

Synthese von antimikrobiellen Polymer-Antibiotika- Konjugaten und Konjugat-Netzwerken

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen

der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

M. Sc. Martin Schmidt

aus Dortmund

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg C. Tiller
2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

Dortmund 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Januar 2018 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg C. Tiller am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften an der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Publikationen

T. Raidt, M. Schmidt, J.C. Tiller, F. Katzenberg; Cross-Linking of Semi-Aromatic Polyesters Towards High Temperature Shape Memory Polymers with Full Recovery, *Macromolecular Rapid Communications*, **2017**, Akzeptiert.

M. Schmidt, L. Bast, F. Lanfer, L. Richter, E. Hennes, R. Seymen, C. Krumm, J. C. Tiller; Poly(2-oxazoline)-antibiotic-conjugates with penicilline, *Bioconjugate Chemistry*, **2017**, 28, 2400-2451.

M. Schmidt, T. Raidt, S. Ring, S. Gielke, C. Gramse, S. Wilhelm, F. Katzenberg, C. Krumm, J. C. Tiller; Investigations on "near perfect" poly(2-oxazoline) based amphiphilic polymer conetworks with a crystallizable block, *European Polymer Journal*, **2017**, 88, 562-574.

M. Schmidt, C. Krumm, J. C. Tiller; Ciprofloxacin with a tail, polymer antibiotic conjugates with high activity, *Scientific Highlights*, **2015**, 21.

M. Schmidt, S. Harmuth, E. R. Barth, E. Wurm, R. Fobbe, A. Sickmann, C. Krumm, J. C. Tiller; Conjugation of ciprofloxacin with poly(2-oxazoline)s and polyethylene glycol via end groups, *Bioconjugate Chemistry*, **2015**, 26 (9), 1950-1962.

Vorträge

M. Schmidt, J. C. Tiller; Conjugation of ciprofloxacin with poly(2-oxazoline)s and polyethylene glycol via end group, IV International Conference on Antimicrobial Research, Torremolinos - Malaga, Spanien, **Juni 2016**.

M. Schmidt, J. C. Tiller; Polymer-antibiotic-conjugates based on ciprofloxacin, 7. Junges Chemie Symposium Ruhr, Dortmund, Deutschland, **Oktober 2016**.

Poster

M. Schmidt, J. C. Tiller, Polymer antibiotic conjugates based on Poly(2-oxazoline)s, 253rd *American Chemical Society National Meeting*, San Francisco, USA, **April 2017**.

M. Schmidt, R. Fobbe, A. Sickmann, C. Krumm, J. C. Tiller; Conjugation of ciprofloxacin with poly(2-oxazoline)s and poly ethylene glycol via end groups, *9. Tag der Chemie*, Dortmund, Deutschland, **Februar 2016**.

M. Hijazi, M. Schmidt, A. Strassburg, N. Rauner, C. Krumm, J. C. Tiller, Antimicrobial polymers in solution and on surfaces, *IV International Conference on Antimicrobial Research*, Torremolinos - Malaga, Spanien, **Juni 2016**.

Danksagung

Herrn Prof. Jörg C. Tiller danke ich herzlich für die Bereitstellung des hoch interessanten Forschungsthemas, den hilfreichen Diskussionen und Anregungen, der hervorragenden Betreuung und der gewährten Forschungsfreiheit.

Ich danke Herrn Prof. Ralf Weberskirch für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Zudem möchte ich mich noch bei Herrn Dr. Frank Katzenberg für seine freundliche Beratung und Unterstützung in fachlichen, didaktischen und allen anderen Lebenslagen bedanken. Herrn Dr. Christian Krumm danke ich für seine überragende fachliche Unterstützung und Beratung sowie für die Durchführung der AFM-Messungen. Herrn Thorsten Moll möchte ich für seine technische Unterstützung im Labor und die Durchführung der GPC-Messungen danken. Frau Monika Meuris vom Zentrum für Elektronenmikroskopie möchte ich herzlich für die überragenden Mikroskopieaufnahmen danken. Herrn Dr. Wolf Hiller und dem gesamten NMR-Team möchte ich für die schnellen NMR-Messungen danken. Ebenso möchte ich Frau Ritta Fobbe vom Leibniz Institut für analytische Wissenschaften für die Durchführung der ESI-MS Messungen danken. Für die Hilfe bei der Bewältigung von bürokratischen Hürden möchte ich Frau Kristine Katzmarczyk danken. Herrn Dr. Jan Volmer vom Lehrstuhl für Bioprozesstechnik danke ich für die Durchführung der PCR-Analysen. Weiterhin möchte ich auch Jonas Lategahn und Hannah Tumbrink vom Lehrstuhl für medizinische Chemie für die Durchführung der Zell-Tests danken.

Meinen Bürokollegen Arne Straßburg und Ramona Plothe, aber auch bei den anderen Mitgliedern des Lehrstuhls, Dr. Nicolas Rauner, Lena Richter, Montasser Hijazi, Dominik Segiet, Thomas Raid, Melanie Leurs, Thorsten Moll, Monika Meuris, möchte ich für eine exzellente Arbeitsatmosphäre und die ständige Bereitschaft zur fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen danken. Die Zusammenarbeit mit Euch hat mir stets große Freude bereitet. Zudem bedanke ich mich besonders bei meinen Masterstudenten Wang Jie, Hekai Xia, Than-Duong Nguyen, Youssef Wolf, Livia Bast, Franziska Lanfer, meinen Bachelorstudenten Alina Romanovska, Elena Wurm sowie meinen Praktikanten Lukas Brieger, Nils Stamm, Veronika Leier, Elisabeth Hennes, Lena Richter, Rana Seymen, Sascha Wilhem, Christian Gramse, Stefan Gilke, Denise Dos Santos, Elena Wall, Eva

Barth, Patrick Dahlhoff, Ulf Bednaski, Benidikt Kruse, Daniel Becker, Sebastian Uppenkamp, Elenora Buchholz. Eure Betreuung hat mir immer Spaß gemacht und ich bin froh, Euch in meinem Team gehabt zu haben. Unseren studentischen Hilfskräften Shinthujah Selvarasa, Umut Sahin, Lutz Kaiser und Sebastian Uppenkamp danke ich für die Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter Irma, meinem Vater Artur und meinem Bruder Frank sowie allen anderen Mitgliedern meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Zum Schluss möchte ich noch meinen Freunden für Ablenkung, Trost und Unterstützung in schweren Zeiten danken, doch vor allem für ihre unbezahlbare Freundschaft. Dabei möchte ich meinem guten Freund Simon Harmuth einen besonderen Dank aussprechen, der mir erst die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat.

„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen, sondern mit den Augen die Türen zu finden.“

(Werner von Siemens)

Kurzzusammenfassung

In Zeiten sich schnell ausbreitender Infektionskrankheiten und resistenter Bakterien existiert ein wachsender Bedarf an neuen Antibiotika. Die Formulierung und Derivatisierung von bekannten Antibiotika ist eine viel versprechende Alternative zur Entwicklung neuer antimikrobieller Verbindungen. Dabei rückt vor allem die Kombination mit Makromolekülen in den Fokus der Wissenschaft. Daher war das Ziel dieser Arbeit die kovalente Verknüpfung von Ciprofloxacin und Penicillin mit dem Polymer Poly(2-oxazolin). Zusätzlich sollten die Konjugate für die Herstellung von antimikrobiellen Materialien verwendet werden.

Die Konjugation von Ciprofloxacin mit Poly(2-oxazolin) führt zu antimikrobiell aktiven Polymer-Antibiotika-Konjugaten. Dabei zeigt die Aktivität dieser Konjugate eine starke Abhängigkeit von der Polymer-Antibiotikum-Bindung. So besitzen die Ciprofloxacin-Konjugate verschiedene Aktivitätsprofile abhängig vom „Spacer“ der zwischen Polymerrückgrat und Antibiotikum liegt. Weiterhin zeigen sowohl das Polymerrückgrat als auch das Molekulargewicht einen Einfluss auf die Aktivität der Konjugate. Die Konjugate besitzen eine hohe Hämo- und Biokompatibilität. Außerdem konnte für eines der Konjugate ein geringes Potential zur Resistenzbildung bei *S. aureus* im Vergleich zu reinem Ciprofloxacin festgestellt werden. Die Konjugation von Penicillin G und Penicillin V mit Poly(2-oxazolin) wurde mittels einer Direktterminierung des lebenden Polymerkettenendes mit den Antibiotika durchgeführt. Die resultierenden Penicillin-Konjugate zeigen eine niedrigere Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Penicillinen. Jedoch verlieren die unmodifizierten Penicilline in Anwesenheit des Enzyms Penicillinase ihre Aktivität im Gegensatz zu den Penicillin-Konjugaten, welche noch aktiv sind. Der Einbau einer quartären Ammoniumgruppe führt zu einer Erhöhung der Konjugataktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von Penicillinase. Des Weiteren konnten mit Hilfe der Antibiotika-Konjugate und amphiphile ABA-Triblockcopolymere antimikrobielle Materialien hergestellt werden. Diese Materialien sind hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität schaltbar.

Abstract

In times of rapid spread of infections and resistant bacteria, there is a growing demand for new antibiotics. The formulation and derivatization of existing antibiotics is a promising alternative to the development of new antimicrobial agents. Especially the covalent bonding of macromolecules to antibiotics moved in focus of research. Therefore, the aim of this work was the covalent attachment of poly(2-oxazoline)s to the antibiotics ciprofloxacin and penicillin. Additionally, the conjugates should be used for the preparation of antimicrobial materials.

The conjugation of ciprofloxacin with poly(2-oxazoline) leads to antimicrobial active polymer-antibiotic-conjugates. The activity of these conjugates is strong influenced by the polymer antibiotic bond. So the ciprofloxacin-conjugates exhibit different activity profiles depending on the spacer between polymer backbone and antibiotic. Furthermore, the nature of the polymer backbone and the molecular weight has an effect on the activity of the conjugates. The conjugates reveal a high hemo- and biocompatibility. Moreover, one conjugate shows a lower potential of resistance formation against *S. aureus* in comparison to ciprofloxacin.

The conjugation of penicillin G and penicillin V with poly(2-oxazolin) was carried out by a direct termination of the living polymer chain end with the antibiotic. The resulting penicillin conjugates shows a lower activity compared to the respective penicillin. In presence of the enzyme penicillinase the pristine penicillins lose their activity in contrast to the penicillin-conjugates, which are still active. The modification of the polymer end group with a quaternary ammonium group leads to an increase of the antimicrobial activity in presence and in absence of penicillinase.

Polymer-Antibiotic-Conjugates were combined with amphiphilic ABA-triblock copolymers to antimicrobial materials. These materials exhibit an antimicrobial switchable activity.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Bakterien	2
1.2.	Antibiotika.....	7
3.2.4.	Penicilline.....	8
3.2.5.	Fluorchinolone.....	12
1.3.	Antibiotikaresistenz.....	15
3.2.6.	Penicillinresistenz	18
3.2.7.	Fluorchinolonresistenz	19
1.4.	Polymer-Antibiotika-Konjugate (PAK)	20
2.	Zielsetzung.....	27
3.	Ergebnisse und Diskussion	28
3.1.	Polymersynthese.....	28
3.1.1.	Endgruppenfunktionalisierung mit Ethylendiamin	28
3.1.1.1.	Funktionalisierung von Polymeren mit Methylstartergruppen	28
3.1.1.2.	Funktionalisierung von Polymeren mit DDA-X und DBX Startergruppen.....	38
3.1.2.	Endgruppenfunktionalisierung von amphiphilen Poly(oxazolinen) mit Ethylendiamin. 42	
3.1.3.	Endgruppenfunktionalisierung von Poly(oxazolinen) mit Aminen.....	45
3.1.4.	Seitenkettenfunktionalisierung mit EDA	48
3.1.5.	Synthese von amphiphilen Triblockcopolymeren	50
3.2.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate.....	53
3.2.1.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels Direktterminierung	53
3.2.2.	Synthese von Ciprofloxacin-„Spacern“	58
3.2.3.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels Konjugation mit xCIP	67
3.2.3.1.	Einfluss des Polymerrückgrates auf die Aktivität der Polymer-xCIP-Konjugate.	72
3.2.3.2.	Einfluss der kritischen Lösungstemperatur auf die Aktivität der Polymer-xCIP- Konjugate	79
3.2.3.3.	Einfluss einer DDA-X-Initiatorgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP- Konjugate	81
3.2.3.4.	Einfluss des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP- Konjugate	86

3.2.3.5.	Antimikrobielle Aktivität von xCIP-Polymer-Konjugaten mit mehr als einer CIP-Funktion	90
3.2.3.6	Einfluss der Polymerendgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP-Konjugate	96
3.2.4.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels eCIP und bCIP.	99
3.2.4.1.	Einfluss des Polymerrückgrates auf die Aktivität der Polymer-eCIP-Konjugate	103
3.2.4.2.	Einfluss einer DDA-X Initiatorgruppe auf die Aktivität der Polymer-eCIP-Konjugate	106
3.2.4.3.	Einfluss des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Aktivität der eCIP-Konjugate	108
3.2.4.4.	Einfluss der Polymerendgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der eCIP-Konjugate	111
3.2.5.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels pCIP.....	116
3.2.5.1.	Einfluss des Polymerrückgrats auf die antimikrobielle Aktivität der pCIP-Konjugate	118
3.2.6.	Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels peCIP.....	120
3.2.6.1.	Einfluss des Polymerrückgrats auf die antimikrobielle Aktivität der peCIP-Konjugate	122
3.2.7.	Amphiphile Ciprofloxacin-Konjugate	123
3.2.8.	Biologische Untersuchung der Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate.....	129
3.2.8.1.	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten	129
3.2.8.2.	Bestimmung der Hämokompatibilität	131
3.2.8.3.	Bestimmung der Zelltoxizität	133
3.2.8.4.	Untersuchung des Resistenzbildungspotentials	135
3.2.8.5.	Untersuchung der Aktivität gegen Bakterien mit einer Effluxpumpenüberregulation.....	139
3.2.8.6.	Untersuchung der Topoisomerase IV in Polymer-Antibiotika-Konjugaten und CIP resistenten <i>S. aureus</i>	142
3.2.9.	Zusammenfassung der Ciprofloxacin-Polymer-Konjugate.....	143
3.3.	Polymer-Penicillin-Konjugate.....	146
3.3.1.	Synthese von Polymer-Penicillin-Konjugate	146
3.3.2.	Untersuchung der Langzeitstabilität der Polymer-Penicillin-Konjugate.....	156
3.3.3.	Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der Polymer-Penicillin-Konjugate	158
3.3.4.	Untersuchung der Penicillinasestabilität.	160
3.3.5.	Untersuchung der Hämokompatibilität der Polymer-Penicillin-Konjugate	165

3.3.6.	Zusammenfassung der Penicillin-Polymer-Konjugate.....	166
3.4.	Antimikrobielle Materialien	168
3.4.1.	Herstellung von antimikrobiellen Materialien auf Basis kovalent vernetzter Polymernetzwerke	168
3.4.1.1.	Herstellung der Polymer Netzwerke	168
3.4.1.2.	Untersuchung der Netzwerkeigenschaften.....	172
3.4.1.3.	Einbau von Penicillin-Polymer Konjugate in Polymernetzwerke	173
3.4.2.	Herstellung von antimikrobiellen Materialien auf Basis nicht kovalent vernetzter Polymernetzwerke.....	178
3.4.3.	Zusammenfassung der antimikrobiellen Materialien	184
4.	Zusammenfassung.....	186
5.	Experimental Teil.....	192
5.1.	Materialien.....	192
5.2.	Geräte und Methoden.....	193
5.3.	Synthesen	197
5.4.	Methoden.....	223
5.5.	Biologische Untersuchungen.....	225
6.	Literatur	232
7.	Erklärung.....	248
8.	Lebenslauf	249
9.	Anhang.....	250
9.1	MIC-Werte der einzelnen Konjugate in [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] und [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	250
9.2.	^1H -NMR-Spektren	256
9.3.	Chromatogramme	307

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
APCN	engl. <i>Amphiphilic Polymer Conetwork</i>
ATR	engl. <i>Attenuated total reflection</i> (Abgeschwächte Totalreflektion)
bCIP	<i>N</i> -(3-Brompropanoyl)-ciprofloxacin
Bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CDCl ₃	Deuteriertes Chloroform
CHCl ₃	Chloroform
cPrOx	<i>2-cyclo</i> -Propyl-2-oxazolin
CP	engl. <i>Cloud Point</i>
CPD	Zitrat-Phosphat-Dextrose-Puffer
CoA	Coenzym A
δ	Chemische Verschiebung
D ₂ O	d ₂ -Deuteriertes Wasser
DBB	<i>Trans</i> 1,4-Dibrom-2-buten
DBX	α,α'-Dibrom- <i>p</i> -xylol
DCM	Dichlormethan
DDA	<i>N,N</i> -Dimethyldodecylamin
DDA-X	4-(Brommethyl)- <i>N</i> -dodecyl- <i>N,N</i> dimethylbenzylammonium-bromid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribunucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DP	<i>Degree of Polymerization</i>
DTAC	Dodecyltrimethylammoniumchlorid
δ	Löslichkeitsparameter
X	

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. c</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCIP	N-(2-Chloracetyl)-ciprofloxacin
EC_{50}	effektive Konzentration
EDA	1,2-Ethylendiamin
EHEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
eq.	Äquivalent
Et_2O	Diethylether
EtOx	2-Ethyl-2-oxazolin
Fd	Funktionalisierungsgrad
ESI-MS	<i>engl. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FT-IR	Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie
g	Gramm
Gew. %	Gewichtsprozent
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HC_{50}	Hämokompatibilitäts Konzentration 50
HepOx	2-Heptyl-2-oxazolin
Hz	Hertz
I	Initiator
<i>iPrOx</i>	2- <i>iso</i> -Propyl-2-oxazolin
<i>J</i>	Kopplungskonstante
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K. p</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
konz.	Konzentriert
L	Liter
μ	Micro
m	Milli
M	Molare Masse
M_n	Zahlenmittleres Molekulargewicht
M_w	Gewichtsmittleres Molekulargewicht

Me	Methyl
MeOH	Methanol
MeOx	2-Methyl-2-oxazolin
min	Minuten
mol.%	Molprozent
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MRSA	Methicillin-Resistente- <i>Staphylococcus aureus</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. a</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
pCIP	<i>N</i> -(propylglycin)-ciprofloxacin
PcPrOx	Poly(2- <i>cyclo</i> -Propyl-2-oxazolin)
peCIP	<i>N</i> -(<i>N</i> -(2-chloroacetyl)- <i>N</i> -propylglycine)- ciprofloxacin
PEtOx	Poly(2-ethyl-2-oxazolin)
PiPrOx	Poly(2- <i>iso</i> -propyl-2-oxazolin)
PHepOx	Poly(2-heptyl-2-oxazolin)
PMeOx	Poly(2-methyl-2-oxazolin)
ppm	<i>Parts per million</i>
ρ	Dichte
R	Rest
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
S	Volumenquellgrad
S _{N2}	Nukleophile Substitution zweiter Ordnung
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. a</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. m</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
T	Temperatur
T_g	Glasübergangstemperatur
T_m	Schmelzpunkt
TREN	<i>N,N</i> -Bis(2-Aminoethyl)ethylendiamin
UV/Vis	<i>Ultraviolet/Visible</i>
Vol.%	Volumenprozent
V_s	molare Volumen des Lösungsmittels Chloroform
Φ	reziproke Volumenquellgrad
X	Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter
xCIP	<i>N</i> -(4-(Chlormethyl)benzyl)-ciprofloxacin

Einleitung

1. Einleitung

Bakterien zählen zu den ältesten Lebewesen der Erde und gehören neben den Archaeen und den Eukaryoten zu einer der drei Domänen des Lebens.¹ Sie sind allgegenwärtig und kommen in den verschiedensten Formen in der Natur vor.¹ Im und auf dem Menschen leben mehr als 10^{14} Bakterien, das sind zehnmal mehr als er körpereigene Zellen besitzt.² Darunter befinden sich mindestens 400 verschiedene Arten, von denen die meisten im Verdauungstrakt angesiedelt sind (Darmflora). In nahezu allen Fällen sind diese Bakterien harmlos, wenn nicht sogar nützlich.³ Darüber hinaus, hat sich der Mensch viele Bakterien zu Nutze gemacht, so werden heutzutage für viele industrielle Prozesse wie die Käseproduktion⁴ oder die Bioethanol-Herstellung⁵ Bakterien verwendet. Allerdings gibt es neben den scheinbar harmlosen und nützlichen Bakterien auch schädliche Bakterienstämme.⁶ Diese sogenannten Pathogene können körperfremde Bakterien oder vermeintlich harmlose Bakterien sein, die in sensible Stellen des menschlichen Körpers vordringen. An diesen Stellen des Körpers angelangt, können die pathogenen Keime zu Infektionen oder Organschäden führen.⁷ Viele Jahrhunderte lang stellten diese bakteriellen Infektionen ein großes Problem dar, da viele dieser Krankheiten zu langfristigen, gesundheitlichen Schäden oder zum Tod führten. Zudem sind viele bakterielle Krankheiten auf andere Menschen übertragbar, wodurch sich diese auf eine große Menschenpopulation ausbreiten können. Erst durch die Entdeckung des Penicillins, ist der Mensch in der Lage bakteriellen Infektionen gezielt und wirksam entgegenzuwirken.^{8, 9} Die Entdeckung des Penicillins war ein Meilenstein in der Medizin und sorgte für die Entwicklung vieler weiterer Antibiotikaklassen. Bakterielle Infektionen und Krankheiten schienen der Vergangenheit anzugehören, jedoch führten ein unverhältnismäßig hoher und vor allem ein falscher Gebrauch von Antibiotika zu einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegenüber genau diesen Wirkstoffen.¹⁰ Heutzutage existieren daher Bakterien, die gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent sind.¹¹ Diese multi-resistenten Keime sind häufig Problemkeime und potentielle Auslöser für Hospitalinfektionen (wie z. B. der Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)).¹² Zudem wurde in den letzten Jahren eine immer kleinere Anzahl an Antibiotika für den Markt zugelassen (Abbildung

Einleitung

1).¹³ Daher ist die Entwicklung neuer Antibiotika, die eine schnelle Resistenzbildung vermeiden oder gezielt gegen den Resistenzmechanismus vorgehen, unabdingbar.

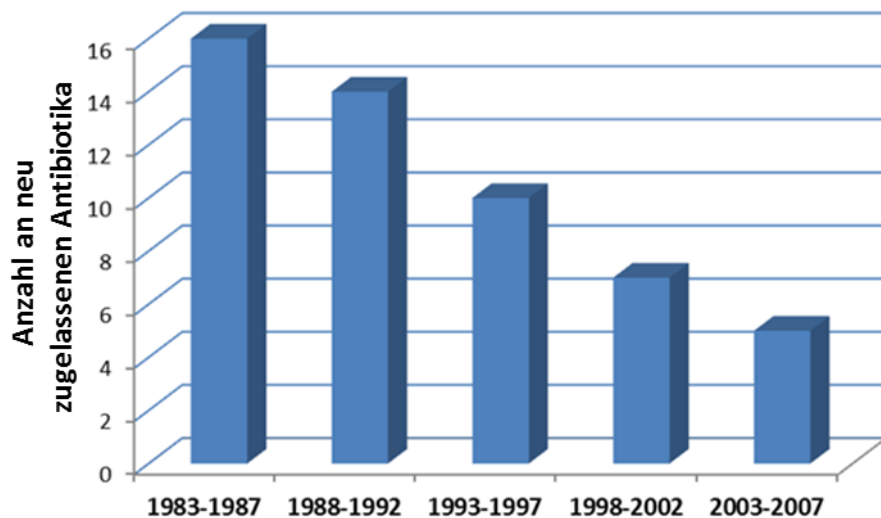


Abbildung 1: Anzahl an neu zugelassenen Antibiotika von 1983 bis 2007.¹³

1.1. Bakterien

Die Bakterien bilden eine der drei grundlegenden Domänen des Lebens, in die alle Organismen eingeteilt werden.^{14,15} Dabei sind sie wie die Archaeen Prokaryoten, da ihre DNA frei im Zytoplasma vorliegt und nicht von einem Zellkern umschlossen wird.¹⁴ Dadurch unterscheiden sich Bakterien grundlegend von den tierischen und pflanzlichen Zellen, diese besitzen einen Zellkern und gehören somit zu den Eukaryoten. Bakterien kommen in fast jedem bekannten Lebensraum der Erde vor. So leben Bakterien in Ozeanen, in der Erde oder im menschlichen Körper. Dabei kann die Größe und Form der Bakterien stark variieren. Es existieren zum Beispiel kugelförmige Bakterien, sogenannte Kokken, oder zylinder-förmige Bakterien (*Bacillus*, *Escherichia*).¹⁶ Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen von verschiedenen Bakterienstämmen.

Einleitung

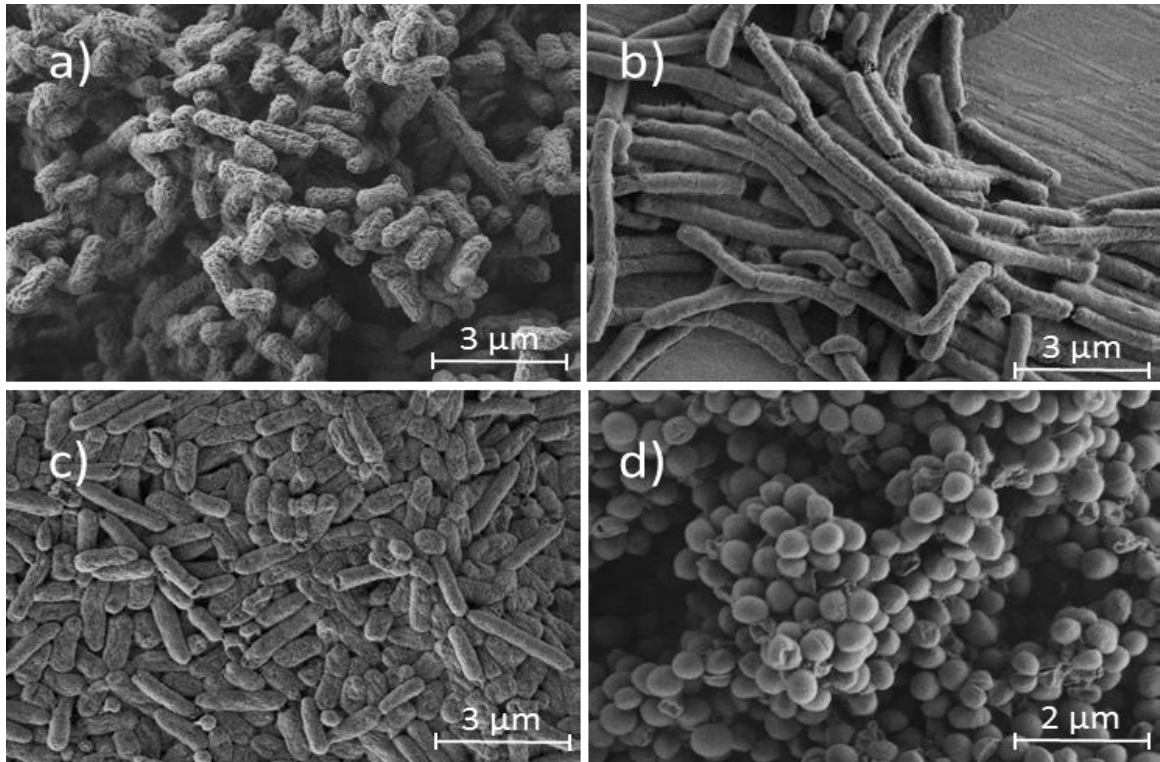


Abbildung 2: REM-Aufnahmen von verschiedenen Bakterienstämmen: a) *Escherichia coli*, b) *Lactobacillus casei*, c) *Pseudomonas aeruginosa* und d) *Staphylococcus aureus*. Die Aufnahmen zeigen die Bakterien bei einer 4500 bis 6000 fachen Vergrößerung. Vor der Messung wurden die Bakterienproben mit Glutaraldehyd vernetzt und gefriergetrocknet. Die Aufnahmen wurden an unserem Lehrstuhl durch MONIKA MEURIS aufgenommen.

Ebenso wie in ihrer äußeren Erscheinungsform, unterscheiden sich die verschiedenen Bakterienarten auch hinsichtlich ihrer Lebensweise und ihres Stoffwechsels. Viele Bakterienarten nutzen chemische Reaktionen zur Energiegewinnung. Dieser Stoffwechseltyp wird Chemotrophie genannt.^{17, 18} Dabei können sie eine Vielzahl an energiereichen organischen oder anorganischen Substraten verarbeiten. Neben der chemotrophen Lebensweise existieren einige Bakterien, wie das Cyanobakterium, die fähig sind Photosynthese zu betreiben.^{19, 20} Während viele phototrophe und einige der chemotrophen Bakterienstämme auf Sauerstoff zum Überleben angewiesen sind, (aerob) existieren auch einige chemotrophe Bakterien für die Sauerstoff tödlich ist (anaerobe).²¹ Allerdings sind viele chemotrophe Arten fakultativ anaerob, was bedeutet, dass sie sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Luftsauerstoff überleben und ihren Stoffwechsel anpassen können.²¹ Obwohl sich die Lebensweise der einzelnen

Einleitung

Bakterienstämme stark unterscheiden kann, bildet jedoch der Aufbau ihrer Zellwand das Hauptunterscheidungsmerkmal und teilt die Bakterien in GRAM-positive und in GRAM-negative Stämme. Diese Einteilung lässt sich auf eine Färbemethode mit Kristallviolett, Lugolscher Lösung und Ethanol zurückführen, welche im 19. Jahrhundert von HANS CHRISTIAN GRAM entwickelt wurde.²² Danach liegen GRAM-negative Bakterien nach der Färbungsmethode farblos und GRAM-positive Bakterien in dunkelblau vor. Die Blaufärbung der GRAM-positiven Bakterien resultiert durch die dickere Zellwand. Diese verhindert eine vollständige Entfernung des eingelagerten Färbemittels durch die Behandlung mit Ethanol.

Der Grundaufbau von GRAM-positiven und GRAM-negativen Bakterien ist gleich. Beide Zellen bestehen aus Zytoplasma, welches von einer Zytoplasmamembran umschlossen wird. Im Zellinneren befindet sich neben den Ribosomen auch ein DNA-Strang, der frei im Zytoplasma vorliegt.^{23, 24} Die Zytoplasmamembran besteht zu einem Großteil aus Phospholipiden^{24, 25} und besitzt bei den meisten Bakteriengattungen eine ähnliche Struktur. Die Phospholipide bestehen aus einem Diglycerid, welches an einer Phosphatgruppe gebunden ist. Diese Phosphatgruppe besitzt einen weiteren Substituenten wie zum Beispiel Cholin, Glycerin, Ethanolamin oder Serin.²⁶⁻³² In der Membran ordnen sich die Phospholipide zu einer Doppelschicht an, wobei die hydrophoben Fettsäurereste des Diglycerids ins Innere der Membran und die Phosphorgruppe nach außen weisen.³³ Dabei besitzt die Membran auch viele Phospholipide mit negativ geladenen Kopfgruppen (Phosphatgruppe mit Substituent) sowie negativ geladene Teichonsäuren, wodurch die Membranoberfläche eine negative Netto-Ladung erhält.^{30, 31} Die Zytoplasmamembran wird von einer Zellwand umgeben, welche hauptsächlich aus Peptidoglycanschichten besteht, auch Murein genannt.³⁴ Das Murein besteht aus Polysaccharid-Strängen, die aus β -(1, 4) glykosidisch verknüpften Zuckerderivaten (*N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin) aufgebaut sind.^{35, 36} Dabei bilden vier dieser Zuckerpaare die Windung einer rechtsdrehende Helix.³⁷ Jede *N*-Acetylmuraminsäureeinheit besitzt ein Pentapeptid, welches für die Quervernetzung der einzelnen Polysaccharid-Stränge erforderlich ist. Diese Quervernetzung kann zum einen über eine Peptidbrücke oder direkt erfolgen.³⁸⁻⁴⁰ Die Vernetzungen bauen die Zellwand zu einem dreidimensionalen Netzwerk auf, wobei die Dicke variieren kann (GRAM-positiv:

Einleitung

16-80 nm und GRAM-negative: 6-10 nm).³⁹⁻⁴¹ Die Zellwand bildet eine stabile jedoch poröse Schutzschicht. Während GRAM-positiven Bakterien eine Zellwand aus vielen Schichten Murein besitzen, weisen GRAM-negative Bakterien nur wenige Mureinschichten auf. Dafür werden diese aber durch eine zusätzliche Membran umschlossen. Diese Membran ist ebenfalls als Doppelschicht aufgebaut, unterscheidet sich jedoch im Wesentlichen von der Zytoplasmamembran. Die innere Schicht besteht ähnlich wie bei der Zytoplasmaschicht aus verschiedenen Phospholipiden. Die äußere Schicht hingegen besteht zu einem Großteil aus Lipopolysacchariden.⁴² Die Lipopolysaccharide bestehen aus einem Zucker und einem fettähnlichen Bestandteil. Der Aufbau der Lipopolysaccharide lässt sich in drei Bereiche einteilen, dem Lipid A, der Kernregion und der Polysaccharidkette. Das Lipid A besteht aus einem Disaccharid an dem Fettsäuren über eine Esterbindung gebunden sind.^{12, 43} Diese Komponente ist für die Verankerung in die Membran verantwortlich. Daran angeknüpft ist die Kernregion, welche aus verschiedenen Sacchariden besteht.^{12, 44} An die Kernregion schließt ein Polysaccharid aus 25-50 Wiederholungseinheiten an.⁴² Zudem durchzieht diese Membran eine Vielzahl an Proteinen, diese sind für Transportaufgaben oder Signalübertragung verantwortlich.^{12, 45} In Abbildung 3 sind schematische Darstellungen der beiden bakteriellen Zellwände dargestellt.

Einleitung

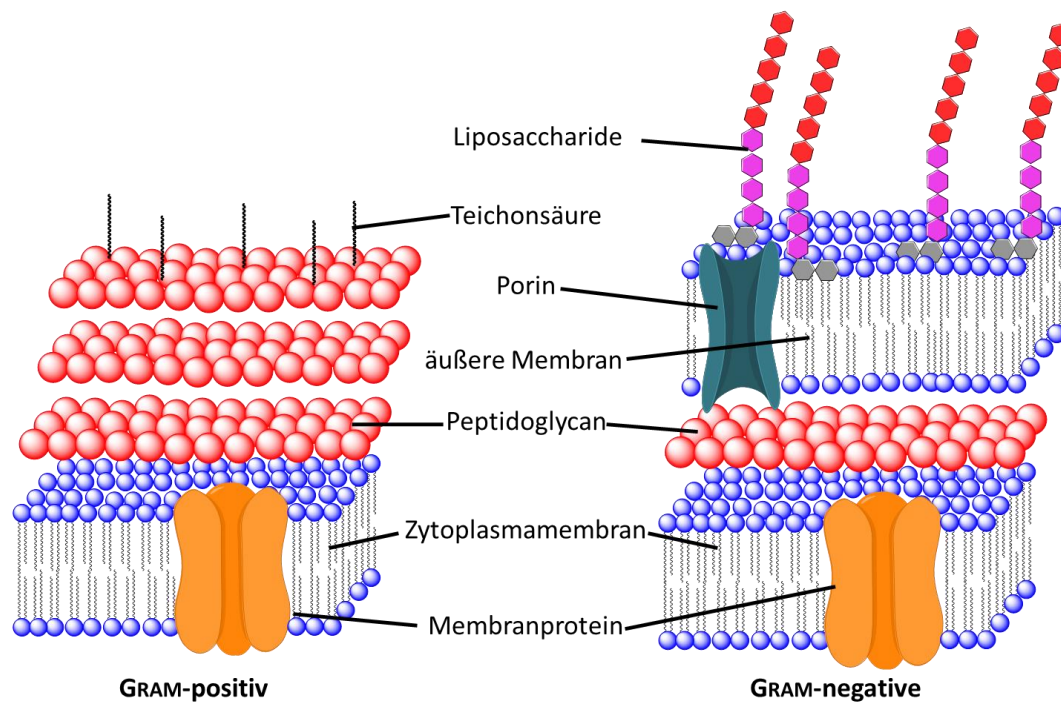


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Bakterienzellwände bei GRAM-positiven Bakterien (links) und GRAM-negativen (rechts). ^{1 46 47} Dargestellt ist die Zytoplasmamembran, eine Peptidoglycanschicht und eine äußere Membran im Falle der GRAM-negativen Bakterien. Diese besteht unter anderem aus Liposacchariden, die sich aus Lipid A (grau), einer Kernregion (pink) und einem Polysaccharid (rot) zusammensetzen.

Die Fortpflanzung findet bei Bakterien durch asexuelle Zellteilung statt. Dabei kann die Zellteilung durch eine Querteilung erfolgen. Allerdings ist eine Knospung oder Sporenbildung ebenfalls möglich. ⁴⁸⁻⁵⁰ Darüber hinaus können Bakterien ihre Erbinformation über parasexuelle Wege austauschen. Dieser Austausch erfolgt in den meisten Fällen über die Aufnahme freier DNA-Fragmente aus der Umgebung (Transformation), ⁵¹ über einen Plasmidaustausch mit einem anderen Bakterium (Konjugation) ⁵² mittels Sexpilus ^{12, 52} oder über einen DNA-Transfer mit Hilfe von Bakteriophagen (Transduktion). ⁵² Diese Form der DNA-Übertragung kann auch zwischen verschiedenen Bakterienstämmen stattfinden und spielt eine große Rolle bei der Resistenzbildung gegenüber Antibiotika.

Einleitung

1.2. Antibiotika

Die Entdeckung der Antibiotika gehört zu einer der bedeutendsten Entwicklungen der Medizingeschichte und ermöglichte die gezielte Bekämpfung bakterieller Infektion. Viele bakterielle Infektionen, die vor der Entwicklung der Antibiotika meist tödlich verliefen, konnten daraufhin effektiv behandelt werden. Die ersten Antibiotika waren Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen wie Schimmelpilzen.⁵³⁻⁵⁵ Heutzutage werden Antibiotika hauptsächlich bio- oder semisynthetisch hergestellt. Eine der wenigen Ausnahmen bildet die Antibiotikaklasse der Chinolone. Diese wird vollsynthetisch produziert.⁵⁶ Je nach Wirkungsart des Antibiotikums wird zwischen einem bakteriziden und einem bakteriostatischen Wirkungstyp unterschieden. Antibiotika mit einer bakteriostatischen Wirkung verhindern lediglich eine Keimvermehrung, wodurch eine Inaktivierung der Bakterien durch das Immunsystem erleichtert wird, wohingegen Antibiotika mit bakterizider Wirkung eine Abtötung der Bakterien bewirken.¹² Dabei können die Angriffspunkte der einzelnen Antibiotikaklassen sehr verschieden sein. Viele Antibiotika haben bestimmte Strukturen oder Mechanismen der prokaryotischen Zelle als Zielstruktur, welche sich deutlich von denen in eukaryotischen Zellen unterscheiden.⁵⁷ So kann ein Antibiotikum gezielt die Hemmung der Zellwandsynthese, der Proteinbiosynthese oder der DNA-Replikation einer Bakterienzelle bewirken. Dadurch wird eine gute Verträglichkeit der Antibiotika für Menschen und Tier gewährleistet. Einen Überblick über die Zielstrukturen in prokaryotischen Zellen gibt Abbildung 4.

Einleitung

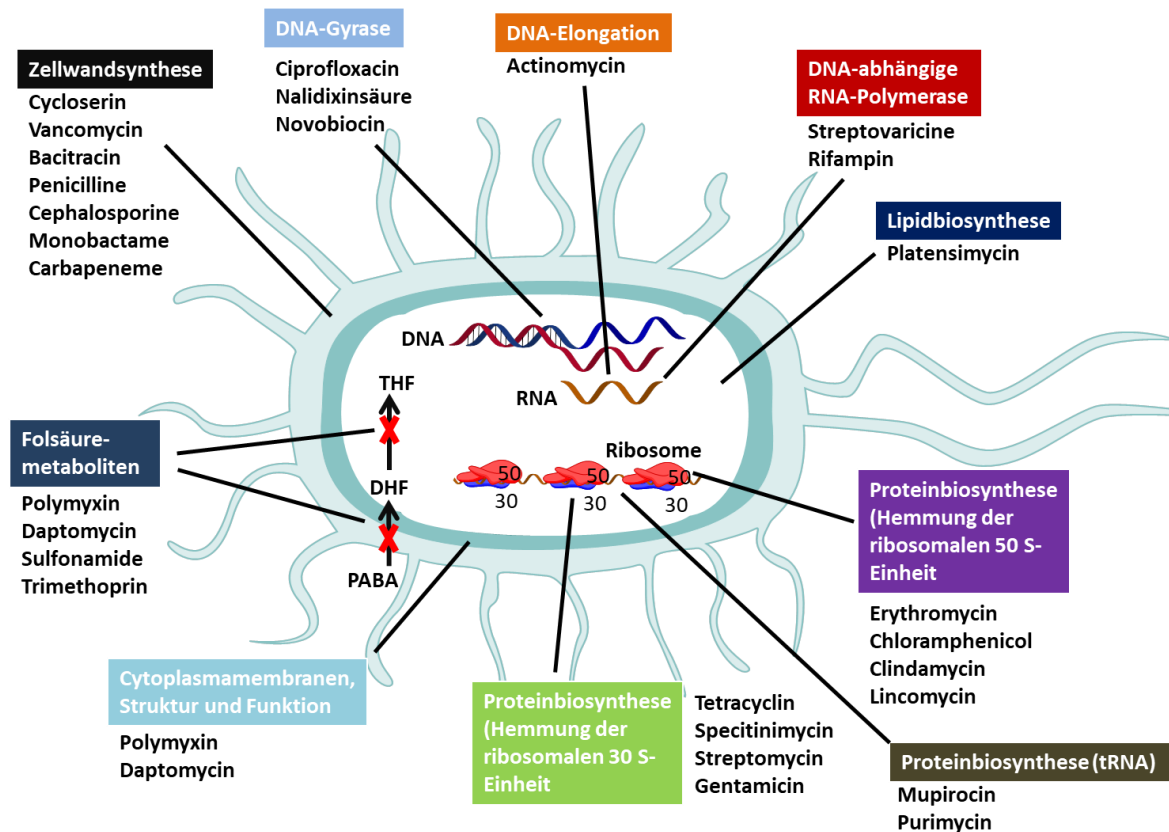


Abbildung 4: Angriffspunkte einzelner Antibiotika auf die Bakterienbestandteile nach MADIGAN et al.. THF: Tetrahydrofolsäure, DHF: Dihydrofolsäure und PABA: *p*-Aminobenzoesäure. ^{41, 57}

Allerdings unterscheiden sich Bakterien in ihren Strukturen und ihrem Aufbau, sodass einige Zielstrukturen je nach Art verändert vorliegen können oder gar nicht vorhanden sind. Daher zeigen nicht alle Antibiotika bei jeder Bakterienart die gleiche Wirkung. Jedes Antibiotikum besitzt somit ein eigenes Wirkspektrum.

1.2.1. Penicilline

Penicilline sind seit mehr als 80 Jahren in klinischer Anwendung und gehören somit zu einer der ältesten Antibiotikagruppen. ^{55, 57} Sie lassen sich mit den Cephalosporinen in die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika zusammenfassen. Die Grundstruktur der Penicilline wird von der antimikrobiell inaktiven 6-Aminopenicillansäure abgeleitet (vergleiche

Einleitung

Abbildung 5), wobei das bicyclische Ringsystem aus einem viergliedrigen β -Lactamring und einem fünfgliedrigen Thiazolidinring besteht.⁵⁸

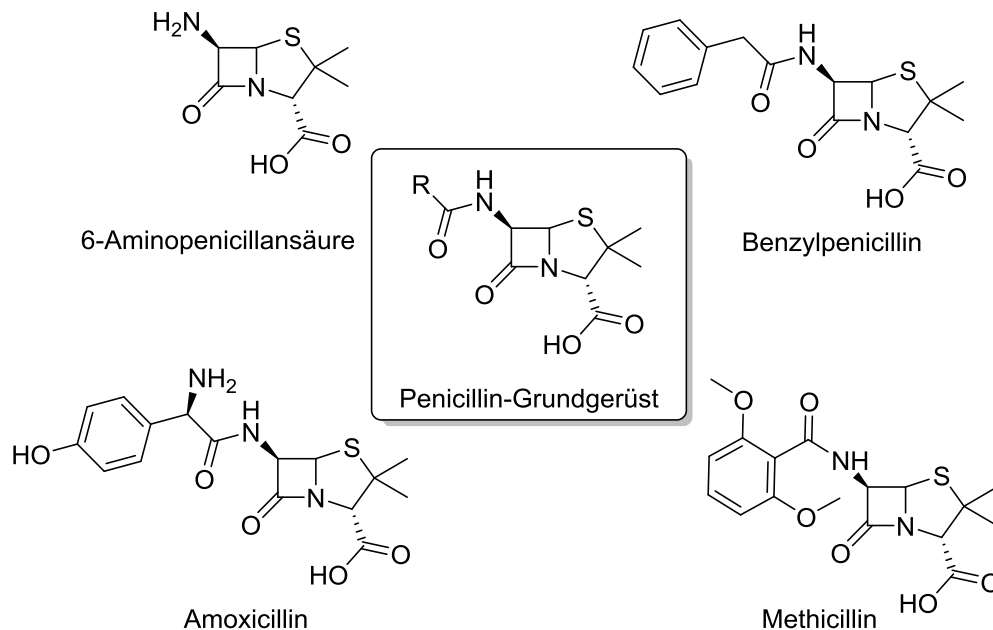


Abbildung 5: Grundstruktur der Penicilline (Mitte). Ebenso sind die Antibiotika Benzylpenicillin (Penicillin G), Amoxicillin und Methicillin sowie die nicht antimikrobielle 6-Aminopenicillansäure aufgeführt.⁵⁸

1928 wurde Penicillin aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* isoliert. In den folgenden Jahren wurden weitere penicillinproduzierende Schimmelpilzgattungen, wie *Aspergillus* und *Trichophyton* entdeckt. Durch die Kultivierung von *Penicillium chrysogenum*,⁵³⁻⁵⁵ die mehr Penicillin synthetisieren, war eine großtechnische fermentative Herstellung von Penicillinen möglich. Das auf diesem Wege erhaltene Penicillin war allerdings keine einheitliche Substanz, sondern ein Gemisch aus vier Penicillinvarianten, die mit den Buchstaben F, G, X und K bezeichnet wurden. Von den natürlich vorkommenden Penicillinen hat heute nur noch das Penicillin G (Benzylpenicillin) eine therapeutische Bedeutung.⁵⁵ In Mikroorganismen wird Penicillin G aus den drei Aminosäuren L-Aminoadipinsäure, L-Cystein und L-Valin hergestellt. Durch mehrere enzymatische Reaktionen wird zunächst Isopenicillin N gewonnen. Anschließend wird die hydrophile Seitenkette (Aminoadipoyl-Rest) des β -Lactamrings

Einleitung

und gegen ein Phenylacetyl-CoA ausgetauscht, wodurch Penicillin G entsteht.⁵⁹ Durch Anreicherung mit korrespondierenden Säuren ist eine Biosynthese von nicht natürlichen Penicillinen in Kulturmedien möglich. Somit kann durch eine Anreicherung mit Phenoxyessigsäure das Phenoxyethylpenicillin (Penicillin V) erhalten werden.⁶⁰ Andere Penicilline werden hingegen teilsynthetisch hergestellt. Dafür wird die, durch enzymatische Hydrolyse aus Penicillin G gewonnene 6-Aminopenicillansäure mit verschiedenen Carbonsäuren oder Carbonsäurechloriden umgesetzt.^{61, 62} Durch biosynthetische und teilsynthetische Methoden ist heute eine Vielzahl von Penicillinen zugänglich. So konnten verschiedenste Penicilline wie das säurestabile Phenoxyethylpenicillin³⁹ oder das penicillinase stabile Methicillin^{62, 63} erhalten werden. Ebenfalls konnten Penicilline mit einem breiteren Wirkspektrum, als das Amoxicillin auf diesem Wege hergestellt werden.⁶⁴

Die bakterizide Wirkung der Penicilline tritt bei der Zellteilung ein, indem das Antibiotikum die Quervernetzung der Peptidoglykanschicht durch das Enzym Transpeptidase verhindert.^{65, 66} Die Quervernetzung erfolgt normalerweise durch die Transpeptidase, welches in Anwesenheit von Penicillinen, diese als falsches Substrat irreversibel bindet. Die Penicilline ähneln hinsichtlich der Position der Carbonylgruppe dem *D-Ala-D-Ala*-Terminus der Peptidoglycankette (vergleiche Abbildung 6 oben rechts). Daher konkurriert das Penicillin mit der eigentlichen Zielstruktur der Transpeptidase, dem *D-Ala-D-Ala*-Terminus der Peptidoglycankette. Im Gegensatz zum *D-Ala-D-Ala*-Terminus bindet das Penicillin irreversibel und inhibiert somit das Enzym.⁶⁷ In Abbildung 6 ist die Inhibierung der Transpeptidase durch Penicillin schematisch dargestellt. Das β -Lactamantibiotikum reagiert mit einer Serineinheit des aktiven Zentrums der Transpeptidase, was zur Öffnung des β -Lactamrings führt.⁵⁷ Da die Hydrolyse der entstandenen acylierten Transpeptidase nur sehr langsam erfolgt, kommt es durch die Bindung des Antibiotikums zur Inaktivierung des Enzyms, wodurch der Neuaufbau der Zellwand nicht mehr möglich ist und das Bakterium seine äußere Schutzhülle verliert.⁵⁷ Aufgrund der fehlenden Quervernetzungen ist die Bakterienzellwand sehr instabil und die Zelle wird durch den osmotischen Druck des Zytoplasmas irreversibel geschädigt. Penicilline entfalten aufgrund ihres Mechanismus ihre Wirkung ausschließlich gegen sich vermehrende Bakterien, bei Keimen, die sich nicht in der Teilungsphase befindet, muss

Einleitung

die Zellwand nicht erneuert werden. Zudem sind die meisten Penicilline nur gegen GRAM-positive Bakterien wirksam, da GRAM-negative Keime durch ihre zusätzliche äußere Membran geschützt werden. Die Ausnahmen sind unter anderem Amino-, Acylamino- und Carboxypenicillin. Diese Penicilline können die äußere Membran passieren, zur Peptidoglykanschicht vordringen und somit auch eine Wirksamkeit gegen GRAM-negative Keime erzielen.^{68, 69}

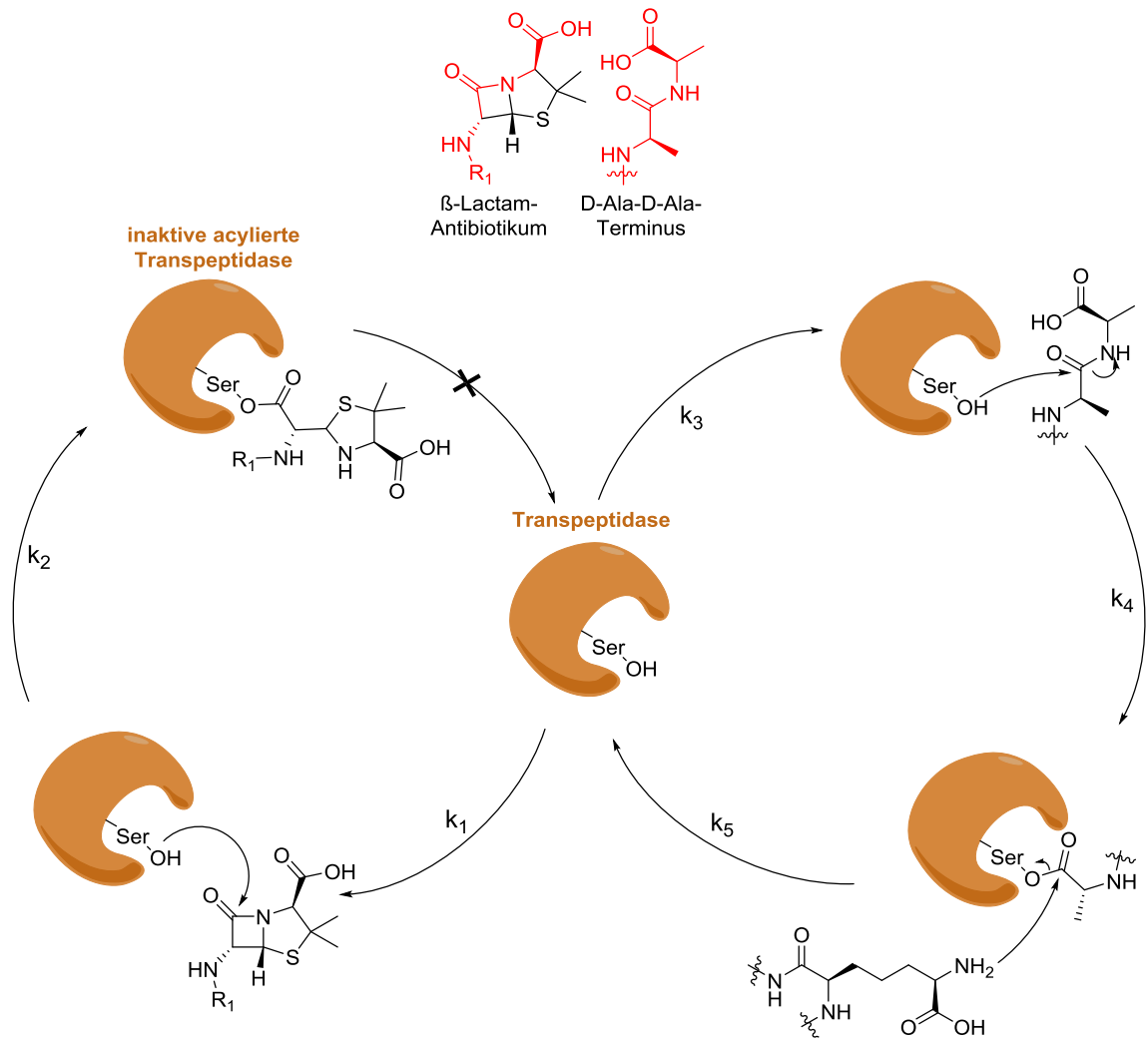


Abbildung 6: Oben ist ein struktureller Vergleich zwischen β -Lactam-Antibiotika und der terminalen Sequenz der Peptidoglykankette abgebildet. Zudem ist in der Mitte der Mechanismus der Transpeptidase-Inhibition durch Penicillin (links) sowie der Peptidoglykanvernetzung (rechts) nach CHELLAT et al. dargestellt.^{57, 70}

Einleitung

Penicilline sind noch heute im medizinischen Gebrauch, obwohl schon kurze Zeit nach der Markteinführung erste Abwehrmechanismen der Bakterien beobachtet werden konnten. Die Wirkweise der Penicilline, sowie die Abwehrmechanismen der Bakterien sind seit langem bekannt und wurden bereits intensiv untersucht, daher eignen sie sich gut als Modellantibiotika.

1.2.2. Fluorchinolone

Chinolone sind die zurzeit bekanntesten synthetisch⁷¹ hergestellten Antibiotika, die eine wichtige Stellung in der Humanmedizin einnehmen. Der erste Vertreter dieser Antibiotikagruppe war die Nalidixinsäure (siehe Abbildung 7), diese lässt sich strukturell, wie alle Chinolone vom Chinolin ableiten.⁵⁶ Die neueren Vertreter dieser Antibiotikagruppe besitzen ein Fluoratom in 6-Stellung und werden daher als Fluorchinolone bezeichnet. Zudem zeichnen sich alle antimikrobiell-aktiven Fluorchinolone durch eine Carbonylgruppe in 4-Stellung und eine Carbonsäuregruppe in 3-Stellung, sowie einen Substituenten in 1- und 7-Position aus. Hierbei lassen sich im wesentlich vier Generationen von Fluorchinolonen identifizieren.^{56, 72, 73} Fluorchinolone der ersten Generation besitzen nur eine geringe orale Resorption sowie eine niedrige Aktivität gegenüber GRAM-positiven Bakterien. Außerdem konnte eine schnelle Resistenzentwicklung beobachtet werden.^{56, 74} Dahingegen zeichnen sich Fluorchinolone der zweiten Generation durch eine bessere Resorption und ein deutlich breiteres Wirkspektrum aus, das auch GRAM-positive Keime und *Pseudomonas aeruginosa* umfasst.⁵⁶ Die Fluorchinolone der dritten und der vierten Generation weisen eine gesteigerte antimikrobielle Wirkung im GRAM-positiven Bereich (gegen Streptokokken und Pneumokokken) sowie gegen Anaerobier auf.⁵⁶ Einer der bekanntesten Vertreter dieser Antibiotikagruppe ist das Ciprofloxacin (CIP). CIP besitzt einen apolaren Cyclopropylrest am N1-Atom, wodurch die Aktivität gegenüber Enterobakterien, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* erhöht wird.⁷² Zudem besitzt es neben einem Fluor- auch einen Piperazinsubstituenten am Benzolring. Dieser verbessert die antimikrobielle Aktivität des Fluorchinolons gegenüber GRAM-

Einleitung

negativen Bakterien. ⁷² Abbildung 7 zeigt das Fluorchinolon-Grundgerüst sowie verschiedene Vertreter dieser Antibiotikaklasse.

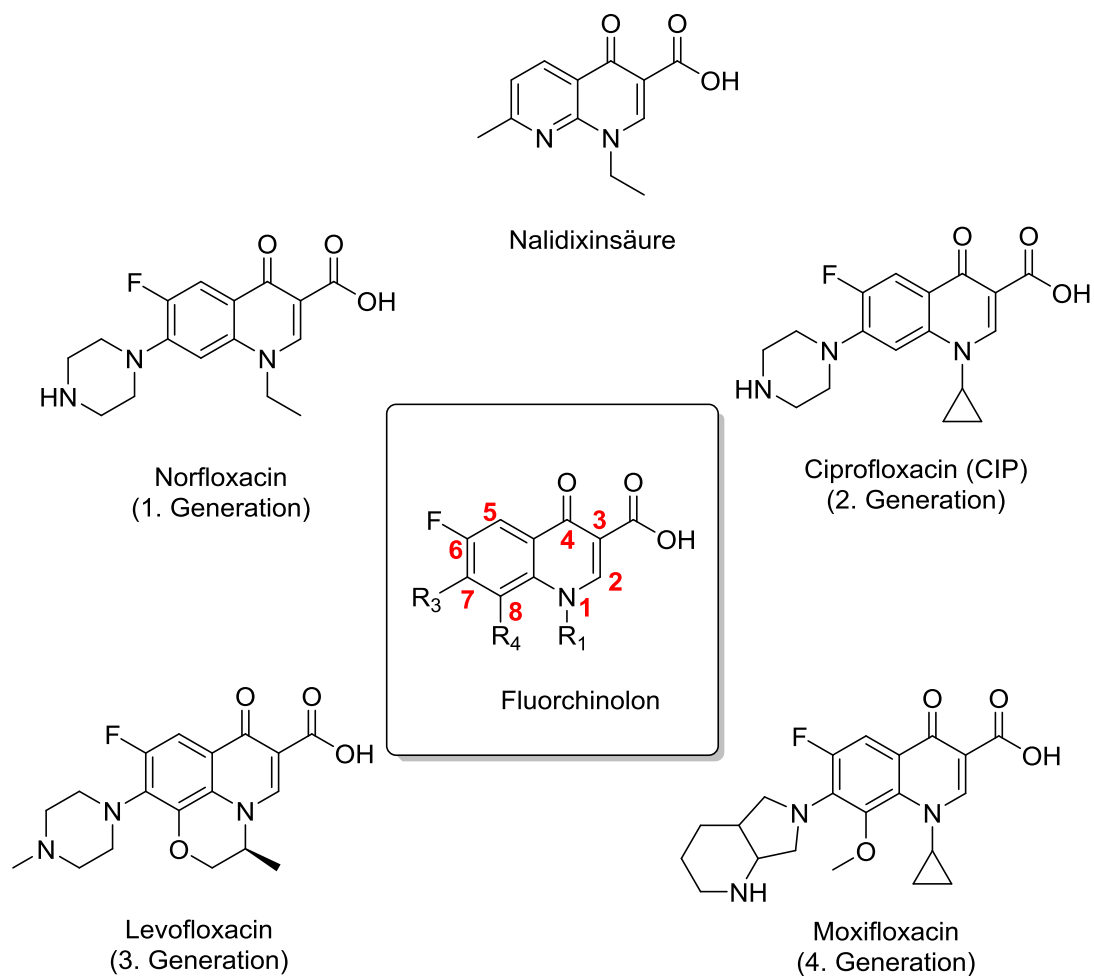


Abbildung 7: Grundgerüst der Fluorchinolone sowie die Fluorchinolonantibiotika Norfloxacin, Ciprofloxacin, Levofloxacin und Moxifloxacin. Oben ist zusätzlich die Struktur der Nalidixinsäure abgebildet. ^{56 74}

Die antimikrobielle Wirkung neuerer Fluorchinolone kommt durch Hemmung der nur in Bakterien vorkommenden Enzyme Gyrase bzw. Topoisomerase IV zustande. ⁷⁵ Die Gyrase sowie die Topoisomerase IV sind essentiell für die bakterielle DNA-Replikation. Die Gyrase ist ein Tetramer und besteht aus zwei *gyrA*-Untereinheiten und zwei *gyrB*-Untereinheit. Topoisomerase IV ist ähnlich strukturiert und teilt sich in zwei *ParC* und zwei *ParE*- Untereinheiten, wobei *ParC* homolog zur *gyrA*-Untereinheit und *ParE* homolog zur *gyrB*-Untereinheit ist (siehe Abbildung 8). ^{75, 76}

Einleitung

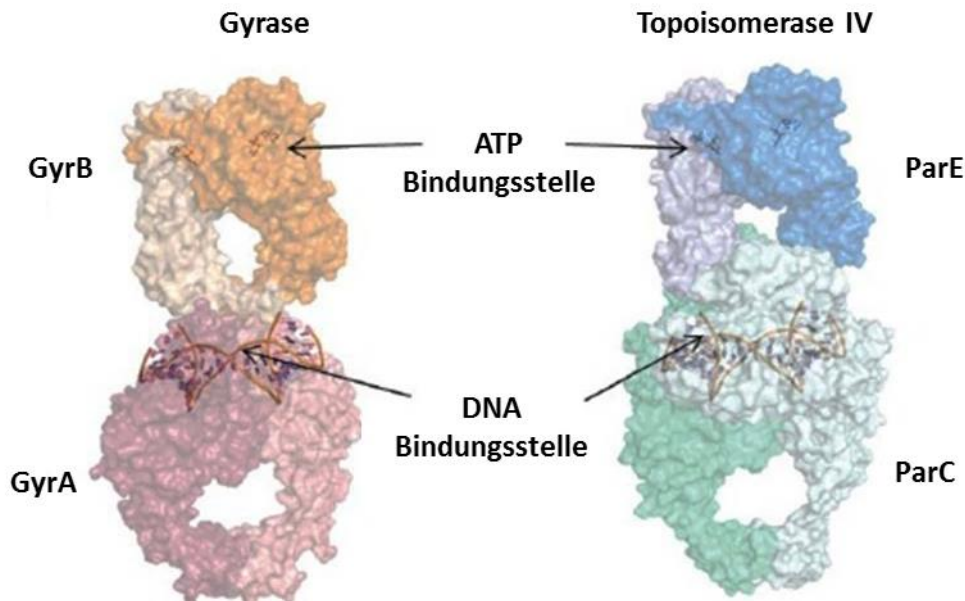


Abbildung 8: Aufbau der beiden Enzyme Gyrase und Topoisomerase. ⁷⁷

Zudem besitzen beide Enzyme wichtige Aufgaben bei der bakteriellen DNA-Replikation. Dabei ist die Gyrase für die Aufrechterhaltung des „negativen Supercoilings“, die Stabilisierung von Replikations- und Transkriptionskomplexen, die Entfernung von Knoten sowie die Faltung des DNA-Stranges verantwortlich. Die Topoisomerase IV hingegen ist für die Entwindung der superhelikalen DNA-Struktur zuständig. ⁷⁸ Damit die Gyrase und die Topoisomerase IV ihre Aufgaben erfüllen können, müssen sie Doppelstrangbrüche an den DNA-Strängen vollziehen und anschließend eine erneute Verknüpfung durchführen. Dadurch wird die Konformation der DNA-Stränge geändert. ^{78, 79} Die Fluorchinolone binden nicht direkt an die Gyrase bzw. Topoisomerase IV sondern an einen Komplex aus DNA und Enzym. Dabei wird der ternäre Komplex aus Enzym, DNA und Fluorchinolon durch Mg^{2+} -Ionen stabilisiert. Der Komplex verschiebt das Gleichgewicht der Enzymreaktion in Richtung des Doppelstrangbruches und verhindert eine erneute Verknüpfung der beiden Strangenden. ^{75, 80-82} Durch diese Gleichgewichtsverschiebung erhöht sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche. Dadurch sendet die Zelle ein „SOS-Signal“ wodurch eine FENTON-Reaktion ausgelöst wird. Es kommt zum oxidativen Stress, der zum schnellen Zelltod führt. ^{80, 83} Allerdings bildet nur eins der beiden Enzyme Gyrase und Topoisomerase IV das Primärziel des Antibiotikums. ⁷⁵ Welches das Primärziel darstellt, hängt von der Art des Bakteriums ab.

Einleitung

So bildet in GRAM-negativen Bakterien die Gyrase das Primärziel und die Topoisomerase IV das Sekundärziel. Im Fall der GRAM-positiven Bakterien verhält es sich genau anders herum. Hier stellt die Topoisomerase IV das Primärziel des Antibiotikums dar und die Gyrase das sekundäre.⁷⁵ Obwohl Fluorchinolone zwei Angriffspunkte haben, konnte seit den 90er Jahren eine Zunahme der Chinolonresistenz beobachtet werden (siehe Kapitel 1.3.2).

1.3. Antibiotikaresistenz

Die Entdeckung und Entwicklung von Antibiotika hat die Zahl der Toten durch bakterielle Infektionen stark gesenkt. Allerdings konnten für viele Antibiotika kurz nach ihrer Markteinführung die ersten resistenten Keime beobachtet werden. Zuvor noch sensible Bakterienstämme zeigten plötzlich eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber den anfangs stark wirksamen Antibiotika. So traten schon vermehrt penicillinresistente Bakterien sieben Jahre nach der Markteinführung auf.⁸⁴ Auch für viele andere Antibiotika konnte relativ schnell nach ihrer Einführung eine Resistenzbildung beobachtet werden. Ausnahme bilden die beiden Antibiotika Vancomycin und Erythromycin, bei denen die ersten Resistenzen erst nach Jahrzehnten beobachtet werden konnten (siehe Abbildung 9).^{84 85}

Einleitung

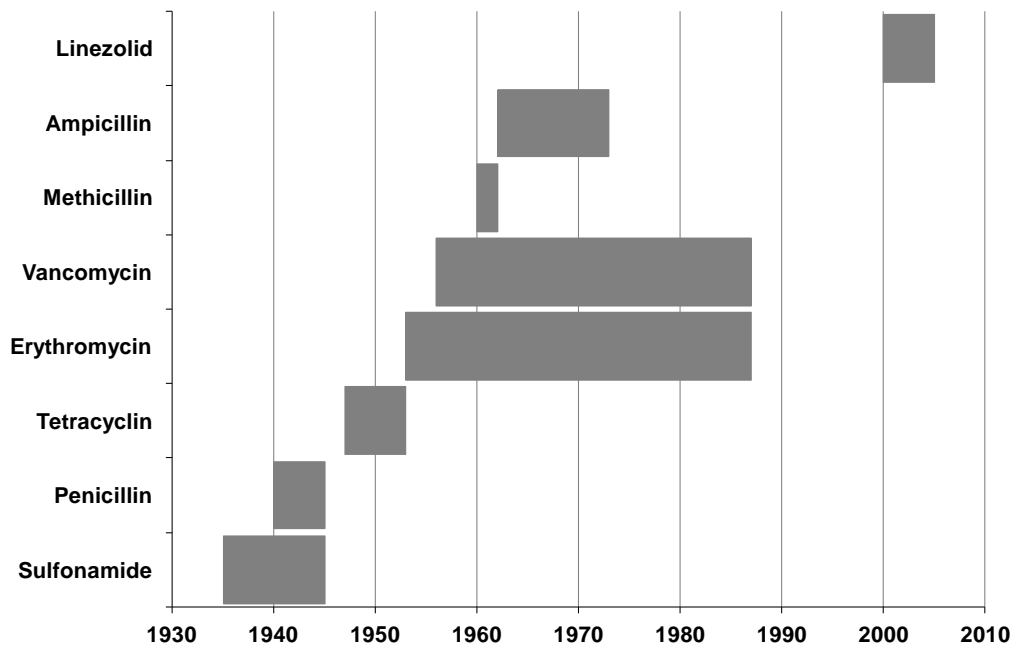


Abbildung 9: Dauer der Resistenzbildung eines Antibiotikums nach der Markteinführung.^{84,}

85

Bei der Betrachtung einer Vielzahl von Bakterienstämmen einer Bakterienspezies lassen sich zwei verschiedene Arten von Antibiotikaresistenzen feststellen. So existiert eine primäre Resistenz, die alle Stämme einer Spezies betrifft und eine sekundäre Resistenz, die nur einzelne Stämme aufweisen, da diese von den einzelnen Stämmen erworben wird.⁸⁰ So sind zum Beispiel alle Bakterienstämme von *Enterococcus faecium* gegen Cephalosporine, Makrolide und Sulfonamide primär resistent.⁸⁶ Im Fall der Cephalosporine beruht die Resistenz auf einer geringeren Affinität der *Enterococcus* Transpeptidase zu β -Lactamantibiotika.⁸⁷ Dahingegen können sekundäre Resistenzen erworben werden. Dies kann prinzipiell auf vier verschiedenen Wegen geschehen. Zum einen können Bakterien durch spontane und ungerichtete Einzelmutationen (De-novo-Mutation) im DNA-Strang Antibiotikaresistenzen entwickeln.⁵⁷ Durch natürliche Selektion setzt sich dann diese phänotypische Veränderung durch. Zum anderen können Gene, die eine Antibiotikaresistenz tragen, auch auf parasexuellem Wege übertragen werden. Dies kann in Form von Transformation, Transduktion oder Plasmidaustausch erfolgen (Vergleich Kapitel 1.1). Diese Übertragungsformen sind auch bakterienartübergreifend möglich.⁸⁸

Einleitung

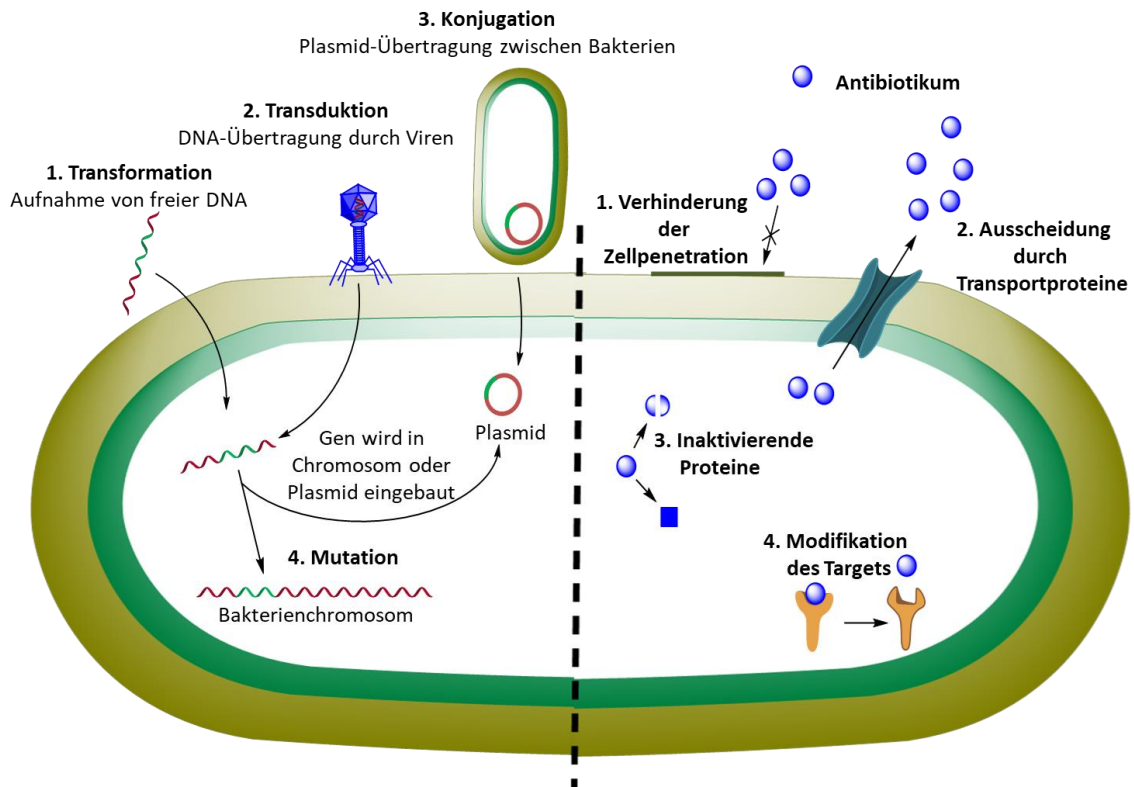


Abbildung 10: Die vier Mechanismen des Resistenzwerbungs von Bakterien: 1. Transformation, 2. Transduktion, 3. Konjugation und 4. Mutation. Zudem sind die vier Grundmechanismen der Antibiotikaresistenz dargestellt: 1. Veränderung der Zellstruktur, 2. Ausscheidungsproteine, 3. Inaktivierende Proteine und 4. Modifikation der Zielstruktur.^{57, 89-91}

91

Die erworbene Resistenz kann auf verschiedenen Grundmechanismen beruhen. Ein Mechanismus ist die Veränderung der Zellmembranstruktur um eine Zellpenetration zu verhindern. Ein weiterer Mechanismus ist die Ausbildung von membranständigen Transportproteinen, die den Wirkstoff aktiv aus der Zelle ausschleusen. Ebenso können inaktivierende oder modifizierende Proteine vom Bakterium exprimiert werden, um den Wirkstoff abzubauen oder so zu modifizieren, sodass keine Gefahr mehr von diesem ausgeht. Des Weiteren ist die Veränderung der Zielstruktur möglich, wodurch die Antibiotika ihre Angriffsstelle verlieren.^{89, 91} Abbildung 10 zeigt die vier Grundmechanismen der Antibiotikaresistenz sowie die verschiedenen Wege diese zu erhalten.

Einleitung

Im Weiteren soll kurz auf die Hauptresistenzmechanismen gegen die Antibiotikagruppen Fluorchinolone und Penicilline eingegangen werden.

1.3.1. Penicillinresistenz

Penicilline sind seit Anfang der 1940er Jahre im klinischen Gebrauch und gehören seitdem zu den am häufigsten verwendeten Antibiotika.⁵⁵ Erste Unempfindlichkeiten gegen Penicilline von zuvor sensiblen Keimen konnten relativ früh nach der klinischen Einführung beobachtet werden. Diese Resistenz kann vom Bakterium auf verschiedene Arten entwickelt werden.⁹² So wurden Bakterien mit veränderten Porinkanälen isoliert, welche einen Zugang zur Transpeptidase für das Antibiotikum verhindert.^{57, 92} Ein anderer Resistenzmechanismus beinhaltet die Ausbildung von speziellen Effluxpumpen. Diese Pumpen erniedrigen durch ein kontinuierliches Ausschleusen die Konzentration des Antibiotikums in der Zelle.^{57, 92} Diese Mechanismen sind allerdings eher selten beobachtet worden und konnten bisher auch nur bei GRAM-negativen Bakterien gefunden werden. Der häufigste Penicillinresistenzmechanismus beruht auf β -Lactamhydrolysierenden Enzymen. Diese Enzyme werden daher auch β -Lactamasen oder genauer Penicillinasen genannt. Diese ähneln in Struktur und Eigenschaften der Transpeptidase. Ebenso wie die Transpeptidasen binden die β -Lactamasen mit einer Serineinheit des aktiven Zentrums an das Penicillin unter Öffnung des β -Lactamrings (vergleiche Abbildung 6). Allerdings kann die acylierte Penicillinase im Gegensatz zur Transpeptidase schnell wieder hydrolysieren, wodurch die Penicillinase schnell regeneriert wird. Mit der schnellen Hydrolyse geht auch eine Deaktivierung der Penicillinmoleküle einher.^{57, 92, 93}

Die Entdeckung der Penicillinasen führte zu einer neuen Generation an Penicillinantibiotika. Penicilline wurden synthetisch verändert, um der Penicillinase standzuhalten. Diese penicillinastabilen Wirkstoffe wiesen große sterische Reste am β -Lactamring auf, um diesen vor der enzymatischen Hydrolyse zu schützen. Zu den penicillinastabilen Penicillinen gehören unter anderem das Methicillin, Cloxacillin, Flucloxacillin, Dicloxacillin und das Oxacillin.⁶¹⁻⁶³ Allerdings zeigten diese Antibiotika eine

Einleitung

geringere Aktivität gegenüber penicillinsensiblen Bakterienkeimen.⁶¹ Der Gebrauch dieser neuen Penicillingruppe führte zum Auftreten eines neuen Resistenzmechanismus, wie er in MRSA vorkommt. Hierbei liegt die Transpeptidase verändert vor, wodurch die Bindungsstelle des Penicillins in einer andern Konformation vorliegt.^{57 92} Das aktive Serin ist falsch ausgerichtet, wodurch es nicht mehr acyliert werden kann und das Antibiotikum keine freie Bindungsstelle mehr besitzt.⁵⁷

In Deutschland weisen in stationären Bereichen von Krankenhäusern schon 79% der isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme eine Penicillinresistenz auf.⁹⁴ Daher herrscht ein großer Bedarf an neuen β -Lactamantibiotika.

1.3.2. Fluorchinolonresistenz

Chinolone gehören neben Cephalosporinen, Penicillinen und Makroliden zu einer der umsatzstärksten Antibiotikagruppen.⁵⁶ Allerdings konnte wie bei den Penicillinen eine Resistenzbildung beobachtet werden.⁹⁵ Dabei wurden zwei verschiedene Resistenzmechanismen relativ häufig gefunden. Zum einen konnte eine Veränderung der Chinolonzielstruktur festgestellt werden. Häufig verursacht durch ein Aminosäureaustausch in der *GyrA*- bzw. *ParC*-Einheit.⁸⁰ Die Serineinheit in der Chinolonbindungstasche wird in vielen Fällen gegen eine Tryptophaneinheit ausgetauscht. Dies verursacht eine geringere Bindungsaffinität des Fluorchinolons zum DNA-Gyrase-Komplex bzw. DNA-Topoisomerase IV-Komplex.² Neben einem Austausch der Serin-Einheit gegen Tryptophan konnte ebenso ein Austausch gegen Prolin oder Leucin beobachtet werden.^{1, 80} Auch Mutationen der *GyrB*-Untereinheit und der Untereinheit der Topoisomerase IV *ParE* konnten gefunden werden. Hier findet ein Aminosäureaustausch im Mittelteil der Untereinheit statt, welcher zu einer Konformationsänderung der Untereinheiten führt und somit die Anbindung des Antibiotikums erschwert. Diese Mutationen der *GyrB*- und *ParE*-Untereinheiten sind allerdings eher selten im Vergleich zu Veränderungen in der *GyrA* bzw. *ParC* Einheit.² Zudem führen diese Mutationen nur zu einer geringeren Unempfindlichkeit gegenüber den Fluorchinolonen. Da neuere Fluorchinolone mit Gyrase und Topoisomerase IV eine

Einleitung

primäre und eine sekundäre Zielstruktur in der Bakterienzelle besitzen, führt eine Mutation in einer der beiden Zielstrukturen nur zu einer geringen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum. Erst eine Mutation der Gyrase und der Topoisomerase IV verursachen ein höheres Niveau der Resistenz.⁷⁵

Neben einer Veränderung der Zielstrukturen konnte auch eine Überexpression an Effluxpumpen bei verschiedenen Bakterienstämmen beobachtet werden. Dabei kommt es zur Ausbildung dieser membranständigen Transportproteine, die den Wirkstoff aktiv aus der Zelle befördern und so die Antibiotikakonzentration erniedrigen.^{75, 80, 96} Effluxpumpen können verschiedene Klassen an antimikrobiellen Substanzen erkennen und als Substrate verwenden, dadurch führt eine vermehrte Ausbildung dieser Proteine zu einer Resistenz gegen eine Vielzahl von antibiotischen Wirkstoffen.^{97, 98} In vielen Fällen wird bei hoch resistenten Bakterienstämmen eine Kombination aus Überexpression von Multiwirkstoffpumpen sowie Mutationen der Zielstrukturen gefunden.^{75, 80}

1.4 Polymer-Antibiotika-Konjugate (PAK)

Als die ersten Polymer-Wirkstoff-Konjugate in den 1950er Jahren publiziert wurden, galten sie als wissenschaftliche Kuriositäten mit keinen oder wenig Aussichten auf einen praktischen Nutzen. Dies hat sich allerdings in den letzten Jahren geändert, so waren 2013 Copaxone[®] und Neulasta[®] unter den zehn meist verkauften Medikamenten in den Vereinigten Staaten.⁹⁹ Beide Medikamente sind Polymer-Therapeutika. Neulasta[®] besteht aus einer Kombination aus PEG und Filgrastim, einem Peptidhormon und wird zur Anregung der Leukozytenbildung eingesetzt. Durch die PEGylierung des Filgrastim, wird die Halbwertszeit des Peptidhormons deutlich erhöht.¹⁰⁰ Das Therapeutikum Copaxone[®] ist aus den Aminosäuren Glutamin, Tyrosin, Alanin und Lysin aufgebaut, diese bilden dabei ein statistisches Copolymer. Die Struktur des Copolymers ähnelt der lipidreichen Myelinschicht der Nervenzellen. Immunzellen, die normalerweise bei Multipler-Sklerose die Myelinschicht attackieren, werden vom Copolymer gebunden.

Einleitung

Dadurch wird die Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem vermindert. ^{101, 102 103} Copaxone[®] und Neulasta[®] sind nur zwei Beispiele von vielen weiteren Polymer-Therapeutika, die in der Medizin Anwendung finden. ⁹⁹ Peptide, Proteine und niedermolekulare Wirkstoffe werden mit Polymeren konjugiert, um ihre therapeutische Wirkung zu verstärken. ^{104, 105} In vielen Fällen weist das entsprechende Polymer-Konjugat eine höhere Halbwertszeit, Stabilität und/oder Wasserlöslichkeit auf als die ihrer niedermolekularen Pendants. ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Zudem zeigen sie häufig eine bessere Immunogenität und Antigenität. ¹⁰⁵ Darüber hinaus besitzen einige Polymer-Wirkstoff-Konjugate eine spezifischere Affinität zu bestimmten Strukturen in Zellen und Gewebe, was eine gezieltere Behandlung ermöglicht. ¹⁰⁸ Neben den schon erwähnten PEG haben sich auch Poly(2-hydroxypropyl)methacrylamid (PHPMA) und Poly(lactid-co-glycolid) (PGLA) Copolymere in klinischen Studien bewährt. ¹⁰⁶ Dabei können verschiedene Strategien hinsichtlich der Bindung zwischen Wirkstoff und Polymer verfolgt werden. Je nach Strategie wird der Wirkstoff dauerhaft oder nur temporär an ein Polymer gebunden. ¹⁰⁶ Bei einer temporären Anbindung erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffes entweder durch einen Abbau der Polymermatrix ^{109, 110} oder über die Spaltung der Polymer-Wirkstoff-Bindung (labiler Spacer). ¹¹¹⁻¹¹³ Neben dem eigentlichen Wirkstoff können die Polymer-Wirkstoff-Konjugate mit weiteren funktionellen Gruppen modifiziert werden. Diese können für einen gezielten Transport oder zur besseren Löslichkeit eingebaut werden (siehe Abbildung 11). ¹¹⁴

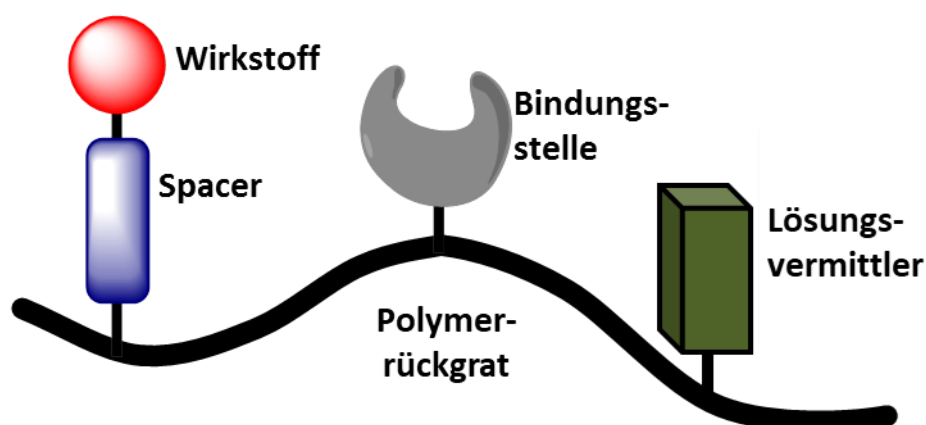


Abbildung 11: Model eines Polymer-Wirkstoff-Konjugats nach RINGSDORF. ¹¹⁴

Einleitung

Im Blick auf die Bekämpfung von Mikroorganismen werden häufig antimikrobielle Polymere als Alternative für niedermolekulare Biozide genannt. Dabei wird zwischen biozidfreisetzenden Polymeren, bioziden Polymeren und polymerisierten Bioziden unterschieden.¹¹⁵ Diese Biozid-Konjugate zeigen häufig eine bessere Selektivität und eine geringere Toxizität als die entsprechenden niedermolekularen Verbindungen.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Zudem konnte bei einigen Beispielen ein geringeres Potential zur Ausbildung von resistenten Bakterienstämmen beobachtet werden.¹¹⁸ Es existieren sogar Biozid-Konjugate die hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften schaltbar gemacht werden konnten.¹¹⁷

Im Fall der Antibiotika werden Makromoleküle hauptsächlich als temporäre Träger verwendet. Das Antibiotikum wird dabei meist über eine hydrolysierbare Bindung an ein nicht abbaubares Polymer oder in eine abbaubare Polymermatrix gebunden (siehe Abbildung 12).^{109, 110, 112, 119-127} Die permanente Verknüpfung zwischen Polymer und Antibiotikum wird weniger häufig verwendet. Die meisten permanenten Polymer-Antibiotika-Konjugate (PAK) enthalten Antibiotika wie Doxorubicin, welche aufgrund ihrer Antitumoreigenschaften mit einem Polymer konjugiert werden.¹²⁸⁻¹³⁰

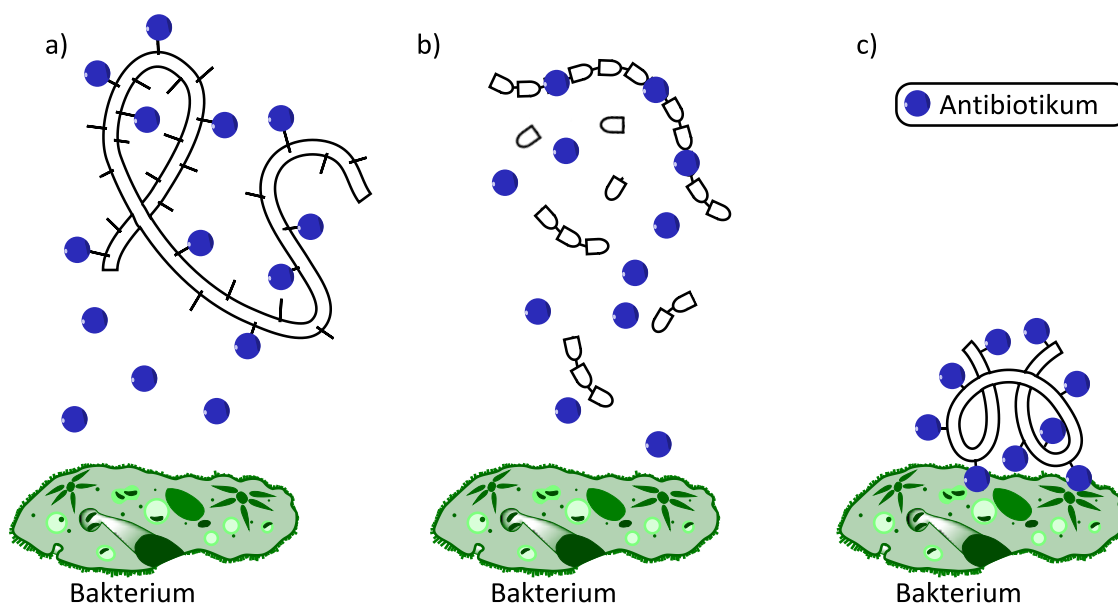


Abbildung 12: Allgemeine Strategien der Polymer-Antibiotika-Konjugate: (a) Freisetzung mittels spaltbarer/hydrolysierbarer Bindung; (b) Freisetzung mittels abbaubarer Polymermatrix; (c) permanent kovalent gebundene Polymer-Antibiotika-Konjugate.¹³¹

Einleitung

Permanente Polymer-Antibiotika-Konjugate für die Behandlung von bakteriellen Infektionen wurden hingegen selten untersucht. Die wenigen existierenden Beispiele weisen oft eine erniedrigte antimikrobielle Aktivität im Vergleich zu den niedermolekularen Antibiotika auf. So wurden von NATHAN et. al. Cephadrin und Penicillin V mit PEG-Lysin-Polyurethan konjugiert. Dabei wurden verschiedene Strategien zur Konjugation verwendet. Während Penicillin V über eine hydrolysierbare Bindung an das Polymer gekoppelt war, wurde das Cephadrin über eine stabile Amidbindung verknüpft. Die Penicillin V-Konjugate zeigten eine gute antimikrobielle Wirkung, da die labile Esterbindung eine Freisetzung des Antibiotikums erlaubt. Die stabile Amidbindung hingegen verhindert eine Freisetzung des Cephadrin, wodurch das Cephadrin-Konjugat keine bakterizide Wirkung aufweist.¹³² Ebenso zeigt die permanente Bindung von Ciprofloxacin- und Norfloxacin- an PEG eine Abnahme der molaren Aktivität gegen GRAM-positive und -negative Keime. Die Norfloxacin-Konjugate verloren sogar vollständig ihre antimikrobielle Wirkung gegen den GRAM-positiven Keim *Staphylococcus aureus*.¹²

Das große Potential der permanenten Anbindung von Antibiotika an ein Polymer liegt aber nicht in der Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität gegenüber sensiblen Keimen, sondern in der Verbesserung von anderen therapeutischen Eigenschaften. DUE et. al. gelang es, Tobramycin mit PEG zu konjugieren. Die so entstandenen PAKs zeigten zwar eine geringere Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) in Lösung als das niedermolekulare Antibiotikum, aber dafür eine deutlich höhere Aktivität gegenüber *P. aeruginosa*-Biofilmen.¹³³ Es konnten auch PEG-Vancomycin-Konjugate synthetisiert werden. Diese wiesen zwar auch eine deutlich schlechtere Aktivität in Lösung auf, konnten aber über eine Acrylatendgruppe am anderen Polymerende auf eine Oberfläche aufgebracht werden und zeigten dadurch eine starke Reduktion der Bakterienkoloniebildung.¹³⁴ TUROS et. al. veröffentlichten eine Studie über die Konjugation von *N*-thiolierten β -Lactamantibiotika mit Polyacrylat. Die β -Lactamantibiotika wurden kovalent an Polyacrylat zu Nanopartikeln gebunden. In allen Fällen zeigten die Nanopartikel eine bessere Aktivität als die mit Antibiotika beladenen Monomere allein. Die Nanopartikel zeigten auch gute Aktivitäten gegen Methicillin

Einleitung

resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).¹³⁵ Die Konjugation von verschiedenen Poly(vinylpyrrolidon) mit Penicillin V und Amoxicillin ist ein weiteres Beispiel für das Potential der permanenten PAKs. Diese Konjugate wiesen eine starke Resistenz gegenüber dem Abbau durch das Enzym β -Lactamase auf.¹³⁶ Ein weiteres innovatives Konzept wurde von der Arbeitsgruppe um Rimmer entwickelt. Polymyxin B wurde mit einem hochverzweigten Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) kombiniert. Dafür wurde die biozide funktionelle Gruppe des Polymyxin B entfernt um eine potentielle Bindungsstelle für das PNIPAM zu schaffen. Durch Bindung des cyclischen Peptids der Polymyxin B-Einheit an die Lipopolysaccharidschicht der bakteriellen Zellmembran wurde die kritische Lösungstemperatur auf unter 37 °C erniedrigt. Diese Erniedrigung führte zu einer Ausfällung des Bakterium-Konjugat-Komplexes.¹³⁷

Auch am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften an der TU Dortmund wurde sich bereits mit dem Thema der Polymer-Antibiotika-Konjugate beschäftigt. In der Masterarbeit von HARMUTH¹³⁸ wurde das biokompatible Poly(2-methyl-2-oxazolin) (PMeOx) zur Verknüpfung des Breitbandantibiotikums Ciprofloxacin verwendet. Es wurde unmodifiziertes Ciprofloxacin als Terminierungsmittel bei der lebenden, kationischen Polymerisation von 2-Methyl-2-oxazolin verwendet. Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie konnte festgestellt werden, dass 87% der entstandenen Polymere über die Piperazingruppe des Antibiotikums und 13% über die Carboxylgruppe konjugiert waren (Vergleich der Struktur von Ciprofloxacin in Abbildung 7). Zusätzlich wurden verschiedene Ciprofloxacin-Derivate hergestellt. Dabei wurde entweder die Carboxyl- oder die Piperazingruppe des Ciprofloxacins geschützt. Dieses Vorgehen ermöglichte eine selektive Konjugation des Antibiotikums an das Polymer. So erfolgte in einem Fall die Anbindung ausschließlich über die Carboxylgruppe und im anderen Fall nur über die Piperazingruppe. Nach erfolgreicher Konjugation wurde die Schutzgruppe entfernt. Ist Abbildung 13 ist eine schematische Syntheseroute gezeigt.

Einleitung

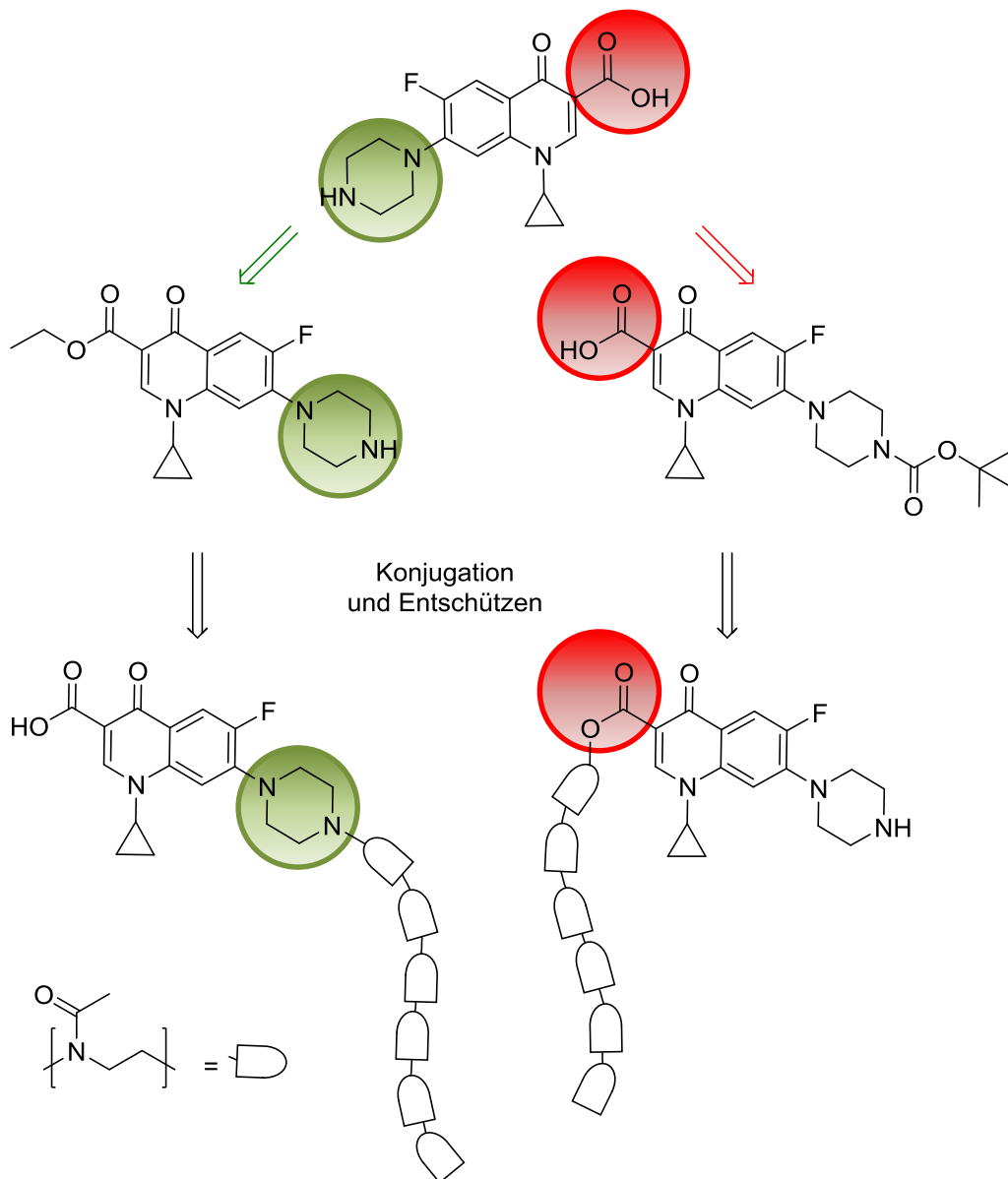


Abbildung 13: Syntheseroute zu Poly(2-methyloxazolin)-Ciprofloxacin-Konjugaten nach HARMUTH.¹³⁸

Die hergestellten Konjugate wiesen vor dem Entfernen der Schutzgruppen eine mehr als 2500-fach schlechtere antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* auf als das niedermolekulare Antibiotikum. Durch die Entfernung der Schutzgruppen konnte die Aktivität der Konjugate zwar leicht verbessert werden, allerdings war diese immer noch 1250-fach schlechter als die Aktivität von Ciprofloxacin.¹³⁸ Obwohl die Konjugation von Ciprofloxacin und Poly(2-methyloxazolin) zu inaktiven Polymer-Antibiotika-Konjugaten führte, zeigten die genannten Beispiele, dass permanente PAKs ein großes Potential zur

Einleitung

Entwicklung neuer stabilerer Antibiotika besitzen können. Allerdings existieren bisher zu wenige Beispiele um das gesamte Potenzial der permanenten PAKs zu erfassen. Zudem könnte die Kombination mit einem Makromolekül helfen, verschiedene Abwehrmechanismen der Bakterien zu umgehen. So könnten PAKs aufgrund des höheren Molekulargewichtes schwerer von dem bakteriellen Effluxpumpensystem erfasst werden oder sie könnten durch das Polymerrückgrat vor antibiotikaabbauenden Enzymen geschützt werden.

Zielsetzung

2. Zielsetzung

Aufgrund steigender Zahlen von antibiotikaresistenten Bakterien ist die Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen von großer Bedeutung. Dabei stellt die Antibiotika-Konjugation mit Makromolekülen eine interessante, wenn auch noch wenig untersuchte Methode dar. Um neue Einblicke in diese Methode zu erlangen, war Ziel der vorliegenden Arbeit die Synthese von Polymer-Antibiotika-Konjugaten auf Basis von Ciprofloxacin und Penicillinen. Dabei sollen die Antibiotika als Endgruppenfunktionalisierung von Poly(2-oxazolin) eingeführt werden.

Die hergestellten Konjugate sollen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität gegen pathogene Bakterienkeime sowie ihrer Biokompatibilität untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss von Molekulargewicht, Polymerrückgrat, Polymer-Antibiotika-Bindung und Satellitengruppe auf die Aktivität analysiert werden.

Zudem könnten die Antibiotika durch die Konjugation mit Polymeren gegen bestimmte Abwehrmechanismen der Bakterien geschützt und somit auch gegen resistente Keime eine antimikrobielle Wirkung erzielt werden. Dies würde eine schnelle Resistenzbildung der Bakterien erschweren. Mit Hilfe der hergestellten Penicillin und Ciprofloxacin-Konjugate als Modellsystem soll diese Theorie untersucht werden.

Desweiteren sollen antimikrobielle Materialien auf Basis von amphiphilen Polymer-Netzwerken hergestellt werden. Dabei sollen Antibiotika in Form von PAKs in die Polymer-Netzwerke eingebaut werden.

Ergebnisse und Diskussion

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Polymersynthese

Für die Synthese von Polymer-Antibiotika-Konjugaten (PAKs) wurden in dieser Arbeit zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte an die Arbeit von HARMUTH¹³⁸ angeknüpft werden und PAKs mittels Direktterminierung der lebenden kationischen Polymerkette mit Antibiotika bzw. Antibiotika-Derivaten hergestellt werden. Zum anderen sollte die Synthese der PAKs durch eine polymeranaloge Reaktion erfolgen. Dabei fungiert die Endgruppe des Polymers als Nucleophil. Zunächst soll in diesem Kapitel die Synthese der Polymere, die für die polymeranaloge Reaktion verwendet wurden, vorgestellt werden. Zudem wird auch auf die Synthese der für die antimikrobiellen Netzwerke verwendeten Polymere eingegangen. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit den Studenten von WANG JIE¹³⁹, YOUSSEF WOLF¹⁴⁰ und THAN-DUONG NGUYEN¹⁴¹ im Rahmen ihrer Masterarbeiten erarbeitet.

3.1.1. Endgruppenfunktionalisierung mit Ethylendiamin

3.1.1.1. Funktionalisierung von Polymeren mit Methylstartergruppen

Für die polymeranalogen Reaktionen wurden hauptsächlich Polymere mit einer Aminendgruppe verwendet. Diese sollte in der polymeranalogen Reaktion als Nucleophil dienen. Die Terminierung mit Ethylendiamin (EDA) ermöglicht eine einfache Synthese von POx mit nucleophiler Endgruppe. Zudem wurde diese Terminierung schon in vorherigen Arbeiten erfolgreich durchgeführt. Daher wurde für die Synthese von Me-POx-EDA Polymeren ein modifiziertes Verfahren von KONIECZNY verwendet.^{116, 142, 143}

Die Polymersynthese von PMeOx wurde mit Hilfe einer Synthesemikrowelle und mit frisch destilliertem Methyltosylat (MeTos) als Initiator durchgeführt. Die Polymerisation erfolgte in einem geschlossenen Druckgefäß bei 90 °C in Chloroform (CHCl₃). Der

Ergebnisse und Diskussion

Polymerisationsgrad (DP_{set}) konnte aufgrund des lebenden Charakters der Polymerisation durch das Initiator ([I]) zu Monomer ([M]) Verhältnis eingestellt werden ($DP_{\text{set}} = [M]/[I]$). Dabei wurden Polymere mit einem Polymerisationsgrad von 10, 20, 30, 40 und 60 Wiederholungseinheiten hergestellt. Nach Ablauf der Polymerisationsreaktion wurde das lebend kationische Kettenende mit einem 10 fachen Überschuss an EDA terminiert, wobei die Terminierungsreaktion für 72 h in CHCl_3 bei 45°C stattfand. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt. Dies sollte nicht reagierte Monomere sowie überschüssiges EDA abtrennen. Um letzte Überreste an Verunreinigungen aus dem Polymer zu entfernen, folgte im Anschluss eine Dialyse mit einer Benzylzellulosemembran (1000 MWCO) gegen destilliertes (dest.) Wasser. Abbildung 14 zeigt die Synthese von Me-PMeOx₃₀-EDA, die Polymerisation von PMeOx mit anderen Kettenlängen erfolgte durch die Variation des Initiator zu Monomer Verhältnisses unter denselben Bedingungen. Dabei konnten Ausbeuten von 79-93% erhalten werden.

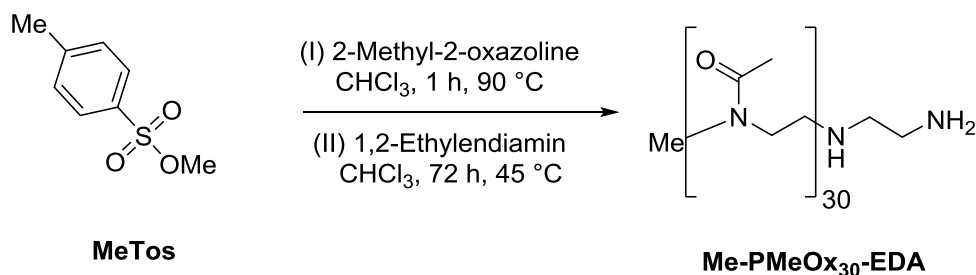


Abbildung 14: Synthese von Ethyldiamin (EDA) terminierten PMeOx nach einer modifizierten Methode von KONIECZNY.¹⁴³ Als Initiator diente Methyltosylat (MeTos).

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte in vielen Fällen über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Das Spektrum von Me-PMeOx₃₀-EDA ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt. Das gezeigte Spektrum weist alle erwarteten Signale auf, neben den deutlich zu erkennenden Polymerrückgratsignalen bei 3.36 ppm (**3, 4**) und 2.05 ppm (**2**) sind auch Signale des Initiators sowie der Endgruppe zu sehen. Die initiierende Methylgruppe zeigt ein Multiplett bei 2.95 ppm (**1**) und die EDA Gruppe ein Signal bei 2.75 ppm (**5, 6**), wobei dieses mit der letzten Methyleneneinheit des Polymerrückgrates überlagert, so dass sich ein Integral von sechs Protonen ergibt. Mit Hilfe des Integrals des Initiatorsignals und

Ergebnisse und Diskussion

den Integralen der Polymerrückgratsignale kann ein Polymerisationsgrad von 28 Wiederholungseinheiten bestimmt werden. Dieser stimmt sehr gut mit dem eingestellten Polymerisationsgrad (DP_{set}) von 30 Wiederholungseinheiten überein. Des Weiteren können die Signale des Initiators und der EDA Endgruppe zur Ermittlung des Funktionalisierungsgrades verwendet werden. Der Vergleich der Integrale dieser Signale ergibt ein Funktionalisierungsgrad von 90%, somit besitzen 90% aller Polymere eine EDA Endgruppe. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Me-PMeOx-EDA mit variierenden Polymerisationsgraden $n = 10, 20, 40, 60$ wurden analog ausgewertet und sind im Anhang dargestellt.

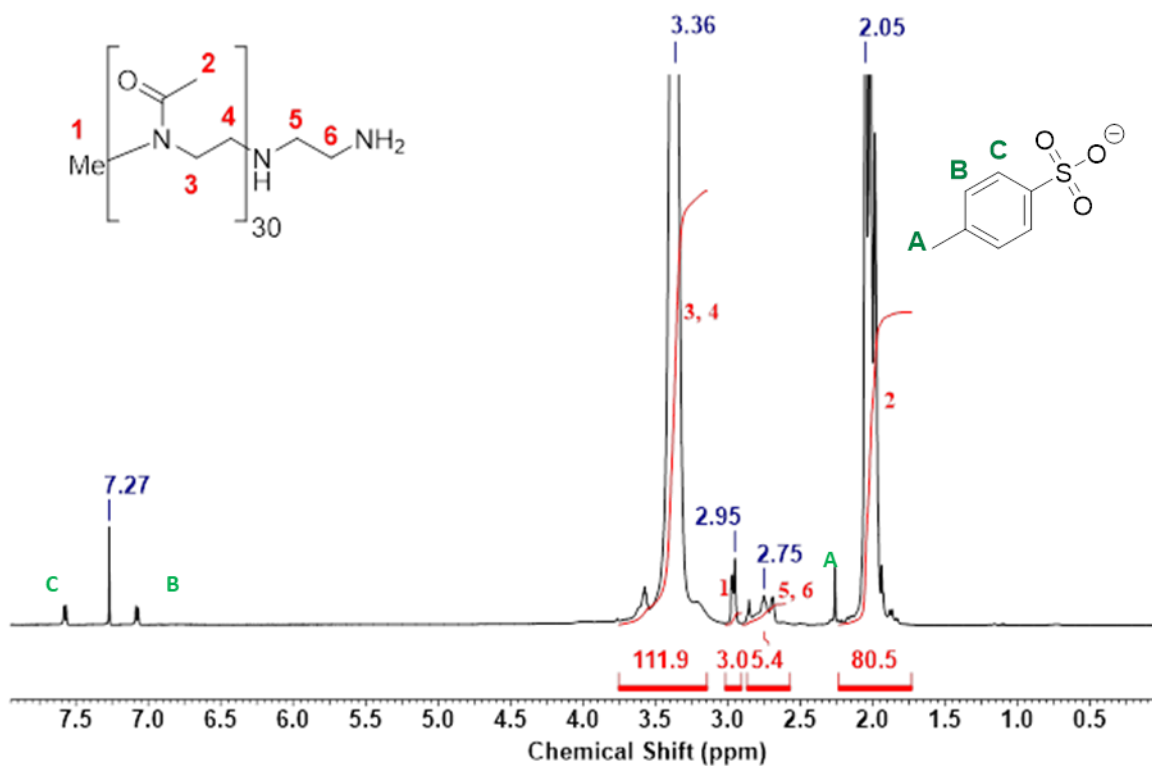


Abbildung 15: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeOx₃₀-EDA in CDCl_3 (7.27 ppm).

Neben PMeOx wurden auch andere Poly(2-oxazoline) auf dieselben Weise hergestellt. Dabei wurde 2-Ethyl-2-oxazolin (EtOx), 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin (*i*PrOx) sowie 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin (*c*PrOx) als Monomere verwendet. Für die Polymerisation von EtOx konnten die Reaktionsbedingungen beibehalten werden.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Me-PEtOx₃₀-EDA (Abbildung 16) konnten alle erhaltenen Signale der entsprechenden Struktur zugeordnet werden. Im Bereich von 1.11 ppm

Ergebnisse und Diskussion

weist die Methylgruppe des Polymerrückgrates (2) ein Multipllett auf. Die Methylengruppe in α -Position der Carbonylgruppe der PEtOx-Einheit zeigt ein Signal bei 2.39 ppm (3). Die Methylengruppen in α -Position zum Amid zeigen wie im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeOx₃₀-EDA ein Multipllett bei 3.44 ppm (4, 5). Neben den Signalen des Polymerrückgrates sind wieder die Signale für die Methylstartergruppe (1) und EDA (6, 7) Endgruppe zu sehen. Allerdings ist hier das EDA Signal leicht vom Signal 3 überlagert. Der Polymerisationsgrad beträgt 30 Wiederholungseinheiten und stimmt exakt mit dem eingestellten Polymerisationsgrad überein. Zudem sind 92% aller Polymere mit einer EDA Endgruppe funktionalisiert.

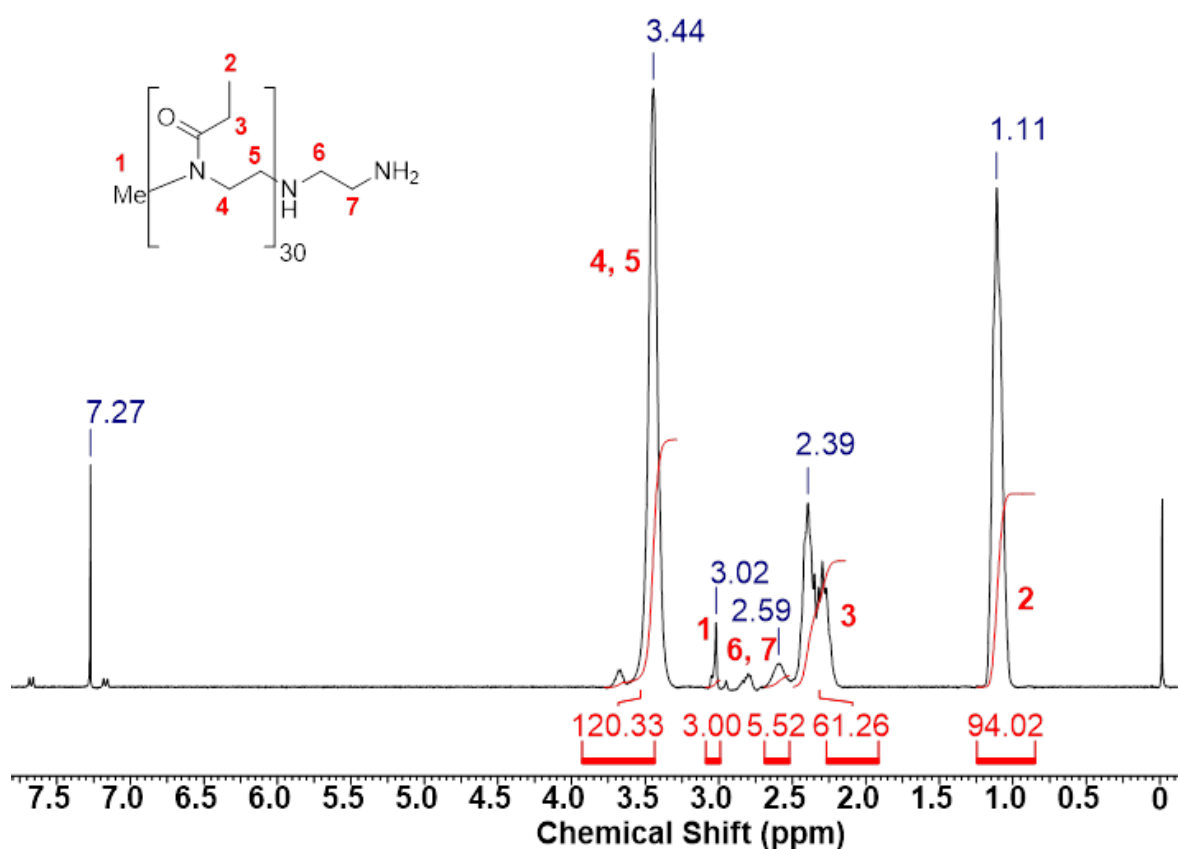


Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PEtOx₃₀-EDA in CDCl_3 (7.27 ppm).

Für die Herstellung von *PiPrOx* und *PcPrOx* mussten zunächst die Monomere *iPrOx* und *cPrOx* synthetisiert werden, da diese nicht kommerziell erhältlich sind. Die Synthese verlief nach einer modifizierten Variante nach SCHUBERT et. al.¹⁴⁴ Die Synthese von *iPrOx* erfolgte mit *iso*-Propylamin und Ethanolamin. Für die Synthese von *cPrOx* diente Ethanolamin und *cyclo*-Propylamin anstatt *iso*-Propylamin. Zinkacetat wurde als

Ergebnisse und Diskussion

Katalysator verwendet. Die Reaktion wurde mikrowellenunterstützt in Substanz durchgeführt.^{28, 144} Nach Reinigung durch zweimalige Destillation konnte das Monomer *i*PrOx mit einer Ausbeute von 83% und einer Reinheit von 99% erhalten werden. Das Monomer *c*PrOx konnte mit einer Ausbeute von 35% und einer Reinheit von 98% hergestellt werden. Die ¹H-NMR-Spektren von *Pi*PrOx und *Pc*PrOx sind im Anhang abgebildet. Die Reaktionsgleichungen der Monomersynthese sowie für die anschließende Polymerisation ist in Abbildung 17 gezeigt.

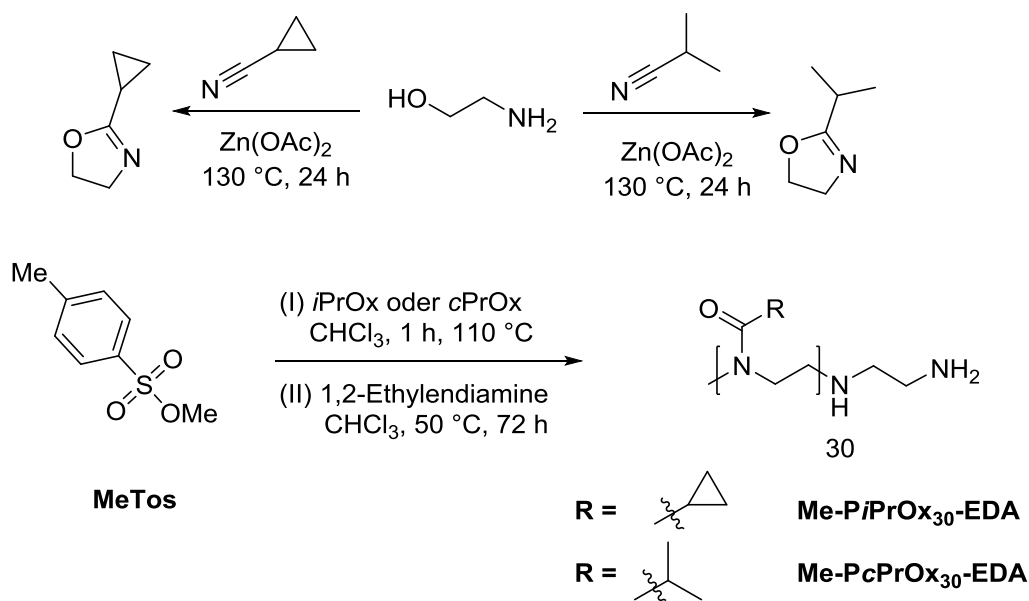


Abbildung 17: Synthese der Monomere *i*PrOx und *c*PrOx nach SCHUBERT et. al.¹⁴⁴ sowie die anschließende Polymerisation zu Me-*Pi*PrOx₃₀-EDA und Me-*Pc*PrOx₃₀-EDA.

Die Polymerisation von *i*PrOx erfolgte wieder mit MeTos als Initiator in CHCl₃ bei 110 °C. Im Anschluss wurde EDA als Terminierungsreagenz hinzugegeben und nach 48 h bei 45 °C konnte Me-*Pi*PrOx-EDA erhalten werden (Vergleich Abbildung 17). Da das Me-*Pi*PrOx-EDA deutlich unpolarer als Me-PMeOx-EDA und Me-PEtOx-EDA ist, konnte eine Fällung in Diethylether nicht durchgeführt werden. Daher wurde nach der Polymerisation das CHCl₃ entfernt und das Polymer anschließend gegen Methanol dialysiert. Die Synthese Me-*Pc*PrOx-EDA verlief analog. Abbildung 18 zeigt die ¹H-NMR-Spektren von Me-*Pi*PrOx-EDA und Me-*Pc*PrOx-EDA. Alle Signale konnten den entsprechenden Strukturen zugeordnet werden. Das Me-*Pi*PrOx-EDA Spektrum weist neben den Signalen des Polymerrückgrates (**2-5**) auch ein Signal für die Methylinitiator-

Ergebnisse und Diskussion

Einheit bei 3.04 ppm (**1**) auf. Ein Signal für die EDA Endgruppe (**6, 7**) ist nicht zu erkennen, dieses Signal wird wahrscheinlich von der Methingruppe des Polymerrückgrates überlagert, weshalb das Signal der Methingruppe auch ein leicht größeres Integral besitzt. Der Polymerisationsgrad beträgt 40 Monomereinheiten, was etwas höher als die eingestellte Anzahl an Wiederholungseinheiten von 30 ist. Dies könnte mit einer β -H-Eliminierung während des Propagationschrittes erklärt werden. Das Spektrum von Me-PcPrOx-EDA zeigt analoge Signale.

Ergebnisse und Diskussion

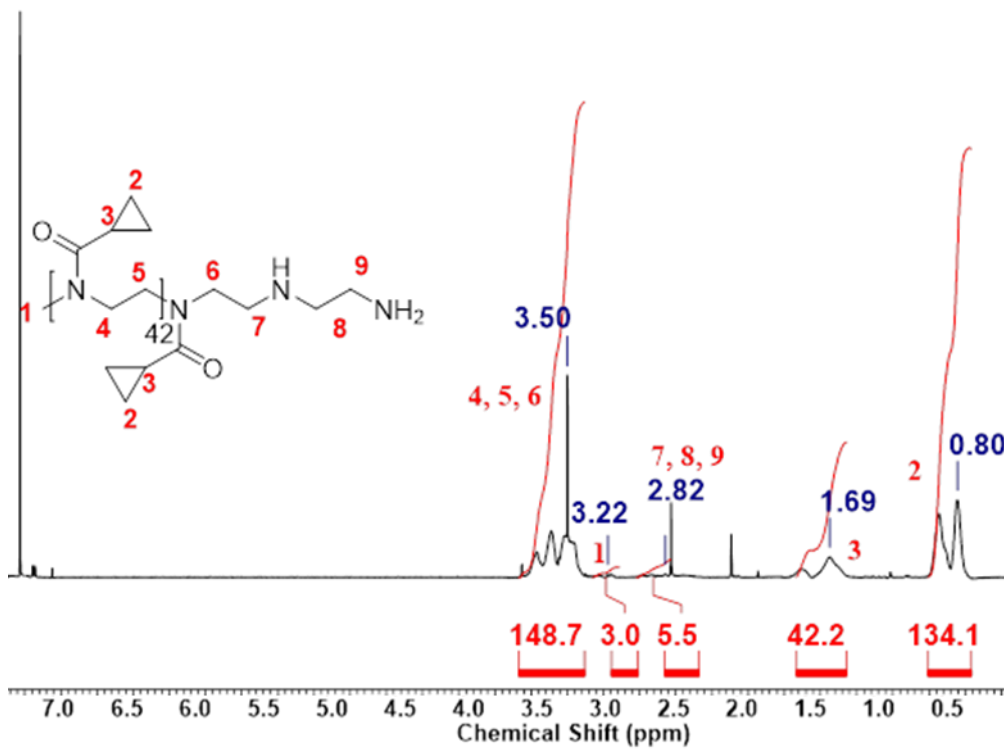
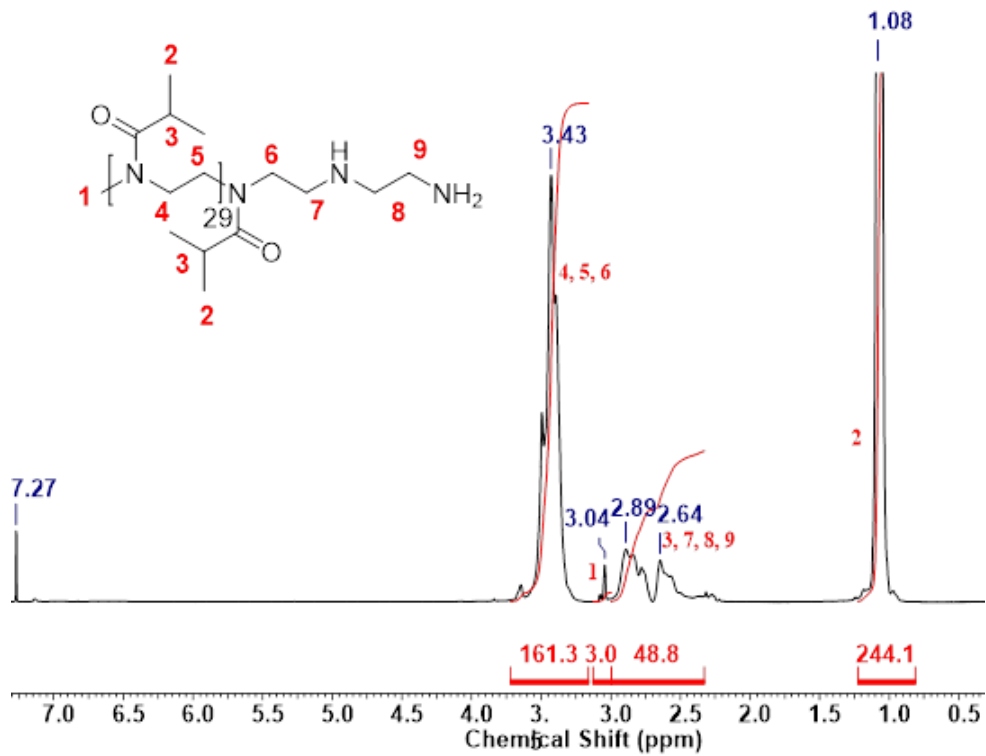


Abbildung 18: ¹H-NMR-Spektren von Me-PiPrOx-EDA (oben) und Me-PcPrOx-EDA (unten) in CDCl₃ (7.27 ppm).

Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich zu dem *i*PrOx Homopolymer wurden auch Copolymere auf Basis von *i*PrOx und EtOx mit variierendem *i*PrOx Anteil hergestellt. Dabei konnten bei der Synthese der Copolymere wieder das modifizierte Verfahren von KONIECZNY verwendet werden.¹⁴³ Ein Beispiel für ein ¹H-NMR-Spektrum eines Copolymers ist in Abbildung 19 dargestellt. Neben den *Pi*PrOx Signalen (2-5) und den Signalen von PEtOx (6-9) ist wieder das Signal des Initiators (1) zu erkennen. Darüber hinaus zeigen auch die Protonen der EDA Gruppe (10, 11) ein Signal bei 2.65 ppm. Dieses Signal wird bei *Pi*PrOx Homopolymeren durch die Methinprotonen des *Pi*PrOx vollständig überlagert. Bei *Pi*PrOx und PEtOx Copolymeren ist das EDA-Signal jedoch zu erkennen, da das Methin-Signal eine geringere Intensität aufweist. Ein Vergleich des Initiatorsignals mit den Signalen der Methingruppe der *iso*-Propyl-Einheit und mit der Methylengruppe in α -Position zur Carbonylgruppe der PEtOx Einheit liefert das *i*PrOx zu EtOx Verhältnis. So besitzt das gezeigte Copolymer 5 *i*PrOx Einheiten und 28 EtOx Einheiten.

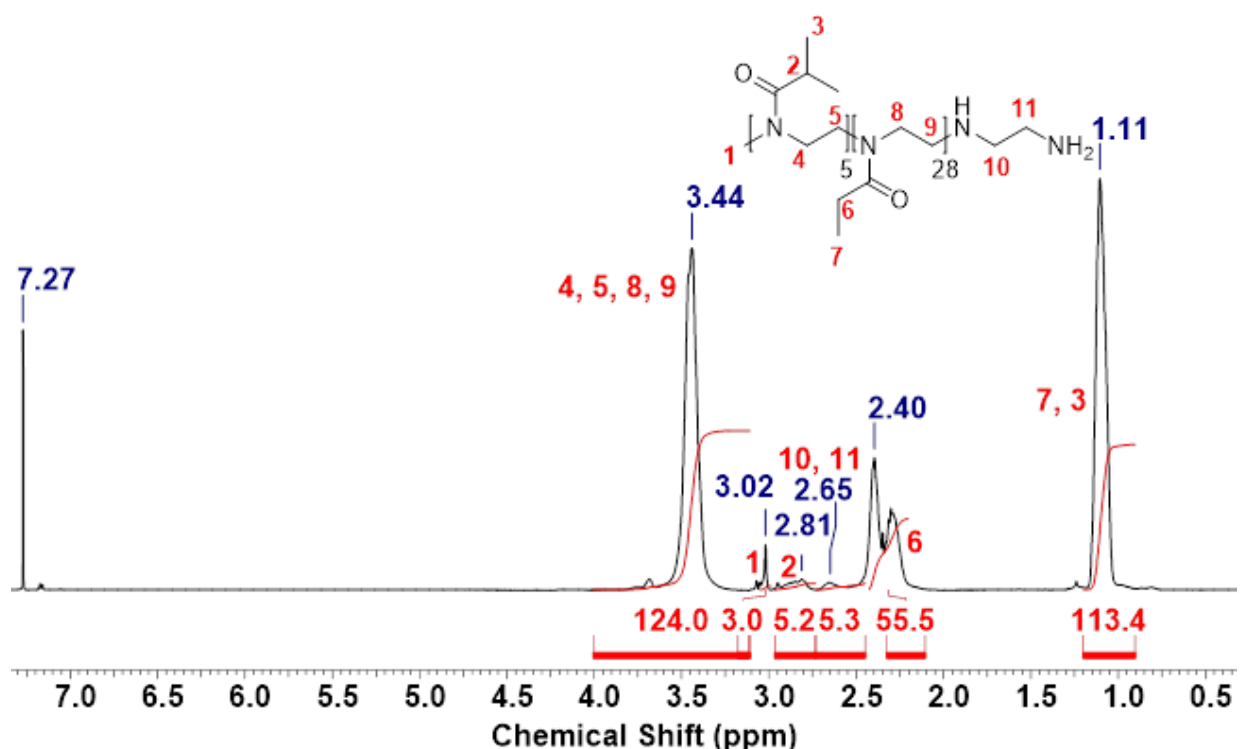


Abbildung 19: ¹H-NMR-Spektrum eines PEtOx-PiPrOx-Copolymer mit 5 PiPrOx und 28 PEtOx Einheiten in CDCl₃ (7.27 ppm).

Ergebnisse und Diskussion

Zu den hergestellten POx mit einer EDA Endgruppe wurde auch PEG mit einer EDA Endgruppe versehen. Ein kommerziell erhältliches PEG mit einem Molekulargewicht von $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ der Firma Fluka wurde für den EDA-Einbau verwendet. Dabei handelte es sich um ein Monomethylether PEG. Das PEG besaß neben einer Methylether Gruppe auch eine Hydroxylgruppe als Endgruppe. Um EDA als Endgruppe einzubauen, musste zunächst die Hydroxylgruppe in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt werden. Zu diesem Zweck wurde PEG mit Mesylchlorid oder Tosylchlorid umgesetzt. Sowohl Me-PEG-OTos als auch Me-PEG-OMs konnten in guten Ausbeuten hergestellt werden. Der nächste Schritt war die Einführung der EDA-Gruppe. Durch den Einbau einer Abgangsgruppe sollte nun eine nucleophile Substitution mit EDA erfolgen und somit die EDA Endgruppe eingebunden werden. Allerdings konnte die EDA Substitution nur bei der Verwendung der Mesyl-Abgangsgruppe beobachtet werden. Anscheinend ist das EDA nicht nucleophil genug, um das durch die Tosylgruppe generierte elektrophile Kohlenstoffatom anzugreifen. Deswegen wurde die Synthese über Me-PEG-OTos nicht weiter untersucht. Ein Überblick über die einzelnen Syntheseschritte gibt Abbildung 20.

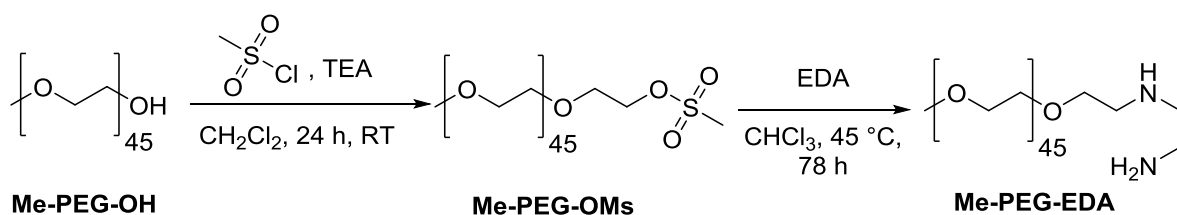


Abbildung 20: Syntheseroute zu Me-PEG-EDA. Zum einen wurde eine Synthese über Me-PEG-OMs durchgeführt und zum anderen eine über Me-PEG-OTos, diese führte allerdings nicht zum gewünschten Produkt.

Die Spektren von Me-PEG-OMs und Me-PEG-OTos sind im Anhang zu sehen und an dieser Stelle soll nicht auf sie eingegangen werden. Das ¹H-NMR-Spektrum von Me-PEG-EDA zeigt ein großes Singulett bei 3.62 ppm wobei es sich um die Protonen des Polymerrückgrates handelt (2-4). Bei 3.36 ppm ist ein weites Singulett zu beobachten, dieses Signal entspricht den Protonen der Monomethylether Endgruppe. Die EDA Endgruppe (6, 7) sowie die letzte Methylengruppe des Polymerrückgrates (5) zeigen Signale im Bereich von 2.78 ppm, wobei die Signale überlagern.

Ergebnisse und Diskussion

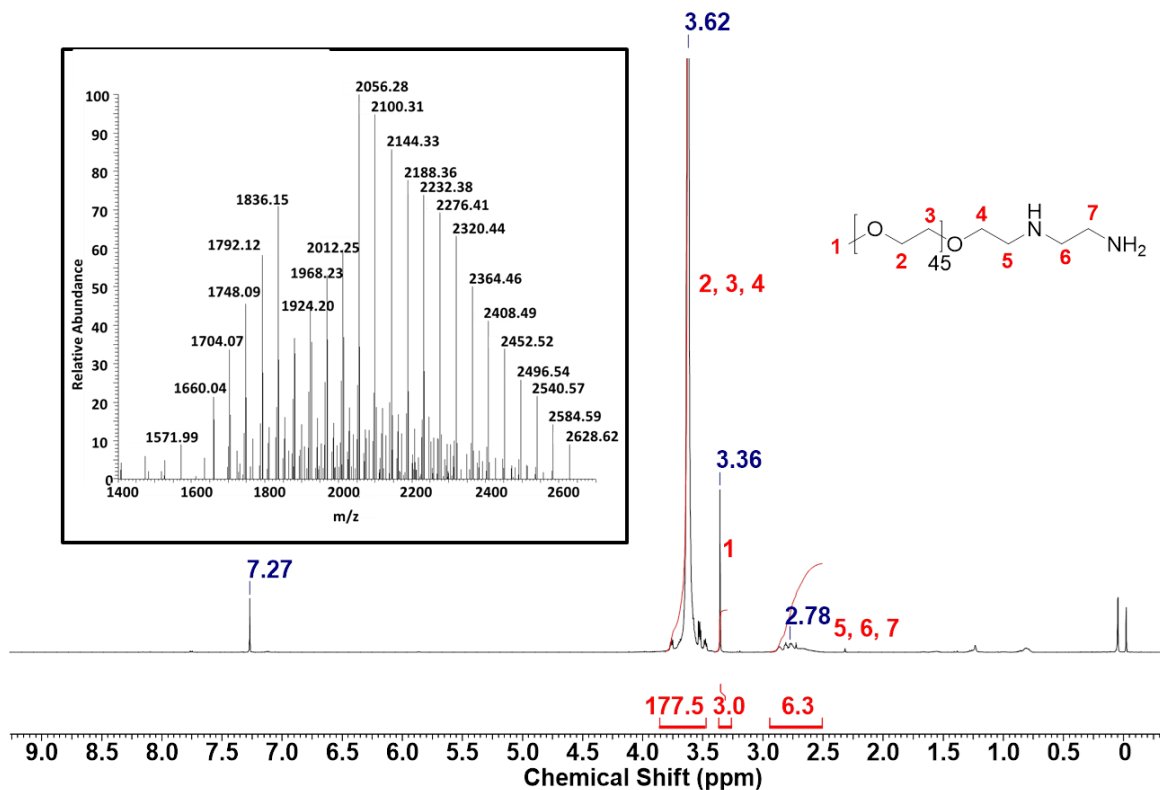


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Me-PEG₄₅-EDA und das dazugehörigen ESI-MS-Spektrum als Inlay.

Zusätzlich zur $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden ESI-MS Messungen vorgenommen. Diese sollten einen erfolgreichen Einbau der EDA Gruppe bestätigen. Die Messung wurde am ISAS von Frau RITA FOBBE durchgeführt. Neben dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist auch das entsprechende ESI-Spektrum in Abbildung 21 gezeigt. Hier lassen sich hauptsächlich EDA funktionalisierte PEGs finden (75%), andere Fraktionen können nicht zugeordnet werden und stellen wahrscheinlich Fragmentierungen dar.

Eine Zusammenstellung der MeTos initiierten Poly(oxazoline) sowie dem modifizierten PEG findet sich in Tabelle 1. Zusätzlich zur $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchung wurden die Polymere mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Zusammenfassung der MeTos initiierten Poly(oxazoline) und dem PEG-Polymer.

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _{n, NMR} [g·mol ⁻¹]	M _{n, GPC} [g·mol ⁻¹]	PDI	F ^{d**}
Me-PMeOx ₁₀ -EDA	10	14	1300			>99%
Me-PMeOx ₂₀ -EDA	20	22	2000	2400	1.10	77%
Me-PMeOx ₃₀ -EDA	30	28	2500	3300	1.10	90%
Me-PMeOx ₄₀ -EDA	40	42	3600			>99%
Me-PMeOx ₆₀ -EDA	60	77	6600	8700	1.03	>99%
Me-PEtOx ₁₀ -EDA	10	15	1400			>99%
Me-PEtOx ₃₀ -EDA	30	30	3000	3500	1.11	92%
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA	30	40	4600	3600	1.22	>99%
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA	30	37	4200	6400	1.15	92%
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₈ -EDA	25/5	22/8	3400	4100	1.17	>99%
Me-PiPrOx ₁₂ -PEtOx ₁₅ -EDA	15/15	12/15	3000	3900	1.11	>99%
Me-PiPrOx ₅ -PEtOx ₂₈ -EDA	5/25	5/28	3100	4100	1.17	86%
Me-PEG ₄₅ -EDA	45	44	2100	2100 ^{***}	1.01 ^{***}	>99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals. *** Bestimmt mittels ESI-MS.

3.1.1.2. Funktionalisierung von Polymeren mit DDA-X und DBX Startergruppen

Die bisher betrachteten Poly(2-oxazoline) wurden alle mit Hilfe des Initiators MeTos polymerisiert. In dieser Arbeit wurden neben den MeTos auch EDA terminierte Poly(2-oxazoline) mit den Initiatoren α,α -Dibrom-*para*-xylol (DBX) und 4-(Brommethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzyl-ammoniumbromid (DDA-X) hergestellt. Bei DDA-X handelt es sich um einen bekannten Initiator mit antimikrobiellen Eigenschaften.^{116, 117} Die Synthese konnte aus DBX und *N,N*-Dimethyldodecylamin (DDA) erfolgen (siehe Abbildung 22). Um die Konzentration an DDA in der Reaktionslösung möglichst niedrig zu halten und um unerwünschte Doppelsubstitution zu vermeiden, wurde das DDA

Ergebnisse und Diskussion

langsam zu einer DBX-Chloroform-Suspension getropft. Das DDA-X wurde im Anschluss durch mehrere Kristallisationsschritte gereinigt.

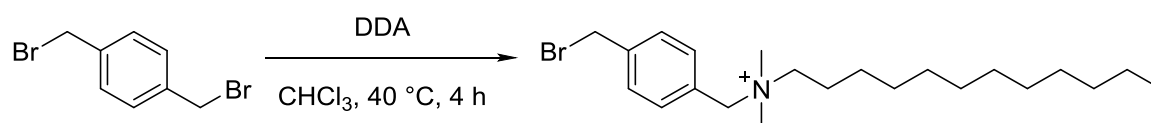


Abbildung 22: Synthese von DDA-X nach Fik et. al.^{115,116}

Zur anschließend Polymerisation von MeOx wurde DDA-X als Initiator eingesetzt. Die Polymersynthese wurde in einem geschlossenen Druckgefäß bei 110 °C durchgeführt. Nach Ablauf der Polymerisationsreaktion wurde das lebende kationische Polymerende mit einem zehnfachen molaren Überschuss EDA terminiert (Abbildung 23).

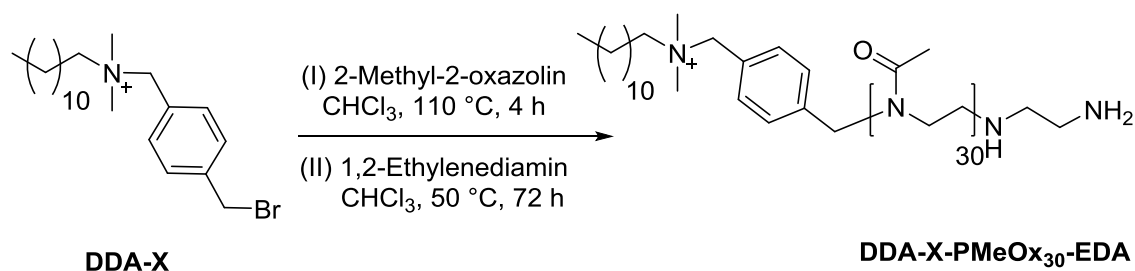


Abbildung 23: Synthese von DDA-X initiiertem und EDA terminiertem PMEOx nach Fik et. al.^{115,116}. Das Polymer wurde DDA-X-PMEOx-EDA genannt.

Das ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 24) zeigt die üblichen PMEOx Rückgratsignale bei 1.99 ppm (**10**) und 3.35 ppm (**11**, **12**) sowie die erwartete EDA Endgruppe bei 2.56 ppm (**13**, **14**). Für die DDA-X Initiatorgruppe sind gleich mehrere Signale zu erkennen. Zum einen ist die Methylgruppe der Alkylkette eindeutig bei 0.86 ppm (**1**) zu sehen. Desweiteren zeigt die Alkylkette ein Signal bei 1.26 ppm. Dieses Multipllett umfasst 18 Protonen (**2**) und ein Signal bei 1.78 ppm mit 2 Protonen. (**3**). Die Methylgruppen des quartären Ammoniums zeigen ein Singulett bei 2.96 ppm (**5**) und die Methylengruppen in α -Position zum Aromaten ein Multipllett bei 4.53 ppm (**6**, **9**). Die aromatischen Protonen (**7**, **8**) sind bei 7.51 ppm zu sehen, wobei die Signale der einzelnen Protonen stark überlagern.

Ergebnisse und Diskussion

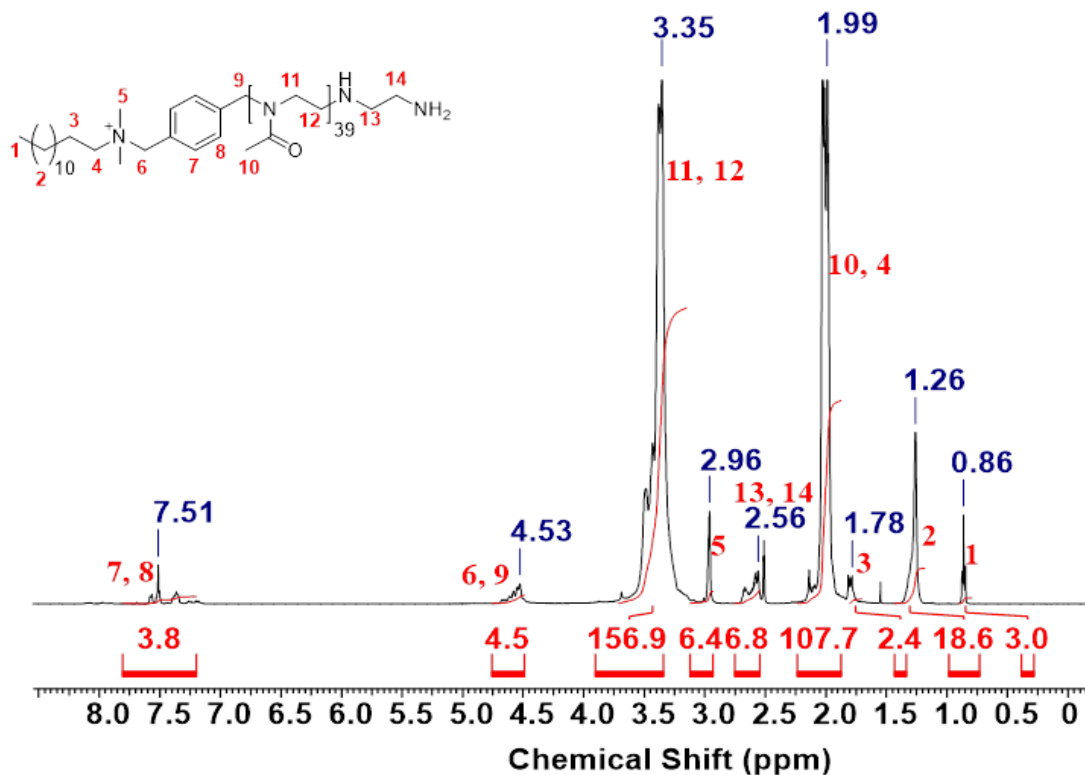


Abbildung 24: ¹H-NMR-Spektrum von DDA-X-PMeOx-EDA aufgenommen in DMSO (2.50 ppm).

Neben den DDA-PMeOx-EDA wurden weitere DDA-X initiierte Poly(2-oxazoline) mit den Monomeren EtOx und *i*PrOx hergestellt. Zudem wurde ein DDA-PMeOx-EDA mit zehn Wiederholungseinheiten synthetisiert. Eine Zusammenfassung der DDA-X initiierten Polymere ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Überblick über die DDA-X initiierten Poly(oxazoline).

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	Mn [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
DDA-X-PMeOx ₃₀ -EDA	30	39	3800	>99%
DDA-X-PMeOx ₁₀ -EDA	10	13	1600	>99%
DDA-X-PEtOx ₃₀ -EDA	30	45	4900	>99%
DDA-X-P <i>i</i> PrOx ₃₀ -EDA	30	19	2560	92%

Für DDA-X-initiierte Poly(oxazoline) konnten keine erfolgreichen GPC-Messungen durchgeführt werden. * Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Ergebnisse und Diskussion

Darüber hinaus wurde auch DBX selbst als Initiator für die Polymerisation von PMeOx verwendet, wobei es sich um einen bifunktionellen Initiator handelt. Dies bedeutet, dass der Initiator zwei Polymerketten gleichzeitig startet, wodurch zwei EDA Endgruppen eingebaut werden können. Die Polymerisation wurde nach KRUMM ET AL.¹⁴⁵ in CHCl₃ bei 100 °C für 4h durchgeführt. Die lebenden Polymerkettenenden wurden nach der Polymerisation mit einem 20-fachen molaren Überschuss an EDA terminiert. Nach 72 h bei 45 °C wurde das Polymer EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA in Diethylether gefällt. Anschließend wurde das überschüssige EDA mittels Dialyse abgetrennt. Durch das Monomer Initiator Verhältnis wurde eine Kettenlänge von 30 Wiederholungseinheiten eingestellt. Abbildung 25 zeigt die Reaktionsgleichung der Polymerisation mit DBX als Initiator.

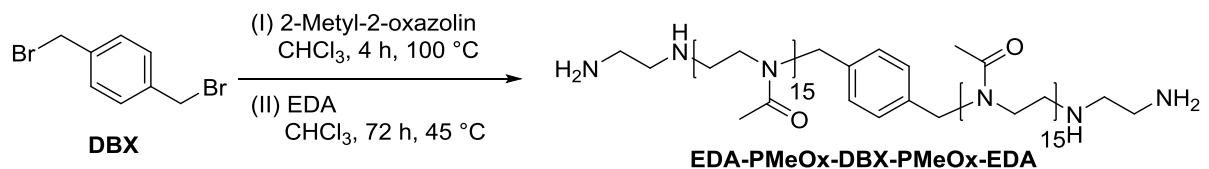


Abbildung 25: Polymerisation von EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA mit DBX als Initiator in CHCl₃ bei 110 °C. Nach 4 h Reaktionszeit wurde EDA zu Terminierung zugegeben. Die Synthese ist eine angepasste Variante von KRUMM et al.¹⁴⁵

Die Analyse des hergestellten EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA erfolgte wieder mittels ¹H-NMR Spektroskopie, das entsprechende Spektrum ist in Abbildung 26 gezeigt. Neben den PMeOx Signalen (3-5) sind die beiden EDA Endgruppen zu erkennen (6, 7). Zudem weist die DBX Gruppe zwei Signale auf. Zum einen sind die aromatischen Protonen bei 7.16 ppm (1), die leicht vom CHCl₃ Signal überlagert werden, zu sehen. Zum anderen sind die Protonen der Methylengruppen des DBX (2) zu erkennen. Dieses Signal wurde auch zu Referenzierung der anderen Signale verwendet. Dadurch konnte ein Polymerisationsgrad von 31 Wiederholungseinheiten ermittelt werden. Ein Vergleich der Integrale des EDA Signals (6, 7) und der Methylengruppen des DBX (2) liefert einen Funktionalitätsgrad größer als 99%.

Ergebnisse und Diskussion

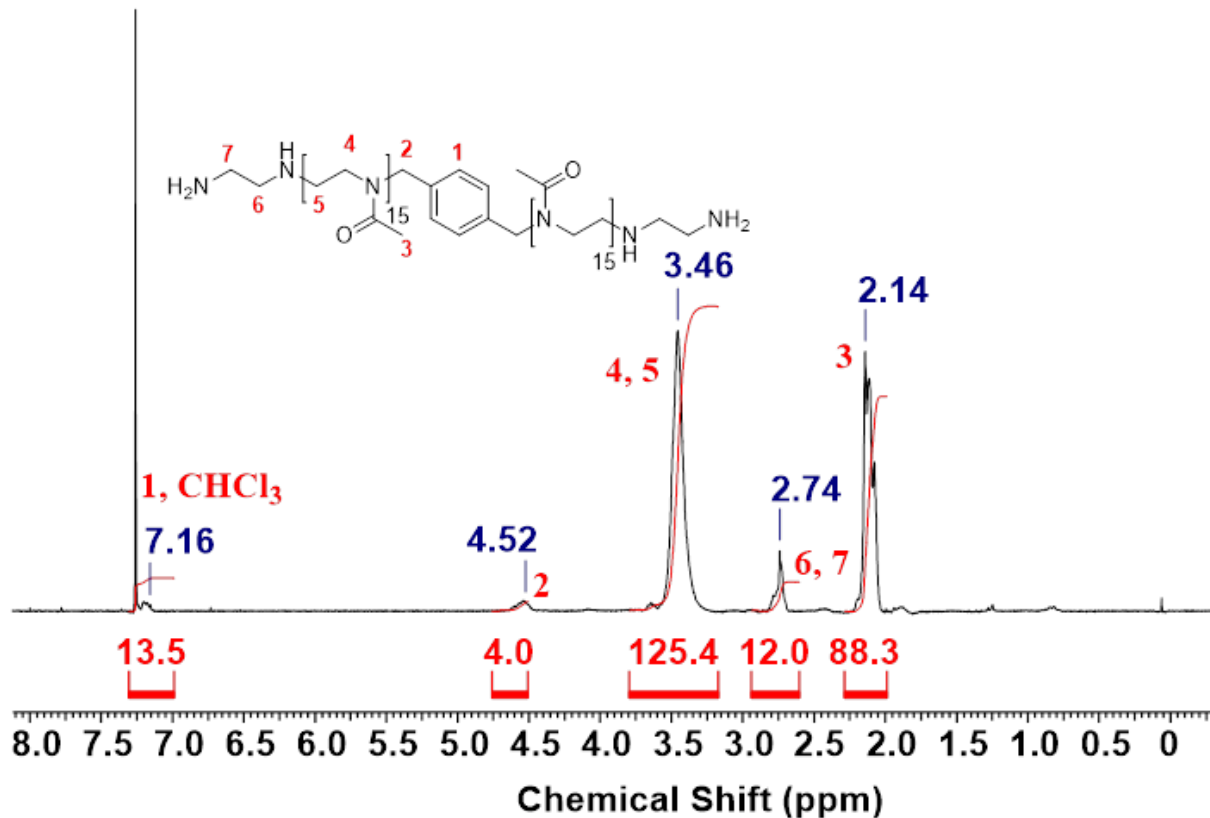


Abbildung 26: ¹H-NMR-Spektrum von EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA aufgenommen in CDCl₃ (7.27 ppm).

3.1.2. Endgruppenfunktionalisierung von amphiphilen Poly(oxazolinen) mit Ethylendiamin

Die in den Kapiteln zuvor besprochenen Polymere sind alle hydrophil und somit wasserlöslich. Durch den lebenden Charakter der Oxazolin-Polymerisation können definierte Diblockcopolymere synthetisiert werden. Dabei können durch die Kombination eines hydrophilen und eines hydrophoben Monomeres amphiphile Strukturen hergestellt werden, die in Wasser Aggregate wie Mizellen bilden können. Als hydrophiles Monomer wurde das bereits verwendete 2-Methyl-2-oxazolin (MeOx) und als hydrophobes Monomer 2-Heptyl-2-oxazolin (HepOx) verwendet. HepOx wurde wie PiPrOx und PcPrOx nach einer modifizierten Variante von SCHUBERT et. al.¹⁴⁴ hergestellt. Octannitril wurde mit Ethanolamin umgesetzt, wobei Zinkacetat Dihydrat oder Cadmiumacetat Dihydrat als Katalysator eingesetzt wurden. Die Reaktion erfolgte bei

Ergebnisse und Diskussion

130 °C mit einer Reaktionszeit von 25 h in der Mikrowelle oder 72 h im Ölbad. Eine fraktionierte Destillation lieferte das gewünschte HepOx mit 73% Ausbeute und einer Reinheit von 98%. Anschließend wurde HepOx über CaH₂ erneut destilliert. Ein Syntheschema von HepOx ist in Abbildung 27 dargestellt. (¹H-NMR-Spektrum von HepOx ist im Anhang gezeigt)

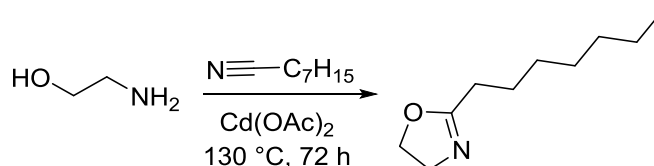


Abbildung 27: Synthese von HepOx aus Ethanolamin und Octannitril.

Die Polymerisation des Diblockcopolymers erfolgte mit MeTos als Initiator. Hierbei erfolgte zunächst die Polymerisation des MeOx-Blockes in CHCl₃ bei 90 °C. Die Reaktionszeit betrug 45 min. Nach Ablauf der Polymerisation der MeOx Monomere wurde HepOx zugegeben um den zweiten Block herzustellen. Die Polymerisation des HepOx-Blockes verlief bei 130 °C mit Reaktionszeiten zwischen 1-4 h. Anschließend wurde die Polymerisation des Diblockcopolymers mit der Zugabe von EDA beendet.

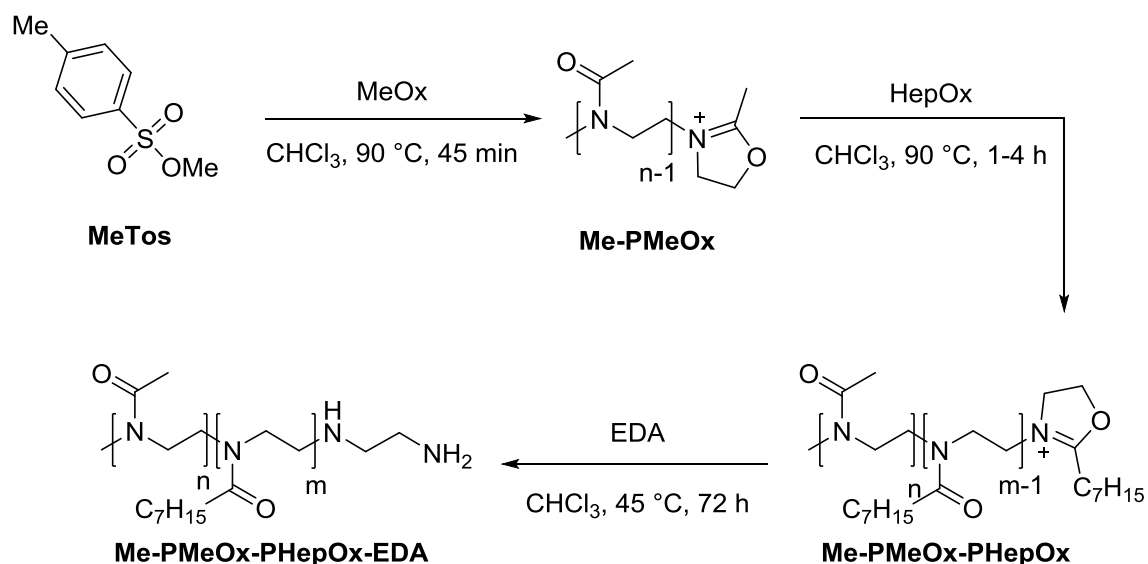


Abbildung 28: Synthese des Diblockcopolymers Me-PMeOx-PHepOx-EDA.

Ergebnisse und Diskussion

Die Diblockcopolymeren wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. In

Abbildung 29 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeOx₁₈-PHepOx₁₃-EDA als Beispiel gezeigt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt wieder die Methylstartergruppe (**1**) bei 3.04 ppm und die EDA Endgruppe (**14, 15**) bei 2.79 ppm. Die Methylgruppe des PMeOx (**2**) weist ein Signal bei 2.14 ppm und die Methylgruppe des PHepOx (**11**) ein Signal bei 0.87 ppm auf. Die Methylengruppen des HepOx-Blockes zeigen ein Signal bei 1.29 ppm (**7-10**) und zwei weitere bei 1.59 (**6**) und 2.33 (**5**) ppm. Die Methylengruppen des Polymerrückgrates in α -Position zur Amideinheit (**3, 4, 12, 13**) des PMeOx sowie des PHepOx besitzen ein gemeinsames Multipllett bei 3.44 ppm. Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ergibt einen Polymerisationsgrad von 31 Wiederholungseinheiten. Zudem konnte durch die Betrachtung der Signale **11, 5** und dem Initiatorsignal (**1**) das PMeOx zu PHepOx-Verhältnis bestimmt werden. Das hier gezeigte Diblockcopolymer weist einen PMeOx-Block mit 15 Wiederholungseinheiten und einen PHepOx-Block mit 12 Wiederholungseinheiten auf. Der Funktionalitätsgrad bezüglich der EDA-Terminierung beträgt 83%. Die Auswertung der anderen Diblockcopolymeren verlief analog.

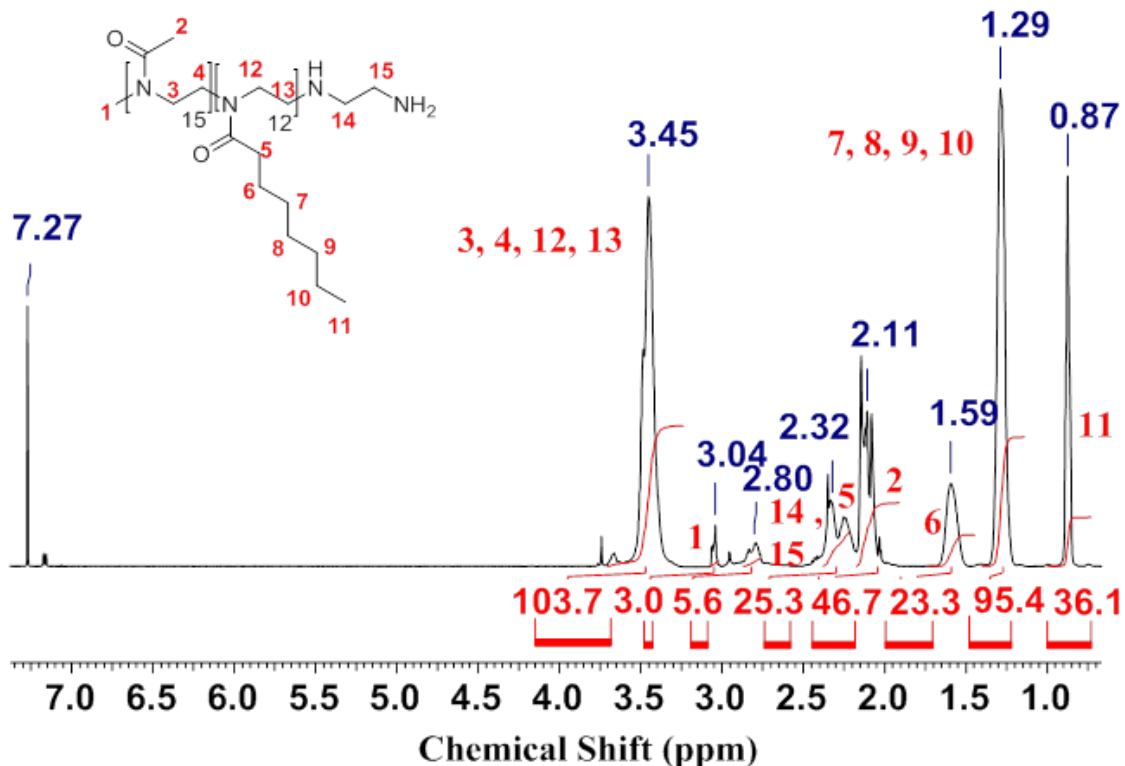


Abbildung 29: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Diblockcopolymer Me-PMeOx₁₈-PHepOx₁₃-EDA in CDCl_3 (7.27 ppm).

Ergebnisse und Diskussion

Ein Überblick über die hergestellten Diblockcopolymeren ist in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Überblick über die hergestellten PMeOx-PHepOx Diblockcopolymeren.

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _{n, NMR} [g·mol ⁻¹]	M _{n, GPC} [g·mol ⁻¹]	PDI	F ^{d**}
Me-PMeOx ₂₈ -PHepOx ₅ -EDA	25/5	28/5	3300	3300	1.12	66%
Me-PMeOx ₁₉ -PHepOx ₄ -EDA	20/5	19/4	2400	3300	1.16	>99%
Me-PMeOx ₁₉ -PHepOx ₉ -EDA	20/10	19/9	3100	3900	1.16	>99%
Me-PMeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ -EDA	15/15	15/12	3800	3800	1.16	>99%
Me-PMeOx ₆ -PHepOx ₁₂ -EDA	10/20	6/12	2600	4000	1.15	>99%
Me-PMeOx ₄ -PHepOx ₁₈ -EDA	5/20	4/18	3500	3800	1.12	83%
Me-PMeOx ₅ -PHepOx ₂₆ -EDA	5/25	5/26	4800	4200	1.19	>99%
Me-PHePOx ₂₃ -EDA	30	23	4000	2800	1.16	88%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

3.1.3. Endgruppenfunktionalisierung von Poly(oxazolinen) mit Aminen

Neben der Synthese von Ethylendiamin terminierten PMeOx sollten weitere Polymerendgruppen für die Synthese von PAKs untersucht werden. Daher wurden zusätzlich 1,4-Butylendiamin (BDA), 1,6-Hexylendiamin (HDA), 1,12-Dodecylendiamin (DODA), *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethylendiamin (TREN), Triethylentetramin (TET) und Tetraethylenpentamin (TEP) zur Terminierung des lebenden Polymerendes verwendet. Zudem wurde eine NH₂ Polymerendgruppe mittels polymeranaloger Umsetzung eingebaut. Ein Überblick über die verwendeten Endgruppen ist in Abbildung 30 gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

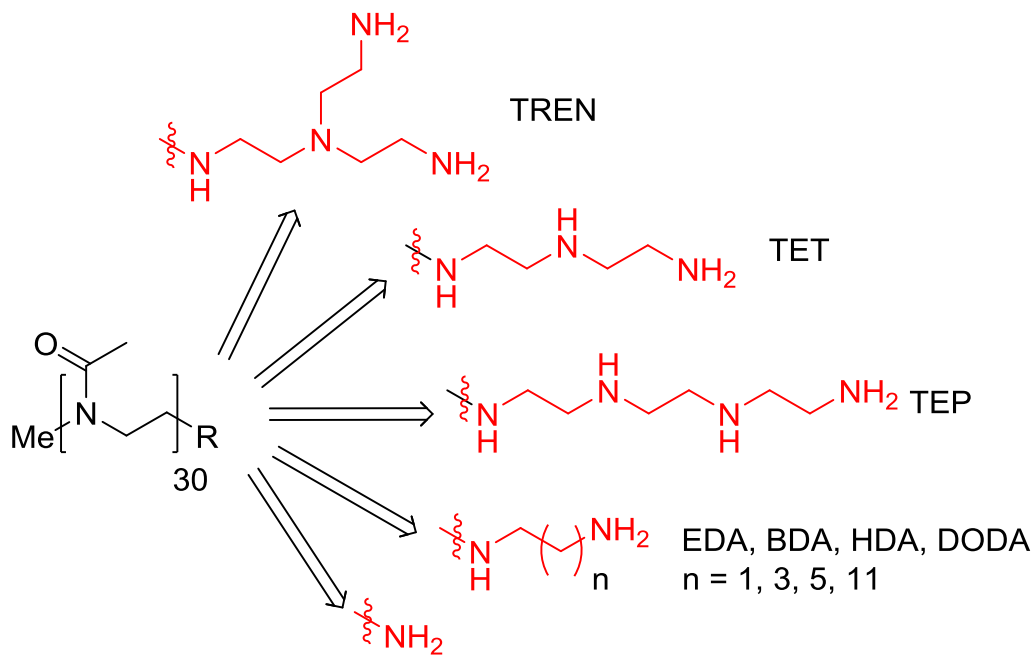


Abbildung 30: Überblick über die verwendeten Endgruppen, 1,4-Butylendiamin (BDA), 1,6-Hexylendiamin (HDA), 1,12-Dodecylamin (DODA), *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethylenediamin (TREN), Triethylenetetramin (TET) und Tetraethylenpentamin (TEP). Außerdem wurde eine NH_2 -Polymerendgruppe eingebaut.

Der Einbau einer BDA, HDA, DODA, TREN, TET und TEP Endgruppe konnte über eine Terminierung der lebenden kationischen Polymerendes erfolgen. Dabei konnten die gleichen Terminierungsbedingungen wie mit EDA verwendet werden: 72 h bei 45°C mit einem 10-fachen molaren Überschuss an Terminierungsreagenz. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der terminierten Polymere befinden sich im Anhang. Die Auswertung der Spektren verlief analog zu den EDA terminierten P MeOx aus Kapitel 3.1.1.1. Die Synthese der NH_2 Endgruppe wurde nach KAMPMANN et al. ¹⁴⁶ durchgeführt. Dabei wurde das lebende Polymerende zunächst mit Natriumazid terminiert. Durch eine anschließende STAUDINGER Reaktion mit PPh_3 konnte die gewünschte Aminendgruppe erhalten werden (Abbildung 31). Die Charakterisierung der Me-PMeOx-N_3 und Me-PMeOx-NH_2 Polymere erfolgte mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

Ergebnisse und Diskussion

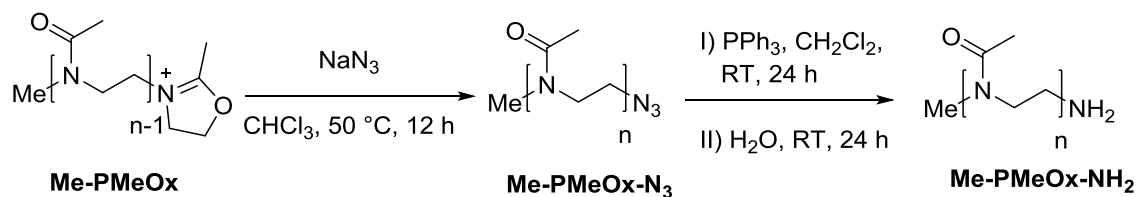


Abbildung 31: Synthese von Me-PMeOx-NH₂ nach KAMPMANN et. al.¹⁴⁶

Der Nachweis der N₃ und NH₂ Endgruppe wurde mit Hilfe der IR-Spektroskopie durchgeführt. Die IR-Spektren sind in Abbildung 32 gezeigt. Die typische Azid-Bande ist bei 2100-2270 cm⁻¹ (asymmetrische Valenzschwingung) zu sehen. Diese Bande ist nach der Reduktion mit PPh₃ nicht mehr zu identifizieren. Dies weist auf eine erfolgreiche Umsetzung hin.¹⁴⁶

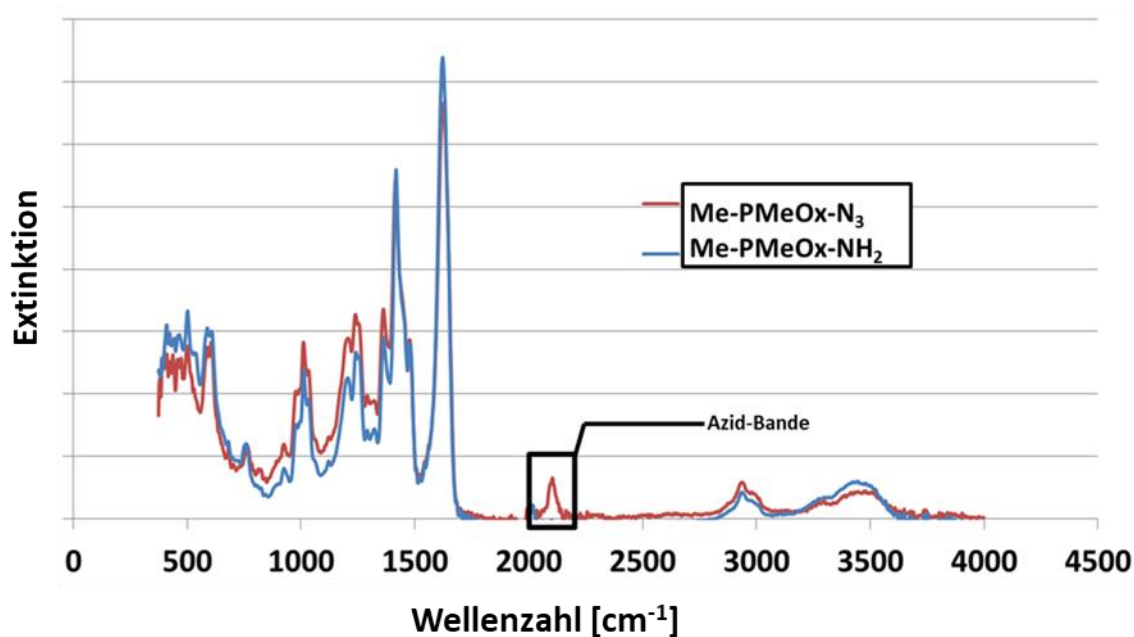


Abbildung 32: IR-Spektren der Me-PMeOx-N₃ und Me-PMeOx-NH₂. Markiert ist die Azid-Bande bei 2100-2270 cm⁻¹.¹⁴⁶

Ein Überblick über die hergestellten Polymere mit verschiedenen Aminendgruppen soll die nachfolgende Tabelle geben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: Überblick über die Polymere mit einer BDA, HDA, DODA, TET, TEP oder TREN Endgruppe. Die Analyse erfolgte mittels GPC und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

Polymer	DP_{Set}	DP_{NM} R^*	$M_{n, \text{NMR}}$ [g·mol $^{-1}$]	$M_{n, \text{GPC}}$ [g·mol $^{-1}$]	PDI	F^{d**}
Me-PMeOx $_{29}$ -BDA	30	29	2600	3300	1.11	93%
Me-PMeOx $_{48}$ -HDA	30	39	3400	4300	1.10	99%
Me-PMeOx $_{34}$ -DODA	30	38	3400	3200	1.13	98%
Me-PMeOx $_{44}$ -TREN	30	33	3000	3400	1.11	91%
Me-PMeOx $_{41}$ -TET	30	34	3000	3700	1.09	99%
Me-PMeOx $_{33}$ -TEP	30	29	2600	3700	1.09	99%
Me-PMOx $_{24}$ -NH $_2$	30	24	2100	2800	1.09	/ ***

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals. *** Endgruppensignale konnten nicht im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identifiziert werden, daher wurde der Funktionalitätsgrad nach der CIP-Konjugation bestimmt.

3.1.4. Seitenkettenfunktionalisierung mit EDA

Dieses Teilkapitel soll eine Synthese vorstellen, die es ermöglicht EDA nicht nur als Endgruppe sondern auch als Seitenkettengruppe einzubauen. Dies ermöglicht die späteren Einführung von CIP als Seitenkettenmodifikation. Zu diesem Zweck wurde ein modifiziertes mehrstufiges Verfahren von MEES et. al.¹⁴⁷ verwendet (Abbildung 33). Dazu wurde zunächst PEtOx mikrowellengestützt hergestellt und mit EDA terminiert (Vergleich Kapitel 3.1.1). Anschließend folgte eine partielle Hydrolyse der Seitenkette zu Poly(ethylenimin) (PEI). Die Hydrolyse wurde mittels konzentrierter Salzsäure bei 73 °C für 4 h durchgeführt. Die Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigt einen Hydrolysegrad von etwa 25%. Im darauffolgenden Schritt wurden die PEI-Einheiten mit Methylsuccinylchlorid umgesetzt, wodurch eine neue Poly(2-oxazolin)-Einheit entsteht, die eine reaktive Estergruppe besitzt. Die neue Poly(2-oxazolin)-Einheit soll im weiteren Verlauf als PMestOx bezeichnet werden. Die Substitution des Succinylmethylester an das freie Amin der PEI-Einheit erfolgte unter der Zugabe von Triethylamin. Nach einer Fällung in Diethylether und anschließender Dialyse konnte das Copolymer Me-PEtOx-

Ergebnisse und Diskussion

PMestOx-EDA erhalten werden. Zum Abschluss der Synthesesequenz wurde das Copolymer einer Amidierungsreaktion unterzogen. Hierzu wurde Me-PEtOx-PMestOx-EDA in EDA bei 70 °C gerührt. Der Methylester wurde unter diesen Bedingungen gespalten und eine Amidbindung mit EDA geknüpft (siehe Abbildung 33). Die neue Poly(2-oxazolin)-Einheit wird als PsucEDAOx bezeichnet. Die einzelnen Reaktionsschritte zum Me-PEtOx-PsucEDAOx-EDA wurden mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verfolgt. Durch die eingebauten EDA Gruppen besitzt das Me-PEtOx-PsucEDAOx-EDA nun zehn primäre Amingruppen die eine potenzielle Bindungsstelle für weitere Modifikationen bieten. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Endproduktes und der Zwischenstufen sind im Anhang dargestellt. Die Signale in den Spektren konnte den jeweiligen Protonen der entsprechenden Struktur zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgte nach MEES et. al.¹⁴⁷ und daher soll an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen werden. Die vierstufige Synthese von Me-PEtOx-PsucEDAOx-EDA konnte mit einer Gesamtausbeute von 54% durchgeführt werden.

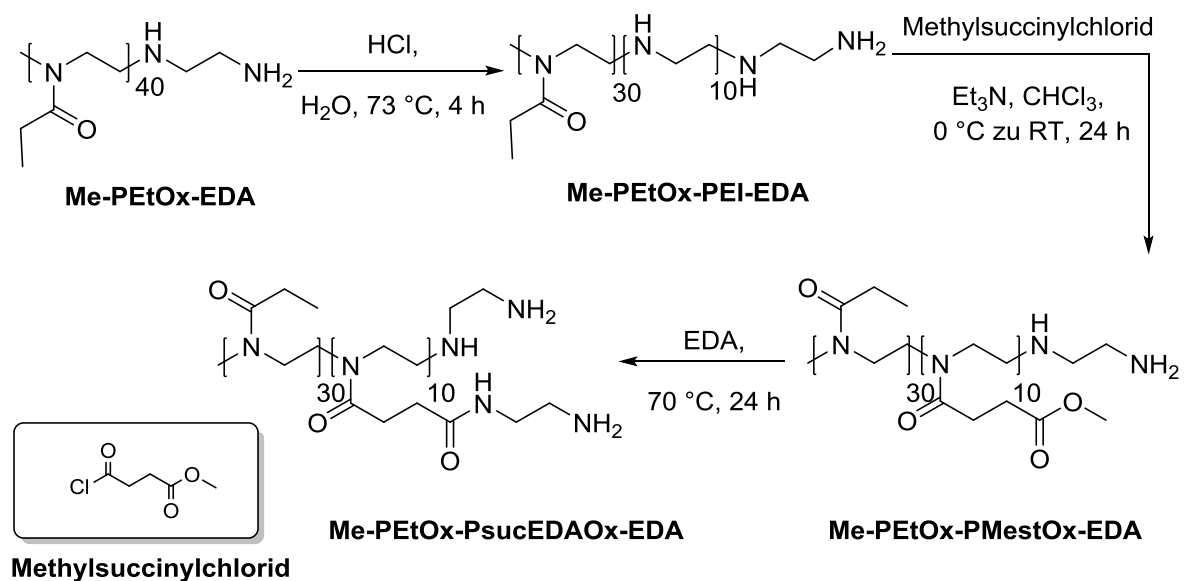


Abbildung 33: Syntheseroute nach MEES et al.¹⁴⁷ zu Me-PEtOx-PsucEDAOx über mehrere Stufen, diese beinhalten eine partielle Hydrolyse, eine Substitutionsreaktion mit Methylsuccinylchlorid sowie eine Amidierung.

Ergebnisse und Diskussion

3.1.5. Synthese von amphiphilen Triblockcopolymeren

Die bisher betrachteten Polymere sollten für die Herstellung von PAKs dienen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese von antimikrobiellen Polymernetzwerken. Daher soll in diesem Kapitel die Synthese von Homo- und Triblockcopolymeren mit geeigneter Endgruppe zur Vernetzung vorgestellt werden. Es wurden Triblockcopolymere aus PHepOx und PMeOx sowie PHepOx und PMeOx-Homopolymere mit vernetzbarer Endgruppe hergestellt. HepOx wurde mit *trans*-1,4-Dibrom-2-buten (DBB) als Initiator umgesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von MeOx. Zum Schluss wurde das lebende kationische Polymerende mit *N*-[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamide (AMA) terminiert (vergleiche Abbildung 34). Die Synthese der ABA-Triblockcopolymere beruht auf einer von KRUMM et al.^{148 149} publizierten Methode zur Herstellung von amphiphiler Conetzwerke. Allerdings besitzen die in dieser Arbeit hergestellten Triblockcopolymere eine AMA- statt einer TREN-Endgruppe. Diese Endgruppe konnte schon von DECH et al.^{150 148, 151} erfolgreich als Poly(2-oxazolin)-Endgruppe etabliert werden und soll eine einfache Vernetzung mittels radikalischer Polymerisation ermöglichen.

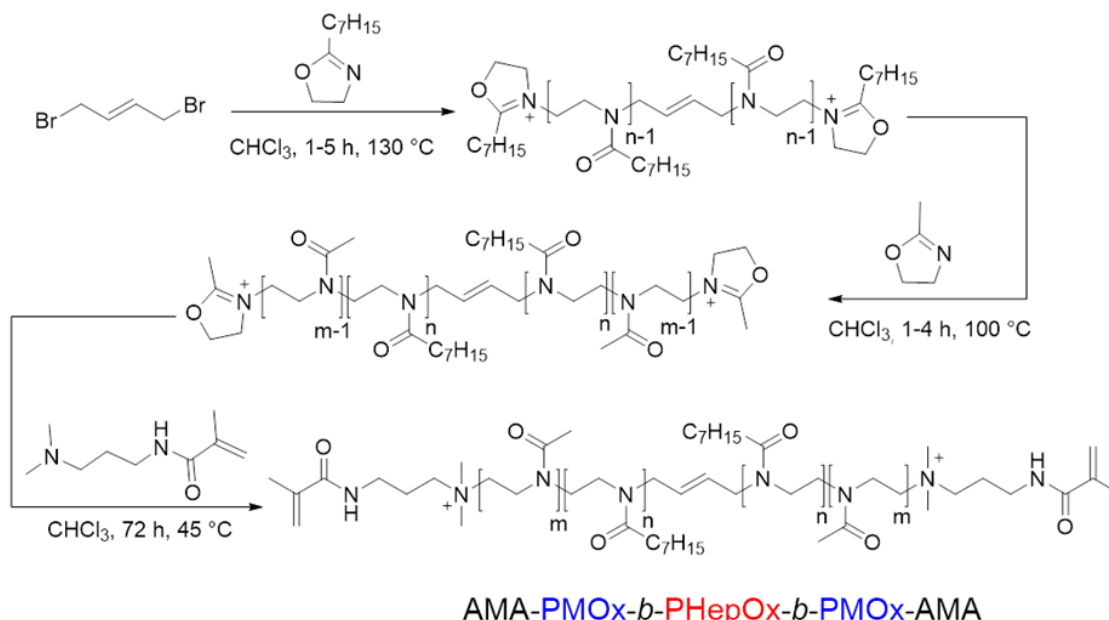


Abbildung 34: Synthese von AMA-PMeOx-*b*-PHepOx-*b*-PMeOx-AMA (MHM).¹⁴⁹

Ergebnisse und Diskussion

Ein ^1H -NMR-Spektrum eines AMA terminierten Triblockcopolymers ist in Abbildung 35 gezeigt. Als Referenz zur Bestimmung des Polymerisationsgrads, der Größe der einzelnen Blöcke sowie des Funktionalitätsgrads können die Doppelbindungsprotonen bei 5.47 ppm herangezogen werden. Die Signale **4**, **5** und **6** gehören zur Seitengruppe des PHepOx und liefern somit die Länge dieses Blockes. Diese beträgt 26 Wiederholungseinheiten. Unter Berücksichtigung des Signals bei 3.44 ppm sowie des Signals der PMeOx Seitengruppe bei 2.10 ppm (**11**) kann die Länge des PMeOx-Blockes (22 Wiederholungseinheiten) sowie die Gesamtlänge (48 Wiederholungseinheiten) bestimmt werden. Die meisten Signale der AMA-Endgruppen sind durch die Signale des Polymers überlagert, allerdings können die Doppelbindungsprotonen (**17**, **18**) bei 5.36 und 5.82 ppm eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Signale und der Signale der Doppelbindungsprotonen kann ein Funktionalitätsgrad bestimmt werden. Der Funktionalitätsgrad bezüglich der AMA-Terminierung beträgt 93%.

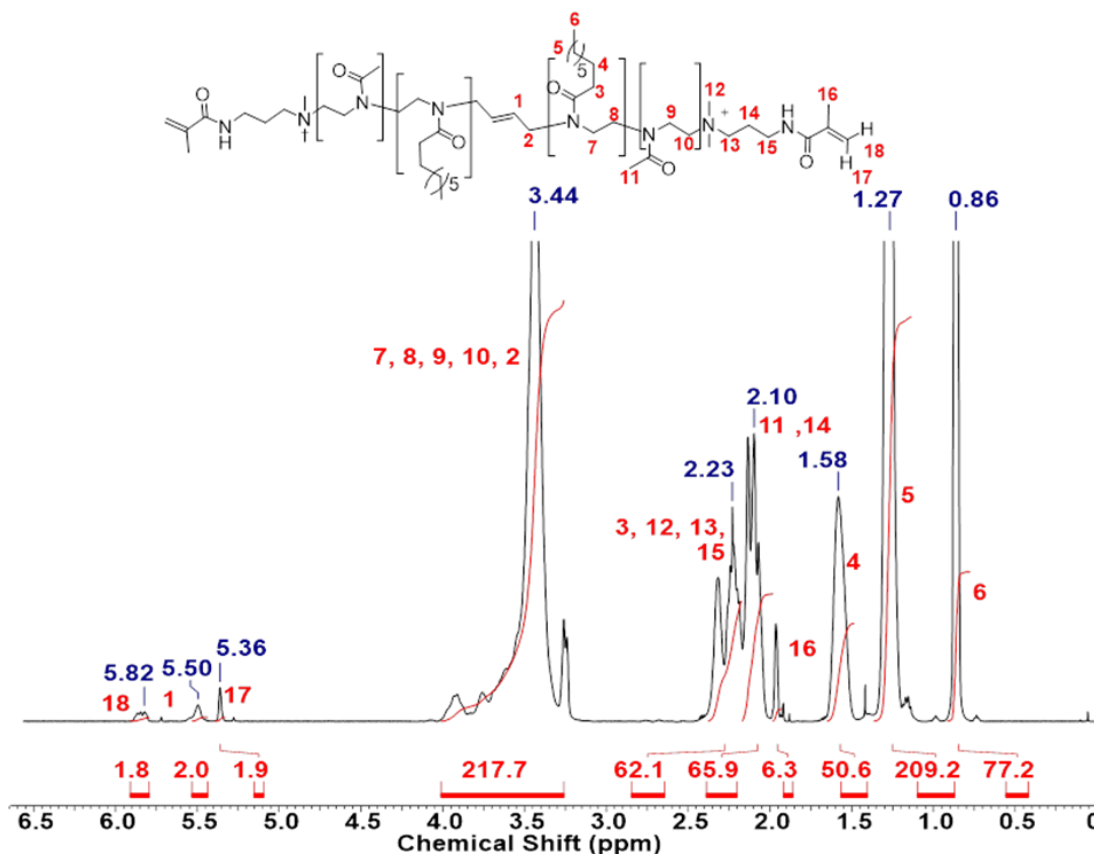


Abbildung 35: ^1H -Spektrum von AMA- PMeOx_{10} - b - PHepOx_{26} - b - PMeOx_{11} -AMA (MHM1) in CDCl_3 (7.27 ppm).¹⁴⁹

Ergebnisse und Diskussion

Messungen der Triblockcopolymeren mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestätigen die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Eine Zusammenfassung der analytischen Daten der einzelnen AMA-PMeOx-*b*-PHepOx-*b*-PMeOx-AMA Triblockcopolymeren aus der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und der GPC sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Charakterisierung der AMA-PMeOx-*b*-PHepOx-*b*-PMeOx-AMA Triblockcopolymeren mittels $^1\text{H-NMR}$ und Gelpermeationschromatographie (GPC).¹⁴⁹

Polymer	Probenname [*]	DP _{NMR} ^{**}	PHepox _{NMR} [vol.%]	M _n [g·mol ⁻¹] ^{***}	PDI [*] ^{**}	F ^{d****}
PMeOx ₁₁ - <i>b</i> -PHepOx ₂₆ - <i>b</i> - PMeOx ₁₁	MHM1	11/26/11	32	3400	1.45	0.92
PMeOx ₁₅ - <i>b</i> -PHepOx ₂₁ - <i>b</i> - PMeOx ₁₅	MHM2	15/21/15	50	2500	1.63	0.95
PMeOx ₂₀ - <i>b</i> -PHepOx ₁₃ - <i>b</i> - PMeOx ₂₀	MHM3	20/13/20	62	2168	1.34	0.95
PMeOx ₁₀ - <i>b</i> -PHepOx ₂₄ - <i>b</i> - PMeOx ₁₀	MHM4	10/23/10	70	3200	1.63	0.75
PMeOx ₁₀ - <i>b</i> -PHepOx ₄₆ - <i>b</i> - PMeOx ₁₀	MHM5	10/46/10	82	1900	1.92	0.99
PHepOx-	H	83	100	3700	1.56	0.61
PMeOx	M	65	0	4000	1.67	0.99

* Der Name setzt sich aus den PMeOx (M) und den PHepOx (H) Block zusammen. ** Der Polymerisationsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. *** Das Zahlenmittel der Molaren Masse sowie der Polydispersitätsindex wurden mittels GPC bestimmt. **** Funktionalitätsgrad wurde mittels $^1\text{H NMR}$ Spektroskopie bestimmt durch den Vergleich des Integrals der Endgruppen Signale mit dem Integral des Initiator Signals

Ergebnisse und Diskussion

3.2. Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate

Für die Konjugation von Ciprofloxacin (CIP) mit Poly(2-oxazolin) (POx) wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden Polymere mittels Direktterminierung mit CIP funktionalisiert und zum anderen durch eine polymeranaloge Reaktion. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in Zusammenarbeit mit JIE WANG¹³⁹, YOUSSEF WOLF¹⁴⁰ und THANDUONG NGUYEN¹⁴¹ sowie ALINA ROMANOVSKA¹⁵² erhalten.

3.2.1 Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels Direktterminierung

Ansatzpunkt dieser Untersuchungsreihe war die Masterarbeit von SIMON HARMUTH.¹³⁸ Diese behandelt die Direktterminierung von PMeOx mit CIP. Dabei konnten verschiedene Methoden erarbeitet werden, die eine selektive Verknüpfung über die Piperazin- oder die Carboxylat-Gruppen des Ciprofloxacins ermöglichen (siehe Kapitel 1.4). Abbildung 36 zeigt nochmal die beiden verschiedenen Konjugate. Jedoch zeigten die hergestellten CIP-Konjugate unabhängig von der Antibiotikabindungsstelle keine antimikrobielle Aktivität.¹³¹

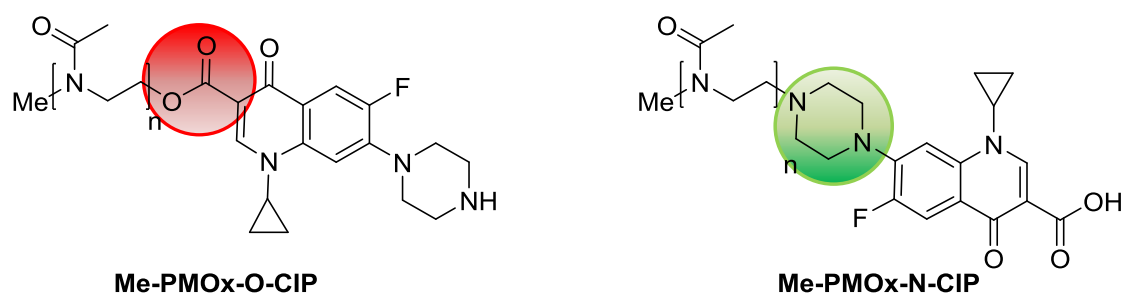


Abbildung 36: Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate von HARMUTH. Links wurde das Antibiotikum über die Carboxylatgruppe und rechts über die Piperazingruppe gebunden.¹³⁸

Ausgehend von dieser Arbeit sollte nun eine zusätzliche DDA-X Gruppe in das CIP-Konjugat eingeführt werden. Das DDA-X sollte durch Wechselwirkung mit der Bakterienmembran die Diffusion des PAKs in die Bakterienzelle kooperativ beeinflussen

Ergebnisse und Diskussion

und dadurch zu einer höheren antimikrobiellen Aktivität führen. Die Antibiotika-Konjugation sollte wie zuvor durch Direktterminierung des lebenden kationischen Polymerkettenendes mit Ciprofloxacin erfolgen. MeOx wurde unter Verwendung des Initiators DDA-X polymerisiert. Die Polymersynthese wurde in einem geschlossenen Druckgefäß bei 110 °C durchgeführt (Vergleich 3.1.1.2). Nach Ablauf der Polymerisationsreaktion wurde das lebende kationische Polymerkettenende mit einem 10 fachen Überschuss CIP terminiert (siehe Abbildung 37). Überschüssiges CIP wurde durch mehrfache Dialyse (1000 Molecular Weight Cut Off, MWCO) entfernt.

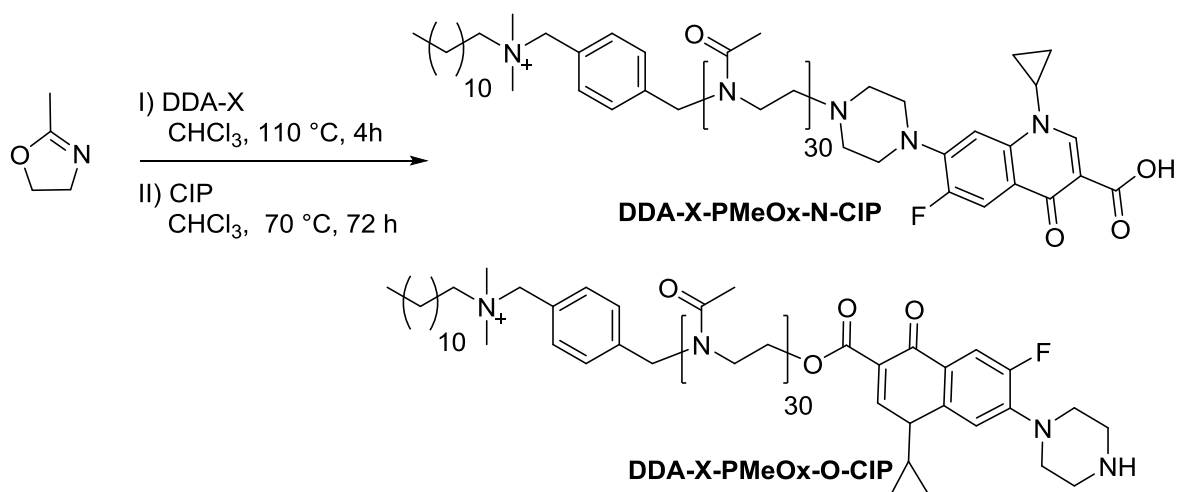


Abbildung 37: Synthese von DDA-X-PMeOx-CIP Konjugaten.

Die Charakterisierung der Konjugate erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (siehe Abbildung 38). Im entsprechenden Spektrum sind alle Signale für das PMeOx (**8-10**) sowie die Signale für den DDA-X Initiator (**1-7**) eindeutig zu erkennen. Zudem sind die Signale der aromatischen Protonen des Ciprofloxacins (**16** und **17**) zu sehen. Mit Hilfe dieser beiden Signale kann der Funktionalitätsgrad auf 40% bestimmt werden. Das bedeutet, dass lediglich 40% der Polymere eine CIP Endgruppe besitzen. Der Polymerisationsgrad beträgt 62 Wiederholungseinheiten und weicht somit deutlich von den angesetzten 30 Wiederholungseinheiten ab. Jedoch könnte dies durch die mehrfache Dialyse erklären werden. Durch diese werden niedermolekulare Komponenten abgetrennt, jedoch können auch kurz-kettige Polymere die Membran

Ergebnisse und Diskussion

passieren. Dadurch kann das zahlenmittlere Molekulargewicht zu höheren Molmassen und somit auch zu einem höheren Polymerisationsgrad verschoben werden.

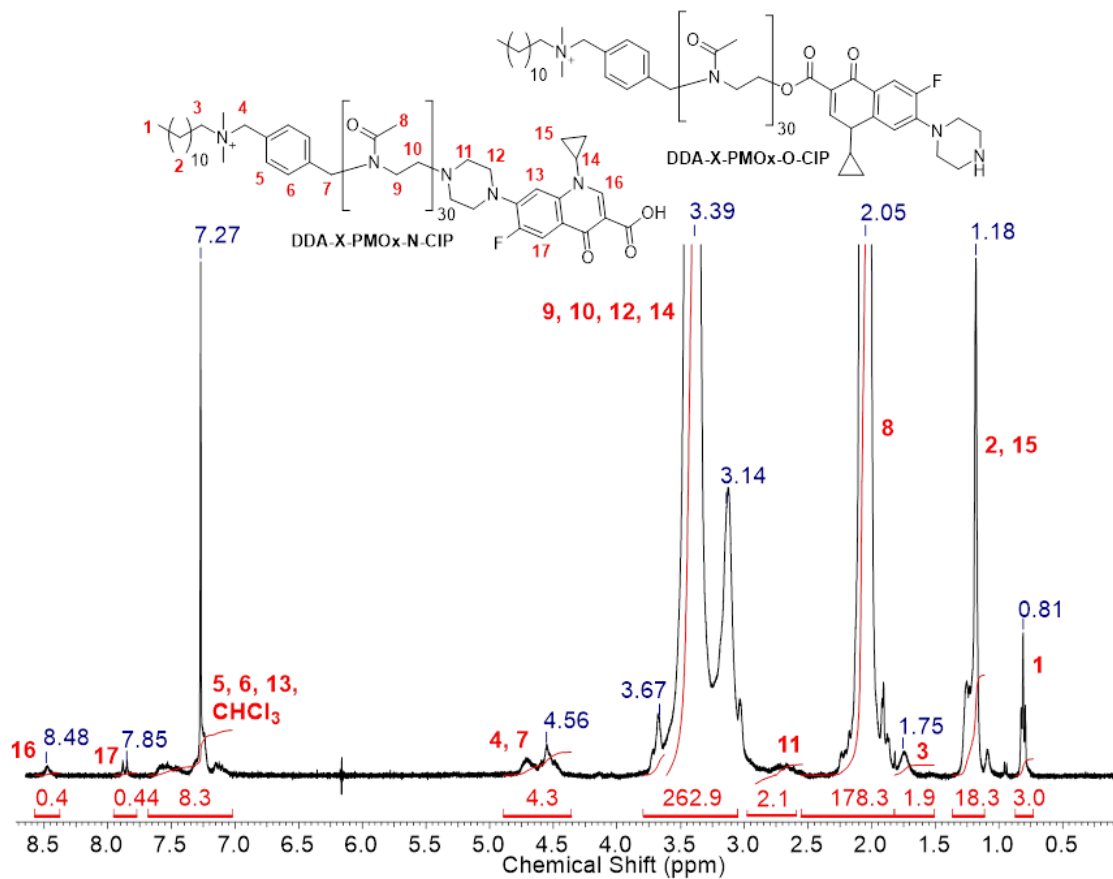


Abbildung 38: ¹H-NMR-Spektrum der Konjugate DDA-X-PMeOx-O-CIP und DDA-X-PMeOx-N-CIP in CDCl₃ (7.27 ppm).

Die antimikrobielle Aktivität des hergestellten CIP-PMeOx-Konjugats wurde mittels minimal inhibierender Konzentrationstest (MIC) charakterisiert. Der sogenannte MIC-Wert beschreibt die Konzentration, bei der 99% aller Bakterien am Wachstum gehemmt werden. Die Konzentration wurde bestimmt, indem eine bekannte Menge der Probe in Nährmedium gelöst wurde. Anschließend wurde damit eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Danach wurde jede Verdünnungsstufe mit einer Bakteriensuspension die 10^7 Zellen·mL⁻¹ enthält angeimpft (vergleiche Abbildung 39).

Ergebnisse und Diskussion

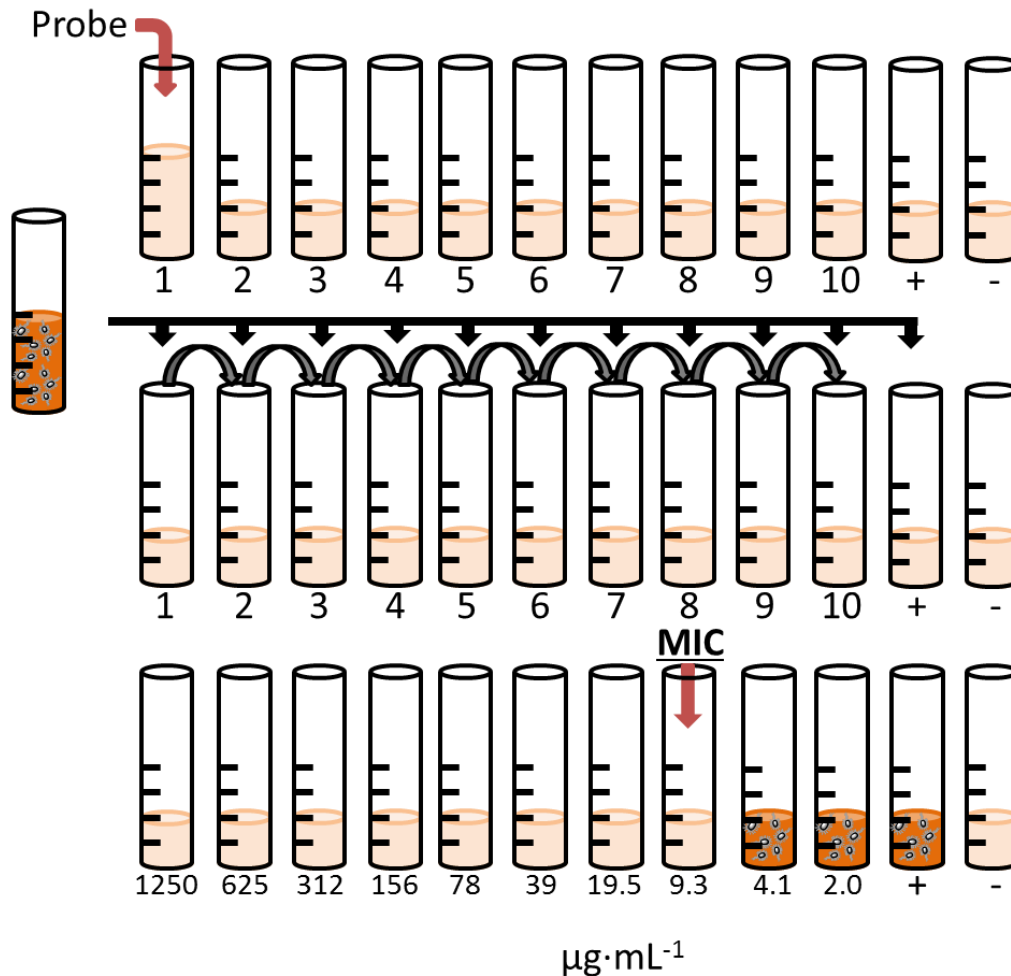


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Bestimmung der minimalen inhibierenden Konzentration (MIC). Modifiziert nach KRUMM.¹⁵³

Die Anzahl an Verdünnungsstufen variierte je nach Aktivität der Probe. Neben den einzelnen Verdünnungsstufen wurde eine positive Probe (nur Nährmedium und Bakterienlösung) und negative Probe (nur Nährmedium) angefertigt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bleiben nur die Verdünnungsstufen klar, bei denen die Bakterien erfolgreich am Wachstum gehindert wurden. Dabei entsprach die letzte unbewachsene Verdünnungsstufe der minimalen inhibierenden Konzentration. Somit ist eine Probe umso aktiver desto kleiner der MIC-Wert ist. Für antimikrobielle Polymere wurde von FORTUNIAK et. al.¹⁵⁴ ein Bewertungsmaßstab vorgeschlagen; dieser ist in Tabelle 6 dargestellt. Nach diesem Bewertungsmaßstab besitzen Polymere mit einem

Ergebnisse und Diskussion

MIC-Wert unter $160 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ eine gute antimikrobielle Aktivität. Bei einem MIC-Wert von größer als $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kann von einer schwachen antibakteriellen Aktivität gesprochen werden.

Tabelle 6: Bewertungsmaßstab nach FORTUNIAK et. al.. ¹⁵⁴

MIC-Wert des Polymers [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Antibakterielle Aktivität
<10	Exzellent
10-50	Sehr Gut
50-160	Gut
160-600	Moderat
600-2000	Schwach
>2000	Sehr Schwach

Das DDA-X-PMeOx-CIP zeigt in den durchgeführten MIC Tests eine Aktivität von $52 \pm 17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gegen den pathogenen Keim *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Somit weist dieses DDA-X initiierte Konjugat im Gegensatz zu den Konjugaten von HARMUTH ¹³⁸ eine antimikrobielle Aktivität auf. Nach dem Bewertungsmaßstab von FORTUNIAK et. al. ¹⁵⁴ besitzt es sogar eine gute bis sehr gute Aktivität *gegen S. aureus*. Allerdings zeigt der Vergleich mit niedermolekularem CIP ($0.42 \pm 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), dass das DDA-X-PMeOx-CIP einen deutlich höheren MIC-Wert besitzt. Ebenso weisen andere antimikrobielle DDA-X initiierte Polymere ähnliche, wenn nicht sogar bessere biozide Aktivitäten auf. ¹¹⁶ Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus HARMUTHS Masterarbeit ¹³⁸ kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivität des Konjugats durch die DDA-X-Gruppe resultiert. Dabei scheint die CIP-Endgruppe keinen Einfluss auf die biologische Aktivität zu haben. Das hier hergestellte DDA-X-PMeOx-CIP zeigt, dass die Direktterminierung keine geeignete Methode zur Synthese von antimikrobiell aktiven Polymer-CIP-Konjugaten ist. Dies stimmt auch mit der Arbeit von HARMUTH überein. Die direkte Bindung des Fluorchinolons zum PMeOx könnte zu einer geringeren Affinität zum Enzym Gyrase bzw. Topoisomerase IV führen. Die direkte Bindung des Antibiotikums zum

Ergebnisse und Diskussion

Polymer könnte auch zu einer starken Verringerung der Diffusionsfähigkeit durch die Zellmembran führen.

3.2.2. Synthese von Ciprofloxacin-„Spacern“

Als Alternative zur Direktterminierung wurde eine Strategie entwickelt, die es erlaubt einen Abstandshalter, einen sogenannten „Spacer“, zwischen Polymer und CIP einzubauen. Dabei sollte der „Spacer“ durch eine Modifikation des niedermolekularen CIP eingeführt werden. Anschließend sollte das neu hergestellte CIP-Derivat durch eine polymeranaloge Reaktion mit dem Polymer konjugiert werden.

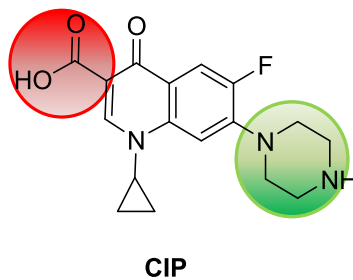


Abbildung 40: Struktur des Ciprofloxacins, dabei ist die Carboxylgruppe in Rot und die Piperazingruppe in Grün hervorgehoben.

Für die Modifikation des CIP kommen wie bei der Direktterminierungsmethode prinzipiell nur zwei funktionelle Gruppen in Frage: die Carboxylgruppe und die Piperazingruppe (siehe Abbildung 40). Struktur-Wirk-Beziehungsstudien zeigen allerdings, ^{72, 73} dass eine Veränderung der Carboxylgruppe zu einem Verlust der Bindungsaffinität zur Zielstruktur führt, wodurch das Antibiotikum massiv an Aktivität verliert, wohingegen eine Derivatisierung der Piperazingruppe nicht zwangsläufig zu inaktiven CIP-Derivaten führt. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten die folgenden Modifikationen ausschließlich am Piperazinring des Ciprofloxacins vorgenommen

Ergebnisse und Diskussion

werden. Eine Übersicht über die hergestellten CIP-Derivaten ist in der Abbildung 41 gegeben.

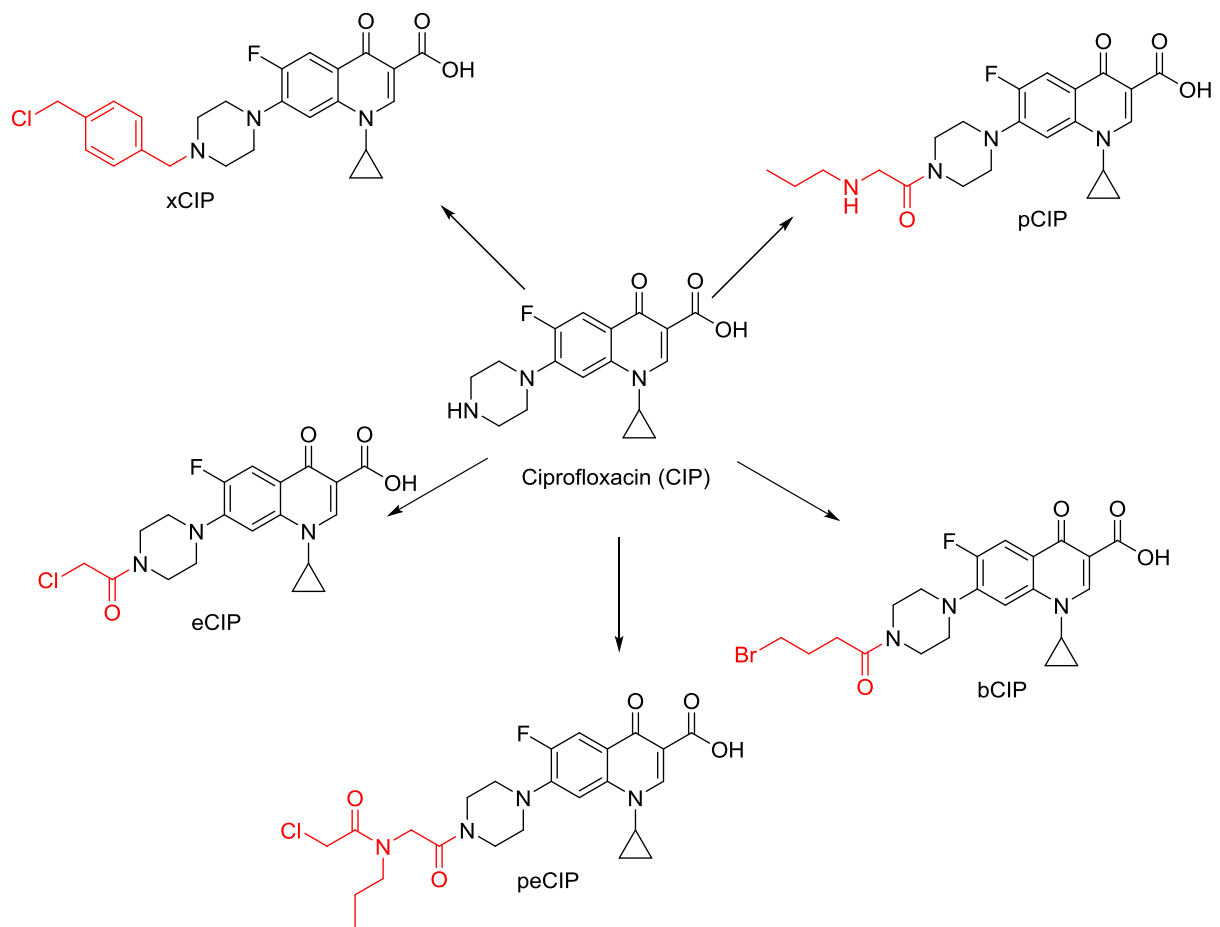


Abbildung 41: Schematische Darstellung der verschiedenen synthetisierten CIP-Derivate.

Für die Synthese des xCIP-„Spacers“ wurde eine modifizierte Vorschrift von KERNS et. al.^{155, 156} gewählt. Dabei wurde CIP mit α,α -Dichlor-*p*-xylol und Natriumhydrogencarbonat umgesetzt (Vergleich Abbildung 42). Dabei erfolgte ein nucleophiler Angriff der Piperazingruppe des CIP's an eines der beiden elektrophilen Kohlenstoffatome des α,α -Dichlor-*p*-xylols. Natriumhydrogencarbonat diente sowohl als Base und auch als Chloridionenfänger.

Ergebnisse und Diskussion

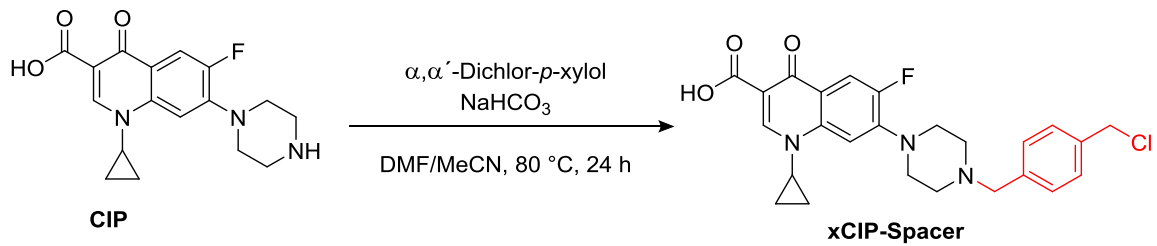


Abbildung 42: Synthese von xCIP-Spacer nach KERNS et. al..^{131, 155}

Durch diese Reaktion wurde ein elektrophiles Zentrum in das entstehende CIP-Derivat eingebaut, welches eine spätere Konjugatbildung durch eine polymeranaloge Reaktion ermöglicht. Die vorgestellte Synthese konnte mit einer Ausbeute von 49% durchgeführt werden. Die Strukturaufklärung des xCIPs erfolgte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie (Abbildung 43). Neben den typischen CIP Signalen (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8**) sind auch Signale (**10** und **11**) im Bereich von aromatischen Protonen zwischen 7.24-7.27 ppm sowie Signale der zwei Methylengruppen (**9** und **12**) bei 3.51 und 4.51 ppm der neu eingebauten funktionellen Gruppe eindeutig zu erkennen. Dabei weist das Signal bei 3.51 ppm auf eine erfolgreiche Substitution des α, α -Dichlor-*p*-xylyl durch die Piperazingruppe hin.

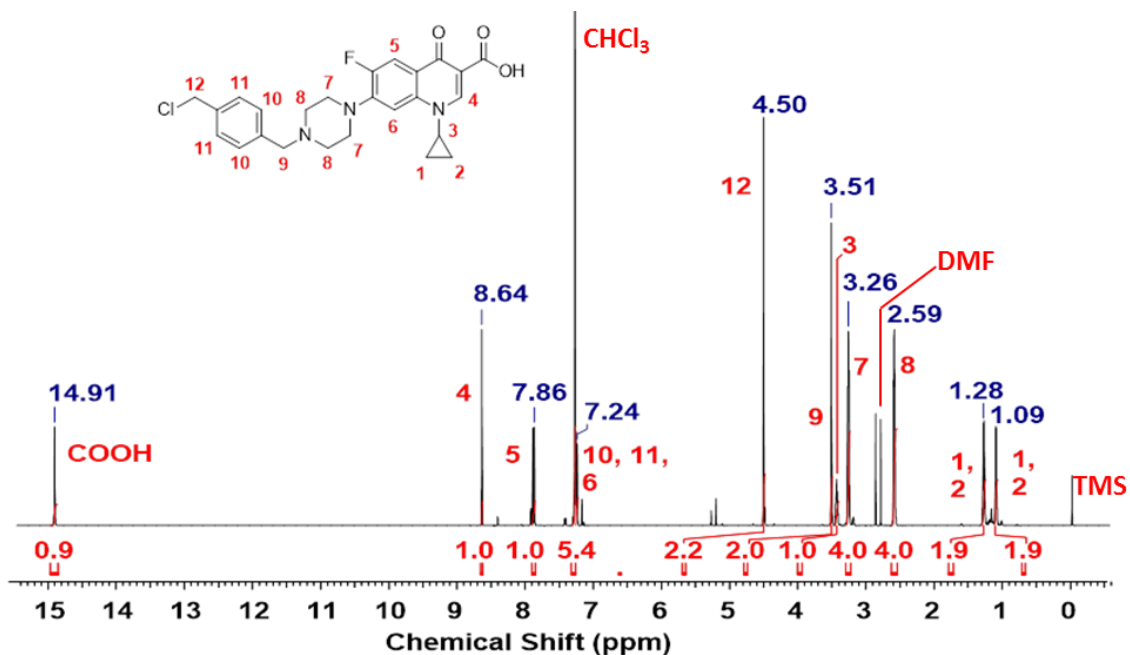


Abbildung 43: ^1H -NMR vom xCIP aufgenommen in CDCl_3 (7.27 ppm).¹³¹

Ergebnisse und Diskussion

An dieser Stelle ist anzumerken, dass eine Doppelsubstitution des α,α -Dichlor-*p*-xylois möglich ist, allerdings nicht beobachtet werden konnte. Das Signal bei 3.51 ppm bestätigt dies, da das Integral des Signals 2 Protonen beträgt, bei einer Doppelsubstitution wäre dieses Integral größer.

Die Synthese des eCIP- und des bCIP-Spacers erfolgte über die Umsetzung mit den entsprechenden Säurechloriden in trockenem Dichlormethan.¹⁵⁷ Für die Synthese von eCIP wurde Chloressigsäurechlorid und für die Synthese von bCIP Brombuttersäurechlorid verwendet. Zur Deprotonierung des Amins der Piperazineinheit sowie als Fänger für das entstehende Chloridion wurde hier Triethylamin genutzt. Die Reaktionsgleichung zu bCIP und eCIP ist in Abbildung 44 gezeigt.

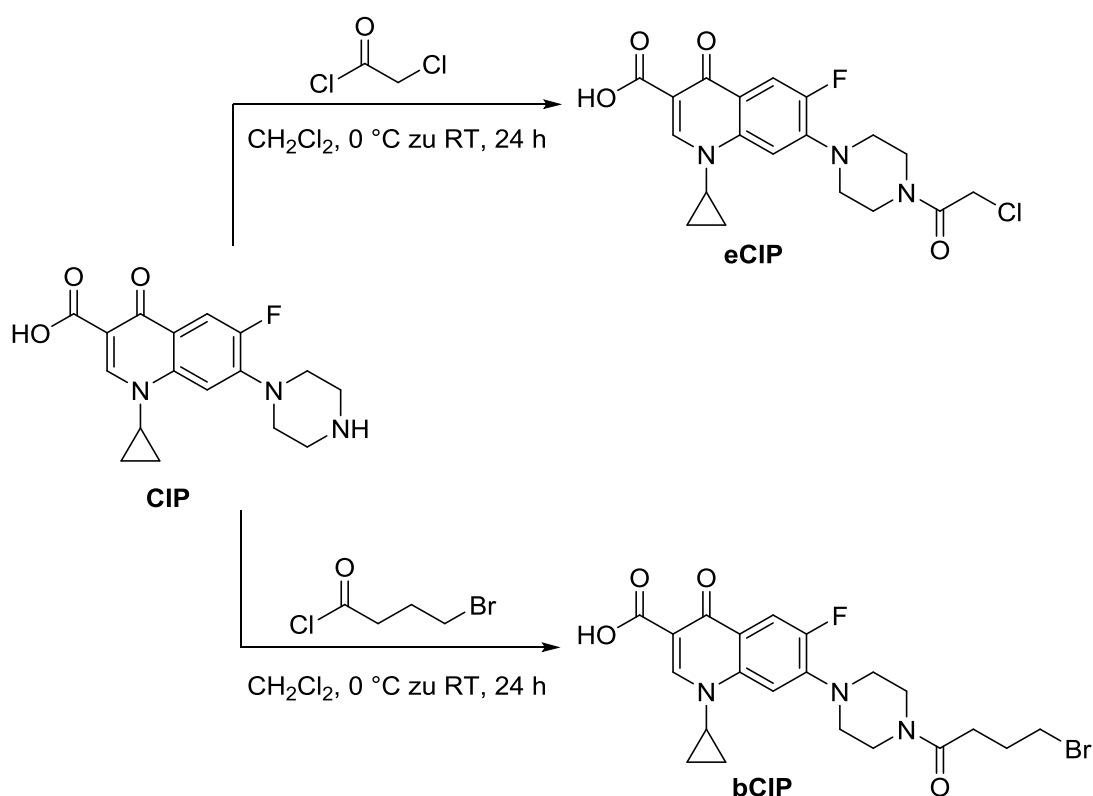


Abbildung 44: Darstellung von bCIP und eCIP.

Die ^1H -NMR-Spektroskopie Messung zeigt im Fall des eCIPs neben den üblichen CIP-Signalen auch Signale der Chloracetylgruppe bei 4.15 ppm (6). Im Fall des ^1H -NMR-Spektrums des bCIPs zeigt sich ebenfalls neben den CIP-Signalen die entsprechenden Spacer-Signale bei 2.18, 2.62 und 3.71 ppm (6-8) (vergleiche Abbildung 45). Die

Ergebnisse und Diskussion

Integration der CIP-Signale und der Signale der neu eingeführten Gruppen implizieren, dass die Umsetzung erfolgreich war. Zudem zeigen die Protonen der Piperazingruppe eine andere Verschiebung als die beim unmodifizierten CIP. Die Protonen der Piperazingruppe des eCIPs weisen ein aufgespaltenes Signal bei 3.30-3.40 ppm und bei 3.70-3.90 ppm auf. Dabei lässt sich die Aufspaltung auf die Sesselkonformation der Piperazingruppe zurückführen. Die Carbonylgruppe kann dannach mit den axialen bzw. äquatorialen Protonen des Piperazinrings stärker bzw. schwächer wechselwirken, wodurch eine Aufspaltung der einzelnen Protonen resultiert.

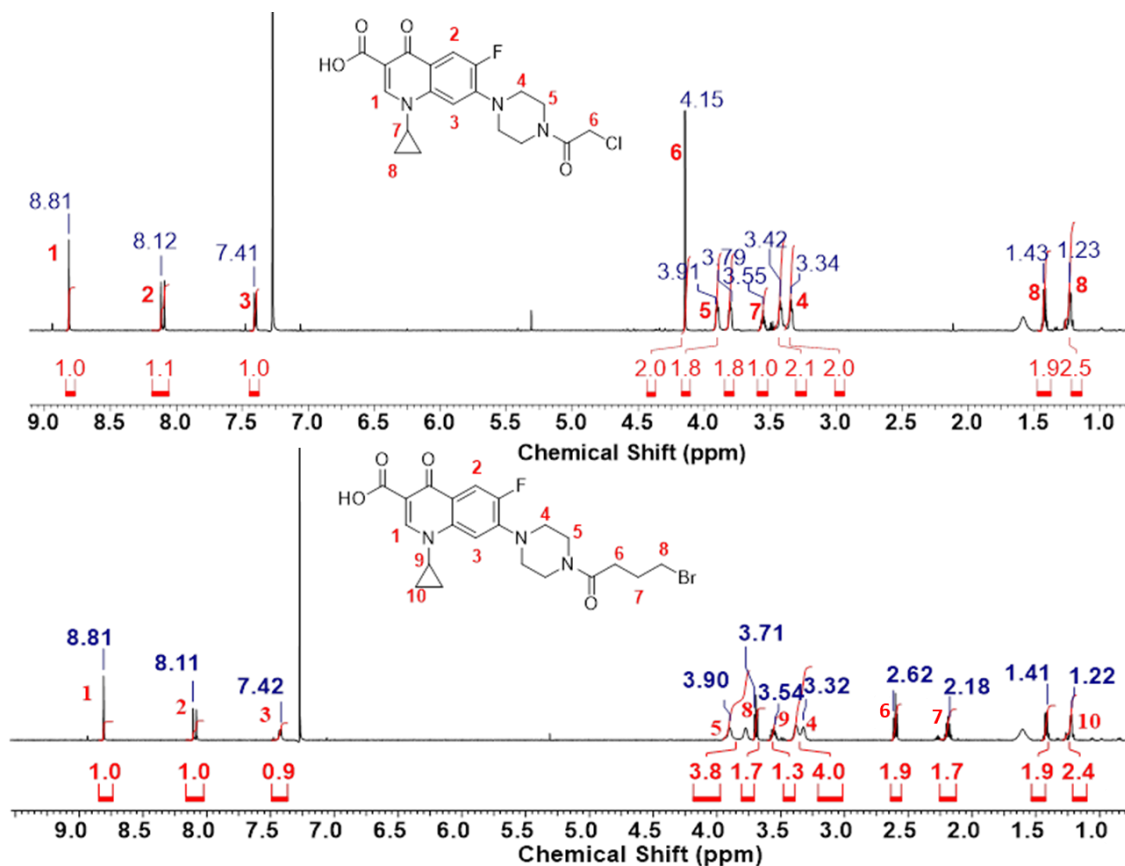


Abbildung 45: ¹H-NMR-Spektren von eCIP (oben) und bCIP (unten) aufgenommen in CDCl₃ (7.27 ppm). Die entsprechende Struktur und die Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Protonen sind ebenfalls dargestellt.

Bei den „Spacern“ pCIP und peCIP handelt es sich im eigentlichen Sinne um Weiterentwicklungen des eCIP-„Spacers“. Ausgehend von eCIP wurde eine Amineinheit in Form von Propylamin in die „Spacer“-Struktur eingebaut (siehe Abbildung 46). Diese

Ergebnisse und Diskussion

Substitutionsreaktion wurde in einem Gemisch aus *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und Acetonitril (MeCN) mit Natriumhydrogencarbonat als Hilfsbase durchgeführt. An dieser Stelle sollte noch erwähnt sein, dass pCIP im Vergleich zu den anderen CIP-Derivaten und dem reinen CIP über eine sehr gute Wasserlöslichkeit verfügt und daher mittels Extraktion statt Säulenchromatographie gereinigt werden konnte. Das pCIP dient als Zwischenprodukt für die Synthese des peCIP, wobei das pCIP selbst auch zu Direktterminierung von POx verwendet wurde. Die Synthese des peCIP erfolgte über eine Umsetzung des pCIP mit Chloressigsäurechlorid. Durch die daraus resultierende Amideinheit besitzt das peCIP eine kleine Peptoidstruktur.

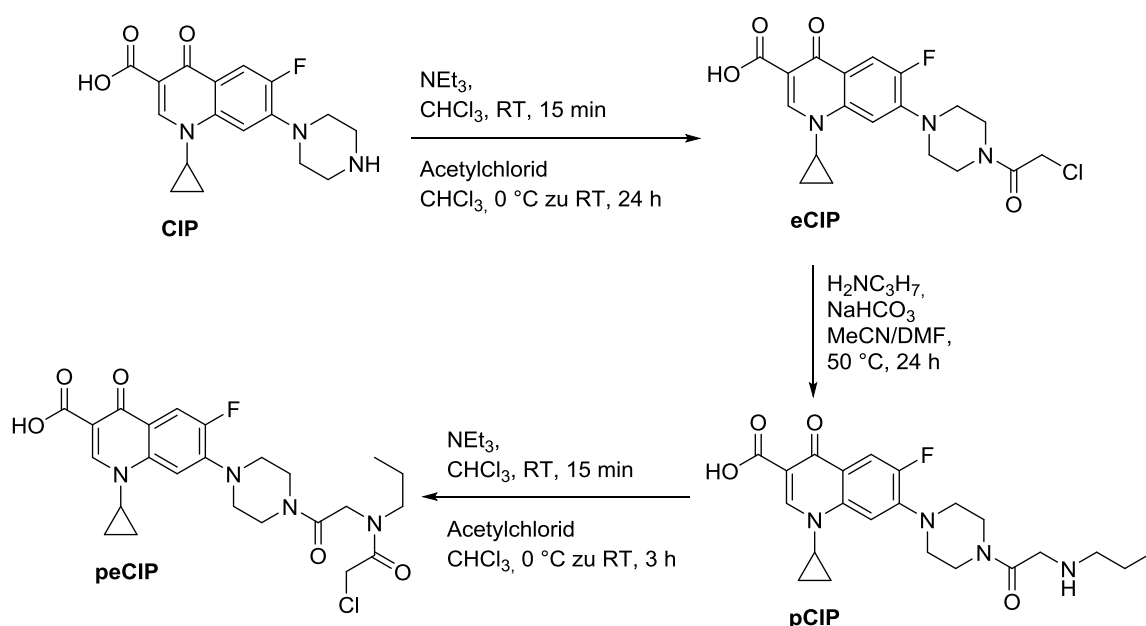


Abbildung 46: Syntheschema von pCIP und peCIP.

Der Strukturnachweis erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie. Das Spektrum von pCIP ist in Abbildung 47 oben gezeigt. Neben den CIP-Signalen (5-12) sind auch die Signale der Propylkette (1, 2 und 3) des Propylamins zu erkennen. Die Verschiebung der Methylengruppe in α -Position zur Amidgruppe (4) zu 3.52 ppm ist ein wichtiges Indiz für das erfolgreiche Ablaufen der Reaktion. Zuvor zeigte das Signal der Methylengruppe noch eine Verschiebung von 4.15 ppm (siehe ¹H-NMR-Spektrum von eCIP, Abbildung 45). Im ¹H-NMR-Spektrum des peCIPs sind wie zuvor alle erwarteten Signale für das CIP eindeutig zu erkennen. Darüber hinaus sind auch die Signale der Propylkette (2-4) zu

Ergebnisse und Diskussion

erkennen. Allerdings kommt es durch die Umsetzung mit Acetylchlorid zu einer Verschiebung des Signals **2** (3.45 ppm), dies überlagert nun mit den Signalen des Piperazinringes (**7**). Des Weiteren zeigen die Protonen der neu eingeführte Chloracetyleinheit ein Signal bei 4.23 ppm. Direkt daneben bei 4.10 ppm ist ein weiteres Singulett mit zwei Protonen unter dem Integral zu erkennen, diese Protonen gehören zur Position **5**. Diese erfahren durch die neu eingebaute Gruppe eine Verschiebung von 3.52 ppm zu 4.15 ppm.

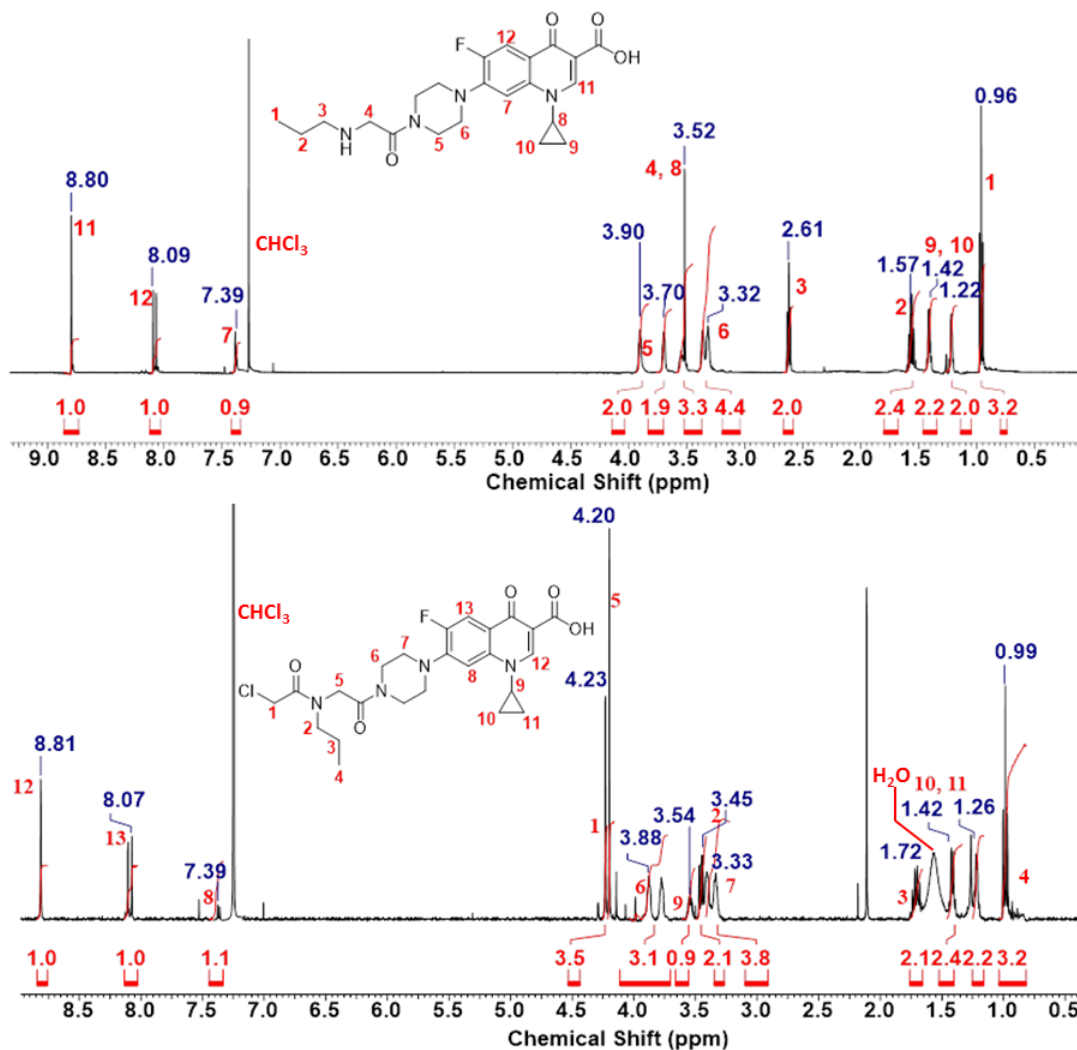


Abbildung 47: ¹H-NMR-Spektrum des pCIP (oben) und peCIP (unten) aufgenommen in CDCl₃ (7.27 ppm).

Um zu überprüfen ob die antimikrobielle Aktivität durch die verschiedenen Modifikationen noch erhalten bleibt, wurde der MIC-Wert des CIP und der vorgestellten CIP-Derivate ermittelt. Der MIC-Wert wurde für eine bessere Vergleichbarkeit in den

Ergebnisse und Diskussion

molaren MIC-Wert umgerechnet. Da es sich bei CIP um ein Breitbandantibiotikum handelt, wurde nicht nur gegen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) getestet, sondern auch gegen die GRAM-negativen Keime *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Die MIC-Werte sind in Abbildung 48 als Säulendiagramme dargestellt.

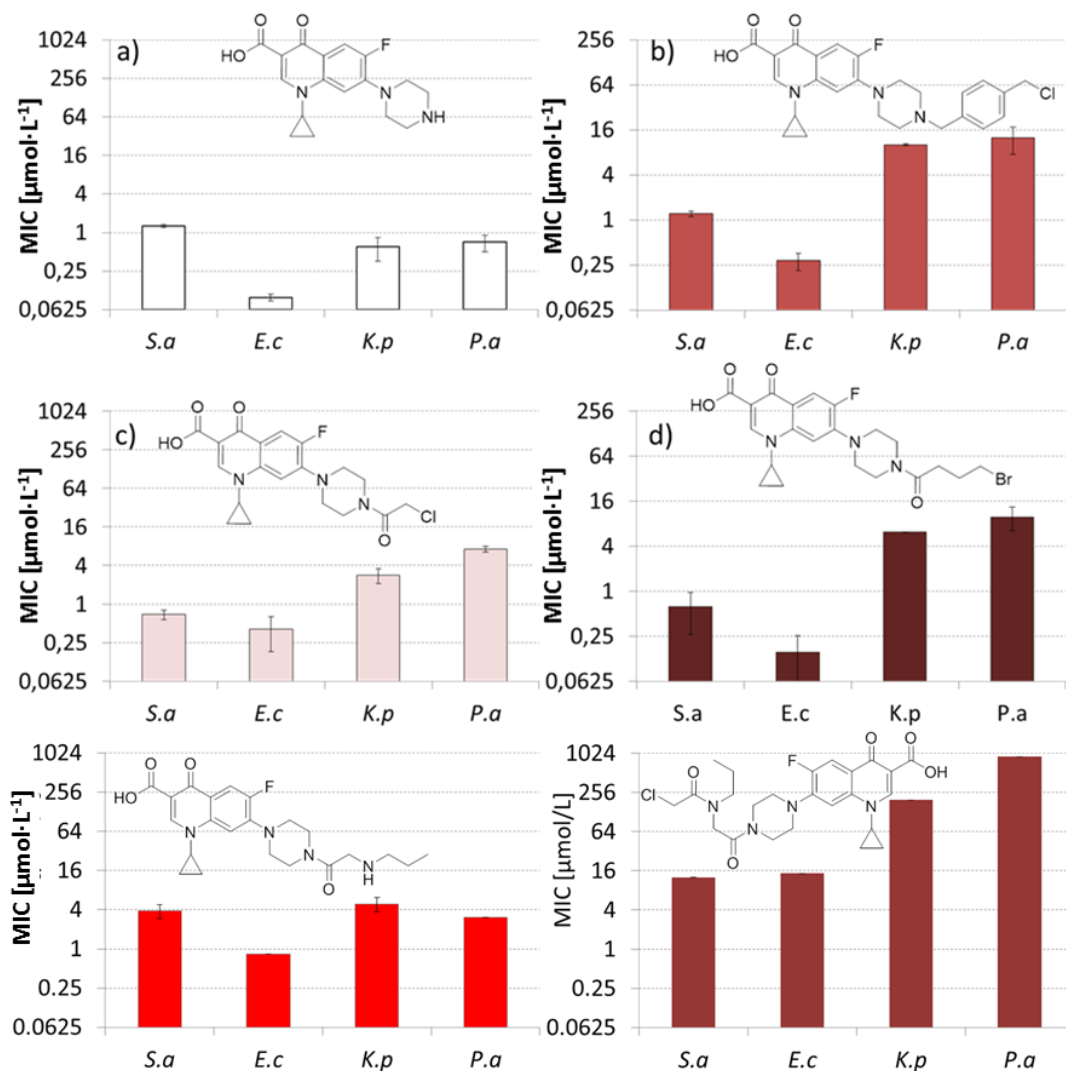


Abbildung 48: Molare MIC-Werte von CIP und den sogenannten CIP-Spacern gegen *Staphylococcus aureus* (*S. a*), *Escherichia coli* (*E. c*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a*) und *Klebsiella pneumoniae* (*K. p*). MIC-Werte a) des unmodifizierten CIPs, b) des xCIP-Spacers, c) des eCIP-Spacers, d) des bCIP-Spacers, e) des pCIP-Spacers und f) des peCIP-Spacers. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 48 a zeigt die MIC-Werte des unveränderten CIPs. Dieses weist gegen *S. aureus* einen sehr niedrigen MIC-Wert von $1.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf. Gegen die GRAM-negativen Keime *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* zeigt CIP sogar MIC-Werte, die unter $1.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ liegen, wobei der Wert für *E. coli* mit $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sehr deutlich darunter liegt. Das xCIP (Abbildung 48 b) zeigt für das GRAM-positive Bakterium *S. aureus* eine ähnliche Aktivität wie das ursprüngliche Antibiotikum. Aber im Gegensatz dazu weist das xCIP gegen alle GRAM-negativen Bakterienkeime eine deutlich schwächere Aktivität auf. Die höheren MIC-Werte können auf die modifizierte Piperazingruppe zurückgeführt werden.^{73 72} Diese Gruppe ist essentiell für eine effiziente Wirkung der Fluorchinolone gegen Bakterien mit einer zusätzlichen Mureinhülle (siehe Abbildung 3). Daraus resultiert für *P. aeruginosa* ein 14-mal ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu $0.70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und für *K. pneumoniae* ein 20-mal ($12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu $0.60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) höherer MIC-Wert. Für *E. coli* ist eine Steigerung um das 3-fache von $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu beobachten. Die Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung des eCIP und des bCIP (Abbildung 48 c und d) zeigen ein ähnliches Bild. Sowohl das eCIP als auch das bCIP besitzen eine sehr gute Aktivität gegenüber dem GRAM-positiven Bakterienstamm *S. aureus*. Diese befindet sich auf demselben Niveau wie die Aktivität des unmodifizierten CIP und des zuvor vorgestellte xCIP. Im Fall der GRAM-negativen Stämme (*K. pneumoniae* und *P. aeruginosa*) weisen eCIP und bCIP ebenso wie das xCIP zuvor deutlich höhere MIC-Werte als das reine CIP auf. Das eCIP ist gegen *K. pneumoniae* 5-mal und gegen *P. aeruginosa* 10-mal ineffektiver als das CIP. Das bCIP besitzt gegen diese Keime sogar noch schlechtere Aktivitäten, die um ein 10-14-faches niedriger sind. Gegen *E. coli* zeigt das eCIP mit $0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eine ähnlich gute Aktivität wie das xCIP. Das bCIP hingegen weist gegen *E. coli* eine hohe Aktivität auf. Diese ist mehr als doppelt so aktiv wie der eCIP und xCIP-„Spacer“ und auf demselben Niveau wie CIP. Beide „Spacer“, eCIP und bCIP besitzen ein ähnliches Aktivitätsprofil und obwohl ihre Aktivität gegen die meisten GRAM-negativen Stämme niedriger ist als die vom CIP, so ist sie doch immer noch um ein Vielfaches höher als die vom zuvor getesteten xCIP. pCIP zeigt mit Ausnahme von *S. aureus* eine ähnliche Aktivität wie sein Ausgangsprodukt das eCIP (Abbildung 48 e). Gegen *S. aureus* ist das eCIP fast fünfmal aktiver als das pCIP. Für *E. coli* und *K. pneumoniae* sind die Aktivitäten des pCIPs leicht schlechter und für *P. aeruginosa* etwas besser als die Aktivitäten des eCIPs, allerdings sind diese Abweichungen nicht signifikant.

Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zum xCIP- und eCIP-Spacer führt diese Modifikation neben einer Verschlechterung der Aktivität gegen GRAM-negative Keime auch zu einer Verschlechterung gegen GRAM-positive Bakterien. Die Umsetzung vom pCIP zum peCIP führt zu einer weiteren Verschlechterung der Aktivität. Die MIC-Werte des peCIP stellen die höchsten gemessenen Werte und somit die niedrigste Aktivität aller CIP-Derivate dar (Abbildung 48 f). In allen Fällen besitzt das peCIP eine drastisch höhere MIC-Werte als das reine CIP. Die größte Differenz findet sich bei *P. aeruginosa*. Hier ist die Aktivität des CIPs fast 1300-mal größer. Auch im Vergleich mit anderen „Spacern“ weist das peCIP drastisch höhere MIC-Werte auf. Trotz der Aktivitätsverluste durch die Modifizierungen wiesen die meisten CIP-Derivate sehr gute antimikrobielle Aktivitäten gegen die getesteten Stämme auf. Daher wurden diese CIP-Derivate für die Konjugation als geeignet befunden.

3.2.3. Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels Konjugation mit xCIP

Die Konjugation des xCIP erfolgte zunächst mit dem Me-PMeOx₃₀-EDA (Abbildung 49). Wie bei der Synthese des xCIPs wird das elektrophile Kohlenstoffatom durch ein nucleophiles Amin angegriffen und das Chlor verlässt als Abgangsgruppe das Molekül. In diesem Fall ist das Nucleophil das primäre Amin der EDA-Endgruppe. Wieder diente Natriumhydrogencarbonat zur Deprotonierung desamins und zum Abfangen des frei werdenden Chloridions, um die Bildung von HCl zu verhindern.

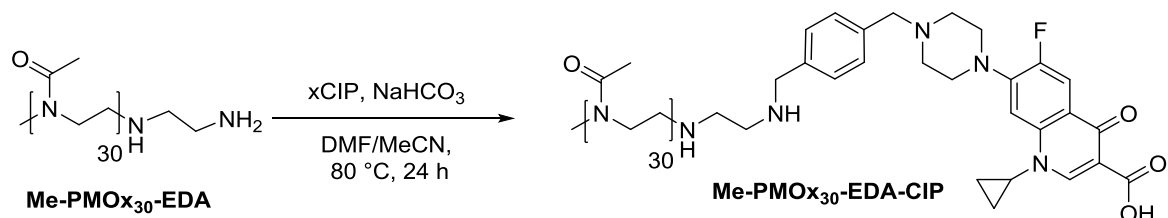


Abbildung 49: Konjugation von Me-PMeOx₃₀-EDA mit xCIP zu Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP. ¹³¹

Ergebnisse und Diskussion

Für die biologische Untersuchung war eine Abtrennung des überschüssigen xCIPs von großer Bedeutung. Die niedermolekulare Verunreinigung hätten zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt, da gegebenenfalls die Eigenschaften des xCIP die der Polymer-Antibiotika-Konjugate überlagern. Die Abtrennung des überschüssigen xCIPs konnte aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Konjugates mittels Extraktion und einer Dialyse gegen bidestilliertes (Benzylzellulosemembran Molecular Weight Cut Off von 2000 g/mol) erfolgen. Das Konjugat Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP konnte mit einer Ausbeute von fast 90% erhalten werden.

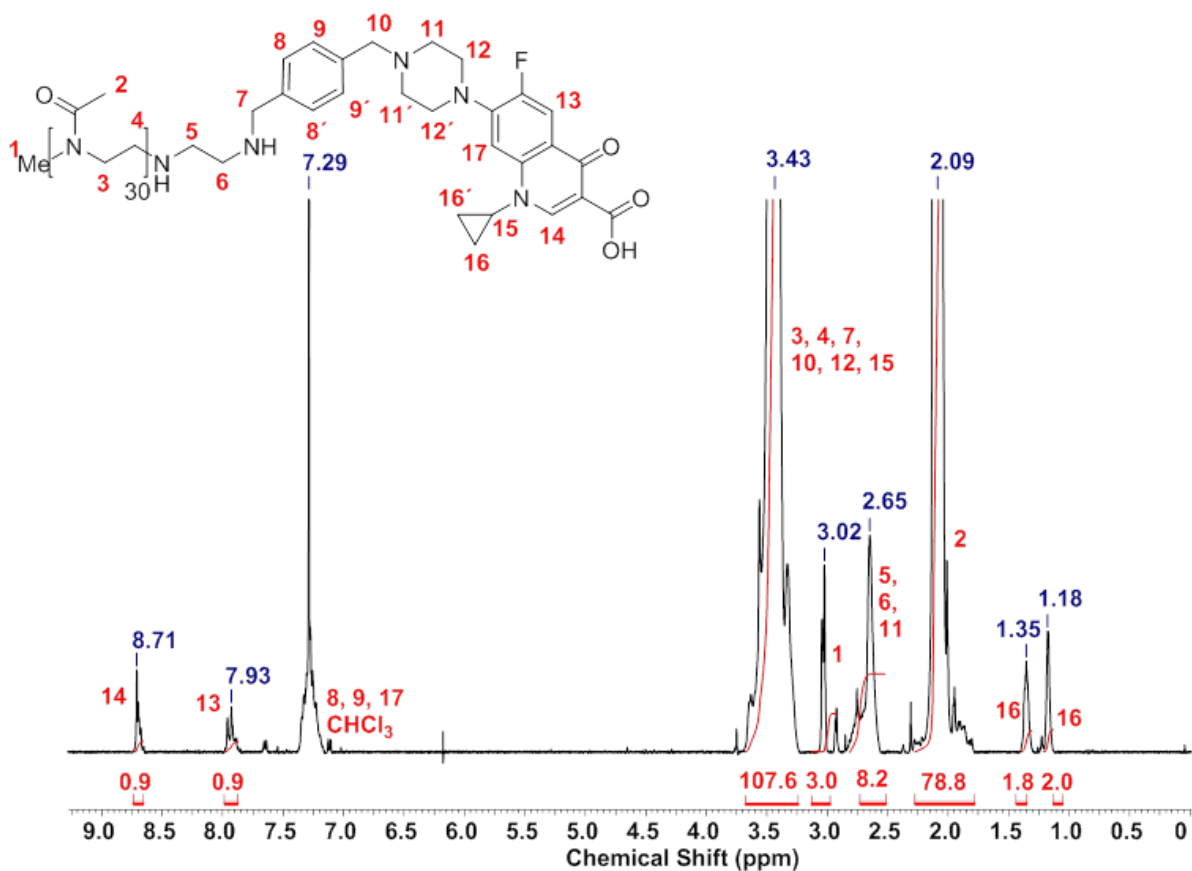


Abbildung 50: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeOx₃₀-EDA-CIP aufgenommen in CDCl₃ (7.27 ppm).¹³¹

In Abbildung 50 ist das ¹H-NMR-Spektrum des Konjugats Me-PMeOx₃₀-EDA-CIP dargestellt. Aus dem Verhältnis der Methylstartergruppe (**1**) bei 3.02 ppm und den Signalen des Polymerrückgrats (**3**, **4**) bei 2.09 und 3.43 ppm resultiert ein Polymerisationsgrad von 27. Daraus kann ein zahlenmittleres Molekulargewicht (M_n)

Ergebnisse und Diskussion

Das ESI-Spektrum von Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP ist in Abbildung 51 gezeigt. Der Hauptteil der gefundenen Massen (94%) zeigen ein äquidistanten Abstand von 85, welche auf die Wiederholungseinheit von PMeOx hinweist. 86% aller Massen des ESI-MS-Spektrums weisen eine Methylstartergruppe und eine xCIP-Endgruppe auf. 9% der Polymere sind CIP funktionalisiert und Proton initiiert. Dies kann durch eine Kettentransferreaktion erklärt werden. Diese Kettentransferreaktion kann durch eine β -H-Eliminierung während der Propagation auftreten. Der gefundene Polymerisationsgrad beträgt 30 Wiederholungseinheiten. Dieser stimmt so wie der Polymerisationsgrad aus der ¹H-NMR-Spektroskopie (DP = 27) gut mit dem zuvor eingestellten Polymerisationsgrad überein. Auf Grundlage der erhaltenen Daten aus der ESI-MS Messung konnte ein zahlenmittleres Molekulargewicht (M_n) von 3100 g·mol⁻¹ bestimmt werden. Dies korreliert sehr gut mit den ¹H-NMR-spektroskopischen Daten. Die Abweichung von 9% kann dadurch erklärt werden, dass in der ¹H-NMR-spektroskopischen Messung keine Protonen gestarteten Polymere ermittelt werden können, wodurch es zu einem 7% höheren Polymerisationsgrad und somit zu einem leicht erhöhten M_n kommt. Der Polydispersitätsindex liegt bei 1.03. Die Abweichung zwischen dem gemessenen Wert und dem errechneten Wert beträgt ca. 0.0644, daher lässt sich von einer sehr guten Übereinstimmung sprechen. Außerdem konnten keine Signale von niedermolekularem CIP bzw. xCIP gefunden werden.

Im Anschluss der Synthese wurde das Konjugat Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP auf seine antimikrobielle Aktivität geprüft. Im Gegensatz zu den direktterminierten Konjugaten zeigt das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP eine Aktivität gegen *S. aureus*, von 5.89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aufgrund der guten Aktivität gegen *S. aureus* wurden weitere Keime getestet. Die molaren MIC-Werte sind in Abbildung 52 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

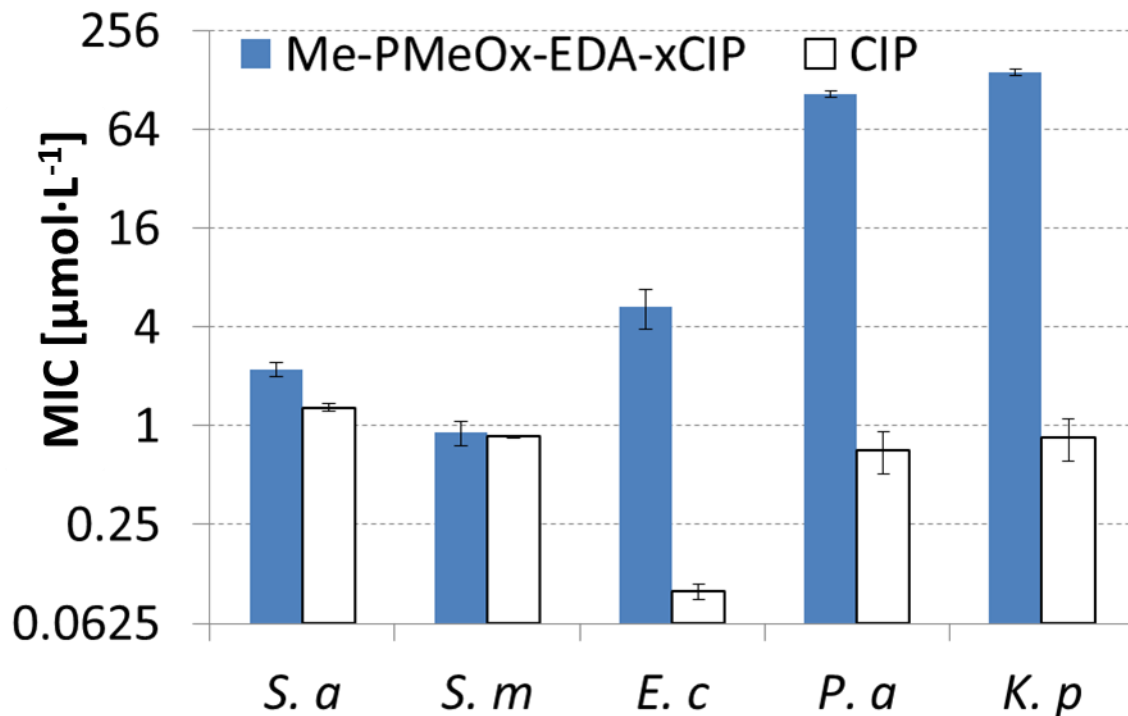


Abbildung 52: MIC-Werte des Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP Konjugats in blau, daneben die MIC-Werte des reinen CIP (weiß) zum Vergleich.¹³¹ Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP zeigt für die GRAM-positiven Bakterienkeime *S. aureus* und *Streptococcus mutans* (*S. m*) eine ähnliche gute Aktivität wie das reine CIP. Für *S. mutans* zeigt das Konjugat 0.85 µmol·L⁻¹ dieselbe Aktivität wie CIP (0.91 µmol L⁻¹). Für *S. aureus* ist der MIC-Wert mit 1.90 µmol·L⁻¹ zumindest auf demselben Niveau wie der des reinen Antibiotikums. Das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP zeigt einen ähnlichen Trend wie der xCIP-„Spacer“. Dies spiegelt sich vor allem in den Aktivitäten gegen GRAM-negative Bakterienkeime wieder. Hier ist der MIC-Wert deutlich höher. Das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP besitzt mit 5.3 µmol·mL⁻¹ gegen *E. coli* eine 54 fache kleinere Aktivität im Vergleich zum reinen CIP. Mit 143 µmol·L⁻¹ für *K. pneumoniae* und 105 µmol·L⁻¹ für *P. aeruginosa* ist die biozide Wirkung drastisch schlechter als die vom CIP. Wird die Aktivität von Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP mit der Aktivität des CIP-„Spacers“ aus Abbildung 48 verglichen, so zeigt sich, dass ein Großteil der Aktivitätsverluste nicht durch die Konjugation mit dem Polymer, sondern durch die Modifizierung zum xCIP verursacht wird.

Ergebnisse und Diskussion

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass die permanente Konjugation von PMeOx und CIP zu aktiven Konjugaten führen kann. Allerdings scheint dabei nicht nur die Antibiotikumsbindungsstelle sondern auch die Art der Bindung eine wichtige Rolle zu spielen.

3.2.3.1. Einfluss des Polymerrückgrates auf die Aktivität der Polymer-xCIP-Konjugate

Da die Konjugation von CIP und PMeOx mittels xCIP-„Spacer“ zu einem antimikrobiell aktiven Konjugat führte und somit gezeigt werden konnte, dass die Polymer-Antibiotika-Bindung einen großen Einfluss auf die biozide Wirkung ausübt, wurde im Folgenden der Einfluss des Polymerrückgrates untersucht. Neben den bereits verwendeten Me-PMeOx₃₀-EDA wurden weitere Poly(2-oxazoline) und Poly(ethylenglykol) als Rückgrat für die PAKs genutzt. Als weitere POx Polymere wurden ethyldiaminterminierte PEtOx, PiPrOx und PcPrOx verwendet.

Abbildung 53 gibt einen Überblick über die verschiedenen angewendeten Polymerrückgrate.

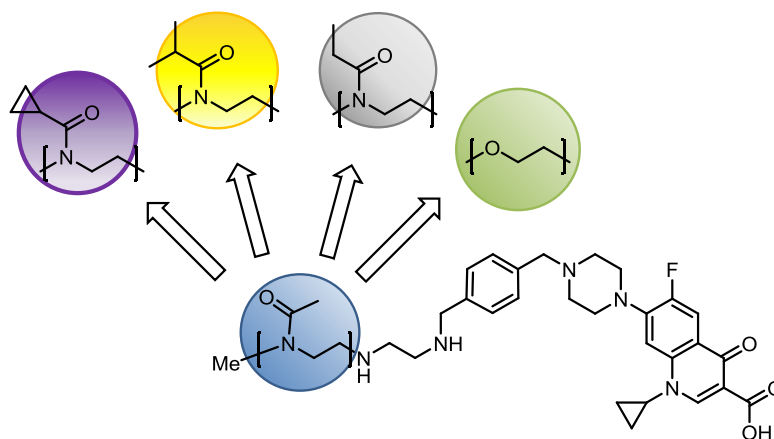


Abbildung 53: Überblick über die Variation des Polymerrückgrates, Poly(2-iso-propyl-2-oxazolin) (gelb), Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (grau), Poly(2-cyclo-propyl-2-oxazolin) (lila) und Poly(ethylenglykol) (grün).

Ergebnisse und Diskussion

Die Konjugation konnte für die verschiedenen ethylendiaminterminierten Polymere unter den gleichen Reaktionsbedingungen erfolgen (Abbildung 54). Lediglich das Abtrennen vom überschüssigem xCIP variiert zwischen den verschiedenen Polymerrückgraten. Während für Me-PEtOx-EDA-xCIP und Me-PEG-EDA-xCIP auf ein Waschen der wässrigen Phase mit CH₂Cl₂ verzichtet wurde und die Konjugate dafür dreimal gegen Wasser dialysiert wurden, wurden die Konjugate Me-PiPrOx-EDA-xCIP und Me-PcPrOx-EDA-xCIP durch eine Dialyse gegen Methanol und eine zweite Dialyse gegen Wasser von nicht reagiertem xCIP befreit.

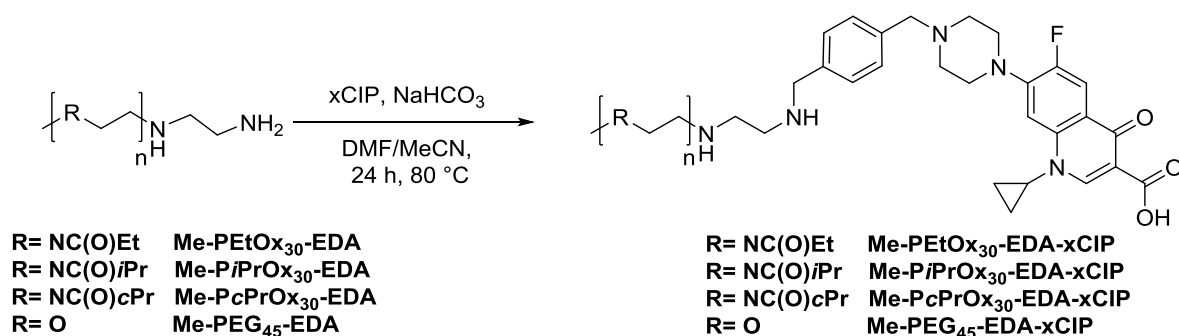


Abbildung 54: Synthese der verschiedenen xCIP-Konjugate ¹³¹

Der Erfolg der einzelnen Konjugationen wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt, dabei erfolgte die Auswertung analog zum Me-PMeOx-EDA-xCIP und den ¹H-NMR-spektroskopischen Messungen aus Kapitel 3.1.1. Daher soll auf die einzelnen ¹H-NMR-Spektren nicht eingegangen und auf den Anhang verwiesen werden. Eine Zusammenfassung der aus der ¹H-NMR-Spektroskopie gewonnenen Daten ist in Tabelle 7 gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Analytische Daten der hergestellten Me-POx-EDA-xCIP und Me-PEG-EDA-xCIP Konjugate charakterisiert mittel $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

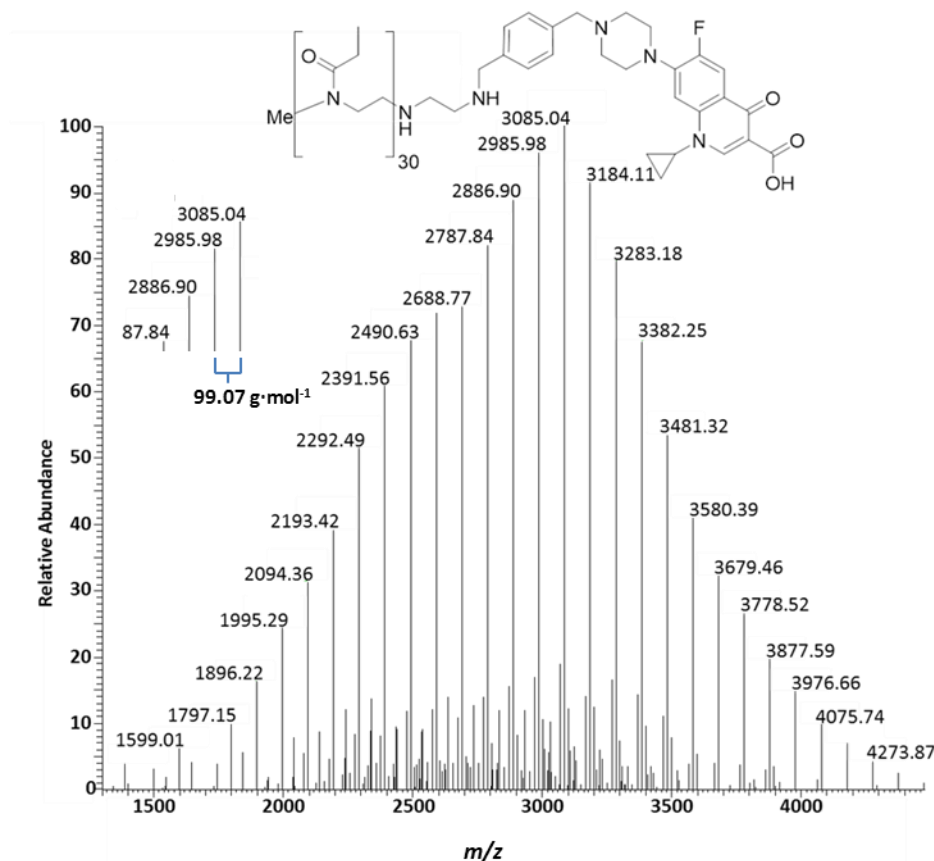
Polymer	DP_{Set}	DP_{NMR}^*	$M_n [\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}]$	F^{d**}
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	33	3300	93%
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	33	3800	99%
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	34	4600	99%
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	44	5200	99%
Me-PEG ₄₅ -EDA-xCIP	45	46	2500	99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die Konjugate Me-PEtOx-EDA-xCIP und Me-PEG-EDA-xCIP neben der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zusätzlich noch mittels ESI-MS untersucht wurden. Diese ESI-MS-Spektren sind nachfolgend abgebildet.

Die ESI-MS Messung des Me-PEtOx₃₀-EDA-xCIP zeigt, dass 91% aller zugeordneten Massen eine CIP-Funktionalisierung aufweisen (Abbildung 55). Davon besitzen mehr als 78% eine Methylstartergruppe. Auch hier können Proton-initiierte Polymere aufgrund einer β -H-Eliminierung während der Polymerisation beobachtet werden. Mit 22% ist dieser Wert doppelt so groß wie der von Me-PMeOx-EDA-xCIP. Dies zeigt, dass das PEtOx während der Propagation deutlich stärker zu β -H-Eliminierung neigt als PMeOx.¹⁵⁸ Des Weiteren können im ESI-MS-Spektrum keine Signale gefunden werden, die auf ein Verbleiben von niedermolekularem CIP oder xCIP im Konjugat hinweisen. Die mittlere Anzahl an Wiederholungseinheiten kann auf 25 bestimmt werden. Dies weicht deutlich von den 34 Wiederholungseinheiten aus der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ab. Dies lässt sich aber, wie bereits erwähnt, auf die protoneninitiierten Polymere zurückführen. Das bestimmte zahlenmittlere Molekulargewicht beträgt $2800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und das massenmittlere Molekulargewicht liegt bei $2900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Daraus resultiert ein, für lebende Polymerisationen typischer Polydispersitätsindex von 1.03. Die theoretische Masse stimmt mit einer Abweichung von 0.0044 sehr gut mit der gemessenen Masse überein.

Ergebnisse und Diskussion



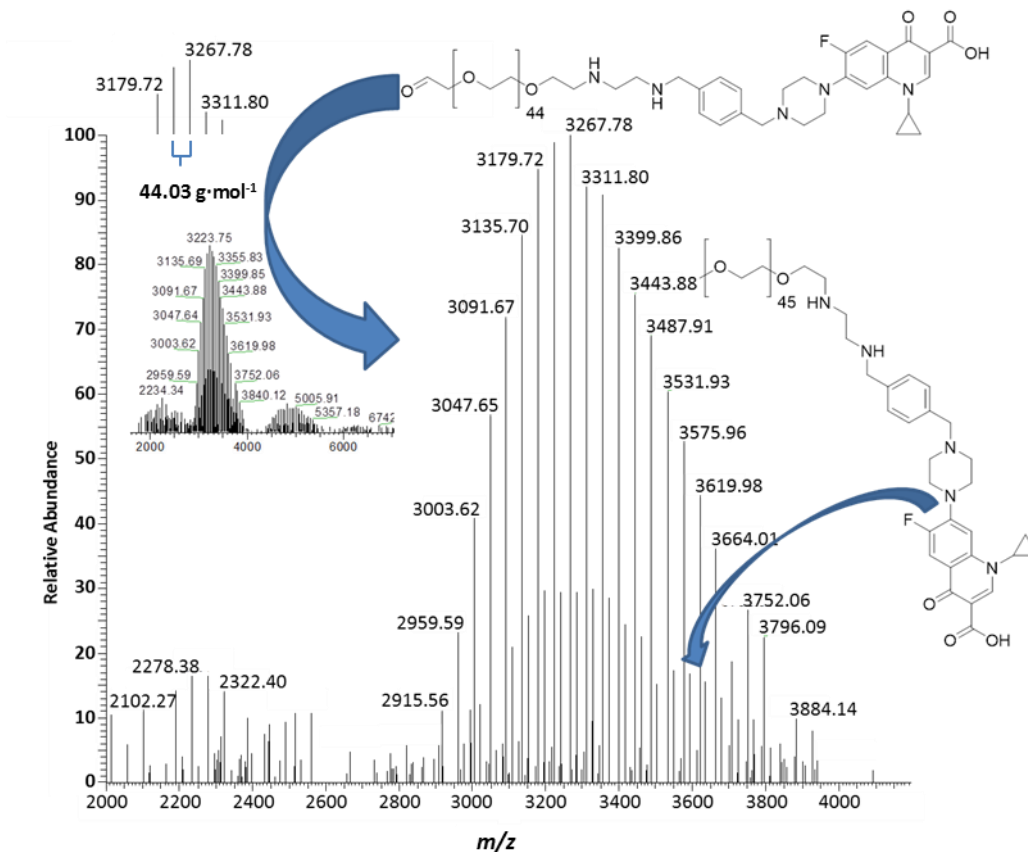
m/z **Me-PMeOx₃₂-EDA-CIP** ($[M+H]^+$) berechnet CH_3 ($15.024 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 26-mal EtOx ($26 \cdot 99.068 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + $NH_2CH_2CH_2NH_2$ ($60.068 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + xCIP ($469.157 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) – Cl^- ($34.969 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Masse $3085.048 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, gefundene Masse $3085.0436 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Abbildung 55: ESI-MS Spektrum von Me-PEtOx-EDA-xCIP und die dazugehörige Berechnung des theoretischen Molekulargewichtes.

Das ESI-MS-Spektrum des Me-PEG₄₅-EDA-xCIP ist in Abbildung 56 gezeigt. Dabei können mehrere Polymermassengenerationen beobachtet werden. Nicht alle dieser Massengenerationen können eindeutig zugeordnet werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die kleineren Massen lediglich Fragmente, die durch den Ionisationsvorgang erzeugt werden. Die Peaks mit sehr großen Massen weisen auf eine Agglomeration der Konjugate beim Ionisieren hin. Die restlichen 75% der aufgenommenen Signale lassen sich eindeutig den entsprechenden Konjugaten zuordnen. Wobei 99% dieser Massen eine CIP Endgruppe aufweisen. Allerdings besitzen nur 14% eine Methylendgruppe am distalen Ende des PEG Polymers. 74% der Massen stimmen mit Konjugaten überein, die eine Aldehydendgruppe besitzen. Dies spricht

Ergebnisse und Diskussion

erneut für eine Fragmentierung des Konjugats während der ESI-MS-Messung. Zusammen mit den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ergibt die ESI-MS eine erfolgreiche Konjugation mit xCIP wieder.



m/z Me-PEG₆₆-EDA-xCIP ($[\text{M}+\text{H}]^+$) berechnet CH_3 ($15.024 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 66-mal PEG ($56 \cdot 44.026 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ($60.068 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + xCIP ($469.157 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) – Cl^- ($34.969 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Masse $3415.064 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, gefundene Masse $3415.878 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Abbildung 56: ESI-MS-Spektrum des Me-PEG-EDA-xCIP und die dazugehörige Berechnung des theoretischen Molekulargewichtes. Das Inlay zeigt das gesamte ESI-Spektrum mit Agglomeraten und Fragmentierungen.

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität wurde wieder der MIC-Test herangezogen und die hergestellten Konjugate gegen die pathogen relevanten Bakterienkeime *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* getestet. Ein Überblick über die antimikrobiellen Aktivitäten bezogen auf das Molekulargewicht [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] ist in Abbildung 57 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

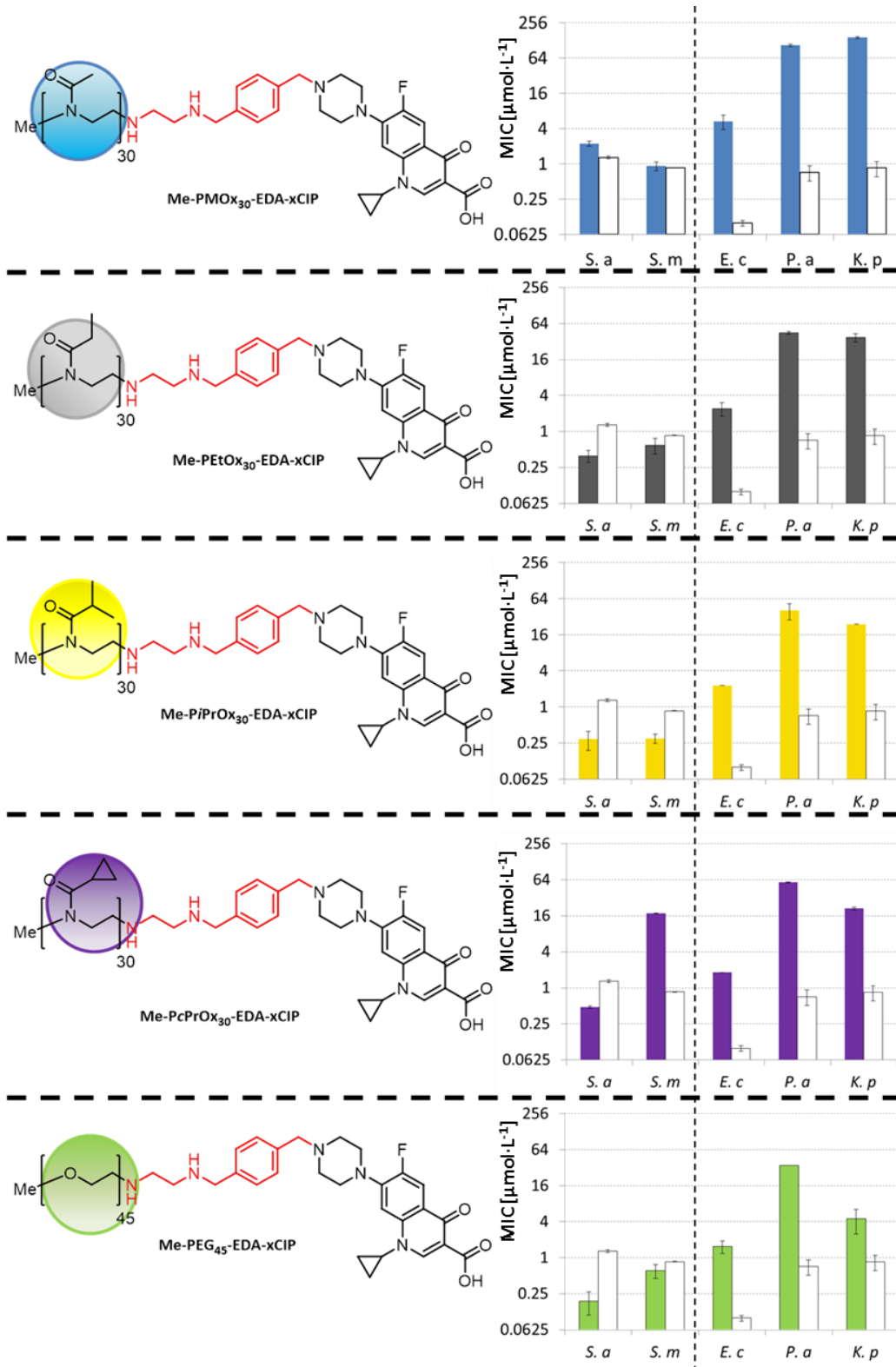


Abbildung 57: MIC-Werte der verschiedenen Polymer-xCIP-Konjugate in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Konjugate wurden gegen *Staphylococcus aureus* (S. a), *Streptococcus mutans* (S. m), *Escherichia coli* (E. c), *Pseudomonas aeruginosa* (P. a) und *Klebsiella pneumoniae* (K. p) getestet.¹³¹ Dazu im Vergleich die MIC-Werte von CIP (weiß).¹³¹

Ergebnisse und Diskussion

Generell lässt sich sagen, dass die getesteten Konjugate eine bessere Aktivität als das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP besitzen. Allerdings kann auch hier ein ähnlicher Trend gegenüber den verschiedenen Bakterienstämmen mit Ausnahme von Me-PcPrOx-EDA-xCIP erkannt werden. Die Konjugate auf PEtOx-, PiPrOx- und PEG-Basis zeigen gegen die beiden GRAM-positiven Keime *S. aureus* und *S. mutans* exzellente Aktivitäten.¹⁵⁴ Diese Konjugate sind sogar noch aktiver als das niedermolekulare CIP. Das Me-PEG₄₅-EDA-xCIP besitzt gegen *S. aureus* eine fast 7 fach höhere Aktivität als CIP und eine fast 10 fach höhere Aktivität als das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP. Das Me-PcPrOx₃₀-EDA-xCIP bildet hier eine Ausnahme, zwar besitzt es eine ähnlich gute Aktivität gegen *S. aureus* wie das PEtOx- und das PiPrOx-Konjugate, jedoch weist es einen höheren MIC-Wert gegen *S. mutans* auf. Im Fall des GRAM-negativen Keim *E. coli* ist das niedermolekulare CIP wieder deutlich aktiver als die getesteten Konjugate, obwohl Me-PEG₄₅-EDA-xCIP, Me-PiPrOx₃₀-EDA-xCIP, Me-PcPrOx₃₀-EDA-xCIP und Me-PEtOx₃₀-xEDA-CIP mit $1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), $2.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($8.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), $1.81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($7.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und $2.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($8.40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) immer noch sehr aktiv sind. Für die beiden anderen GRAM-negativen Bakterien *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* ist die Aktivität deutlich niedriger. Allerdings gibt es eine Ausnahme. Das Me-PEG₄₅-EDA-xCIP Konjugat weist überraschender Weise auch eine sehr gute Aktivität gegen *K. pneumoniae* auf. Ein Vergleich der CIP-Konjugate untereinander zeigt, dass die Natur des Polymerrückgrates einen starken Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität hat. Dies zeigt sich vor allem bei den Bakterien *S. aureus*, *E. coli* und *K. pneumoniae*. Dabei steigt die Aktivität in der Reihenfolge PMeOx < PcPrOx < PEtOx ≤ PiPrOx < PEG, wobei dieser Effekt am deutlichsten bei *K. pneumoniae* zu erkennen ist (von $143 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($443 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP auf $4.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($11.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für Me-PEG₄₅-EDA-xCIP).

An dieser Stelle soll noch erwähnt sein, dass das Me-PiPrOx₃₀-EDA-xCIP sowie das Me-PcPrOx₃₀-EDA-xCIP eine untere kritische Lösungstemperatur (engl. *lower critical solution temperature*, LCST) aufwiesen. Daher wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie der Trübungspunkt (engl. Cloud Punkte, CP), also der Punkt an dem das Polymer aufgrund seiner veränderten Eigenschaften in der Lösung ausfällt, bestimmt. Es zeigte sich, dass Me-PcPrOx₃₀-EDA-xCIP einen CP bei 47 °C und Me-PiPrOx₃₀-EDA-xCIP einen bei 38 °C besitzen. Im Fall des PiPrOx-Konjugats liegt diese Temperatur nah bei der

Ergebnisse und Diskussion

Inkubationstemperatur. Daher wurde im folgenden Kapitel der Einfluss der LCST-Eigenschaften des *PiPrOx* untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass durch die Variation des Polymerrückgrates die Aktivität der Konjugate stark beeinflusst werden. Dabei steigt die Aktivität von *PMeOx* über *PcPrOx*, *PEtOx* und *PiPrOx* zu dem aktivsten Polymerrückgrat PEG.

3.2.3.2. Einfluss der kritischen Lösungstemperatur auf die Aktivität der Polymer-xCIP-Konjugate

Um einen Einfluss der kritischen Lösungstemperatur zu untersuchen, wurden die MIC-Werte für *Me-PiPrOx*₃₀-EDA-xCIP bei einer Inkubationszeit von 30 °C wiederholt, ohne eine signifikante Änderung des MIC-Wertes festzustellen. Um weiterhin die Unabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von der LCST festzustellen, wurden statistische Copolymere aus *EtOx* und *iPrOx* mit xCIP konjugiert und die antimikrobielle Aktivität sowie die kritische Lösungstemperatur untersucht (¹H-NMR-Spektren sind im Anhang abgebildet). Da das LCST Verhalten abhängig von der Polymerkonzentration ist, wurde in den Untersuchungen eine ähnliche Konzentration wie in den MIC-Tests verwendet. Die hergestellten statistischen Copolymere aus *PiPrOx* und *PEtOx* wurden mit xCIP konjugiert. Anschließend wurde das ihr LCST Verhalten und die antimikrobielle Aktivität dieser Konjugate untersucht. Die Ergebnisse sind mit dazugehörigen Cloud Point-Temperaturen (CP) und MIC_{*S.aureus*}-Werten in Tabelle 8 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Analytische Daten der PiPrOx-PEtOx-copolymere sowie der PiPrOx-PEtOx Konjugate bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Zusätzlich sind noch die MIC-Werte gegen *S. aureus* und CP-Werte dargestellt.

Polymer	DP _{NMR} **	F ^{d,CIP*} [%]	MIC <i>S. a</i> [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	CP [°C]
Me-PiPrOx ₃₉ -EDA	30		>2500	52
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA	20/10		>2500	55
Me-PiPrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA	15/15		>2500	71
Me-PiPrOx ₅ -PEtOx ₂₈ -EDA	10/20		>2500	80
Me-PiPrOx ₃₄ -EDA-xCIP	30	99	0.29 ± 0.13	38
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA-xCIP	20/10	99	0.43 ± 0.01	50
Me-PiPrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA-xCIP	15/15	99	0.29 ± 0.09	64
Me-PiPrOx ₅ -PEtOx ₂₈ -EDA-xCIP	10/20	90	0.35 ± 0.01	69

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Wie erwartet zeigen die unkonjugierten Polymere keine antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus*. Ihr CP liegt zwischen 52 und 80 °C. Die PEtOx-PiPrOx Copolymere mit CIP-Endgruppe hingegen weisen alle einen ähnlichen MIC-Wert auf. Dieser unterscheidet sich nur um eine Verdünnungsstufe, somit ist die Änderung nicht signifikant. Es fällt auf, dass die Polymere mit einer CIP-Endgruppe deutlich niedrige CPs besitzen. Die CPs von CIP funktionalisierten Polymeren sind in etwa 5-14°C niedriger als die entsprechenden CPs der unkonjugierten Polymere. Diese Ergebnisse zeigen, dass das LCST Verhalten keinen starken Einfluss auf die Aktivität der xCIP Endgruppe ausübt. Aber ebenso, dass die Polymerendgruppe das LCST Verhalten maßgeblich beeinflusst, wobei die Abhängigkeit der Polymerendgruppe mit zunehmendem EtOx-Anteil abnimmt.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.3. Einfluss einer DDA-X-Initiatorgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP-Konjugate

In diesem Kapitel sollen die Untersuchungen zum Einfluss einer bioziden Gruppe am distalen Ende der PAKs gezeigt werden. Dies sollte in Form vom antimikrobiellen Initiator DDA-X erfolgen, daher wurde das zuvor hergestellte DDA-X-PMeOx-EDA zur Konjugation verwendet.

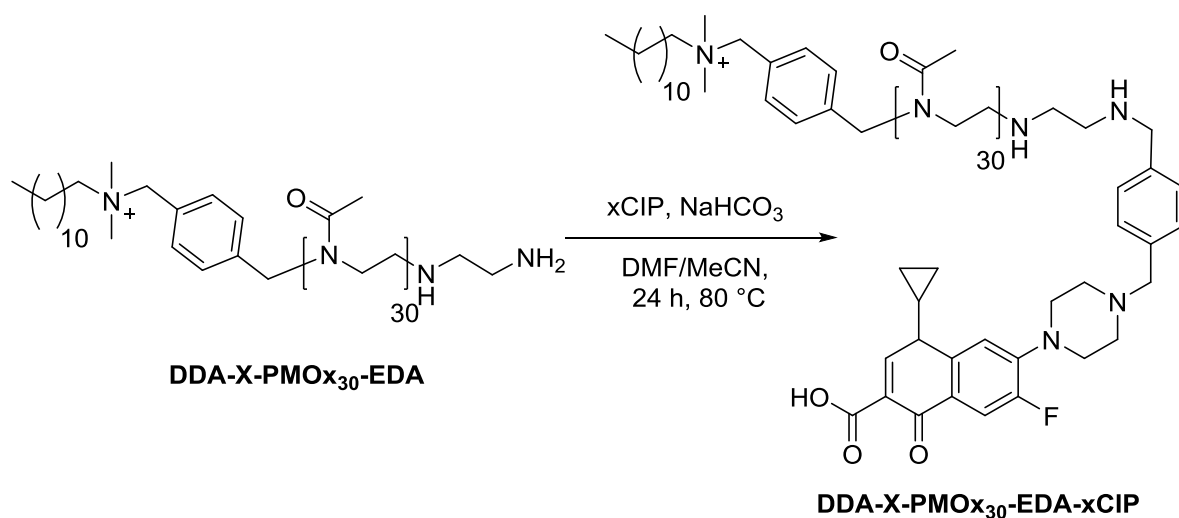


Abbildung 58: Synthese von DDA-X-PMeOx₃₀-EDA-xCIP. ¹³¹

Die Synthese des DDA-X-PMeOx₃₀-EDA-xCIP erfolgte wie in Abbildung 58 beschrieben. Neben den CIP- und PMeOx-Signalen können auch eindeutig die Signale des DDA-X im ¹H-NMR-Spektrum identifiziert werden. Als Referenz dient das Signal der Methylgruppe des DDA-X Initiators. Mit dessen Hilfe kann ein Polymerisationsgrad von 51 Wiederholungseinheiten errechnet werden. Darüber hinaus kann ein Funktionalitätsgrad der xCIP Endgruppe von 99% ermittelt werden.

Ergebnisse und Diskussion

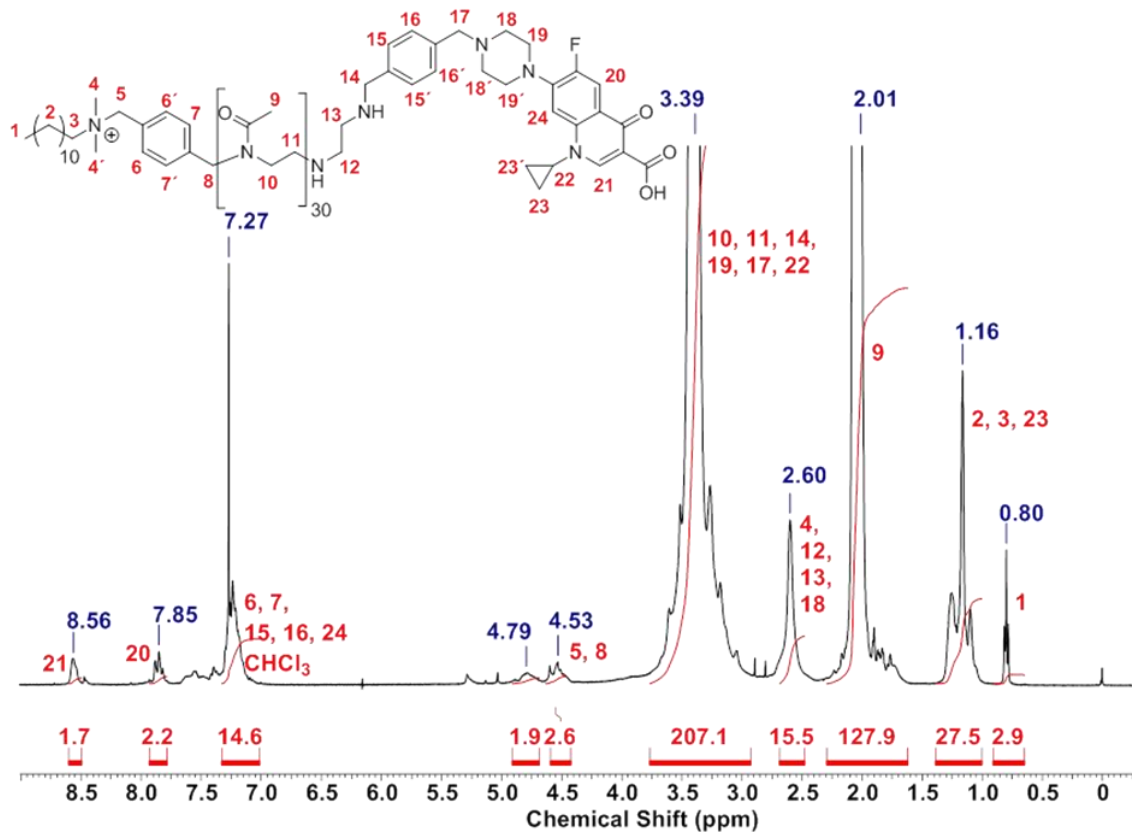
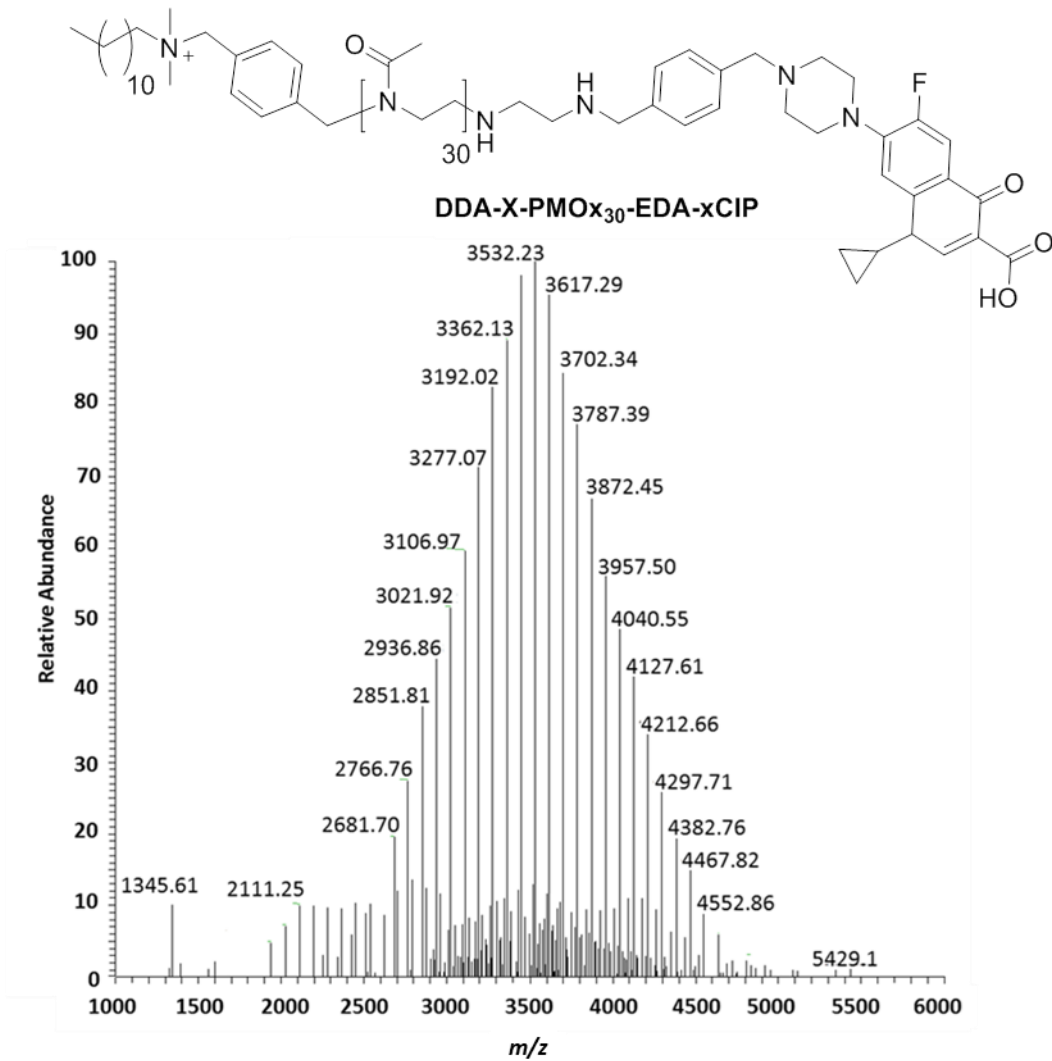


Abbildung 59: ¹H-NMR Spektrum des DDA-X-PMeOx-EDA-xCIP in CDCl₃ (7.27 ppm).¹³¹

Ein hoher Funktionalitätsgrad kann auch im ESI-MS Spektrum (siehe Abbildung 60) beobachtet werden. 96% aller Polymere besitzen eine CIP Endgruppe. Davon wiesen 74% aller Polymere eine DDA-X Initiator Gruppe auf. 13% sind durch Protonen gestartet und weitere 9% aller Polymere zeigen eine Fragmentierung der DDA-X Gruppe. Die leicht erhöhte Zahl an Protonen initiierten Polymeren kann dadurch erklärt werden, dass das DDA-X während des Propagationsschrittes stärker zur β -H Eliminierung neigt als das MeTos. Außerdem kann mit Hilfe des ESI-MS-Spektrums ein M_n von $3400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und ein PDI von 1.03 bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion



m/z **DDA-X-PMeOx₃₂-EDA-xCIP** ($[M+H]^+$) berechnet DDA-X ($475.151 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 20-mal MeOx ($32 \cdot 85.054 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ($60.068 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + xCIP ($469.157 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) – Cl^- ($34.969 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) – Br (78.918) Masse $2511.59371 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, gefundene Masse $2511.56940 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Abbildung 60: ESI-MS Spektrum von DDA-X-PMeOx-EDA-xCIP. ¹³¹

Zusätzlich wurden PAKs mit DDA-X Gruppe auf Basis von PEtOx und PiPrOx hergestellt und die antimikrobielle Aktivität der drei verschiedenen Konjugate mit Hilfe des MIC-Tests ermittelt. Ein Überblick über die hergestellten DDA-X-Konjugate ist in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Überblick über die DDA-X initiierten Poly(oxazoline).

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	Mn [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
DDA-X-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	51	5100	99%
DDA-X-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	58	6400	99%
DDA-X-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	30	18	2900	50%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Eine graphische Darstellung der MIC-Testergebnisse ist in Abbildung 61 gegeben.

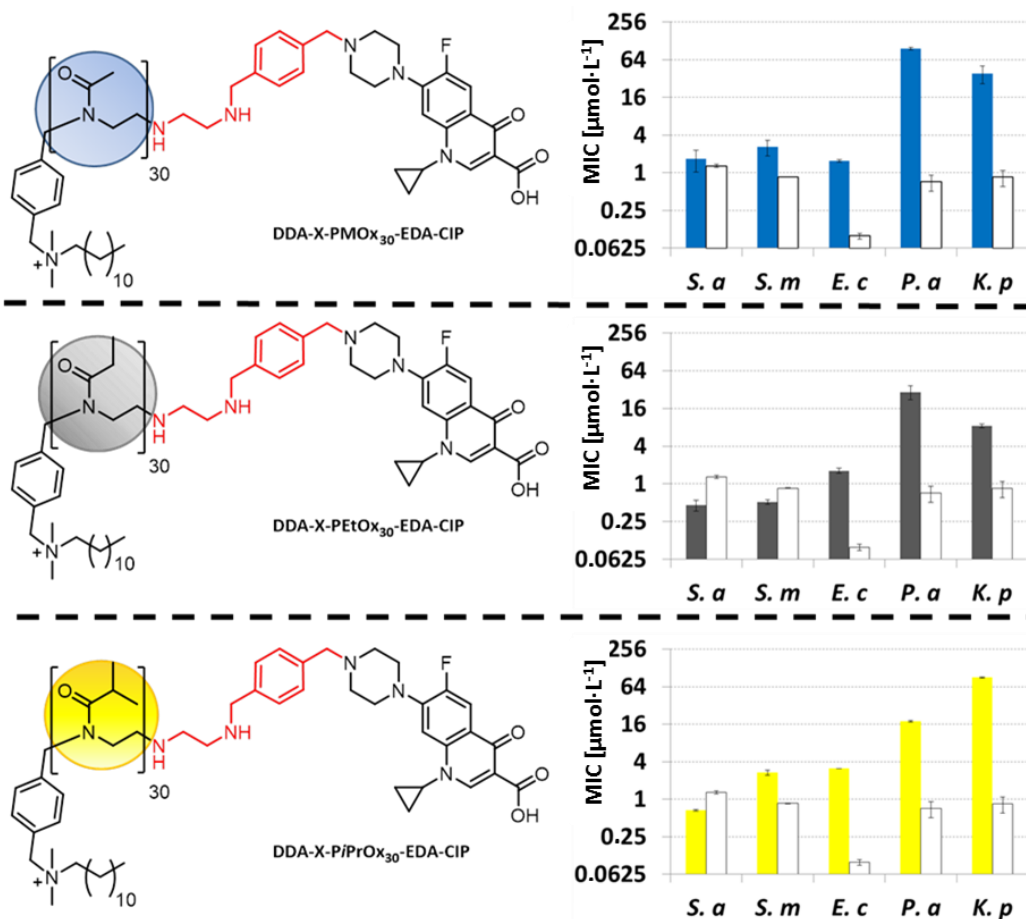


Abbildung 61: MIC-Wert der Konjugate DDA-X-PMeOx-EDA-xCIP, DDA-X-PEtOx-EDA-xCIP und DDA-X-PiPrOx-EDA-xCIP gegen *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.¹³¹ Dazu im Vergleich die MIC-Werte von CIP (weiß).¹³¹ Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Die DDA-X-POx-EDA-xCIP Konjugate zeigen ein ähnliches Aktivitätsmuster wie die Me-POx-EDA-xCIP Konjugate. Sie besitzen eine exzellente Aktivität gegen GRAM-positive Bakterien und eine sehr gute bis moderate Aktivität gegenüber GRAM-negativen Bakterien. Auch ist ein ähnlicher Trend bei den Polymerrückgraten zu beobachten, der Austausch von PMeOx durch PEtOx und PiPrOx führt auch hier zu einer Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität. Allerdings scheint die Aktivität in der Reihenfolge PMeOx < PiPrOx ≤ PEtOx zu steigen.

Die Aktivitäten der DDA-X-POx-EDA-xCIP Konjugate unterscheiden sich kaum von den zuvor synthetisierten Me-POx-EDA-xCIP Konjugaten. Allerdings fällt bei näherer Betrachtung auf, dass die Aktivitäten gegenüber GRAM-negativen Bakterienkeimen leicht erhöht sind. Dieser Trend zeigt sich vor allem bei *E. coli*. Dies ist unerwartet, da die DDA-X Gruppe eigentlich eine stärkere Aktivität gegen über den GRAM-positiven Bakterienzellen aufweist. Daher wurde eine Verbesserung der Aktivität gegenüber *S. aureus* und *S. mutans* erwartet. Die biozide Wirkung des DDA-X beruht auf einer Wechselwirkung mit der Zellmembran, die zu einer Neuordnung der Zellmembranbestandteile führt.^{114, 116, 168} Durch die ständige Umorganisation der Zellmembran muss die Zelle Energie aufwenden. Erfolgt die Neuordnung oft genug, stirbt die Zelle durch den hohen Energieverbrauch.^{115, 165} Die DDA-X Gruppe besitzt im Konjugat wahrscheinlich keine primären Aufgaben als antimikrobielle Gruppe sondern erleichtert hauptsächlich, durch den Angriff der Zellmembran, das Eindringen der CIP-Konjugate in die Zelle. Da das Eindringen in GRAM-negative Bakterienzellen durch die zusätzliche Zellmembran anscheinend erschwert ist, zeigt die DDA-X Gruppe einen stärkeren Effekt bei genau diesen Bakterienzellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einführung der DDA-X Gruppe nur einen geringen Einfluss auf GRAM-negative und keinen auf GRAM-positive Keime ausübt. Dieser Einfluss wird auch mit hydrophoberen Polymerrückgrat abgeschwächt. Dies bedeutet, dass der Effekt für das PMeOx-Konjugat am ausgeprägtesten ist und mit PEtOx und PiPrOx als Polymerrückgrat geringer wird.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.4. Einfluss des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP-Konjugate

Ciprofloxacin ist wie bereits erläutert ein „Gyrase“-Hemmer (siehe Kapitel 1.2.2). Dies bedeutet, dass sich der Wirkort der hergestellten PAKs im Zellinneren befindet. Daher ist die Diffusionsfähigkeit in die Zelle entscheidend für die antimikrobielle Aktivität der Konjugate. Die Diffusionsfähigkeit wird wahrscheinlich stark durch das Molekulargewicht der Konjugate beeinflusst. Um einen möglichen Effekt zu untersuchen, wurden Konjugate mit Kettenlängen von 10, 20, 31, 39 und 60 auf Basis von MeOx hergestellt und auf ihre antimikrobielle Wirkung gegen *S. aureus* und *E. coli* untersucht. Die Ergebnisse der MIC-Tests dieser Konjugate gegen *S. aureus* sind in Abbildung 62 dargestellt. Es wird deutlich, dass das Molekulargewicht einen starken Einfluss auf die antibakterielle Aktivität hat. Diese Aktivität steigt linear zu kleineren Molekulargewichten. Das Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP ($0.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) mit nur zehn Wiederholungseinheiten weist sogar eine fünfmal höhere molare Aktivität als die niedermolekularen Verbindungen CIP ($1.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und xCIP ($1.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) auf. Zudem ist Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP achtmal aktiver als Me-PMeOx₃₀-EDA-CIP ($1.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

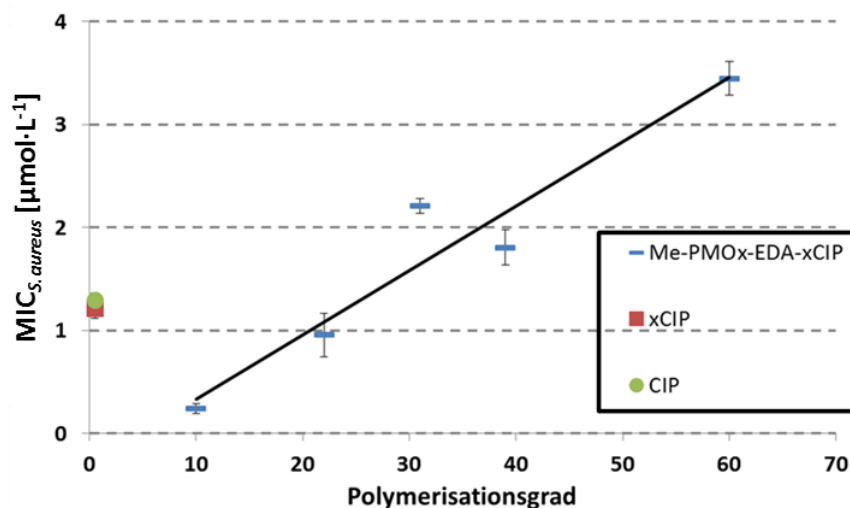


Abbildung 62: Polymerisationsgrade aufgetragen gegen MIC-Werte von *S. aureus* in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Dabei wurden Konjugate mit einer Kettenlängen von 10, 22, 31, 39 und 60 Wiederholungseinheiten verwendet.¹³¹ Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Ein anderes Bild zeigen die MIC-Werte gegen *E. coli* (Abbildung 63), es ist kein linearer Zusammenhang zwischen Polymerisationsgrad und Aktivität zu erkennen. Das Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP ist mit fast 17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ deutlich inaktiver gegen *E. coli* als CIP mit 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und xCIP mit 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Sogar sein Pendant mit 30 Wiederholungseinheiten zeigt im Vergleich mit 5.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eine mehr als neunmal höhere Aktivität. Bei der Betrachtung von Konjugaten mit 30 und 40 Wiederholungseinheiten fällt auf, dass die MIC-Werte mit 5.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP und 1.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für Me-PMeOx₄₀-EDA-xCIP besser werden. Jedoch führt eine weitere Erhöhung der Kettenlänge zu einer Verschlechterung der Aktivität gegen *E. coli*. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine optimale Kettenlänge für die Aktivität gegen *E. coli* bei etwa 40 Wiederholungseinheiten vorliegt. Im Gegensatz zu *S. aureus* führen im Fall von *E. coli* kleinere Molmassen zu weniger aktiven Konjugaten. Die Gründe dafür könnten zum einen die schlechtere Wasserlöslichkeit des Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP sein und zum anderen könnte bei *E. coli* ein anderes Effluxpumpensystem vorliegen, welches kleine Konjugate aus der Zelle befördern kann.

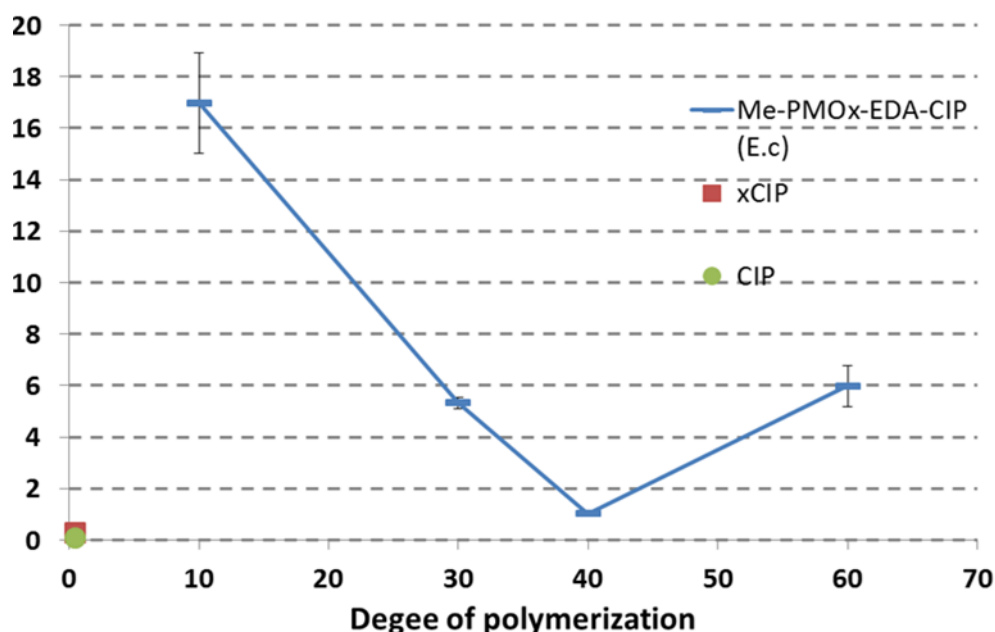


Abbildung 63: Polymerisationsgrad aufgetragen gegen MIC-Werte von *E. coli* in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Es wurden Kettenlängen mit 10, 22, 31, 39 und 60 verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Um die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität der PAKs von der Polymerkettenlänge tiefgehender zu untersuchen, wurde das Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP auf die drei weiteren relevanten Keime *S. mutans*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* getestet (Abbildung 64).

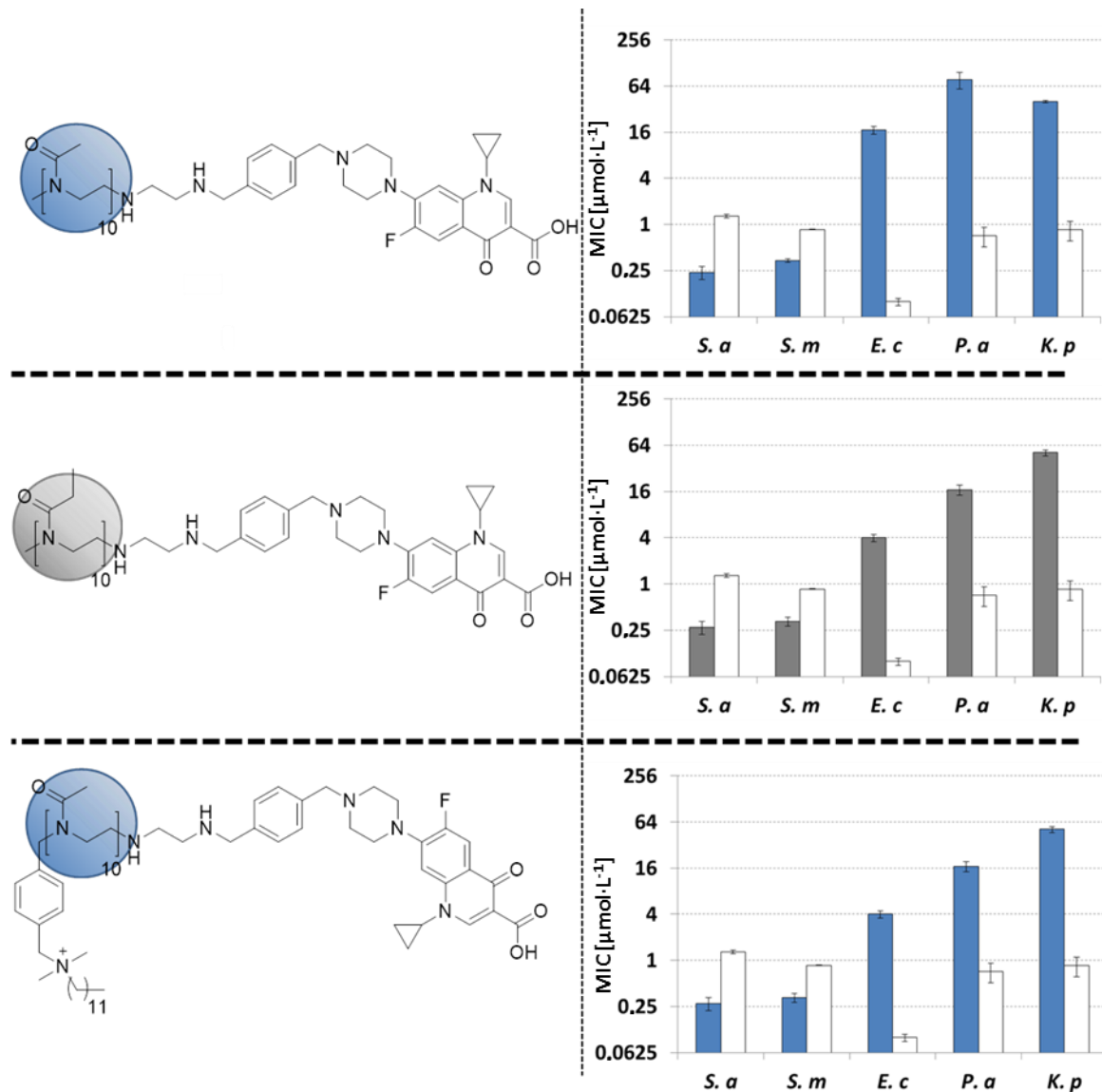


Abbildung 64: MIC-Werte (µmol·L⁻¹) für Polymer-Antibiotika-Konjugate (Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP, Me-PEtOx₁₀-EDA-xCIP, DDA-X-PMeOx₁₀-EDA-xCIP) mit 10 Wiederholungseinheiten gegen die Bakterien *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* im Vergleich zu CIP (weiß).¹³¹ Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

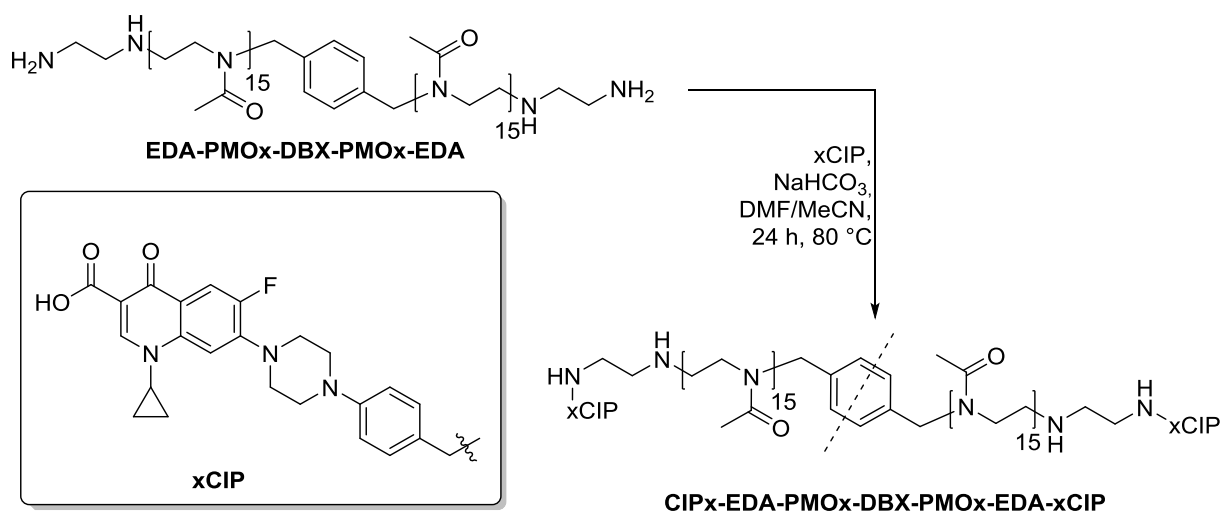
Das Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP zeigt eine gesteigerte Aktivität gegen alle getesteten GRAM-positiven Bakterienstämme (*S. aureus* und *S. mutans*). Bei der Betrachtung der Aktivität gegen die GRAM-negativen Bakterienstämme (*P. aeruginosa* und *K. pneumoniae*) fällt auf, dass die Aktivität im Vergleich mit Me-PMeOx₃₀-EDA-CIP keine nennenswerte Steigerung erfährt mit Ausnahme von *E. coli*, hier zeigt sich wie bereits erwähnt eine Verschlechterung der Aktivität durch kürzere Polymerketten. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für die Konjugate Me-PEtOx₁₀-EDA-xCIP und DDA-X-PMeOx₁₀-EDA-xCIP beobachtet werden. Das DDA-X-PMeOx₁₀-EDA-xCIP zeigt eine bessere Aktivität gegen *S. aureus* und *S. mutans* ($0.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. aureus* und $0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. mutans*) als das zuvor hergestellte DDA-X-PMeOx₃₀-EDA-xCIP und das unmodifizierte CIP. Allerdings ist die Aktivität gegen *E. coli* in einem guten und gegen *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* in einem moderaten Bereich, womit die Aktivität gegen GRAM-negative Bakterien in einem ähnlichen Aktivitätsbereich wie das DDA-X-PMeOx₃₀-EDA-xCIP liegt. Das Me-PEtOx₁₀-EDA-xCIP weist ein ähnliches Aktivitätsmuster auf. Es zeigt eine exzellente Aktivität gegen die beiden GRAM-positiven Stämme ($0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. aureus* und $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. mutans*) und eine gute bis moderate Aktivität gegenüber GRAM-negativen Keimen. Anscheinend nimmt der Einfluss des Polymerrückgrades mit abnehmender Anzahl an Wiederholungseinheiten ab. So führt der Austausch von PMeOx zu PEtOx je nach Bakterienart zu einer Aktivitätssteigerung um das 2- bis 56-fache. Wohingegen bei Konjugaten mit nur 10 Wiederholungseinheiten der Austausch von PMeOx zu PEtOx kaum eine Steigerung der Aktivität hervorruft. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Untersuchung sind in Abbildung 64 gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe lassen darauf schließen, dass das Molekulargewicht einen starken Einfluss auf die antimikrobiellen Aktivitäten der PACs gegen GRAM-positive und -negative Bakterien ausübt.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.5. Antimikrobielle Aktivität von xCIP-Polymer-Konjugaten mit mehr als einer CIP-Funktion

In diesem Kapitel soll der Einbau von mehreren xCIP Einheiten in die Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate vorgestellt werden. Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf deren Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität gelegt werden. Dabei soll CIP zum einen in Seitenkette des Polymerrückgrates und zum anderen als Endgruppe an zwei entgegengesetzte Polymerenden eingebaut werden. Zunächst soll xCIP als Endgruppe an zwei entgegengesetzten Polymerenden untersucht werden. Um ein POx an beiden Polymerenden mit CIP modifizieren zu können, wurde das EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA (Vergleich Kapitel 3.1.1.2) verwendet. Die Verknüpfung mit dem CIP erfolgte mit einem vierfachen molaren Überschuss an xCIP-Spacer bezogen auf das Polymer.



Schema 1: Synthese von einem CIP_x-EDA-PMeOx-DBB-PMeOx-EDA-xCIP Konjugat.

Der Funktionalisierungsgrad sowie der Polymerisationsgrad kann mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Das Konjugat CIP_x-EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA-xCIP besitzt 36 Wiederholungseinheiten. 87% aller Kettenenden sind mit einer CIP-Funktion versehen. Das ¹H-NMR-Spektrum von CIP_x-EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA-xCIP ist im Anhang abgebildet. Die Auswertung des Spektrums verlief analog zu Kapitel 3.1.1.2 und 3.2.3.

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung des CIPx-EDA-PMeOx₁₈-DBX-PMeOx₁₈-EDA-xCIP erfolgte wieder gegen zwei GRAM-positive und drei GRAM-negative Bakterienstämme. Die MIC-Werte sind in Abbildung 65 dargestellt.

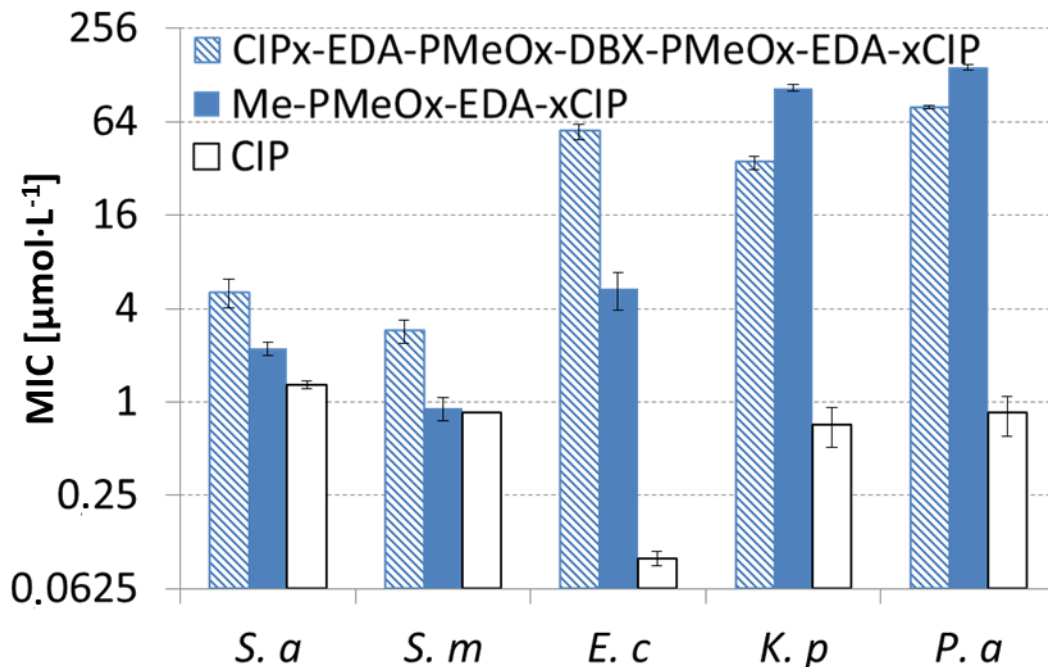


Abbildung 65: Molare MIC-Werte von CIPx-EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA-xCIP (blau gestreift) und zum Vergleich die Werte für Me-PMeOx-EDA-xCIP (blau) und CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ebenso sind zum Vergleich das unmodifizierte CIP und das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP Konjugat abgebildet. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Untersuchung zeigen, dass der Einbau der zweiten CIP Endgruppe in fast allen Fällen keinen Einfluss bzw. sogar einen negativen Einfluss auf die antimikrobielle Wirkung besitzt. Die minimal inhibierende Konzentration liegt für *S. aureus* bei $5,10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und für *S. mutans* bei $2,88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und somit sind diese MIC-Werte mehr als doppelt so hoch wie die von Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP ($1,90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *S. aureus* und $0,91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *S. mutans*). Beim Vergleich der Aktivität gegen drei GRAM-negative Vertreter fällt vor allem die niedrige Aktivität gegen *E. coli* auf. Das doppelt funktionalisierte Konjugat weist mit einem MIC-Wert von $55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ einen mehr als 10-mal höheren MIC-Wert auf als das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP

Ergebnisse und Diskussion

mit $5.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Im Fall von *P. aeruginosa* zeigt das CIPx-EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA-xCIP mit $237 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($79 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) nur noch eine moderate Aktivität ähnlich wie das Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP ($327 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($105 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)). Ein ähnliches Bild ist auch bei *K. pneumoniae* zu erkennen ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $143 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Allerdings ist der MIC-Wert gegen *P.aeruginosa* und *K. pneumoniae* von CIPx-EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA-xCIP ($79 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) etwas niedriger als der von Me-PMeOx-EDA-xCIP ($105 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $143 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Dies bedeutet, dass die zweite xCIP-Gruppe zu einer leichten Verbesserung der Aktivität gegen diese Keime führt.

Im Vergleich mit dem unmodifizierten CIP weist das doppelt funktionalisierte Konjugat gegen alle untersuchten Bakterienstämme eine deutlich schlechtere Aktivität auf. Im Fall von *E. coli* weist das CIPx-EDA-PMeOx₁₅-DBX-PMeOx₁₅-EDA-xCIP einen mehr als 600-fach höheren MIC-Wert auf. Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass der Einbau einer weiteren Antibiotikum-Endgruppe zu keiner nennenswerten Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität führt mit Ausnahme gegen den Stamm *K. pneumoniae*. Für die meisten getesteten Stämme scheint sich die Aktivität durch die zweite CIP Gruppe zu verschlechtern.

Des Weiteren soll die Möglichkeit diskutiert werden, CIP in die Seitenkette des Polymerrückgrates einzubauen. Dies würde den Einbau von mehr als nur zwei CIP Einheiten erlauben. Um dies zu erreichen, wurde das Me-PEtOx-PsucEDAOx-EDA Polymer aus Kapitel 3.1.4 verwendet. Dieses Polymer besitzt neben der EDA-Endgruppe auch EDA-Gruppen als Seitenkettenmodifikation. Dadurch besitzt das Me-PEtOx-PsucEDA-EDA zehn primäre Amineinheiten, die eine potenzielle Bindungsstelle für das xCIP bilden. Das Me-PEtOx-PsucEDAOx-EDA wurde mit einem zehnfachen Überschuss an xCIP in einem Gemisch aus DMF und MeCN umgesetzt (Vergleich Abbildung 66).

Ergebnisse und Diskussion

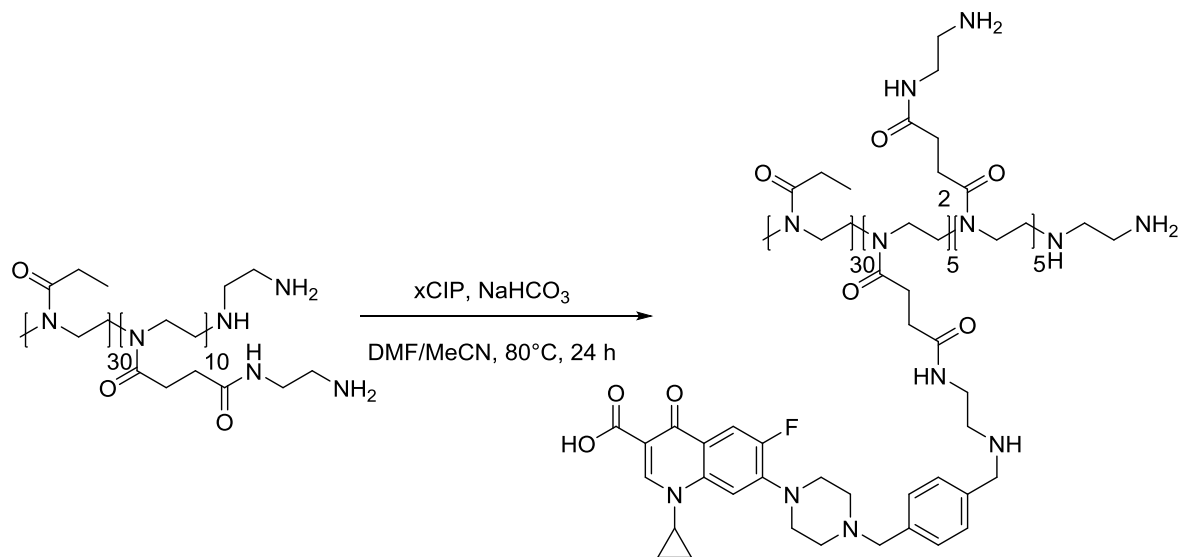


Abbildung 66: Synthese des Me-PEtOx-PsucEDAox-PsucEDAoxxCIP-EDA-xCIP.

Mit Hilfe des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (Abbildung 67) konnte die mittlere Anzahl an xCIP pro Polymer bestimmt werden. Dabei wurden die Signale der Methylstartergruppe (**1**) mit den aromatischen Signalen der xCIP Gruppe (**22-24**) verglichen. Da die beiden Signale ein Verhältnis von 1:5 aufweisen folgt daraus, dass die Polymere durchschnittlich fünf CIP-Moleküle besitzen. Folglich sind 50% der neu eingeführten Seitenketten mit einer Antibiotikafunktion versehen ($x = \frac{\text{CIP-Gruppen}}{\text{Gesamte Anzahl an EDA-Gruppen}}$).

Ergebnisse und Diskussion

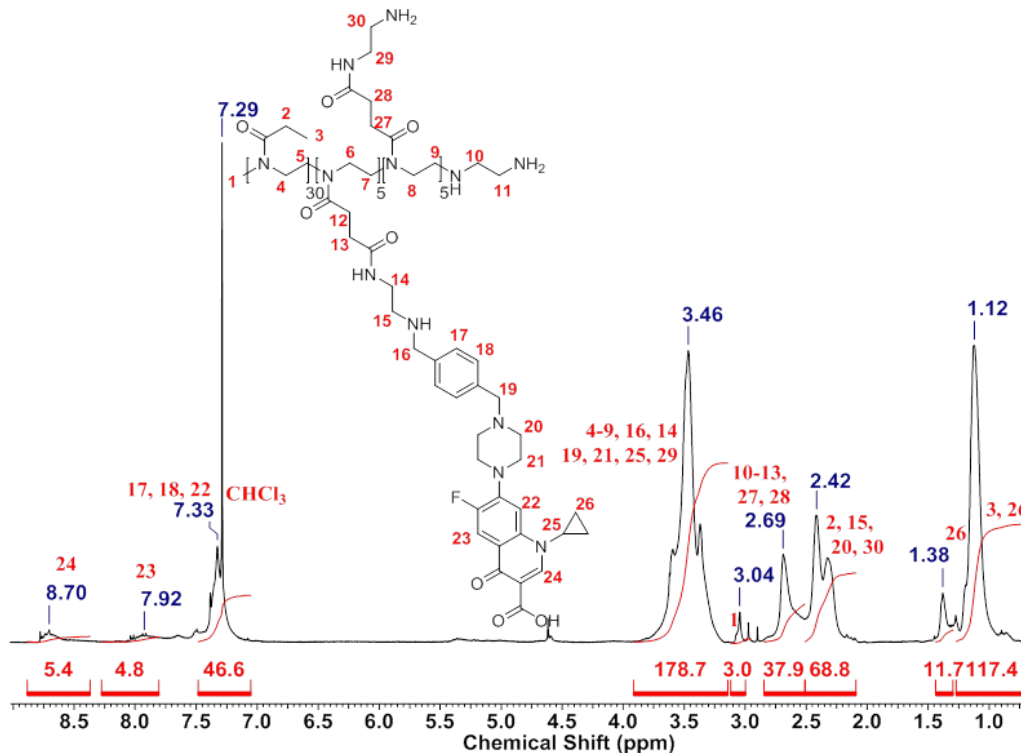


Abbildung 67: ¹H-NMR-Spektrum des Me-PEtOx-PsucEDAOx-PsucEDAOxxCIP-EDA-xCIP.

Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität zeigt, dass das fünffach beladene CIP-PEtOx-Konjugat einen MIC-Wert von $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen den GRAM-positiven Stamm *S. aureus* aufweist. Damit ist es deutlich aktiver als das niedermolekulare CIP mit einem MIC-Wert von $1.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und dem Me-PMEOx₃₀-EDA-xCIP mit $1.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Im Gegensatz dazu weist ein einfach beladenes Me-PEtOx₃₀-EDA-xCIP Konjugat einen Wert von $0.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf. Damit ist das fünffach beladene genau so aktiv wie das einfach beladene PEtOx-Konjugat. Im Fall von *S. mutans* ist ein ähnliches Bild zu erkennen. Auch hier sind die Aktivitäten nahezu identisch. Das fünffach beladene PEtOx-Konjugat weist eine Aktivität von $0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und das einfach beladene eine von $0.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf und somit sind die Aktivitäten im Rahmen der Messungenauigkeit des MIC-Testes gleich. Im Gegensatz dazu zeigt das Me-PEtOx-PsucEDAOx-PsucEDAOxxCIP-EDA-xCIP eine deutlich verbesserte Aktivität gegenüber den GRAM-negativen Bakterien als das Me-PEtOx-EDA-xCIP. Die Aktivitäten gegen *E. coli* und *K. pneumoniae* sind mit $0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $1.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf demselben Niveau wie das unmodifizierte CIP ($0.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *E. coli* und $0.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *K. pneumoniae*) und damit deutlich aktiver als das Me-PEtOx-EDA-xCIP (für *E. coli* um das 13-fache und für *K. pneumoniae* um das 21-fache). Für *P.*

Ergebnisse und Diskussion

aeruginosa ist die Aktivität des fünffach beladenen Konjugats mit $3.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zwar leicht schlechter als die vom reinen CIP mit $0.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, jedoch immer noch mehr als das 10-fache aktiver als das Me-PEtOx-EDA-xCIP. Die MIC-Werte des Me-PEtOx-PsucEDAOx-PsucEDAOxxCIP-EDA-xCIP (grau gestreift) und Me-PEtOx-EDA-xCIP (dunkelgrau) sowie des niedermolekularen CIP (weiß) sind in Abbildung 68 als Säulendiagramm dargestellt.

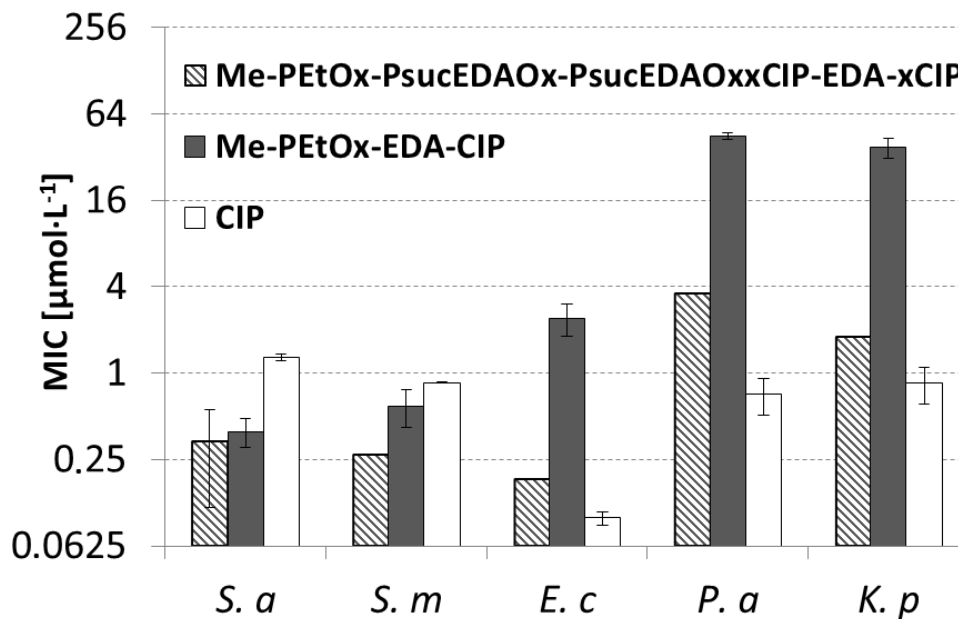


Abbildung 68: MIC-Werte von Me-PEtOx-PsucEDAOx-PsucEDAOxxCIP-EDA-xCIP (grau gestreift) und Me-PEtOx-EDA-xCIP (dunkelgrau) sowie des niedermolekularen CIP (weiß) in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Das Fazit dieser Untersuchung ist, dass der Einbau einer zweiten xCIP Endgruppe am distalen Ende des Polymers zu keiner nennenswerten Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung führt. Stattdessen scheint der Einbau der zweiten xCIP Funktion die biozide Wirkung gegen die meisten Stämme zu stören. Der Einbau von xCIP in die Seitenkette des Polymerrückgrates wies keine Verbesserung der Aktivität gegen GRAM-positive Keime auf. Allerdings kann eine verbesserte Wirkung gegen GRAM-negative Bakterien beobachtet werden. Damit erscheint eine mehrfache Beladung mit xCIP nur bei der Bekämpfung von GRAM-negativen Bakterien eine sinnvolle Alternative zu den zuvor

Ergebnisse und Diskussion

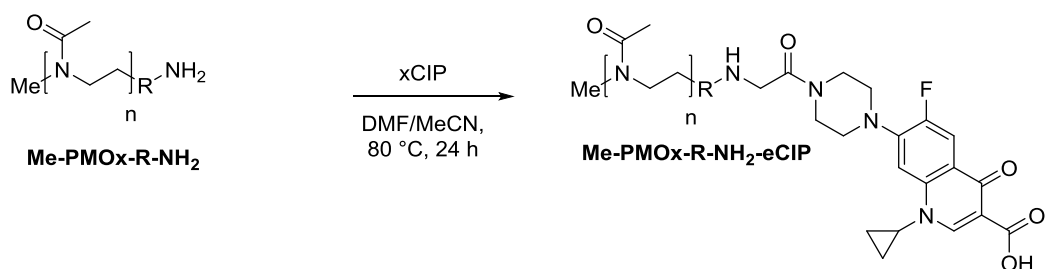
diskutierten Konjugaten zu sein. Allerdings sind solche mehrfach beladenen Polymere nur schwer von überschüssigem Antibiotikum zu trennen, wodurch eine Differenzierung der Aktivitäten des Polymer-Konjugats sowie der nicht abgetrennten Antibiotika schwer fällt. Zudem ist unklar, wie sich die verbleibenden EDA-Gruppen auf die Aktivität auswirken. Diese könnten portioniert vorliegen und als Polykationen wirken

3.2.3.6 Einfluss der Polymerendgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der xCIP-Konjugate

Die Ergebnisse der Direktterminierung und die Untersuchungen der xCIP-Konjugate zeigte, dass die Bindung zwischen Polymer und Ciprofloxacin eine wichtige Rolle hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität spielt. Daher stellt sich die Frage ob die Struktur der Polymerendgruppe ebenfalls einen Einfluss ausübt. Die Polymerendgruppe wird zur Konjugation des CIP-„Spacers“ verwendet und dient im Konjugat selbst auch als ein Teil des „Spacers“. Daher ist naheliegend, dass diese Gruppe einen starken Einfluss auf die antimikrobielle Effizienz ausüben kann. Zu diesem Zweck wurden die Polymere mit verschiedenen Aminendgruppen aus Kapitel 3.1.3 für die Konjugation mit xCIP verwendet. Neben dem bereits verwendeten EDA terminierten PMeOx wurden zusätzlich auch Polymere mit 1,4-Butylendiamin (BDA), 1,6-Hexylendiamin (HDA), 1,12-Dodecylendiamin (DODA), *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethylendiamin (TREN), Triethylentetramin (TET) und Tetraethylenpentamin (TEP) als Endgruppe konjugiert.

Die Konjugation mit dem xCIP-„Spacer“ konnte für alle aminterminierten Polymere ohne Veränderung der Reaktionsbedingungen durchgeführt werden (Abbildung 69). Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Die entsprechenden ¹H-NMR-Spektren wurden analog zum Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP und den Polymeren aus Kapitel 3.1.3 ausgewertet und sind im Anhang abgebildet.

Ergebnisse und Diskussion



R = -HNC ₄ H ₈ -	(Me-PMOx-BDA)	R = -HNC ₄ H ₈ -	(Me-PMOx-BDA-eCIP)
R = -HNC ₆ H ₁₂ -	(Me-PMOx-HDA)	R = -HNC ₆ H ₁₂ -	(Me-PMOx-HDA-eCIP)
R = -HNC ₁₂ H ₂₄ -	(Me-PMOx-DODA)	R = -HNC ₁₂ H ₂₄ -	(Me-PMOx-DODA-eCIP)
R = -HNC ₂ H ₄ NHC ₂ H ₄ NH ₂	(Me-PMOx-TET)	R = -HNC ₂ H ₄ NHC ₂ H ₄ NH ₂	(Me-PMOx-TET-eCIP)
R = -HNC ₂ H ₄ (NHC ₂ H ₄) ₂ NH ₂	(Me-PMOx-TEP)	R = -HNC ₂ H ₄ (NHC ₂ H ₄) ₂ NH ₂	(Me-PMOx-TEP-eCIP)
R = -HNC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₄ NH ₂)C ₂ H ₄ NH ₂	(Me-PMOx-TREN)	R = -HNC ₂ H ₄ N(C ₂ H ₄ NH ₂)C ₂ H ₄ NH ₂	(Me-PMOx-TREN-eCIP)

Abbildung 69: Konjugation der aminfunktionalisierten Poly(2-methyl-2-oxazoline).

Die analytischen Daten aus der ¹H-NMR-Spektroskopie sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Nahezu alle Konjugate weisen eine quantitative xCIP Funktionalisierung ($F^d = 80\%$) auf.

Tabelle 10: Überblick über die xCIP-Konjugate mit einer BDA, HDA, DODA, TET, TEP oder TREN Endgruppe

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _n [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
Me-PMeOx ₂₉ -BDA-xCIP	30	29	3000	99%
Me-PMeOx ₄₈ -HDA-xCIP	30	48	4600	99%
Me-PMeOx ₃₄ -DODA-xCIP	30	34	3500	99%
Me-PMeOx ₄₄ -TREN-xCIP	30	44	4400	99%
Me-PMeOx ₄₁ -TET-xCIP	30	41	4000	80%
Me-PMeOx ₃₃ -TEP-xCIP	30	33	3400	60%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität wurde an dem GRAM-positiven Stamm *S. aureus* und dem GRAM-negativen Stamm *E. coli* durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 70 wiedergegeben.

Ergebnisse und Diskussion

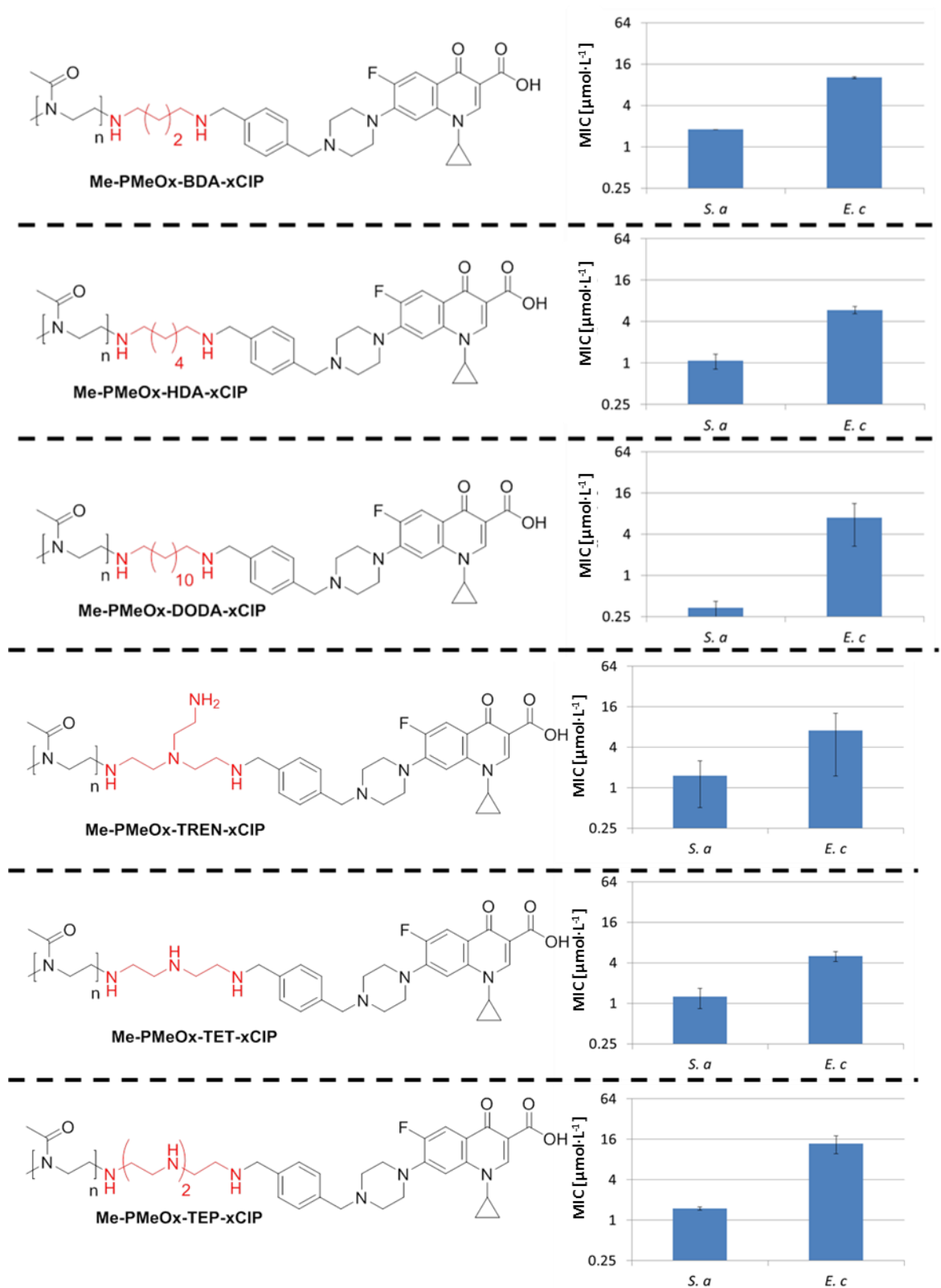


Abbildung 70: MIC-Werte der Konjugate Me-PMeOx-BDA-xCIP, Me-PMeOx-HDA-xCIP, Me-PMeOx-DODA-xCIP, Me-PMeOx-TREN-xCIP, Me-PMeOx-TET-xCIP und Me-PMeOx-TEP-xCIP in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Die meisten der gezeigten Konjugate weisen eine deutlich bessere Aktivität gegen *S. aureus* als gegen *E. coli* auf. Die verschiedenen Konjugate weisen im Wesentlichen eine vergleichbare Aktivität gegen *E. coli* auf. Diese liegt zwischen $5.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $13.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Somit ist für *E. coli* kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Im Fall von *S. aureus* kann hingegen ein Einfluss des Polymerendes beobachtet werden. So liegt das Me-PMeOx-BDA-xCIP mit $1.80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf einem Niveau wie das Me-PMeOx-EDA-xCIP mit $1.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Vergleich Kapitel 3.2.3). Werden nun Diamine mit längeren Alkylketten wie HDA verwendet, steigt die Aktivität des Konjugats. Beispielsweise besitzt das Me-PMeOx-HDA-xCIP einen MIC-Wert von $1.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und damit eine leicht bessere Aktivität. Der Einbau von DODA zeigt sogar mit $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eine deutlich bessere Aktivität als das Me-PMeOx-EDA-xCIP. Der Einbau von weiteren Aminen in die Endgruppe, wie es bei TREN, TET und TEP der Fall ist, zeigen hingegen keinen Einfluss. Die Aktivität liegt hier zwischen 1.26 - $1.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und damit auf einem Niveau wie die Konjugate mit EDA Polymerendgruppe.

Die Untersuchungen der verschiedenen Polymerendgruppen bestätigen die Annahme, dass die Bindung zwischen Polymer und Ciprofloxacin eine essentielle Rolle bei der Aktivität einnimmt. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass die Polymerendgruppe einen starken Einfluss auf die Aktivität der xCIP-Konjugate ausübt.

3.2.4. Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels eCIP und bCIP.

Die vorangegangenen Untersuchungen bezogen sich lediglich auf die Konjugation mittels xCIP, nun soll in den folgenden Kapiteln die Konjugation mit eCIP und bCIP vorgestellt werden. Für die Konjugation mit eCIP und bCIP-„Spacern“ konnte die gleiche Strategie wie zuvor bei xCIP verwendet werden. Auch die Reaktionsbedingungen konnten beibehalten werden. Ein Gemisch aus DMF und MeCN diente als Lösungsmittel und Natriumhydrogencarbonat als Hilfsbase. Die Konjugation wurde bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

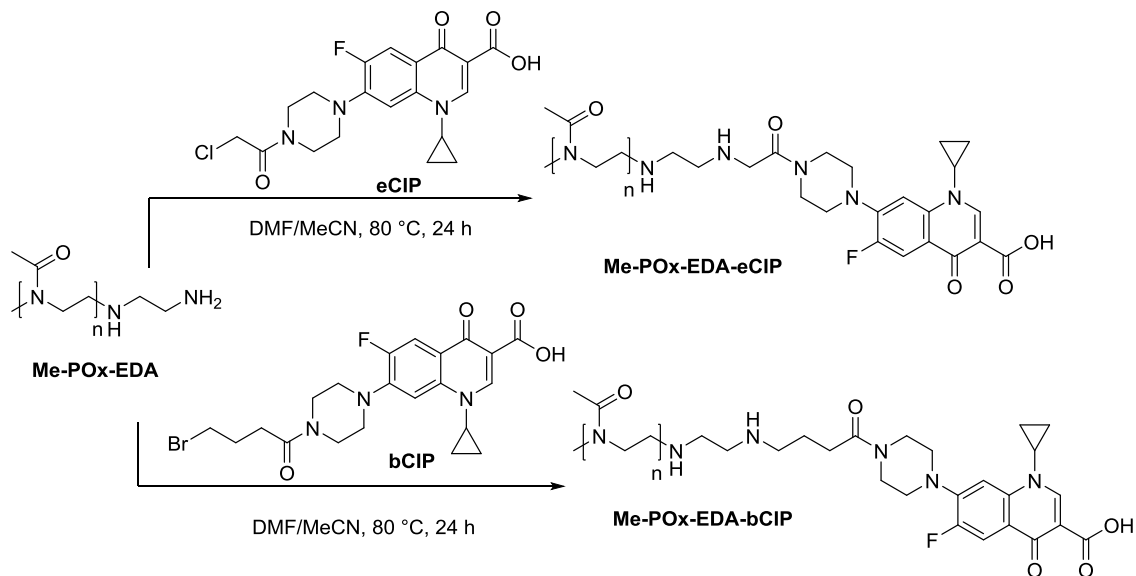


Abbildung 71: Reaktionsgleichung der Konjugation von Me-PMeOx-EDA mit eCIP und bCIP. Die resultierenden Polymer-Antibiotika-Konjugate wurden Me-PMeOx-EDA-eCIP und Me-PMeOx-EDA-bCIP genannt.

Zur Abtrennung niedermolekularer CIP-Derivate wurden die Konjugate mehrmals in Wasser dialysiert und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Die Reaktionsgleichung für die Konjugation von eCIP bzw. bCIP mit einem Me-PMeOx₃₀-EDA ist in Abbildung 71 gezeigt. Dabei konnte die Konjugation mit guten Ausbeuten von 77-91% durchgeführt werden.

Der Verlauf der Konjugation wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. In Abbildung 72 ist exemplarisch das Konjugat Me-PMeOx-EDA-eCIP gezeigt. Die Auswertung der bCIP Konjugate verlief analog und das dazugehörige Spektrum ist im Anhang zu finden. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt die typischen PMeOx Signale (2-5) sowie die Methyl- Startergruppe (1). Daraus lässt sich eine Wiederholungseinheitenzahl von 37 Oxazolin-Einheiten berechnen. Darüber hinaus ist ein Multipllett im Bereich von 2.50 ppm zu erkennen, welches zu den Protonen der Ethylendiamin-Einheit (7, 8) und der letzten Methylengruppe der terminalen Oxazolin-Einheit (6) gehört. Zudem können eindeutig die aromatischen Signale der CIP-Endgruppe sowie die beiden Methylengruppen des Cyclopropylrings erkannt werden. Die Signale des Piperazinrings (10, 11), die Methylengruppe in α -Position zur Carbonylgruppe (9) sowie die Methingruppe des Cyclopropylrings (13) werden durch das Polymerrückgrat überlagert. Mit Hilfe der

Ergebnisse und Diskussion

aromatischen Signale der Antibiotikum-Endgruppe und der Methylstartergruppe lässt sich eine Endgruppenfunktionalisierung von 83% bestimmen.

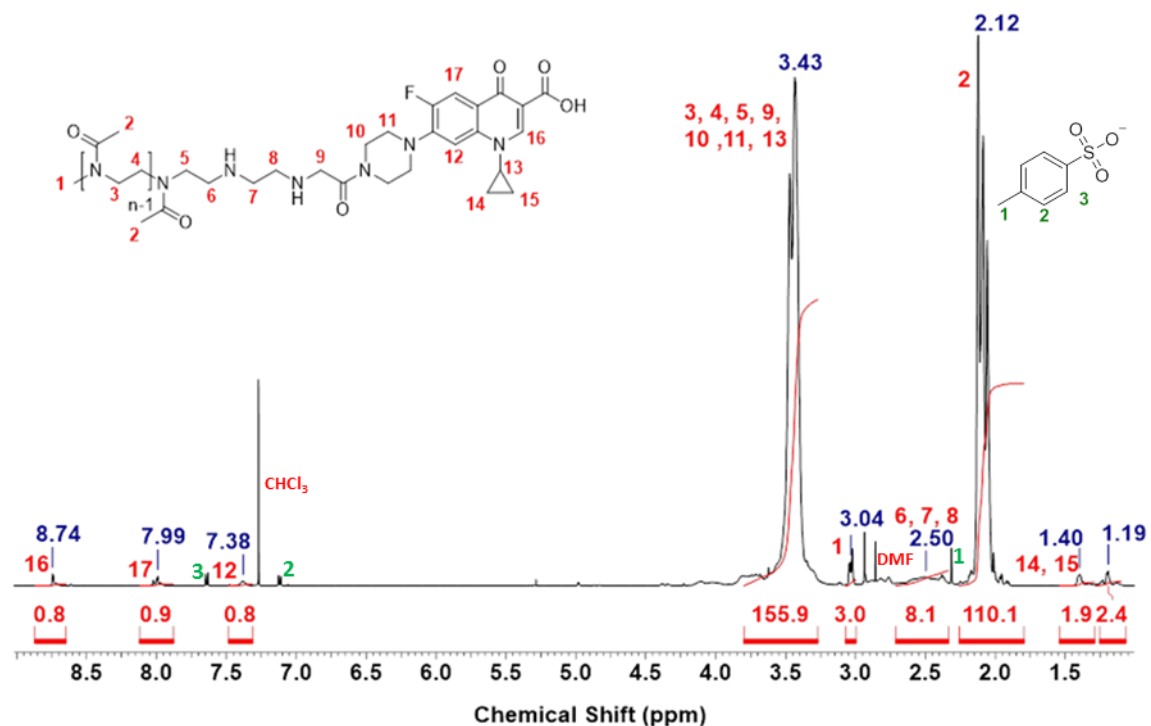


Abbildung 72: ¹H-NMR-Spektrum des Konjugats Me-PMeOx-EDA-CIP. Diese Messung wurde in CDCl₃ (7.27 ppm) aufgenommen.

Die MIC-Tests der beiden hergestellten Konjugate Me-PMeOx₃₇-EDA-eCIP und Me-PMeOx₃₀-EDA-bCIP zeigten, dass die beiden Konjugate eine hohe Aktivität gegenüber den getesteten Bakterien aufweisen. Das Me-PMeOx₃₇-EDA-eCIP besitzt gegen *S. aureus* einen MIC-Wert von 33 µg·mL⁻¹ (10.7 µmol·L⁻¹). Für die GRAM-negativen Stämme zeigt das eCIP-Konjugate einen MIC-Wert von 4.60 µg·mL⁻¹ (1.49 µmol·L⁻¹) gegen *E. coli*, 15 µg·mL⁻¹ (4.98 µmol·L⁻¹) gegen *K. pneumoniae* und 3.33 µg·mL⁻¹ (1.07 µmol·L⁻¹) gegen *P. aeruginosa*. Ein Überblick über die MIC-Werte in µmol·L⁻¹ der beiden neu hergestellten Konjugate mit dem bCIP- und dem eCIP-„Spacern“ ist in Abbildung 73 gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

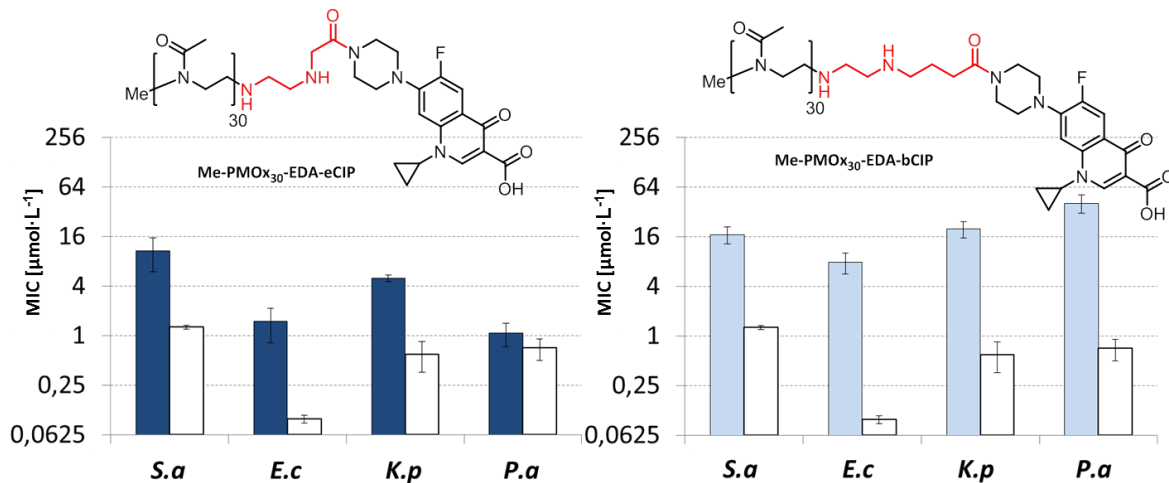


Abbildung 73: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ der Konjugate Me-PMEOx-EDA-eCIP (dunkelblau) und Me-PMEOx-EDA-bCIP (hellblau) gegen die Bakterien *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* im Vergleich mit CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Im Vergleich zeigt das Me-PMEOx-EDA-bCIP deutlich höhere MIC-Werte als das Me-PMEOx-EDA-eCIP. Für *S. aureus* liegt der MIC-Wert des Me-PMEOx-EDA-bCIP bei $52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($17,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und für *E. coli* bei $24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($7,90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Gegen *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* liegt die Aktivität des bCIP-Konjugats mit $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($40,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und $61 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($19,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) etwas niedriger als gegen die anderen Bakterienstämme. Ein Vergleich zwischen eCIP-Konjugat und bCIP-Konjugat zeigt, dass das Me-PMEOx₃₇-EDA-eCIP eine deutlich bessere Aktivität als das Me-PMEOx₃₀-EDA-bCIP besitzt. Während die Wirkung gegen *S. aureus* für beide Konjugate ähnlich ist, weist das eCIP-Konjugat im Fall von *E. coli* und *K. pneumoniae* eine 4-5-fach und im Fall von *P. aeruginosa* einen 37-fach besseren Aktivität auf. Im Vergleich mit Me-PMEOx₃₀-EDA-xCIP weisen Me-PMEOx₃₀-EDA-eCIP und Me-PMEOx₃₀-EDA-bCIP eine deutliche verbesserte Aktivität gegen GRAM-negative Bakterien auf. Während das Me-PMEOx-EDA-xCIP mit $105 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($327 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) eine mehr als 100-fach schlechtere Aktivität als CIP ($0,23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) besitzt, liegt das Me-PMEOx-EDA-eCIP mit $1,07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3,33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) auf dem gleichen Niveau wie das unmodifizierte CIP gegen *P. aeruginosa*.

Ergebnisse und Diskussion

Die neu hergestellten „Spacer“ eCIP und bCIP eignen sich sehr gut zur Synthese von Polymer-CIP-Konjugaten. Dabei scheint vor allem das eCIP für die Synthese von aktiven PAKs geeignet zu sein, die im Vergleich zu den Konjugaten mit xCIP auch sehr gute Aktivitäten gegen GRAM-negative Bakterien aufweisen. Interessanterweise weisen die eCIP- und bCIP-Konjugate ein unterschiedliches Aktivitätsmuster zum xCIP auf. Während xCIP-Konjugate eine verbesserte Aktivität gegen GRAM-positive und eine Verschlechterung gegen GRAM-negative Bakterien bewirken, zeigt das eCIP-Konjugat einen ähnlichen Trend wie das niedermolekulare CIP. Dieser ähnliche Trend könnte auf eine Hydrolyse der Amidbindung des eCIP-„Spacers“ und damit auf eine Abspaltung des CIPs hinweisen. Daher soll in den nächsten Kapiteln weitere Untersuchung zur Aktivität der eCIP-Konjugate erfolgen.

3.2.4.1. Einfluss des Polymerrückgrates auf die Aktivität der Polymer-eCIP-Konjugate

In Abschnitt 3.2.3.1 wurde der Einfluss des Polymerrückgrates auf die Aktivität der xCIP-Konjugate untersucht. Das Polymerrückgrat besitzt einen starken Einfluss, wobei die Aktivität von PMeOx über PcPrOx und PEtOx/PiPrOx zu dem aktivsten Polymerrückgrat PEG steigt. Daher soll nun überprüft werden, ob dieser Einfluss auch bei den eCIP-Konjugaten vorliegt. Neben den bereits für die Konjugation des eCIPs verwendeten PMeOx wurden nun auch PEtOx, PiPrOx, PcPrOx und PEG zur Synthese von eCIP-Konjugaten verwendet (Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind im Anhang gezeigt).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Zusammenfassung der eCIP-Konjugate für die Untersuchung des Einflusses des Polymerrückgrates

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _n [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
Me-PMeOx ₃₈ -EDA-eCIP	30	38	3700	90%
Me-PMeOx ₄₀ -EDA-bCIP	30	40	3800	83%
Me-PEtOx ₃₆ -EDA-eCIP	30	36	3500	84%
Me-PiPrOx ₇₁ -EDA-eCIP	30	71	6400	77%
Me-PcPrOx ₃₃ -EDA-eCIP	30	33	3300	99%
Me-PEG ₂₆ -EDA-eCIP	45	26	1600	99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Die Untersuchungen der antimikrobiellen Aktivität der PEtOx-, PiPrOx-, PcPrOx- und PEG Konjugate zeigt, dass der Austausch von PMeOx durch PEtOx und PiPrOx zu einer leichten Verbesserung gegen den GRAM-positiven Stamm *S. aureus* führt. Die MIC-Werte sind für das Me-PEtOx₃₀-EDA-eCIP mit 3.61 μmol·L⁻¹ und Me-PiPrOx₃₀-EDA-eCIP mit 3.25 μmol·L⁻¹ fast dreimal niedriger als das PMeOx-Konjugat (10.7 μmol·L⁻¹) und somit auch aktiver. Der Austausch des Rückgrates durch PcPrOx oder PEG führt dahingegen im Allgemeinen zu einer Verschlechterung der Aktivität. Im Fall des PEG-Konjugat zeigt sich die Verschlechterung gegen die GRAM-negativen Keime. Me-PEG₄₅-EDA-eCIP weist gegen *P. aeruginosa* eine mehr als 43-fach schlechtere Aktivität als das zuvor vorgestellte Me-PMeOx₃₇-EDA-eCIP auf. Die Untersuchungen der antimikrobiellen Aktivität zeigen, dass das Me-PEtOx₃₀-EDA-eCIP das aktivste Konjugat ist (Abbildung 74).

Ergebnisse und Diskussion

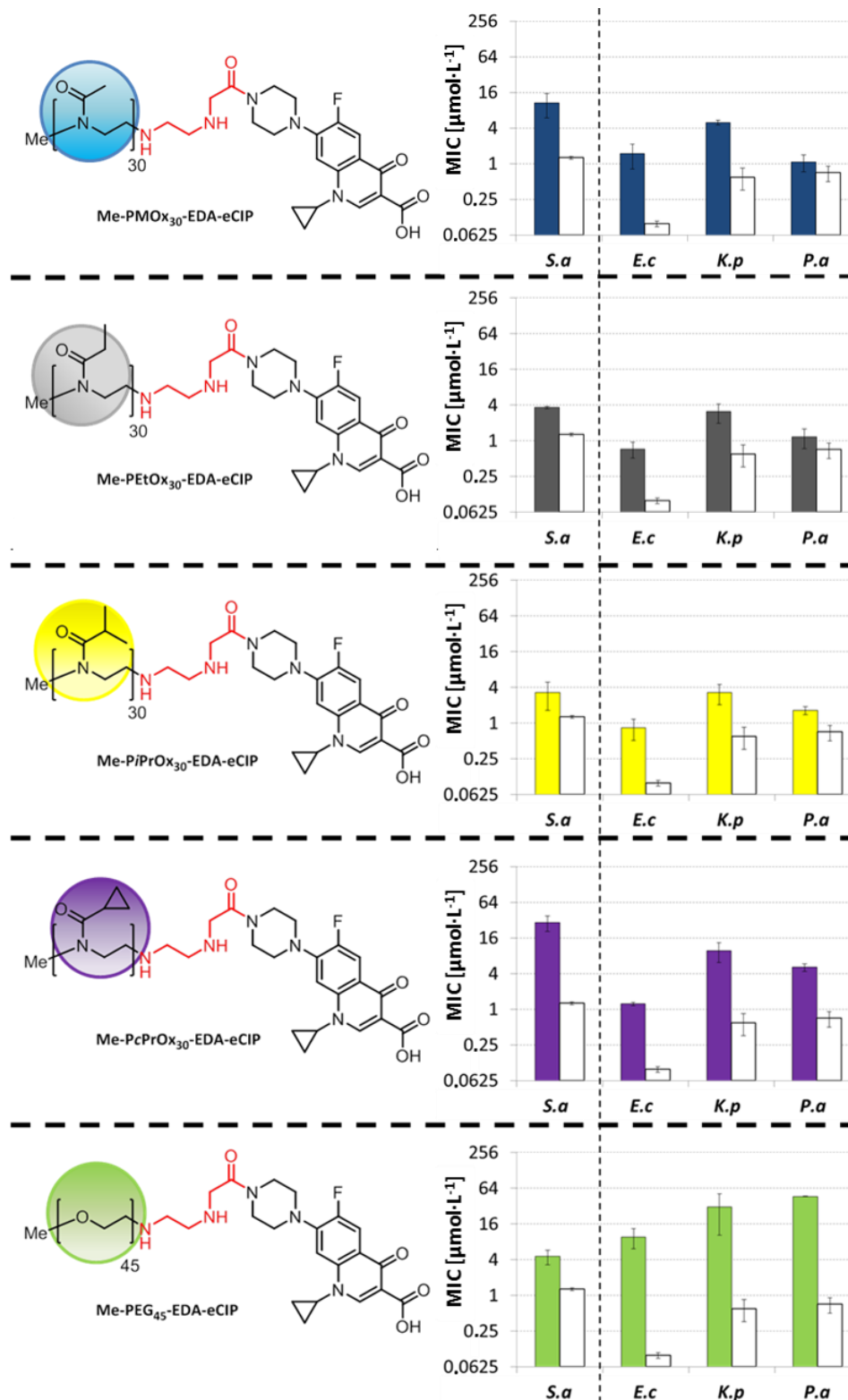


Abbildung 74: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ der verschiedenen Polymer-eCIP-Konjugate im Vergleich zu CIP (weiß). Die Konjugate wurden gegen *Staphylococcus aureus* (S. a), *Escherichia coli* (E. c), *Pseudomonas aeruginosa* (P. a) und *Klebsiella pneumoniae* (K. p) getestet. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Die allgemein schlechte Aktivität des Me-PEG₄₅-EDA-eCIP ist etwas verwunderlich, da im Fall der xCIP Konjugate das Me-PEG₄₅-EDA-xCIP die höchsten MIC-Werte lieferte. Anscheinend gibt es einen synergetischen Effekt zwischen dem CIP-„Spacer“ und dem Polymerrückgrat, der je nach Bauart des CIP-Derivates unterschiedlich ist. Dies bedeutet, dass jedes CIP-Derivat ein optimales Polymerrückgrat besitzt. Im Fall des eCIP-Derivates wäre PEtOx bzw. PiPrOx das geeignetste Polymerrückgrat.

3.2.4.2. Einfluss einer DDA-X Initiatorgruppe auf die Aktivität der Polymer-eCIP-Konjugate

Wie schon zuvor soll auch nun bei den eCIP-Konjugaten die Einführung einer DDA-X-Initiator Gruppe untersucht werden. Die DDA-X Gruppe konnte bei den bisher untersuchten xCIP-Konjugaten einen geringen positiven Effekt auf die Aktivität gegen GRAM-negative Bakterien ausüben. Daher sollte überprüft werden, ob sich dieser Effekt auch bei den eCIP-Konjugaten zeigt. Zu diesem Zweck wurde ein DDA-X-PMeOx-EDA Polymer mit eCIP konjugiert (siehe Abbildung 75).

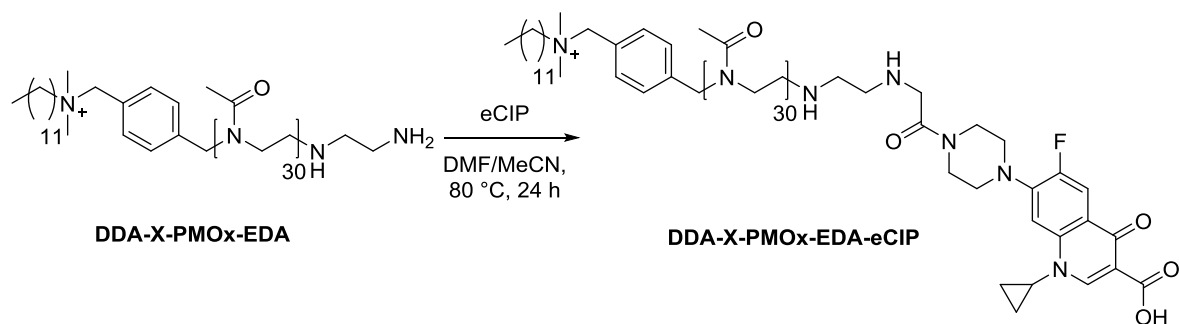


Abbildung 75: Konjugation von DDA-X-PMeOx-EDA zu DDA-X-PMeOx-EDA-eCIP.

Im Gegensatz zu den MIC-Werten der xCIP-Konjugate zeigen die MIC-Werte des DDA-X-PMeOx-EDA-eCIP keinen positiven Einfluss durch die eingeführte DDA-X Gruppe. Die Aktivitäten gegen GRAM-negative Bakterien sind im Vergleich mit Me-PMeOx-EDA-eCIP nahezu unverändert. Für *S. aureus* führt die Einführung der DDA-X Gruppe bei den eCIP-

Ergebnisse und Diskussion

Konjugaten sogar zu einer Verschlechterung der Aktivität von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf mehr als $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (siehe Abbildung 76).

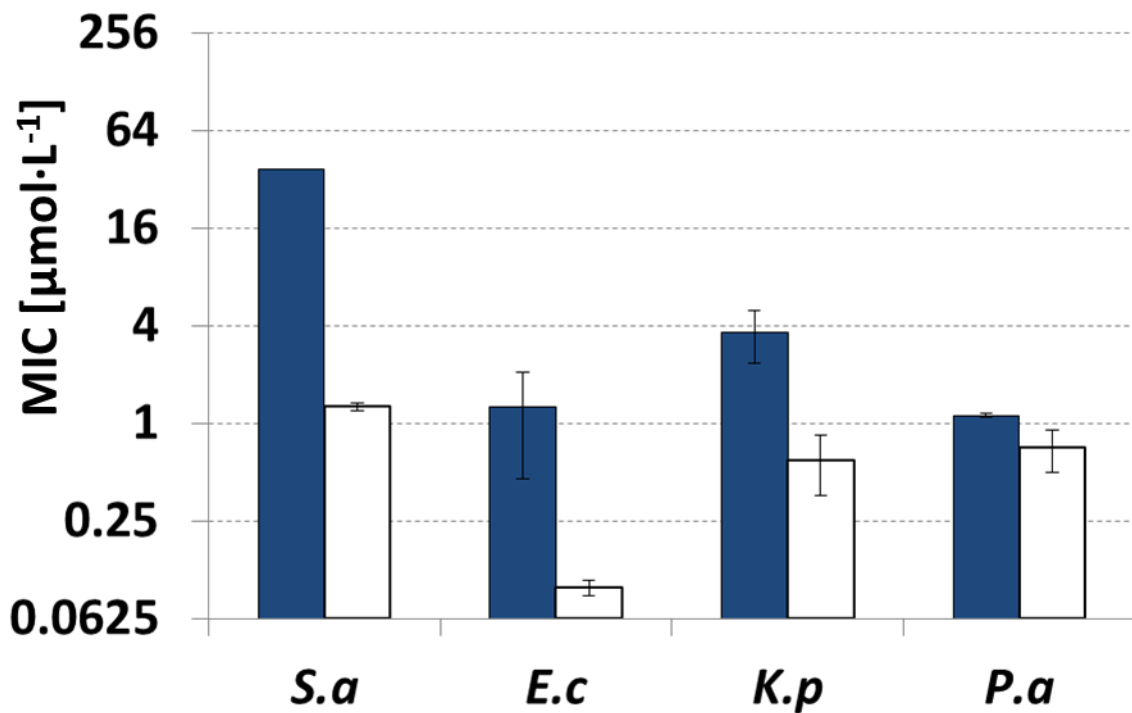


Abbildung 76: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für das DDA-X-PMeOx-EDA-eCIP (blau) und CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Der positive Effekt durch die Einführung einer DDA-X Gruppe, der bei der Aktivität gegen GRAM-negative Bakterien für die xCIP-Konjugate zu sehen war (Vergleich Kapitel 3.2.3.3), konnte nicht für die eCIP-Konjugate beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte die allgemein bessere Aktivität gegen GRAM-negative Bakterienkeime der eCIP-Konjugate sein. Allerdings führt der Einbau der DDA-X-Initiator Gruppe in das Konjugat zu einer verschlechterten Aktivität gegen *S. aureus*.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.3. Einfluss des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Aktivität der eCIP-Konjugate

In diesem Kapitel soll auf den Einfluss des Molekulargewichtes der eCIP Konjugate auf die antimikrobielle Aktivität eingegangen werden. Polymere mit Methyltosylat als Initiator und MeOx als Monomer wurden mikrowellenunterstützt hergestellt und mit EDA terminiert. Es wurden Kettenlängen von 10, 30, 40 und 60 Wiederholungseinheiten über das Monomer-Initiator-Verhältnis eingestellt (vergleiche Kapitel 3.1.1.1). Anschließend folgte eine Konjugation mit dem eCIP-Derivat. Die resultierenden PAKs wurden auf ihre biozide Aktivität gegen den GRAM-positiven Stamm *S. aureus* und den GRAM-negativen Stamm *E. coli* untersucht. Eine Auftragung der erhaltenen MIC-Werte gegen die Anzahl an Wiederholungseinheiten ist in Abbildung 77 gegeben.

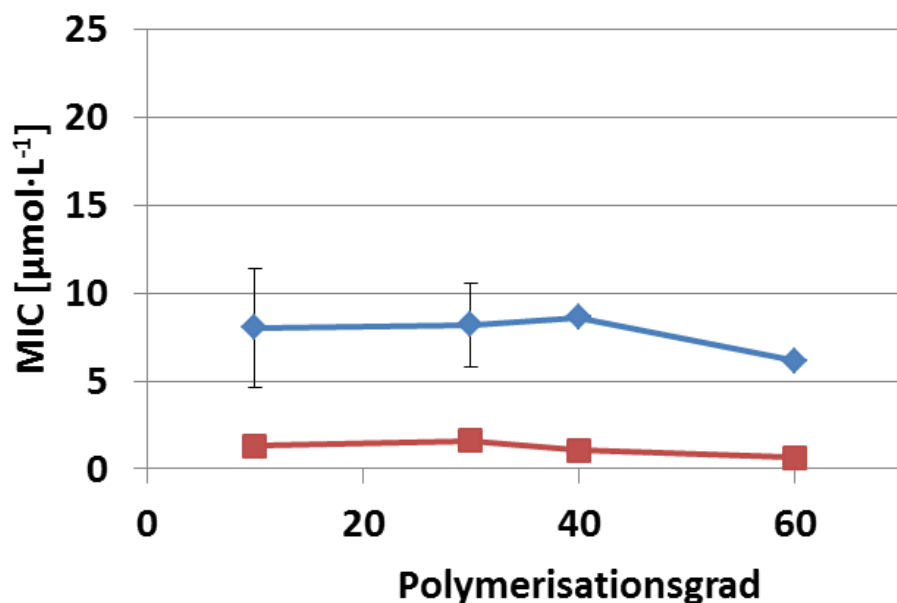


Abbildung 77: MIC-Werte aufgetragen gegen den Polymerisationsgrad für die beiden Bakterienstämme *S. aureus* (blau) und *E. coli* (rot). Die MIC-Werte sind in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ angegeben. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

Im Allgemeinen ist die Aktivität gegen *E. coli* deutlich besser als die gegen *S. aureus*. Unabhängig von der Kettenlänge zeigen die PMeOx-eCIP Konjugate einen MIC-Wert von $0.67 - 1.62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *E. coli* und einen von $6.13 - 8.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. aureus*. Diese Unabhängigkeit ist überraschend, da die Kettenlänge zuvor einen starken Einfluss auf die biozide Wirkung der xCIP-Konjugate ausübte. Dies war vor allem gegen GRAM-positive Bakterien zu beobachten. Die Kettenlängenunabhängigkeit der Aktivität könnte auf eine mögliche Freisetzung des eCIP hinweisen. Dies könnte durchaus möglich sein, da die Amidbindung, die durch die eCIP Derivatisierung eingeführt wurde, labil sein könnte. Im Gegensatz dazu ist die Aminbindung des xCIP deutlich stabiler.

Um die Ergebnisse aus Abbildung 77 zu verifizieren wurde zusätzlich Me-PEtOx₁₀-EDA mit eCIP konjugiert. Anschließend folgte eine Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität gegen *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa*. Abbildung 78 zeigt die erhaltenen MIC-Werte der hergestellten Konjugate. Beide Konjugate weisen exzellente Aktivitäten gegen die getesteten Stämme auf. Wobei auffällig ist, dass das Me-PEtOx₁₀-EDA-eCIP mit $2.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ einen vierfach niedrigeren MIC-Wert als das Me-PMeOx₁₀-EDA-eCIP ($8.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen *S. aureus* aufweist. Für die getesteten GRAM-negativen Stämme sind die Aktivitäten nahezu gleich (*E. coli*: $1.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $0.87 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *K. pneumoniae*: $6.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $5.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, *P. aeruginosa*: $2.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $2.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Ergebnisse und Diskussion

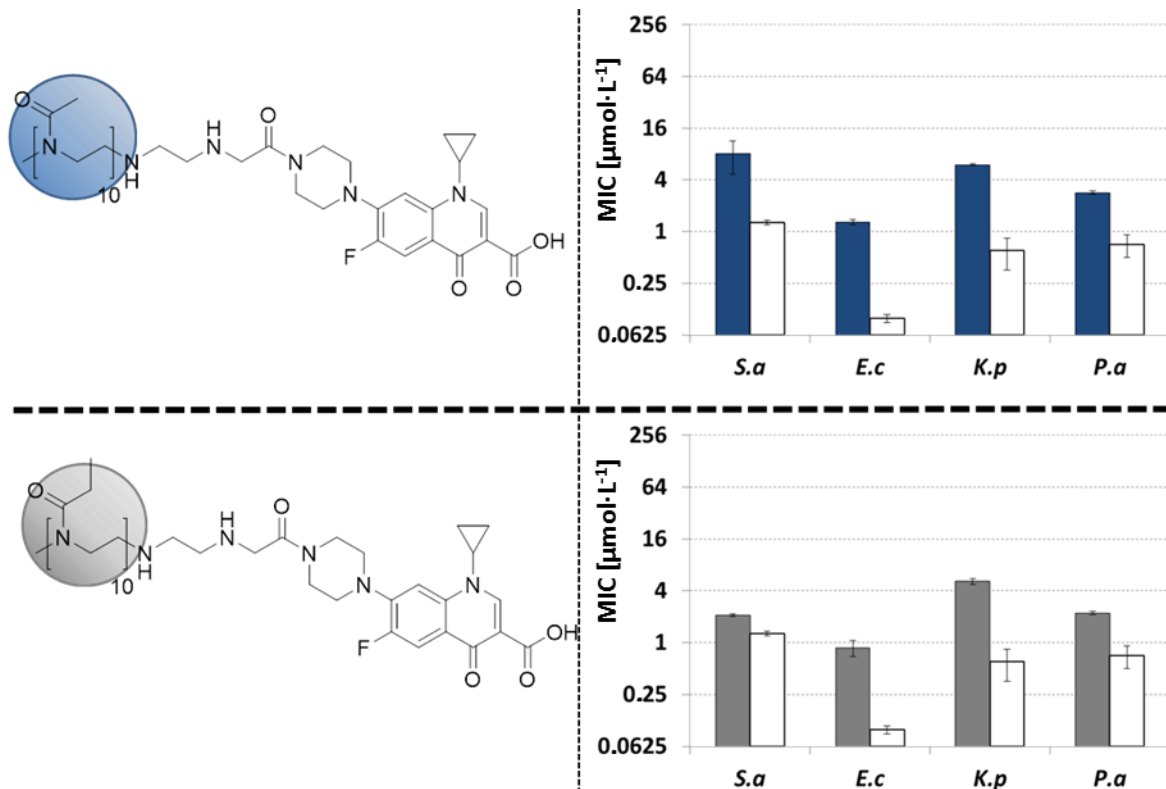


Abbildung 78: MIC-Werte für Me-PMEOx₁₀-EDA-eCIP und Me-PEtOx₁₀-EDA-eCIP gegen die Bakterienstämme *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Im Vergleich dazu die MIC-Werte von CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ein Vergleich mit den entsprechenden Konjugaten mit einer angesetzten Kettenlänge von 30 Wiederholungseinheiten (Kapitel 3.2.4.1) zeigt, dass sowohl die Konjugate mit 10 Wiederholungseinheiten als auch die Konjugate mit 30 Wiederholungseinheiten über die gleiche Aktivität verfügen. Dies bestätigt die zuvor erhaltenen Ergebnisse. Anscheinend besitzt die Kettenlänge und somit das Molekulargewicht keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der eCIP-Konjugate, da das eCIP eine Abspaltung des niedermolekularem CIP ermöglicht.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.4. Einfluss der Polymerendgruppe auf die antimikrobielle Aktivität der eCIP-Konjugate

Wie in Kapitel 3.2.3.6 soll auch für den eCIP-„Spacer“ der Einfluss der Polymerendgruppe untersucht werden. Neben den bereits untersuchten Endgruppen EDA, BDA, HDA, DODA, TREN, TET und TEP wurden zusätzlich ein Konjugat mit einer NH₂-Gruppe und ein Konjugat ohne Polymerendgruppe hergestellt (Siehe Abbildung 79).

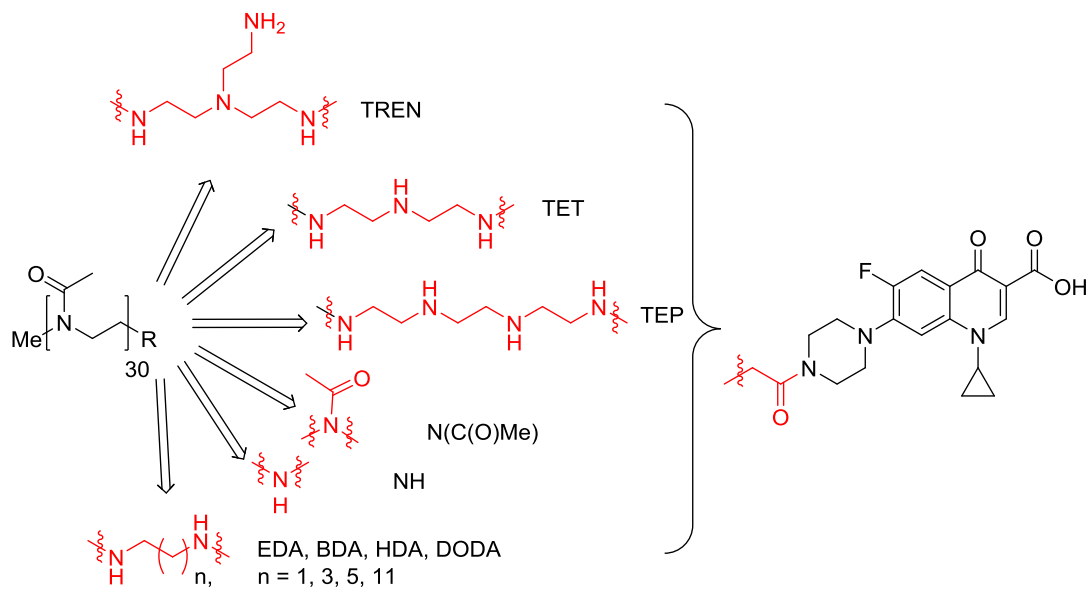


Abbildung 79: Überblick über die verwendeten Polymerendgruppen bei der Synthese von eCIP-Konjugaten auf Basis von PMeOx. Als Endgruppen wurde 1,4-Butylendiamin (BDA), 1,6-Hexylendiamin (HDA), 1,12-Dodecylendiamin (DODA), *N,N*-Bis(2-aminoethyl)ethylendiamin (TREN), Triethylentetramin (TET) und Tetraethylenpentamin (TEP) verwendet. Außerdem wurden ein Konjugat mit NH₂- und ein Konjugat ohne Polymerendgruppe hergestellt.

Für alle Amin-terminierten Polymere konnten die Reaktionsbedingungen beibehalten werden. Die Reaktion wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Die ermittelten Daten aus den Spektren sind in Tabelle 12 dargestellt. Die ¹H-NMR-Spektren selbst sind im Anhang abgebildet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Überblick über die hergestellten eCIP-Konjugate mit verschiedenen Polymerendgruppen.

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _n [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
Me-PMeOx ₃₁ -BDA-eCIP	30	31	3100	60%
Me-PMeOx ₅₄ -HDA-eCIP	30	54	5000	90%
Me-PMeOx ₄₃ -DODA-eCIP	30	43	4200	99%
Me-PMeOx ₂₃ -TREN-eCIP	30	23	2500	99%
Me-PMeOx ₃₅ -TET-eCIP	30	35	3500	71%
Me-PMeOx ₃₅ -TEP-eCIP	30	35	3500	61%
Me-PMeOx ₂₈ -eCIP	30	28	2800	90%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Das Konjugat Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP wurde durch eine Acetylierung des Me-PMeOx-EDA-eCIP gewonnen. Bei der Umsetzung mit Acetylchlorid wurden die sekundären Amine der Polymerendgruppe des Me-PMeOx-EDA-eCIP in Amidfunktionen umgewandelt (siehe Abbildung 80).

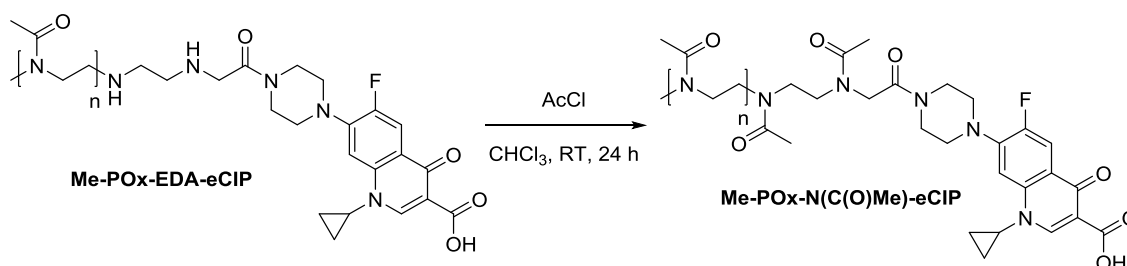


Abbildung 80: Synthese von Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP.

Durch die Umwandlung der sekundären Amine der EDA Gruppe in Amid-Funktionen sind die Signale der EDA-Gruppe nicht mehr im ¹H-NMR-Spektrum zu identifizieren (Vergleich Abbildung 81). Die neuen Amid-Signale sind durch ihre ähnliche Verschiebung wie das Polymerrückgrat nicht mehr separat zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussion

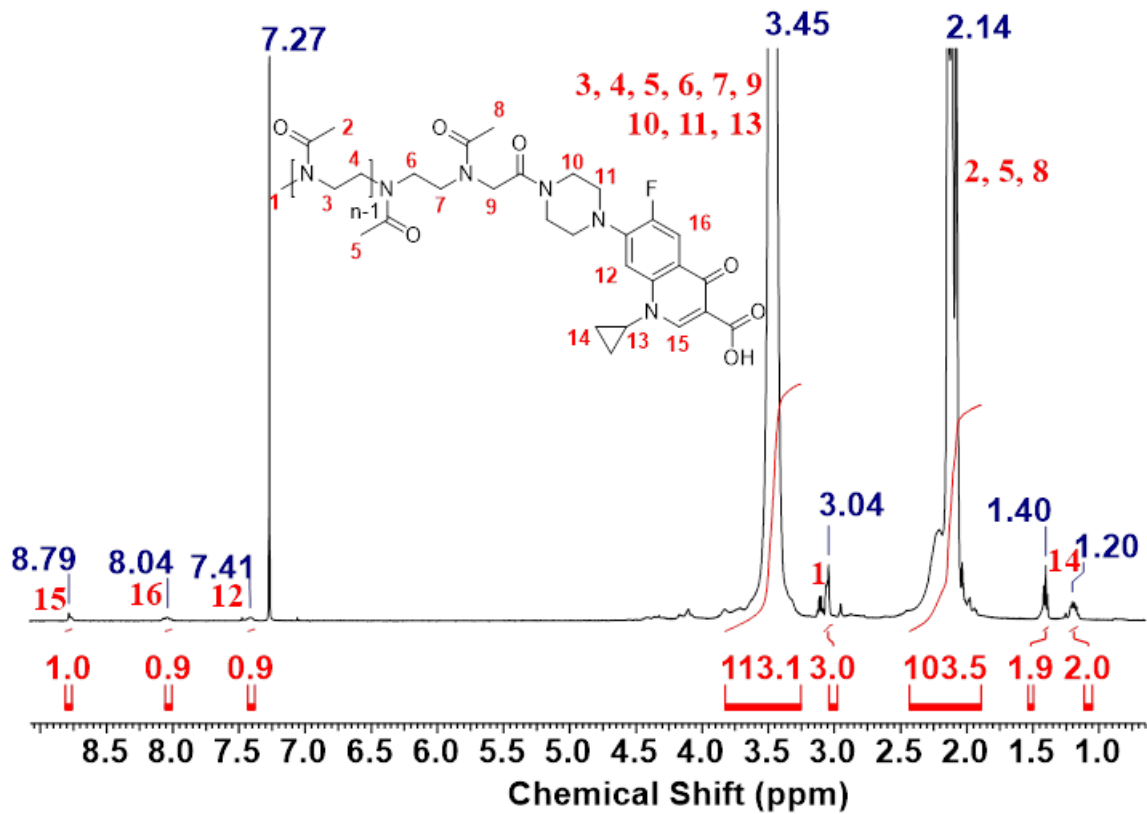
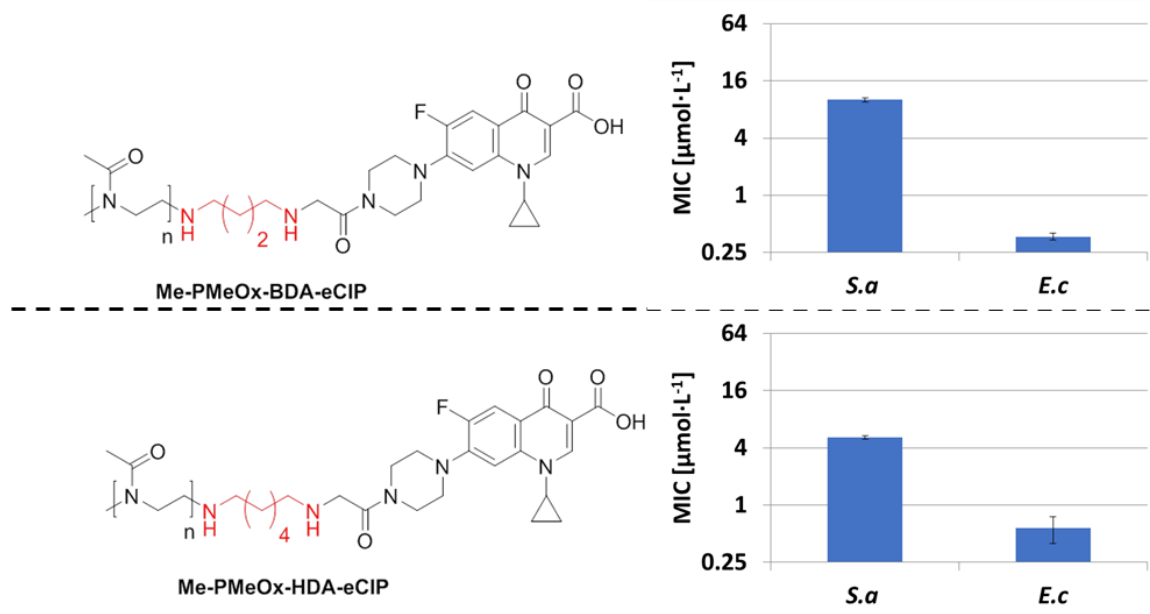
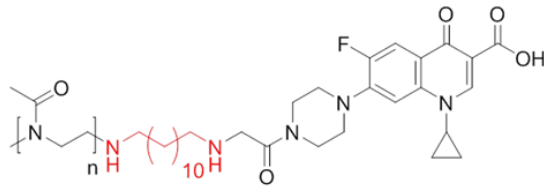


Abbildung 81: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP.

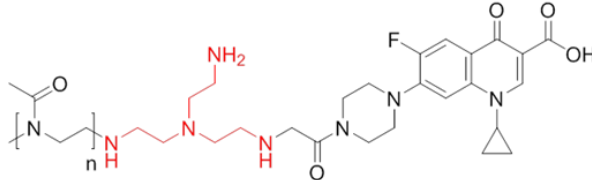
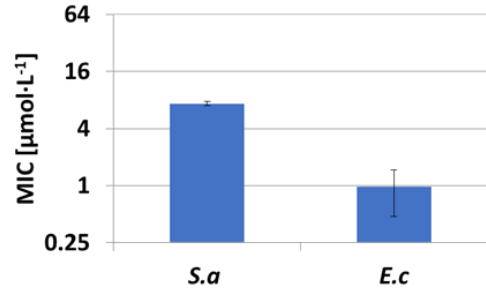
Die Ermittlung der MIC-Werte erfolgte wieder anhand der Bakterienstämme *S. aureus* und *E. coli*. Die Ergebnisse sind in Abbildung 82 wiedergegeben.



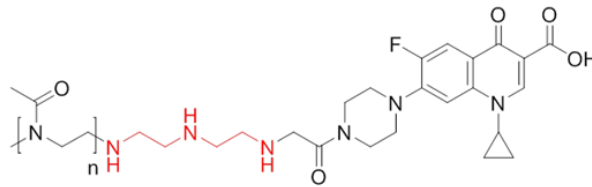
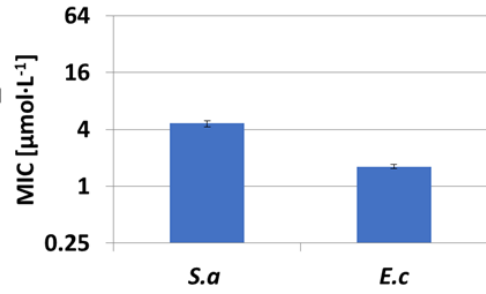
Ergebnisse und Diskussion



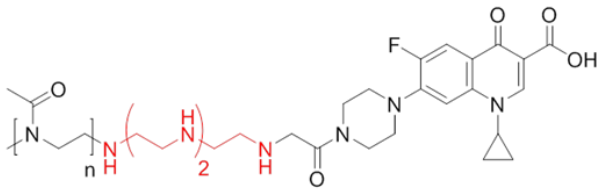
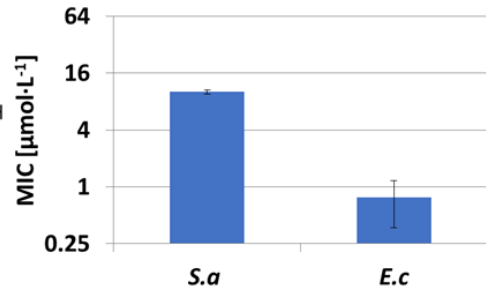
Me-PMeOx-DODA-eCIP



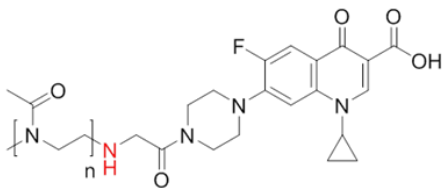
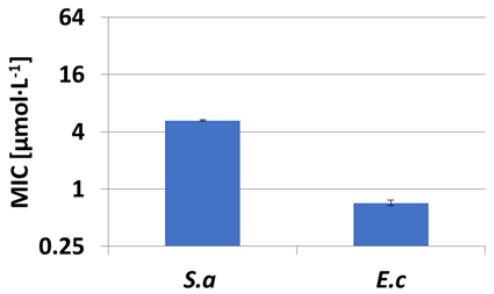
Me-PMeOx-TREN-eCIP



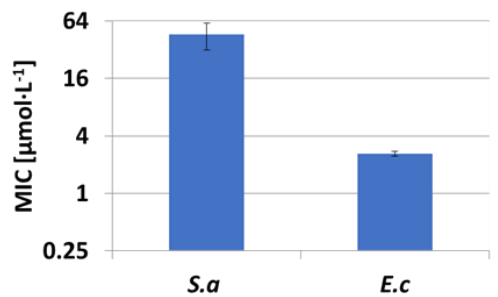
Me-PMeOx-TET-eCIP



Me-PMeOx-TEP-eCIP



Me-PMeOx-NH-eCIP



Ergebnisse und Diskussion

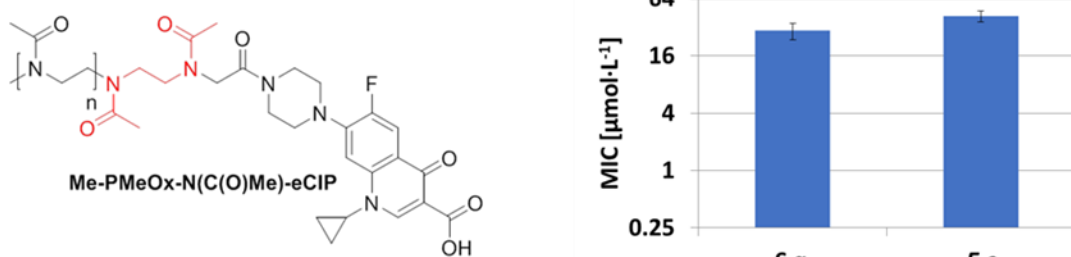


Abbildung 82: MIC-Werte der Konjugate Me-PMeOx-BDA-eCIP, Me-PMeOx-HDA-eCIP, Me-PMeOx-DODA-eCIP, Me-PMeOx-TREN-eCIP, Me-PMeOx-TET-eCIP, Me-PMeOx-TEP-eCIP, Me-PMeOx-NH-eCIP, Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die meisten der gezeigten Konjugate weisen eine deutlich bessere Aktivität gegen *E. coli* als gegen *S. aureus* auf. Einzige Ausnahme ist das Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP. Hier ist die Aktivität für *S. aureus* besser als gegen *E. coli*. Das Me-PMeOx-NH-eCIP besitzt mit $2.60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($7.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) einen exzellenten MIC-Wert gegen *E. coli* aber mit $46.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($139 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) nur eine gute Aktivität gegen *S. aureus*, die damit deutlich niedriger als die der restlichen Konjugate ist. Diese weisen im Wesentlichen eine vergleichbare Aktivität auf, welche für *S. aureus* zwischen $4.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $10.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ schwankt und für *E. coli* zwischen $0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und $1.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Dabei ist das Me-PMeOx-TREN-eCIP mit $4.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ das effektivste Konjugat gegen den GRAM-positiven Keim und Me-PMeOx-BDA-eCIP mit $0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ das aktivste Konjugat gegen *E. coli*. Ein Vergleich mit Me-PMeOx-EDA-eCIP ($10.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *S. aureus* und $1.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *E. coli*) zeigt, dass keine der neuen Polymerendgruppen zu einer wirklichen Verbesserung der Aktivität führt. Anscheinend spielt die Polymerendgruppe nur eine zweitrangige Rolle bei der Aktivität der eCIP-Konjugate. Allerdings zeigen die Konjugate mit einem sehr kurzen „Spacer“ wie Me-PMeOx-N(C(O)Me)-eCIP und Me-PMeOx-NH-eCIP sowie die Konjugate ohne „Spacer“ (siehe HARMUTH)¹³⁸ geringe Aktivitäten. Dieses Ergebnis und die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.4.3 weisen auf eine Spaltung des eCIP-„Spacers“ hin. Dies würde auch erklären, wieso die antimikrobielle Aktivität nur schwach vom Molekulargewicht und der Polymerendgruppe beeinflusst wird. Dabei erfolgt die Spaltung des „Spacers“ bei allen Konjugaten mit Diamin-Gruppen,

Ergebnisse und Diskussion

wodurch all diese Konjugate eine vergleichbare Aktivität aufweisen. Dies würde auch die deutlich bessere Aktivität (3-30 mal) gegen *E. coli* im Vergleich zu *S. aureus* erklären, da auch das unmodifizierte CIP 10 mal aktiver gegen *E. coli* wirkt. Bei Konjugaten die keine Diamin-Gruppe enthalten, scheint keine Spaltung des eCIP-„Spacers“ aufzutreten. Dies lässt vermuten, dass die Spaltung des eCIP-„Spacers“ enzymatisch erfolgt und die Diamin-Einheit als Bindungsstelle für das Enzym dient.

3.2.5. Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels pCIP

Im Vergleich zu den bisher behandelten „Spacern“ eCIP und xCIP wurde pCIP nicht mittels polymeranaloger Substitution sondern durch eine Direktterminierung eingeführt. Die Terminierung erfolgte bei 45 °C in Chloroform. Die Analyse des Konjugats mittels ¹H-NMR-Spektroskopie zeigt alle erwarteten Signale, die der Zielstruktur entsprechen. Zudem kann mit dem Initiatorsignal (**1**) und den Signalen des Polymerrückgrats (**3**, **4** und **2**) eine Wiederholungseinheit von 23 Monomereinheiten bestimmt werden. Neben den aromatischen CIP Signalen im Tieffeldbereich (**11**, **15** und **16**) sind auch die typischen Signale des Cyclopropylrings (**13**, **14**) bei 1.22-1.42 ppm sichtbar. Darüber hinaus sind auch die Methylengruppen der Propylkette des pCIPs (**5**, **6**, **7**) zu erkennen. Mit Hilfe dieser Signale und dem Integral der Initiatorprotonen (**1**) kann ein Funktionalitätsgrad von 99% bestimmt werden. Das Spektrum ist in Abbildung 83 gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

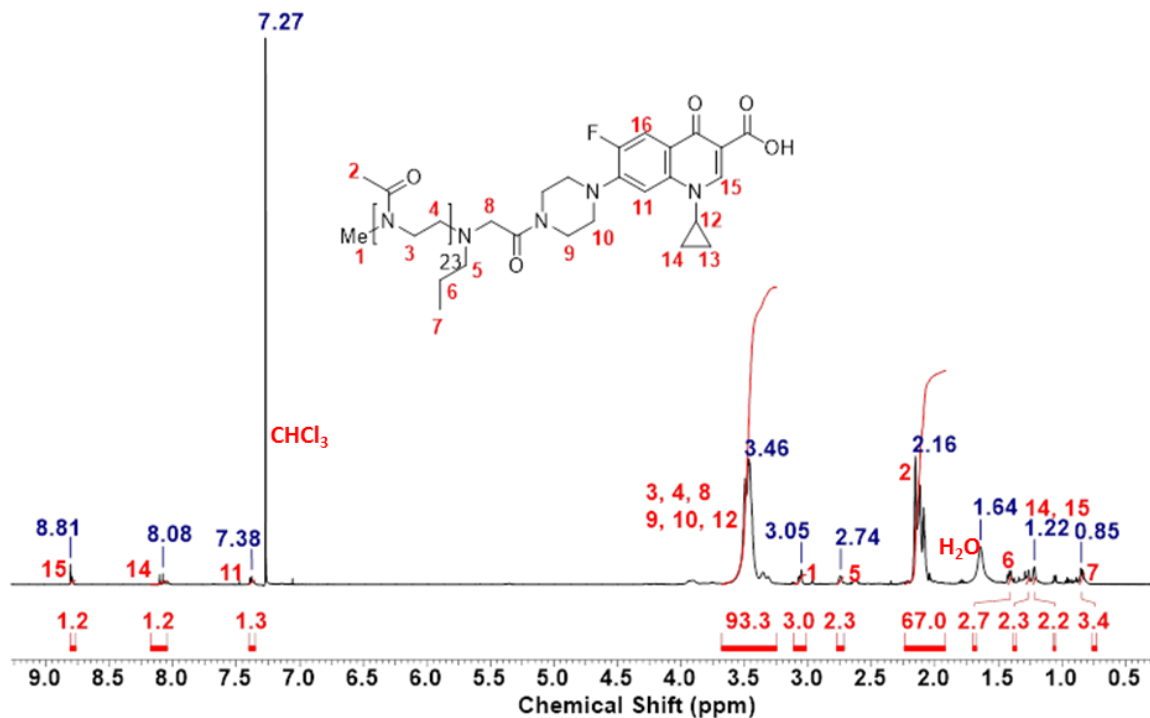


Abbildung 83: ¹H-NMR-Spektrum des Me-PMeOx₂₃-pCIP in CDCl₃ (7.27 ppm).

Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität ist in Abbildung 84 gezeigt. Das Me-PMeOx₂₃-pCIP zeigt für alle Bakterien eine exzellente Aktivität. Diese Aktivität ist auf demselben Niveau oder sogar besser als das des zuvor getesteten Me-PMeOx₃₇-EDA-eCIP. Für *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* sind die MIC-Werte nahezu identisch, im Fall von *E. coli* und *S. aureus* sind diese aber mit 0.33 μmol·L⁻¹ und 0.45 μmol·L⁻¹ deutlich niedriger. Gegen *E. coli* scheint das Me-PMeOx-pCIP das bisher aktivste Konjugat zu sein, welches sogar fast auf einem Niveau mit dem niedermolekularen CIP liegt. Zudem fällt auf, dass das pCIP durch die Konjugation mit PMeOx an Aktivität gewinnt, denn das Konjugat besitzt eine merklich bessere Aktivität als der unkonjugierte „Spacer“ (Vergleiche 3.2.2).

Ergebnisse und Diskussion

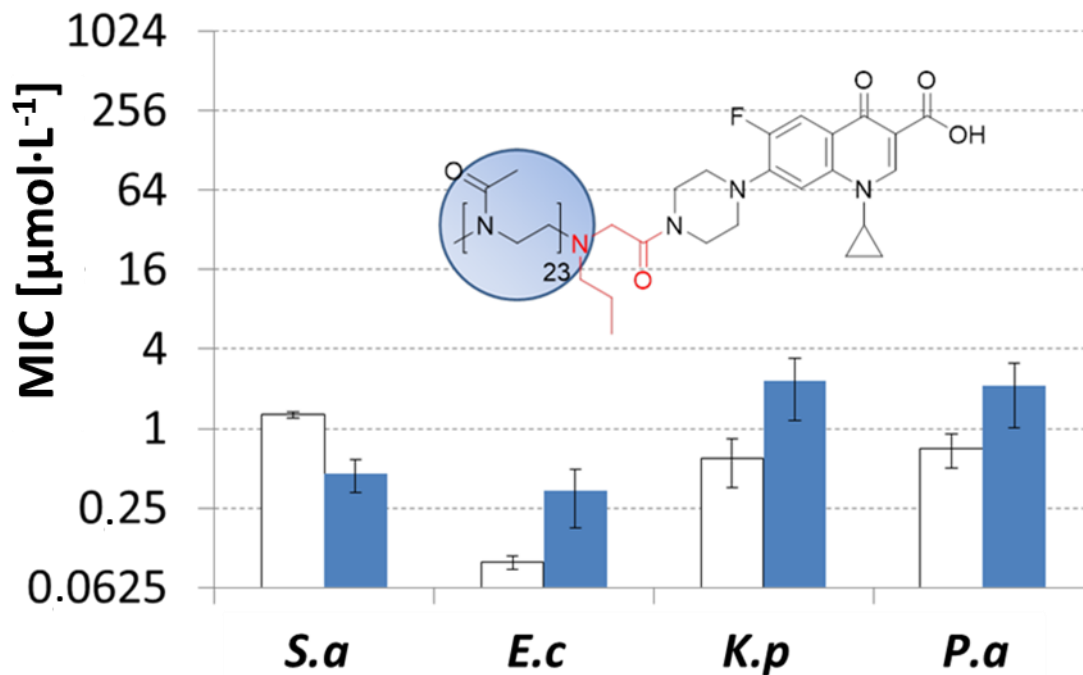


Abbildung 84: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für die Konjugate Me-PMeOx-EDA-peCIP (blau) und von CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.2.5.1. Einfluss des Polymerrückgrats auf die antimikrobielle Aktivität der pCIP-Konjugate

Die Synthese von pCIP-Konjugaten mit PEtOx und PiPrOx als Polymerrückgrat konnten mit einer Erhöhung der Terminierungstemperatur auf 90 °C mit Funktionalisierungsgraden von 80 bis 99% durchgeführt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Überblick über die hergestellten pCIP-Konjugate.

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _n [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
Me-PMeOx ₃₂ -pCIP	30	23	2400	99%
Me-PEtOx ₂₈ -pCIP	30	28	3200	80%
Me-PiPrOx ₂₈ -pCIP	30	28	3600	99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Ergebnisse und Diskussion

Die MIC-Werte dieser Konjugate gegen *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* sind in Abbildung 85 dargestellt. Das Me-PEtOx₃₀-pCIP und Me-PiPrOx₃₀-pCIP zeigen im Vergleich zum Me-PMeOx₂₃-pCIP deutlich schlechtere MIC-Werte. Dabei scheint die Konjugation mit PEtOx zu einer stärkeren Erniedrigung der Aktivität zu führen als die Konjugation mit PiPrOx. Dies wird vor allem beim Vergleich der Aktivitäten gegen *S. aureus* deutlich. Während Me-PiPrOx-pCIP mit 0.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zwar einen doppelt so hohen MIC-Wert hat wie Me-PMeOx-pCIP mit 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ist es immer noch aktiver als das niedermolekulare CIP (1.28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Im Gegensatz zum Me-PEtOx₃₀-pCIP, weist dieses Konjugat einen MIC-Wert von 10.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf, wodurch die Aktivität des Konjugats mehr als 23-mal niedriger als die von Me-PMeOx₂₃-pCIP ist. Im Fall des pCIP-„Spacers“ scheint die Kombination mit PMeOx die aktivsten PAKs zu liefern.

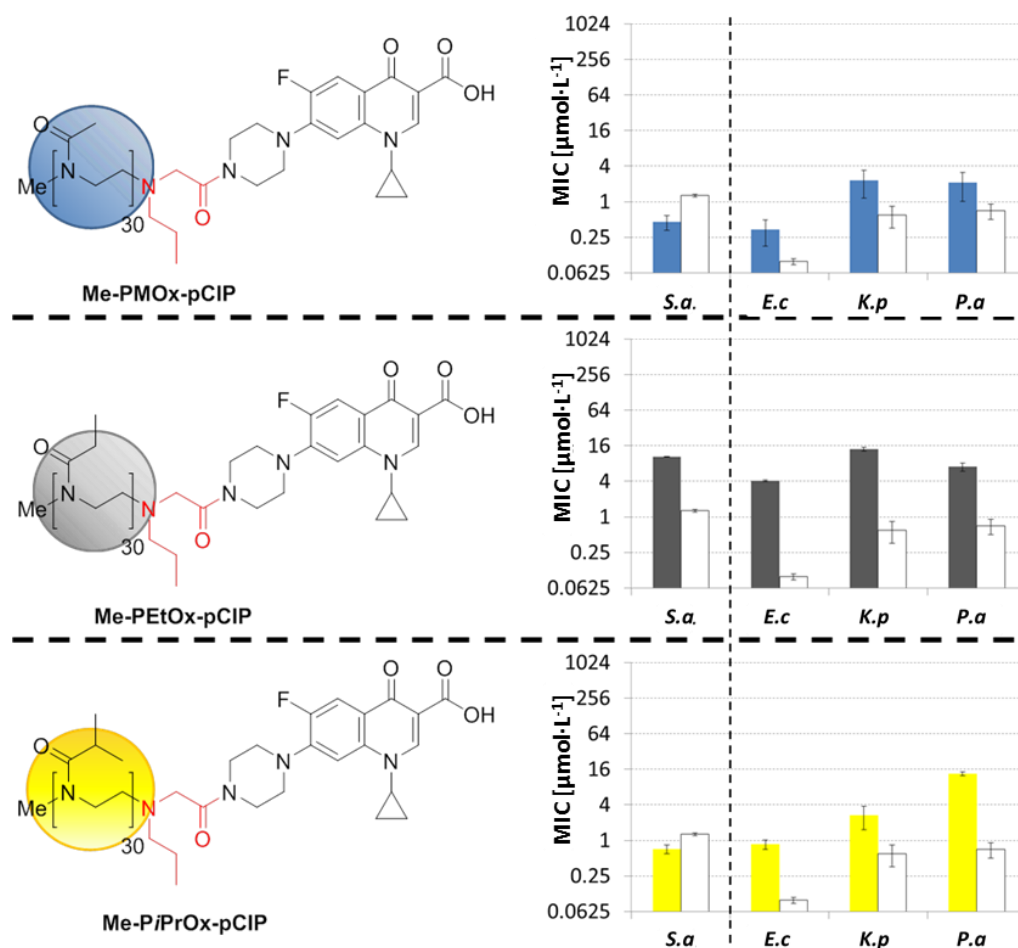


Abbildung 85: MIC-Werte ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) von Me-PEtOx-pCIP, Me-PiPrOx-pCIP und Me-PMeOx-pCIP. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.6. Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate mittels peCIP

Als letzter „Spacer“ soll nun der peCIP-„Spacer“ vorgestellt werden, dieser wurde wie der eCIP- und der xCIP-„Spacer“ mit einem EDA terminierten PMeOx umgesetzt. Dabei konnte wieder die zuvor verwendeten Bedingungen angewendet werden. Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt in erster Linie alle erwarteten Signale. Zudem weist das Spektrum auf eine nicht vollständige Konjugation hin. Nur 56% aller Polymerendgruppen sind mit einer peCIP Gruppe funktionalisiert. Des Weiteren kann eine Kettenlänge von 35 Wiederholungseinheiten bestimmt werden (Abbildung 86).

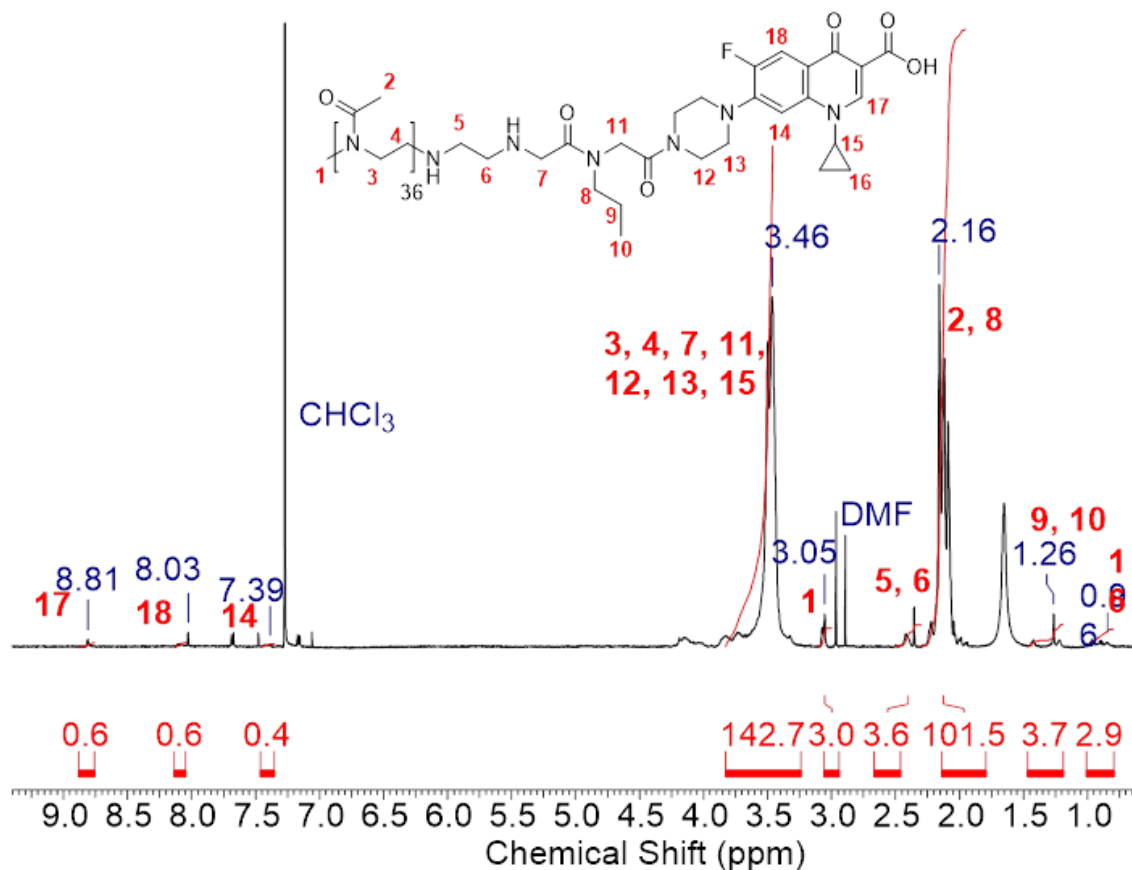


Abbildung 86: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeOx-EDA-peCIP in CDCl_3 (7.27 ppm).

Die Untersuchung der MIC-Werte des Me-PMeOx₃₅-EDA-peCIP ist in Abbildung 87 gezeigt. Am auffälligsten ist, dass das Konjugat Me-PMeOx₃₂-EDA-peCIP deutlich höhere MIC-Werte als das Me-PMeOx-pCIP besitzt. Im Fall der GRAM-negativen Bakterien liegt

Ergebnisse und Diskussion

der MIC-Wert ungefähr bei $16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und zeigt damit schlechtere Aktivitäten als die zuvor getesteten eCIP und pCIP Konjugate. Im Fall von *S. aureus* zeigt das Me-PMeOx-EDA-peCIP die bisher schlechteste Aktivität. Im Vergleich mit Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP weist das peCIP-Konjugat eine höhere Aktivität gegen *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* auf, aber dafür auch eine deutlich schlechtere antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus* und *E. coli*.

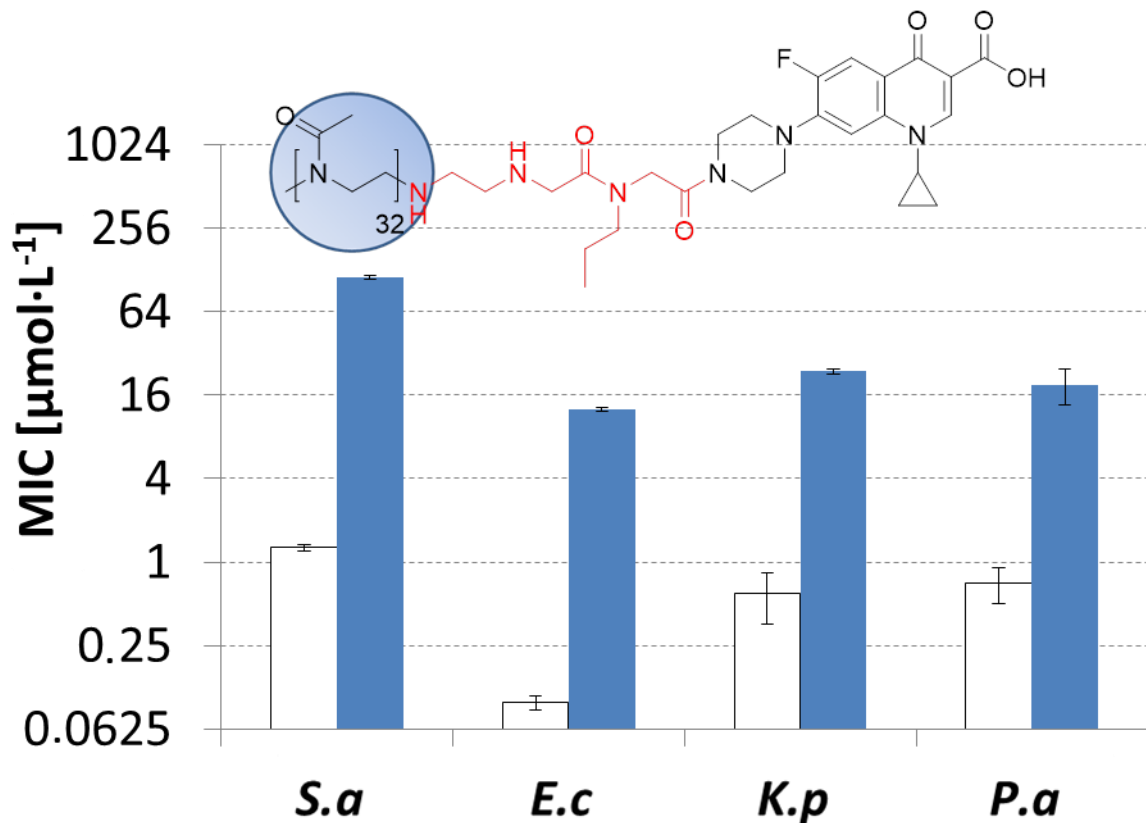


Abbildung 87: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für Me-PMeOx₃₂-EDA-peCIP (blau) und CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.6.1. Einfluss des Polymerrückgrats auf die antimikrobielle Aktivität der peCIP-Konjugate

Um auch bei den peCIP-Konjugaten den Einfluss des Polymerrückgrats zu untersuchen, wurden die Polymere Me-PEtOx-EDA und Me-PiPrOx-EDA ebenfalls mit peCIP konjugiert. (Vergleich Tabelle 14).

Tabelle 14: Überblick über die hergestellten peCIP-Konjugate.

Polymer	DP _{Set}	DP _{NMR} [*]	M _n [g·mol ⁻¹]	F ^{d**}
Me-PMeOx ₃ -pCIP	30	23	2400	99%
Me-PEtOx ₂₈ -pCIP	30	28	3200	80%
Me-PiPrOx ₂₈ -pCIP	30	28	3600	99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Die peCIP-Konjugate zeigen bei einem Austausch des PMeOx Polymerrückgrats gegen PEtOx eine Verschlechterung der MIC-Werte. Die einzige Ausnahme bildet *S. aureus*. Hier konnte eine leichte Verbesserung beobachtet werden von 113 auf 64 µmol·L⁻¹. Der Austausch von PMeOx gegen PiPrOx hingegen zeigt eine gleichbleibende oder in einigen Fällen sogar eine bessere Aktivität. Im Fall von *S. aureus* und *E. coli* wird die Aktivität fast um das Vierfache verbessert. Die Aktivität steigt in der Reihenfolge PEtOx<PMeOx<PiPrOx. Auch hier zeigt sich wieder, dass ein synergistischer Effekt zwischen Polymerrückgrat und CIP-„Spacer“ vorliegt. Im Falle des peCIPs scheinen Konjugate auf Basis von PiPrOx die aktivsten Verbindungen zu liefern (Abbildung 88). Anscheinend führt eine Peptoidstruktur im „Spacer“ zu einer Verringerung der antimikrobiellen Aktivität der Konjugate.

Ergebnisse und Diskussion

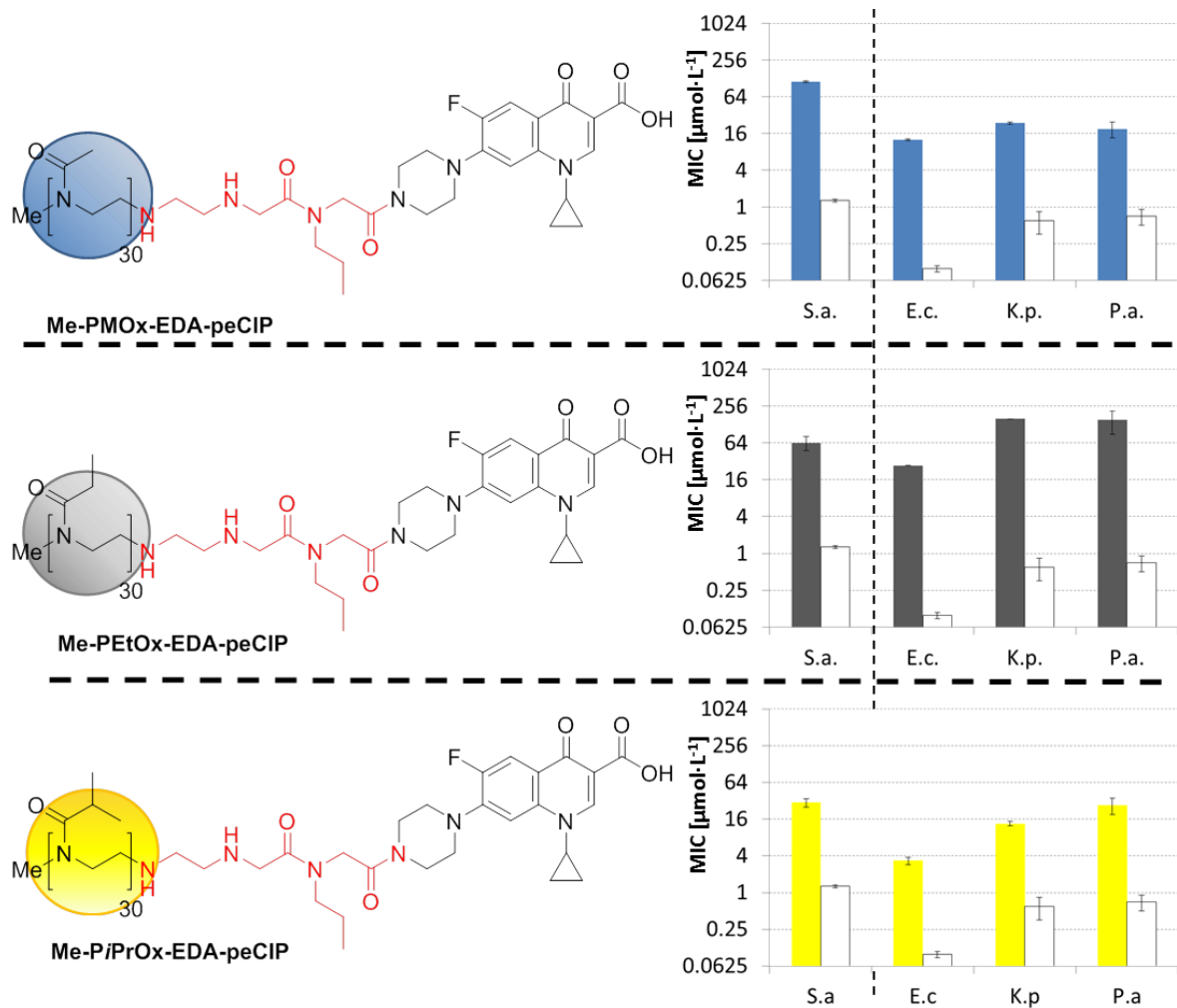


Abbildung 88: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ von Me-PEtOx-EDA-peCIP (grau), Me-PiPrOx-EDA-peCIP (gelb) und Me-PMeOx-EDA-peCIP (blau) sowie die MIC-Werte des CIP (weiß). Alle Messungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.2.7. Amphiphile Ciprofloxacin-Konjugate

Amphiphile Polymere sind aufgrund ihrer amphiphilen Natur in der Lage Mizellen oder andere Aggregate zu bilden. Diese supramolekularen Strukturen könnten einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Konjugate ausüben und diese schaltbar machen. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden eCIP- und xCIP-Konjugate mit amphiphilem Polymerrückgrat hergestellt und die antimikrobielle Aktivität und die kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *Critical Micell Concentration*, CMC) untersucht. Für

Ergebnisse und Diskussion

die Synthese der amphiphilen CIP-Konjugate wurden die amphiphilen Diblockcopolymer aus Kapitel 3.1.2 mit xCIP und eCIP konjugiert. Die Konjugation verlief dabei analog zu den zuvor beschriebenen Konjugaten. Ein Beispiel für ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Diblockcopolymer-Konjugats ist in Abbildung 89 gezeigt. Die erhaltenen Signale können der Konjugat-Struktur zugeordnet werden. Im Spektrum sind die Signale für die Protonen des Initiators (**1**) sowie die Signale für die Monomereinheiten PMeOx (**2-4**) und PHepOx (**5-12**) zu identifizieren. Darüber hinaus sind die Signale der aromatischen CIP Protonen zu erkennen. Weitere Signale des CIP sowie die Signale des EDA werden vom Polymerrückgrat überlagert.

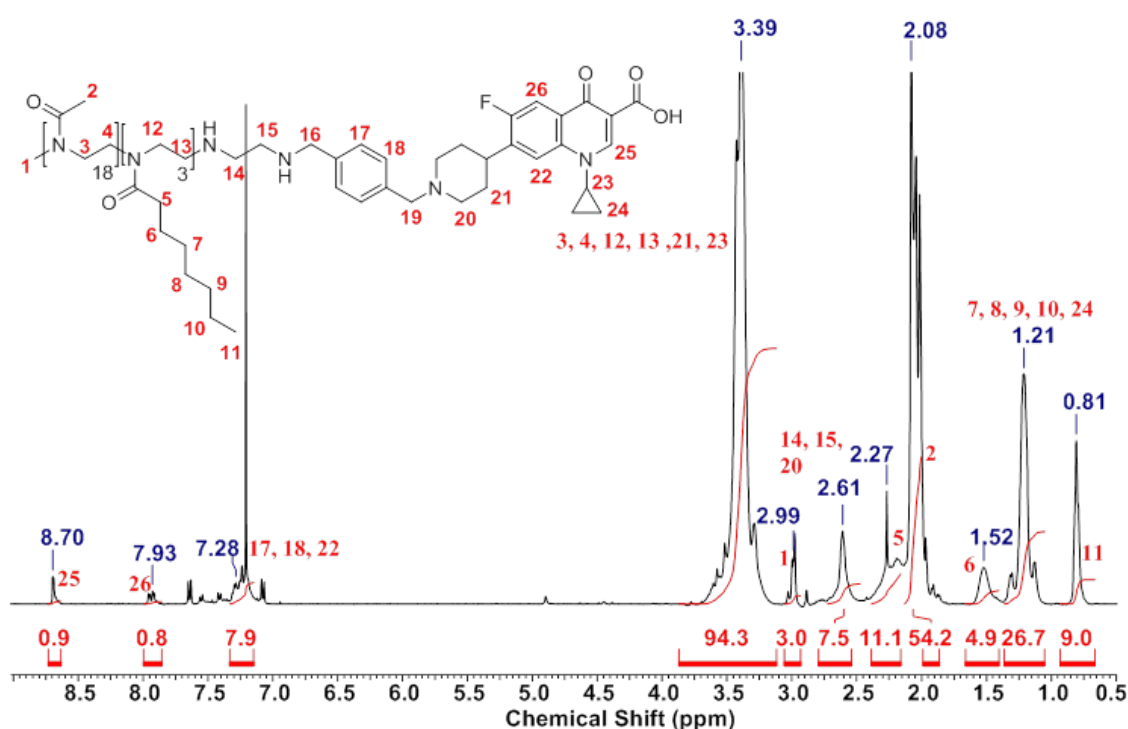


Abbildung 89: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Me-MeOx₁₈-PHepOx₃-EDA-xCIP (CHCl_3 , 7.27 ppm).

Die Größe des PMeOx Blocks kann auf 18 Wiederholungseinheiten und die des PHepOx Blocks auf drei ermittelt werden. Zudem kann mit Hilfe der CIP Signale ein Funktionalitätsgrad von 90% bestimmt werden. Die Spektren der anderen eCIP und xCIP Diblockcopolymer-Konjugate sind im Anhang gezeigt. Eine Zusammenfassung dieser Konjugate ist in Tabelle 15 gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Zusammenfassung der Konjugation der Diblockcopolymeren mit eCIP und xCIP.

Polymer	DP*	HepOx [Gew.%]	M _n [g·mol ⁻¹]	F [%] ^d	Endgruppe**
Me-MeOx ₂₈ -PHepOx ₄ -EDA-eCIP	28/4	22	3100	50	eCIP
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₆ -EDA-eCIP	18/6	40	2500	30	eCIP
Me-MeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ -EDA-eCIP	15/12	61	3300	80	eCIP
Me-MeOx ₈ -PHepOx ₂₂ -EDA-eCIP	8/22	97	4400	99	eCIP
Me-PHepOx ₂₃ -EDA-eCIP	0/23	100	3700	99	eCIP
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₃ -EDA-xCIP	18/3	25	2000	90	xCIP
Me-MeOx ₁₉ -PHepOx ₇ -EDA-xCIP	19/7	42	2800	90	xCIP
Me-MeOx ₁₄ -PHepOx ₁₁ -EDA-xCIP	14/11	60	3000	99	xCIP
Me-MeOx ₈ -PHepOx ₁₄ -EDA-xCIP	8/14	78	3000	99	xCIP
Me-PHepOx ₂₂ -EDA-xCIP	0/22	100	3400	80	xCIP

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Zunächst wurde die antimikrobielle Aktivität der amphiphilen Konjugate untersucht. Die erhaltenen MIC-Werte der einzelnen Konjugate gegen *S. aureus* und *E. coli* sind in Abbildung 90 gezeigt. Die Aktivitäten für die Diblockcopolymer-eCIP-Konjugate sind für beide Bakterien nahezu identisch. Sie unterscheiden sich lediglich um eine Verdünnungsstufe. Zudem zeigen die Konjugate zwischen 22-97 Gew.% HepOx-Anteil mit einer Aktivität zwischen 2.65-14.6 µg·mL⁻¹ für *S. aureus* und 4.53-14.6 µg·mL⁻¹ für *E. coli* ähnliche Aktivitäten. Das reine PHepOx Polymer weist einen leicht höheren MIC-Wert für *E. coli* im Vergleich zu den Copolymeren auf. Diese liegen mit 35 µg·mL⁻¹ über den MIC-Werten der Copolymeren. Jedoch sind die MIC-Werte für das reine HepOx-Konjugat ebenso wie für das Konjugat mit 97 Gew.% HepOx-Anteil niedriger als erwartet, da diese Konjugate nur schlecht wasserlöslich sind. Anscheinend müssen die PAKs nur fein in der Lösung suspendiert sein um ihre antimikrobielle Wirkung zu entfalten.

Ergebnisse und Diskussion

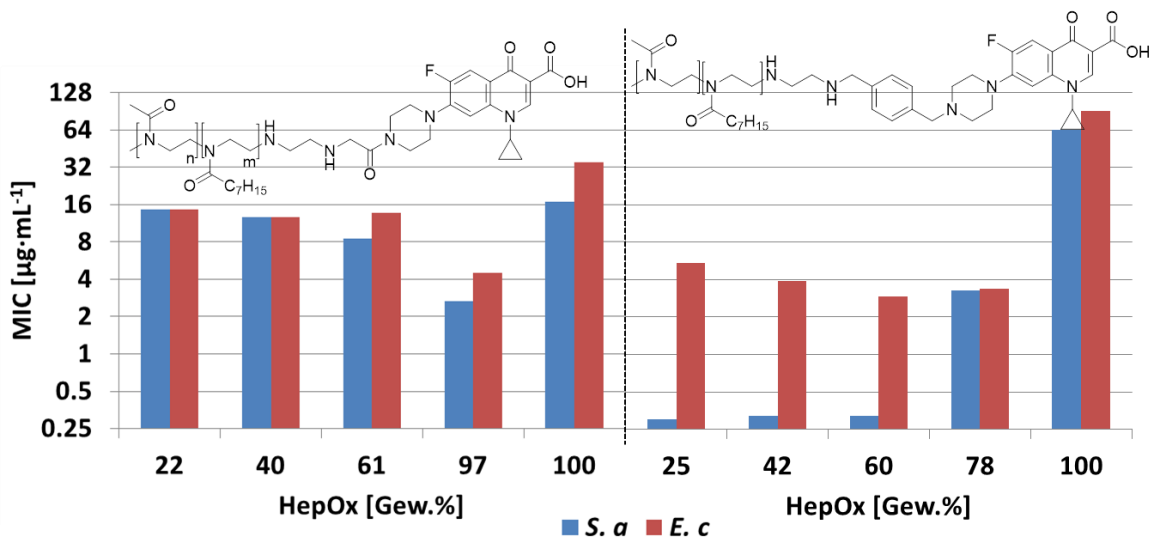


Abbildung 90: MIC-Werte der Diblockcopolymer-Konjugate gegen *S. aureus* und *E. coli*. Links sind die MIC-Werte der eCIP Konjugate und rechts der xCIP Konjugate gezeigt.

Die xCIP Diblockcopolymer-Konjugate zeigen ein leicht anderes Bild. Die wasserlöslichen Konjugate bis zu einem HepOx-Anteil von 61 Gew.% weisen sie eine deutlich bessere Aktivität gegen *S. aureus* als gegen *E. coli* auf. Die Aktivität liegt für *S. aureus* zwischen $0.27\text{-}0.32\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0.09\text{-}0.12\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) und ist damit sogar deutlich höher als die des unveränderten PMeOx-xCIP-Konjugats. Im Vergleich zum niedermolekularen CIP ($1.29\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sind diese Konjugate fast 10-mal aktiver. Das bedeutet, dass ein amphiphiles Polymerrückgrat die Aktivität gegen *S. aureus* stark begünstigt. Auch gegen *E. coli* weisen diese Konjugate mit $2.91\text{-}4.92\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0.91\text{-}2.30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) eine bessere Aktivität auf als das reine PMeOx Konjugat. Ab einem HepOx-Anteil von 78 Gew.% zeigt die Konjugate eine Verschlechterung der Aktivität. Das Konjugat mit 78 Gew.% PHepOx besitzt einen MIC-Wert von $5.92\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und befindet sich somit auf demselben Niveau wie das reine PMeOx-xCIP-Konjugat. Dieser MIC-Wert ist nur ein zwanzigstel so hoch, wie die der Konjugate mit einem geringeren HepOx-Anteil. Das reine Me-PHepOx-EDA-xCIP besitzt im Vergleich zu den anderen gezeigten xCIP-Konjugaten deutlich höhere MIC-Werte. Diese befinden sich aber immer noch in einem sehr guten Bereich und sind etwas niedriger als die MIC-Werte vom eCIP Pendant. Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität, dass die hier hergestellten Konjugate trotz HepOx-Blockes über eine antimikrobielle Aktivität verfügen. Die xCIP Konjugate besitzen

Ergebnisse und Diskussion

mit einem HepOx-Anteil unter 61 Gew.% sogar eine bessere Aktivität gegen *S. aureus* als CIP.

Für die Bestimmung der CMC wurde eine wässrige Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs 6-(p-Toludino)-2-naphthalinsäure (0.2 μM) verwendet. Eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Konjugate wurde erstellt, wobei die Konzentration mit jedem Schritt halbiert wurde. Die Verdünnungsreihe wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht, dabei wies der Anstieg der Emissionsintensität bei 415 nm auf die Bildung von Mizellen hin, da der Fluoreszenzfarbstoff nur in hydrophober Umgebung, also in Mizellen fluoresziert. Die CMC wurde durch Interpolation der Messwerte erhalten und für ausgewählte Konjugate untersucht (Tabelle 16). An dieser Stelle soll erwähnt sein, dass Konjugate mit einem höheren HepOx-Anteil als 61 Gew.% nicht in Wasser löslich waren und daher für diese Konjugate keine CMC bestimmt werden konnte.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Konjugation der Diblockcopolymeren mit eCIP und xCIP.

Polymer	CMC [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Me-MeOx ₂₈ -PHepOx ₄ -EDA-eCIP	13.5
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₆ -EDA-eCIP	5.0
Me-MeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ -EDA-eCIP	4.8
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₃ -EDA-xCIP	6
Me-MeOx ₁₉ -PHepOx ₇ -EDA-xCIP	3.2
Me-MeOx ₁₄ -PHepOx ₁₁ -EDA-xCIP	2.5

Die in Tabelle 16 gezeigten CMCs für die eCIP- Konjugate befinden sich alle auf einem ähnlichen Niveau wie die MIC-Werte gegen *S. aureus* und *E. coli*. Im Fall der amphiphilen xCIP-Konjugate zeigt sich ein anderes Bild. Hier liegen die CMCs und die MIC-Werte gegen *E. coli* im gleichen Größenbereich. Für *S. aureus* ist die CMC 10-20-fach höher als die entsprechenden MIC-Werte. Dies bedeutet, dass die CMC keinen Einfluss auf die MIC-Werte ausübt und die Konjugate trotz Mizellbildung eine antimikrobielle Aktivität besitzen. Die Aktivität der Konjugat-Mizellen könnte durch eine Spaltung des CIP-„Spacer“ verursacht werden. Um dies auszuschließen wurden die Konjugate mit NaOH

Ergebnisse und Diskussion

Diese Ergebnisse weisen im Fall von xCIP auf eine Aktivität der Mizellen hin und nicht auf eine Freisetzung der CIP Endgruppe. Für eCIP bestätigt die Untersuchung die zuvor vermutete Labilität des eCIP-„Spacers“. Weitere Untersuchungen des eCIP-Konjugats Me-MeOx₁₅-PHepOx₁₂-EDA-eCIP mit Lipase zeigten, dass die Aktivität sich in Anwesenheit des Enzyms (2 mg·mL⁻¹) verbessern. So besitzt das Konjugat gegen *S. aureus* einen MIC –Wert von 8.56 µg·mL⁻¹ in Abwesenheit und einen MIC-Wert von 1.50 µg·mL⁻¹ in Anwesenheit von Lipase. Dies entspricht einer Verbesserung um das Fünffache. Im Fall von *E. coli* zeigen die MIC-Werte ein ähnliches Bild. Hier steigt die Aktivität durch die Zugabe des Enzyms von 13.71 µg·mL⁻¹ auf 3.13 µg·mL⁻¹. Dies beweist, dass der eCIP-„Spacers“ auch enzymatisch gespalten werden kann. Wahrscheinlich wird der eCIP-„Spacers“ während des MIC-Tests selbst durch bakterielle Enzyme hydrolysiert und CIP abgespalten. Dadurch resultiert auch die Unabhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität der eCIP-Konjugate gegenüber dem Molekulargewicht und den Polymerendgruppen.

3.2.8. Biologische Untersuchung der Polymer-Ciprofloxacin-Konjugate

In diesem Kapitel soll auf die Untersuchungen der pharmakokinetischen Eigenschaften und der Biokompatibilität der Konjugate eingegangen werden. Bisher wurden nur die antimikrobiellen Eigenschaften in Form von MIC-Werten betrachtet, daher soll im weiteren Verlauf auf die Fettaffinität, Blutkompatibilität, Zelltoxizität sowie das Potential der Resistenzbildung von Bakterien eingegangen werden.

3.2.8.1. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Häufig werden Antibiotika früher oder später in die Umwelt exponiert, wo diese in Fettgewebe von Tieren akkumulieren können.¹⁶⁰⁻¹⁶³ Mittlerweile werden Antibiotika in vielen Fluss- und Seebewohnern nachgewiesen.¹⁶²⁻¹⁶⁵ Diese dauerhafte Anwesenheit des Antibiotikums kann zu Bildung von resistenten Bakterienkeimen führen. Die resistenten Bakterienkeime gelangen über die Nahrungskette auch zum Menschen, wo

Ergebnisse und Diskussion

sie großes Gesundheitsrisiko darstellen (Methicillin-Resistente-*Staphylococcus aureus* (MRSA) oder Enterohemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)). Zudem könnte die Akkumulation des Antibiotikums in niederen Tierarten, die letale Dosis überschreiten und zum Tod führen.¹⁶²⁻¹⁶⁵ Dies konnte für Ciprofloxacin bei einigen Algenarten, Regenbogenforellen, Schlammkulturen und Daphnien beobachtet werden.¹⁶²⁻¹⁶⁵

Aus diesen Gründen ist eine wichtige pharmakokinetische Kenngröße für Wirkstoffe der Verteilungskoeffizient. Mit Hilfe des Verteilungskoeffizienten kann abgeschätzt werden ob die Wirkstoffe zur Akkumulation in Fettgewebe neigen. Die CIP-Konjugate und das niedermolekulare Antibiotikum wurden in Wasser gelöst und mit Chloroform extrahiert, wobei Chloroform als Modell für das Fettgewebe genutzt wurde. Anschließend wurde die Menge des Antibiotikums in den beiden Phasen bestimmt und der Quotient aus den beiden Mengen liefert den Verteilungskoeffizienten.

$$K_{\text{Wasser/Chloroform}} = \frac{m_{\text{Wasser}}}{m_{\text{Chloroform}}}$$

Tabelle 17: Verteilungskoeffizienten verschiedener Konjugate, CIP und CIP-HCl.

Konjugate	Verteilungskoeffizient
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	8.46 ± 1.16
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.12 ± 0.43
Me-PEG ₄₅ -EDA-xCIP	2.62 ± 1.37
CIP	0.23 ± 0.12
CIP-HCl	14.60 ± 4.30

Die Verteilungskoeffizienten in Tabelle 17 zeigen, dass die Konjugate deutlich Wasseraffiner sind als das reine CIP. Wobei Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP mit 8.46 den höchsten Verteilungskoeffizienten aufweist. Der Austausch des Polymerrückgrats von PMeOx zu PEG bzw. PEtOx bewirkt eine deutliche Erniedrigung des Koeffizienten. Dabei ergibt sich folgende Reihenfolge PMeOx>PEG>PEtOx. Der Verteilungskoeffizient von reinem CIP ist 36-mal niedriger als der Koeffizient von Me-PMeOx₃₀-EDA-CIP. Daraus lässt sich abschätzen, dass die Konjugate deutlich weniger zur Akkumulation in unpolaren Medien, wie dem Fettgewebe neigen als das reine CIP. Allerdings zeigt das

Ergebnisse und Diskussion

häufig verwendete CIP·HCl einen deutlich besseren Verteilungskoeffizienten als das CIP selbst und auch einen besseren als die untersuchten Konjugate. Im Fall von Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP ist der Verteilungskoeffizient etwas niedriger und für Me-PEtOx₃₀-EDA-xCIP sowie Me-PEG₄₅-EDA-xCIP deutlich niedriger. Somit kann mit der Polymerkonjugation eine bessere Wasserlöslichkeit und somit eine niedrige Akkumulationsaffinität verglichen zu reinem CIP erreicht werden, jedoch keine bessere als für das CIP·HCl. Aufgrund der vorhandenen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Konjugate Me-PMeOx₃₀-EDA-xCIP, Me-PEtOx₃₀-EDA-xCIP und Me-PEG₄₅-EDA-xCIP nur zu geringer Akkumulation neigen.

3.2.8.2. Bestimmung der Hämokompatibilität

Für eine spätere Anwendung im menschlichen Körper müssen eine hohe Gewebekompatibilität sowie eine hohe Hämokompatibilität gewährleistet sein. Für die Untersuchung der Hämokompatibilität wurden Erythrozyten verwendet. Dabei wurde der HC₅₀-Wert ermittelt, dieser Wert beschreibt bei welcher Konzentration 50% der Erythrozyten durch die Probe lysiert werden. Dementsprechend haben toxische Verbindungen einen niedrigen Wert und ungiftige Verbindungen einen hohen. Das Verhältnis zwischen HC₅₀-Wert und MIC-Wert gibt die Selektivität wieder. Je höher die Selektivität ist, desto besser ist die Verbindung für eine medizinische Anwendung geeignet, wobei dies nur ein Kriterium von vielen ist.

$$S = \frac{HC_{50}}{MIC}$$

Das für den HC₅₀-Wert benötigte Erythrozytenkonzentrat wurde aus Schweineblut durch mehre Waschschriffe isoliert und in CPD-Puffer (Zitrat-Phosphat-Dextrose) gelagert. Einen Überblick über die getesteten Konjugate gibt Tabelle 18. Hierbei soll erwähnt sein, dass nur einige ausgewählte Konjugate auf ihre hämolytischen Aktivität getestet wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 18: Überblick über HC₅₀-Werte, MIC-Werte sowie Selektivität (S) gegen *S. aureus* einiger ausgewählter Konjugate.

Konjugate	HC ₅₀ [µg·mL ⁻¹]	MIC _{<i>S.aureus</i>} [µg·mL ⁻¹]	S _{<i>S.aureus</i>}
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	≥ 21000	5.90 ± 0.67	≥ 3600
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	≥ 17000	1.36 ± 0.32	≥ 12500
Me-PEG ₄₅ -EDA-xCIP	≥ 13000	0.47 ± 0.19	≥ 28000
CIPx-EDA-PMeOx-DBB-PMeOx-EDA-xCIP	≥ 16000	16.0 ± 3.12	≥ 1000
DDA-X-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	6200 ± 1700	5.60 ± 2.10	1100
Me-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	≥ 24000	0.31 ± 0.06	≥ 77000
DDA-X-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	≥ 17000	1.19 ± 0.49	≥ 14000
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-eCIP	≥ 36000	33.2 ± 14.8	≥ 1100
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-eCIP	≥ 23000	12.5 ± 0.50	≥ 1800
Me-PEG ₄₅ -EDA-eCIP	≥ 16000	11.3 ± 3.08	≥ 1400
DDA-X	250 ± 80	4.19 ± 0.49	60
xCIP	≥ 10000	0.56 ± 0.04	≥ 18000
eCIP	≥ 11000	0.29 ± 0.05	≥ 38000
DTAC	540 ± 40		
CIP*	≥ 47000	0.42 ± 0.02	≥ 111000

* HC₅₀ Test wurde mit dem CIP-HCl-Salz durchgeführt

In Tabelle 18 sind die HC₅₀ und die MIC-Werte der getesteten Konjugate sowie die niedermolekularen Verbindungen DDA-X, DTAC, eCIP, xCIP und CIP dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die meisten Polymer-Antibiotika-Konjugate keine hämolytische Aktivität gegenüber den Blutzellen aufweisen. Die Konzentration bei der mehr als 50% der Blutzellen zerstört wird liegt über 10000 µg·mL⁻¹. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da das POx keine hämolytische Aktivität aufweist ebenso wenig wie das Antibiotikum CIP. Ausnahmen bilden allerdings Konjugate mit einer DDA-X Gruppe. So besitzt das DDA-X-PMeOx-EDA-xCIP mit einem HC₅₀-Wert von 6200 ± 1700 µg·mL⁻¹ eine

Ergebnisse und Diskussion

hämolytische Aktivität, wenn auch eine geringe. Das DDA-X Konjugat weist im Vergleich zum niedermolekularen Initiator DDA-X eine deutlich geringere hämolytische Aktivität auf. Anscheinend wird durch die Polymerisation und anschließender Konjugation die hämolytische Aktivität des Initiators deutlich gesenkt. Für das DDA-X-PMeOx₁₀-EDA-xCIP konnte keine Aktivität gegen rote Blutzellen ermittelt werden, obwohl das Konjugate mit 30 Wiederholungseinheiten und der niedermolekulare Initiator einen HC₅₀-Wert und somit eine hämolytische Aktivitäten aufweisen. Daher ist das Ergebnis überraschend, allerdings kann bei diesem Hämokompatibilitätstest nur die Freisetzung des Hämoglobins untersucht werden. Andere Mechanismen, die zu einer Beeinträchtigung der Funktion von roten Blutzellen führen, wie zum Beispiel das Binden und Ausfällen, können durch diesen Test nicht ermittelt werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass das Konjugat DDA-X-PMeOx₁₀-EDA-xCIP eine andere Art von Bluttoxizität aufweist.

Ein Blick auf die Selektivitäten (S) zeigt, dass alle Konjugate einen hohen Wert aufweisen und somit selektiv gegen Bakterienzellen wirken. Dabei zeigt Me-PMeOx₁₀-EDA-xCIP mit einer Selektivität von mehr als 77000 die höchste Selektivität unter den Konjugaten. Allerdings ist der Vergleich unter einander und mit dem niedermolekularen Antibiotikum nicht leicht, da der HC₅₀-Wert bei vielen Konjugaten sowie beim CIP nicht bestimmt werden konnte. Die meisten Konjugate weisen eine Zellyse von etwa 1% auf. Die höchste Lyse liegt bei den Konjugaten bei etwa 3% (mit Ausnahme des DDA-X-Konjugats).

Die hier getesteten Polymer-Antibiotika-Konjugate zeigen zusammenfassend nur geringe hämolytische Aktivität gegenüber Erythrozyten, wodurch auch hohe Selektivitäten von 1000 bis ≥ 77000 resultieren.

3.2.8.3. Bestimmung der Zelltoxizität

Neben der Hämokompatibilität wurde auch die Zelltoxizität bzw. Gewebetoxizität für ausgewählte Konjugate bestimmt. Die Zelltoxizität wurde mittels Zelltiter Glo Tests ermittelt.¹⁶⁶ Diese Tests wurden von JONAS LATEGAHN und HANNAH TUMBRINK am Lehrstuhl für medizinische Chemie durchgeführt. In Tabelle 19 sind die gemessenen Daten gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: EC₅₀-Werte der untersuchten Konjugate gegen die Zelllinien CTG-H1975-002 und CTG-A431-002.

	CTG EC ₅₀ [μM]	
	A431	H1975
CIP	>30	>30
xCIP	23.95 ± 8.70	17.51 ± 9.42
eCIP	23.73 ± 11.33	19.68 ± 12.60
Me-PMOx ₃₀ -EDA-xCIP	>30	>30
Me-PMOx ₃₀ -EDA-eCIP	24.53 ± 10.94	23.77 ± 12.46

Für das Konjugat, Me-PMOx₃₀-EDA-xCIP sowie das ursprüngliche CIP konnten für die Zelllinien H1975 und A431 bis zu einer Konzentration von 30 μmol·mL⁻¹ keine EC₅₀-Werte gefunden werden. Dies könnte für eine gute Kompatibilität dieser Verbindungen gegenüber eukaryotischen Zellen sprechen. Ein anderes Bild zeigen die beiden niedermolekularen CIP Modifizierungen. Das xCIP besitzt mit 23.95 ± 8.70 μmol·L⁻¹ gegen A431 und 17.51 ± 9.42 μmol·L⁻¹ gegen H1975- EC₅₀-Werte, welche sehr nahe an dem MIC für *K. pneumoniae* mit 12.49 μmol·L⁻¹ liegen. Ähnliches konnte für eCIP gefunden werden, diese CIP Modifizierung zeigt mit 23.73 ± 11.33 μmol·L⁻¹ gegen A431 und 19.68 ± 12.60 μmol·L⁻¹ gegen H1975 eine ähnliche Toxizität. Das PMeOx-eCIP-Konjugat weist auch einen EC₅₀-Wert auf. Dieser ist zwar mit 24.53 ± 10.94 μmol·L⁻¹ und 23.77 ± 12.46 μmol·L⁻¹ niedriger als die ermittelten MIC-Werte für dieses Konjugat allerdings nur um ein 2.4- bis 24-faches. Dies ist dennoch überraschend, da bei eCIP-„Spacer“ Hydrolyse nur die Abspaltung von unmodifiziertem CIP und das Entstehen eines unreaktiven Polymers mit Carboxylgruppe erwartet wurde. Keine der beiden Verbindungen sollte den Erwartungen nach eine Zelltoxizität aufweisen, jedoch könnte die Hydrolyse zu toxischen Zwischen- oder Abbauprodukten führen. Die Ergebnisse des Zelltoxizitätstests zeigen auch, dass das Konjugat Me-PMOx₃₀-EDA-xCIP ebenso wie das CIP keine Toxizität im untersuchten Konzentrationsbereich aufweist. Die Ergebnisse für eCIP, xCIP und Me-PMOx₃₀-EDA-eCIP sind dahingegen ernüchternd, hier konnte ein EC₅₀-Wert im Bereich von 17.51 μmol·L⁻¹ bis zu 24.53 μmol·L⁻¹ gefunden werden. Im Fall der

Ergebnisse und Diskussion

niedermolekularen „Spacer“ könnte dies durch die aminoreaktive Gruppe erklärt werden. Durch Abspaltung des Chloridions könnte ein reaktives Carbokation entstehen, welches unkontrolliert mit der Zelle reagieren und somit auch zum Zelltod führen kann. Die Toxizität des Me-PMOx₃₀-EDA-eCIP im Vergleich zum Me-PMOx₃₀-EDA-xCIP könnte möglicherweise auf die Labilität des eCIP-„Spacers“ zurückgeführt werden. An diese Stelle soll noch angemerkt werden, dass die maximal getestete Konzentration von 30 µmol·mL⁻¹ aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Proben im verwendeten Medium resultierte. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einer Ausfällung der Proben. Zudem dienen für diesen Test Krebszelllinien als Modell für eukaryotische Zellen. Daher wären weitere Kompatibilitätstest mit weiteren Zelltypen äußerst interessant.

3.2.8.4. Untersuchung des Resistenzbildungspotentials

Ein großes Problem in der Antibiotikaforschung ist die schnelle Anpassung der Bakterien an die neu entwickelten Wirkstoffe. Durch die Anpassung werden die Mikroorganismen resistent und der zuvor effektive Wirkstoff verliert seine Aktivität (Vergleich Kapitel 1.3). Durch einen Langzeittest sollte das Potential der Resistenzbildung durch die PAKs untersucht werden. Bei diesem Langzeittest handelt es sich um eine Abwandlung des MIC-Testes. Zunächst wird ein MIC-Test durchgeführt, dabei wird die erste bewachsene Stufe zum Animpfen eines weiteren MIC-Testes benutzt. So wurde jeden Tag neun bis zehn Tage lang ein MIC-Test angefertigt und mit den Bakterien aus dem MIC-Test vom Vortag angeimpft. Dadurch wurde der evolutionäre Stress der Bakterien ständig erhöht und somit auch die Wahrscheinlichkeit auf eine schnelle Resistenzbildung. Als Modelbakterien wurden *S. aureus* und *E. coli* verwendet. Als Konjugate wurde das Me-PMeOx-EDA-xCIP und das Me-PMeOx-EDA-eCIP aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkspektren untersucht. Zum Vergleich wurden ebenfalls das unmodifizierte CIP sowie die entsprechenden CIP-„Spacer“ untersucht. In Abbildung 92 sind die Ergebnisse des durchgeführten Langzeittests für das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

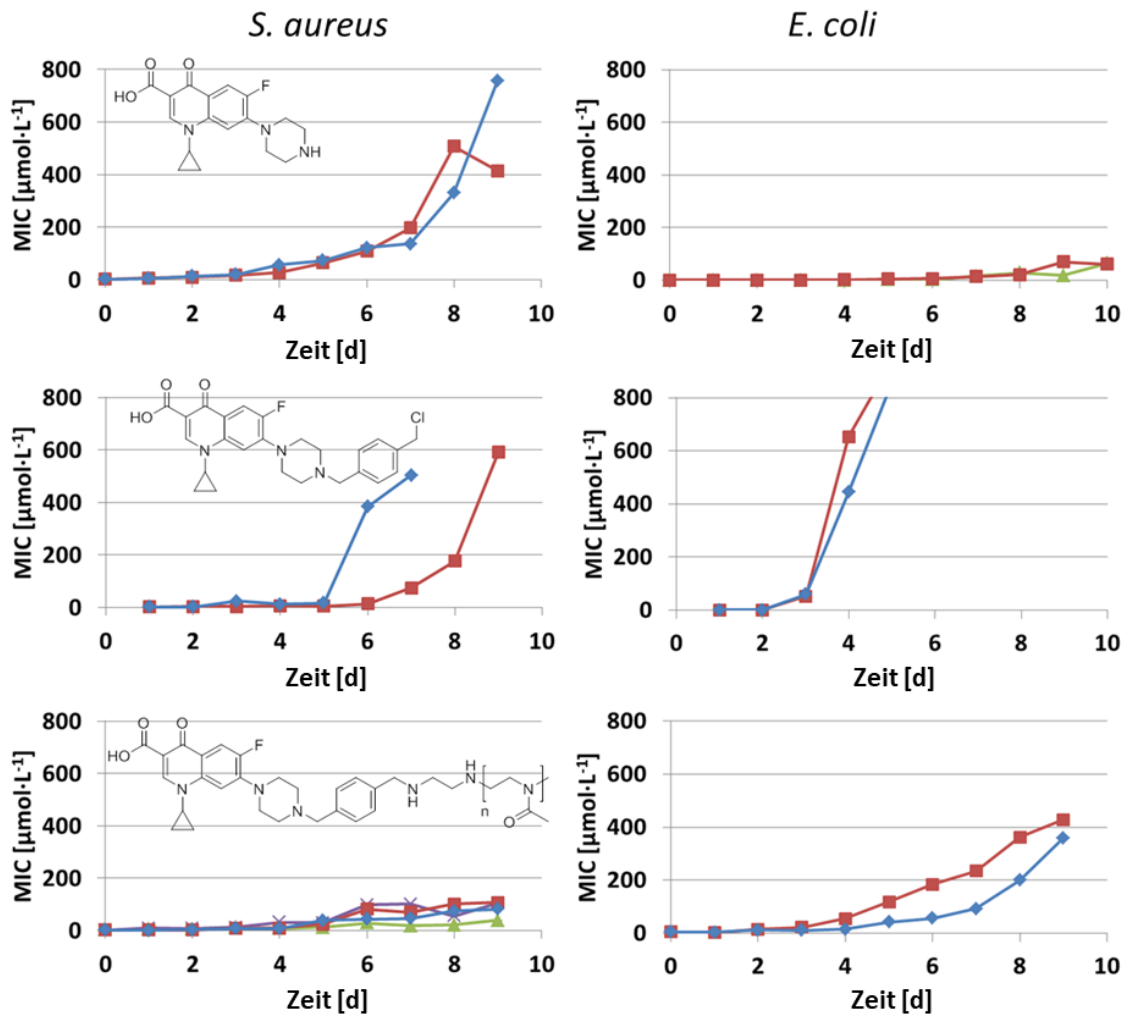


Abbildung 92: Resistenztest gegen *S. aureus* und *E. coli* über 9-10 Tage. Dabei wurden die MIC-Tests mit den Bakterien aus der ersten bewachsenen Probe des MIC-Testes vom Vortag angeimpft. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse gegen *S. aureus* für CIP (oben links), xCIP (mitte links) und Me-PMeOx-EDA-xCIP (unten links) sowie gegen *E. coli* für CIP (oben rechts), xCIP (mitte rechts) und Me-PMeOx-EDA-xCIP (unten rechts). Für jede Messung (Rot) wurde mindestens eine Wiederholungsmessung (blau, grün, violett) durchgeführt.

Der Test zeigt, dass der Bakterienstamm *S. aureus* nach etwa neun Tagen eine deutliche Resistenzbildung gegen CIP aufweist. Dabei sind schon nach vier Tagen erste Resistenzen zu beobachten. Der MIC-Wert stieg innerhalb von vier Tagen von $1.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ an. Innerhalb der nächsten Tage stieg der MIC-Wert konstant an, bis er am achten Tag einen starken Sprung machte und $418 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ erreichte. Am neunten Tag konnte ein finaler MIC-Wert von $584 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ermittelt werden. Somit konnten sich die

Ergebnisse und Diskussion

Bakterien innerhalb von neun Tagen anpassen und die Effektivität des CIPs um ein 478-faches verschlechtern. Ein ähnliches Bild zeigt der xCIP-„Spacer“, dieser weist sogar eine schnellere Resistenzbildung auf. Nach nur sieben Tagen kann von einer deutlichen Resistenz gegen diesen CIP-Derivate gesprochen werden. Auch hier tritt nach vier Tagen ein massiver Anstieg des MIC-Wertes auf, wobei dieser allerdings deutlich drastischer ausfällt als der beim unmodifizierten CIP. Im Laufe des Testes wurde der MIC-Wert von $1.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $590 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht. Das entspricht einem Anstieg um das 487-fache. Interessanterweise zeigt das Me-PMeOx-EDA-xCIP im Vergleich zu dem CIP und dem xCIP nur eine geringe Resistenzbildung im Zeitrahmen des Versuches. Das Konjugat weist einen leichten Anstieg nach fünf Tagen auf, von $2.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Allerdings stagniert dieser nach sieben Tagen wieder und ein Plateau ist zu erkennen. Diese Ergebnisse sprechen für eine verzögerte Resistenzbildung des Konjugats Me-PMeOx-EDA-xCIP im Vergleich mit dem niedermolekularen CIP. Nach neun Tagen weist das Polymerantibiotikum einen fast vier- bis acht-fach niedrigeren MIC-Wert als die entsprechenden niedermolekularen Spezies auf.

Bei *E. coli* zeigt sich ein etwas anderes Resistenzverhalten. Im Fall von CIP zeigte *E. coli* nach Ablauf des Testes einen MIC-Wert von $78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und besitzt somit immer noch eine leichte Aktivität. Wohingegen der xCIP-„Spacer“ schon nach vier Tagen vollständig seine Aktivität verliert. Das Me-PMeOx-EDA-xCIP zeigt nach zehn Tagen mit $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ einen deutlich höheren MIC-Wert als das CIP. Allerdings ist der Anstieg des Konjugats immer noch deutlich niedriger als der vom xCIP-„Spacer“. Nun könnte vermutet werden, dass die Resistenzbildung bei *E. coli* gegen das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP deutlich schneller erfolgt als gegen das unmodifizierte CIP, jedoch zeigt das CIP mit einem Anstieg des MIC-Wertes von $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eine Verschlechterung um ca. das 780-fache und das Konjugate von $2.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nur um etwas das 180 fache. Das bedeutet, der Anstieg des MIC-Wertes erfolgt beim Konjugat mit einem Faktor von 3.3 langsamer.

Abbildung 93 stellt die Ergebnisse des eCIP und des Me-PMeOx-EDA-eCIP dar. Hier kann ein anderes Resistenzverhalten als zuvor beobachtet werden. Me-PMeOx-EDA-eCIP zeigt gegen *S. aureus* schon innerhalb der ersten sieben Tage einen raschen konstanten Anstieg von $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $285 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Am achten Tag ist ein Sprung des MIC-Wertes

Ergebnisse und Diskussion

zuerkennen, welcher auf $655 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ansteigt. Somit weist das Me-PMeOx-EDA-eCIP im Gegensatz zum Me-PMeOx-EDA-xCIP ein höheres Potential der Resistenzbildung von *S. aureus* als CIP auf.

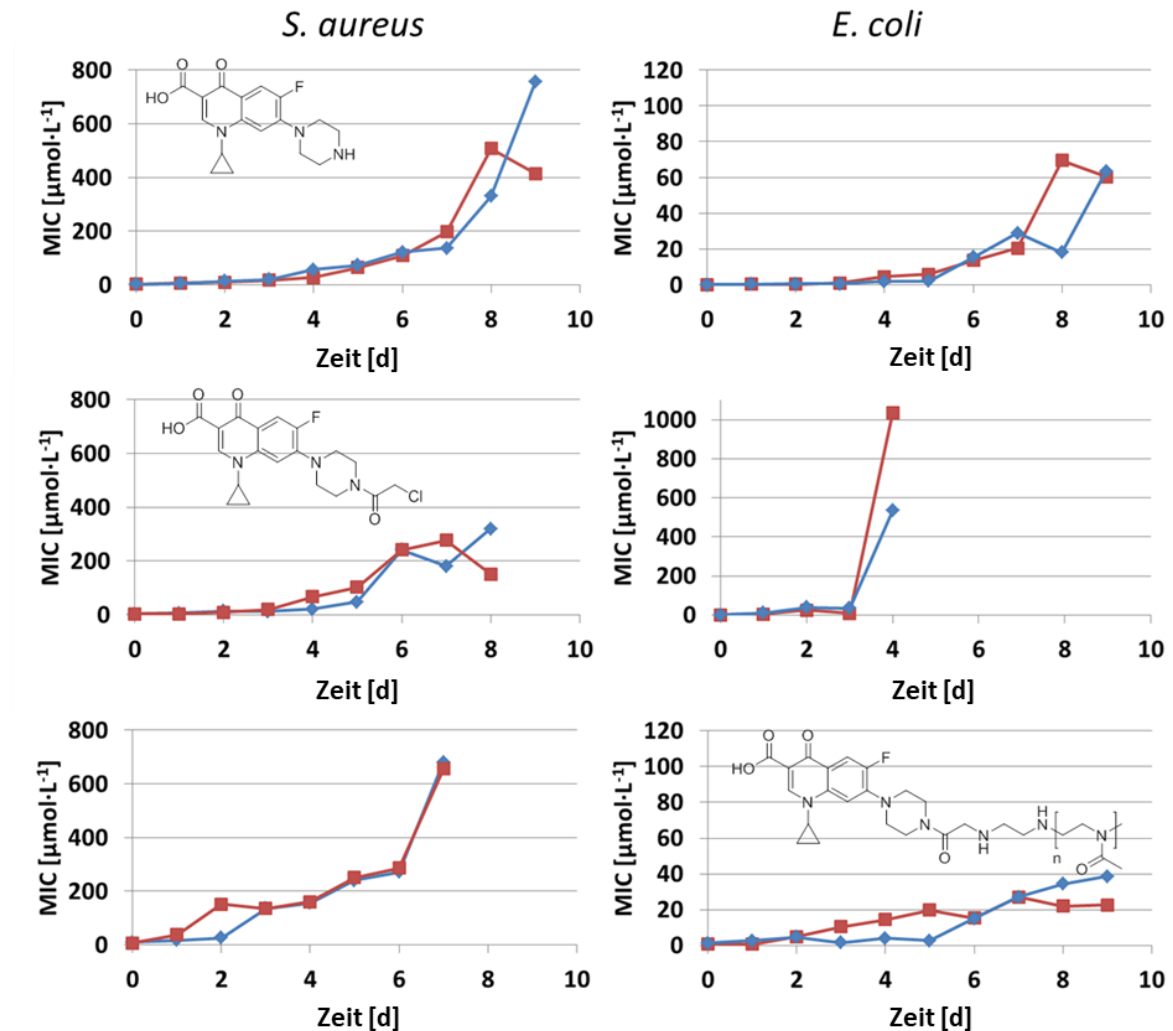


Abbildung 93: Resistenztest gegen *S. aureus* und *E. coli* über 9-10 Tage. Dabei wurden die MIC-Tests mit den Bakterien aus der ersten bewachsenen Probe des MIC-Testes vom Vortag angeimpft. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse gegen *S. aureus* für CIP (oben links), eCIP (Mitte links) und Me-PMeOx-EDA-eCIP (unten links) sowie gegen *E. coli* für CIP (oben rechts), eCIP (Mitte rechts) und Me-PMeOx-EDA-eCIP (unten rechts). Für jede Messung (Rot) wurde mindestens eine Wiederholungsmessung (blau) durchgeführt.

Interessanterweise ist im Fall von *E. coli* ein anderes Bild zu erkennen. Obwohl gegen das eCIP schon nach relativ kurzer Zeit (3 bis 4 Tage) eine starke Resistenz entwickelt wird,

Ergebnisse und Diskussion

kann für das Konjugat ein langsamer Anstieg des MIC-Wertes beobachtet werden. Dabei unterscheidet sich die MIC-Wert des Me-PMeOx-EDA-eCIPs und des CIP nach neun Tagen nicht mehr signifikant voneinander. Dies ist bemerkenswert, da CIP einen viel kleineren Start MIC-Wert besitzt. Diese Tatsache ist interessant, da im Kapitel 3.2.7 und 3.2.4.4 eine enzymatische Hydrolyse des eCIP-„Spacers“ beschrieben wurde. Durch die Hydrolyse wird unmodifiziertes CIP freigesetzt und daher wurde für das eCIP-Konjugat ein ähnliches Resistenzbildungspotential wie beim CIP erwartet. Aber anscheinend führt schon die temporäre Bindung an das Antibiotikum zu einer Verlangsamung der Resistenzbildung. Interessant ist auch, dass das Me-PMeOx-EDA-eCIP ein geringes Resistenzbildungspotential gegen *E. coli* und Me-PMeOx-EDA-xCIP ein geringeres gegen *S. aureus* besitzt. Dieser Sachverhalt regt zu Spekulationen an. Denn Fluorchinolone besitzen in GRAM-negativen und GRAM-positiven Bakterien unterschiedliche Primärziele (Vergleich Kapitel 1.2.2). Daher könnte die xCIP Modifikation zu einer stärkeren Bindung zum Primärziel vom GRAM-positiven Bakterium (Topoisomerase IV) wie *S. aureus* führen aber gleichzeitig die Bindung zum Primärziel bei GRAM-negativen Bakterien (Gyrase) schwächen. Im Fall von *E. coli* verhält es sich genau anderes herum. Hier scheint das eCIP-Konjugat eine höhere Bindungsaffinität zum Primärziel von GRAM-negativen zu besitzen.

Die Ergebnisse dieses Testes zeigen, dass durch die Konjugation des CIP mit POx eine Resistenzbildung verlangsamt werden kann. Dies wird vor allem gegen den Keim *S. aureus* deutlich.

3.2.8.5. Untersuchung der Aktivität gegen Bakterien mit einer Effluxpumpenüberregulation.

Im Kapitel zuvor wurde gezeigt, dass die PAKs in einigen Fällen ein geringeres Potential zur Resistenzbildung als CIP aufweisen. Wie im Kapitel 1.3 genannt, existieren zwei Hauptmechanismen die zu einer Resistenz gegen Fluorchinolone führen. Zum einen kann die Zielstruktur durch Mutation oder Erwerb von Genmaterial verändert werden, wodurch der Wirkstoff seine Wirkung verliert. Zum anderen kann durch Hochregulierung

Ergebnisse und Diskussion

von Effluxpumpensystemen ein Transport des Wirkstoffes aus der Zelle erfolgen. Aufgrund der Zunahme an Molekulargewicht als Folge der Konjugation könnten die resultierenden PAKs schlechtere Substrate für die Effluxpumpen sein, wodurch auch eine schlechtere Anpassung seitens der Bakterien erfolgen könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden verschiedene Bakterien sowie ihre Mutanten untersucht. Bei den Bakterien handelt es sich um die GRAM-negativen Keime *E. coli* und *Pseudomonas taiwanensis* (*P. taiwanensis*) und ihre Mutanten mit einem „Knockout“-Gen für die Effluxpumpenregulierung (VLB120 Δ C Δ ttgV). Durch das „Knockout“-Gen sind die Gene, die für die Effluxpumpenregulierung zuständig sind, ausgeschaltet und infolgedessen kommt es im Bakterium zu einer Überexpression an diesen Pumpen. Für *E. coli* wurde neben der Mutante mit einem „Knockout“-Gen für die Effluxpumpenregulierung (JW5503 Keio Kollektion) zusätzlich eine weitere Mutante untersucht. Diese Mutante besitzt keine Gene, die für die Ausbildung dieser Pumpensysteme zuständig sind, wodurch das Bakterium keine Effluxpumpen besitzt (JW0453 Keio Kollektion). Die Wildtypen sowie die Mutanten von *E. coli* und *P. taiwanensis* wurden von Dr. JAN VOLMER Lehrstuhl für Bioprozesstechnik zu Verfügung gestellt.¹⁶⁷

Sollten wirklich die Konjugate schlechtere Substrate für die Effluxpumpen als das niedermolekulare CIP sein, so sollte die Anzahl an Effluxpumpen keinen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Konjugate ausüben im Gegensatz zum niedermolekularem CIP. In Abbildung 94 sind die MIC-Werte für Me-PMeOx-EDA-xCIP und Me-PMeOx-EDA-eCIP gegen *E. coli* und *P. taiwanensis* sowie ihren Mutanten dargestellt. Im Fall *P. taiwanensis* kann zwischen den MIC-Werten des Wildtyps und der Mutanten kein Unterschied erkannt werden. Dies bedeutet, dass die untersuchten Verbindungen (CIP wie auch die Konjugate) in diesem Bakterium nicht als Substrat für das Pumpensystem erkannt werden. Im Fall von *E. coli* verhält es sich anders. Hier ist sehr wohl eine Erhöhung des MIC-Wertes mit zunehmender Anzahl an Effluxpumpen zu erkennen. Die *E. coli* Mutanten weisen mit einer Überexpression an Effluxpumpen (JW5503) deutlich höhere MIC-Werte auf. Der MIC-Wert gegen CIP ist im Vergleich zum Wildtyp um ein 20-faches erhöht. Auch bei den Konjugaten kommt es zu einer Erhöhung des MIC-Wertes bei Me-PMeOx-EDA-xCIP um fast ein 20-faches und bei Me-PMeOx-EDA-eCIP um fast das Dreifache. Allerdings kann unter Berücksichtigung des Fehlers des MIC-Testes von

Ergebnisse und Diskussion

keinem signifikanten Unterschied gesprochen werden. Mutanten ohne Effluxpumpen (JW0453) sind deutlich anfälliger gegen den antibiotischen Wirkstoff. Der MIC-Wert ist für CIP als auch für das Konjugat um etwa das 10-fache niedriger als bei ein Bakterienstamm mit einer normalen Anzahl an Effluxpumpen. Allerdings scheint die Anzahl an Effluxpumpen sowohl auf die Konjugate als auch auf das niedermolekulare CIP einen ähnlichen Einfluss aus zu üben. Dies weist darauf hin, dass die resultierende Zunahme an Molekulargewicht durch die Konjugation nicht ausschlaggebend für die verzögerte Resistenzbildung ist.

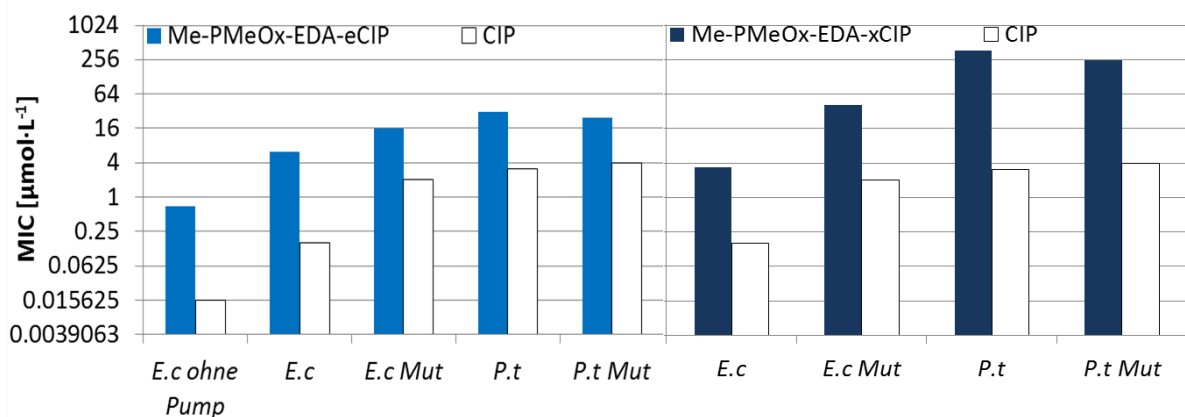


Abbildung 94: MIC-Werte von CIP, Me-PMeOx-EDA-xCIP und Me-PMeOx-EDA-eCIP gegen *E. coli* und *P. taiwanensis* (*P.t*) sowie die Mutante von *P. taiwanensis* (VLB120 Δ C Δ ttgV) mit einem „Knockout“-Gen für die Effluxpumpenregulierung, *E. coli* Mutante ohne Effluxpumpenregulierung (JW5503) und ohne Pumpensystem (JW0453).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Effluxpumpensystem bei *P. taiwanensis* keine Rolle spielt und im Fall von *E. coli* wahrscheinlich nur eine untergeordnete bei der Resistenzbildung. Da sowohl die Aktivität des CIP als auch der Konjugate durch die Anzahl an Effluxpumpen beeinflusst wird.

Ergebnisse und Diskussion

3.2.8.6. Untersuchung der Topoisomerase IV in Polymer-Antibiotika-Konjugaten und CIP resistenten *S. aureus*

Die Ergebnisse, die in Kapitel 3.2.8.4. und 3.2.8.5. vorgestellt worden sind, wiesen auf ein geringeres Resistenzbildungspotential von Bakterien gegen das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP im Vergleich zu unmodifiziertem CIP hin. Zur Aufklärung des Resistenzmechanismus wurde das Erbgut von Me-PMeOx-EDA-xCIP und CIP resistenten *S. aureus* analysiert. Dabei wurde allerdings nicht das komplette Genom der jeweiligen Bakterien untersucht sondern lediglich das primäre Ziel des Antibiotikums, die Topoisomerase IV. Zu diesem Zweck wurde der Genabschnitt, der für die Bildung von Topoisomerase IV verantwortlich ist, mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und anschließend sequenziert. Durch die Sequenzierung konnte der Genabschnitt für die Topoisomerase IV bei den jeweiligen Me-PMOx-EDA-xCIP und CIP resistenten *S. aureus* aufgeklärt und mit dem Wildtyp verglichen werden. Die PCR wurde von Dr. JAN VOLMER vom Lehrstuhl für Bioprozesstechnik durchgeführt.

Da in der Literatur¹⁶⁸ das Genom von *S. aureus* (Wildtyp) bereits bekannt ist, konnten mit Hilfe der Software Primer-Blast die entsprechenden Primer designet werden. Die Nukleotid-Reihenfolge lautet GGGCTTCACGTTACAACGTTAC und CCTCGCATCCTCTACATGAATC. Dabei wurden die Synthesearbeiten von der Firma EUROFINS GENOMICS durchgeführt. Die Sequenzierung der replizierten DNA-Stränge erfolgte ebenfalls durch EUROFINS GENOMICS. Als Sequenzierungsprimer wurden die Oligonukleotid-Stränge GGGCTTCACGTTACAACGTTAC, CCACGGCAATGTTACAC, TGCCCTTAATCCGGTATCTG, CGAATGGACGTAAACAG und CCTCGCATCCTCTACATGAATC verwendet. Die erhaltenen Chromatogramme (Siehe Anhang) der Topoisomerase IV Gensequenzen der Me-PMOx-EDA-xCIP und CIP resistenten *S. aureus* Stämme wurden mit der Gensequenz des Wildtyps verglichen.¹⁶⁸ Dabei konnte für die Me-PMeOx-EDA-xCIP und CIP resistenten Bakterienstämme ein Basenpaaraustausch beobachtet werden. So wurde Cytosin gegen Adenosin ausgetauscht. Diese Änderung der Genfolge verursacht in der Topoisomerase IV einen Austausch der Aminosäure Serin (Position 80) durch die Aminosäure Tyrosin im aktiven Zentrum. Dieser Aminosäureaustausch in der Topoisomerase IV konnte bereits in Fluorchinolon-resistenten *S. aureus*-Isolaten

Ergebnisse und Diskussion

beobachtet werden. ¹⁶⁹ Da beide Stämme dieselbe Mutation aufweisen, indiziert dieser Befund, dass sowohl das CIP als auch das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP den gleichen Wirkmechanismus aufweisen. Allerdings zeigt die Mutation einen geringeren Einfluss auf die Aktivität des PACs, anscheinend führt die Konjugation mit dem Polymer zu einem geringeren Affinitätsverlust durch den Austausch von Serin durch Tyrosin, wodurch eine langsamere Resistenzbildung auftritt. Wahrscheinlich sind weitere Mutationen außerhalb der Topoisomerase IV notwendig, damit das Bakterium eine stärkere Toleranz gegenüber dem Konjugat ausbilden kann.

Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zeigen, dass die Konjugate zum einen denselben Wirkmechanismus verfolgen wie ihr niedermolekulares Pendant und zum anderem, dass die Polymer-Konjugation eine gute Möglichkeit bietet herkömmliche Antibiotika unempfindlicher für Mutationen in der Zielstruktur des Bakteriums zu machen.

3.2.9. Zusammenfassung der Ciprofloxacin-Polymer-Konjugate

Die Konjugation von Ciprofloxacin konnte für verschiedene POx und PEG erfolgreich durchgeführt werden. Dabei konnten die Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität zeigen, dass vor allem die Polymer-Antibiotikum Bindung einen starken Einfluss ausübt. So zeigte ein direkt modifiziertes PMeOx Konjugat keine durch das CIP hervorgerufene Aktivität, wohingegen Konjugate mit einem „Spacer“ antimikrobielle Aktivitäten aufwiesen. Dabei konnten verschiedene CIP-Derivate, xCIP, eCIP, bCIP, pCIP und peCIP als „Spacer“ entwickelt und verwendet werden (Vergleich Abbildung 41). Während xCIP-Konjugate exzellente Aktivitäten gegen GRAM-positive Bakterien und nur moderate gegen GRAM-negative Bakterien zeigen, weisen die eCIP- und bCIP-Konjugate gute Aktivitäten gegen GRAM-positive Bakterien, aber dafür exzellente gegen die GRAM-negative Bakterien auf. Das peCIP hingegen besitzt nach der Konjugation nur schlechte Aktivitäten. Die Verwendung des pCIP zur Konjugation lieferte PAKs die sowohl gegen GRAM-positive als auch gegen GRAM-negative exzellente MIC-Werte aufweisen. Neben der Struktur der Polymer-Antibiotika-Bindung haben auch die Kettenlänge, die

Ergebnisse und Diskussion

Polymerendgruppe und das Polymerrückgrat einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Dabei besitzt jeder „Spacer“ ein optimales Polymerrückgrat. Im Fall von xCIP ist dies PEG. Der Einbau einer weiteren bioziden Einheit in Form eines quartären Ammoniumsalzes konnte mit Hilfe des Initiators DDA-X durchgeführt werden. Dabei zeigt sich, dass diese zusätzliche antimikrobielle Gruppe keine biozide Aufgabe im Polymer übernimmt, sondern lediglich das Eindringen in die Zelle erleichtert. Dies kann vor allem bei GRAM-negativen Bakterien beobachtet werden (Vergleich Abbildung 61).

Des Weiteren konnten amphiphile Konjugate auf Basis von PMeOx und PHepOx mit Hilfe von xCIP und eCIP hergestellt werden. Diese Konjugate zeigen trotz Bildung von Mizellen eine ausgezeichnete Wirkung gegen *S. aureus* und *E. coli*. Diese zeigen in einigen Fällen sogar eine höhere Aktivität als das CIP

Die hergestellten Konjugate wurde auf ihre Biokompatibilität untersucht. Die untersuchten Konjugate weisen mit Ausnahme der DDA-X gestarteten Konjugate, keine hämolytische Aktivität auf (Vergleich Kapitel 3.2.8.2). Ebenso konnte festgestellt werden, dass die PAKs und die CIP-Derivate eine Selektivität gegenüber Bakterien im Vergleich zu eukaryotischen Zellen aufweisen (Vergleich Kapitel 3.2.8.3). Allerdings zeigte die Untersuchung der Zelltoxizität, dass eine gewisse Toxizität gegenüber den getesteten eukaryotischen Zellen vorliegt. Diese wird jedoch nicht durch die Konjugation sondern schon durch die CIP-Modifizierung hervorgerufen. Ausnahme bildet hier das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP. Für dieses Konjugat kann bis zu einer Konzentration von $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ keine Toxizität gegen eukaryotischen Zellen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigt dieses CIP-Konjugat ein zehnfach geringeres Potential zur Resistenzbildung bei *S. aureus* als bei reinem CIP beobachtet werden konnte. Dabei zeigte sich, dass das geringere Potential nicht durch Zunahme an Molekulargewicht verursacht wird, da sowohl das Konjugat als auch das CIP als Substrat für Effluxpumpen dienen. Eine Analyse des bakteriellen Genoms zeigte, dass die Konjugate denselben Wirkmechanismus wie das CIP aufweisen. Allerdings scheint das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP unanfälliger gegen diese Mutationen der Zielstruktur zu sein.

Die in dieser Arbeit hergestellten PAKs besitzen in einigen Fällen eine bessere Aktivität, eine selektivere Aktivität, eine bessere Wasserlöslichkeit sowie ein geringeres Potential

Ergebnisse und Diskussion

zur Resistenzbildung als ihr niedermolekulares Pendant Ciprofloxacin. Somit stellen die Polymer-Konjugation von Antibiotika eine gute Alternative zur niedermolekularen Derivatisierung dar.

Ergebnisse und Diskussion

3.3. Polymer-Penicillin-Konjugate

Neben den Ciprofloxacin-Polymer-Konjugaten, die im Kapitel zuvor diskutiert wurden, sollen nun die in dieser Arbeit hergestellten Penicillin-Polymer-Konjugate vorgestellt werden. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit FRANZISKA LANFER und LIVIA BAST in Rahmen ihrer Masterarbeiten erhalten.^{84, 170} Ziel dieses Projektes war die Konjugation verschiedener Penicillinase-stabiler Penicilline mit Poly(2-oxazolin). Durch die kovalente Bindung sollten Konjugate erhalten werden, die das gebundene Antibiotikum gegen den Abbau durch Penicillinase schützen und eine exzellente Aktivität gegen Penicillin-sensible Bakterienstämme aufweisen. Für die Konjugation wurden die Penicilline Benzylpenicillin (PenG) und Phenoxymethylpenicillin (PenV) (siehe Abbildung 95) verwendet.

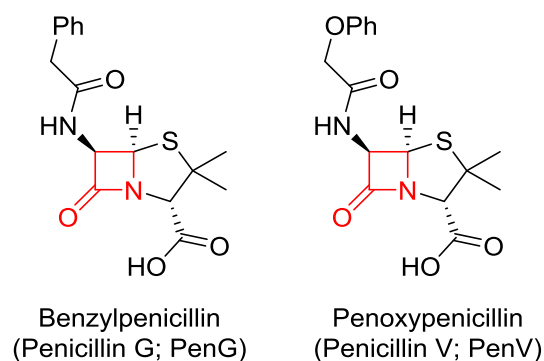


Abbildung 95: Chemische Struktur von Penicillin G (links) und von Penicillin V (rechts).

3.3.1. Synthese von Polymer-Penicillin-Konjugate

Die Polymer-Penicillin-Konjugate konnten über eine einfache Direktterminierungsmethode des lebenden Polymerendes mit Penicillinsalzen erhalten werden. Hierzu wurde MeOx mikrowellenunterstützt polymerisiert. Dazu wurde erneut MeTos als Initiator verwendet. Als Lösungsmittel diente wie zuvor trockenes Chloroform. Das Monomer-Initiator-Verhältnis wurde auf 30 Wiederholungseinheiten eingestellt. Nach dem Propagationsschritt, wurde das lebende kationische Kettenende direkt mit einem Überschuss an Penicillin G (PenG) Natriumsalz terminiert (Vergleich Abbildung 96).

Ergebnisse und Diskussion

Überschüssiges PenG Natriumsalz konnte nach Ablauf der Terminierungsreaktion aufgrund der schlechten Löslichkeit im Lösungsmittel einfach abfiltriert werden. Um noch verbleibende Reste an niedermolekularen Antibiotika zu entfernen wurde das Chloroform verdampft und der Polymerrückstand mehrfach gegen Wasser dialysiert.

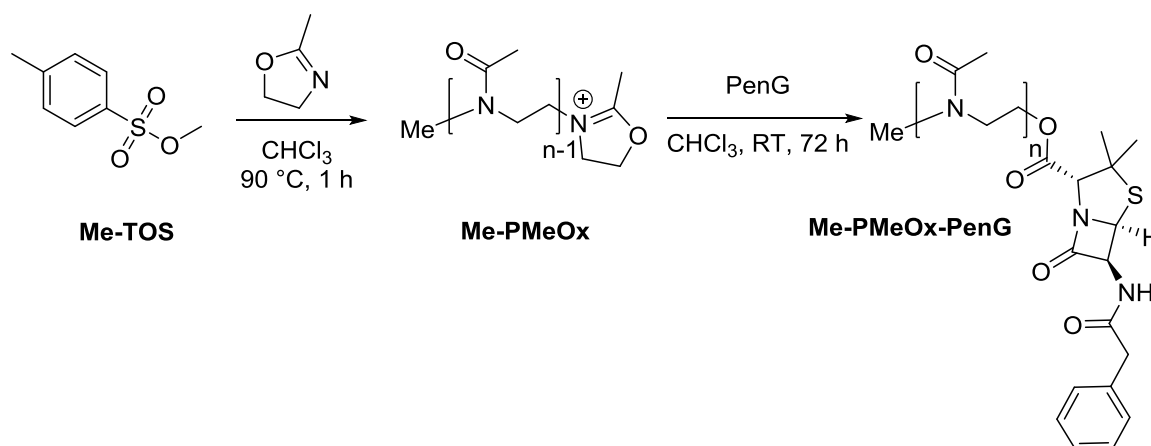


Abbildung 96: Synthese von Me-PMeOx-PenG. Polymerisation von MeOx in Chloroform mit MeTos als Initiator. Im Anschluss der Polymerisation folgte die Direktterminierung mit PenG.¹⁷¹

Das ¹H-NMR-Spektrum des Polymers ist in Abbildung 97 dargestellt. Die Analyse des ¹H-Spektrums weist auf einen Polymerisationsgrad von 30 Wiederholungseinheiten hin. Dies kann durch das Verhältnis der Polymerrückgratsignale (**2 bis 5**) zu dem Initiatorsignal (**1**, 3.00 ppm) berechnet werden. Die Signale **7-14** können dem Penicillin zugeordnet werden. Durch einen Vergleich dieser Signale mit dem des Initiators kann ein Funktionalisierungsgrad von 99% bestimmt werden. Außerdem zeigt das Signal bei 4.30 ppm (**6, 7**), dass die Terminierung des lebenden kationischen Kettenendes mit der Carboxylatgruppe des Penicillins erfolgt, sodass das Polymer und das Antibiotikum über eine Esterbindung miteinander verknüpft sind.

Ergebnisse und Diskussion

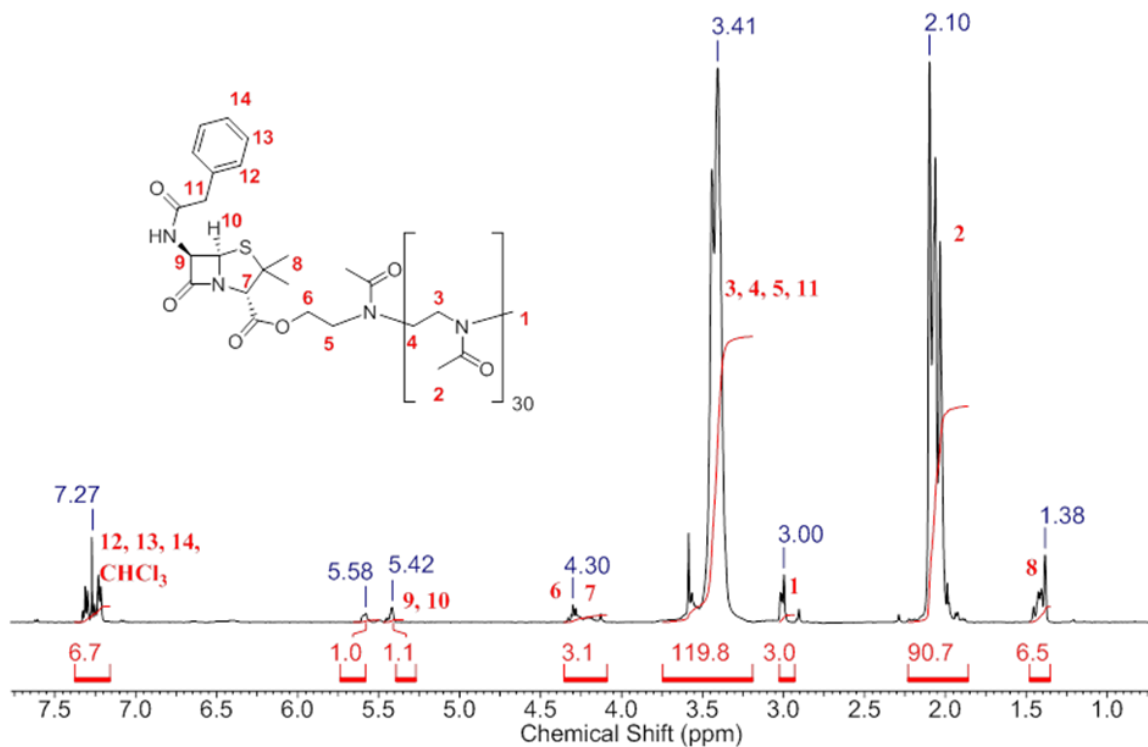
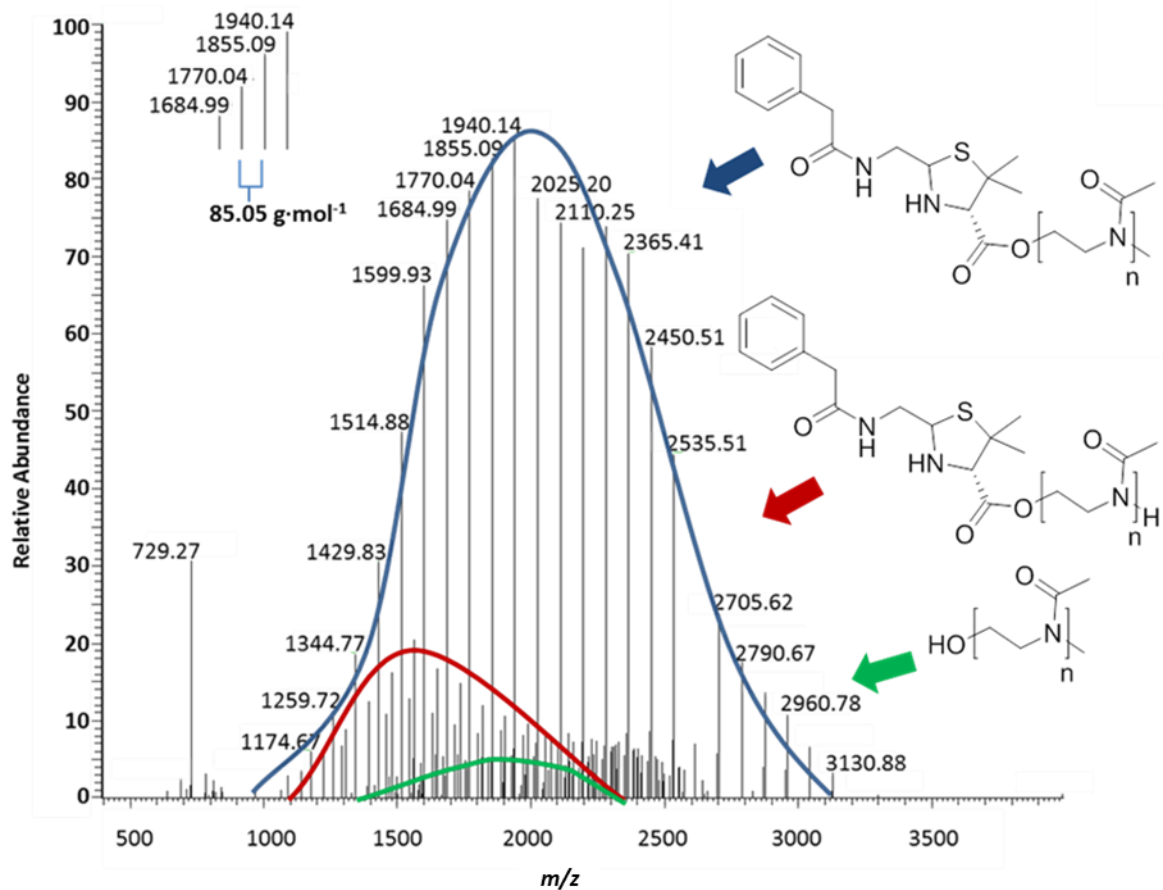


Abbildung 97: ^1H -NMR Spektrum vom Me-PMeOx-PenG, aufgenommen in CDCl_3 (7.27 ppm). Oben links ist die Struktur von Me-PMeOx-PenG dargestellt. Die Protonen des Konjugats konnten den Signalen des Spektrums zugeordnet werden (1-14 in Rot).¹⁷¹

Neben der Analyse mittels ^1H -NMR-Spektroskopie wurde zusätzlich eine Elektronenspray Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) und eine Matrix unterstützte Laser Desorption Ionisation Massenspektrometrie (MALDI) verwendet. Das ESI-MS Spektrum ist in Abbildung 98 dargestellt. Im Gegensatz zu den Daten, die durch die ^1H -NMR-Spektroskopie gewonnen werden können, zeigt das ESI-MS Spektrum Polymere die mit einem Metaboliten von PenG funktionalisiert sind. Dieser Metabolit kann als Penillosäure identifiziert werden. Penillosäure resultiert aus einer Hydrolyse des PenG, gefolgt von einer Decarboxylierung. Diese Umwandlung tritt wahrscheinlich aufgrund der sauren Bedingungen während der Ionisation auf, da PenG äußerst säurelabil ist.¹⁷² 73% aller gefundenen Massen zeigen diese Endgruppe und weitere 17% eine Hydroxyl-Endgruppe. Neben den Polymeren mit einer Methylinitiatorgruppe können auch protoneninitiierte Polymere beobachtet werden. Ihr Anteil beträgt 7% der gesamten Masse.

Ergebnisse und Diskussion



m/z **Me-PMeOx₃₀-Penillosäure** ($[M+H]^+$) berechnet CH_3 ($15.024 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 30-mal MeOx ($30 \cdot 85.054 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + Penillosäure ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; $308.112 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + H^+ ($1.007 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ergibt $2875.531 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und gefunden wurden $2875.763 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

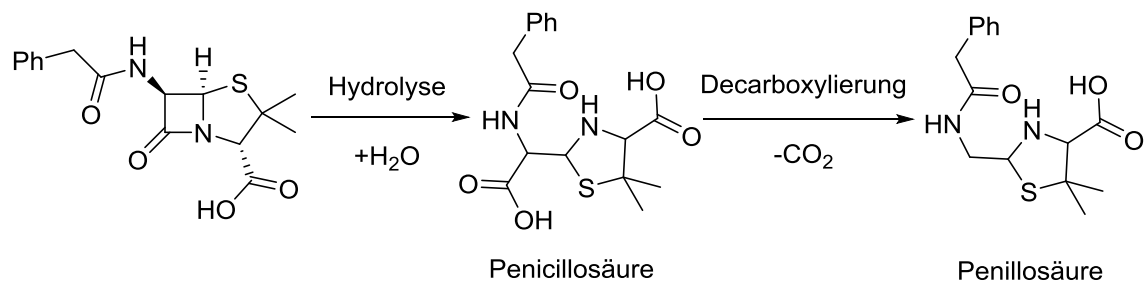
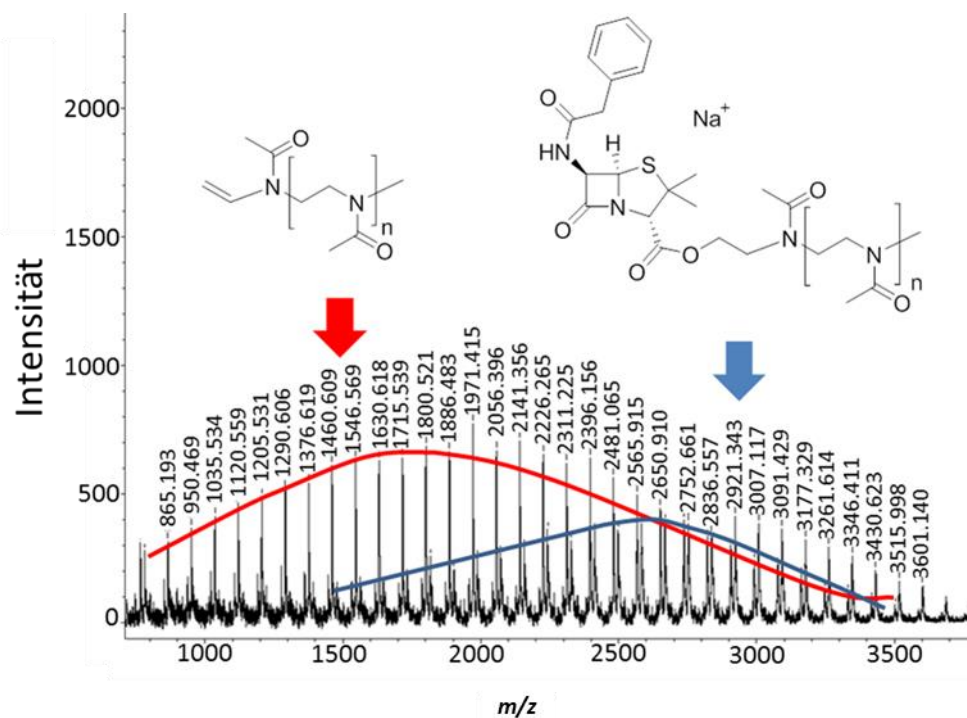


Abbildung 98: ESI-MS Spektrum von Me-PMeOx-PenG. Die Peaks zeigen die Isotope mit dem niedrigsten Molekulargewicht. Unter dem Spektrum ist eine Beispielrechnung für die theoretische Masse abgebildet, sowie der zweistufige Abbau des PenG zu Penillosäure.¹⁷¹⁻¹⁷⁵

Das MALDI-TOF Spektrum von Me-PMeOx-PenG zeigte zwei unterschiedliche Polymergenerationen. Beide Generationen bestehen aus PMeOx wie durch die

Ergebnisse und Diskussion

Wiederholungseinheit von 85 angedeutet wird. Eine der beiden Polymergenerationen entspricht PMeOx mit einer Methylstartergruppe und einer PenG-Endgruppe am terminalen Polymerende. Die zweite Generation konnte als PMeOx mit Methylstartergruppe und einer Vinylendgruppe identifiziert werden. Diese Generation könnte durch eine Fragmentierung während des Ionisationsschrittes erfolgen. Eine ähnliche Fragmentierung mit Penicillin-Poly(3-hydroxybutylsäure)-Konjugaten konnte auch bei ADAMUS et. al.¹⁷⁶ beobachtet werden. ADAMUS et. al. konnte eine Spaltung der Polymer-Antibiotika-Bindung nachweisen, die zu einer Vinylendgruppe am Polymer verursacht. Keine anderen Signale sind in diesem Spektrum zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die in der ESI-MS Messung gefundenen Produkte höchstwahrscheinlich durch eine Hydrolyse des Me-PMeOx-PenG während der Messung entstanden.



m/z Me-PMOx₃₀-Penicillin G ($[M+Na]^+$) berechnet CH_3 ($15.024 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 28-mal MeOx ($28 \cdot 85.054 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + Penicillin G ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$; $334.099 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + Na^+ ($22.989 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) – H^+ (1.008) ergibt $2752.616 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und gefunden wurden $2752.661 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Abbildung 99: MALDI-MS von Me-PMeOx-PenG und eine dazugehörige Beispielrechnung für die theoretische Masse.¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Damit bestätigen die MS Analysen die Struktur der Me-PMeOx-PenG, die durch die ^1H -NMR-Spektroskopie suggeriert wird.

Neben dem PenG wurde auch PenV für die Polymer-Konjugation verwendet. Dabei konnte die Syntheseroute beibehalten werden. Das entsprechende PenV-Konjugat wurde mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie analysiert. Das ^1H -NMR-Spektrum ist nachfolgend abgebildet. Die Signalzuordnung erfolgte analog zum PenG Konjugat. Im Spektrum sind alle erwarteten Signale eindeutig zu sehen. Der Polymerisationsgrad beträgt 21 Wiederholungseinheiten und 99% der Polymere besitzen eine antibiotische Endgruppe.

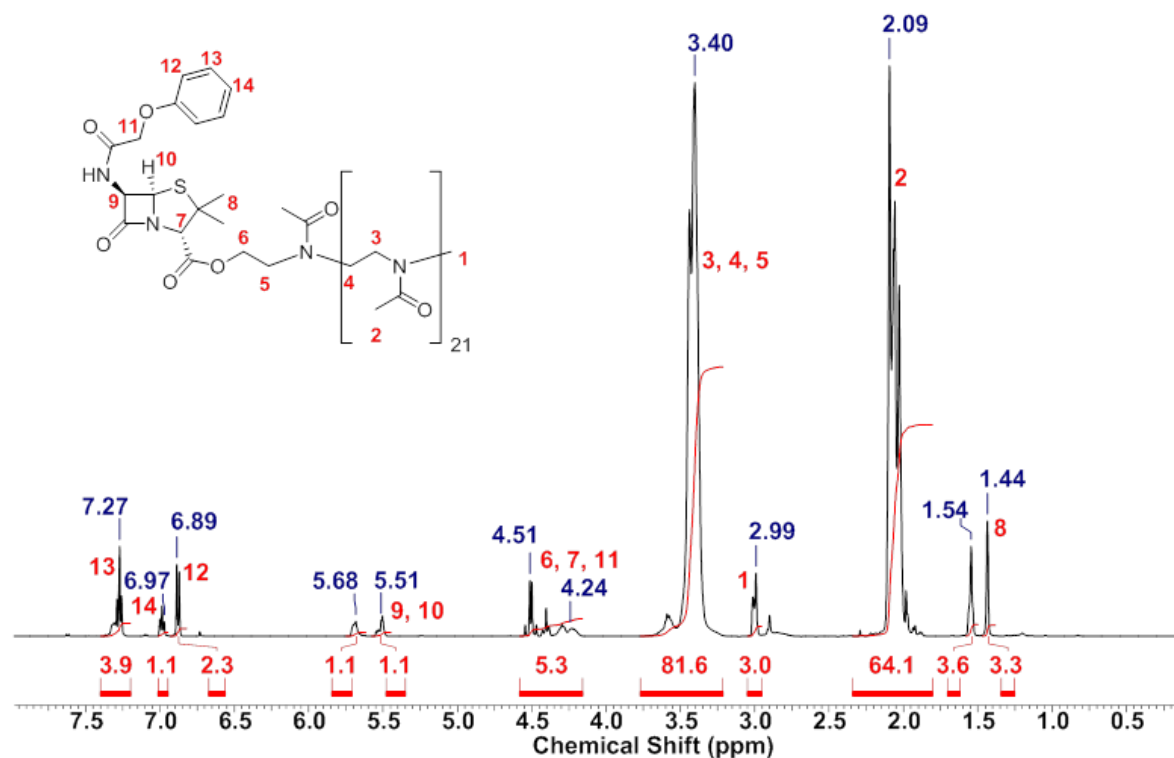


Abbildung 100: ^1H -NMR Spektrum von Me-PMeOx-PenV, aufgenommen in CDCl_3 (7.27 ppm). Oben links ist die Struktur von Me-PMeOx-PenV dargestellt. Die Protonen des Konjugats konnten den Signalen des Spektrums zugeordnet werden (1-14 in Rot).¹⁷¹

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) Messungen bestätigten die Analyse des ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 101). Me-PMeOx-PenG besitzt einen PDI von 1.13 und Me-PMeOx-PenV ein PDI von 1.09. Zusätzlich zur Variation der antibiotischen Endgruppen, wurde auch hier, wie auch schon bei den Ciprofloxacin-Konjugaten (Vergleich

Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 3.2.3.1) eine Variation des Polymerrückgrates vorgenommen um einen möglichen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität zu untersuchen. Daher wurden PEtOx und PiPrOx zur Konjugation von PenG und PenV verwendet. Abbildung 101 zeigt die schematische Syntheseroute. Die Modifikation mit dem entsprechenden β -Lactam-Antibiotikum erfolge wie zuvor beim PMeOx.

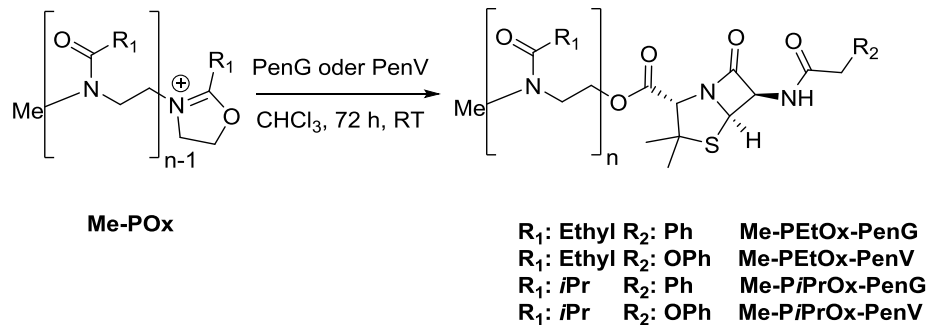


Abbildung 101: Syntheseroute zur Synthese von PEtOx- und PiPrOx-Penicillin-Konjugaten. ¹⁷¹

Die Penicillin-Konjugate auf Basis von PEtOx und PiPrOx wurden wie zuvor mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und GPC untersucht. Die gemessenen Spektren sind im Anhang zu finden, eine Zusammenfassung der analytischen Daten ist in Tabelle 20 gegeben. Alle Konjugate zeigen, dass die Mehrheit der Polymere (über 70%) eine antibiotische Endgruppe und eine Methylinitiatorgruppe besitzen. Der PDI liegt zwischen 1.09-1.26 und entspricht damit dem Charakter einer lebenden Polymerisation.

Des Weiteren sollten Einflüsse des Molekulargewichtes auf die antimikrobielle Aktivität untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden PMeOx-PenG-Konjugate mit Kettenlängen von 5, 10, 22 und 45 Wiederholungseinheiten hergestellt. Die analytischen Daten sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: Analytische Daten der GPC und ¹H-NMR-Spektroskopie Messungen der hergestellten Penicillin-Polymer-Konjugate.

Polymer	DP _{NMR} [*]	M _{n,NMR} [g·mol ⁻¹]	M _{n,GPC} [g·mol ⁻¹]	PDI _{GPC}	F _{NMR} ^{d**}
Me-PMeOx ₅ -PenG	5	800	800	1.10	97%
Me-PMeOx ₁₀ -PenG	10	1200	1400	1.12	99%
Me-PMeOx ₂₂ -PenG	22	2200	2200	1.12	82%
Me-PMeOx ₃₀ -PenG	30	2900	2900	1.13	99%
Me-PMeOx ₄₅ -PenG	45	4200	3900	1.19	95%
Me-PEtOx ₅₃ -PenG	53	4900	4900	1.36	70%
Me-PiPrOx ₂₉ -PenG	29	3600	3800	1.15	>99%
Me-PMeOx ₂₁ -PenV	21	2200	2300	1.09	>99%
Me-PEtOx ₃₈ -PenV	38	4100	4200	1.15	>99%
Me-PiPrOx ₂₄ -PenV	24	3100	2900	1.26	>99%

* Der Polymerisationsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie durch den Vergleich der entsprechenden Polymerrückgratsignale mit den Initiatorsignalen bestimmt. ** Funktionalitätsgrad wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu diente der Vergleich des Integrals der Endgruppensignale mit dem Integral des Initiatorsignals.

Um mögliche synergetische Effekte zu untersuchen sollte eine quartäre Ammoniumgruppe in das Konjugat eingeführt werden. Um dies zu bewerkstelligen wurde DDA-X als Initiator verwendet um Polymere auf Basis von PMeOx und PEtOx herzustellen. Diese Polymere wurden anschließend mit PenG und PenV terminiert. Dadurch kombiniert dieses Polymer eine antibiotische und eine biozide Gruppe (siehe Abbildung 102).

Ergebnisse und Diskussion

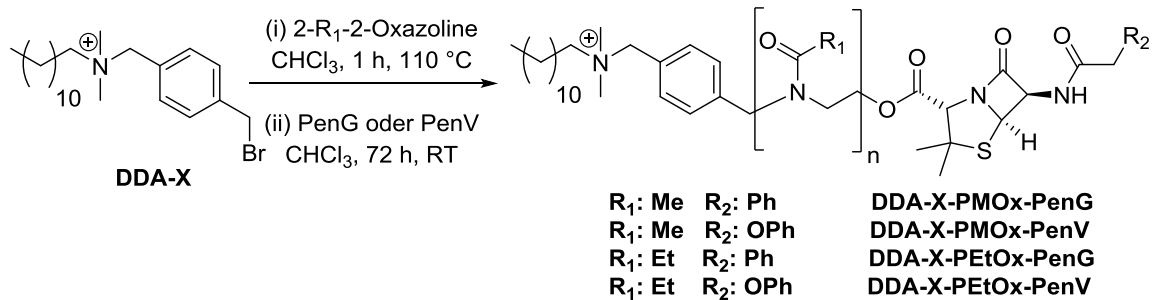


Abbildung 102: Synthese von DDA-X gestarteten PenG und PenV-Konjugaten. ¹⁷¹

Das ¹H-NMR-Spektrum von DDA-X-PMOx₃₀-PenG ist exemplarisch in Abbildung 103 gezeigt. Das DDA-X gestartete Konjugat zeigt die entsprechenden PMeOx und PenG Signale. Zusätzlich zu diesen Signalen sind auch die Protonen des DDA-X Initiators eindeutig zu erkennen. Das DDA-X zeigt eine Methylgruppe (**1**) bei 0.78 ppm, diese dient auch als Referenz des Spektrums. Der Rest der DDA-X-Alkylkette zeigt ein breites Signal bei 1.16-1.25 ppm (**2**), ein zweites bei 1.71 ppm (**3**) und ein weiteres bei 3.35 ppm (**4**) welche mit den Signalen des Polymerrückgrates überlagert. Des Weiteren sind die aromatischen Signale (**6**, **7**) bei 7.15 ppm sowie die Methylengruppen in benzylicher Position (**5**, **8**) bei 4.50 ppm zu identifizieren. Zudem lässt das ¹H-NMR-Spektrum auf einen Funktionalitätsgrad von mehr als 99% und Polymerisationsgrad von 30 Wiederholungseinheiten schließen.

Ergebnisse und Diskussion

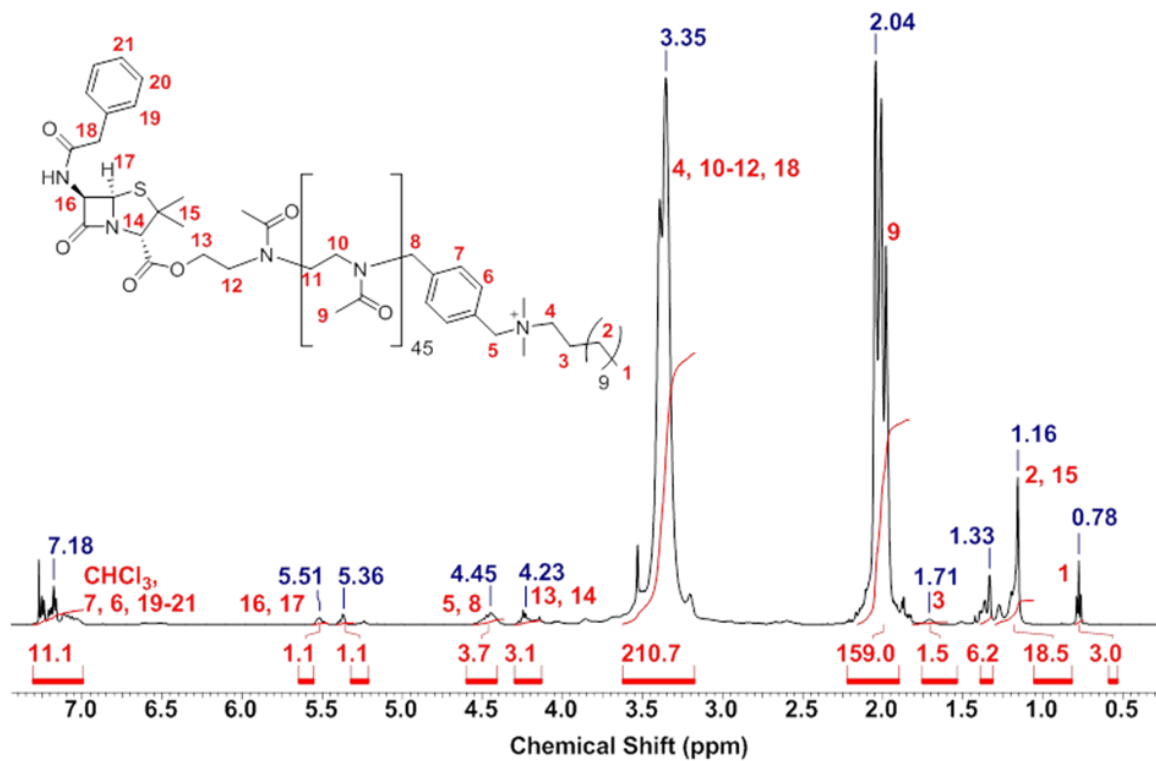


Abbildung 103: ¹H-NMR Spektrum von DDA-X-PMeOx-PenG, aufgenommen in CDCl₃ (7.27 ppm). Oben links ist die Struktur von DDA-X-PMeOx-PenG dargestellt. Die Protonen des Konjugats konnten den Signalen des Spektrums zugeordnet werden (1-21 in Rot).¹⁷¹

Die ¹H-NMR-Spektren von DDA-X-PMeOx-PenV, DDA-X-PEtOx-PenG und DDA-X-PEtOx-PenV sind im Anhang abgebildet. Die Auswertung der Spektren erfolgte entsprechend dieses Beispiels. Eine Zusammenfassung aus den erhaltenen Daten ist in Tabelle 21 aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 21: Analytische Daten der GPC und ¹H-NMR-Spektroskopie Messungen der hergestellten Penicillin-DDA-X-Polymer-Konjugate.

Polymer	DP _{NMR} ^{a)}	M _{n,NMR} [g·mol ⁻¹]	M _{n,SEC} [g·mol ⁻¹]	PDI _{SEC}	F _{NMR} ^{d)} ^{b)}
DDA-X-PMOx ₅₂ -PenG	52	4800	4000	1.18	>99%
DDA-X-PEtOx ₅₀ -PenG	50	4600	4100	1.60	>99%
DDA-X-PMOx ₂₂ -PenV	22	2200	2700	1.57	75%
DDA-X-PEtOx ₃₀ -PenV	30	2900	2500	1.46	>99%

3.3.2. Untersuchung der Langzeitstabilität der Polymer-Penicillin-Konjugate

Wie die ¹H-NMR-spektroskopischen Messungen der Polymer-Penicillin-Konjugate zeigen, handelt es sich bei der Bindung zwischen Polymer und Penicillin um eine Esterbindung. Nun soll die Stabilität dieser Esterbindung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Langzeit ¹H-NMR-spektroskopische Studien mit den Konjugaten Me-PMeOx-PenG und Me-PMeOx-PenV durchgeführt. Die Konjugate wurden in D₂O gelöst und für mehrere Tage gerührt. Dabei wurde alle 24 h ein ¹H-NMR-Spektrum der Konjugate aufgenommen. Das Signal der Protonen der Methylengruppe in α -Position der Esterfunktion bei 4.50 ppm sollte als Referenz der Hydrolyse dienen, welches aufgrund der Hydrolyse an Intensität verliert sollte. Abbildung 104 zeigt die ¹H-NMR-Spektren der beiden verschiedenen Konjugate an unterschiedlichen Tagen. Aus der Abbildung geht hervor, dass das Signal bei 4.50 ppm nicht schwächer wird und somit keine Hydrolyse der Esterbindung stattfindet. Allerdings lässt sich durch eine Verringerung der Signale des β -Lactamrings bei 5.50 ppm sowie das Erscheinen neuer Signale bei 1.00 ppm auf eine Hydrolyse des β -Lactamrings schließen. Außerdem geht aus den Messungen hervor, dass das Me-PMeOx-PenG schneller hydrolysiert wird als das Me-PMeOx-PenV. Während Me-PMeOx-PenG innerhalb von 18 Tagen eine vollständige Hydrolyse seiner Penicillinendgruppe erfährt, weist Me-PMeOx-PenV eine Halbwertszeit von etwa 63 Tagen auf. Die hier erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine stabile Esterbindung zwischen

Ergebnisse und Diskussion

Polymerrückgrat und Penicillin hin. Zudem bestätigen diese die Ergebnisse aus der ESI-MS Messungen. In beiden Fällen kann beobachtet werden, dass der β -Lactamring eher und schneller als die neu gebildete Esterbindung hydrolysiert. Daher kann auch davon ausgegangen werden, dass die antimikrobielle Aktivität auf das Konjugat und nicht auf abgespaltenes Penicillin zurückzuführen ist.

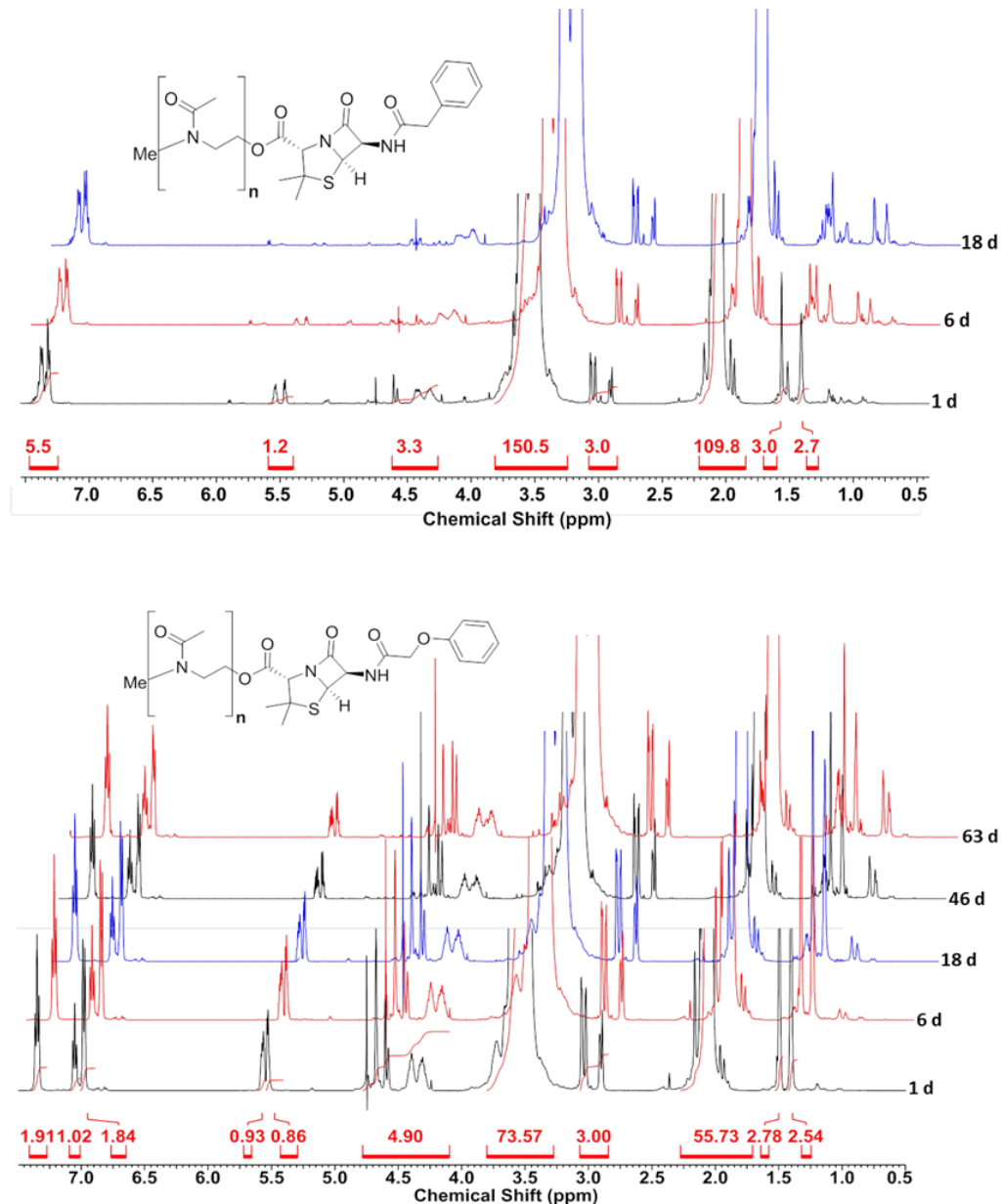


Abbildung 104: Langzeit-¹H-NMR-spektroskopische Studien zur Stabilität der Konjugate Me-PMeOx-PenG (oben) und Me-PMeOx-PenV (unten).¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

3.3.3. Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der Polymer-Penicillin-Konjugate

Zunächst wurden Me-PMeOx-PenG Konjugate mit verschiedenen Kettenlängen untersucht, um gegebenenfalls einen Einfluss des Molekulargewichts auf die antimikrobielle Aktivität, wie es bei den xCIP-Konjugaten der Fall war, zu beobachten. Diese Abhängigkeit wurde im Fall von CIP erwartet, da die Topoisomerase IV bzw. Gyrase sich im Zellinneren befindet, wodurch die Konjugate in die Zelle vordringen müssten. Lange Polymerreste könnten dabei hinderlich sein. Penicilline inhibieren das Enzym Transpeptidase, welches in der Zellwand lokalisiert ist. Damit muss das Antibiotikum nicht in die Zelle vordringen und somit sollte die antimikrobielle Aktivität nicht von der Polymerlänge beeinflusst werden. Die MIC-Werte gegen *S. aureus* für PenG-PMeOx-Konjugate mit Kettenlängen von 5-45 Wiederholungseinheiten ist in Abbildung 105 dargestellt.

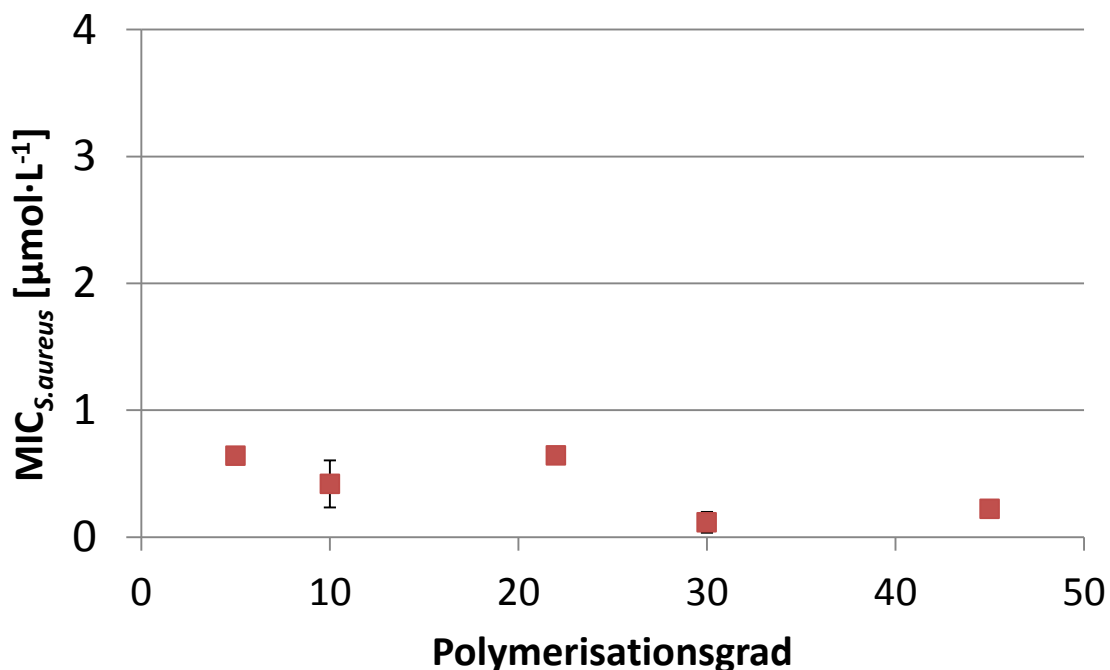


Abbildung 105: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gegen *S. aureus*, aufgetragen gegen Konjugate mit verschiedenen Kettenlängen.¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Die MIC-Werte der Konjugate liegen im Bereich von $0.20 \pm 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ zu $0.64 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ unabhängig von der Kettenlänge. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivitäten der hergestellten PAKs wie erwartet unabhängig vom Polymerisationsgrad sind. Um einen Einfluss des Polymerrückgrates auf die antimikrobielle Aktivität der konjugierten Penicilline zu untersuchen, wurde eine Reihe von verschiedenen Polymerrückgraten mit unterschiedlichen Hydrophobizitäten gegen die bakteriellen Stämme *S. aureus*, *S. mutans*, und *E. coli* getestet. Als Polymerrückgrate wurden PMeOx, PEtOx und PiPrOx verwendet. Zusätzlich wurden auch Konjugate mit einer zweiten bioziden Gruppe, DDA-X gegen die gleichen Bakterien getestet. Die MIC-Werte der entsprechenden freien Antibiotika, PenG und PenV sowie die MIC-Werte für ein weiteres Penicillinase resistentes Penicillin, namens Cloxacillin (Clox) wurden ebenfalls für die drei Bakterienstämme bestimmt. Die Ergebnisse des MIC-Wertes sind in Abbildung 106 gezeigt.

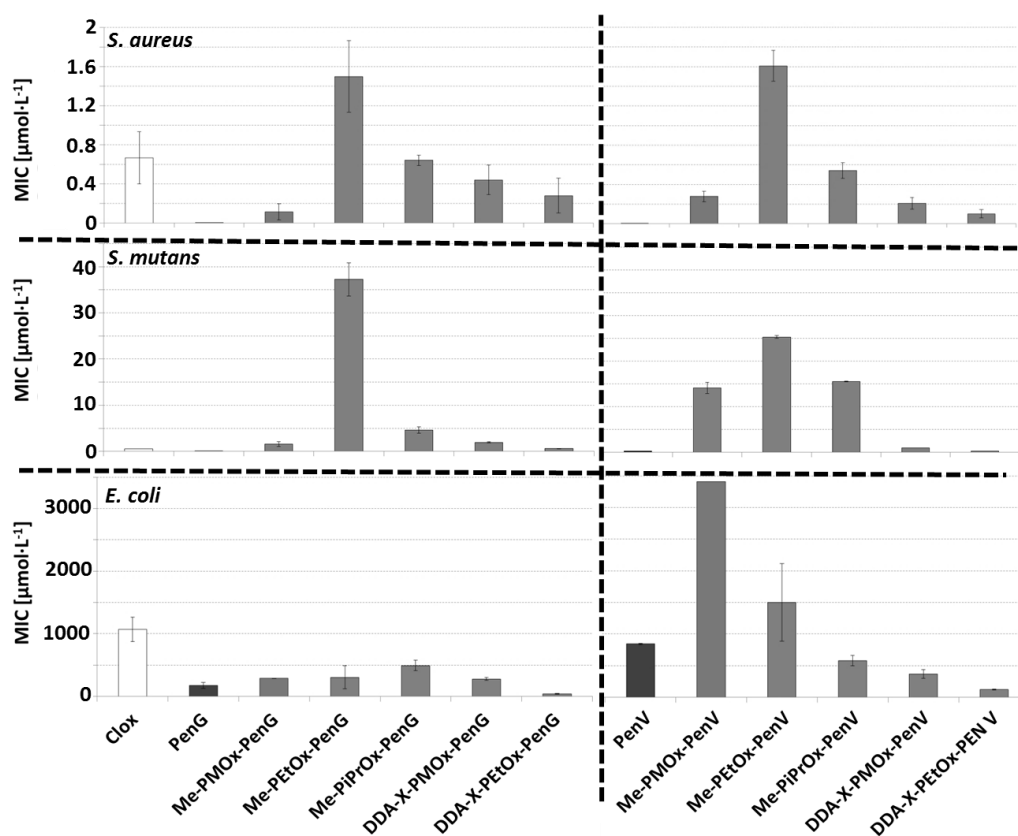


Abbildung 106: MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für die drei Bakterienstämme *S. aureus*, *S. mutans* und *E. coli* für die PAKs auf Penicillinbasis sowie für PenG, PenV und Clox. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt und die Fehlerbalken sind die entsprechenden Mittelwertabweichungen. ¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 106 zusehen ist, sind die MIC-Werte gegen *S. aureus* der POx Konjugate des PenG und PenV um etwa zwei Größenordnungen höher als die MIC-Werte von den niedermolekularen Antibiotika. Obwohl die Antibiotika durch die Konjugation massiv an Aktivität verlieren, sind die meisten MIC_{*S.aureus*}-Werte der Konjugate immer noch besser als die MIC-Werte von Clox. Die Aktivitäten der verschiedenen POx Derivate zeigen, dass das hydrophilste PMeOx die höchste Aktivität gegen *S. aureus* aufweist. Im Fall von CIP-Konjugaten, zeigt hingegen PEtOx die höchste Aktivität unter den POx Derivaten. Konjugate mit einer zusätzlichen DDA-X Gruppe weisen eine signifikant höhere Aktivität als die PAKs mit Methylstartergruppe auf. Die Aktivitäten gegen *S. mutans* zeigen einen ähnlichen Trend wie die MIC-Werte gegen *S. aureus*. Allerdings sind die MIC-Werte der Konjugate eine Größenordnung näher an den MIC-Werten von PenG und PenV. Im Fall von DDA-X-PEtOx-PenV erreicht die molare Aktivität an die Aktivität der Antibiotika. Ein anderes Bild findet sich bei der Betrachtung der antimikrobiellen Aktivität gegen den GRAM-negativen Stamm *E. coli*. Die freien Penicilline sind kaum aktiver gegen *E. coli* als die Konjugate. Diese weisen eine ähnliche Aktivität auf. Hier zeigt die eingeführte DDA-X Gruppe eine signifikante Verbesserung der Aktivität. So sind die DDA-X-PEtOx Konjugate vier (-PenG) bis neun (-PenV) mal aktiver als die entsprechenden freien Antibiotika und deutlich aktiver als das Clox. Dies zeigt, dass die beiden antimikrobiellen Verbindungen einen synergistischen Effekt besitzen, wenn diese in einem Makromolekül vereinigt sind.

3.3.4. Untersuchung der Penicillinasestabilität.

Die Penicillinase katalysierte Hydrolyse ist der Hauptanpassungsmechanismus von Penicillin-resistenten Bakterien.⁵⁷ Daher wurde die Hydrolyse der verschiedenen Penicillin-Konjugaten sowie der niedermolekularen Penicilline in Anwesenheit des Enzyms Penicillinase untersucht. Dabei wurde ein iodometrisches Assay nach dem Protokoll von Novick *et. al.*¹⁷⁷ verwendet. Der iodometrische Assay beruht darauf, dass das Hydrolyseprodukt Penillosäure im Gegensatz zu Penicillin Iod reduzieren kann. Die Reduktion von Iod und somit die Hydrolyse von Penicillin zu Penillosäure konnte mit Hilfe einer Iod-Stärke-Lösung sichtbar gemacht werden, wobei sich die Hydrolyse aus der

Ergebnisse und Diskussion

Entfärbungsrate ergibt. Die Entfärbung des Iod-Stärke-Komplexes wurde mit einem Photometer verfolgt. PenG zeigt eine vollständige Entfärbung in der Anwesenheit von Penicillinase nach 1000 Sekunden bei 25 °C. Wie in

Abbildung 107 zu sehen zeigt das PenG-PMeOx Konjugat eine fünffach langsamere Hydrolyse im Vergleich zum freien Antibiotikum. Um zu überprüfen ob das Polymer selbst die Hydrolyse durch das Enzym inhibiert wurde der Test mit einer Mischung aus PMeOx und PenG wiederholt. Der Test zeigt, dass das Polymer nur zu einer geringen Erniedrigung der Hydrolyserate fähig ist. Die Hydrolyse des Me-PEtOx-PenG Konjugats ist mehr als zehnmal langsamer im Vergleich zum PenG. Das hydrophobere Me-PiPrOx-PenG hydrolysiert nur achtmal langsamer. Die Hydrolyse durch Penicillinase der PenV Konjugate ist durch die Konjugation stärker inhibiert als bei den PenG Konjugaten. Hier hydrolysieren PMeOx und PEtOx Konjugate bis zu 50-mal langsamer als das freie PenV. Diese Hydrolyserate befindet sich in der gleichen Größenordnung wie die des Clox.

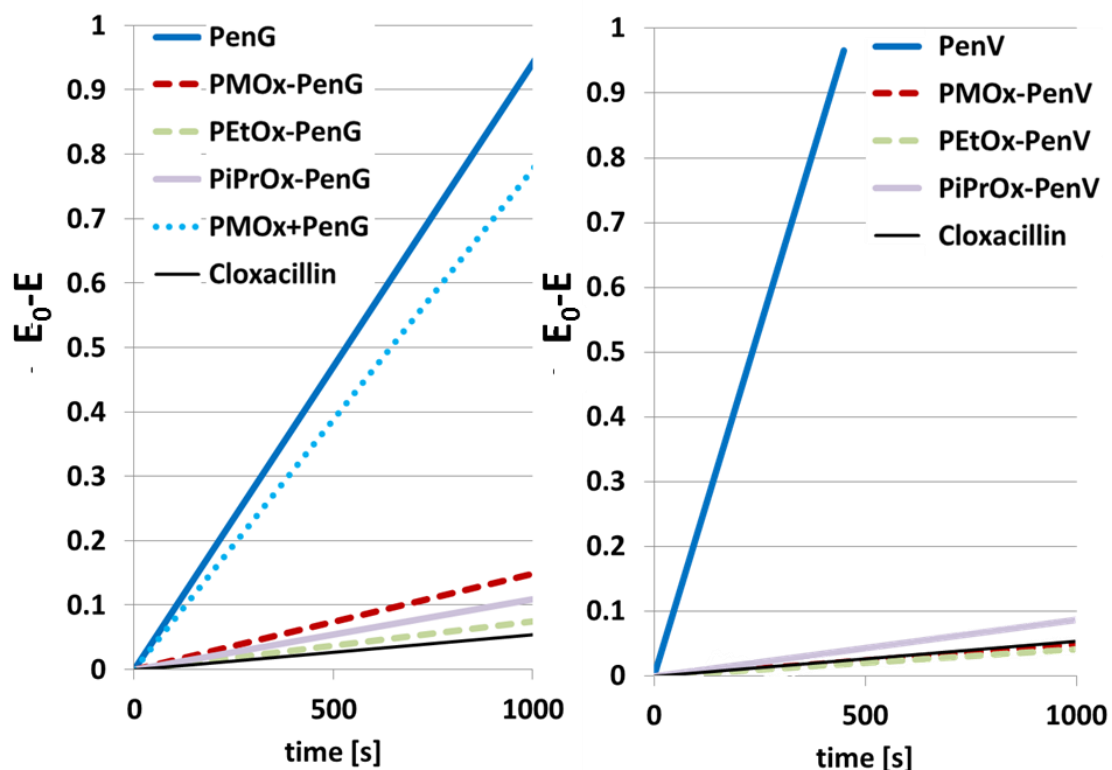


Abbildung 107: Iodometrisches Assay zur Untersuchung der Penicillinase Aktivität gegen PenG, PenV, Clox und den verschiedenen Konjugaten. E_0 ist die Extinktion der Probe vor der Zugabe von Penicillinase in Bezug auf die Kontrolle (Assay ohne Penicillinase) und E ist die Extinktion nach Zugabe der Penicillinase nach einer Reaktionszeit (t) in Bezug zur Kontrolle. ¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Wie erwartet zeigen die PAKs eine deutliche höhere Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch das Enzym Penicillinase im Vergleich zu PenG und PenV. Nun stellt sich die Frage, ob diese Penicillinase-Stabilität auch zu hohen Aktivitäten gegen Penicillinase-produzierende Stämmen führt. Daher wurden MIC-Werte gegen den GRAM-positiven Stamm *S. aureus* in Anwesenheit von Penicillinase im Nährmedium ermittelt. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe der Proben in einem Nährmedium angefertigt. Anschließend folgte die Zugabe von Penicillinase. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten wurde die Verdünnungsreihe mit *S. aureus* angeimpft. In Abbildung 108 ist gezeigt, dass die Zugabe von Penicillinase zu einer Inaktivierung der niedermolekularen Antibiotika PenG und PenV führt, wohingegen die entsprechenden POx Konjugate trotz der Zugabe des Enzyms noch eine antimikrobielle Wirkung aufweisen. Wie in der Vergrößerung der Abbildung zusehen ist, verlieren die Konjugate auch ein bis zwei Größenordnungen an Aktivität durch Anwesenheit der Penicillinase. Dies entspricht aber immer noch einer 20-350-fach höheren Resistenz gegen dieses Enzym im Vergleich zu den niedermolekularen Antibiotika. Im Gegensatz zu den Penicillinase-labilen PenG und PenV weist das Clox einen doppelt so hohen MIC-Wert gegen *S. aureus* in Anwesenheit des Enzyms auf. Die höchste Aktivität in Anwesenheit von Penicillinase ist mit $3\text{-}6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ die Aktivität der DDA-X-PEtOx Konjugat. Damit ist die Aktivität dieser Konjugate um ein drei bis vierfaches niedriger als das Penicillinase-stabile Clox. Diese Ergebnisse zeigen das POx Konjugate ein hilfreiches Werkzeug bei der Herstellung von Penicillinase-stabileren Penicillinen sind. Die POx Modifikation ist zwar nicht so effektiv wie Clox, aber einige der PenG und PenV Konjugate sind nahezu ähnlich aktiv wie dieses Antibiotikum in Anwesenheit von PenG und PenV und bis zu sechsmal aktiver in Abwesenheit der Penicillinase. Die Ergebnisse zeigen, dass der Penicillinase Assay nicht direkt in die antimikrobielle Aktivität übersetzt werden kann, allerdings einen qualitativen Hinweis geben kann.

Ergebnisse und Diskussion

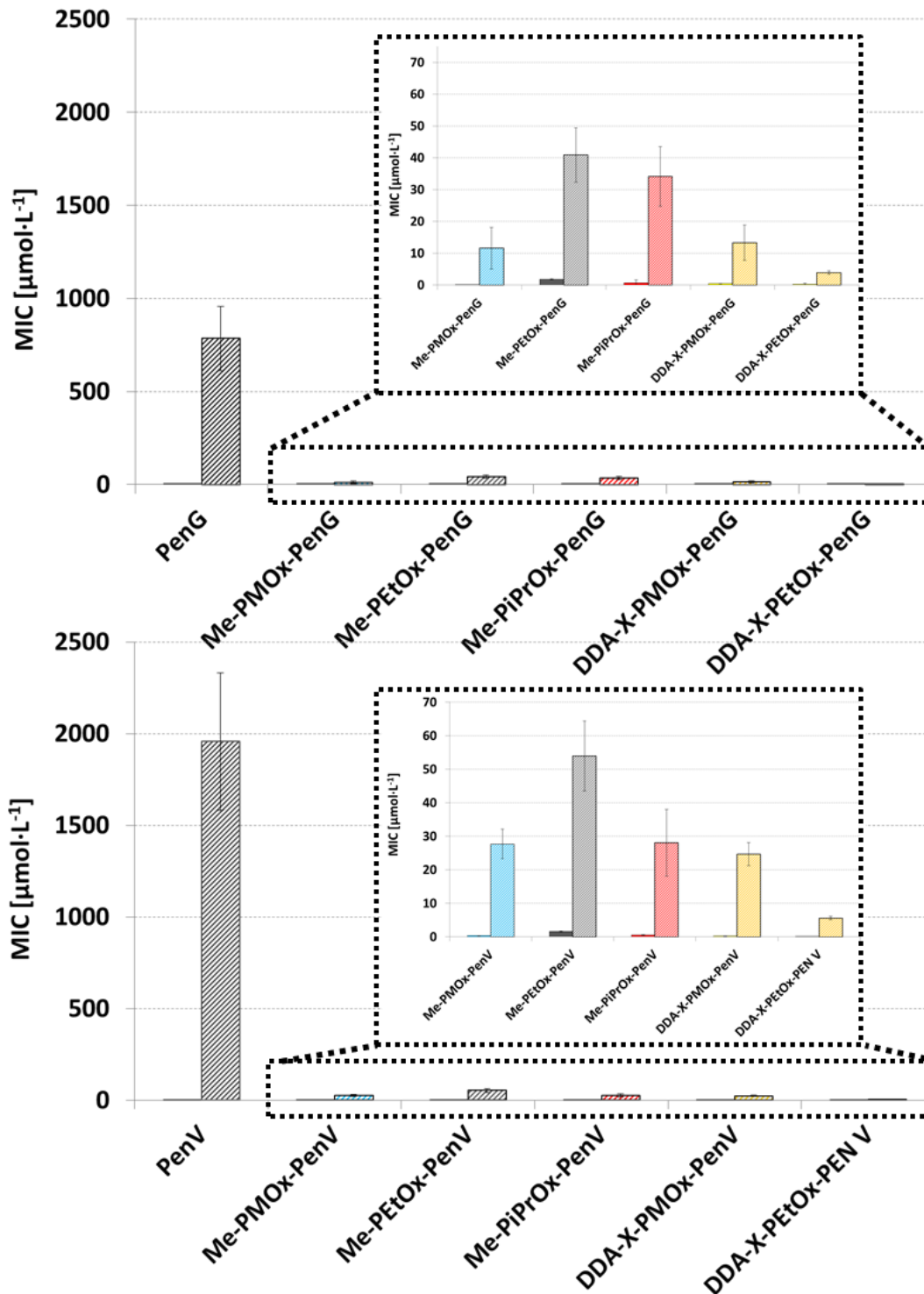


Abbildung 108: MIC-Werte ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gegen *S. aureus* von PenG, PenV sowie den verschiedenen Konjugaten mit (rechte Balken) und ohne Penicillinase (linke Balken). Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt, die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen mittleren Abweichung.¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Die Konjugate mit zwei verschiedenen antimikrobiellen Verbindungen in einem Polymer besitzen eine höhere Aktivität gegen *E. coli* als die niedermolekularen Antibiotika und sind die aktivsten Konjugate in Anwesenheit von Penicillinase, da die DDA-X Gruppe nicht durch das Enzym beeinflusst wird. Um dies etwas detaillierter zu untersuchen, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde die antimikrobielle Aktivität gegen *S. aureus*, *S. aureus*/Penicillinase sowie *E. coli* für die Polymere DDA-X-PEtOx-PenG, DDA-X-PEtOx-OH (DDA-X-PEtOx) und einer 1:1 Mischung aus DDA-X-PEtOx und PenG sowie für reines PenG getestet.

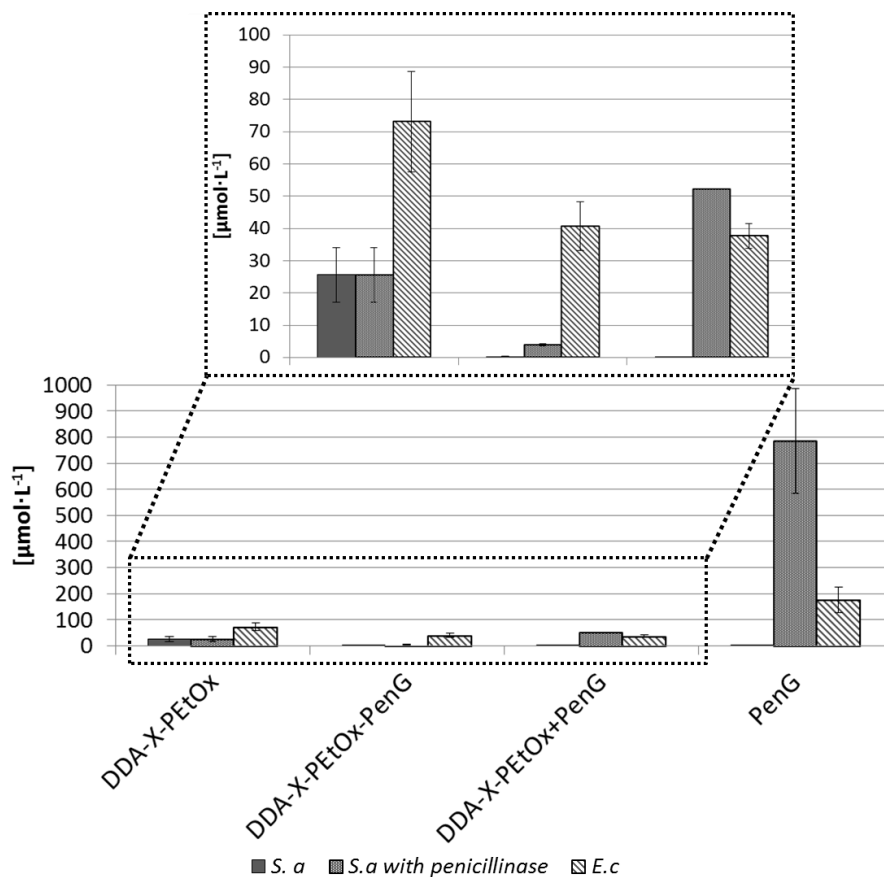


Abbildung 109: MIC-Werte ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) gegen *E. coli* und *S. aureus* in Anwesenheit und Abwesenheit von Penicillinase. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der MIC-Werte. Alle Messungen MIC-Werte wurden durch Dreifachbestimmung bestimmt. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Abweichung.¹⁷¹

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieses Testes sind in Abbildung 109 dargestellt. DDA-X-PEtOx zeigen identische MIC-Werte gegen *S. aureus* sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von Penicillinase. Die Mischung aus PenG und DDA-X-PEtOx besitzt einen ähnlichen MIC-Wert gegen *S. aureus* in Anwesenheit von Penicillinase wie das DDA-X-PEtOx, während das DDA-X-PEtOx-PenG eine 13-fach niedrigeren MIC-Wert bei Anwesenheit des Enzyms aufweist. Dies weist darauf hin, dass ein Teil der PenG Endgruppen noch aktiv ist. Die MIC-Werte gegen den GRAM-negativen Bakterienstamm *E. coli* für DDA-X-PEtOx-PenG und die Mischung aus DDA-X-PEtOx und PenG sind viermal niedriger als die vom reinen PenG. Dies weist in beiden Fällen auf einen synergistischen Effekt der beiden antimikrobiellen Gruppen hin. Allerdings ist für diesen Effekt keine kovalente Bindung nötig.

3.3.5. Untersuchung der Hämokompatibilität der Polymer-Penicillin-Konjugate

Wie schon zuvor bei den Ciprofloxacin-Polymer-Konjugaten wurden auch die Penicillin-Polymer-Konjugate auf ihre Kompatibilität gegenüber roten Blutzellen getestet. Zudem wurde noch die Hämokompatibilität der niedermolekularen Verbindungen PenG, PenV und Clox ermittelt. Für diese Verbindungen konnte jedoch keine hämolytische Aktivität beobachtet werden. Ähnliches zeigen auch die Konjugate, die eine Methylstartergruppe besitzen. Auch hier kann kein HC_{50} -Wert bestimmt werden. Diese Polymere weisen eine maximale Blutzellyse von unter 2.5% bei einer Konzentration von $34000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf. Ein anderes Bild zeigen die Konjugate mit einer DDA-X Endgruppe, diese Konjugate weisen einen HC_{50} -Wert zwischen $2000-9000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf. Dabei bildet DDA-X-PMeOx-PenV eine Ausnahme. Hierbei kann bei den verwendeten Konzentrationen kein HC_{50} -Wert ermittelt werden. Das Konjugat zeigt bei der höchsten getesteten Konzentration eine Lyse von 3%. Außerdem fällt bei der Betrachtung der Werte auf, dass die DDA-X-PEtOx Konjugate hämolytisch aktiver als die DDA-X-PMeOx Konjugate sind. Weiterhin fällt auf, dass die DDA-X-Konjugate mit einer PenG Endgruppe eine höhere Lyse bzw. HC_{50} -Wert aufweisen als ihre Pendants mit einer PenV Gruppe. Eine Zusammenfassung der Lysegrade und der HC_{50} -Wert ist in Tabelle 22 gegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 22: Hämokompatibilität der verschiedenen Konjugate, PenG, PenV, Cloxacillin und DTAC.

PAK	HC ₅₀ [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Lyse [%]
Me-PMOx ₃₀ -PenG	>21000	<1%
Me-PEtOx ₅₃ -PenG	>24000	<1%
Me-PiPrOx ₂₉ -PenG	>5300	<1%
Me-PMOx ₂₁ -PenV	>34000	2.5%
Me-PEtOx ₃₈ -PenV	>16000	<1%
Me-PiPrOx ₂₄ -PenV	>10000	<1%
DDA-X-PMOx ₅₂ -PenG	5100	50%
DDA-X-PEtOx ₅₀ -PenG	2000	50%
DDA-X-PMOx ₂₂ -PenV	>29000	3.2%
DDA-X-PEtOx ₃₀ -PenV	9900	50%
PenG	>27500	<1%
PenV	>22000	<1%
Cloxacillin	>7000	<1%

3.3.6. Zusammenfassung der Penicillin-Polymer-Konjugate

Die Konjugation von POx mit PenG und PenV konnte mittels Direktterminierung des lebenden kationischen Kettenendes erfolgen. Die Penicillin-Konjugate zeigen im durchgeführten MIC-Test eine schwächere Aktivität gegen *S. aureus*, *S. mutans* und *E. coli* als ihre niedermolekularen Pendants. Dafür weisen sie aber eine 20-350-fach geringere Anfälligkeit gegenüber dem Resistenzenzym Penicillinase auf. Dadurch sind die Konjugate bis zu 350-mal aktiver in Anwesenheit dieses Enzyms. Im Gegensatz zu den CIP-Konjugaten zeigen die Penicillin POx-Konjugate keine Aktivitätsabhängigkeit vom Molekulargewicht der POx-Kette. Daraus lässt sich schließen, dass die Penicillin-Konjugate einen ähnlichen Wirkmechanismus wie das freie Antibiotikum besitzen. Die PAKs müssen nicht in das Zellinnere um ihre Wirkung zu entfalten, daher existiert auch kein diffusionsbegrenzendes Polymergewicht. Ein Vergleich mit dem Penicillinase-

Ergebnisse und Diskussion

stabilen Antibiotikum Cloxacillin zeigt, dass die Konjugate in vielen Fällen aktiver gegen *S. aureus*, *S. mutans* und *E. coli* sind, allerdings nicht in Anwesenheit von Penicillinase. Die Einführung von DDA-X führt zu einer Erhöhung der Aktivität der Konjugate auch in Anwesenheit des Resistenzzyms Penicillinase. Diese Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität wird durch eine leichte Zunahme der Hämotoxizität begleitet. Eine Zusammenfassung aller MIC-Werte in $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ und $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sind im Anhang in Tabelle 39 und Tabelle 40 gezeigt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Penicillin-Konjugate eine vielversprechende Methode zur Penicillin-Modifikation darstellt, wodurch die entstehenden Antibiotika-Konjugate stabiler gegen die Penicillinase katalysierte Hydrolyse werden.

Ergebnisse und Diskussion

3.4. Antimikrobielle Materialien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese von antimikrobiellen Materialien auf Basis von amphiphilen Polymer Netzwerken (engl. Amphiphilic polymeric conetworks, APCNs). Dabei sollten zum einen kovalent und zum anderen nicht-kovalent verknüpfte APCNs verwendet werden. Als antimikrobielle Komponente sollten PAKs dienen.

3.4.1. Herstellung von antimikrobiellen Materialien auf Basis kovalent vernetzter Polymernetzwerke

Amphiphile ABA-Triblockcopolymere sollten mit PAKs zu kovalent Vernetzten APCNs umgesetzt werden. Dabei sollte der Einbau der PAKs über ein permanente Bindung erfolgen um somit ein kontaktaktives Material zu generieren.

3.4.1.1. Herstellung der Polymer Netzwerke

Für die Herstellung der kovalent verknüpften APCNs wurden die ABA-Triblockcopolymere aus Kapitel 3.1.5 verwendet. Dabei sollte zunächst die Vernetzung der Triblockcopolymere untersucht werden. Die Vernetzung sollte mittels radikalischer Polymerisation der Endgruppen erfolgen. Als Photoinitiator diene Irgacure 651 (Abbildung 110). Die hergestellten Netzwerkproben wurden mit dem Namenskürzel NW ergänzt um sie im weiterem von den unvernetzten ABA-Triblockcopolymere sowie den entsprechenden Homopolymeren zu unterscheiden.

Ergebnisse und Diskussion

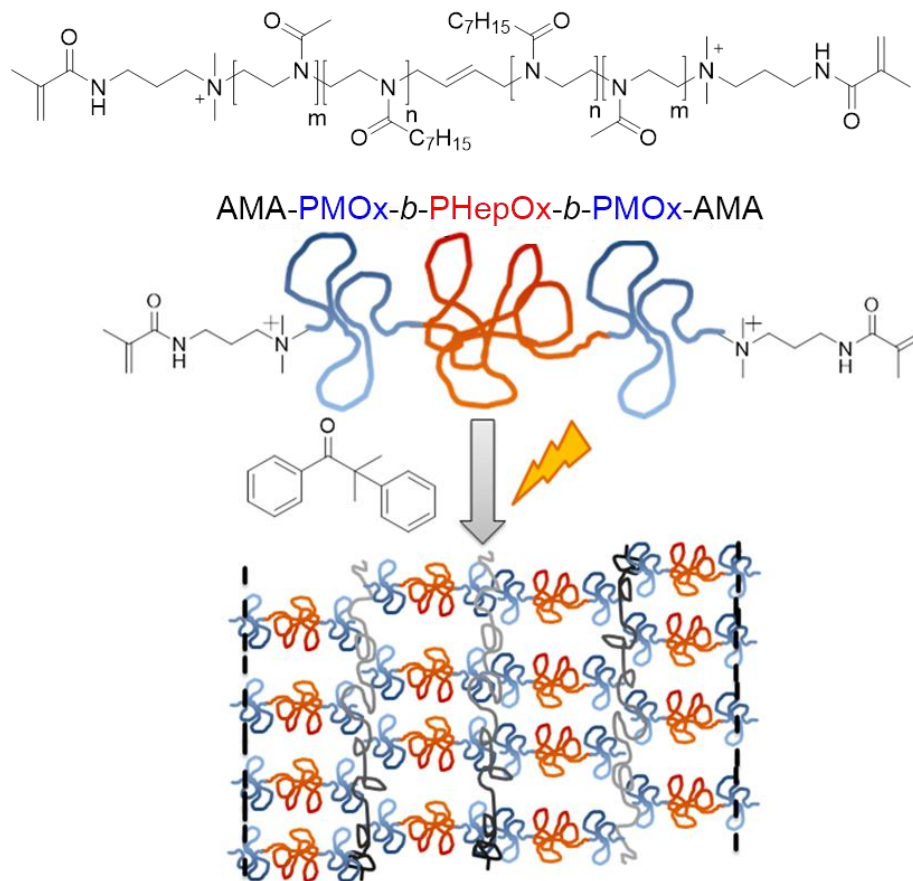


Abbildung 110: Schematische Darstellung der Vernetzung von AMA-terminierten Polymeren am Beispiel eines Triblockcopolymers. ^{15, 149}

Die Netzwerke wurden anschließend mit einem, für beide Blöcke geeigneten, Lösungsmittel gewaschen. Hierfür wurde Methanol verwendet. Durch gravimetrische Messungen vor und nach dem Waschen konnte der Sol-Anteil der einzelnen amphiphilen Polymerconetze (APCN) bestimmt werden. In Tabelle 23 sind die extrahierten Sol-Anteile der einzelnen Polymernetzwerke dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 23: Zusammenfassung des extrahierten Sol-Anteils sowie der PHepOx-Anteil nach der Extraktion. ¹⁴⁹

Name der Netzwerkproben	Sol-Anteil [Gew.%]	PHepOx Anteil nach dem Waschen[vol.%]
NW-MHM1	42	19
NW-MHM2	28	38
NW-MHM3	35	52
NW-MHM4	68	68
NW-MHM5	69	81
NW-H	56	100
NW-M	54	0

Nachdem der Sol-Anteil durch Extraktion entfernt wurde, wurde die Zusammensetzung des verbliebenden Polymernetzwerkes untersucht. Dazu wurde die ATR-FT-IR Spektroskopie verwendet. Eine ATR-FT-IR Spektroskopie-Messung ist in der nachfolgenden Abbildung 111 gezeigt. Das Methylenschwingungssignal des PHepOx-Blockes bei 2925 cm^{-1} eignet sich besonders für eine Quantifizierung. Dabei wurden die nicht extrahierten Netzwerke zur Kalibrierung verwendet. Das in der Abbildung 111 gezeigte Netzwerk NW-MHM 3 weist nach der Extraktion einen PHepOx-Anteil von 52 vol.% auf. Eine Zusammenfassung der Netzwerkzusammensetzung nach der Extraktion ist in Tabelle 23 dargestellt. Die Netzwerke MHM 4 und 5 weisen nach der Extraktion keine signifikante Abweichung in ihrer Zusammensetzung auf. Die restlichen Netzwerke (MHM1-3) zeigen eine Verschiebung ihrer Zusammensetzung zugunsten des PMeOx-Blockes erfahren. Die Sol-Anteile für MHM 4 und 5 sind mit 68 vol.% und 69 vol.% ungewöhnlich hoch. Dies weist auf eine geringere Vernetzungseffizienz dieser Netzwerke hin.

Ergebnisse und Diskussion

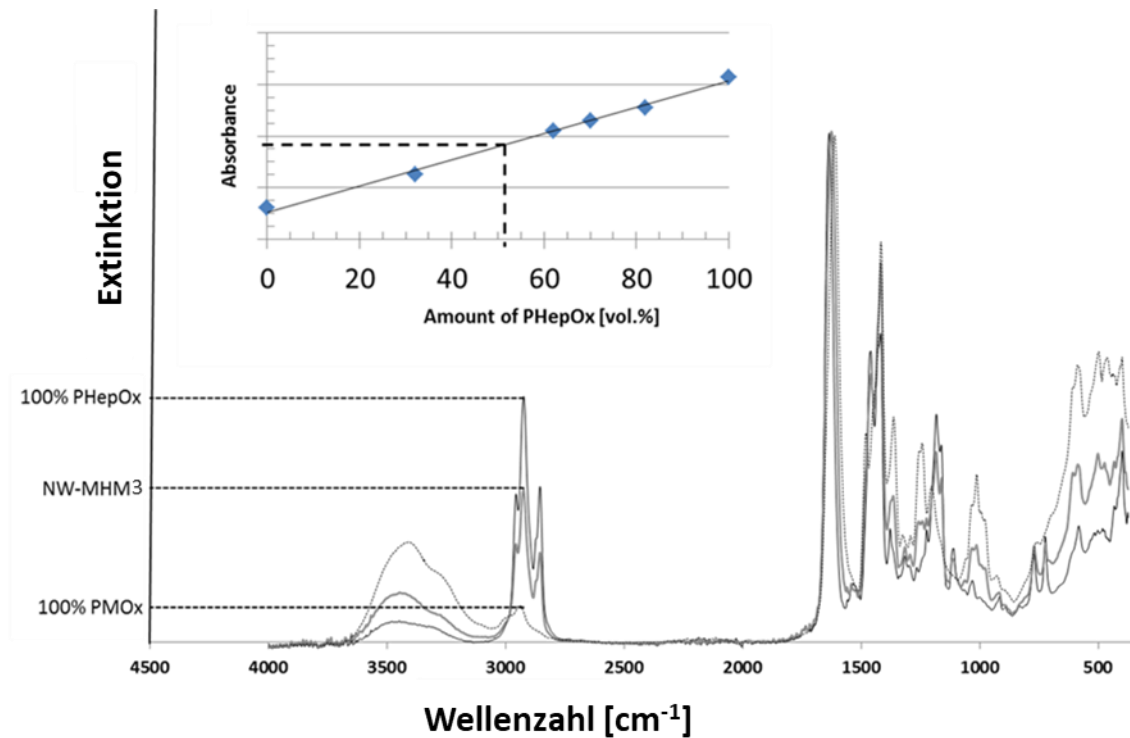


Abbildung 111: IR-Spektrum des Netzwerkes NW-MHM3 (unten) sowie NW-H und NW-M. Zudem ist im Ausschnitt die Kalibrierkurve mit den nicht extrahierten Netzwerken dargestellt.¹⁴⁹

Um den Vernetzungsgrad genau zu untersuchen, wurden die Netzwerke in Chloroform, ein geeignetes Lösungsmittel für beide Blöcke, gequollen. Es zeigte sich, dass die Netzwerke mit niedrigem Sol-Anteil einen Quellgrad von 7.5 ± 1 und Netzwerke mit hohem Sol-Anteil einen Quellgrad von 16.5 ± 2.5 haben. Nach der *Flory-Rehner* Theorie¹⁷⁸ weist dies auf eine drei bis vierfach niedrigere Vernetzungsdichte hin. Das bedeutet, dass die Netzwerke NW-MHM 4 und 5 verhältnismäßig viele „Dangling Ends“ besitzen. Allerdings sind diese „Dangling Ends“ homogen im Netzwerk verteilt, da alle Netzwerke vollständig transparent waren (Vergleich Abbildung 112).

Ergebnisse und Diskussion

3.4.1.2. Untersuchung der Netzwerkeigenschaften

Die extrahierten Netzwerke wurden nun auf ihre Quelleigenschaften in ausgewähltem Lösungsmittel untersucht. Neben dem bereits erwähnten Chloroform wurde Toluol, Methanol und Wasser ausgewählt. Aufgrund des amphiphilen Charakters der Triblockcopolymeren quillt jede Polymerphase unabhängig in dem entsprechenden hydrophilen bzw. hydrophoben Lösungsmittel. Die Quellgrade wurden gravimetrisch bestimmt und die gemessenen Quellgrade gegen den PHepOx-Anteil aufgetragen (siehe Abbildung 112). Die Polymernetzwerke zeigen eine kontinuierliche Zunahme des Quellgrades mit zunehmender Größe des PHepOx Blockes in Toluol. Die Quellung in Methanol zeigt einen linearen Anstieg des Quellgrades mit steigendem PHepOx-Anteil. Die Quellversuche in Wasser hingegen zeigen eine deutliche Abnahme des Quellgrades mit steigendem PHepOx-Anteil im Netzwerk.

Ideal amphiphile APCNs würden für ein PHepOx- bzw. PMeOx selektives Lösungsmittel keine Quellung aufweisen bis der PHepOx bzw. PMeOx-Block mehr als 50 Gew.% beträgt. Dann sollte der Quellgrad drastisch ansteigen und sofort danach ein Plateau erreichen. Die Quellexperimente der hier hergestellten Polymernetzwerke in Wasser und in Toluol weisen daher auf ein nicht ideales aber dennoch amphiphiles Verhalten hin.

Ergebnisse und Diskussion

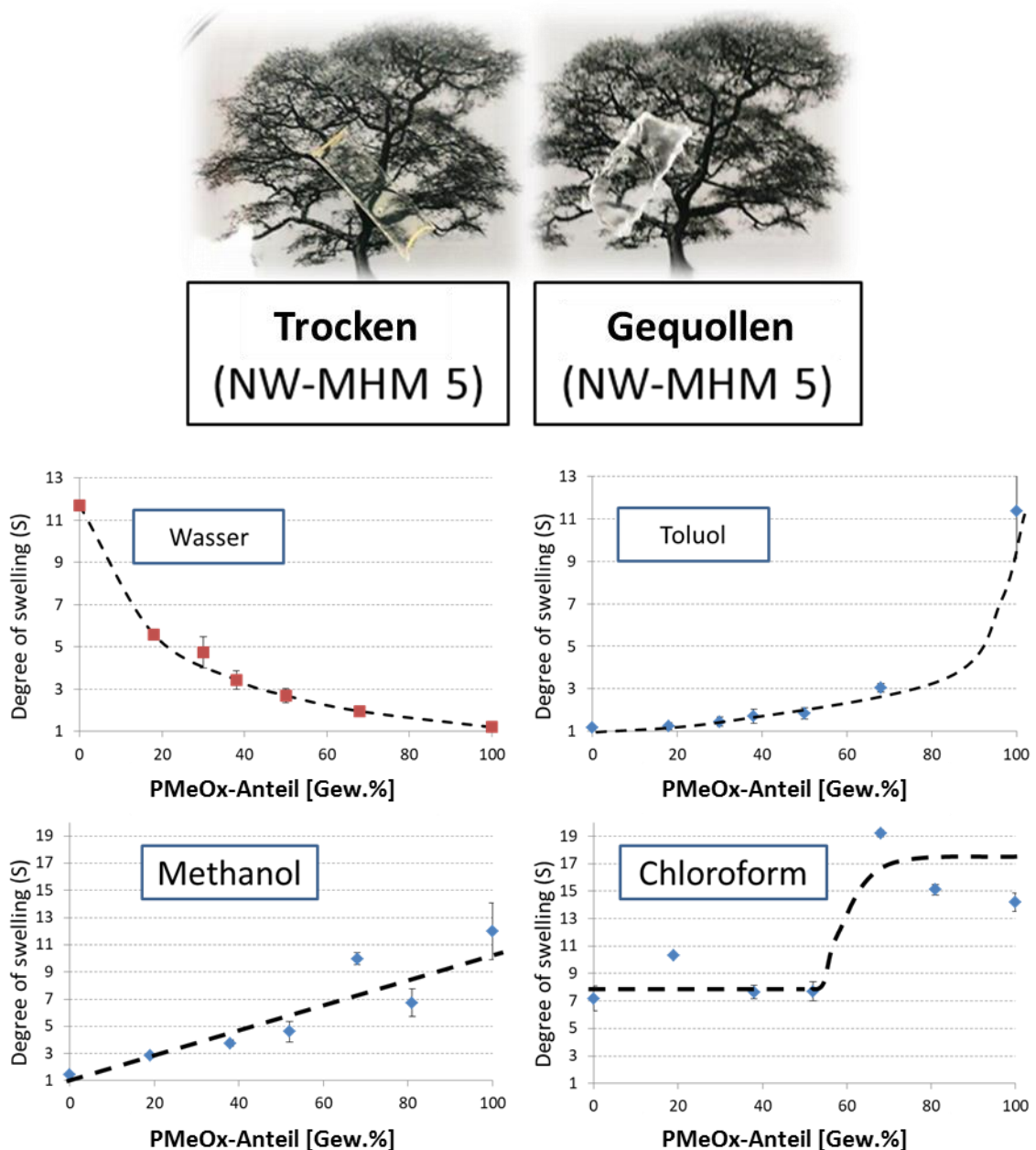


Abbildung 112: Quellgrad der hergestellten Polymernetzwerke in Wasser, Methanol, Toluol und Chloroform. sowie Abbildung des Netzwerkes NW-MHM 5 in gequollenem und trockenem Zustand. ¹⁴⁹

3.4.1.3. Einbau von Penicillin-Polymer Konjugate in Polymernetzwerke

Eine Möglichkeit Antibiotika in Netzwerke einzubauen ist die Verwendung von Polymer-Antibiotika-Konjugaten. Die Verwendung von Polymer-Konjugaten bietet den Vorteil, dass das Antibiotikum über eine funktionelle Gruppe am anderen Ende des Polymers

Ergebnisse und Diskussion

eingebaut werden kann. Da die Modifikation nicht direkt am Wirkstoff stattfindet sondern am entgegen gesetzten Polymerende, bleibt die Aktivität erhalten.^{134, 179, 180} Die Vernetzung der einzelnen Polymerketten soll über eine radikalische Polymerisation der Endgruppen stattfinden. Daher wurden zunächst Penicillin-Konjugate mit allylischer Startergruppe hergestellt (Abbildung 113).

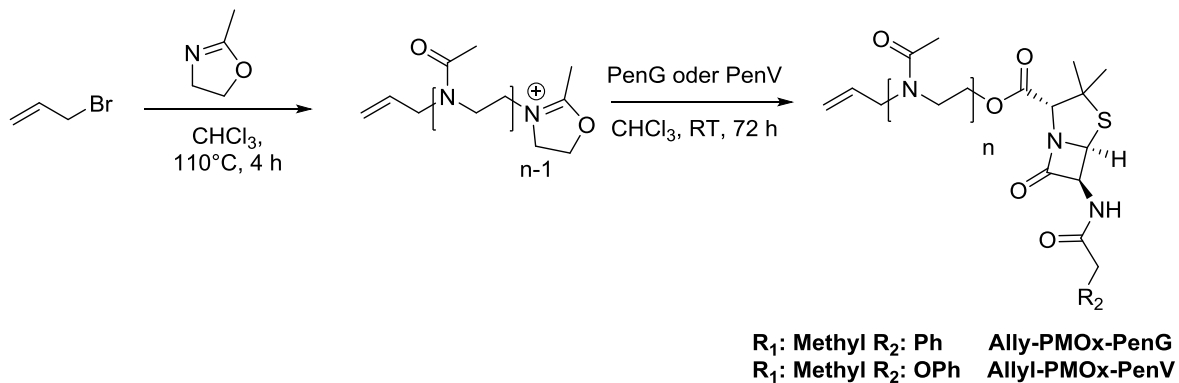


Abbildung 113: Synthese von Allyl-PMeOx-PenG und Allyl-PMeOx-PenV.

Zu diesem Zweck wurde Allylbromid zur Initiierung von MeOx verwendet, das nach dem Propagationsschritt entstandene kationische Kettenende wurde entweder mit PenG oder mit PenV terminiert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Allyl-PMeOx-PenG ist nachfolgend abgebildet. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Allyl-PMeOx-PenV befindet sich im Anhang. Das Spektrum zeigt alle charakteristischen Signale des PMeOx-Rückgrades sowie des Penicillins. Außerdem sind die Signale der Doppelbindungsprotonen (**1** und **2**) und für Position **3** deutlich zu erkennen. Zudem konnte ein Funktionalisierungsgrad von $< 99\%$ für beide Endgruppen bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

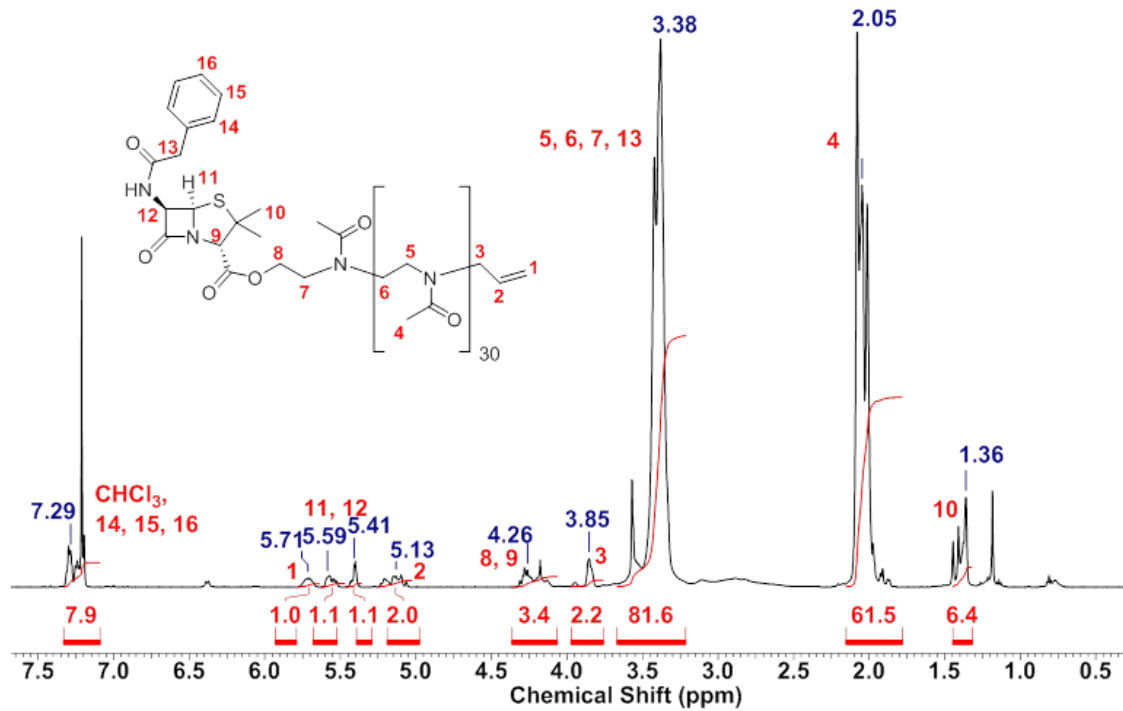


Abbildung 114: ¹H-NMR-Spektrum des Allyl-PMeOx-PenG Konjugats in CDCl₃ (7.27 ppm).

Die antimikrobielle Wirkung der allylinitiierten Konjugate wurde gegen *S. aureus* getestet und ist in der Tabelle 24 zusammengefasst. Zum Vergleich sind nochmals die Aktivitäten der beiden niedermolekularen Initiatoren PenG und PenV aufgeführt.

Tabelle 24: Übersicht über die antimikrobielle Aktivität von Allyl-PMeOx-PenG und Allyl-PMeOx-PenV sowie der niedermolekularen Antibiotika PenG und PenV in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Konjugate	MIC _{S. aureus} [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]
Allyl-PMeOx-PenG	0.7199 ± 0.0
Allyl-PMeOx-PenV	0.1466 ± 0.0
PenG	0.0025 ± 0.0017
PenV	0.0012 ± 0.0006

Für die Synthese der antimikrobiellen Polymernetzwerke wurde das Homopolymer M in Chloroform zusammen mit der antimikrobiellen Komponente (Allyl-PMeOx-PenG oder

Ergebnisse und Diskussion

Ally-PMeOx-PenV) gelöst. Diese machte 5 Gew.% des Gesamtvolumens aus. Anschließend wurde die Polymerlösung mit 1 Gew.% des Radikalstarters Irgacure 651 versetzt. Die entstehenden Radikale reagieren mit den Acrylat-Endgruppen des Homopolymers M und lösen somit ein Kettenwachstum aus, welches die Vernetzung der Endgruppen verursacht.

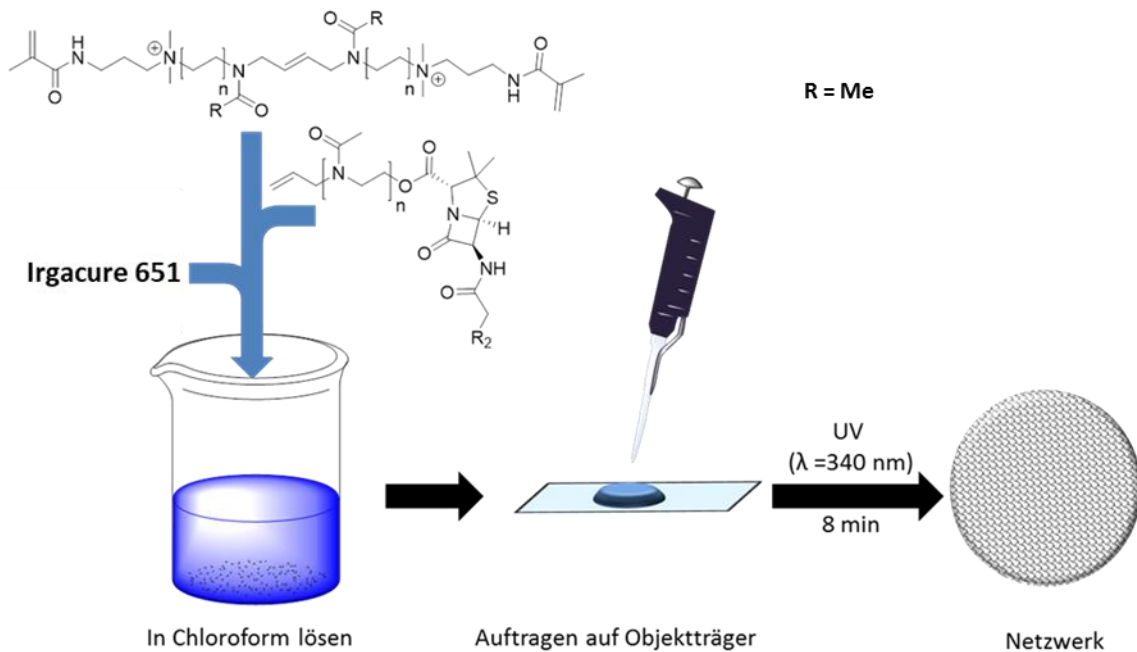


Abbildung 115: Schematische Darstellung der Polymernetzwerksynthese.

Mit Hilfe dieser Methode wurden verschiedene PenG und PenV beladenen PMeOx Netzwerke hergestellt (siehe Tabelle 25). Diese besitzen einen Quellgrad zwischen 19 und 27 mit Ausnahme von NW 2. dieser Quellgrad ist mit 14 etwas kleiner. Weiterhin kann von einer erfolgreichen Vernetzung ausgegangen werden, da die Netzwerke nicht wasserlöslich sind.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 25: Übersicht über die Hergestellten Netzwerke.

Netzwerk	PenG-Anteil	PenV Anteil	Quellgrad [S]
NW1	5 Gew.%		19
NW2	5 Gew.%		14
NW3	5 Gew.%		27
NW4		5 Gew.%	16
NW5		5 Gew.%	21
NW6		5 Gew.%	26

Die antimikrobielle Aktivität wurde im Anschluss der Synthese untersucht. Dazu wurde ein modifizierter JIS (engl. *Japanese Industrial Standard*) Test verwendet. Auf das zu untersuchende Netzwerk wurde eine bestimmte Menge einer Bakterienlösung getropft. Anschließend wurden die angeimpften Netzwerke für 4 h bei 37 °C inkubiert. Dann folgte ein Waschen der Netzwerke mit PBS-Puffer um die Bakterien von dem Netzwerk zu lösen. Die dadurch entstehende Bakterien-PBS-Puffer Lösung wurde zum Schluss verdünnt und auf Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und mit einer Referenzprobe (Objektträger) verglichen. Als Teststamm wurde das Bakterium *S. aureus* ausgesucht.

Während die Referenzprobe einen deutlichen Bewuchs mit Bakterienkolonien aufweist, zeigen die untersuchten Netzwerke keinen Bewuchs. Dies spricht für eine sehr gute antimikrobielle Wirkung der hergestellten Netzwerke. Um die Langzeitaktivität der Netzwerke weiter zu untersuchen, wurden die Proben 3, 7, 11 und 14 Tage mit Wasser gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde das Polymernetzwerk getrocknet und die Aktivität mittels JIS-Test bestimmt. Es zeigt sich, dass die Netzwerke nach 14 Tagen immer noch über eine bakterizide Wirkung verfügen, da kein Bakterienwachstum auf den untersuchten Proben festgestellt werden kann. Neben den Netzwerken wurde auch das Waschwasser der Netzwerke untersucht. Mit Hilfe einer Gefriertrocknung wurde der Sol-Anteil der Netzwerke isoliert und auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet. Die isolierte Menge an Sol-Anteil lag nach drei Tagen zwischen 36-39 mg, nach sieben Tagen wurden bis zu weiteren 12 mg aus den Netzwerken gewaschen. Somit verliert das Netzwerk in den ersten sieben Tagen etwa 33% an Gewicht. Außerdem zeigen die

Ergebnisse und Diskussion

antimikrobiellen Untersuchungen, dass auch der Sol-Anteil mit 5.9 ppm für PenG beladene Netzwerke und 4.6 ppm für PenV beladene Netzwerke einen sehr guten MIC-Wert aufweist. Aufgrund dieser Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den vorliegenden antimikrobiellen Netzwerken um effektive Freisetzungssysteme handelt.

3.4.2. Herstellung von antimikrobiellen Materialien auf Basis nicht kovalent vernetzter Polymernetzwerke

Am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften konnten im Rahmen einer Masterarbeit unter der Leitung von Herrn Dr. CHRISTIAN KRUMM amphiphile ABA-Triblockcopolymer bestehend aus PMeOx und Poly(2-phenyl-2-oxazolin) (PPhOx) entwickelt werden.¹⁸¹ Dieses amphiphile ABA-Triblockcopolymer mit gleich großen PPhOx und PMeOx-Blöcken kann hinsichtlich des Aggregationsverhaltens geschaltet werden. Während das ABA-Triblockcopolymer ohne Endgruppe zur Mizellenbildung neigt, bildet das ABA-Triblockcopolymer mit C₈-Fettsäureester-Endgruppen Polymerpartikel. Wobei diese Partikel im Inneren eine amphiphile Netzwerkstruktur aufweisen. Diese Polymerpartikel lassen sich mittels Hydrolyse der Fettsäureester-Endgruppen in Mizellen überführen (vergleiche Abbildung 116). Dabei kann die Hydrolyse sowohl chemisch als auch enzymatisch erfolgen. Diese Triblockcopolymer mit ihrem steuerbaren Aggregationsverhalten könnten antimikrobielle Komponenten hinsichtlich ihrer Aktivität schaltbar machen.

Ergebnisse und Diskussion

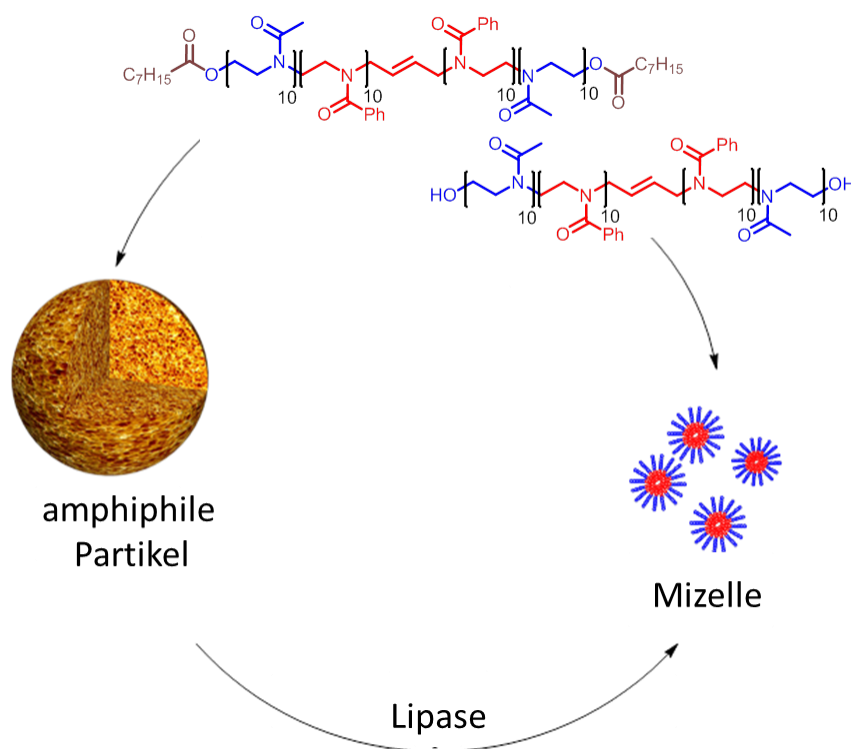


Abbildung 116: Schematische Darstellung des Aggregationsverhalten der ABA-Triblockcopolymeren von KRUMM.¹⁸¹

Allerdings zeigten Untersuchungen mit niedermolekularen Antibiotika, dass die Partikel die Antibiotika nicht zurückhalten können. Die Antibiotika diffundierten aus den Polymerpartikeln heraus, da diese wie amphiphile Netzwerke aufgebaut sind.¹⁸¹⁻¹⁸³

Die Frage, der in diesem Kapitel nachgegangen werden soll, ist, ob PAKs ebenfalls unkontrolliert aus dem Polymerpartikel diffundieren. Zur Einlagerung in die amphiphilen Partikel wurden die amphiphilen xCIP-Konjugate aus Kapitel 3.1.2 sowie die Homopolymere Me-PMeOx-EDA-xCIP und Me-PHepOx-EDA-xCIP verwendet. Für einige der amphiphilen Konjugate konnte in Kapitel 3.1.2 schon gezeigt werden, dass diese auch in Mizellen über eine antimikrobielle Aktivität verfügen.

Für die Herstellung der Partikel wurde das entsprechende Konjugat mit dem ABA-Triblockcopolymer in Ethanol gelöst und langsam in Wasser getropft. Unter starkem Rühren bildeten sich innerhalb von 2 h weiße Suspensionen. Die Partikelsuspension wurde zentrifugiert und das Lösungsmittel wurde abdekantiert. Die

Ergebnisse und Diskussion

Polymerpartikelbildung konnte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung und Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 117). Die Partikelgröße beträgt etwa 140 nm, was einer typischen Größe für Polymerpartikel entspricht. Bei der Herstellung der Partikel lieferte ein Verhältnis zwischen Konjugat und ABA-Triblockcopolymer von 2.1 μmol zu 1.9 μmol eine fast quantitative Partikelausbeute von etwa 90-95%. Zudem wurde Zusammensetzung der Polymerpartikel mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht und weist darauf hin, dass 96% der Konjugate in die Partikel eingebaut sind. Verhältnisse mit einem höheren Konjugat-Anteil zeigten eine deutlich geringere Partikelbildung. Die Partikelausbeute beträgt hier lediglich 5-7%. An dieser Stelle soll auch noch erwähnt sein, dass für das Konjugat Me-PMeOx-EDA-xCIP nur eine maximale Partikelausbeute unter 5% isoliert werden konnten. Dies indiziert, dass das Me-PMeOx-EDA-xCIP die Bildung der Partikel stört.

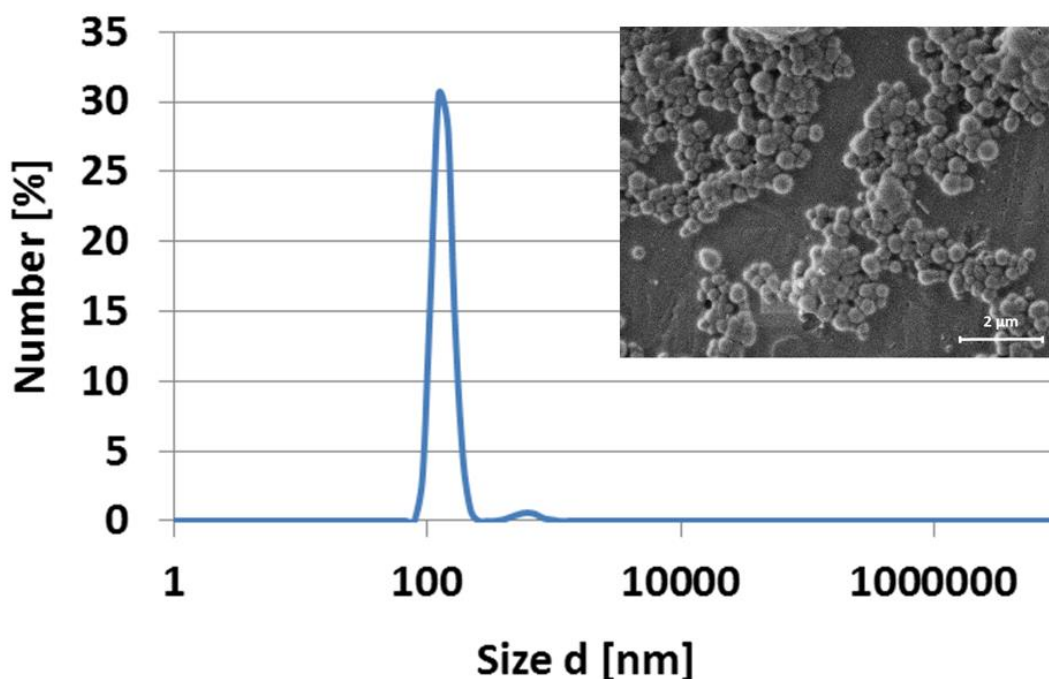


Abbildung 117: REM (inlay) und DLS-Messung der Konjugat-ABA-Triblockcopolymer-Partikel.

Der Einbau der Konjugate in das amphiphile Netzwerk der Partikel sollte die Verfügbarkeit der Konjugate deutlich verringern. Dadurch sollten diese Polymerpartikel über keine antimikrobielle Aktivität verfügen. Daher wurden die MIC-Wert der

Ergebnisse und Diskussion

beladenen Polymerpartikel gegen *S. aureus* und *E. coli* ermittelt. Wie in Abbildung 118 zu sehen ist, zeigen alle Konjugat-beladene Polymerpartikel sehr hohe MIC-Werte und sind somit im Vergleich zum jeweiligen PAKs (Kapitel 3.2.7) deutlich weniger aktiv. Der höchste MIC-Wert für beide Bakterienstämme liefert die Einlagerung des Konjugats mit 60 Gew.% HepOx-Anteil. Dieser liegt bei etwa 500-600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Somit zeigt das Konjugat mit einer ähnlichen hydrophoben/hydrophilen Zusammensetzung wie das ABA-Triblockcopolymer die höchste Verkapselungseffizienz. Dies weist darauf hin, dass der Einbau der Konjugate in die Partikel mit Hilfe des Polymerrückgrates kontrolliert werden kann. Die CIP-beladenen Partikel zeigen ein anders Verhalten. Die Aktivität der CIP-beladenen Partikel unterscheidet sich nicht signifikant von der Aktivität des freien CIP. Dies bestätigt das niedermolekulare Antibiotika aus den Polymerpartikel diffundieren.

181

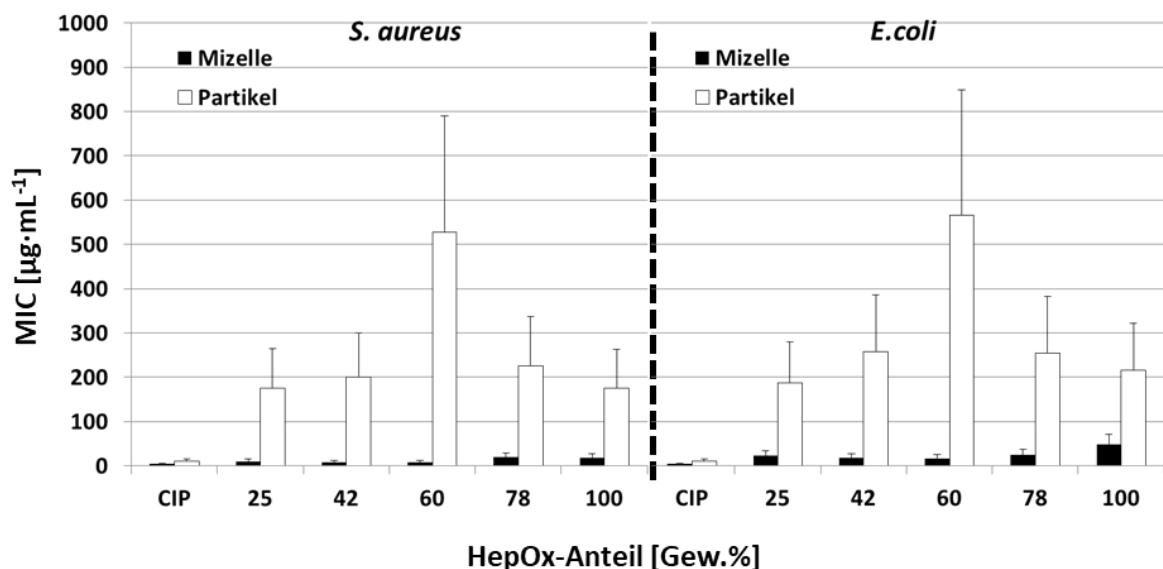


Abbildung 118: MIC-Werte der Konjugat-beladenen Partikel vor (schwarz) und nach (weiß) der Behandlung mit NaOH. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und die MIC-Werte zeigen die niedrigste gemessene Konzentration. Die Fehlerbalken zeigen die Differenz zwischen dem niedrigsten und höchsten gemessenen MIC-Wert.

Entsprechend Abbildung 116 sollte durch die Spaltung der Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymer das Aggregationsverhalten verändert werden. Die Partikel sollten sich zu Mizellen umformen und CIP-Konjugate sollten wieder besser verfügbar sein, wodurch die antimikrobielle Aktivität wieder steigt. Um die Ester-Endgruppe der ABA-

Ergebnisse und Diskussion

Triblockcopolymeren zu spalten wurden die Konjugat-beladenen Partikel mit 0.015 M NaOH behandelt. Nach 4 h bei 37 °C konnte eine optische Veränderung der Partikelsuspension wahrgenommen werden. Die weiße Partikelsuspension löste sich auf. DLS-Messungen zeigten die Bildung von Mizellen (9 nm). Die antimikrobielle Aktivität der Partikel nach der NaOH-Behandlung wurde untersucht und ist in Abbildung 118 dargestellt. Alle Konjugat-beladenen Mizellen weisen eine drastisch höhere Aktivität im Vergleich zu den beladenen Partikeln auf. Die größte Veränderung in der Aktivität konnte für das Konjugat mit 60 Gew.% HepOx gefunden werden. Die Aktivität steigt für *S. aureus* um das 260-fache und um das 33-fache für *E. coli*. Somit wurde im Fall von *S. aureus* mehr als 99% und im Fall *E. coli* 97% der Konjugate durch die Partikel zurückgehalten. Außerdem zeigen die wasserunlöslichen PAKs Me-PHepOx-EDA-xCIP und Me-MeOx₈-PHepOx₁₄-EDA-xCIP in Anwesenheit der Mizellen eine bessere Aktivität als die reinen PAKs (Vergleich Kapitel 3.2.7).

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde NaOH zur Spaltung der Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymeren verwendet. Da aber NaOH für viele Anwendungen im medizinischen Bereich ungeeignet ist, wurde untersucht, ob die Hydrolyse der Ester-Endgruppe auch unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Daher wurde die Spaltung des Esters auch enzymatisch durchgeführt. Als Enzym wurde Lipase aus *Candida rugosa* verwendet. Die antimikrobielle Aktivität von Me-PMeOx₁₄-PHepOx₁₁-EDA-xCIP-beladenen Partikeln wurde in Anwesenheit von Lipase untersucht. Zunächst wurde das Enzym (2 mg·mL⁻¹) zu den Partikeln in Phosphat-Puffer gegeben und 24 h bei 37 °C inkubiert (indirekt). Anschließend wurde der MIC-Wert der Partikelsuspension ermittelt. In einem zweiten Experiment wurde Lipase (2 mg·mL⁻¹) zu einer Suspension aus Konjugat-beladenen Partikeln in Nährmedium gegeben. Anschließend folgte direkt die Zugabe von Bakterienzellen (10⁷ Zellen pro mL) (direkt). Wie in Abbildung 119 zu sehen ist, führt die Zugabe von Lipase zu einer Erhöhung der Aktivität der Partikelsuspension. Dabei unterscheiden sich die MIC-Werte der beiden verschiedenen Experimente (direkt und indirekt). Die MIC-Werte sind für den direkten Versuch leicht erhöht (Abbildung 119 b). Dies kann aber durch die Anwesenheit der Bakterien erklärt werden, da eine längere Enzym-Inkubationszeit (24 h) auch zu höheren Aktivitäten führt. Anscheinend ist die Enzymaktivität durch die Bakterien gestört. An dieser Stelle soll

Ergebnisse und Diskussion

darauf hingewiesen werden, dass die Lipase selbst über keine antimikrobielle Aktivität verfügt (vergleiche Abbildung 119 a). Allerdings kann die Lipase eine antimikrobielle Aktivität der Partikelsuspension induzieren, d.h. eine Partikelsuspension ist in Abwesenheit von Lipase inaktiv und sobald das Enzyme zugegeben wird, entwickelt die Partikelsuspension eine Aktivität. Somit kann die Spaltung der Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymeren und die damit verbundene Veränderung des Aggregationsverhaltens auch mit Lipase unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden.

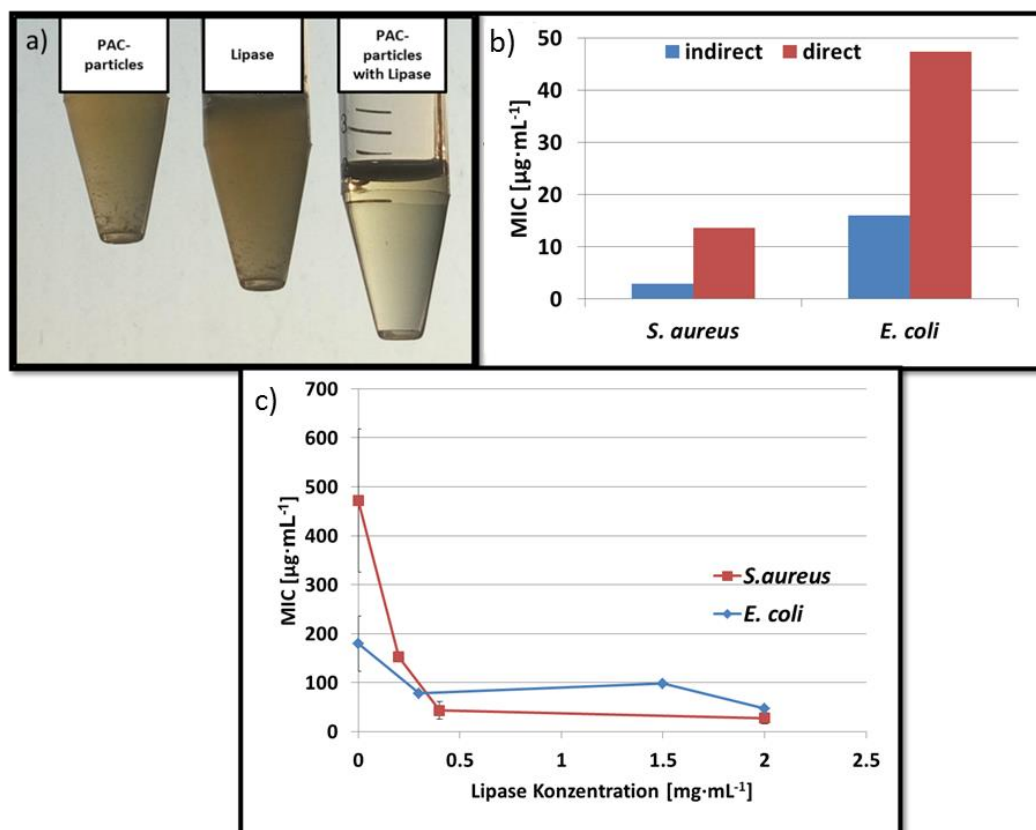


Abbildung 119: Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der Partikelsuspension in Anwesenheit von Lipase. a) Bild von MIC-Teste Partikeln in Anwesenheit und in Abwesenheit von Lipase und einmal der MIC-Test von reiner Lipase ohne Partikel. b) Vergleich zwischen direkter und indirekter Endgruppenhydrolyse mittels Lipase. c) MIC-Werte von Me-MeOx₁₉-PHepOx₇-EDA-xCIP Partikeln in Anwesenheit verschiedener Konzentration von Lipase.

Um die minimale Lipase-Konzentration zu ermitteln die notwendig ist um eine geeignete Verfügbarkeit der CIP-Konjugate zu gewährleisten, wurden MIC-Tests mit verschiedenen Lipase-Konzentrationen als Additiv durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe

Ergebnisse und Diskussion

sind in Abbildung 119 c dargestellt. Die Konjugat-beladenen Partikel besitzen gegen *S. aureus* eine zehnfach höhere Aktivität als gegen *E. coli*, daher ist auch eine höhere Konjugat-Verfügbarkeit nötig um diese Bakterienzellen abzutöten. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass im Vergleich zu *S. aureus* eine höhere Lipase-Konzentration für *E. coli* benötigt wird.

Die amphiphilen Konjugate zeigen eine sehr gute Einlagerung in die hier verwendeten Polymerpartikel. Dabei kann die Verfügbarkeit der Konjugate enzymatisch oder mittels NaOH gesteuert werden.

3.4.3. Zusammenfassung der antimikrobiellen Materialien

Die Vernetzung der PMeOx-b-PHepOx-b-PMeOx Blockcopolymere (MHM1-5 sowie M und H) konnten mit Hilfe eines Radikalstarters über ihre AMA-Endgruppen erfolgen. Quelleexperimente in Wasser und Toluol zeigen, dass die hergestellten Netzwerke ein nicht ideal amphiphiles Verhalten aufweisen. Zusätzlich wurde der Einbau von antimikrobiellen Komponenten in Form von Penicillin-Konjugaten in die Netzwerke untersucht. Dabei diente das Homopolymer M als Modell. Der Einbau erfolgte über das Konjugat Allyl-PMeOx-PenG/PenV, wobei die Allylgruppe als Angriffspunkt für die radikalische Vernetzung diente. Diese antimikrobiellen Netzwerke zeigten eine biozide Wirkung, die auch nach 14 Tagen waschen beibehalten wurde. Dabei beruht diese Aktivität auf einer Freisetzung der antimikrobiellen Komponenten, da auch das Waschwasser eine Aktivität gegen Mikroorganismen aufwies. Alles im allem zeigen die PMeOx-b-PHepOx-b-PMeOx Netzwerke Eigenschaften von amphiphilen Polymerconetzwerken. Zudem zeigte der Einbau der Konjugate, dass diese Netzwerke auch als eine Matrix für Wirkstoffe verwendet werden kann, die den Wirkstoff langsam freisetzt.

Des Weiteren konnten amphiphile xCIP-Konjugate mit Hilfe von ABA-Triblockcopolymer hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität schaltbar gemacht werden. Die ABA-Triblockcopolymer bilden in wässriger Umgebung Partikel, welche durch Hydrolyse der hydrophoben Endgruppen des ABA-Triblockcopolymer aufgelöst und Mizellen

Ergebnisse und Diskussion

umgeformt werden. In diese Partikel wurden erfolgreich amphiphile Konjugate eingebaut. Der Einbau der Konjugate in die Partikel führte zu einem gut Rückhalt der Konjugate. Dies spiegelte sich auch in den MIC-Werten der Partikel wieder. Die MIC-Werte lagen zwischen $170\text{-}560\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und sind damit deutlich höher als die MIC-Werte der entsprechenden freien Konjugate. Durch die Behandlung mit NaOH konnte die Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymeren gespalten werden. Durch die Spaltung der Endgruppe veränderte sich das Aggregationsverhalten der ABA-Triblockcopolymeren und es bildeten sich Mizellen. Die Umwandlung in Mizellen führte zu einer erhöhten Verfügbarkeit der Konjugate, wodurch die beladenen Mizellen hohe antimikrobielle Aktivitäten aufwiesen. Mit Hilfe der ABA-Triblockcopolymeren konnten die xCIP-Konjugate hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität schaltbar gemacht werden. Neben NaOH konnte auch Lipase zur Hydrolyse der Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymeren verwendet werden. Dies bietet die Möglichkeit die Konjugat-Aktivität auch unter physiologischen Bedingungen zu steuern.

Zusammenfassung

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Polymer-Antibiotika-Konjugaten (PAKs) auf Basis von Poly(2-oxazolin). Diese PAKs sollten über eine gute Biokompatibilität verfügen und ihre antimikrobielle Wirkung auch nach der Konjugation beibehalten. Zudem sollten die Antibiotika durch Konjugation eine Resistenz gegen einige bakterielle Abwehrmechanismen zeigen. Des Weiteren sollten Antibiotika mit Hilfe der PAKs in Polymernetzwerke eingebaut werden.

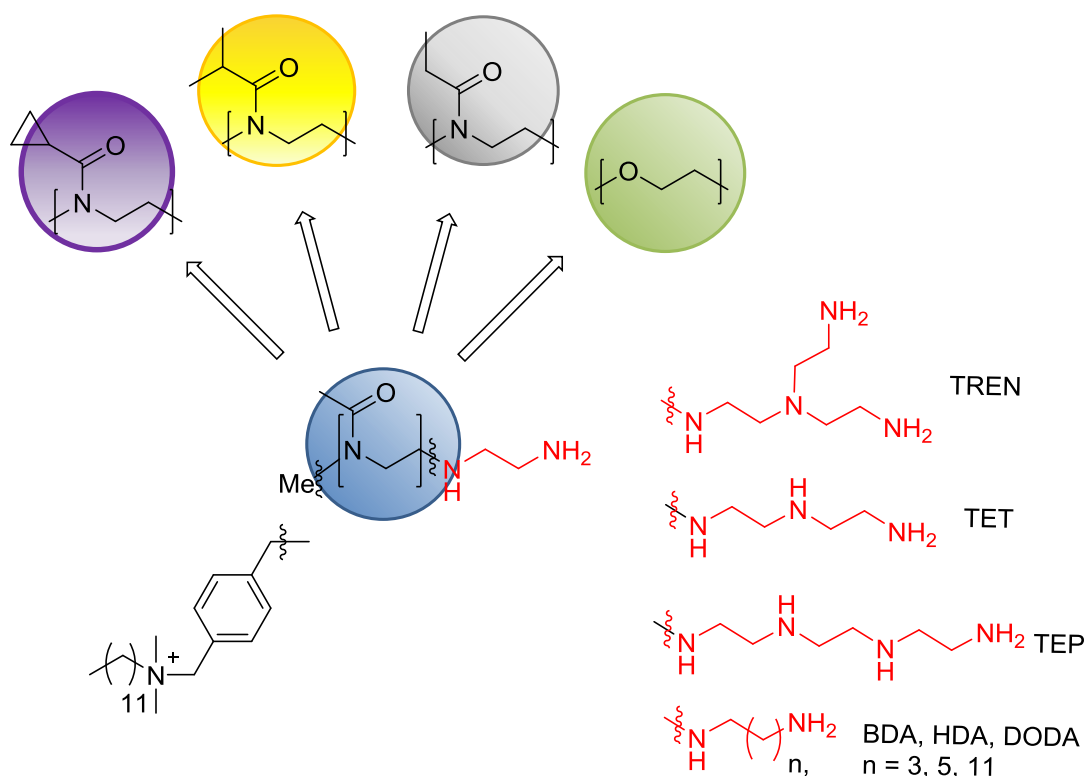


Abbildung 120: Schematischer Überblick über die hergestellten Polymere, die für die polymeranaloge Konjugation dienen.

Bei der Konjugation von Ciprofloxacin konnten zwei verschiedene Konjugationsmethoden verwendet werden. Zum einen wurde das Antibiotikum mittels Direktterminierung des lebenden kationischen Polymerkettenendes verwendet und zum anderen wurden PAKs mit Hilfe von CIP-Derivaten in einer polymeranalogen Reaktion konjugiert. Für die polymeranaloge Reaktion wurden POxs und Poly(ethyleneglykol)

Zusammenfassung

(PEG) mit Amin-Endgruppen hergestellt. Als Amin-Endgruppen wurde hauptsächlich Ethylendiamin (EDA) eingesetzt. Des Weiteren dienten auch 1,4-Butylendiamin (BDA), 1,6-Hexylendiamin (HDA), 1,12-Dodecylendiamin (DODA), *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethylendiamin (TREN), Triethylentetramine (TET) und Tetraethylenepentamin (TEP) als Endgruppe für die polymeranaloge Umsetzung. Der lebende Charakter der Polymerisation des POxs erlaubte die Synthese von amphiphilen Blockcopolymeren sowie thermoresponsiven Polymeren. Zudem konnte über die Wahl des Initiators eine weitere antimikrobielle Gruppe in Form eines quartären Ammoniumsalzes eingeführt werden (DDA-X). Ein Überblick über die hergestellten Polymere, die für die Konjugation verwendet wurden, ist Abbildung 120 gegeben. Die polymeranaloge Konjugation konnte mit verschiedenen CIP-Derivaten durchgeführt werden (Vergleich Abbildung 121).

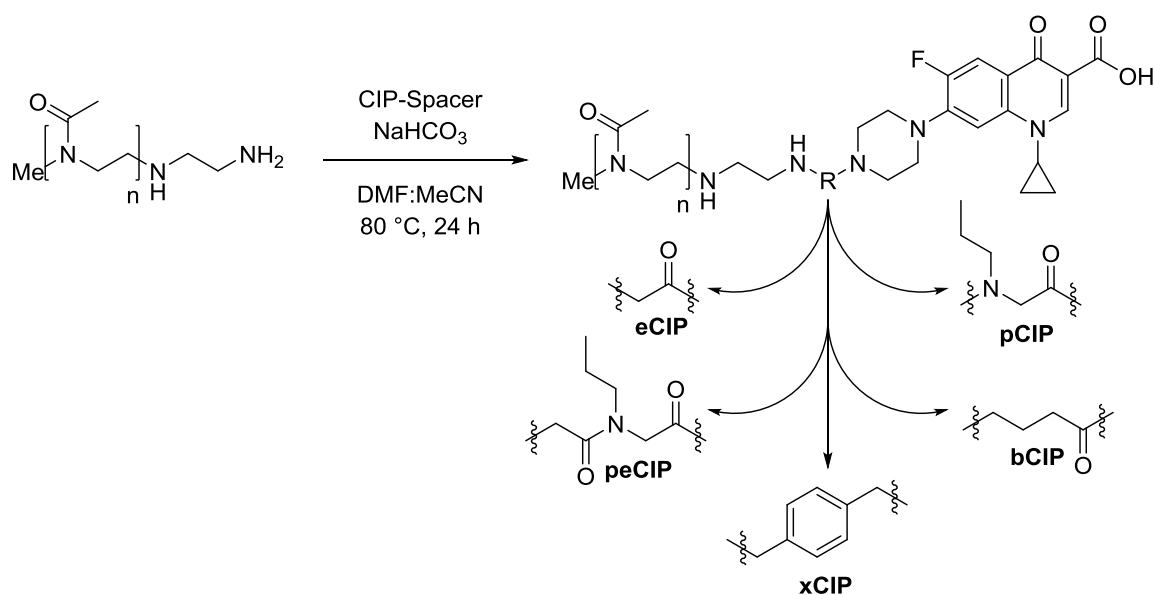


Abbildung 121: Schematischer Überblick über die Konjugation mit den CIP-„Spacer“.

Die antimikrobielle Untersuchung (MIC-Test) der CIP-Polymer-Konjugate zeigte, dass jeder CIP-„Spacer“ über ein anderes Aktivitätsprofil verfügt (siehe Abbildung 122). So weisen Konjugate, die mittels xCIP konjugiert wurden, exzellente Aktivitäten gegen GRAM-positive Keime und *E. coli*, aber nur moderate Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* auf, wohingegen die Konjugate mit pCIP ein ausgeglichenes Aktivitätsprofil zeigen. eCIP- und bCIP-Konjugate besitzen niedrigere MIC-Werte gegen

Zusammenfassung

GRAM-negative Bakterien aber relativ hohe MIC-Werte gegen *S. aureus* (GRAM-positive). Konjugate mit peCIP besitzen auch ein gleichmäßiges Aktivitätsprofil. Allerdings sind diese Aktivitäten deutlich niedriger als die der anderen Konjugate. Die eCIP-Konjugate besitzen wiederum nur eine temporäre Bindung zwischen Polymer und CIP, da der „Spacer“ in Anwesenheit durch NaOH oder Lipase gespalten wird und niedermolekulares CIP freisetzt. Da bCIP, peCIP und pCIP nur Modifikationen des eCIP sind, muss angenommen werden, dass auch diese „Spacer“ CIP freisetzen.

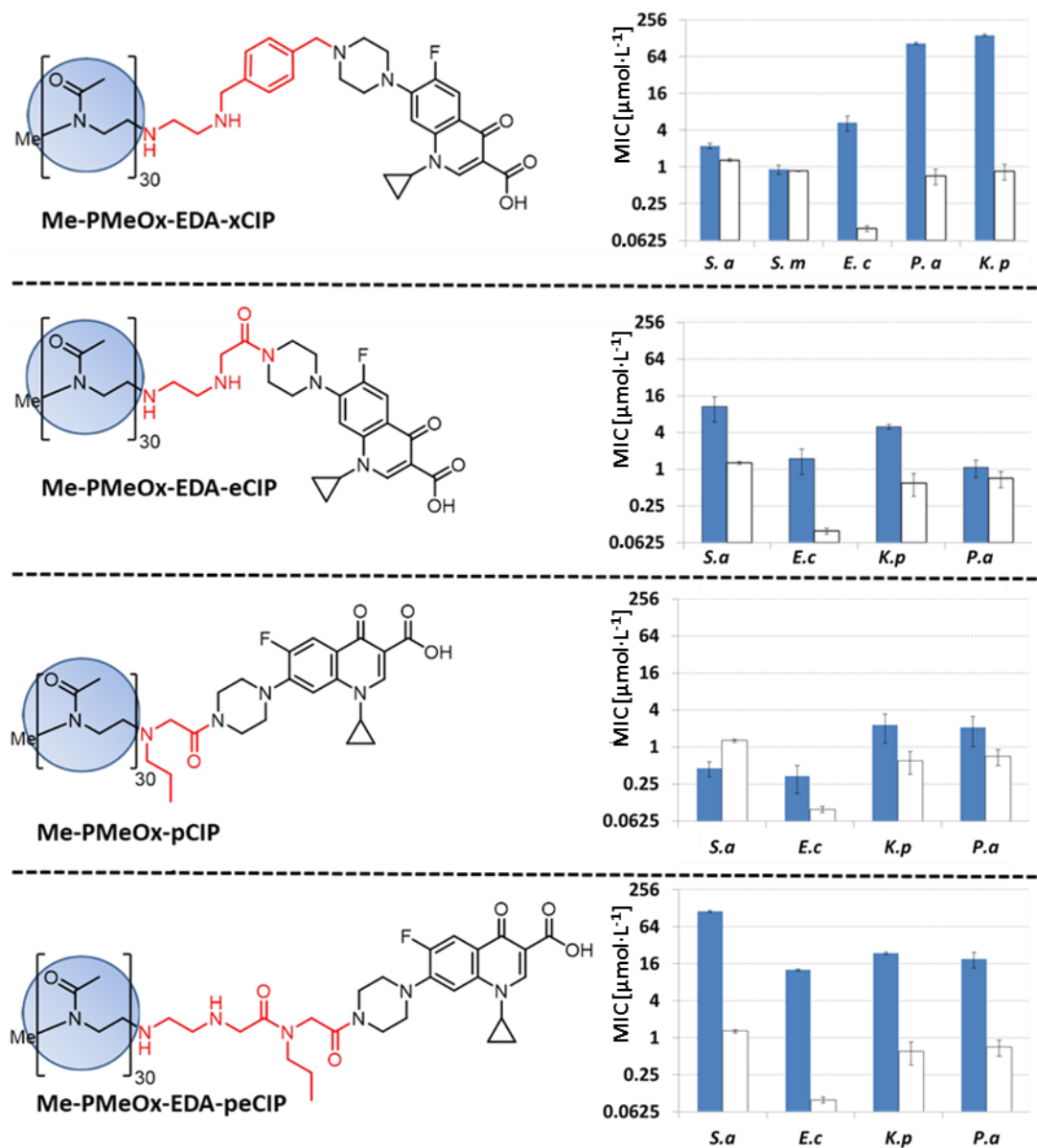


Abbildung 122: Überblick über die Aktivitätsprofile der einzelnen PMeOx-Konjugate in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Zusammenfassung

Die Aktivität der Konjugate kann durch das Molekulargewicht sowie durch die Natur oder Hydrophilie des Polymerrückgrates beeinflusst werden, wobei diese Einflüsse einen unterschiedlichen Effekt auf die einzelnen CIP-Derivate ausüben. So zeigt das Me-PEG-EDA-xCIP die höchste Aktivität der xCIP-Konjugate, wohingegen das PEtOx-Konjugat die höchste Aktivität bei den eCIP-Konjugaten darstellt. Des Weiteren konnten Untersuchungen eine gute Hämo- und Biokompatibilität der PAKs feststellen. Darüber hinaus zeigte das Me-PMeOx-EDA-xCIP ein zehnfach geringeres Resistenzbildungspotential beim bakteriellen Keim *S. aureus* im Vergleich zum niedermolekularen CIP. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konjugation von Ciprofloxacin mit Polymeren eine geeignete Methode zur Derivatisierung von Antibiotika darstellt, wodurch die Antibiotika neue Eigenschaften erlangen können.

Die Synthese von Penicillin-Polymer-Konjugaten wurde im Gegensatz zur Synthese von CIP-Konjugaten, ausschließlich durch die Terminierung des lebenden Poly(2-oxazolin) Kettenendes mit Penicillin dargestellt. Dabei wurden Penicillin G (PenG) und Penicillin V (PenV) als Endgruppen eingebaut. Als Monomere für die Polymerisation dienten 2-Methyl-2-oxazolin, 2-Ethyl-2-oxazolin sowie 2-*iso*-Proyl-2-oxazolin. Als Initiator wurden das Methyltosylat sowie DDA-X verwendet (Abbildung 123).

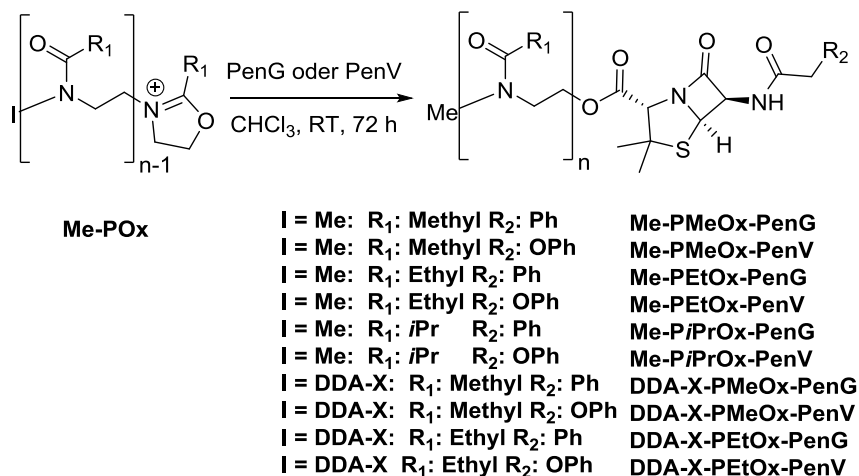


Abbildung 123: Überblick über die Synthese der verschiedenen Penicillin-Polymer-Konjugate.

Die Penicillin-Konjugate zeigen schwächere Aktivitäten gegen *S. aureus*, *S. mutans* und *E. coli* als PenG und PenV. Dafür zeigen sie aber eine deutlich geringere Anfälligkeit

Zusammenfassung

gegenüber dem Resistenzenzym Penicillinase auf, daher weisen die Penicillin-Konjugate bessere Aktivitäten in Anwesenheit des Enzyms auf. Penicillin-Konjugate scheinen einen ähnlichen Wirkmechanismus wie das freie Penicillin zu besitzen, da die Konjugate keine Abhängigkeit der Aktivität von der Kettenlänge zeigen. Im Vergleich mit dem Penicillinase-stabilen Antibiotikum Cloxacillin besitzen die hergestellten Konjugate in vielen Fällen eine höhere Aktivität gegen *S. aureus*, *S. mutans* und *E. coli*. Die Einführung von DDA-X führt zu einer Erhöhung der Aktivität der Penicillin-Konjugate, auch in Anwesenheit des Resistenzzyms Penicillinase. Allerdings führt die neue Gruppe auch zu einer leichten Erniedrigung der Hämokompatibilität. Die vorgestellten Penicillin-Konjugate bieten eine gute Alternative zu den herkömmlichen Penicillinase-resistenten Penicillinen.

Zudem wurden ABA-Triblockcopolymere auf Basis von Poly(2-Methyl-2-oxazolin) und Poly(2-Heptyl-2-oxazolin) mit vernetzbaren Endgruppen hergestellt. Diese PMeOx-b-PHepOx-b-PMeOx Blockcopolymer konnten mit Hilfe eines Radikalstartes über ihre AMA-Endgruppen vernetzt werden. Quellexperimente der Netzwerke zeigen typische Verläufe von amphiphilen Polymerconetzwerken. Der Einbau von Penicillin in das Netzwerk erfolgte mit dem Allyl-PMeOx-PenG/PenV Konjugat. Die so hergestellten antimikrobiellen Netzwerke zeigen eine biozide Wirkung, die auch nach 14 Tagen Waschen beibehalten wird. Dabei zeigt auch das Waschwasser eine Aktivität gegen Mikroorganismen. Somit stellen die hergestellten Netzwerke ein effektives, auf PAK-basierendes, Langzeit wirkendes (14 Tage) Freisetzungssystem dar.

Außerdem wurden amphiphile ABA-Triblockcopolymer verwendet, die hinsichtlich Aggregationsverhalten schaltbar waren. Diese ABA-Triblockcopolymer bilden in wässriger Umgebung Partikel. Diese Partikel können durch Hydrolyse der hydrophoben Endgruppen aufgelöst und Mizellen umgeformt werden. In diese Partikel konnten erfolgreich amphiphile CIP-POx-Konjugate eingebaut werden. Diese waren durch die Einlagerung in die Partikeln nur schlecht verfügbar und besaßen daher nur eine geringe antimikrobielle Aktivität. Die MIC-Werte lagen zwischen $170\text{-}560\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Somit ist die antimikrobielle Aktivität der Partikel deutlich niedriger als die Aktivität der entsprechenden freien Konjugate. Durch die Behandlung mit NaOH konnte die Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymere gespalten werden, dadurch kam es zur

Zusammenfassung

Auflösung der Polymerpartikel und es bildet sich Mizellen. Durch die Umwandlung in Mizellen wurde die Verfügbarkeit der Konjugate erhöht und die beladenen Mizellen wiesen hohe antimikrobielle Aktivitäten auf. Dadurch konnten die Konjugate mit Hilfe der ABA-Triblockcopolymeren hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität schaltbar gemacht werden (vergleiche Abbildung 124).

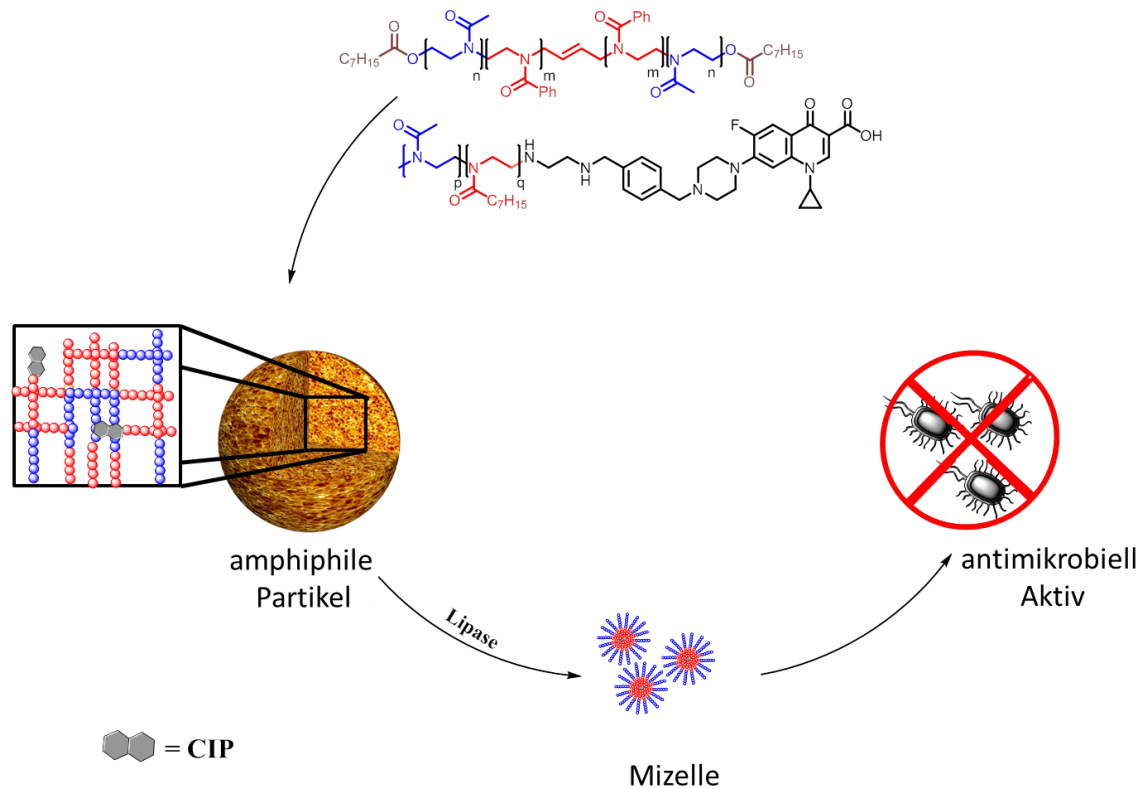


Abbildung 124: Schematische Darstellung der Schaltbaren Konjugat mit Hilfe der ABA-Triblockcopolymeren.

Zudem konnte auch Lipase zur Hydrolyse der Ester-Endgruppe der ABA-Triblockcopolymeren verwendet werden, was eine Schaltbarkeit der antimikrobiellen Aktivität auch unter physiologischen Bedingungen ermöglicht.

Experimental Teil

5. Experimental Teil

5.1. Materialien

Alle Reaktionen, Destillationen und Polymerisationen wurden unter Schutzgas (Argon) durchgeführt. Chloroform wurde bei vermindertem Druck über Aluminiumoxid destilliert und unter Schutzgas mit Molekularsieb (4 Å) gelagert. *N,N*-Dimethylformamid sowie Acetonitril wurden zunächst über Phosphorpentaoxid und anschließend über Kaliumcarbonat destilliert und mit Molekularsieb (3 Å) unter Schutzgas gelagert. Der Wassergehalt wurde mittels Karl-Fischer-Titration (< 0.5 ppm) bestimmt. Die Monomere 2-Methyl-2-oxazolin, 2-Ethyl-2-oxazolin, 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin, 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin und 2-Heptethyl-2-oxazolin wurden einmal ohne Calciumhydrid und einmal über Calciumhydrid destilliert. *N,N*-Dimethyldodecylamin, Methyltosylat, *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethyldiamin, *N*-[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamid und Ethyldiamin wurden bei vermindertem Druck destilliert. α,α' -Dibrom-*p*-xylol wurde aus Chloroform umkristallisiert. Ciprofloxacin, Penicillin G, Penicillin V, Cloxacillin, Allylbromid, α,α' -Dichlor-*p*-xylol, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, Propylamin, Polyethylenglycol Monomethylether (2000 g·mol⁻¹), Mesylchlorid, Tosylchlorid, Octannitril, Ethanolamin, *cyclo*-Propannitril, *iso*-Propannitril, Triethylamin, *N*-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamid, *N,N*-Dimethylacrylamid, Irgacure 651, Chloressigsäurechlorid, Brombutansäurechlorid, 1,4-Dibrombut-2-en, 1,4-Butyldiamin, 1,6-Hexyldiamin, 1,12-Dodecylamin, *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethyldiamin, Triethylentetramin, Tetraethylenpentamin, Natriumazid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumhydroxid, Natriumzitat, Zitronensäure Monohydrat, Glucose Monohydrat, Salzsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Dithranol, Nährmedium (Standard 1) wurden ohne weitere Reinigungsschritte verwendet. Die Keime *Escherichia coli* (Gram-negativ, ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativ, ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ, ATCC 17423), *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv, ATCC 25323), *Lactobacillus casei* (Gram-positiv, ATCC 393), *Bacillus subtilis* (Gram-positiv, ATCC 6633) und *Streptococcus*

Experimental Teil

mutans (Gram-positiv, ATCC 25175) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Frisches Schweineblut wurde von lokalen Metzgereien bereitgestellt. Das Enzym Penicillinase wurde vom Zulieferer VWR der TCI Chemicals bezogen. *Pseudomonas taiwanensis* und *Pseudomonas taiwanensis* (VLB120ΔCΔttgV) sowie *Escherichia coli* JW0453 und *Escherichia coli* JW5503 aus Keio Kollektion wurden von DR. JAN VOLMER zur Verfügung gestellt.

5.2. Geräte und Methoden

Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy NMR).

Die ^1H -NMR-Spektren wurden in deuteriertem Lösungsmittel (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, D_2O) am FT-Spektrometer der Firma *Burker*, des Typs DPX-300 (300 MHz), DRX-400 (400 MHz), DRX-500 (500 MHz) oder FT-Spektrometer der Firma *Varian*, des Typs Inova 500 (500 MHz) aufgenommen. Die Protonen des nicht vollständig deuterierten Lösungsmittels dienten als interner Standard. Die chemische Verschiebung δ der Signalsätze wurde in *parts per million* (ppm) angegeben und die Kopplungskonstanten J in Hz. Die Spektren wurden mit dem Programm ACD/SpecManager 12.0 prozessiert. Für die durch Spin-Spin-Kopplung auftretenden Multiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), brs (breites Signal) und m (Multipllett).

Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI - MS).

Die ESI-MS Messungen wurden an einem Thermo LTQ-FT-ICR-Ultra Massenspektrometer (linear iron trap –Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) durchgeführt. Die Proben wurden in einer Mischung aus 69.9 vol.% destillierten Wasser, 30.0 vol.% Acetonitril und 0.1 vol.% Ameisensäure gelöst. Die Polymerproben wurden mit einer Konzentration von $10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ gemessen. Es wurden $5 \mu\text{L}$ Probe mittels Chip-A-384 Emitter, (mit $5 \mu\text{m}$ i.D) injiziert. Die resultierende Flussrate lag bei $\sim 200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Der Stickstoffgedruck sowie die Spannungsrate wurden den jeweiligen Proben angepasst und variierten zwischen 0.4 - 1.4 psi und 1.8 kV. Die Massenspektren wurden

Experimental Teil

im positiven Modus mit 2 μ scans in einem Massenbereich m/z von 225 - 2000 mit einer Auflösung von 100.000 (bei m/z 400) durchgeführt. In dem Bereich von 600 - 1400 besitzen die erhaltenen Massenspektren eine Ladung bis 12. Mit Hilfe der Software XtractRAW wurden die Rohdaten ausgewertet. Die Polymerverteilung wurde auf Basis der monoisotopischen Peaks ermittelt. Der Berechnung der theoretischen Massen liegen folgende Isotope zu Grunde: $^{12}\text{C} = 12.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{16}\text{O} = 15.995 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{14}\text{N} = 14.003 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^1\text{H} = 1.008 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{79}\text{Br} = 78.918 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^1\text{H}^+ = 1.007 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{19}\text{F} = 18.998 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{32}\text{S} = 31.972 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisations-Massenspektrometrie/ (MALDI - MS)

Die MALDI-TOF-Messungen erfolgten an einem Autoflex II der Firma Bruker mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337.1 \text{ nm}$). Die Messungen wurden mit der Software FlexControl gesteuert und zur Auswertung der erhaltenen Spektren diente das Programm FlexAnalysis. Zur Probenpräparation wurde die Dried-Droplet-Methode verwendet. Dazu wurde 1 mg der Universalmatrix Dithranol in 1 mL in Chloroform gelöst. Ebenso wurde 1 mg der Probe in 1 mL Chloroform gelöst. 1 μL der Probenlösung wurde auf die Probenscheibe getropft. Nach einigen Minuten verdampfte das Chloroform und die Dithranol-Lösung wurde über die Probe getropft. Anschließend wurde gewartet bis das Lösungsmittel vollständig verdampfte. Im Anschluss wurde die Probe gemessen. Der Berechnung der theoretischen Massen liegen folgende Isotope zu Grunde: $^{12}\text{C} = 12.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{16}\text{O} = 15.995 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{14}\text{N} = 14.003 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^1\text{H} = 1.008 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{79}\text{Br} = 78.918 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^1\text{H}^+ = 1.0072766 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{19}\text{F} = 18.998 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{23}\text{Na} = 22.9898 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{39}\text{K} = 38.9637 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $^{32}\text{S} = 31.9721 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC).

Die GPC Messungen wurden an einem GPCMax-System der Firma Viscotek durchgeführt. Die GPC wurde mit einem Brechungsindexdetektor (RI) ausgerüstet und auf 55 °C temperiert. Zur Auftrennung der Proben wurden eine Vorsäule TSKgel® und zwei TSKgel® GMHHR-M 7.8 x 300 mm (5 μm Porengröße) Säulen der Firma Tosch eingesetzt.

Experimental Teil

Dabei wurden die Säulen mittels Säulenofens konstant bei 60 °C gehalten. Als Laufmittel diente *N,N*-Dimethylformamid mit 20 mmol·L⁻¹ LiBr. Die Flussrate betrug 0.7 mL·min⁻¹. Als Kalibrationsstandards dienten Polysyrolstandards der Firma Viskotek. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 2 - 4 mg·mL⁻¹ bei einem Injektionsvolumen von 200 µL aufgegeben. Vor jeder Messung wurden die Proben 12 h äquilibriert und anschließend mit einem 0.2 µm PTFE-Filter filtriert. Das erhaltene Elugramm ermöglichte die Bestimmung des zahlenmittleren Molekulargewichts (M_n), des gewichtsmittleren Molekulargewicht (M_w) und des Polydispersitätsindex (PDI).

Infrarotspektroskopie (FT – IR).

Die Messung der FT-IR Spektren erfolgte an einem Alpha-Spektrometer der Firma Burker. Das Spektrometer wurde mit einem ATR-Druckmodul ausgestattet. Dabei erfolgte die Aufnahme der Spektren an einem einzelrefraktiven Diamantfenster in abgeschwächter Totalreflexion (ATR). Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 4 cm⁻¹ mit 24 Scans pro Messung in einem Wellenzahlbereich von 400 - 4000 cm⁻¹ aufgenommen. Flüssige Proben wurden auf das Diamantfenster auf getropft und feste Proben mittels Druckmodul fixiert. Für die Auswertung der Daten wurde die Software Opus (Bruker) verwendet.

Gefriertrocknung

Die wässrigen Polymerproben wurden in einem Rundkolben gegeben und in flüssigen Stickstoff getaucht bis die Probe vollständig gefroren waren. Anschließend wurde der Probenkolben an die Gefriertrocknung Alpha 1-4 LDplus der Firma Christ angeschlossen und das Wasser wurde bei 1·10⁻³ mbar und -56 °C sublimiert.

Experimental Teil

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronischen Aufnahmen wurden an einem Hitachi S4500 Gerät aufgenommen. Die Anregungsspannung betrug dabei 1 kV. Die Netzwerkproben wurden auf dem Probenhalter aufgebracht und anschließend vermessen.

UV/Vis Spektroskopie

Die UV/Vis spektroskopischen Messungen wurden entweder an einem Zweistrahl-Photometer Specord 210 der Firma Analytik Jena bei 25 °C oder an einem Einstrahl-Photometer Specord S600 der Firma Analytik Jena durchgeführt. Dabei erfolgte die Temperaturregelung beim Specord S600 über ein Peltierelements (0 - 85 °C).

Fluoreszenzspektroskopie

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektroskop f-2700 der Firma Hitachi bei 25 °C durchgeführt.

Dialysen

Die durchgeführten Dialysen wurden mithilfe von Dialysemembranen der Firma Roth mit einem Molekulargewichtsausschluss (eng. Molecular weight cut off, MWCO) von 1000 bzw. 2000 g·mol⁻¹ in Methanol oder bidestillierten (bidest.) Wasser durchgeführt. Die Dialyse gegen Methanol erforderte zuvor eine Konditionierung der Dialysemembran. Dazu wurde der Dialyseschlauch in einem Becherglas mit 50 mL bidest. Wasser überschichtet und langsam wurden 50 mL Methanol zu getropft. Nach dem vollständigen Zutropfen des Methanols wurden 50 mL der entstanden Methanol/bidest. Wasser Lösung entnommen und erneut wurde 50 mL Methanol zu getropft. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach dem letzten Schritt (ca. 97 vol.% Methanol) konnte der Dialyseschlauch für eine Dialyse in Methanol verwendet oder Übernacht in Methanol gelagert werden. Für die Dialysen in bidest. Wasser war keine Konditionierung

Experimental Teil

nötig. In diesen Fällen wurde die Dialysemembran vor dem Gebrauch mit VE-Wasser gespült. Für die Durchführung der Dialyse wurde die Probe in dem entsprechenden Lösungsmittel (bidest. Wasser oder Methanol) gelöst und anschließend in die Dialysemembran gefüllt. Dabei wurden die beiden Enden der Dialysemembran mit Gefrierbeutelklemmen verschlossen. Die Dialyse gegen bidest. Wasser erfolgte über Nacht in 1000 mL bidest. Wasser und die Dialyse gegen Methanol erfolgte innerhalb von 5 h in 1000 mL Methanol. Abschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und die gereinigte Probe konnte erhalten werden.

5.3. Synthesen

4-(Brommethyl)-*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylbenzenammonium-bromid (DDA-X):

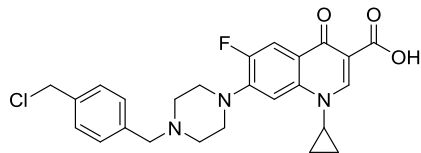
Zu einer Suspension aus α,α' -Dibrom-*p*-xylol (5.00 g, 18.9 mmol, 1.00 eq.) in trockenem Chloroform wurde eine Lösung aus *N,N*-Dimethyldodecylamin (DDA; 4.04 g, 18.9 mmol, 1.00 eq.) in 7.50 mL Chloroform bei 42 °C in einem Zeitintervall von 4 h langsam zu getropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend für weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Lösungsmittelvolumen wurde auf ein Drittel reduziert und die verbleibende Lösung für 6 h bei 0 °C gelagert. Anschließend wurde nicht abreagiertes α,α' -Dibrom-*p*-xylol abfiltriert. Das Chloroform wurde nun vollständig entfernt und der Rückstand in Tetrahydrofuran (150 mL) aufgenommen. Das ausfallende Nebenprodukt wurde durch eine Filtration entfernt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und das hochviskose Produkt (5.48 g, 13.8 mmol, 77%) konnte erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.69 - 0.95 (t, J = 6.8 Hz 3 H), 1.06 - 1.46 (m, 18 H), 1.58 - 1.90 (m, 2 H), 3.28 (s, 6 H), 3.41 - 3.57 (m, 2 H), 4.57 (s, 2 H), 5.15 (s, 2 H), 7.43 (d, J = 8.42 Hz, 2 H), 7.68 (d, J = 8.42 Hz, 2 H) ppm.

Experimental Teil

7-(4-(4(Chlormethyl)benzyl)piperazin-1-yl)-1-cyclo-propyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydro-chinolon-3-carbonsäure (xCIP-Spacer): ¹⁵⁵

α,α' -Dichlor-*p*-xylol (875 mg, 5.00 mmol, 5.00 eq.) und NaHCO₃ (168 mg, 2 mmol, 2.00 eq.) wurden in einer Mischung aus *N,N*-

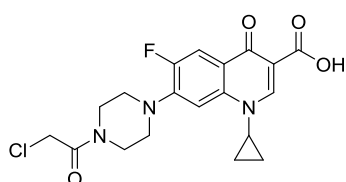


Dimethyl-formamid und Acetonitril (1:1, 4 mL) gelöst. Ciprofloxacin (331 mg, 1.00 mmol, 1 eq.) wurde anschließend zugegeben. Die Reaktionslösung wurde

auf 80 °C erwärmt und für 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Das Produkt wurde in Diethylether gefällt, der Überstand ab dekantiert und der Feststoff getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂:MeOH = 20:1) gereinigt und das reine Produkt konnte als leicht gelblicher Feststoff erhalten werden (230 mg, 0.489 mmol, 49%).

¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.15 - 1.25 (m, 2 H), 1.32 - 1.44 (m, 2 H), 2.69 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H), 3.36 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H), 3.52 (td, *J* = 6.77, 2.93 Hz, 1 H), 3.61 (s, 2 H), 4.61 (s, 2 H), 7.31 - 7.42 (m, 5 H), 8.02 (d, *J* = 13.17 Hz, 1 H), 8.77 (s, 1 H) ppm.

7-(4-(2-Chloracetyl)piperazin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinoline-3-carbonsäure(eCIP-Spacer): ¹⁵⁷



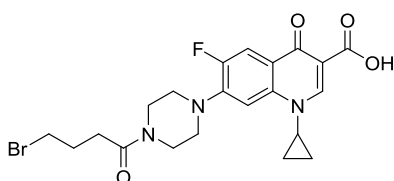
In einen 100 mL Schlenk Kolben wurde unter Argonatmosphäre Ciprofloxacin (332 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.) in 5.00 mL Dichlormethan suspendiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur Triethylamin

(101 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.) zu getropft. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C abgekühlt und Chloracetylchlorid (0.170 g, 1.55 mmol, 1.55 eq.) langsam zugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde das Gemisch in Diethylether gefällt, zentrifugiert und der Diethylether ab dekantiert. Mittels Säulenchromatographie (SiO₂; Dichlormethan:Methanol 20:1, mit 1 % Essigsäure) wurde das Rohprodukt gereinigt. Das Produkt konnte als leicht gelblicher Feststoff mit einer Ausbeute von 67% (274 mg, 0.670 mmol) erhalten werden.

Experimental Teil

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.17 - 1.29 (m, 2 H), 1.42 (d, J = 6.85 Hz, 2 H), 3.32 – 3.44 (m, 4 H), 3.48 – 3.59 (m, 1 H), 3.75 -3.95 (m, 4 H), 4.14 (s, 2 H), 7.40 (d, J = 6.85 Hz, 1 H), 8.10 (d, J = 12.72 Hz, 1 H), 8.81 (s, 1 H) ppm.

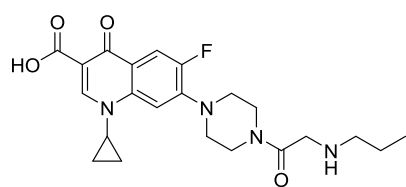
7-(4-(4-brombutanoyl)piperazin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydrochinoline-3-carbonsäure (bCIP-Spacer):



Die Synthese des bCIP-Spacern verlief analog zu dem zuvor beschriebenen eCIP-Spacer. Es wurden 4-Brombutylchlorid (285 mg, 1.55 mmol, 1.55 eq) statt Chloracetylchlorid verwendet. Das Produkt konnte als leicht gelblichen Feststoff mit einer Ausbeute 42% (171 mg, 0.420 mmol) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.16 - 1.29 (m, 2 H), 1.42 (d, J = 6.85 Hz, 2 H), 2.19 (t, J = 6.36, 2H), 2.60 (t, J = 7.09 Hz, 2H), 3.26 – 3.43 (m, 4 H), 3.55 (d, J = 2.45 Hz, 1 H), 3.69 (t, J = 5.87 Hz, 2H), 3.74 – 3.96 (m, 4 H), 7.38 – 7.52 (m, 1H), 8.09 (d, J = 13.21 Hz, 1 H), 8.81 (s, 1 H) ppm.

1-Cyclopropyl-6-fluor-4-oxo-7-(4-(propylglycyl)piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinoline-3-carbonsäure (pCIP):



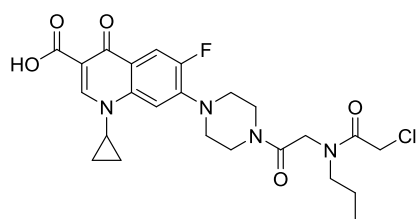
Unter Argonatmosphäre wurden in einem 100 mL Schlenkkolben eCIP (100 mg, 0.210 mmol, 1.00 eq.) und Natriumhydrogencarbonat (17.5 mg, 0.210 mmol, 1.00 eq.) in 5.00 mL einer Mischung aus *N,N*-Dimethylformid und Acetonitril (1:1 v/v) suspendiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 50 °C erwärmt und *n*-Propylamin (170 mL, 2.10 mmol, 10.0 eq.) langsam zu getropft. Nach einer Reaktionszeit von 24 h bei 50 °C wurde die Reaktionslösung in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert und der Diethylether ab dekantiert. Das Rohprodukt wurde getrocknet und in 25.0 mL Chloroform aufgenommen. Die resultierende organische Phase wurde dann mit (3 × 25.0 mL) Wasser extrahiert. Die wässrige Phasen wurden gesammelt, eingengt und das Wasser

Experimental Teil

an einem Lyophilisator entfernt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden mit einer Ausbeute von 51% (46 mg, 0.107 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*): δ = 0.93 (t, $J=7.34$ Hz, 3 H,), 1.03 - 1.16 (m, 2 H), 1.28 - 1.41 (m, 2 H), 1.56 - 1.78 (m, 2 H), 2.96 - 3.12 (m, 2 H), 3.24 - 3.43 (m, 4 H), 3.62 (m, 3H), 3.75-4.14 (m, 4 H), 7.40 (m, 1 H), 7.53 (m, 1 H), 8.56 (m, 1 H) ppm.

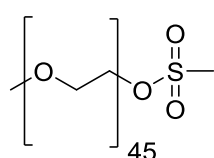
7-(4-(N-(2-Chloroacetyl)-N-propylglycyl)piperazin-1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluor-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carbonsäure (peCIP):



Unter Argonatmosphäre wurde in einem Schlenkkolben pCIP (800 mg, 1.96 mmol, 1.00 eq) vorgelegt und mit 12.0 mL Chloroform suspendiert. Anschließend wurde Triethylamin (0.280 mL, 2.00 mmol, 1 eq.) bei Raumtemperatur zu getropft. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit Chloracetylchlorid (0.320 mL, 4.00 mmol, 2.00 eq.) versetzt. Die Reaktion wurde 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt in Diethylether gefällt, zentrifugiert und der Diethylether ab dekantiert. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO_2 ; Dichlormethan:Methanol; 20:1 mit 1% Essigsäure). peCIP konnte mit einer Ausbeute von 73% (724 mg, 1.43 mmol) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz Chloroform-*d*): δ = 0.99 (m, 3 H), 1.19 - 1.25 (m, 2H), 1.38 - 1.46 (m, 2 H), 1.63 - 1.81 (m, 2 H), 3.33 (d, 4H), 3.43 (m, 4H), 3.54 (dt, $J=7.21, 3.48$ Hz, 1 H), 3.78 - 3.88 (m, 4 H), 4.20 (s, 2 H), 7.39 (d, $J=6.85$ Hz, 1 H), 8.06 (d, $J=13.21$ Hz, 1 H), 8.80 (s, 1 H) ppm.

Methoxy-poly(ethylenglycol)-mesylat (Me-PEG-OMs):



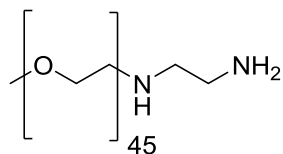
Polyethylenglycol Monomethylether ($2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 4.00 g, 2.00 mmol, 1.00 eq.) wurde 2 h bei 100 °C unter vermindertem Druck getrocknet. Anschließend wurde das trockne Polymer in 100 mL

Experimental Teil

Dichlormethan gelöst und mit Triethylamin (2.77 mL, 20.0 mmol, 10.0 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und Mesylchlorid (1.48 mL, 20.0 mmol, 10.0 eq.) langsam zugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 24 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit Dichlormethan (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in Diethylether gefällt, der Überstand dekantiert und der Feststoff getrocknet. Dieser Fällungsschritt wurde dreimal wiederholt um Me-PEG-OMs als weißen Feststoff (2.39 g, 1.15 mmol, 58%) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 3.04 (s, 3 H) 3.33 (s, 3 H) 3.42 - 3.78 (m, 168 H) 4.30 - 4.36 (m, 2 H) ppm.

Methoxy-poly(ethylenglycol)-ethylendiamin (Me-PEG-EDA):



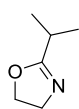
Me-PEG-OMS (208 mg, 0.100 mmol, 1.00 eq.) wurde in 5.00 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurde Ethylendiamin (66.7 μL , 1.00 mmol, 10.0 eq.) zugegeben, die Reaktionslösung auf 78 °C erwärmt und für 48 h bei dieser Temperatur gerührt. Das

Rohprodukt wurde dann in Diethylether gefällt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand an Diethylether wurde ab dekantiert und das verbleibende Rohprodukt durch Dialyse gegen destilliertes Wasser (24 h, mit einer benzylierten Zellulosemembran (1000 MWCO)) gereinigt. Das Wasser wurde mittels Lyophile entfernt und das Me-PEG-EDA konnte als weißer Feststoff (170 mg, 0.083 mmol, 83%) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 2.43 - 2.98 (m, 6 H) 3.36 (s, 3 H) 3.62 (s, 182 H) ppm

Experimental Teil

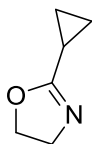
Synthese von 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin (*iPrOx*):



Die Synthese von 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin wurde nach einer modifizierten Variante eines Protokolls von SCHUBERT et. al.^{28, 144} hergestellt. Zu einer Mischung aus *iso*-Propylcyanid (85.0 mL, 0.930 mol, 1.00 eq.) und Ethanolamin (67,8 mL, 1.11 mol, 1.20 eq.) wurde Zinkacetat Dihydrat (1.00 g, 0.019 mmol, 0.020 eq.) gegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Rückfluss in der Synthesemikrowelle langsam auf 115 °C erwärmt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurde die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt und das Rohprodukt mittel fraktionierter Destillation gereinigt, wobei zunächst das überschüssige *iso*-Propylcyanid siedet (30 mbar, 33 °C). Die nachfolgende Fraktion lieferte das Monomer 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin (30 mbar, 43-47 °C)(75%, 78.8 g, 0.698 mol). Dann wurde das Monomer über CaH₂ destilliert.

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.20 (d, J = 7.27 Hz, 6 H) 2.57 (dt, J = 13.86, 7.03 Hz, 1 H) 3.82 (t, J = 9.37 Hz, 2 H) 4.22 (t, J = 9.56 Hz, 2 H) ppm.

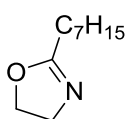
Synthese von 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin (*cPrOx*):



Die Synthese von 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin wurde analog zur Synthese von 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin durchgeführt. Allerdings siedet 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin bei 25 mbar und 87 °C. Die Ausbeute betrug 33% (34.7 g, 0.307 mol).

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.70 - 0.81 (m, 2 H), 0.80 - 0.92 (m, 2 H), 1.57 (tt, J =8.35, 4.92 Hz, 1 H), 3.72 (t, J =9.50 Hz, 2 H), 4.12 (t, J =9.50 Hz, 2 H) ppm.

Synthese von 2-Heptyl-2-oxazolin (*HepOx*):



Die Synthese beruht auf einem modifizierten Protokoll nach SCHUBERT et. al.^{144 28} Octanitril (35.2 mL, 0.228 mol, 0.930 eq.), Zinkacetat dihydrat (1.00 g 0.020 eq.) und Ethanolamin (16.4 mL, 0.273 mol, 1.20 eq.) wurden zusammen in einen Kolben gegeben. Der Kolben wurde in einer Synthesemikrowelle platziert und mit einem Rückflusskühler ausgerüstet. Die Reaktionslösung wurde

Experimental Teil

anschließend auf 130 °C erwärmt und 25 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt und mit 100 mL Cyclohexan versetzt. Die Cyclohexanphase wurde anschließend fünfmal mit Wasser (400 mL) und einmal mit einer ges. wässr. NaCl Lösung (400 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend einmal fraktioniert und einmal über CaH₂ destilliert. Das HepOx konnte als klare Flüssigkeit (57%, 89.6 g, 0.530 mol) erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.85 (t, $J=6.85$ Hz, 3 H) 1.16 - 1.37 (m, 8 H) 1.60 (quin, $J=7.46$ Hz, 2 H) 2.23 (t, $J=7.83$ Hz, 2 H) 3.79 (t, $J=9.54$ Hz, 2 H) 4.18 (t, $J=9.54$ Hz, 2 H) ppm.

Generelle Prozedur zur Herstellung für Homopolymere:

Die benötigte Konzentration an Initiator (DDA-X, α,α' -Dibrom-*p*-xylol (DBX) und Methyltosylat (MeTos)) wurde mit Hilfe des Polymerisationsgrade DP_{set} und der Anfangskonzentration an Monomer [Initiator] = [Monomer]·DP_{set}⁻¹ berechnet. Der Initiator (DDA-X; 0.149 g, DBX; 0.098 g oder Methyltosylat; 0.059 g, 0.375 mmol, 1.00 eq.) wurde bei Raumtemperatur in 5.00 mL trockenem Chloroform gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe des Monomers (2-Methyl-2-oxazolin (MeOx); 1.00 g, 2-Ethyl-2-oxazolin (EtOx); 1.11 g 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin (*i*PrOx); 1.27 g, 2-*cyclo*-Propyl-2-oxazolin (*c*PrOx); 1.25 g 11.25 mmol, 30.0 eq.). Die Polymerisation wurde in einer CEM-Discover Synthesemikrowelle durchgeführt. Die Reaktionstemperatur wurde mittels vertikal fokussierenden Infrarotsensors überwacht. Das Reaktionsgefäß wurde unter Rühren bei einer max. Leistung (300 W) auf die jeweilige Temperatur gebracht (siehe Tabelle 26). Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die MW-Leistung angepasst. Zur Vermeidung von Temperaturspitzen wurde die Reaktionslösung innerhalb der folgenden 2-3 min durch Druckluftstöße gekühlt. Die entsprechenden Reaktionszeiten variierten, je nach Initiator, Monomer und Temperatur zwischen 1 – 16 h.

Experimental Teil

Termination mit Ethylendiamin (EDA): Ein zehnfach molarer Überschuss (bezogen auf die Stoffmenge des Initiator) von Ethylendiamin (250 mL, 3.75 mmol, 10 eq.) wurde bei RT zur lebenden Polymerkette hinzu gegeben und anschließend 45 °C für 72 h gerührt. Das Rohprodukt wurde in Diethylether gefällt, zentrifugiert, dekantiert, getrocknet und anschließend mit destilliertes Wasser aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert. Es folgte eine Dialyse für 24 h in destilliertem Wasser (benzoylierte Zellulosemembran (1000 MWCO)). Das Wasser wurde an einer Gefriertrocknung entfernt und die Polymere konnten in Ausbeuten von 69 - 93% erhalten werden.

Tabelle 26: Überblick über die hergestellten Polymere sowie die verwendeten Einwaagen und der Reaktionsparameter.

Probenname	Initiator [mg]	Monomer [mg]	Reaktions- bedingungen	EDA [mg]
MeTos initiierte Polymere				
Me-PMeOx ₂₇ -EDA	59	1000	1 h, 90 °C	223
Me-PEtOx ₃₁ -EDA	59	1110	2 h, 100 °C	223
Me-PiPrOx ₄₄ -EDA	59	1270	4 h, 110 °C	223
Me-PcPrOx ₃₇ -EDA	59	1270	4 h, 110 °C	223
DDA-X initiierte Polymere				
DDA-X-PMOx ₃₉ -EDA	149	1000	4 h, 110 °C	223
DDA-PEtOx ₅₀ -EDA	149	1100	12 h, 110 °C	223
DDA-X-PiPrOx ₂₄ -EDA	149	1270	16 h, 110 °C	223
DBX initiierte Polymer				
EDA-PMOx ₂₄ -DBB-PMOx ₂₄ -EDA	98	1000	4 h, 110 °C	223

Me-PMOx-EDA. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.74 – 2.20 (m, 81 H), 2.66 – 2.89 (m, 4 H), 2.91 - 3.02 (m, 3H), 3.10 – 3.72 (m, 112 H) ppm.

Me-PEtOx-EDA. ¹H-NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.11 (m, 94 H) 2.14 - 2.49 (m, 61 H) 2.59 (br. s., 6 H) 3.02 (s, 3 H) 3.28 - 3.78 (m, 120 H) ppm.

Experimental Teil

Me-PiPrOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.08 (m., 269 H), 2.50 - 2.99 (m, 51 H), 3.04 (m, 3 H), 3.29 - 3.67 (m, 180 H) ppm.

Me-PcPrOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.65 - 1.02 (m, 116 H), 1.54 - 2.03 (m, 38 H), 2.79 - 3.00 (m, 6 H), 3.14 - 3.36 (m, 3 H), 3.38 - 3.84 (m, 148 H) ppm.

DDA-X-PMOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.72 - 0.93 (m, 3 H), 1.25 (br. s., 18 H), 1.67 - 2.16 (m, 117 H), 2.51 - 2.72 (m, 6 H), 2.95 (br. s., 6 H), 3.08 - 3.71 (m, 165 H), 4.37 - 4.74 (m, 4 H), 7.04 - 7.84 (m, 4 H) ppm.

DDA-PEtOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.71 - 0.88 (m, 3 H), 0.92 - 1.38 (m, 150 H), 1.94 - 2.51 (m, 89 H), 2.69 (d, $J=11.34$ Hz, 7 H), 3.13 - 3.69 (m, 181 H), 4.39 - 4.60 (m, 4 H), 7.09 (d, $J=7.68$ Hz, 4 H) ppm.

DDA-X- PiPrOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.84 (t, $J=6.85$ Hz, 3 H), 0.90 - 1.22 (m, 104 H), 2.49 - 3.00 (m, 24 H), 3.08 - 3.85 (m, 74 H), 4.45 - 4.72 (m, 4 H), 6.94 - 7.19 (m, 4 H) ppm

Me-PEG-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 2.69 - 2.89 (m, 4 H), 3.36 (s, 3 H), 3.62 (s, 187 H).

EDA-PMOx-DBX-PMOx-EDA. $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, Chloroform-*d*) δ = 2.02 - 2.22 (m, 98 H), 2.75 (s, 5 H), 3.47 (m, 140 H), 4.40 - 4.71 (m, 4 H), 7.07 - 7.25 (m, 4 H).

Termination mit CIP: Für die Funktionalisierung mit CIP wurde ein zehnfacher Überschuss (bezogen auf die Stoffmenge des Initiator) zur Reaktionslösung gegeben und 48 h für 70 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde in Diethylether gefällt, zentrifugiert, dekantiert, getrocknet und anschließend wurden die Polymere in Wasser suspendiert und für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mittels Spritzenfilter filtriert und dann dialysiert. Das Produkt wurde an einem Lyophilisator getrocknet.

DDA-X-PMOx-CIP. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.83 (t, $J=6.65$ Hz, 3 H), 1.01 - 1.47 (m, 18 H), 1.69 - 2.40 (m, 178 H), 2.76 - 3.92 (m, 258 H), 4.04 - 4.78 (m, 4 H), 7.38 - 7.67 (m, 1 H), 8.06 (m, 1 H), 8.37 - 8.67 (m, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Termination mit BDA, HDA, DODA, TREN, TET oder TEP: Für die Funktionalisierung mit einem Amin (1,4-Butyldiamin (BDA), 1,6-Hexyldiamin (HDA), 1,12-Dodecylamin (DODA), *N,N*-Bis(2-Aminoethyl)ethylendiamin (TREN), Triethylentetramin (TET), Tetraethylenpentamin (TEP)) wurde ein 10-facher Überschuss (bezogen auf die Initiator Menge) (3.75 mmol, 10.0 eq.) zur Reaktionslösung gegeben und 48 h für 70 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde in Diethylether gefällt, zentrifugiert, dekantiert. Anschließend wurde das Produkt gegen Wasser dialysiert. Nach entfernen der Wassers konnte das Polymer erhalten werden.

Me-PMeOx₂₉-BDA. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.44 (m, 2 H), 1.89 (m, 2 H), 2.08 (m, 92 H), 2.55 - 2.86 (m, 6 H), 2.98 (m, 3 H), 3.41 (m, 117 H) ppm.

Me-PMeOx₃₉-HDA. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.14 (m, 2 H), 1.23 - 1.44 (m, 5 H), 1.80 - 2.31 (m, 123 H), 2.57 - 2.87 (m, 6 H), 2.96 - 3.01 (m, 3 H), 3.20 - 3.71 (m, 157 H) ppm.

Me-PMeOx₃₈-DODA. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.98 - 1.64 (m, 14 H), 1.08 - 1.50 (m, 6 H), 1.87 - 2.17 (m, 115 H), 2.48 - 2.84 (m, 6 H) 2.88 - 3.01 (m, 3 H), 3.14 - 3.70 (m, 152 H)

Me-PMeOx₃₃-TREN. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.93 - 2.18 (m, 98 H), 2.26 - 2.91 (m, 12 H), 2.95 - 3.03 (m, 3 H), 3.23 - 3.69 (m, 133 H) ppm.

Me-PMeOx₃₄-TET. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.83 - 2.26 (m, 90 H), 2.36 - 2.92 (m, 10 H), 2.95 - 3.03 (m, 3 H), 3.21 - 3.70 (m, 120 H) ppm.

Me-PMeOx₂₉-TEP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.96 - 2.34 (m, 87 H), 2.51 - 2.96 (m, 14 H), 3.01 - 3.08 (m, 3 H), 3.29 - 3.81 (m, 117 H) ppm.

Termination mit Natriumazid: Die Polymerisationslösung wurde mit einem 5-fachen Überschuss an Natriumazid (135 mg, 1.86 mmol, 5.00 eq.) versetzt und 24 h bei 50 °C gerührt. Die Aufarbeitung verlief analog zu den EDA terminierten Polymeren.

Me-PMeOx₃₂-N₃. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.12 - 2.48 (m, 96 H), 2.88 - 3.11 (m, 3 H), 3.16 - 3.65 (m, 127 H) ppm.

Experimental Teil

Allgemeine Herstellung zur Synthese von statistischen Copolymeren

Methyltosylat (59.0 mg, 0.375 mmol, 1.00 eq.) wurde bei Raumtemperatur in 5.00 mL trockenem Chloroform gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin. Die Polymerisation wurde in einer CEM-Discover Synthesemikrowelle durchgeführt. Die Reaktionstemperatur wurde mittels vertikal fokussierendem Infrarotsensors überwacht. Das Reaktionsgefäß wurde unter Rühren bei einer max. Leistung (300 W) auf 110 °C gebracht. Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die MW-Leistung angepasst. Zur Vermeidung von Temperaturspitzen wurde die Reaktionslösung innerhalb der folgenden 2 - 3 min durch Druckluftstöße gekühlt. Die Reaktionszeit entsprach 4 h. Die Termination und die Reinigung erfolgten wie bei den Homopolymeren (siehe oben).

Tabelle 27: Überblick der hergestellten statistischen Copolymeren sowie die verwendeten Einwaagen und Reaktionsparameter

Probenname	MeTos	EtOx	<i>i</i> PrOx	EDA
Me- <i>Pi</i> PrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA	59 mg	323 mg,	902 mg,	223 mg
		7.99 mmol	7.98 mmol	
Me- <i>Pi</i> PrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA	59 mg	537 mg,	657 mg,	223 mg
		5.43 mmol	5.81 mmol	
Me- <i>Pi</i> PrOx ₇ -PEtOx ₁₆ -EDA	59 mg	774 mg,	386 mg,	223 mg
		7.82 mmol	3.42 mmol	

Me-*Pi*PrOx-PEtOx-EDA. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.09 (br. s., 125 H), 2.27 - 2.38 (m, 30 H), 2.64 (m, 13 H), 2.84 (m, 12 H), 3.00 (m, 3 H), 3.43 (m, 110 H) ppm.

Experimental Teil

Allgemeine Herstellung zur Synthese von Blockcopolymeren

Methyltosylat (172 mg, 0.939 mmol, 1.00 eq.) wurde in 15.0 mL trockenem Chloroform gelöst und anschließend 2-Methyl-2-oxazolin hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde in einer Synthesemikrowelle platziert. Die Polymerisation der MeOx-Monomere wurde bei 90 °C für 30 - 60 min durchgeführt. Dann wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und es folgte die Zugabe von 2-Heptyl-2-oxazolin unter Schutzgas. Der PHepOx-Block wurde 1 - 5 h in der Mikrowelle bei 120 °C polymerisiert. Nach Ablauf der Polymerisation wurde das Reaktionsgemisch wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit EDA versetzt (626 mL, 9.40 mmol, 10.0 eq). Die Lösung wurde 72 h bei 45 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt wurde gegen Methanol dialysiert.

Tabelle 28: Überblick über die hergestellten Blockcopolymeren sowie die verwendeten Einwaagen und Reaktionsparameter

Probenname	MeTos	MeOX	HepOx	EDA
Me-PMeOx ₂₈ -PHepOx ₅ -EDA	172 mg	2000 mg	912 mg	564 mg
Me-PMeOx ₁₉ -PHepOx ₉ -EDA	172 mg	1600 mg	1820 mg	564 mg
Me-PMeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ -EDA	172 mg	1200 mg	2730 mg	564 mg
Me-PMeOx ₆ -PHepOx ₁₂ -EDA	172 mg	800 mg	3640 mg	564 mg
Me-PMeOx ₅ -PHepOx ₂₆ -EDA	172 mg	400 mg	4550 mg	564 mg
Me-PHePOx ₂₃ -EDA	172 mg	0 mg	4000 mg	564 mg

Me-PMeOx-PHepOx-EDA. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.66 - 0.98 (m, 42 H), 1.27 (br. s., 115 H), 1.59 (br. s., 27 H), 1.86 - 2.19 (m, 42 H), 2.19 - 2.43 (m, 27 H), 2.92 - 3.10 (m, 3 H), 3.21 - 3.89 (m, 111 H) ppm.

Generierung einer NH₂-Polymer-Endgruppe

Me-PMeOx-N₃ (400 mg, 0.190 mmol, 1.00 eq.) wurde in 5.00 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde Triphenylphosphin (75.0 mg, 0.1 mmol,

Experimental Teil

1.00 eq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser (8.00 mL) beendet. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase wurde mit einem Spritzenfilter filtriert. Das Wasser wurde entfernt und der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und mittels Spritzenfilter filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das Produkt erhalten werden (56%, 223 mg, 0.010 mmol).

Me-PMeOx₃₂-NH₂.¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.85 - 2.32 (m, 85 H), 2.72 - 2.96 (m, 2 H), 2.99 - 3.08 (m, 3 H) 3.24 - 3.73 (m, 113 H) ppm.

Durchführung der xCIP-Verknüpfung:

Das xCIP (93.8 mg, 2.00 mmol, 2 eq.) und NaHCO₃ (16.8 mg, 2.00 mmol, 2 eq.) wurde in einer Mischung aus *N,N*-Dimethylformamid and Acetonitril (1:1, 4 mL) suspendiert. Das jeweilige Polymer (DDA-X-PMOx₃₀-EDA; 300 mg, Me-PMOx₃₀-EDA; 219 mg, Me-PEtOx₃₀-EDA; 305 mg, Me-PEG₄₅-EDA; 205 mg, Me-*Pi*PrOx₃₀-EDA; 263 mg, EDA-PMOx₁₅-DBX-PMOx₁₅-EDA; 277 mg, DDA-X-PEtOx₃₀-EDA; 336 mg, DDA-X-*Pi*PrOx₃₀-EDA; 378 mg 0.10 mmol, 1 eq.) wurde zur Suspension gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 80 °C erwärmt und für 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das rohe Polymer in Diethylether gefällt, der Überstand ab dekantiert und der Rückstand getrocknet. Der Polymerrückstand wurde in Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert (benzoylierte Zellulosemembran (2000 MWCO)). Polymere mit einem niedrigeren Molekulargewicht wurden zweimal dialysiert, wobei eine Zellulosemembran mit einem *cutt-of* von 1000 g mol⁻¹ verwendet wurden. Das Wasser wurde mittels Lyophile entfernt und die erwarteten Polymere wurden mit einer Ausbeute von 45-85% erhalten. Für PEtOx-Polymere wurde auf eine Extraktion verzichtet und stattdessen wurden diese drei- bis zweifach gegen Wasser dialysiert. *Pi*PrOx und *Pc*PrOx wurde zur Reinigung einmal gegen Methanol und einmal gegen Wasser dialysiert.

Experimental Teil

Tabelle 29: Überblick der hergestellten CIP-Konjugate sowie der verwendeten Einwaagen

Probenname	Polymermenge	xCIP-Menge
Me-PMeOx ₂₆ -EDA-xCIP	219 mg	93.8 mg
Me-PEtOx ₃₃ -EDA-xCIP	305 mg	93.8 mg
Me-PiPrOx ₄₇ -EDA-xCIP	263 mg	93.8 mg
DDA-X-PMeOx ₄₂ -EDA-xCIP	300 mg	93.8 mg
DDA-PEtOx ₅₀ -EDA-xCIP	336 mg	93.8 mg
DDA-X-PiPrOx ₂₅ -EDA-xCIP	378 mg	93.8 mg
CIP-EDA-PMOx ₁₉ -DBB-PMOx ₁₉ -EDA-xCIP	277 mg	187.6 mg
Me-PEG ₄₃ -EDA-xCIP	205 mg	93.8 mg
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA-xCIP	345 mg	93.8 mg
Me-PiPrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA-xCIP	316 mg	93.8 mg
Me-PiPrOx ₇ -PEtOx ₁₆ -EDA-xCIP	245 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₃₁ -BDA-xCIP	260 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₅₄ -HDA-xCIP	344 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₄₃ -DODA-xCIP	347 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₂₃ -TREN-xCIP	310 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₃₅ -TET-xCIP	313 mg	93.8 mg
Me-PMeOx ₃₅ -TEP-xCIP	274 mg	93.8 mg
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₃ -EDA-xCIP	260 mg	93.8 mg
Me-MeOx ₁₉ -PHepOx ₇ -EDA-xCIP	340 mg	93.8 mg
Me-MeOx ₁₄ -PHepOx ₁₁ -EDA-xCIP	340 mg	93.8 mg
Me-MeOx ₈ -PHepOx ₁₄ -EDA-xCIP	300 mg	93.8 mg
Me-PHepOx ₂₂ -EDA-xCIP	300 mg	93.8 mg

Me-PMOx₂₆-EDA-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.18 (br. s., 2 H), 1.35 (br. s., 2 H), 1.70 - 2.30 (m, 79 H), 2.54 - 2.86 (m, 8 H), 3.01 - 3.05 (m, 2 H), 3.24 - 3.72 (m, 107 H), 7.23 - 7.33 (m, 6 H), 7.89 - 7.99 (m, 1 H) 8.65 - 8.74 (m, 1 H) ppm.

Me-PEtOx₃₃-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.90 - 1.29 (m, 98 H) 1.36 (d, *J*=6.50 Hz, 2 H) 2.07 - 2.47 (m, 70 H) 2.65 (br. s., 8 H) 2.96 - 3.09 (m, 3 H) 3.22 - 3.79 (m, 135 H) 7.19 - 7.41 (m, 6 H) 7.98 (d, *J*=13.00 Hz, 1 H) 8.73 (s, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Me-*PiPrOx*₄₇-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.65 - 1.42 (m, 287 H), 2.49 - 3.04 (m, 47 H), 3.08 (m., 3 H), 3.15 - 3.83 (m, 195 H), 7.27 - 7.40 (m, 5 H), 7.45 - 7.55 (m, 1 H), 7.93 - 8.17 (m, 1 H) ppm.

Me-PEG₄₃-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.10 - 1.20 (m, 2 H) 1.32 - 1.41 (m, 2 H) 2.55 - 2.72 (m, 8 H) 3.28 - 3.36 (m, 4 H) 3.37 (s, 3 H) 3.46 - 3.80 (m, 173 H) 7.29 (s, 7 H) 7.84 - 8.01 (m, 1 H) 8.65 - 8.75 (m, 1 H) ppm.

DDA-X-PMOx₄₂-EDA-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.80 (t, *J*=6.78 Hz, 3 H), 0.99 - 1.25 (m, 22 H), 1.65 - 2.28 (m, 128 H), 2.60 (br. s., 17 H), 3.00 - 3.76 (m, 206 H), 4.39 - 5.39 (m, 6 H), 7.27 (s, 8 H), 7.56 (m, 1H), 7.85 (m, 1 H) 8.56 (m, 1 H) ppm.

DDA-X-PEtOx₅₀-EDA-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.85 (s, 3 H), 0.97 - 1.38 (m, 158 H), 1.97 - 2.65 (m, 125 H), 3.44 (m, 224 H), 4.58 (m, 4 H), 7.14 (d, *J*=5.13 Hz, 4 H), 7.48 - 7.60 (m, 1 H), 7.81 - 8.15 (m, 1 H), 8.43 - 8.93 (m, 1 H) ppm.

DDA-X-*PiPrOx*₂₅-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.89 - 1.01 (m, 3 H), 1.02 - 1.39 (m, 115 H), 2.52 - 3.05 (m, 25 H), 3.30 - 3.81 (m, 82 H), 7.27 - 7.31 (s, 5 H), 7.94 - 8.07 (m, 1 H), 8.67 - 8.79 (m, 1 H) ppm.

xCIP-EDA-PMOx-DBB-PMOx-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.03 - 1.57 (m, 4 H), 1.66 - 2.31 (m, 57 H), 2.69 (m, 8 H), 3.27 - 3.92 (m, 65 H), 4.34 - 4.79 (m, 2 H), 7.29 - 7.67 (m, 5 H), 7.80 - 8.19 (m, 1 H), 8.77 (s, 1 H) ppm.

Me-*PiPrOx*-PEtOx-EDA-xCIP ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.77 - 1.46 (m, 184 H), 2.27 - 2.41 (m, 18 H), 2.68 (br. s., 21 H), 2.80 - 2.89 (m, 12 H), 3.08 (m, 3 H), 3.46 (m, 133 H), 7.27 (m, 5 H), 7.93 - 8.09 (m, 1 H), 8.70 - 8.84 (m, 1 H) ppm.

Me-PcPrOx₃₀-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.79 (br. m., 124 H), 1.86 (br. m., 34 H), 2.67 (br. m., 4 H), 2.97 (br. s., 3 H), 3.60 (br. m., 127 H), 7.27 (br. s., 4 H), 7.36 (m, 1 H) 8.02 (m, 1 H), 8.77 (m, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₃₁-BDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.19 (m, 14 H), 1.86 - 2.18 (m, 84 H), 2.21 - 2.73 (m, 8 H), 2.45 - 2.68 (m, 8 H), 2.96 - 3.04 (m, 3 H), 3.41 (d, *J*=12.72 Hz, 120 H), 7.19 (m, 1 H), 7.84 - 8.05 (m, 1 H), 8.55 - 8.83 (m, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Me-PMeOx₄₅-HDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.05 - 1.34 (m, 12 H), 1.90 - 2.17 (m, 118 H), 2.30 - 2.89 (m, 12 H), 2.95 - 3.03 (m, 3 H), 3.41 (d, *J*=12.72 Hz, 192 H), 7.19 (m, 1 H), 7.80 - 8.14 (m, 1 H), 8.62 - 8.81 (m, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₄₃-DODA-xCIP ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.19 (m., 24 H), 1.88 - 2.23 (m, 91 H), 2.31 - 2.78 (m, 12 H), 2.95 - 3.02 (m, 3 H), 3.41 (d, *J*=11.25 Hz, 137 H), 7.19 (s, 1 H), 7.80 - 8.08 (m, 1 H), 8.60 - 8.78 (m, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₂₃-TREN-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.12 (m., 2 H), 1.31 (m, 2 H), 1.97 - 2.17 (m, 111 H), 2.61 (br. s., 10 H), 2.94 - 3.03 (m, 3 H), 3.14 - 3.70 (m, 174 H), 7.14 - 7.33 (m, 1 H), 7.85 - 8.04 (m, 1 H) 8.70 (s, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₃₅-TET-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.20 (br. s., 2 H), 1.36 - 1.44 (m, 2 H), 1.95 - 2.28 (m, 114 H), 2.68, (br. s., 8 H), 3.05 (br. s., 3 H), 3.26 - 3.76 (m, 157 H), 7.27 (s, 1 H), 7.92 - 8.13 (m, 1 H), 8.77 - 8.92 (m, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₃₅-TEP-xCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.04 - 1.16 (m, 2 H), 1.27 - 1.37 (m, 2 H), 1.81 - 2.17 (m, 94 H), 2.26 - 2.93 (m, 6 H), 2.94 - 3.07 (m, 3 H), 3.22 - 3.74 (m, 132 H), 7.19 (m, 1 H), 7.85 - 8.08 (m, 1 H), 8.62 - 8.89 (m, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₁₅-PHepOx₁₂-EDA-xCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.80 (br. s., 34 H), 1.12 (m, 2H), 1.05 - 1.37 (m, 89 H), 1.31 (m, 2), 1.52 (br. s., 22H), 1.83 - 2.12 (m, 42 H), 2.12 - 2.38 (m, 25 H), 2.61 (br. s., 8 H), 2.95 - 3.02 (m, 3 H), 3.11 - 3.74 (m, 108 H), 7.01 - 7.32 (m, 6 H), 7.75 - 8.08 (m, 1 H), 8.70 (s, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Durchführung der eCIP- und bCIP-Verknüpfung

Die Konjugation mit eCIP sowie mit bCIP- erfolgte analog zur xCIP-Konjugation.

Tabelle 30: Überblick der hergestellten CIP-Konjugate und verwendeten Einwaagen.

Probenname	Polymermenge	eCIP-Menge
Me-PMeOx ₃₆ -EDA-eCIP	379 mg	100 mg
Me-PEtOx ₃₆ -EDA-eCIP	441 mg	100 mg
Me-PiPrOx ₆₂ -EDA-eCIP	480 mg	100 mg
Me-PEG ₂₃ -EDA-eCIP	126 mg	95 mg
DDA-X-PMeOx ₄₂ -EDA-eCIP	480 mg	100 mg
Me-PMeOx ₃₆ -EDA-bCIP	322 mg	100 mg
Me-PMeOx ₃₈ -BDA-eCIP	379 mg	100 mg
Me-PMeOx ₄₀ -HDA-eCIP	612 mg	100 mg
Me-PMeOx ₃₆ -DODA-eCIP	514 mg	100 mg
Me-PMeOx ₇₁ -TREN-xCIP	306 mg	100 mg
Me-PMeOx ₃₃ -TET-xCIP	428 mg	100 mg
Me-PMeOx ₂₆ -TEP-xCIP	428 mg	100 mg
Me-MeOx ₂₈ -PHepOx ₄ -EDA-eCIP	277 mg	100 mg
Me-MeOx ₁₈ -PHepOx ₆ -EDA-eCIP	362 mg	100 mg
Me-MeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ -EDA-eCIP	362 mg	100 mg
Me-MeOx ₈ -PHepOx ₂₂ -EDA-eCIP	319 mg	100 mg
Me-PHepOx ₂₃ -EDA-eCIP	319 mg	100 mg

Me-PMOx₃₆-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.10 - 1.27 (m, 2 H), 1.40 (br. s., 2 H), 1.84 - 2.25 (m, 105 H), 2.38 (br. s., 7 H), 2.98 - 3.09 (m, 3 H), 3.23 - 3.72 (m, 148 H), 7.33 - 7.49 (m, 1 H), 7.92 - 8.07 (m, 1 H), 8.74 (s, 1 H) ppm.

Me-PEtOx₃₆-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.11 -1.40 (m, 110 H), 2.11 - 2.40 (m, 72 H), 2.78 - 2.90 (m, 5 H), 3.02 (m, 3 H), 3.34 - 3.69 (m, 145 H), 7.39 (s, 1 H), 8.04 (m, 1 H), 8.77 (s, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Me-PiPrOx₄₇-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.12 (br. s., 372 H), 2.51 - 3.02 (m, 62 H), 3.05 - 3.19 (m, 3 H), 3.29 - 3.90 (m, 248 H), 7.35 - 7.62 (m, 1 H), 7.94 - 8.18 (m, 1 H), 8.68 - 8.87 (m, 1 H) ppm.

Me-PcPrOx₃₀-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.79 (br. m., 124 H), 1.86 (br. m., 34 H), 2.76 (br. m., 4 H), 2.97 (br. s., 3 H), 3.60 (br. m., 127 H), 7.43 (m, 1 H), 8.06 (m, 1 H), 8.79 (m, 1 H) ppm.

Me-PEG₂₃-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 1.14 - 1.28 (m, 2 H), 1.35 - 1.51 (m, 2 H), 1.73 - 2.25 (m, 8 H), 2.63 - 3.01 (m, 4 H), 3.38 (s, 3 H), 3.47 - 4.00 (m, 125 H), 7.32 - 7.51 (m, 1 H), 7.93 - 8.12 (m, 1 H), 8.66 - 8.85 (m, 1 H) ppm.

DDA-X-PMOx₄₂-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.84 (s, 3 H), 1.22 (br. s., 24 H), 1.91 - 2.26 (m, 90 H), 2.65 - 3.05 (m, 12 H), 3.30 - 3.69 (m, 127 H), 4.40 - 4.64 (m, 4 H), 7.27 (s, 3 H), 7.88 - 8.08 (m, 1 H), 8.66 - 8.80 (m, 1 H) ppm.

Me-PMOx₃₆-EDA-bCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.21 (br. s., 2 H), 1.41 (br. s., 2 H), 1.89 - 2.26 (m, 94 H), 2.34 (m, 8 H), 3.02 - 3.09 (s, 3 H), 3.26 - 3.78 (m, 127 H), 7.30 - 7.51 (m, 1 H), 7.97 - 8.14 (m, 1 H), 8.78 (s, 1 H) ppm.

Me-PMOx₃₆-BDA-eCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.14 (d, *J*=5.01 Hz, 2 H), 1.35 (br. s., 1 H), 1.91 - 2.31 (m, 97 H), 2.89 (s, 6 H), 2.95 - 3.04 (m, 3 H), 3.21 - 3.99 (m, 124 H), 7.27 - 7.41 (m, 1 H), 7.94 - 8.05 (m, 1 H), 8.71 (s, 1 H) ppm.

Me-PMOx₄₀-HDA-eCIP. ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.05 - 1.40 (m, 10 H), 1.69 - 2.25 (m, 171 H), 2.28 - 2.94 (m, 6 H), 2.94 - 3.09 (m, 3 H), 3.06 - 3.86 (m, 215 H), 7.28 - 7.45 (m, 1 H), 7.85 - 8.17 (m, 1 H), 8.66 - 8.73 (m, 1 H) ppm.

Me-PMOx₃₆-DODA-eCIP. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.92 - 1.51 (m, 21 H), 1.92 - 2.19 (m, 122 H), 2.31 (s, 8 H), 2.94 - 3.17 (m, 3 H), 3.26 - 4.00 (m, 175 H), 7.31 - 7.45 (m, 1 H), 7.87 - 8.11 (m, 1 H), 8.59 - 8.84 (m, 1 H) ppm.

Me-PMOx₇₁-TREN-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.08 - 1.22 (m, 2 H), 1.37 - 1.44 (m, 2 H), 1.88 - 2.25 (m, 105 H), 2.25 - 2.96 (m, 12 H), 3.01 - 3.11 (m, 3 H), 3.21 - 4.01 (m, 143 H), 7.34 - 7.48 (m, 1 H), 7.88 - 8.14 (m, 1 H), 8.60 - 8.82 (m, 1 H) ppm.

Experimental Teil

Me-PMOx₃₃-TET-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.20 (br. s., 2 H), 1.35 - 1.46 (m, 2 H), 1.89 - 2.22 (m, 105 H), 2.53 (br. s., 10 H), 2.98 - 3.10 (m, 3 H), 3.18 - 3.89 (m, 140 H), 7.32 - 7.55 (m, 1 H), 7.88 - 8.15 (m, 1 H), 8.59 - 8.93 (m, 1 H) ppm.

Me-PMOx₂₆-TEP-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.20 (br. s., 2 H), 1.39 - 1.54 (m, 2 H), 1.82 - 2.30 (m, 105 H), 2.39 - 2.97 (m, 12 H), 2.99 - 3.13 (m, 3 H), 3.25 - 4.21 (m, 142 H), 7.35 - 7.51 (m, 1 H), 7.96 - 8.12 (m, 1 H), 8.76 (s, 1 H) ppm.

Me-PMeOx₁₅-PHepOx₁₂-EDA-eCIP. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.87 (br. s., 37 H), 1.14 - 1.47 (m, 100 H), 1.59 (br. s., 24 H), 1.91 - 2.19 (m, 46 H), 2.19 - 2.51 (m, 23 H), 2.67 - 3.01 (m, 6 H), 3.02 - 3.09 (m, 3 H), 3.21 - 3.94 (m, 103 H), 7.33 - 7.46 (m, 1 H), 8.01 (s, 1 H), 8.78 (s, 1 H) ppm.

Generelle Synthese von pCIP-Konjugaten

In einer ausgeheizten Schottflasche wurde unter Argonatmosphäre MeTos (0.390 mmol, 1.00 eq) in trockenem Chloroform gelöst. Anschließend wurde 2-Oxazolin (11.8 mmol, 30.0 eq.) zugegeben. Die Polymerisation erfolgte in einer Labormikrowelle. Die Reaktionsparameter für die verschiedenen Monomere sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Reaktionsparameter der Synthese der Poly(2-Oxazoline) für die Terminierung mit pCIP.

Polymer	MeTos [μL]	2-Oxazoline [μL]	CHCl ₃ [μL]	Reaktionsbedingungen
Me-PMeOx	58	1	5	50 min, 90 °C
Me-PEtOx	84	2	10	2h, 110 °C
Me-PiPrOx	130	3	15	2 h, 110 °C

Nach der Polymerisation wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit pCIP (838 mg, 1.95 mmol, 5.00 eq) versetzt und anschließend drei Tage bei 50 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen.

Experimental Teil

Die wässrige Phase wurde mit Chloroform gewaschen. Für Me-PMOx-pCIP wurden die wässrigen Phasen gesammelt und lyophilisiert. Für Me-PEtOx-pCIP und Me-PiPrOx-pCIP wurde die organischen Phasen gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Dialyse gegen Wasser.

Me-PMOx-pCIP: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 2.16 (m, 3 H), 3.05 (s, 3 m) 3.46 (m, 4 Hm), 7.38 (s, 1 H), 8.08 (s, 1 H), 8.81 (s, 1 H) ppm.

Me-PEtOx-pCIP: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.04 - 1.24 (m, 1 H), 2.30-2.40 (m, 2 H), 3.02 (s, 3 H), 3.45 (m, 4 H), 7.37 (s, 1 H), 8.06 (s, 1 H), 8.79 (s, 1 H) ppm.

Me-PiPrOx- pCIP: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.12 (m, 6 H), 2.69-2.91 (m, 1 H), 3.09 (m, 3 H) 3.47 (m, 4 H), 7.48 (s, 1 H), 8.05 (s, 1 H), 8.78 (s, 1 H) ppm.

Durchführung der peCIP-Linkung

Unter Argonatmosphäre wurde Ethylendiamin-terminiertes Poly(2-oxazolin) (0.114 mmol, 1.00 eq.), Natriumhydrogencarbonat (0.114 mmol, 1.00 eq) sowie peCIP (0.228 mmol, 2.00 eq) in einem Schlenkkolben vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus *N,N*-Dimethylformamid und Acetonitril (1:1 v/v, 3 mL) zugeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei 80 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde in Diethylether gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Die Reinigung erfolgte mittels zweifacher Dialyse gegen Wasser. Tabelle 32 gibt einen Überblick über die verwendeten Reaktionsparameter.

Experimental Teil

Tabelle 32: Reaktionsparameter der peCIP Konjugation.

Konjugat	Polymer [mg]	pe-CIP [mg]	NaHCO ₃ [mg]	Reaktionsbedingungen
Me-PMeOx-EDA-peCIP	300	115	9.6	1d, 80 °C
Me-PetOX-EDA-peCIP	300	125	10.0	4d, 100 °C
Me-PiPrOx-EDA-peCIP	300	126	10.5	4d, 100 °C

Me-PMeOx-EDA-peCIP: ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 2.00 - 2.28 (m, 3 H), 3.05 (s, 1 H), 3.25 - 4.23 (m, 4 H), 7.40 (m, 1 H), 8.11 (s, 1 H), 8.81 (s, 1 H) ppm.

Me-PEtOx-EDA-peCIP: ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.78 - 1.33 (m, 3 H), 2.05 - 2.59 (m, 2 H), 3.01 (m, 3 H), 3.17 - 3.90 (m, 4 H), 7.37 (m, 1 H), 8.03 (m, 1 H), 8.77 (m, 1 H) ppm.

Me-PiPrOx-EDA-pe-CIP: ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.12 (m, 6 Hm), 2.51 - 2.99 (m, 6 Hm), 3.08 (m, 1 H), 3.19 - 3.87 (m, 4 H), 7.66 (m, 1 H), 8.07 (m, 1 H), 8.80 (m, 1 H) ppm.

Generelle Prozedur zur Synthese von Konjugat beladenen Partikel

In Ethanol (350 μ L) wurden Blockcopolymer-Konjugate (6.00-10.0 mg, 2.10 μ mol, 1.10 eq.) und ein ABA-Triblockcopolymer (Octansäure-PMeOx-PPhOx-DBB-PPhOx-PMeOx-Octansäure, bezogen von KRUMM, 8.00, 1.90 μ mol, 1.00 eq.) gelöst. Anschließend wurde die Lösung in Wasser (2.10 mL) unter starkem Rühren zu getropft. Innerhalb von 2 h bildeten sich die Partikel. Nach Ablauf der 2 h wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand mit noch gelösten Konjugaten abgetrennt. Durch Trocknen der Partikel mit Druckluft konnten diese als Feststoff erhalten werden.

Experimental Teil

Hydrolyse der Partikel

Mit NaOH: Die Partikel (4 mg) wurden in einem Gemisch aus wässriger NaOH-Lösung (2 mL, 0.03 M) und Wasser (2 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei 37 °C gerührt, anschließend wurde mit verdünnter HCl-Lösung der pH-Wert auf 7 eingestellt und das Wasser mit Hilfe der Lyophile entfernt.

Mit Lipase: Bei der enzymatischen Hydrolyse der Partikel wurden 4 mg der Partikel in 1 mL Sörensen-Pufferlösung ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ sowie KH_2PO_4 , Verhältnis 1:1, pH = 7) gelöst. Anschließend wurde Lipase (2 mg) aus *Candida rugosa* zugegeben, sodass eine Enzymkonzentration von $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ entsteht. Die Lösung wurde bei 37 °C über Nacht gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Wasser mit Hilfe der Lyophile entfernt.

Generelle Synthese von Penicillin-Polymer-Konjugate

Der Initiator (DDA-X, Allylbromid oder Methyltosylat) wurde mit Hilfe der Monomerstartkonzentration und dem gewünschten Polymerisationsgrad DP_{set} berechnet, entsprechend der Formel $[\text{Initiator}] = [\text{Monomer}] \cdot \text{DP}_{\text{set}}^{-1}$. Der Initiator (DDA-X; 0.149 g oder Methyltosylat; 0.059 g, Allylbromid; 0.047 g, 0.375 mmol, 1 eq.) wurde in 5 mL Chloroform bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde das Monomer (2-Methyl-2-oxazolin; 1.00 g, 2-Ethyl-2-oxazolin; 1.11 g 2-*iso*-Propyl-2-oxazolin; 1.27 g, 11.25 mmol, 30 eq.) zugegeben. Die Polymerisation wurde in einer Synthesemikrowelle durchgeführt. Die Temperatur wurde mit einem vertikal fokussierenden Infrarotsensor überwacht. Das Reaktionsgefäß wurde unter Rühren bei einer max. Leistung (300 W) auf die jeweilige Temperatur erhitzt (siehe Tabelle 33). Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die MW-Leistung angepasst. Zur Vermeidung von Temperaturspitzen wurde die Reaktionslösung innerhalb der folgenden 2-3 min durch Druckluftstöße gekühlt. Die entsprechenden Reaktionszeiten variierten, je nach Initiator, Oxazolin und Temperatur zwischen 1 - 16 h.

Experimental Teil

Tabelle 33: Synthese der Polymere die für die Konjugation mit Penicillinen verwendet wurden

Polymer	Initiator- menge [mg]	Monomer- menge [mg]	Reaktions- bedingungen
Me-PMOx	59	1000	1 h, 90 °C
Me-PEtOx	59	1110	2 h, 100 °C
Me-PiPrOx	59	1270	4 h, 110 °C
DDA-X-PMOx	149	1000	4 h, 110 °C
DDA-PEtOx	149	1100	12 h, 110 °C
DDA-X- PiPrO	149	1270	16 h, 110 °C
Allyl-PMOx	47	1000	4 h, 110 °C

Nach der Polymerisation wurde unter Argonatmosphäre die Polymerlösung in eine Lösung aus Penicillin G bzw. Penicillin V (PenV; 657 mg; PenG; 629 mg, 1.88 mmol, 5.20 eq.) in 2 mL Chloroform gegeben. Die Terminierungsreaktion wurde für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das überschüssige Penicillin abfiltriert und die Lösung bei vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und 48 h gegen Wasser dialysiert (benzylierte Zellulosemembran, 2000 MWCO). Zuletzt wurde das Wasser mittels Lyophile entfernt.

Me-PMO_{x30}-PenG. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.04 (m, 6 H), 2.05 – 2.14 (m, 141 H), 3.02 (m, 3H), 3.43 – 3.46 (m, 180 H), 4.19 – 4.32 (m, 3 H), 5.44 (m, 1 H), 5.60 (m, 1 H), 7.24 – 7.33 (m, 5 H) ppm.

Me-PMO_{x20}-PenV. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.43 (s, 3 H), 1.54 (s, 3 H), 1.87 - 2.24 (m, 63 H), 2.99 - 3.03 (m, 3 H), 3.16 - 3.79 (m, 80 H), 4.15 - 4.55 (m, 5 H), 5.51 (d, $J=4.40$ Hz, 1 H), 5.64 - 5.75 (m, 1 H), 6.88 (d, $J = 8.31$ Hz, 2 H), 6.98 (t, $J = 7.34$ Hz, 1 H), 7.21 - 7.32 (m, 2 H)ppm.

Experimental Teil

Me-PEtOx₅₅-PenG. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.76 - 1.24 (m, 170 H), 1.34 (br. s., 6 H), 1.96 - 2.58 (m, 110 H), 2.99-3.01 (m, 3 H), 3.09 - 3.72 (m, 214 H), 4.00 - 4.31 (m, 3 H), 5.33 - 5.44 (m, 1 H), 5.48 - 5.63 (m, 1 H), 6.98 - 7.36 (m, 5 H) ppm.

Me-PEtOx₃₈-PenV. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.07 (d, $J=6.85$ Hz, 121 H), 1.34 - 1.58 (m, 6 H), 2.09 - 2.50 (m, 80 H), 2.98 (s, 3 H), 3.41 (m, 156 H), 4.50 (m, 5 H), 5.40 - 5.60 (m, 1 H), 5.60 - 5.72 (m, 1 H), 6.88 (d, $J=7.83$ Hz, 2 H), 6.98 (m, 1 H), 7.21 - 7.33 (m, 2 H) ppm.

Me-PiPrOx₂₉-PenG. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.94 - 1.23 (m, 160H), 1.42 - 1.54 (m, 6 H), 2.54 - 3.01 (m, 32 H), 3.07 (br. s., 3 H), 3.22 - 3.65 (m, 115 H), 4.15 - 4.40 (m, 3 H), 5.42 - 5.51 (m, 1 H), 5.61 - 5.68 (m, 1 H), 7.23 - 7.40 (m, 5 H) ppm.

Me-PiPrOx₂₉-PenV. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.11 (m, 139 H), 1.42 - 1.64 (m, 6 H), 2.54 - 2.96 (m, 27 H), 3.07 (m, 3 H), 3.45 (m, 88 H), 4.55 (m, 5 H), 5.56 (m, 1 H), 5.73 (m, 1 H), 6.92 (d, $J=7.83$ Hz, 2 H) 7.00 - 7.06 (m, 1 H) 7.31 (t, $J=7.34$ Hz, 2 H) ppm.

DDA-X-PMOx₅₂-PenG. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.78 (t, $J=6.85$ Hz, 3 H), 1.06 - 1.49 (m, 26 H), 1.77 - 2.23 (m, 155 H), 3.13 - 3.92 (m, 208 H), 3.95- 4.61 (m, 7 H), 5.32 - 5.43 (m, 1 H), 5.43 - 5.59 (m, 1 H), 6.97 - 7.36 (m, 9 H) ppm.

DDA-X-PMOx₂₂-PenV. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.81 (t, $J=6.97$ Hz, 3 H), 1.05 - 1.29 (m, 18 H), 1.48 - 1.56 (m, 6 H), 1.65 (brs. s, 2 H), 1.74 - 2.26 (m, 66 H), 3.07 - 3.90 (m, 85 H), 4.13 - 4.64 (m, 9 H), 5.42 - 5.67 (m, 2 H), 6.74 - 7.46 (m, 9 H) ppm.

DDA-X-PEtOx₅₀-PenG. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.81 (t, $J=6.97$ Hz, 3 H), 0.94 - 1.14 (m, 143 H), 1.15 - 1.36 (m, 18 H), 1.40 - 1.46 (m, 6 H), 1.69 (brs. s, 2 H), 2.11 - 2.45 (m, 95 H), 3.03 - 3.68 (m, 200 H), 4.11 - 4.49 (m, 5 H), 5.36 - 5.50 (m, 2 H), 7.10 - 7.35 (m, 9 H) ppm.

DDA-X-PEtOx₃₀-PenV. ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ = 0.84 (t, $J=6.85$ Hz, 3 H), 0.91 - 1.17 (m, 84 H), 1.17 - 1.35 (m, 18 H), 1.55 - 1.59 (m, 6 H), 1.74 (brs. S, 1H), 1.208 - 2.52 (m, 56 H), 3.05 - 3.82 (m, 121 H), 4.23 - 4.63 (m, 9 H), 5.46 - 5.55 (m, 1 H), 5.59 (dd, $J=9.54, 4.16$ Hz, 1 H), 6.86 - 7.45 (m, 9 H) ppm.

Experimental Teil

Allyl-PMOx₂₀-PenG. ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.32 - 1.47 (m, 6 H), 1.82 - 2.18 (m, 58 H), 3.19 - 3.55 (m, 73 H), 3.85 (br. s., 2 H), 4.10 - 4.34 (m, 3 H), 5.11 (d, *J*=16.78 Hz, 2 H), 5.41 (d, *J*=3.97 Hz, 1 H), 5.57 (br. s., 1 H), 5.66 - 5.79 (m, 1 H), 7.17 - 7.36 (m, 5 H) ppm.

Allyl-PMOx₂₀-PenV. ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ = 1.42 (br. s., 3 H), 1.46 - 1.59 (m, 3 H), 1.84 - 2.22 (m, 66 H), 3.03 - 3.61 (m, 83 H), 3.85 (br. s., 2 H), 4.05 - 4.59 (m, 5 H), 5.03 - 5.27 (m, 2 H), 5.46 - 5.55 (m, 1 H), 5.69 (m, 2 H), 6.86 (d, *J*=7.93 Hz, 2 H), 6.97 (t, *J*=7.32 Hz, 1 H), 7.26 (t, *J*=7.78 Hz, 2 H) ppm.

Allgemeine Synthese von ABA-triblockcopolymeren

Die Polymerisation von ABA-Blockcopolymeren soll am Beispiel MHM1 beschrieben werden. Unter Argonatmosphäre wurde *trans*-1,4-Dibromo-2-buten (126 mg, 0.59 mmol), 2-Heptyl-2-oxazolin (1 mL, 6.50 mmol) und 15 mL trocknes Chloroform zusammen gegeben. Die Reaktionslösung wurde in einem geschlossenen Gefäß auf 130 °C erwärmt, dabei wurde eine CEM-Discover Synthesemikrowelle verwendet. Nach 3 h Reaktionszeit wurde die Lösung auf 50 °C gekühlt und anschließend 1.5 mL (17.6 mmol) 2-Methyl-2-oxazolin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde in der CEM-Discover Synthesemikrowelle auf 100 °C erwärmt und für 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 50 °C gekühlt und das Terminationsreagenz *N*-[3-(Dimethylamino)-propyl]-methacrylamid (AMA) hinzugegeben um die lebenden Polymerenden zu terminieren. Die Termination wurde bei 70 °C für 72 h gerührt. Dann wurde das Chloroform unter verminderten Druck entfernt und der Polymerrückstand in Methanol aufgenommen. Die Reinigung erfolgte mittels mehrfacher Dialyse (benzoylierte Zellulosemembran (1000 MWCO) gegen Methanol).

Experimental Teil

Tabelle 34:: Zusammenfassung der verwendeten Mengen an DBB, MOx, HepOx und AMA für die Herstellung von AMA-PMOx-PHepOx-DBB-PHepOx-PMOx-AMA.

Polymer	m _{DBB} [mg]	V _{HepOx} [mL]	t _{reac} [h]	V _{MOx} [mL]	t _{reac} [h]	V _{AMA} [mL]
MHM1	126	1	3	1.5	4	1.2
MHM2	128	1.6	4	1.2	3	1.2
MHM3	109	1.7	4	0.8	3	1.0
MHM4	104	2.0	4.5	0.7	2.5	1.2
MHM5	104	2.5	5	0.4	2.5	1.3
H1	95	3	5	---	---	1.0
M1	187	3	3	---	---	1.5

MHM1. ¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ= 0.69 - 0.95 (m, 77 H), 1.27 (b, 208 H), 1.58 (b, 50 H), 1.96 (b, 6 H), 2.10 (m, 66 H), 2.23 - 2.42 (m, 62 H), 3.20 - 4.03 (m, 205 H), 5.36 (b, 2 H), 5.43 - 5.58 (m, 2 H), 5.78 - 5.93 (m, 2 H) ppm.

Synthese von Polymernetzwerken

Die ABA-Blockcopolymere (148-312 mg, 78.0 μmol, 1.00 eq) und der Photoinitiator (Irgacure 651, 1 mg, 3.90 μmol, 0.05 eq.) wurden in 1.00 mL Chloroform gelöst. Die Makromonomer-Initiator Lösung wurde anschließend zwischen zwei Glasobjektträger platziert. Wobei die beiden Enden des unteren Glasobjektträgers mit einem Poly(propylene)film bedeckt waren, wodurch die beiden Glasplatten nicht direkt aufeinander lagen. Die Vernetzung erfolgte unter UV-Licht (Heraeus Kuzler, Typ Heraflash, Germany, λ = 340 nm) für 4 mal 120 s. Für weitere Untersuchungen wurden die Polymerfilme von der Glasoberfläche entfernt.

Experimental Teil

Synthese von antimikrobiellen Polymernetzwerken auf Basis von Poly(2-Oxazolinen)

Polymer M1 (1000 mg, 0.250 mmol, 1 eq.) wurde mit Allyl-PMOx-PenG bzw. Allyl-PMOx-PenV (25 mg, 0.012 mmol 0.05 eq.) in 1.00 mL Chloroform gelöst. Anschließend wurden der Initiators Irgacure 651 (3.2 mg, 0.0125 mmol, 0.05 eq.) zugegeben. Die Polymerlösung wurde gut durchmischt und in eine PP-Form (0.5 · 2.0 cm) platziert. Die Vernetzung erfolgte 8 min lang unter UV-Licht ($\lambda = 340$ nm).

5.4. Methoden

Bestimmung der kritischen Lösungstemperatur (engl. Low Critical Solution Temperatur, LCST)

Die LCST wurden mittels UV/Vis Spektroskopie (Specord S600) bei 500 nm bestimmt. Dabei wurde mit Hilfe des Petlierhalters die Temperatur von 20 °C auf 85 °C mit einer Heizrate von 30 °C/h erhöht. Die Temperatur ab der eine Verringerung der gemessenen Emission auftritt beschreibt den LCST.

Bestimmung der Dichte von Poly(2-heptyl-2-oxazolin)

Ein Poly(2-heptyl-2-oxazolin)-Homopolymer wurde in einer Teflonform zu einem Poly(2-heptyl-2-oxazolin) Pellet geschmolzen. Das Gewicht des Pellets wurde mittels Wägung bestimmt. Anschließend wurde das Pellet in einem Becherglas mit Wasser gegeben und das verdrängtem Volumen an Wasser bestimmt. Der Quotient aus Gewicht und verdrängten Volumen ergibt die Dichte von Poly(2-heptyl-2-oxazolin). Diese beträgt $1.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bei 25 °C.

Experimental Teil

Bestimmung der Sol- und Gel-Anteile

Der Sol-Anteil der Polymernetzwerke wurde mittels gravimetrischer Messung bestimmt. Dazu wurden die Polymerfilme (20.0-30.0 mg) bei Raumtemperatur in ein Schnappdeckelglas mit Methanol getaucht. Nach 24 h wurden die Polymerfilme aus dem Methanol genommen und mit Trockenluft getrocknet. Der Sol-Anteil ergibt sich aus $(m_0 - m_{24})/m_0$ wobei m_0 das Gewicht des Polymerfilms vor und m_{24} das Gewicht des Polymerfilms nach der Extraktion beschreibt. Der Gel-Anteil ergibt sich aus m_{24}/m_0 .

Bestimmung der Quellgrade

Die Quelleigenschaften der verschiedenen Polymerfilme wurden mittels gravimetrischer Messung bestimmt. Die Polymernetzwerkfilme wurden im trocknen (m_{trocken}) und im geschwollenen Zustand ($m_{\text{gequollen}}$) gewogen. Der Quellgrad ergibt sich aus dem Quotienten $m_{\text{trocken}}/m_{\text{gequollen}}$.

Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)

Die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration erfolgte an einem Fluoreszenzspektrometer. Eine 0.200 μM Lösung von 6-(*p*-Toluidino)-2-Naphthalinsulfonsäure in bidest. Wasser wurde hergestellt. 20.0 mg der zu untersuchenden Polymerprobe wurden in 4.00 mL dieser Lösung gelöst ($5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und eine Verdünnungsreihe wurde angesetzt. Dabei wurde die Polymerkonzentration bei jeder Stufe halbiert. Insgesamt wurden 14 Verdünnungsstufen hergestellt. Anschließend wurden die Polymerproben bei einer Extinktion von 306 nm und einer Emission von 415 nm in einem Fluoreszenzspektrometer untersucht. Ein plötzlicher Anstieg der Emissionsintensität zeigt die Bildung von Mizellen an.

Experimental Teil

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

10 - 20 mg Polymerprobe wurden in 100 mL Wasser gelöst und jeweils mit 100 mL Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die Phasen getrennt und Wasser sowie Chloroform entfernt. Anschließend wurde die Menge an Probe in den beiden Phasen gravimetrisch bestimmt. Der Quotient aus beiden Mengen lieferte den Verteilungskoeffizienten.

$$K_{\text{Wasser/Chloroform}} = \frac{m_{\text{Wasser}}}{m_{\text{Chloroform}}}$$

Bestimmung der Langzeitstabilität der Penicillin-Konjugate

40 mg der Polymerprobe wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Die Proben wurden anschließend 63 Tage alle 24 h gemessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte analog zu Kapitel 3.3.1.

5.5. Biologische Untersuchungen

Zelltiter Glo-Test

Die Zelltiter Glo-Tests wurden im Lehrstuhl für medizinische Chemie an der Technischen Universität-Dortmund von JONAS LATEGAHN und HANNAH TUMBRINK durchgeführt. Zunächst wurden Krebszellen der Linie H1975 und A431 herangezogen. Polymerproben mit verschiedenen Konzentrationen (von 1 - 30 µM) wurden in Zelltiter Glo Puffer-Lösung hergestellt. Anschließend wurden 50000 Zellen der entsprechenden Krebszelllinien zugegeben und für drei Tage bei 37 °C inkubiert. Dann folgte die Zugabe des Zelltiter Glo Reagenz und die Lumineszenz wurde gemessen. Eine Verringerung der Lumineszenz weist auf weniger ATP und somit auf weniger lebende Zellen hin.

Experimental Teil

Bestimmung der bakteriellen Suszeptibilität durch Bestimmung der minimal inhibierenden Konzentration (MIC, minimal inhibitor concentration)

Die minimale inhibierende Konzentration (MIC) ist die niedrigste Konzentration eines Stoffes, die ausreicht um 99% der Bakterien am Wachstum zu hindern. Für die Bestimmung des MIC-Wertes wurden zunächst Bakterienstamm-Kulturen aus gefriergetrockneten Bakterienpellets (bezogen von DSMZ) herangezogen. Dafür wurde das jeweiligen Pellets in 50 mL Nährmedium gelöst (steriles Nährmedium Standard 1, 25.0 g in 1.00 L destillierten Wasser) und für 24 h unter optimalen Wachstumsbedingungen (siehe Tabelle 35) inkubiert. Das konfluente Medium wurde zentrifugiert (300 rpm, 10 min) und der flüssige Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in 50 mL sterilem PBS-Puffer (8.77 g NaCl, 1.56 g NaH₂PO₄ 2H₂O, der pH-Wert wurde mittels 0.100 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt) resuspendiert und erneut zentrifugiert (300 rpm, 10 min). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Im letzten Schritt wurde der Bakterienrückstand in 10.0 mL PBS-Puffer und in 10.0 mL einer steril filtrierten wässr. 50%-Glycerin-Lösung gelöst und bei -20 °C eingelagert.

Für die Erstellung der Vorkulturen wurden 50.0 µL der entsprechenden Stammlösung in 25 mL Nährmedium (Standard 1) gelöst und 24 h bei optimalen Wachstumsbedingungen (siehe Tabelle 35) inkubiert. Die Bakterienkonzentration der Suspension wurde mit UV/Vis-Spektroskopie bei 541 nm/25°C bestimmt und mittels Verdünnen mit Nährmedium auf $\sim 10^7$ Zellen pro mL eingestellt.

Für den MIC-Test wurden jeweils 5 - 10 mg der Polymerprobe in 4.00 mL Nährmedium (Standard 1) gelöst und eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Konzentration in jeder Stufe halbiert wurde. Jede Probe wurde mit 20.0 µL der erstellten Vorkultur ($\sim 10^7$ Zellen pro mL) inkubiert (24 h bei den in Tabelle 35 gegebenen Bedingungen). Zusätzlich wurde eine Positiv- und eine Negativprobe erstellt, wobei die Negativprobe aus 2.00 mL Nährmedium und die Positivprobe aus 2.00 mL mit 20.0 µL Bakteriensuspension bestand ($\sim 10^7$ Zellen pro mL). Die minimale inhibierende Konzentration wurde optisch ausgewertet und anschließend mit 100 µL einer wässrigen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung (1 mg·mL⁻¹) versetzt. Nach weiteren 3 h Inkubation zeigte jede Probe, die eine Bakterienkonzentration > 1% besaß eine

Experimental Teil

Rotfärbung. Die minimale inhibierende Konzentration ist die Verdünnungsstufe mit der geringsten Konzentration, die keine Rotfärbung aufweist.

Tabelle 35: Verwendete Bakterienstämme und ihre optimalen Wachstumsbedingungen

Bakteriensträmme	DSM	ATCC	Einteilung nach GRAM	Inkubationsbedingungen
<i>Escherichia coli</i>	1103	25922	Negativ	Nährmedium Standard 1, pH= 6.8, 37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30104	13883	Negativ	Nährmedium Standard 1, pH= 7.0, 37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50078	17423	Negativ	Nährmedium Standard 1, pH= 7.0, 30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	1104	25923	Positiv	Nährmedium Standard 1, pH= 7.3, 37 °C
<i>Streptococcus mutans</i>	20523	24178	Positiv	Nährmedium Standard 1, pH= 7.3, 37 °C
<i>Lactobacillus casei</i>	20011	393	Positiv	Nährmedium Standard 1, pH= 6.2, 30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	347	6633	Positiv	Nährmedium Standard 1, pH= 7.0, 30 °C

Bestimmung der hämolytischen Aktivität (HC₅₀-Test)

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde zunächst der sogenannte Zitrat-Phosphat-Dextrose Puffer (CPD) hergestellt. Dafür wurden Natriumzitrat (26.3 g), Zitronensäure Monohydrat (3.27 g), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (2.51 g) und Glucose Monohydrat in 1.00 L destillierten Wasser gelöst und anschließend steril filtriert (Filterporen Größe 0.200 µm). Der pH-Wert wurde mit steril filtrierter HCl (1.00 M) und NaOH (1.00 M) auf 7.38 eingestellt.

Experimental Teil

Frisches, nicht gesalzenes Schweineblut (10.0 mL) wurde bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand an Blutplasma wurde entfernt. Die sedimentierten Erythrozyten wurden sechsmal mit einer sterilen, isotonischen NaCl Lösung ($6.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) gewaschen. Dieser Schritt wurde 3-6 wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Erythrozytenkonzentrat in CPD-Puffer (12 mL) resuspendiert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für maximal 5 Tage gelagert.

Die Polymerproben (40.0-80.0 mg) wurden in CPD-Puffer (1.60 mL) gelöst. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei die Konzentration zu jeder Stufe halbiert wurde. Das Erythrozytenkonzentrat wurde auf Raumtemperatur erwärmt und $200 \text{ }\mu\text{L}$ des Konzentrats wurden zu jeder Verdünnungsstufe hinzugegeben. Die Erythrozytenkonzentration beträgt in den einzelnen Verdünnungsstufen 5×10^8 rote Blutzellen pro mL (ermittelt durch Hämozytometer). Die Verdünnungsreihe wurde für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde mit CPD-Puffer verdünnt und die Freisetzung an Hämoglobin mittels UV/Vis Spektroskopie (541 nm bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) untersucht. Neben der Verdünnungsreihe wurde immer eine negative Kontrolle (ohne hämolytische aktive Komponente) und eine positive Kontrolle ($2 \text{ }\mu\text{L}$ Triton X) inkubiert. Der Hämolysegrad der roten Blutzellen ist proportional zu der Hämoglobinkonzentration und somit zur gemessenen Extinktion. Die interpolierte Konzentration, bei der 50% der roten Blutzellen zerstört wurden, ergibt den HC_{50} -Wert. Als Referenz für eine 100% Hämolyse diente die Positivprobe.

Iodometrisches Mikroassay zur Bestimmung der β -Lactamasestabilität¹⁷⁷

Der Phosphat-Puffer wurde durch Lösen von Dikaliumphosphat Trihydrat (6.25 g) und Monokaliumphosphat (0.696 g) in 1.00 L destillierten Wasser und anschließendes Einstellen des pH-Wertes auf 5.8 hergestellt. Eine 2%-ige Stärkelösung (w/v) wurde durch Suspendierung von Stärkepulver in Phosphat-Puffer-Lösung und Erhitzen hergestellt. Die Lösung wurde solange erhitzt bis sie transparent wurde. Durch Verdünnen der 2%-igen Stärkelösung wurde eine 0.2%-ige Stärkelösung erstellt. 10.0 mg sublimiertes Iod sowie 530 mg Kaliumiodid wurden in Phosphat-Puffer gelöst.

Experimental Teil

Zu 1 mL einer 0.25 mM-Lösung der Probe in Phosphat-Puffer wurde in einer 1 · 1 cm Glasküvette platziert. Dazu wurde 1 mL der 0.2% Stärkelösung, 0.9 mL Phosphat-Puffer, 0.2 mL der 2% Stärkelösung zugegeben. Anschließend wurde diese zur Iod/Iodid-Lösung (4.00 µL für PenG bzw. PenV, 7.00-10.0 µL für Konjugate) zugegeben und die Lösung färbte sich blau. Die Küvette wurde in ein Photometer (Analytic Jena, type Specord 210 ausgerüstet mit einem Thermostat) gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min wurde eine β -Lactamase-Lösung (VWR, 0.2 Units, in Phosphate-Puffer) in die Küvette gegeben. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm jede 0.5 s für 60 min gemessen. Eine Probe mit autoklaviertem Enzym diente als Referenz.

Bestimmung der minimalen inhibierenden Konzentration in Anwesenheit von β -Lactamase

5 mg der zu untersuchenden Probe wurde in 4 mL Nährmedium gelöst und eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dabei wurde mit jedem Verdünnungsschritt die Probenkonzentration halbiert. Anschließend wurde zu jede Verdünnungsstufe 100 µL einer wässrigen β -Lactamase-Lösung (TCI Chemicals, $2.5 \cdot 10^{-3}$ units·mL⁻¹) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde jede Verdünnungsstufe mit 20 µL einer verdünnten Bakterienstammlösung (10^7 Bakterien, *S.a*) bei 37 °C für 24 h inkubiert. Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle wurden zusätzlich hergestellt. Der MIC-Wert wurde zunächst visuell bestimmt und dann wurden 100 µL einer wässrigen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TCC)-Lösung ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) zugegeben. Nach weiteren 3 h bei 37 °C zeigten Stufen mit einer Bakterienkonzentration höher als 1% eine Rotfärbung. Der MIC-Wert ergab sich aus der niedrigsten Probenkonzentration ohne Rotfärbung. Die molare Masse der Konjugate wurde aus den ¹H-NMR-Spektroskopie-Messungen entnommen.

Experimental Teil

Bestimmung der minimalen inhibierenden Konzentration in Anwesenheit von Lipase

5.00 mg der zu untersuchenden Probe wurde in 4.00 mL Nährmedium gelöst und eine Verdünnungsreihe wurde angefertigt. Dabei wurde mit jedem Verdünnungsschritt die Probenkonzentration halbiert. Anschließend wurde zu jede Verdünnungsstufe 500 μL einer wässrigen Lipase-Lösung (aus *Candida rugosa*, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde jeder Verdünnungsstufe mit 20.0 μL einer verdünnten Bakterienstammlösung (10^7 Bakterien, *S.a*) bei 37 °C für 24 h inkubiert. Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle wurden zusätzlich hergestellt. Der MIC-Wert wurde zunächst visuell bestimmt und dann mit 100 μL einer wässrigen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TCC)-Lösung ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) versetzt. Nach weiteren 3 h bei 37 °C zeigten Stufen mit einer Bakterienkonzentration höher als 1% eine Rotfärbung. Der MIC-Wert ergab sich aus der niedrigsten Probenkonzentration ohne Rotfärbung. Die molare Masse der Konjugate wurde aus den ^1H -NMR-Spektroskopie-Messungen entnommen.

Bestimmung der Mutation bei *S. aureus*

Die Vervielfältigung der entsprechenden DNA-Sequenz erfolgte durch eine Polymerase Kettenreaktion (PCR). Diese wurde am Lehrstuhl für Bioprocess Technik von Herrn Dr. JAN VOLMER durchgeführt. Dabei wurden GGGCTTCACGTTACAACGTTAC und CCTCGCATCCTCTACATGAATC als Primer verwendet. Die Ermittlung der passenden Primer erfolgte ebenfalls durch Herrn Dr. JAN VOLMER mit Hilfe der Software Primer-Blast. Die Sequenzierung der vervielfältigten DNA-Sequenz erfolgte durch Eurofins Genomics mit den Sequenzierungsprimern GGGCTTCACGTTACAACGTTAC, CCTCGCATCCTCTACATGAATC, GGGCTTCACGTTACAACGTTAC, CCACGGCAATGTTACAC, TGCCCTTAATCCGGTATCTG, CGAATGGACGTAAACAG und CCTCGCATCCTCTACATGAATC.

Japanischer industrieller Standard (JIS) ¹⁸⁴

Für die antimikrobielle Untersuchung der Penicillin-beladenen Netzwerke wurde eine modifizierte Variante des JIS-Testes verwendet. 100 μL einer Stammlösung aus

Experimental Teil

Staphylococcus aureus in Nährmedium (10^7 Bakterienzellen pro mL) wurde auf die Netzwerkproben ($1 \cdot 1 \cdot 0.01$ cm) auf getropft. Die Probe wurde 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Netzwerkprobe in 10 mL PBS-Puffer gegeben und mittels Vortexmischer durchmischt, so dass sich die Bakterien vom Netzwerk lösen. Der PBS-Überstand wurde 1:10 sowie 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt. 50 µL jeder Verdünnungsstufe wurde auf eine Petrischale mit Nähragar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterienkolonien ausgezählt und mit einer Referenz verglichen (analog behandelte unmodifizierte Glasobjektträger).

Literatur

6. Literatur

1. Drews, G., *Bakterien - ihre Entdeckung und Bedeutung für Natur und Mensch* 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2015.
2. Riley, D. R.; Sieber, K. B.; Robinson, K. M.; White, J. R.; Ganesan, A.; Nourbakhsh, S.; Dunning Hotopp, J. C., Bacteria-Human Somatic Cell Lateral Gene Transfer Is Enriched in Cancer Samples. *PLOS Computational Biology* 2013, 9, 1-20.
3. Zoetendal, E. G.; Vaughan, E. E.; De Vos, W. M., A microbial world within us. *Molecular Microbiology* 2006, 59, 1639-1650.
4. Fernández, M.; del Río, B.; Linares, D. M.; Martín, M. C.; Alvarez, M. A., Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science* 2006, 89, 3763-3769.
5. D. Sagan; Margulis, L., *Garden of Microbial Delights: A Practical Guide to the Subvisible World*. Kendall/Hunt Publishing Company: 1993.
6. Finlay, B. B.; Falkow, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997, 61, 136-69.
7. Dobson, A. P.; Carper, E. R., Infectious Diseases and Human Population History: Throughout history the establishment of disease has been a side effect of the growth of civilization. *Bioscience* 1996, 46, 115-126.
8. Fleming, A., On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology* 1929, 10, 226-236.
9. Alekshun, M. N.; Levy, S. B., Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037-1050.
10. Alanis, A. J., Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* 2005, 36, 697-705.
11. Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J., Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2009, 48, 1-12.
12. Fuchs, G.; Schlegel, H.-G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Auflage 8, Georg Thieme Verlag: 2007.

Literatur

13. Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L., Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990, 87, 4576-4579.
14. Baumgärtel, T., Begriff der Bakterienzelle. In *Grundriss der Theoretischen Bakteriologie*, 1 Auflage, Springer Berlin Heidelberg: 1924.
15. Thauer, R. K.; Jungermann, K.; Decker, K., Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological Reviews* 1977, 41, 100-180.
16. Pierson, B. K.; Castenholz, R. W., A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology* 1974, 100, 5-24.
17. Stanier, R. Y.; Cohen-Bazire, G., Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 1977, 31, 225-274.
18. Krämer, J.; Prange, A., *Lebensmittel-Mikrobiologie*. Auflage 7, UTB GmbH: 2016.
19. Gram, H. C., Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* 1884, 2, 185-89.
20. Garrett, R. H.; Grisham, C. M., *Biochemistry*. 2 Auflage, Cengage Learning: 1999.
21. Matsumoto, K.; Kusaka, J.; Nishibori, A.; Hara, H., Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular Microbiology* 2006, 61, 1110-1117.
22. Engelman, D. M., Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 2005, 438, 578-580.
23. White, D. C.; Frerman, F. E., Extraction, Characterization, and Cellular Localization of the Lipids of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1967, 94, 1854-1867.
24. Frerman, F. E.; White, D. C., Membrane Lipid Changes During Formation of a Functional Electron Transport System in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 1967, 94, 1868-1874.
25. White, D. C.; Frerman, F. E., Fatty Acid Composition of the Complex Lipids of *Staphylococcus aureus* During the Formation of the Membrane-bound Electron Transport System. *Journal of Bacteriology* 1968, 95, 2198-2209.
26. Joyce, G. H.; Hammond, R. K.; White, D. C., Changes in Membrane Lipid Composition in Exponentially Growing *Staphylococcus aureus* During the Shift from 37 to 25 C. *Journal of Bacteriology* 1970, 104, 323-330.

Literatur

27. Haest, C. W. M.; De Gier, J.; Op Den Kamp, J. A. F.; Bartels, P.; Van Deenen, L. L. M., Changes in permeability of Staphylococcus aureus and derived liposomes with varying lipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1972, 255, 720-733.
28. Ray, P. H.; White, D. C., Effect of Glycerol Deprivation on the Phospholipid Metabolism of a Glycerol Auxotroph of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* 1972, 109, 668-677.
29. Bretscher, M. S., Membrane Structure: Some General Principles. *Science* 1973, 181, 622-629.
30. Waschinski, C. J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J. C., Influence of Satellite Groups on Telechelic Antimicrobial Functions of Polyoxazolines. *Macromolecular Bioscience* 2005, 5, 149-156.
31. Timofeeva, L.; Kleshcheva, N., Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, 89, 475-492.
32. Weidel, W.; Pelzer, H., Bagshaped Macromolecules—A New Outlook on Bacterial Cell Walls. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 26 Auflage, John Wiley & Sons, Inc.: 2006.
33. Schleifer, K. H.; Kandler, O., Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriological Reviews* 1972, 36, 407-477.
34. Tipper, D. J.; Toemoda, M.; Strominger, J. L., Structure of the cell wall of Staphylococcus aureus strain Copenhagen. XII. Isolation and characterization of β -1,4-N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and its O-acetyl derivative. *Biochemistry* 1971, 10, 4683-4690.
35. Vollmer, W.; Bertsche, U., Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2008, 1778, 1714-1734.
36. Mandelstam, M. H.; Strominger, J. L., On the structure of the cell wall of staphylococcus aureus (Copenhagen). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1961, 5, 466-471.
37. Izaki, K.; Matsushashi, M.; Strominger, J. L., Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls: XIII. PEPTIDOGLYCAN TRANSPEPTIDASE AND d-ALANINE

Literatur

- CARBOXYPEPTIDASE: PENICILLIN-SENSITIVE ENZYMATIC REACTION IN STRAINS OF ESCHERICHIA COLI. *Journal of Biological Chemistry* 1968, 243, 3180-3192.
38. Tipper, D. J.; Ghuysen, J.-M.; Strominger, J. L., Structure of the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*, Strain Copenhagen. III. Further Studies of the Disaccharides*. *Biochemistry* 1965, 4, 468-473.
39. Dmitriev, B. A.; Toukach, F. V.; Holst, O.; Rietschel, E. T.; Ehlers, S., Tertiary Structure of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Murein. *Journal of Bacteriology* 2004, 186, 7141-7148.
40. Giesbrecht, P.; Kersten, T.; Maidhof, H.; Wecke, J., Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicillin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998, 62, 1371-1414.
41. Madigan, M. T.; Martinok, J. M.; Parker, J., *Brock Mikrobiologie*. 1 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin: 2001.
42. Osborn, M. J., Structure and Biosynthesis of Bacterial Cell Wall. *Annual Review of Biochemistry* 1969, 38, 502-530.
43. Imoto, M.; Kusumoto, S.; Shiba, T.; Rietschel, E. T.; Galanos, C.; Lüderitz, O., Chemical structure of *Escherichia coli* lipid A. *Tetrahedron Letters* 1985, 26, 907-908.
44. Loutet, S. A.; Flannagan, R. S.; Kooi, C.; Sokol, P. A.; Valvano, M. A., A Complete Lipopolysaccharide Inner Core Oligosaccharide Is Required for Resistance of *Burkholderia cenocepacia* to Antimicrobial Peptides and Bacterial Survival In Vivo. *Journal of Bacteriology* 2006, 188, 2073-2080.
45. Beveridge, T. J., Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology* 1999, 181, 4725-4733.
46. Alberts, B.; Graw, J., *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 4 Auflage, Wiley-VCH-Verl.: 2012.
47. Dingermann, T.; Hänsel, R.; Zündorf, I., *Pharmazeutische Biologie*. 1. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2002.
48. Errington, J.; Daniel, R. A.; Scheffers, D.-J., Cytokinesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003, 67, 52-65.
49. Hirsch, P., Budding Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 1974, 28, 392-438.

Literatur

50. Young, I. E.; Fitz-James, P. C., Chemical and Morphological Studies of Bacterial Spore Formation. *The Journal of Cell Biology* 1959, 6, 467-482.
51. Redfield, R. J., Evolution of bacterial transformation: is sex with dead cells ever better than no sex at all? *Genetics* 1988, 119, 213-221.
52. Robinson, D. A.; Enright, M. C., Evolution of *Staphylococcus aureus* by Large Chromosomal Replacements. *Journal of Bacteriology* 2004, 186, 1060-1064.
53. Cole, M., Formation of 6-Aminopenicillanic Acid, Penicillins, and Penicillin Acylase by Various Fungi. *Applied Microbiology* 1966, 14, 98-104.
54. Kato, N.; Brooks, W.; Calvo, A. M., The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by *veA*, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryotic Cell* 2003, 2, 1178-1186.
55. Rolinson, G. N.; Geddes, A. M., The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007, 29, 3-8.
56. Petersen, U., Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation: Die Evolution der Chinolone. *Pharmazie in unserer Zeit* 2001, 30, 376-381.
57. Chellat, M. F.; Raguž, L.; Riedl, R., Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden. *Angewandte Chemie* 2016, 128, 6710-6738.
58. Hou, J. P.; Poole, J. W., β -lactam antibiotics: Their physicochemical properties and biological activities in relation to structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1971, 60, 503-532.
59. Imming, P., Wie macht der Pilz das Penicillin? Aktuelle Forschung, Trends bei β -Lactam-Antibiotika. Biosynthese der Penicilline und Cephalosporine. *Pharmazie in unserer Zeit* 1989, 18, 20-24.
60. Ferrero, M. A.; Reglero, A.; Martín-Villacorta, J.; Fernández-Cañón, J. M.; Luengo, J. M., Biosynthesis of benzylpenicillin (G), phenoxymethylpenicillin (V) and octanoylpenicillin (K) from glutathione S-derivatives. *The Journal of Antibiotics* 1990, 43, 684-691.
61. Sutherland, R.; Croydon, E. A. P.; Rolinson, G. N., Flucloxacillin, a New Isoxazolyl Penicillin, Compared with Oxacillin, Cloxacillin, and Dicloxacillin. *British Medical Journal* 1970, 4, 455-460.

Literatur

62. Doyle, F. P.; Long, A. A. W.; Nayler, J. H. C.; Stove, E. R., New Penicillins Stable towards Both Acid and Penicillinase. *Nature* 1961, 192, 1183-1184.
63. Knudsen, E. T.; Brown, D. M.; Rolinson, G. N., A new orally Effective Penicillinase-stable Penicillin. *The Lancet* 280, 632-634.
64. Gonçalves, L. R. B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C., A Kinetic Study of Synthesis of Amoxicillin Using Penicillin G Acylase Immobilized on Agarose. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado*, Finkelstein, M.; Davison, B. H., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 2000; pp 931-945.
65. Waxman, D. J., Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of β -Lactam Antibiotics *ann. Rev. Biochem.* 1983, 52, 825-869.
66. Tipper, D. J.; Strominger, J. L., Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965, 54, 1133-1141.
67. Fisher, J. F.; Meroueh, S. O.; Mobashery, S., Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chemical Reviews* 2005, 105, 395-424.
68. Lipsky, B. A.; Itani, K.; Norden, C., Treating Foot Infections in Diabetic Patients: A Randomized, Multicenter, Open-Label Trial of Linezolid versus Ampicillin-Sulbactam/Amoxicillin-Clavulanate. *Clinical Infectious Diseases* 2004, 38, 17-24.
69. Weber, D. J.; Tolkoff-Rubin, N. E.; Rubin, R. H., Amoxicillin and Potassium Clavulanate: An Antibiotic Combination Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Antimicrobial Spectrum, Clinical Efficacy and Adverse Effects. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1984, 4, 122-133.
70. Lee, M.; Heseck, D.; Suvorov, M.; Lee, W.; Vakulenko, S.; Mobashery, S., A Mechanism-Based Inhibitor Targeting the dd-Transpeptidase Activity of Bacterial Penicillin-Binding Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 16322-16326.
71. Grohe, K.; Heitzer, H., Cycloaracylierung von Enaminen, I. Synthese von 4-Chinolon-3-carbonsäuren. *Liebigs Annalen der Chemie* 1987, 1987, 29-37.

Literatur

72. Chu, D. T.; Fernandes, P. B., Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989, 33, 131-135.
73. Tillotson, G. S., Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *Journal of Medical Microbiology* 1996, 44, 320-324.
74. Sörgel, F.; Bulitta, J.; Kinzig-Schippers, M., Pharmakokinetik der Chinolone: Wie gut wirken die Gyrasehemmer. *Pharmazie in unserer Zeit* 2001, 30, 418-427.
75. Hooper, D. C., Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 2000, 31, S24-S28.
76. Levine, C.; Hiasa, H.; Marians, K. J., DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1998, 1400, 29-43.
77. Bisacchi, G. S.; Hale, M. R., A "Double-Edged" Scaffold: Antitumor Power within the Antibacterial Quinolone. *Current Medicinal Chemistry* 2016, 23, 520-577.
78. Champoux, J. J., DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 2001, 70, 369-413.
79. Deibler, R. W.; Rahmati, S.; Zechiedrich, E. L., Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes & Development* 2001, 15, 748-761.
80. Wiedemann, B.; Heisig, P., Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone: Actio und Reactio. *Pharmazie in unserer Zeit* 2001, 30, 382-393.
81. Skauge, T.; Turel, I.; Sletten, E., Interaction between ciprofloxacin and DNA mediated by Mg²⁺-ions. *Inorganica Chimica Acta* 2002, 339, 239-247.
82. LeBel, M., Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1988, 8, 3-30.
83. Sanders, C. C., Ciprofloxacin: In Vitro Activity, Mechanism of Action, and Resistance *Clinical Infectious Diseases* 1988, 10, 516-527.
84. Bast, L. K., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2016.
85. Fischer, M., *Neue und alte Infektionskrankheiten*. Springer Fachmedien: Wiesbaden, 2014.

Literatur

86. Leclercq, R.; Cantón, R.; Brown, D. F. J.; Giske, C. G.; Heisig, P.; MacGowan, A. P.; Mouton, J. W.; Nordmann, P.; Rodloff, A. C.; Rossolini, G. M.; Soussy, C. J.; Steinbakk, M.; Winstanley, T. G.; Kahlmeter, G., EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* 2013, 19, 141-160.
87. Hollenbeck, B. L.; Rice, L. B., Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 2012, 3, 421-569.
88. Tenover, F. C., Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 2006, 119, S3-S10.
89. Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V., Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Micro* 2015, 13, 42-51.
90. Lebek, G., Medizinische Aspekte der infektiösen Antibiotika-Resistenz gram-negativer Darmbakterien. *Pathobiology* 1967, 30, 1015-1036.
91. O'Connell, K. M. G.; Hodgkinson, J. T.; Sore, H. F.; Welch, M.; Salmond, G. P. C.; Spring, D. R., Die Bekämpfung multiresistenter Bakterien: aktuelle Strategien zur Entdeckung neuer Antibiotika. *Angewandte Chemie* 2013, 125, 10904-10932.
92. Drawz, S. M.; Bonomo, R. A., Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 2010, 23, 160-201.
93. Kirby, W. M. M., Extraction of a highly potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci. *Science* 1944, 99, 452-453.
94. Robert Koch-Institut.
95. Neuhauser, M. M.; Weinstein, R. A.; Rydman, R.; Danziger, L. H.; Karam, G.; Quinn, J. P., Antibiotic Resistance Among Gram-Negative Bacilli in US Intensive Care Units. *JAMA* 2003, 298, 885-888.
96. Webber, M. A.; Piddock, L. J. V., The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, 51, 9-11.
97. Du, D.; Wang, Z.; James, N. R.; Voss, J. E.; Klimont, E.; Ohene-Agyei, T.; Venter, H.; Chiu, W.; Luisi, B. F., Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 2014, 509, 512-515.
98. Sun, J.; Deng, Z.; Yan, A., Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, 453, 254-267.

Literatur

99. Duncan, R., Polymer therapeutics: Top 10 selling pharmaceuticals — What next? *Journal of Controlled Release* 2014, 190, 371-380.
100. Piedmonte, D. M.; Treuheit, M. J., Formulation of Neulasta® (pegfilgrastim). *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60, 50-58.
101. Miller, A.; Shapiro, S.; Gershtein, R.; Kinarty, A.; Rawashdeh, H.; Honigman, S.; Lahat, N., Treatment of multiple sclerosis with Copolymer-1 (Copaxone®): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *Journal of Neuroimmunology* 1998, 92, 113-121.
102. Jalilian, B.; Einarsson, H. B.; Vorup-Jensen, T., Glatiramer Acetate in Treatment of Multiple Sclerosis: A Toolbox of Random Co-Polymers for Targeting Inflammatory Mechanisms of both the Innate and Adaptive Immune System? *International Journal of Molecular Science* 2012, 13, 14579-14605.
103. Aharoni, R.; Teitelbaum, D.; Arnon, R.; Sela, M., Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82–100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96, 634-639.
104. Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 2005, 10, 1451-1458.
105. Pasut, G.; Veronese, F. M., Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science* 2007, 32, 933-961.
106. Khandare, J.; Minko, T., Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs. *Progress in Polymer Science* 2006, 31, 359-397.
107. Li, C.; Wallace, S., Polymer-Drug Conjugates: Recent Development in Clinical Oncology. *Advanced drug delivery reviews* 2008, 60, 886-898.
108. Krishna, A. S.; Radhakumary, C.; Antony, M.; Sreenivasan, K., Functionalized carbon dots enable simultaneous bone crack detection and drug deposition. *Journal of Materials Chemistry B* 2014, 2, 8626-8632.
109. Woo, G. L. Y.; Mittelman, M. W.; Santerre, J. P., Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer. *Biomaterials* 2000, 21, 1235-1246.
110. GAC, S.; Coudane, J.; Boustta, M.; Domurado, M.; Vert, M., Synthesis, Characterisation and In Vivo Behaviour of a Norfloxacin-Poly(L-Lysine Citramide

Literatur

- Imide) Conjugate Bearing Mannosyl Residues. *Journal of Drug Targeting* 2000, 7, 393-406.
111. Woo, G. L. Y.; Yang, M. L.; Yin, H. Q.; Jaffer, F.; Mittelman, M. W.; Santerre, J. P., Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002, 59, 35-45.
112. Sobczak, M., Synthesis and characterization of polyester conjugates of ciprofloxacin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 45, 3844-3849.
113. Stebbins, N. D.; Ouimet, M. A.; Uhrich, K. E., Antibiotic-containing polymers for localized, sustained drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014, 78, 77-87.
114. Ringsdorf, H., Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 1975, 51, 135-153.
115. Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C., Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* 2012, 4, 46-71.
116. Fik, C. P.; Krumm, C.; Muennig, C.; Baur, T. I.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., Impact of Functional Satellite Groups on the Antimicrobial Activity and Hemocompatibility of Telechelic Poly(2-methyloxazoline)s. *Biomacromolecules* 2012, 13, 165-172.
117. Fik, C. P.; Konieczny, S.; Pashley, D. H.; Waschinski, C. J.; Ladisch, R. S.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., Telechelic Poly(2-oxazoline)s with a Biocidal and a Polymerizable Terminal as Collagenase Inhibiting Additive for Long-Term Active Antimicrobial Dental Materials. *Macromolecular Bioscience* 2014, 14, 1569-1579.
118. Milović, N. M.; Wang, J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 90, 715-722.
119. Sobczak, M.; Nałęcz-Jawecki, G.; Kołodziejcki, W. L.; Goś, P.; Żółtowska, K., Synthesis and study of controlled release of ofloxacin from polyester conjugates. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 402, 37-43.
120. Namazi, H.; Kanani, A., Investigation diffusion mechanism of β -lactam conjugated telechelic polymers of PEG and β -cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. *Carbohydrate Polymers* 2009, 76, 46-50.

Literatur

121. Greenwald, R. B.; Zhao, H.; Xia, J.; Martinez, A., Poly(ethylene glycol) Transport Forms of Vancomycin: A Long-Lived Continuous Release Delivery System. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003, 46, 5021-5030.
122. Greenwald, R. B.; Zhao, H.; Peng, P.; Longley, C. B.; Dai, Q.-H.; Xia, J.; Martinez, A., An unexpected amide bond cleavage: poly (ethylene glycol) transport forms of vancomycin. 2. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2005, 40, 798-804.
123. Pichavant, L.; Bourget, C.; Durrieu, M.-C.; Héroguez, V., Synthesis of pH-Sensitive Particles for Local Delivery of an Antibiotic via Dispersion ROMP. *Macromolecules* 2011, 44, 7879-7887.
124. Das, D.; Srinivasan, S.; Kelly, A. M.; Chiu, D. Y.; Daugherty, B. K.; Ratner, D. M.; Stayton, P. S.; Convertine, A. J., RAFT polymerization of ciprofloxacin prodrug monomers for the controlled intracellular delivery of antibiotics. *Polymer Chemistry* 2016.
125. Parwe, S. P.; Chaudhari, P. N.; Mohite, K. K.; Selukar, B. S.; Nande, S. S.; Garnaik, B., Synthesis of ciprofloxacin-conjugated poly (L-lactic acid) polymer for nanofiber fabrication and antibacterial evaluation. *International Journal of Nanomedicine* 2014, 9.
126. Kugel, A.; Chisholm, B.; Ebert, S.; Jepperson, M.; Jarabek, L.; Stafslie, S., Antimicrobial polysiloxane polymers and coatings containing pendant levofloxacin. *Polymer Chemistry* 2010, 1, 442-452.
127. Yang, H.; Lopina, S. T., Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2003, 14, 1043-1056.
128. Říhová, B.; Jelínková, M.; Strohalm, J.; Šubr, V.; Plocová, D.; Hovorka, O.; Novák, M.; Plundrová, D.; Germano, Y.; Ulbrich, K., Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules.: II. Anti-cancer activity of antibody or (Fab')₂-targeted conjugates and combined therapy with immunomodulators. *Journal of Controlled Release* 2000, 64, 241-261.
129. Haag, R.; Kratz, F., Polymer Therapeutics: Concepts and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* 2006, 45, 1198-1215.
130. Zhao, Y.-J.; Wei, W.; Su, Z.-G.; Ma, G.-H., Poly (ethylene glycol) prodrug for anthracyclines via N-Mannich base linker: Design, synthesis and biological evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 379, 90-99.

Literatur

131. Schmidt, M.; Harmuth, S.; Barth, E. R.; Wurm, E.; Fobbe, R.; Sickmann, A.; Krumm, C.; Tiller, J. C., Conjugation of Ciprofloxacin with Poly(2-oxazoline)s and Polyethylene Glycol via End Groups. *Bioconjugate Chemistry* 2015, 26, 1950-1962.
132. Nathan, A.; Zalipsky, S.; Ertel, S. I.; Agathos, S. N.; Yarmush, M. L.; Kohn, J., Copolymers of lysine and polyethylene glycol: a new family of functionalized drug carriers. *Bioconjugate Chemistry* 1993, 4, 54-62.
133. Du, J.; Bandara, H. M. H. N.; Du, P.; Huang, H.; Hoang, K.; Nguyen, D.; Mogarala, S. V.; Smyth, H. D. C., Improved Biofilm Antimicrobial Activity of Polyethylene Glycol Conjugated Tobramycin Compared to Tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Molecular Pharmaceutics* 2015, 12, 1544-1553.
134. Lawson, M. C.; Shoemaker, R.; Hoth, K. B.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S., Polymerizable Vancomycin Derivatives for Bactericidal Biomaterial Surface Modification: Structure–Function Evaluation. *Biomacromolecules* 2009, 10, 2221-2234.
135. Turos, E.; Shim, J.-Y.; Wang, Y.; Greenhalgh, K.; Reddy, G. S. K.; Dickey, S.; Lim, D. V., Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: New opportunities for development of anti-MRSA agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007, 17, 53-56.
136. Panarin, E. F.; Solovskij, M. V., Polymer derivatives of β -lactam antibiotics of the penicillin series. *Journal of Controlled Release* 1989, 10, 119-129.
137. Sarker, P.; Shepherd, J.; Swindells, K.; Douglas, I.; MacNeil, S.; Swanson, L.; Rimmer, S., Highly Branched Polymers with Polymyxin End Groups Responsive to *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomacromolecules* 2011, 12, 1-5.
138. Harmuth, S., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2013.
139. Ji, W., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2017.
140. Wolf, Y., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2017.
141. Nguyen, T.-D., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2017.
142. Konieczny, S.; Leurs, M.; Tiller, J. C., Polymer Enzyme Conjugates as Chiral Ligands for Sharpless Dihydroxylation of Alkenes in Organic Solvents. *ChemBioChem* 2015, 16, 83-90.
143. Konieczny, S., *Dissertation, Technische Universität Dortmund*. 2014.

Literatur

144. Kempe, K.; Lobert, M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S., Screening the Synthesis of 2-Substituted-2-oxazolines. *Journal of Combinatorial Chemistry* 2009, 11, 274-280.
145. Krumm, C.; Fik, C. P.; Meuris, M.; Dropalla, G. J.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C., Well-Defined Amphiphilic Poly(2-oxazoline) ABA-Triblock Copolymers and Their Aggregation Behavior in Aqueous Solution. *Macromolecular Rapid Communications* 2012, 33, 1677-1682.
146. Kampmann, A.-L.; Grabe, T.; Jaworski, C.; Weberskirch, R., Synthesis of well-defined core-shell nanoparticles based on bifunctional poly(2-oxazoline) macromonomer surfactants and a microemulsion polymerization process. *RSC Advances* 2016, 6, 99752-99763.
147. Mees, M. A.; Hoogenboom, R., Functional Poly(2-oxazoline)s by Direct Amidation of Methyl Ester Side Chains. *Macromolecules* 2015, 48, 3531-3538.
148. Krumm, C.; Konieczny, S.; Dropalla, G. J.; Milbradt, M.; Tiller, J. C., Amphiphilic Polymer Conetworks Based on End Group Cross-Linked Poly(2-oxazoline) Homo- and Triblock Copolymers. *Macromolecules* 2013, 46, 3234-3245.
149. Schmidt, M.; Raidt, T.; Ring, S.; Gielke, S.; Gramse, C.; Wilhelm, S.; Katzenberg, F.; Krumm, C.; Tiller, J. C., Investigations on "near perfect" poly(2-oxazoline) based amphiphilic polymer conetworks with a crystallizable block. *European Polymer Journal* 2017, 88, 562-574.
150. Dech, S., Dissertation, Technische Universität Dortmund. 2013.
151. Schmidt, M.; Raidt, T.; Ring, S.; Gielke, S.; Gramse, C.; Wilhelm, S.; Katzenberg, F.; Krumm, C.; Tiller, J. C., Investigations on "near perfect" poly(2-oxazoline) based amphiphilic polymer conetworks with a crystallizable block. *European Polymer Journal*.
152. Romanovska, A., *Bachelorarbeit, technische Universität Dortmund* 2016.
153. Krumm, C., *Dissertation, Technische Universität Dortmund* 2014.
154. Fortuniak, W.; Mizerska, U.; Chojnowski, J.; Basinska, T.; Slomkowski, S.; Chehimi, M.; Konopacka, A.; Turecka, K.; Werel, W., Polysiloxanes With Quaternary Ammonium Salt Biocidal Functions and Their Behavior When Incorporated Into a Silicone Elastomer Network. *J Inorg Organomet Polym* 2011, 21, 576-589.

Literatur

155. Kerns, R. J.; Rybak, M. J.; Kaatz, G. W.; Vaka, F.; Cha, R.; Grucz, R. G.; Diwadkar, V. U.; Ward, T. D., Piperazinyl-linked fluoroquinolone dimers possessing potent antibacterial activity against drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003, 13, 1745-1749.
156. Kerns, R. J.; Rybak, M. J.; Kaatz, G. W.; Vaka, F.; Cha, R.; Grucz, R. G.; Diwadkar, V. U., Structural features of piperazinyl-linked ciprofloxacin dimers required for activity against drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003, 13, 2109-2112.
157. Azéma, J.; Guidetti, B.; Dewelle, J.; Le Calve, B.; Mijatovic, T.; Korolyov, A.; Vaysse, J.; Malet-Martino, M.; Martino, R.; Kiss, R., 7-((4-Substituted)piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin: Synthesis and in vitro biological evaluation as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, 17, 5396-5407.
158. Krumm, C.; Hijazi, M.; Trump, S.; Saal, S.; Richter, L.; Noschmann, G. G. F. K.; Nguyen, T.-D.; Preslikoska, K.; Moll, T.; Tiller, J. C., Highly active and selective telechelic antimicrobial poly(2-oxazoline) copolymers. *Polymer* 2017, 118, 107-115.
159. Krumm, C.; Harmuth, S.; Hijazi, M.; Neugebauer, B.; Kampmann, A.-L.; Geltenpoth, H.; Sickmann, A.; Tiller, J. C., Antimicrobial Poly(2-methyloxazoline)s with Bioswitchable Activity through Satellite Group Modification. *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, 3830-3834.
160. Hannappel, S.; Groeneweg, J.; Zühlke, S., Antibiotika und Antiparasitika im Grundwasser unter Standorten mit hoher Viehbesatzdichte. 2014.
161. Küster, A.; Lehmann, S.; Hein, A.; Schönfeld, J., Antibiotics in the environment – effects and side-effects. *UMID* 2013, 1, 18-28.
162. Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Mersch-Sundermann, V., Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 2000, 40, 701-710.
163. Länge, R.; Dietrich, D., Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—conceptual considerations. *Toxicology Letters* 2002, 131, 97-104.

Literatur

164. Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Holten Lützhøft, H. C.; Jørgensen, S. E., Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 1998, 36, 357-393.
165. Saavedra, M. J.; Guedes-Novais, S.; Alves, A.; Rema, P.; Tação, M.; Correia, A.; Martínez-Murcia, A., Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology* 2004, 7, 207-211.
166. Engel, J.; Lategahn, J.; Rauh, D., Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2016, 7, 2-5.
167. Volmer, J.; Neumann, C.; Bühler, B.; Schmid, A., Engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 for Constitutive Solvent Tolerance and Increased Specific Styrene Epoxidation Activity. *Applied and Environmental Microbiology* 2014, 80, 6539-6548.
168. Treangen, T. J.; Maybank, R. A.; Enke, S.; Friss, M. B.; Diviak, L. F.; Karaolis, D. K. R.; Koren, S.; Ondov, B.; Phillippy, A. M.; Bergman, N. H.; Rosovitz, M. J., Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announcements* 2014, 2, e01110-14.
169. Fitzgibbon, J. E.; John, J. F.; Delucia, J. L.; Dubin, D. T., Topoisomerase Mutations in Trovafloxacin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, 42, 2122-2124.
170. Lanfer, F., *Masterarbeit, technische Universität Dortmund* 2015.
171. Schmidt, M.; Bast, L. K.; Lanfer, F.; Richter, L.; Hennes, E.; Seymen, R.; Krumm, C.; Tiller, J. C., Poly(2-oxazoline)-Antibiotic Conjugates with Penicillins. *Bioconjugate Chemistry* 2017, 28, 2440-2451.
172. A. D. Deshpande; K. G. Baheti; Chatterjee, N. R., Degradation of β -lactam antibiotics *Current Science* 2004, 87, 1684-1695.
173. Levine, B. B.; Zolov, D. M., Prediction of penicillin allergy by immunological tests. *Journal of Allergy* 1969, 43, 231-244.
174. Cole, M.; Kenig, M. D.; Hewitt, V. A., Metabolism of Penicillins to Penicilloic Acids and 6-Aminopenicillanic Acid in Man and Its Significance in Assessing Penicillin Absorption. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1973, 3, 463-468.

Literatur

175. Robinson-Fuentes, V. A.; Jefferies, T. M.; Branch, S. K., Degradation Pathways of Ampicillin in Alkaline Solutions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1997, 49, 843-851.
176. Adamus, G.; Kowalczyk, M., Electrospray multistep ion trap mass spectrometry for the structural characterisation of poly[(R,S)-3-hydroxybutanoic acid] containing a β -lactam end group. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000, 14, 195-202.
177. Novick, R. P., Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochemical Journal* 1962, 83, 236-240.
178. Flory, P. J.; Rehner, J., Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics* 1943, 11, 521-526.
179. Aumsuwan, N.; Danyus, R. C.; Heinhorst, S.; Urban, M. W., Attachment of Ampicillin to Expanded Poly(tetrafluoroethylene): Surface Reactions Leading to Inhibition of Microbial Growth. *Biomacromolecules* 2008, 9, 1712-1718.
180. Aumsuwan, N.; Heinhorst, S.; Urban, M. W., The Effectiveness of Antibiotic Activity of Penicillin Attached to Expanded Poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) Surfaces: A Quantitative Assessment. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3525-3530.
181. Noschmann, G., Masterarbeit, Technische Universität Dortmund. 2017.
182. Tobis, J.; Boch, L.; Thomann, Y.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks as chiral separation membranes. *Journal of Membrane Science* 2011, 372, 219-227.
183. Dech, S.; Wruk, V.; Fik, C. P.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents. *Polymer* 2012, 53, 701-707.
184. Rauner, N., *Dissertation, Technische Universität Dortmund* 2017.

Anhang

7. Erklärung

Name, Vorname: Schmidt, Martin
Matrikel-Nr.: 130618
Anschrift: Sulpkestr. 35 44269 Dortmund
E-Mail: martin2.schmidt@tu-dortmund.de

Erklärung:

§ 8 (2) 4

Ich erkläre, dass ich beim Anfertigen der vorliegenden Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

§ 8 (2) 6

Ich erkläre, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Dortmund, den 05.01.2018

(Martin Schmidt)

Anhang

9. Anhang

9.1 MIC-Werte der einzelnen Konjugate in [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] und [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]

Tabelle 36: Überblick über die MIC-Werte der Ciprofloxacin-Polymer-Konjugate in [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$].

Samples	MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]				
	<i>S. a</i>	<i>S. m</i>	<i>E. c</i>	<i>P. a</i>	<i>K. p</i>
Me-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	0.31 ± 0.06	0.44 ± 0.02	22 ± 2.54	101 ± 24	53 ± 1.95
Me-PMeOx ₂₀ -EDA-xCIP	2.05 ± 0.45				
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	6.85 ± 0.67	2.83 ± 0.49	17 ± 4.51	327 ± 15	444 ± 18
Me-PMeOx ₄₀ -EDA-xCIP	6.85 ± 0.22		3.9 ± 0.01		
Me-PMeOx ₆₀ -EDA-xCIP	19.3 ± 0.90		33.5 ± 2.5		
Me-PEtOx ₁₀ -EDA-xCIP	0.41 ± 0.08	0.49 ± 0.07	6.00 ± 0.67	25 ± 3.75	77 ± 7.0
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.36 ± 0.31	2.04 ± 0.60	8.40 ± 2.14	155 ± 0.1	130 ± 20
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.12 ± 0.40	1.16 ± 0.21	8.75 ± 2.15	154 ± 8	93 ± 0.01
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.87 ± 0.20	68 ± 1.50	7.05 ± 0.43	226 ± 0	83 ± 0.01
Me-PEG-EDA-xCIP	0.47 ± 0.19	1.51 ± 0.39	3.82 ± 0.90	87 ± 0.01	11 ± 4.88
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA-xCIP	1.68 ± 0.02				
Me-PiPrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA-xCIP	1.05 ± 0.31				
Me-PiPrOx ₅ -PEtOx ₂₈ -EDA-xCIP	1.38 ± 0.01				
DDA-X-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	1.19 ± 0.50	0.34 ± 0.09	1.67 ± 0.17	96 ± 4.00	62 ± 18.8
DDA-X-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	5.77 ± 2.13	8.78 ± 2.47	5.24 ± 0.26	326 ± 14	130 ± 40
DDA-X-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.73 ± 0.35	1.96 ± 0.18	6.15 ± 0.56	110 ± 27	32 ± 2.32
DDA-X-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	2.10 ± 0.24	9.38 ± 3.13	10.9 ± 0.01	62 ± 6.0	312 ± 12
CIPx-EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA-xCIP	15.3 ± 3.21	8.64 ± 1.51	165 ± 18	237 ± 6	105 ± 10.5
Me-PEtOx-PsucEDAox-PsucEDAoxxCIP-EDA-xCIP	2.33 ± 1.53	1.89 ± 0.01	1.26 ± 0.01	12.5 ± 0.01	25 ± 0.01
Me-PMeOx ₁₈ -PHepOx ₃ -EDA-xCIP	0.30 ± 0.01		5.47 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₉ -PHepOx ₇ -EDA-xCIP	0.32 ± 0.01		3.89 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₄ -PHepOx ₁₁ -EDA-xCIP	0.32 ± 0.01		2.91 ± 0.01		

Anhang

Me-PMeOx ₈ -PHepOx ₁₄ - EDA-xCIP	3.28 ± 0.01		3.40 ± 0.01		
Me-PHepOx ₂₀ -EDA-xCIP	64 ± 0.01		91 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₀ -EDA-eCIP	10.4 ± 4.4		1.69 ± 0.13	3.67 ± 0.16	7.79 ± 0.18
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-eCIP	33 ± 14		4.61 ± 2.07	3.34 ± 1.07	15 ± 1.34
Me-PMeOx ₄₀ -EDA-eCIP	32 ± 0.01		4.10 ± 0.25		
Me-PMeOx ₆₀ -EDA-eCIP	34 ± 0.01		3.65 ± 0.01		
Me-PEtOx ₁₀ -EDA-eCIP	3.02 ± 0.10		1.25 ± 0.25	3.19 ± 0.13	7.43 ± 0.60
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-eCIP	12.5 ± 0.50		2.50 ± 0.75	3.96 ± 1.44	10.6 ± 3.80
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-eCIP	12.5 ± 6.25		3.20 ± 1.25	21 ± 13.3	12.5 ± 4.68
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA-eCIP	100 ± 30		4.81 ± 0.28	226 ± 46	38 ± 13.7
Me-PEG-EDA-eCIP	11.3 ± 3.09		24.10 ± 8.91	116 ± 1.00	77 ± 51
Me-PMeOx ₂₈ -PHepOx ₄ - EDA-eCIP	14.6 ± 0.01		14.6 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₈ -PHepOx ₆ - EDA-eCIP	12.7 ± 0.01		12.7 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ - EDA-eCIP	8.55 ± 0.01		13.7 ± 0.01		
Me-PMeOx ₈ -PHepOx ₂₂ - EDA-eCIP	2.65 ± 0.01		4.53 ± 0.01		
Me-PHepOx ₂₃ -EDA-eCIP	76 ± 0.01		158 ± 0.01		
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-bCIP	52 ± 11.9		24 ± 7.04	125 ± 31	61 ± 14.1
Me-PMeOx ₃₀ -pCIP	1.72 ± 0.48		1.27 ± 0.61	7.94 ± 4.05	8.67 ± 4.32
Me-PEtOx ₃₀ -pCIP	46 ± 2.5		18 ± 6.48	62 ± 0.01	31 ± 0.01
Me-PiPrOx ₃₀ -pCIP	3.58 ± 0.01		4.32 ± 0.01	67 ± 32	13.4 ± 0.01
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-peCIP	373 ± 14.4		42 ± 1.56	62 ± 17.9	78 ± 3.75
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-peCIP	256 ± 64		109 ± 0.01	603 ± 251	631 ± 1.25
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-peCIP	150 ± 23		16.9 ± 2.31	135 ± 41	68 ± 5.94
CIP	0.43 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.24 ± 0.07	0.20 ± 0.08
CIP·HCl	0.30 ± 0.20	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.25 ± 0.04
xCIP	0.58 ± 0.04	2.03 ± 0.41	2.39 ± 1.12	4.78 ± 0.09	5.86 ± 2.34
eCIP	0.28 ± 0.05		0.165 ± 0.09	2.94 ± 0.31	1.15 ± 1.35
bCIP	0.32 ± 0.18		0.08 ± 0.05	5.08 ± 1.76	3.17 ± 0.05
pCIP	1.66 ± 0.39		0.36 ± 0.01	1.31 ± 0.01	2.11 ± 0.52
peCIP	5.47 ± 0.01		6.25 ± 0.01	389 ± 0.01	84 ± 0.01

Anhang

Tabelle 37: Überblick über die MIC-Werte der Ciprofloxacin-Polymer-Konjugate in [$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$].

Samples	MIC [$\mu\text{mol}/\text{mL}$]				
	<i>S. a</i>	<i>S. m</i>	<i>E. c</i>	<i>P. a</i>	<i>K. p</i>
Me-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	0.20 ± 0.10	0.3 ± 0.02	17 ± 2.00	78 ± 19	41 ± 1.50
Me-PMeOx ₂₀ -EDA-xCIP	0.95 ± 0.21				
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	2.20 ± 0.20	0.90 ± 0.20	5.3 ± 1.5	105 ± 50	143 ± 6.10
Me-PMeOx ₄₀ -EDA-xCIP	1.81 ± 0.17		1.02 ± 0.01		
Me-PMeOx ₆₀ -EDA-xCIP	3.44 ± 0.16		5.98 ± 0.81		
Me-PEtOx ₁₀ -EDA-xCIP	0.27 ± 0.05	0.33 ± 0.04	4.00 ± 0.44	16.8 ± 2.48	51 ± 4.67
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	0.40 ± 0.10	0.60 ± 0.20	2.40 ± 0.60	44 ± 2.50	37 ± 5.90
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	0.29 ± 0.10	0.29 ± 0.05	2.26 ± 0.01	40 ± 12.5	24 ± 0.01
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	0.48 ± 0.05	17.6 ± 0.37	1.81 ± 0.11	58 ± 0.01	21 ± 0.01
Me-PEG-EDA-xCIP	0.20 ± 0.10	0.60 ± 0.20	1.50 ± 0.40	35 ± 0.01	4.50 ± 2.00
Me-PiPrOx ₂₂ -PEtOx ₉ -EDA-xCIP	0.43 ± 0.01				
Me-PiPrOx ₁₅ -PEtOx ₁₄ -EDA-xCIP	0.29 ± 0.09				
Me-PiPrOx ₅ -PEtOx ₂₈ -EDA-xCIP	0.35 ± 0.01				
DDA-X-PMeOx ₁₀ -EDA-xCIP	0.70 ± 0.30	0.20 ± 0.05	1.00 ± 0.1	60 ± 2.50	39 ± 11.7
DDA-X-PMeOx ₃₀ -EDA-xCIP	1.70 ± 0.60	2.60 ± 0.7	1.50 ± 0.1	96 ± 4.10	38 ± 11.9
DDA-X-PEtOx ₃₀ -EDA-xCIP	0.46 ± 0.09	0.52 ± 0.05	1.62 ± 0.15	29 ± 7.31	8.44 ± 0.61
DDA-X-PiPrOx ₃₀ -EDA-xCIP	0.66 ± 0.02	2.69 ± 0.26	3.12 ± 0.01	17.7 ± 0.50	89 ± 1.04
CIPx-EDA-PMeOx-DBX-PMeOx-EDA-xCIP	5.10 ± 1.07	2.88 ± 0.50	55 ± 6.25	79 ± 2.00	35 ± 3.50
Me-PEtOx-PsucEDAox-PsucEDAoxxCIP-EDA-xCIP	2.34 ± 0.22	0.27 ± 0.01	0.18 ± 0.01	1.78 ± 0.01	3.57 ± 0.01
Me-PMeOx ₁₈ -PHepOx ₃ -EDA-xCIP	0.12 ± 0.01		2.13 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₉ -PHepOx ₇ -EDA-xCIP	0.10 ± 0.01		1.20 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₄ -PHepOx ₁₁ -EDA-xCIP	0.09 ± 0.01		0.91 ± 0.01		
Me-PMeOx ₈ -PHepOx ₁₄ -EDA-xCIP	0.98 ± 0.01		1.11 ± 0.01		
Me-PHepOx ₂₀ -EDA-xCIP	17.0 ± 0.01		23 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₀ -EDA-eCIP	8.04 ± 3.38		1.30 ± 0.10	2.82 ± 0.13	6.00 ± 0.14
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-eCIP	10.7 ± 4.79		1.48 ± 0.67	1.08 ± 0.35	4.98 ± 0.43
Me-PMeOx ₄₀ -EDA-eCIP	8.61 ± 0.01		1.08 ± 0.07		
Me-PMeOx ₆₀ -EDA-eCIP	6.13 ± 0.01		0.66 ± 0.01		
Me-PEtOx ₁₀ -EDA-eCIP	2.10 ± 0.07		0.87 ± 0.18	2.21 ± 0.09	5.17 ± 0.42

Anhang

Me-PEtOx ₃₀ -EDA-eCIP	3.62 ± 0.14		0.721 ± 0.22	1.14 ± 0.42	3.07 ± 1.10
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-eCIP	3.25 ± 1.63		0.83 ± 0.33	5.49 ± 3.46	3.26 ± 1.22
Me-PcPrOx ₃₀ -EDA-eCIP	25 ± 7.85		1.24 ± 0.07	5.16 ± 0.26	9.78 ± 3.53
Me-PEG-EDA-eCIP	4.15 ± 1.24		9.64 ± 3.56	46 ± 0.40	30 ± 20
Me-PMeOx ₂₈ -PHepOx ₄ - EDA-eCIP	4.04 ± 0.01		4.04 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₈ -PHepOx ₆ - EDA-eCIP	4.86 ± 0.01		4.86 ± 0.01		
Me-PMeOx ₁₅ -PHepOx ₁₂ - EDA-eCIP	2.30 ± 0.01		5.09 ± 0.01		
Me-PMeOx ₈ -PHepOx ₂₂ - EDA-eCIP	0.53 ± 0.01		0.94 ± 0.01		
Me-PHepOx ₂₃ -EDA-eCIP	3.93 ± 0.01		8.11 ± 0.01		
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-bCIP	17.0 ± 3.90		7.90 ± 2.30	40 ± 10.2	19.8 ± 4.59
Me-PMeOx ₃₀ -pCIP	0.45 ± 0.13		0.34 ± 0.16	2.09 ± 1.07	2.28 ± 1.14
Me-PEtOx ₃₀ -pCIP	10.45 ± 0.56		4.09 ± 1.47	7.05 ± 0.01	14.1 ± 0.01
Me-PiPrOx ₃₀ -pCIP	0.72 ± 0.01		0.86 ± 0.01	13.5 ± 0.01	2.67 ± 0.01
Me-PMeOx ₃₀ -EDA-peCIP	113 ± 4.36		12.7 ± 0.47	19.0 ± 5.42	23 ± 1.14
Me-PEtOx ₃₀ -EDA-peCIP	64 ± 16.2		27 ± 0.01	150 ± 63	157 ± 0.31
Me-PiPrOx ₃₀ -EDA-peCIP	30 ± 4.75		3.34 ± 0.46	27 ± 8.18	13 ± 1.19
CIP	1.29 ± 0.10	0.90 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.70 ± 0.20	0.60 ± 0.20
CIP-HCl	0.78 ± 0.52	0.71 ± 0.08	0.75 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.66 ± 0.10
xCIP	1.20 ± 0.10	4.30 ± 0.90	5.10 ± 2.40	10.0 ± 0.20	12.0 ± 5.00
eCIP	0.68 ± 0.12		0.40 ± 0.22	7.21 ± 0.77	2.82 ± 0.75
bCIP	0.62 ± 0.35		0.15 ± 0.10	9.82 ± 3.39	6.13 ± 0.10
pCIP	3.87 ± 0.91		0.84 ± 0.01	1.31 ± 0.01	4.91 ± 1.21
peCIP	12.7 ± 0.01		14.6 ± 0.01	905 ± 0.01	195 ± 0.01

Anhang

Tabelle 38: Zusammenfassung der MIC-Werte für die Penicillin-Polymer-Konjugate in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Polymer	MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			
	<i>S. a</i>	<i>S. m</i>	<i>E. c</i>	<i>S. a</i> mit Penicillinase
Me-PMeOx ₅ -PenG	0.51 ± 0.02			
Me-PMeOx ₁₀ -PenG	0.50 ± 0.22			
Me-PMeOx ₂₂ -PenG	1.46 ± 0.05			
Me-PMeOx ₃₀ -PenG	0.50 ± 0.24	6.83 ± 2.11	1243 ± 13.5	49 ± 18
Me-PMeOx ₄₅ -PenG	0.93 ± 0.19			
Me-PEtOx ₅₃ -PenG	9.18 ± 3.18	182 ± 17.5	1496 ± 903	200 ± 28
Me-PiPrOx ₂₉ -PenG	1.54 ± 0.20	11.0 ± 2.00	1186 ± 244	82 ± 35
Me-PMOx ₂₁ -PenV	0.612 ± 0.16	31 ± 2.66	1337 ± 122	61 ± 13
Me-PEtOx ₃₈ -PenV	2.89 ± 0.51	45.5 ± 0.50	187 ± 35	97 ± 29
Me-PiPrOx ₂₄ -PenV	2.11 ± 0.29	60.5 ± 0.50	7500 ± 0.01	1.09 ± 38
DDA-X-PMeOx ₅₂ -PenG	2.11 ± 1.06	2.11 ± 1.06	2700 ± 1100	64 ± 21
DDA-X-PEtOx ₅₀ -PenG	1.29 ± 0.66	2.81 ± 0.23	2262 ± 328	18 ± 2.0
DDA-X-PMeOx ₂₂ -PenV	0.46 ± 0.18	2.01 ± 0.01	810 ± 150	54 ± 13
DDA-X-PEtOx ₃₀ -PenV	0.29 ± 0.15	0.77 ± 0.01	347 ± 22.5	16 ± 1.9
PenG	0.0008 ± 0.0005	0.044 ± 0.0005	58.5 ± 16.5	260 ± 50
PenV	0.0004 ± 0.0002	0.09 ± 0.0001	300 ± 3.00	685 ± 130
Clox	0.32 ± 0.12	0.244 ± 0.01	508 ± 91.5	0.48 ± 0.22

Anhang

Tabelle 39: Zusammenfassung der MIC-Werte für die Penicillin-Polymer-Konjugate in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Polymer	MIC [$\mu\text{mol/L}$]			
	<i>S. a</i>	<i>S. m</i>	<i>E. c</i>	<i>S. a</i> mit Penicillinase
Me-PMeOx ₅ -PenG	0.64 ± 0.03			
Me-PMeOx ₁₀ -PenG	0.42 ± 0.18			
Me-PMeOx ₂₂ -PenG	0.64 ± 0.02			
Me-PMeOx ₃₀ -PenG	0.12 ± 0.08	1.59 ± 0.01	289 ± 3.19	11 ± 6.5
Me-PMeOx ₄₅ -PenG	0.22 ± 0.05			
Me-PEtOx ₅₃ -PenG	1.87 ± 0.99	37.2 ± 3.6	305 ± 184.38	40 ± 8.5
Me-PiPrOx ₂₉ -PenG	0.64 ± 0.05	4.58 ± 0.69	494 ± 84.1	34 ± 9.3
Me-PMOx ₂₁ -PenV	0.28 ± 0.05	14.1 ± 1.21	3409 ± 0.01	27 ± 4.4
Me-PEtOx ₃₈ -PenV	1.6 ± 0.15	25.2 ± 0.28	1500 ± 611	54 ± 8.7
Me-PiPrOx ₂₄ -PenV	0.54 ± 0.08	15.5 ± 0.13	580 ± 84.1	28 ± 9.9
DDA-X-PMeOx ₅₂ -PenG	0.44 ± 0.33	1.95 ± 0.12	278 ± 25.6	13 ± 5.5
DDA-X-PEtOx ₅₀ -PenG	1.29 ± 0.66	0.61 ± 0.05	40.6 ± 7.61	3.91 ± 0.53
DDA-X-PMeOx ₂₂ -PenV	0.46 ± 0.18	0.92 ± 0.01	368 ± 68.4	24 ± 3.5
DDA-X-PEtOx ₃₀ -PenV	0.10 ± 0.04	0.26 ± 0.01	120 ± 7.75	5.6 ± 0.49
PenG	0.00258 ± 0.0017	0.13 ± 0.007	175 ± 49.4	780 ± 17
PenV	0.0012 ± 0.0006	0.25 ± 0.001	842 ± 8.42	1900 ± 370
Clox	0.67 ± 0.26	0.513 ± 0.01	1070 ± 1 92	1.10 0.51

Anhang

9.2. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren

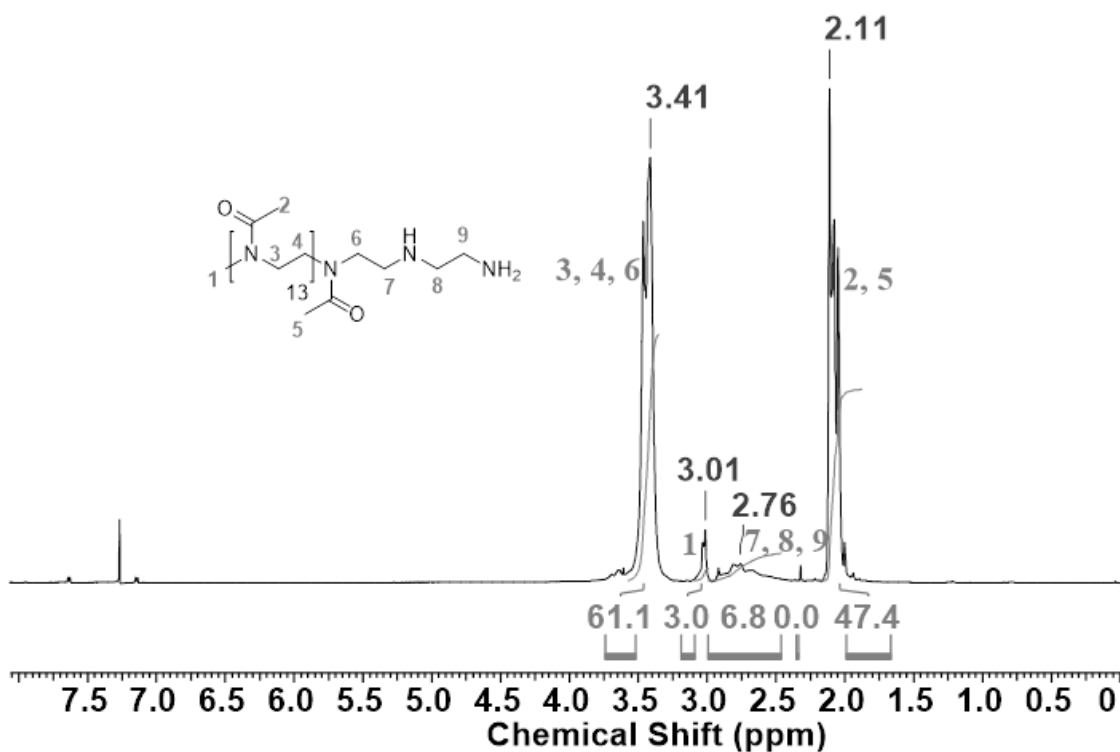


Abbildung 125: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO₁₀-EDA.

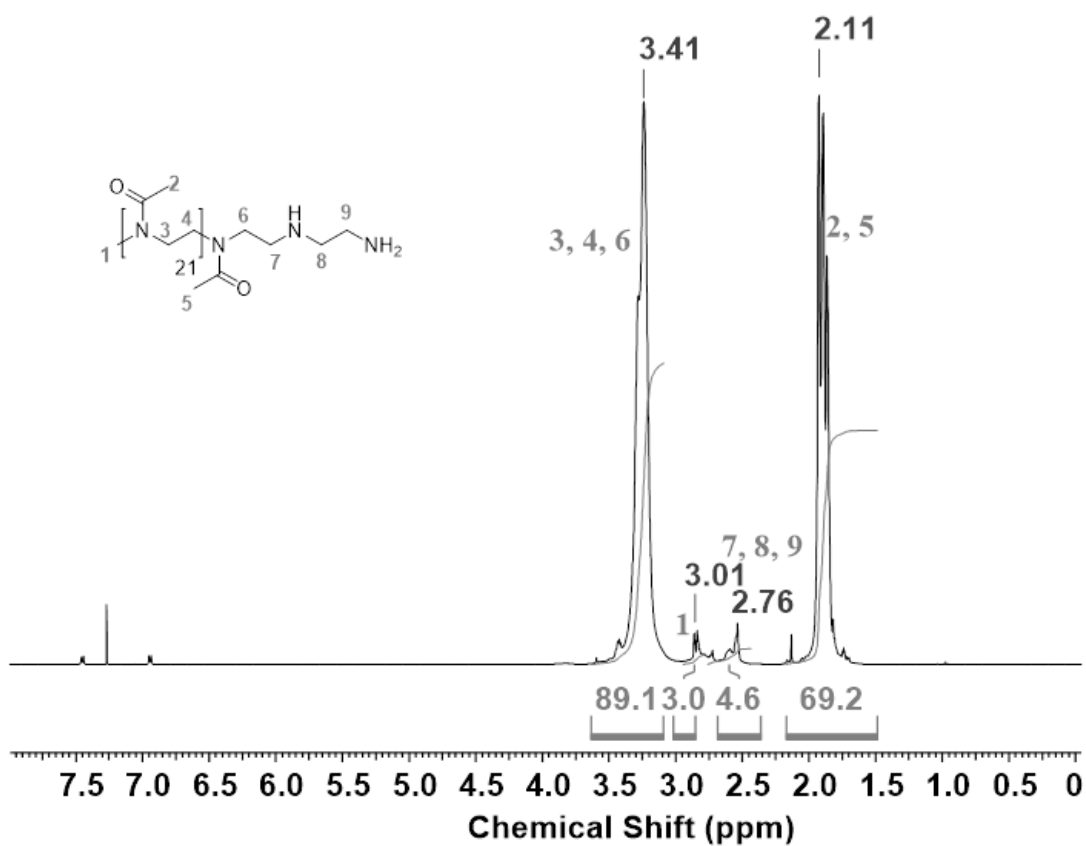


Abbildung 126: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO₂₂-EDA.

Anhang

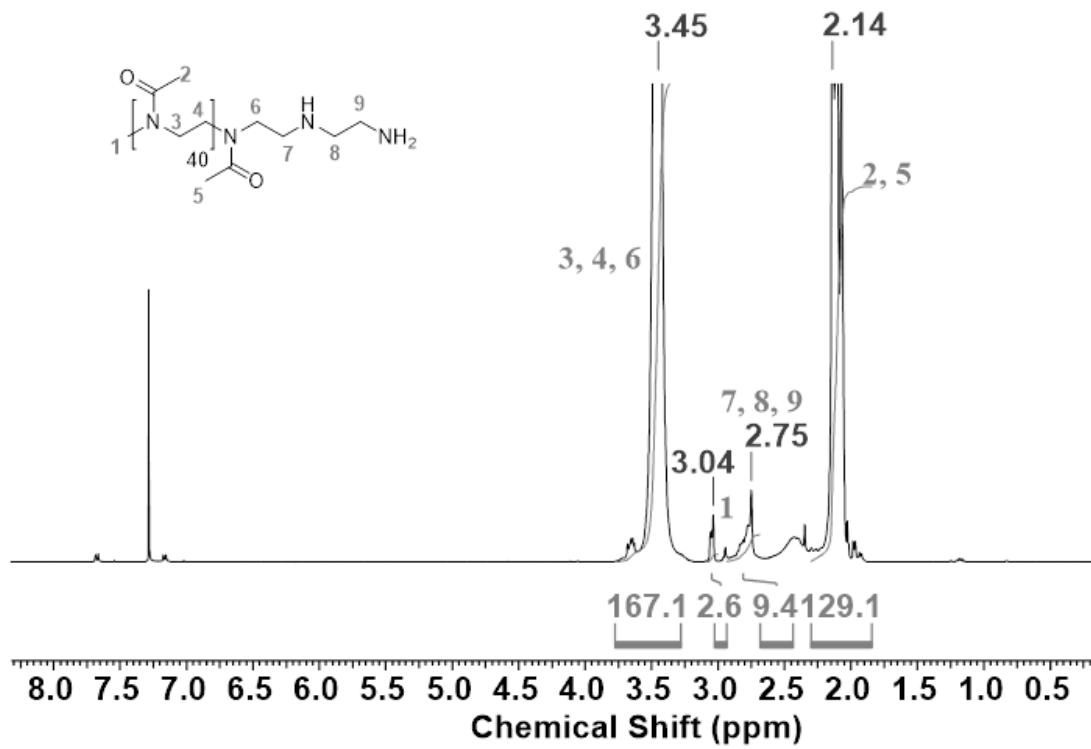


Abbildung 127: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeOx₄₁-EDA.

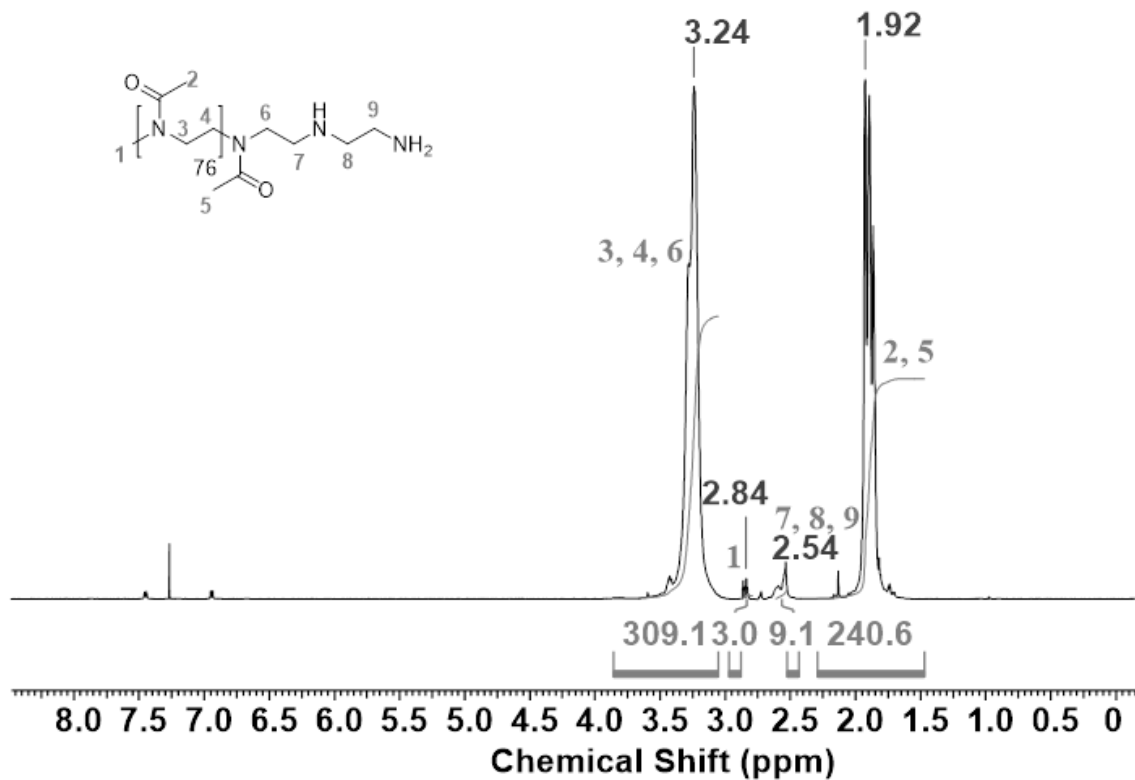


Abbildung 128: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeOx₇₇-EDA.

Anhang

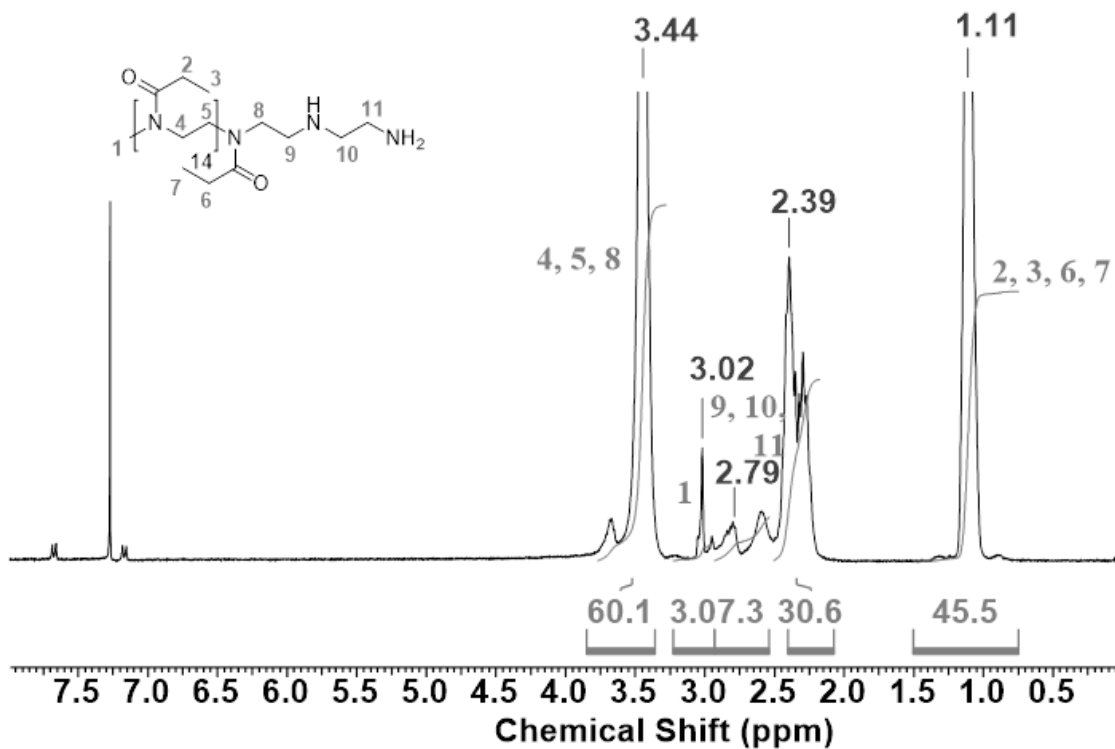


Abbildung 129: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PEtOx₁₅-EDA.

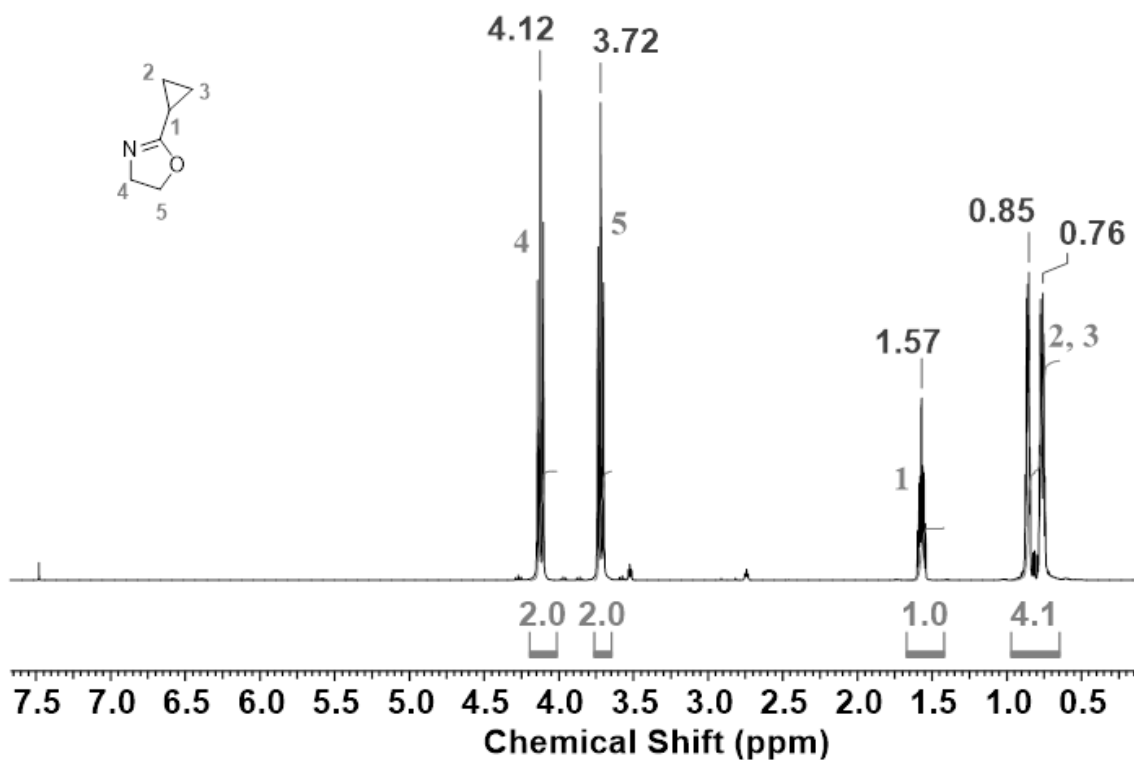


Abbildung 130: ¹H-NMR-Spektrum des Monomers 2-cyclo-Propyl-2-oxazolin (cPrOx).

Anhang

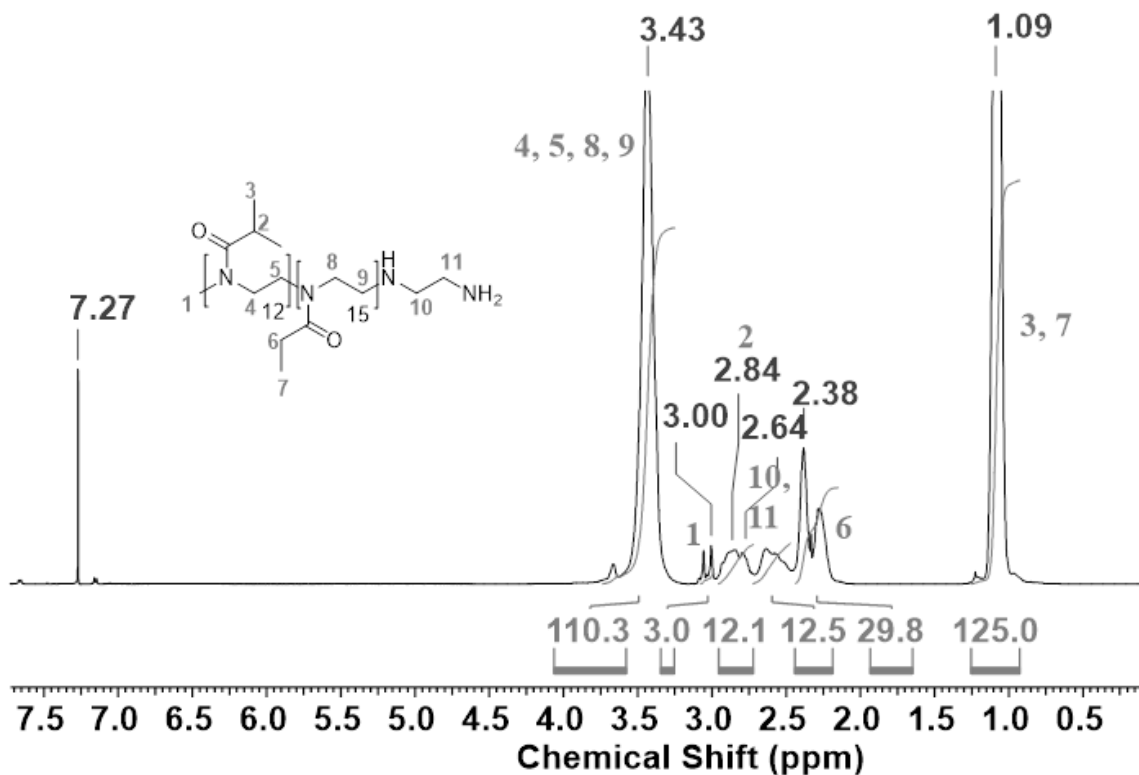


Abbildung 133: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PiPrOx₁₂-PEtOx₁₅-EDA.

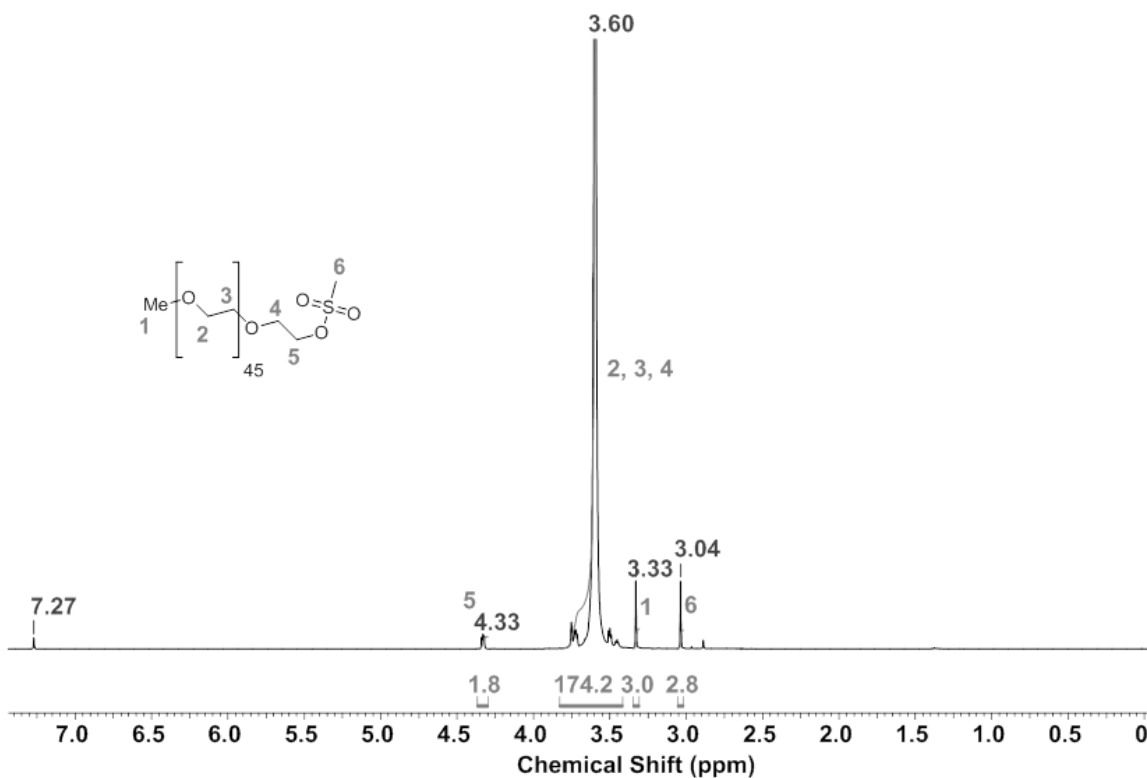


Abbildung 134: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PEG₄₅-Ms.

Anhang

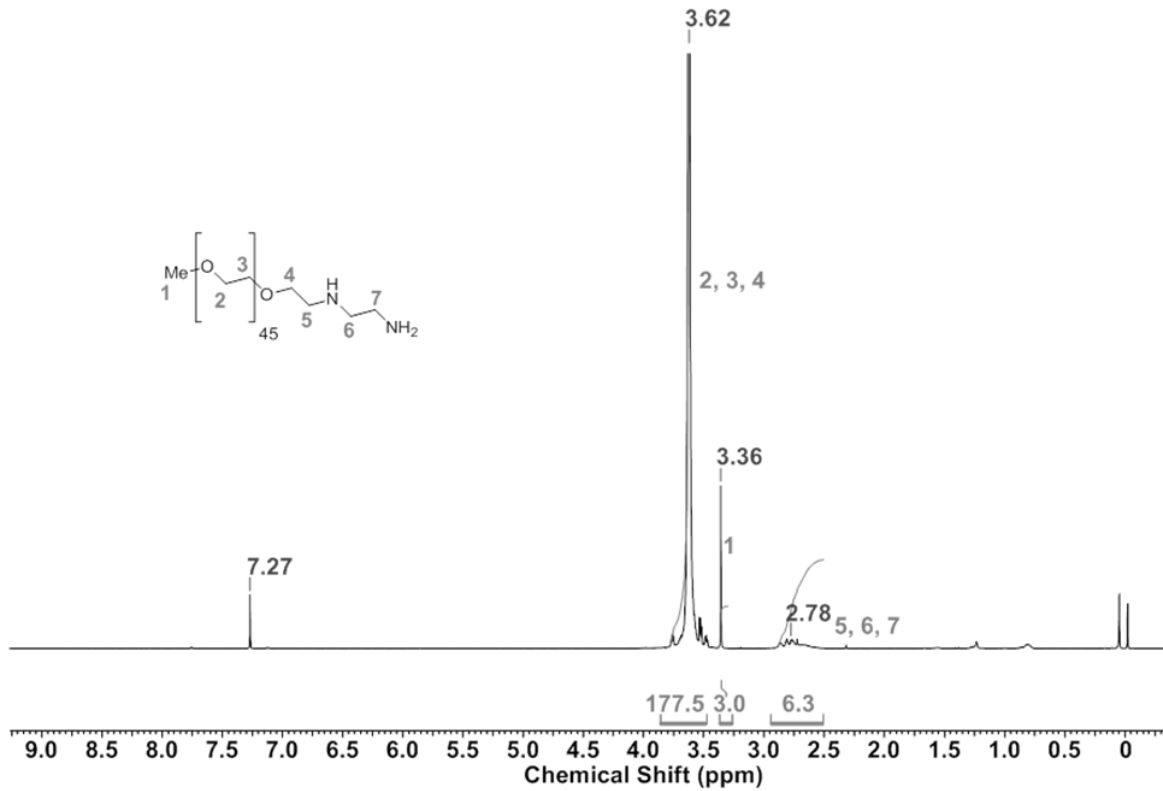


Abbildung 135: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PEG₄₅-EDA.

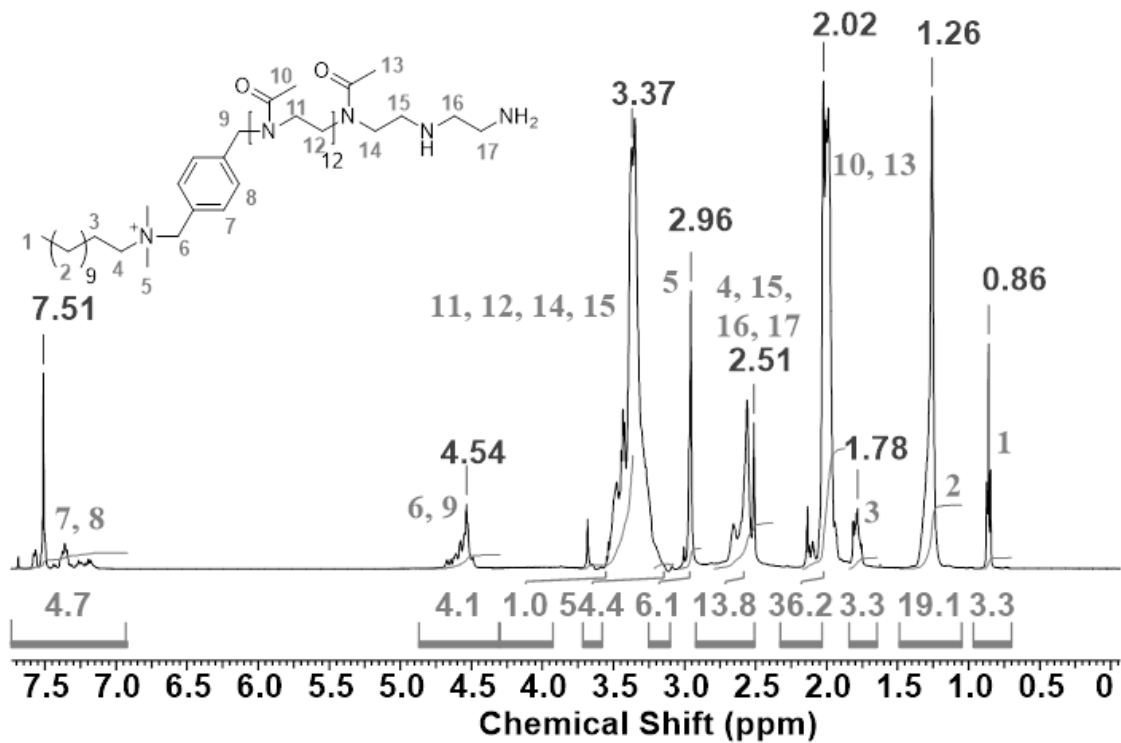


Abbildung 136: ¹H-NMR-Spektrum von DDA-X-PMOx₁₀-EDA.

Anhang

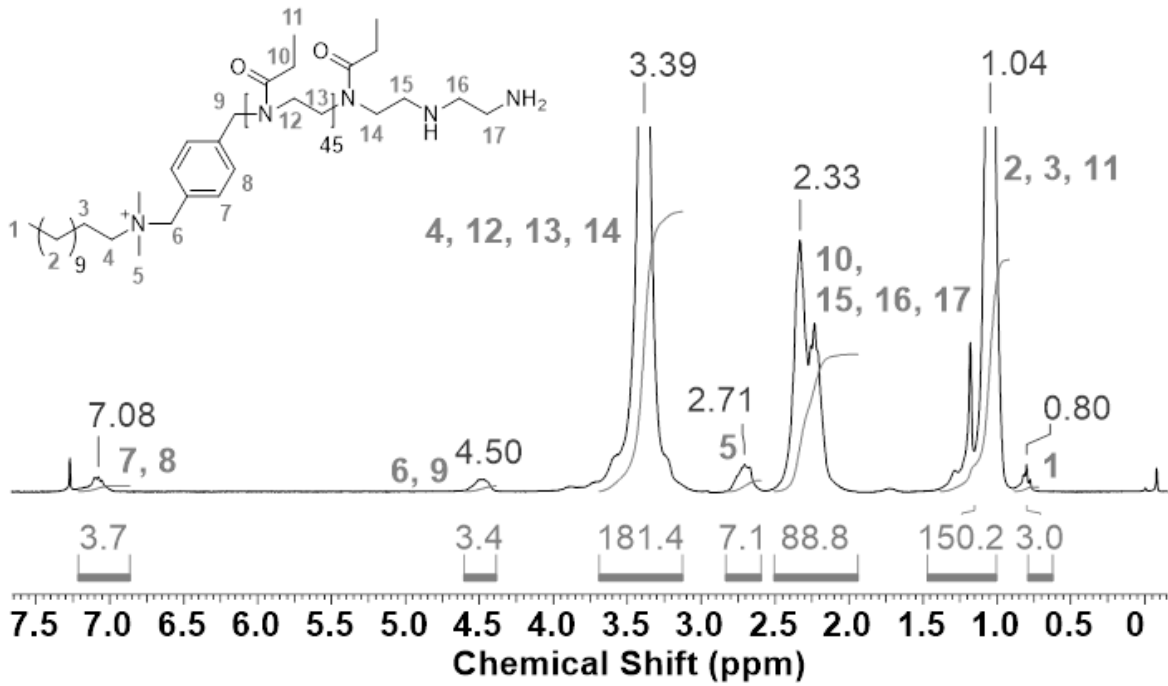


Abbildung 137: ^1H -NMR-Spektrum von DDA-X-PEtOx₄₅-EDA.

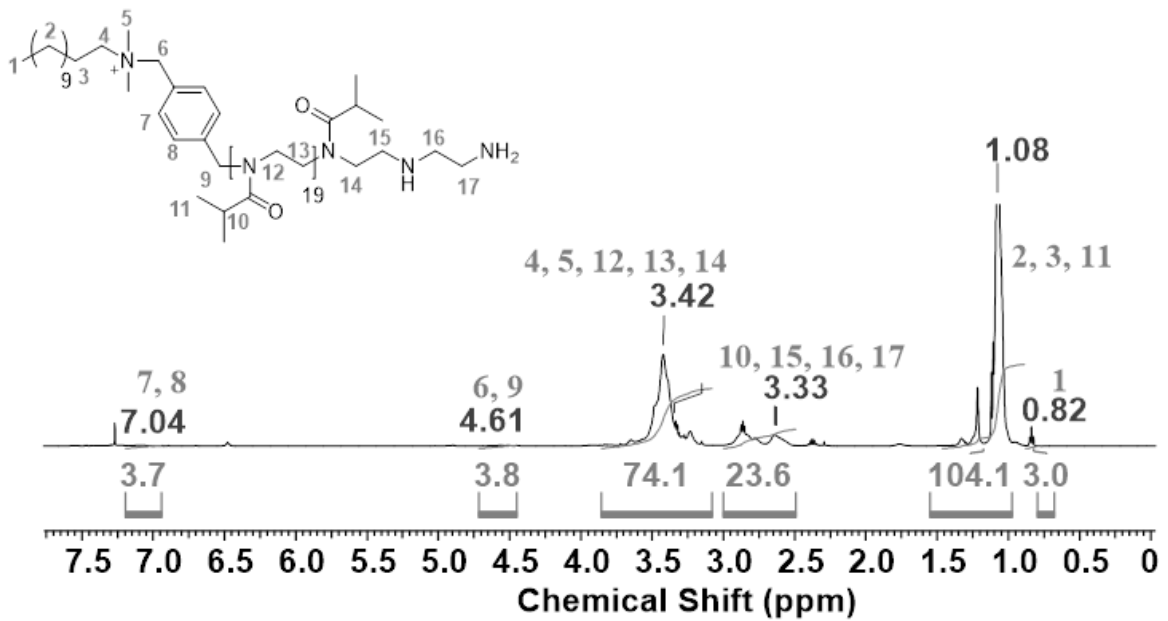


Abbildung 138: ^1H -NMR-Spektrum von DDA-X-PiPrOx₁₉-EDA.

Anhang

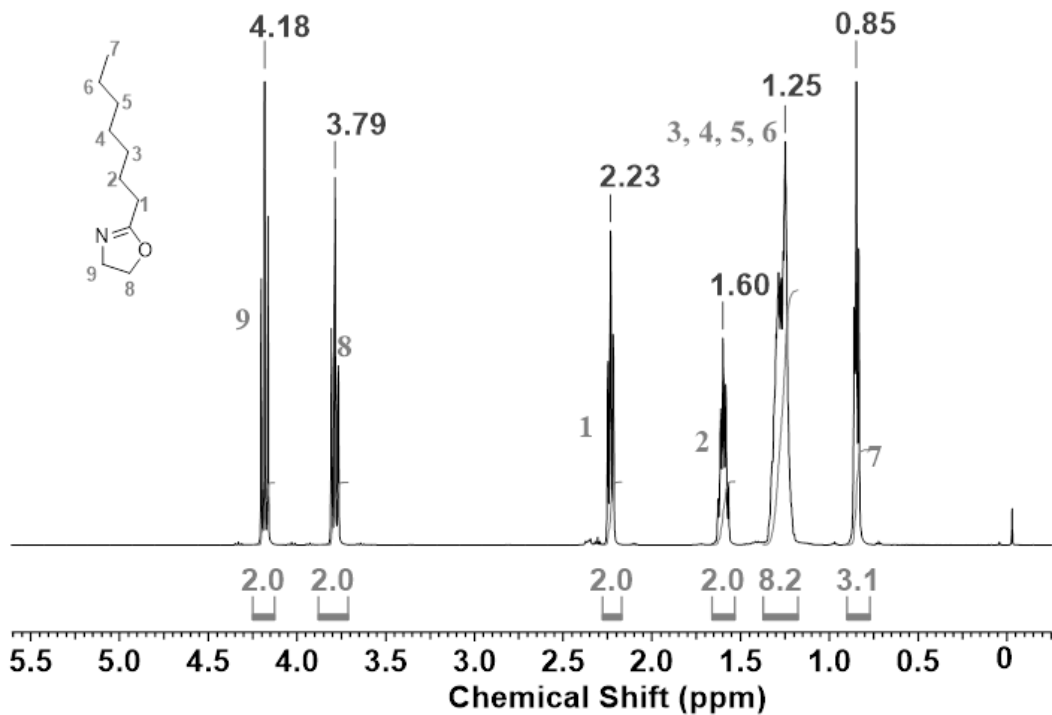


Abbildung 139: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Monomer 2-Heptyl-2-oxazoline (HepOx).

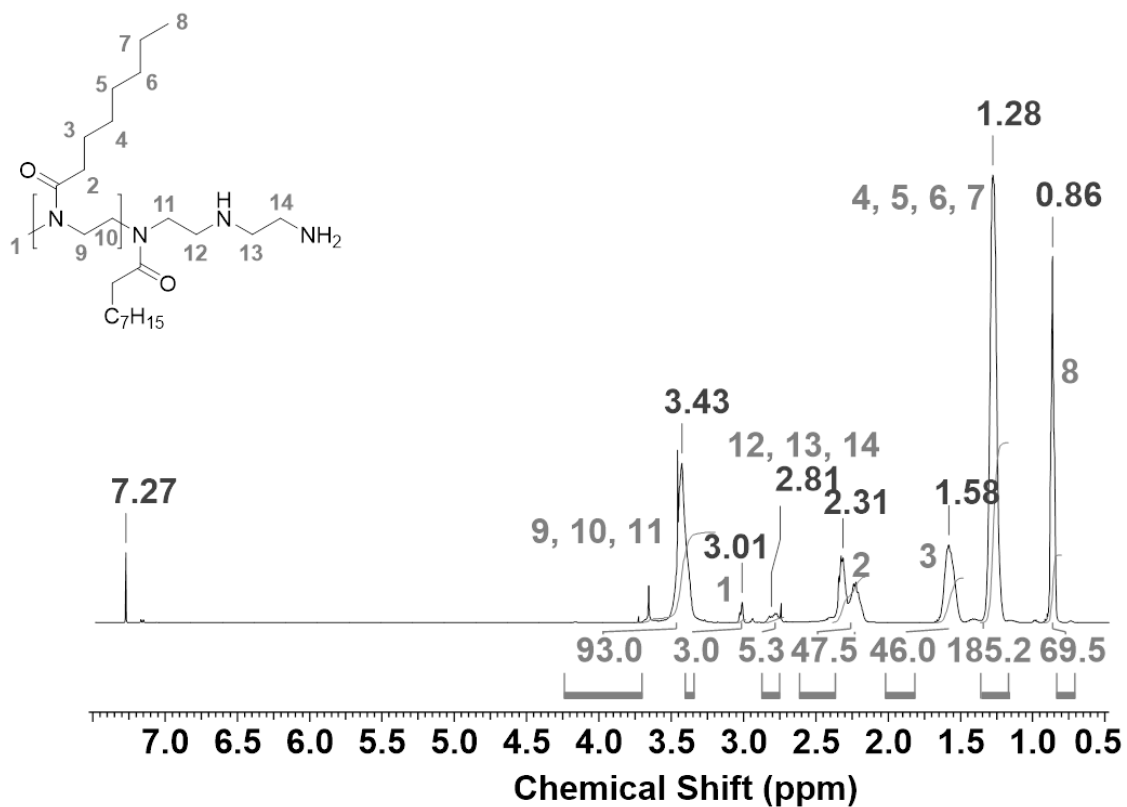


Abbildung 140: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-HepOx₂₃-EDA.

Anhang

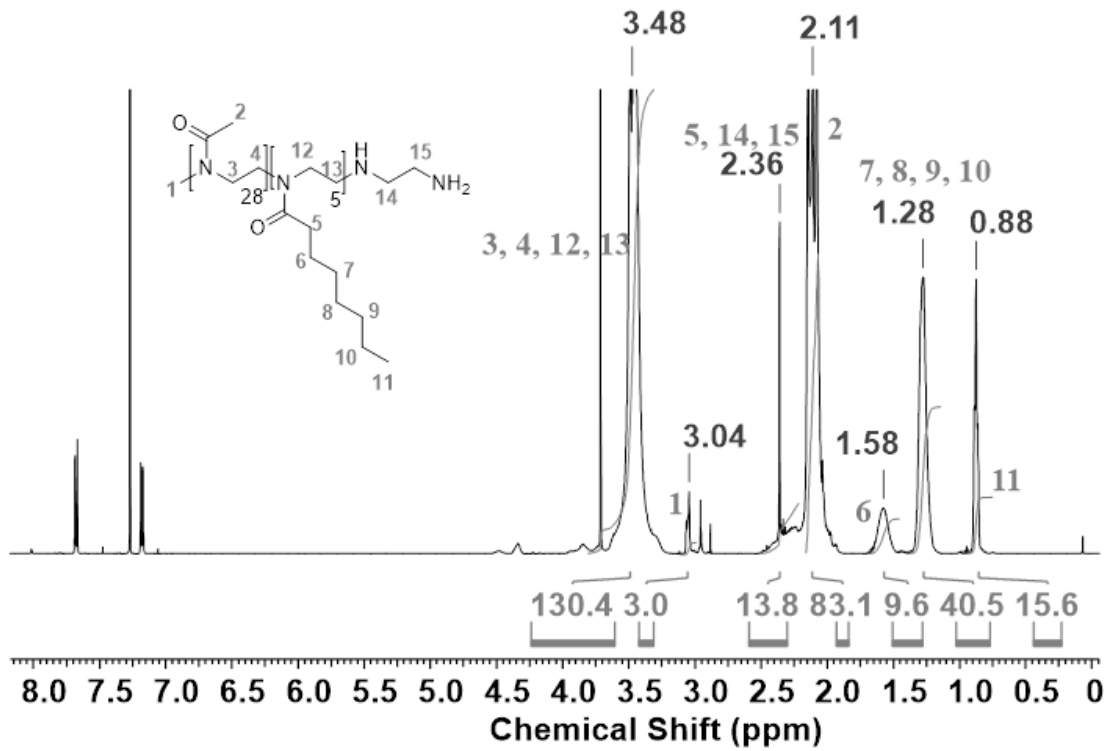


Abbildung 141: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO_{x28}-PHepO_{x5}-EDA.

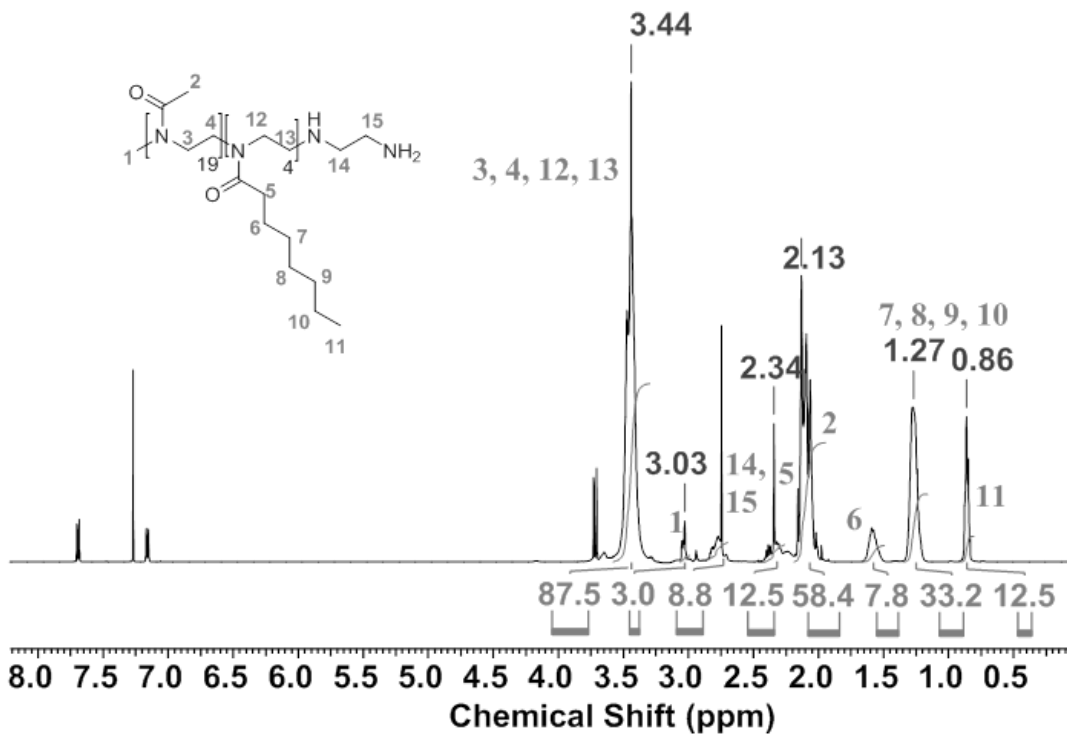


Abbildung 142: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO_{x19}-PHepO_{x4}-EDA.

Anhang

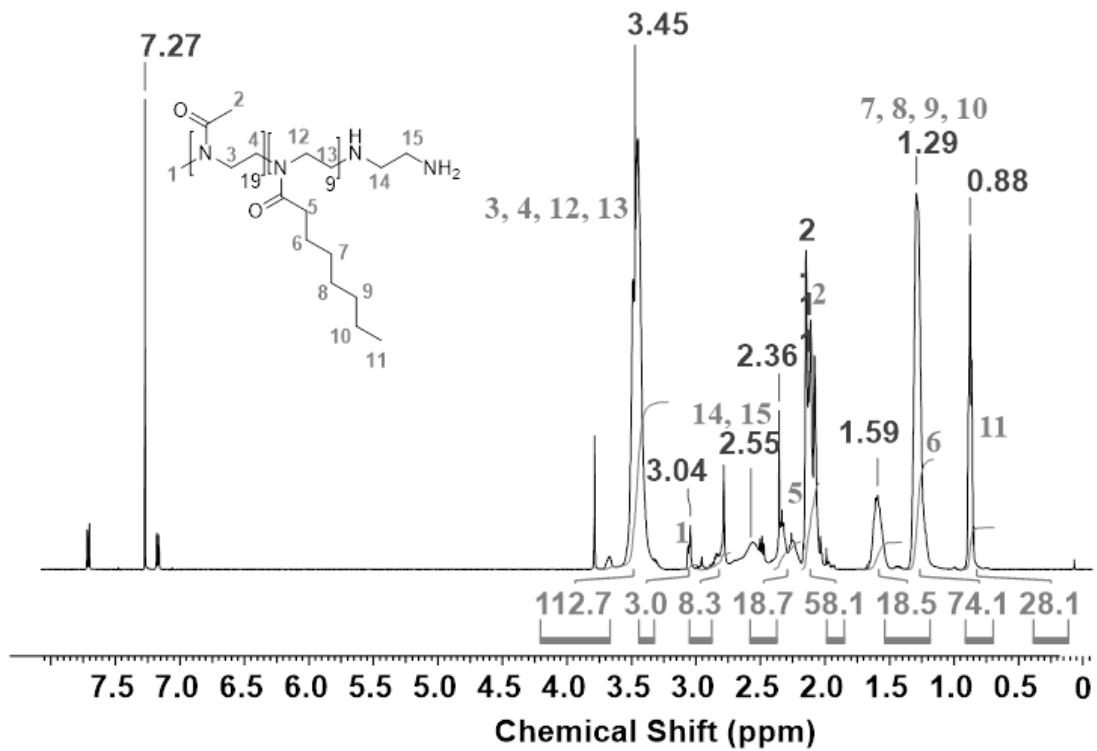


Abbildung 143: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO_x₁₉-PHepO_x₉-EDA.

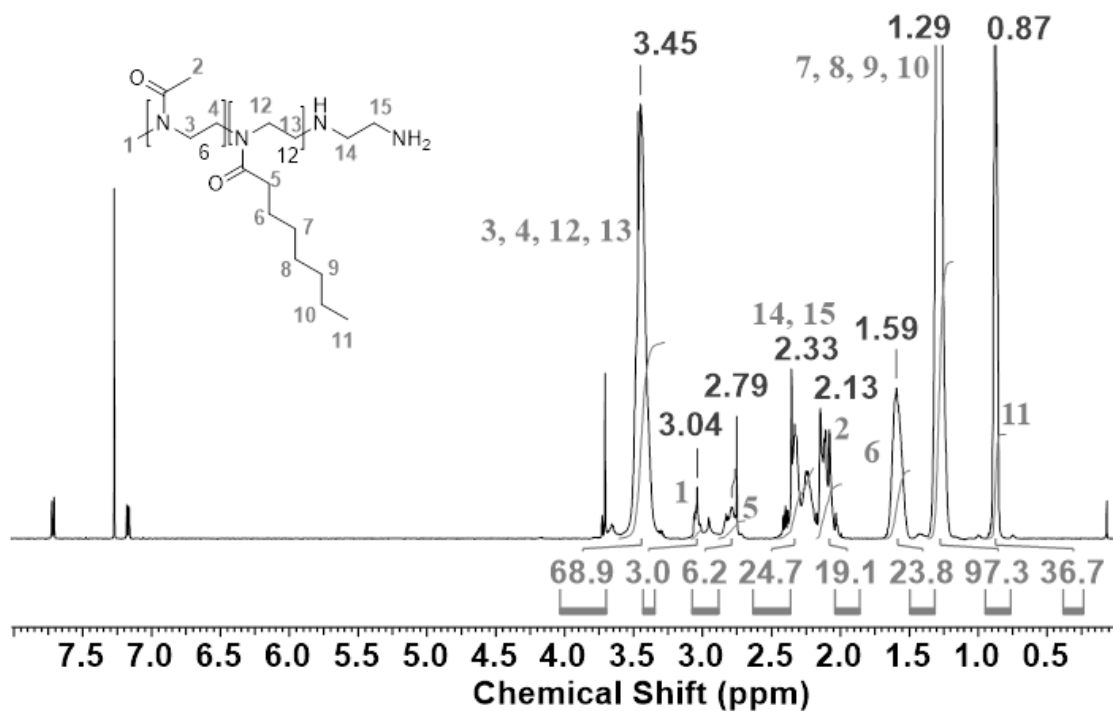


Abbildung 144: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO_x₆-PHepO_x₁₂-EDA.

Anhang

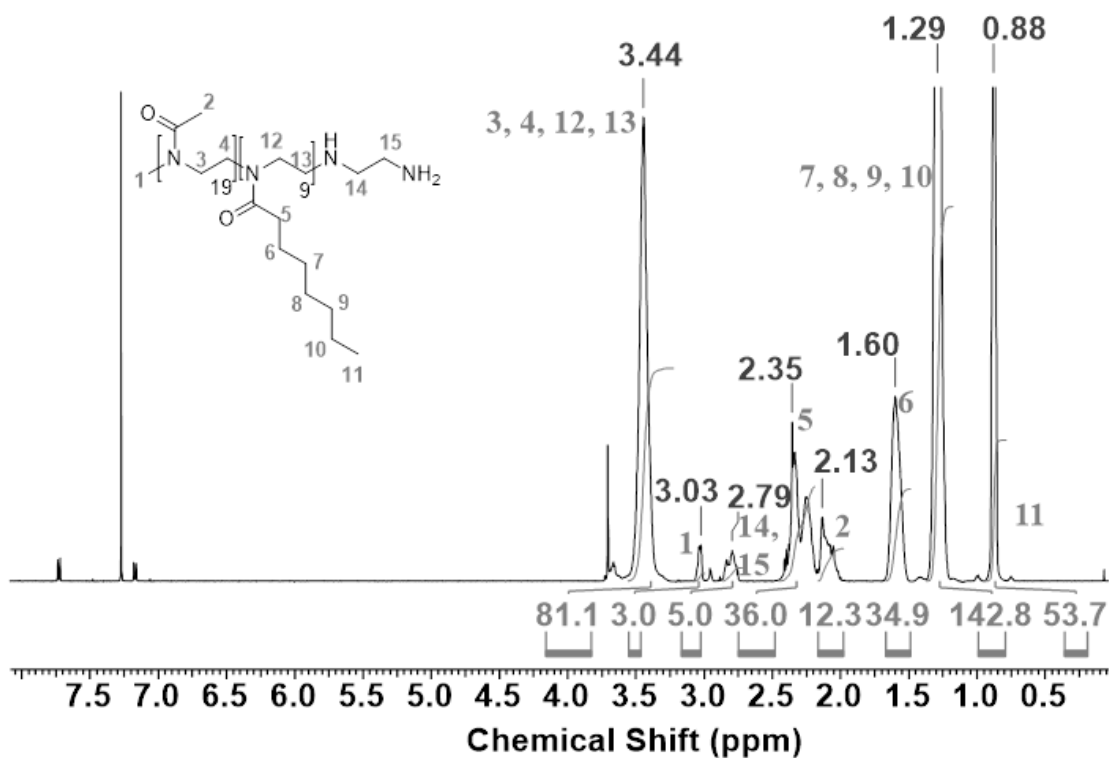


Abbildung 145: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO₄-PHepO₁₈-EDA.

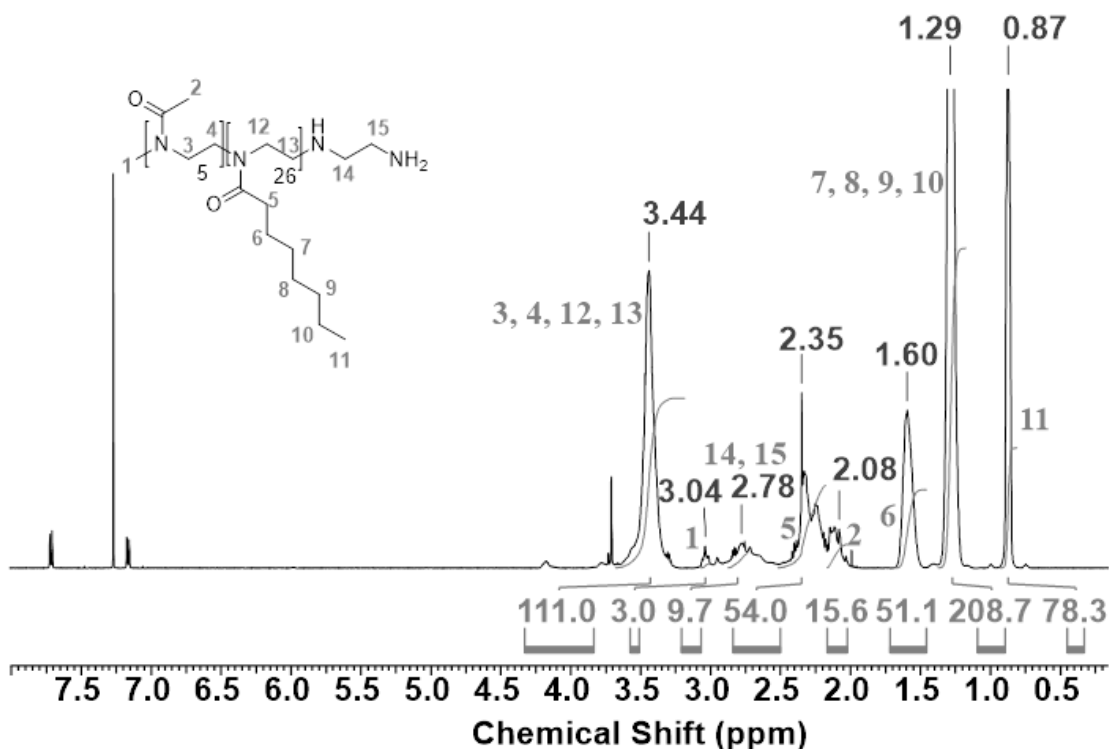


Abbildung 146: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PMeO₅-PHepO₂₆-EDA.

Anhang

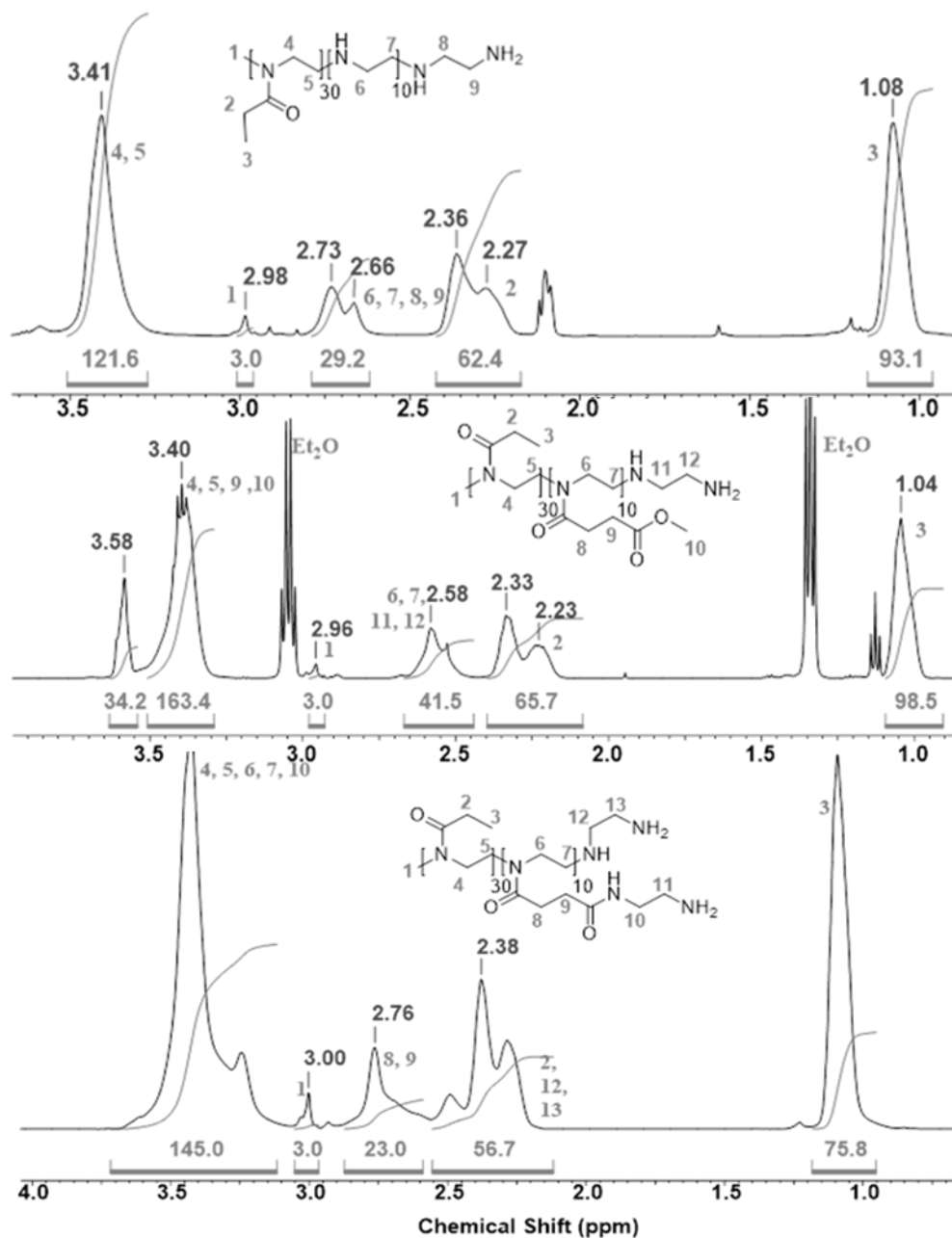


Abbildung 147: $^1\text{H-NMR}$ Spektren der einzelnen Zwischenstufen bei der Synthese von Me-PeTEx-PsucEDAox-EDA. Die Zwischenstufen sind Me-PeTEx-PEI-EDA (Oben), Me-PeTEx-PMestOx-EDA (Mitte), Me-PeTEx-PsucEDAox-EDA (Unten) in CDCl_3 (7.27 ppm).

Anhang

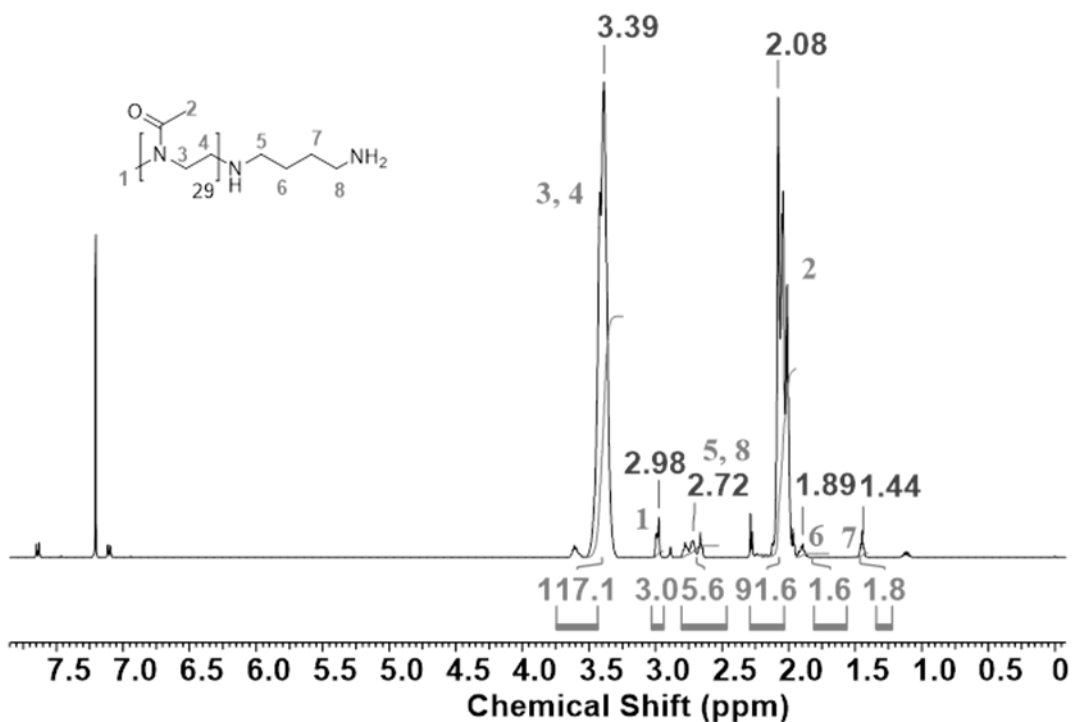


Abbildung 148: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMeO_{x29}-BDA.

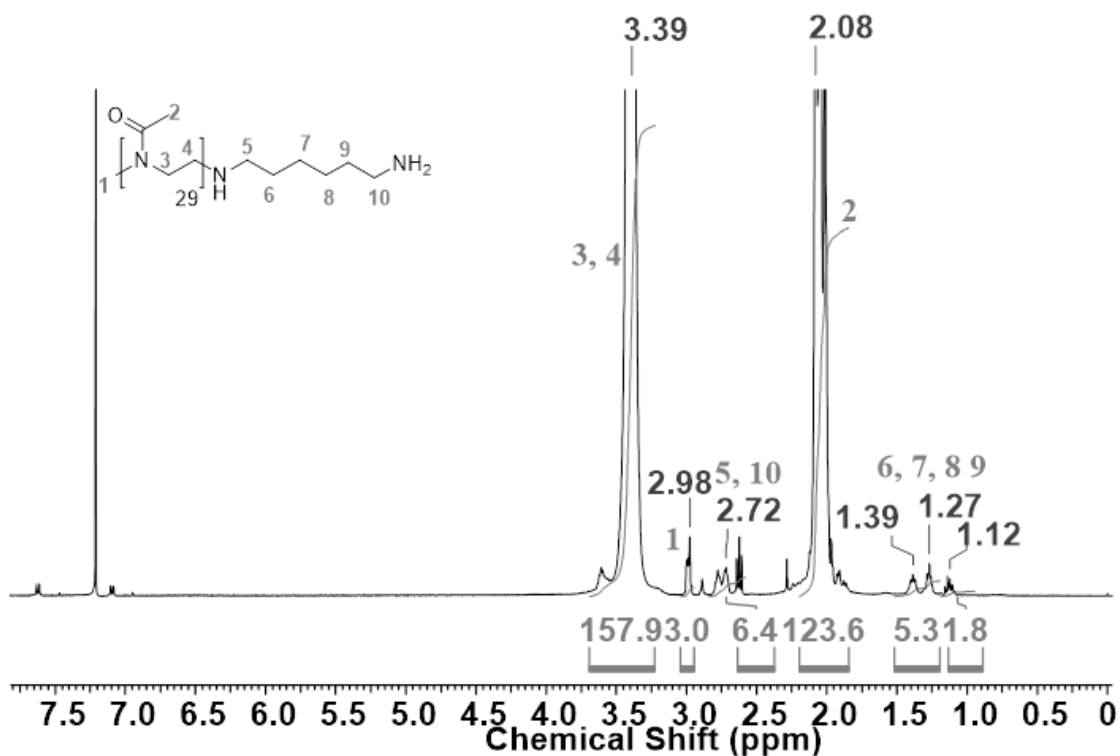


Abbildung 149: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMeO_{x39}-HDA.

Anhang

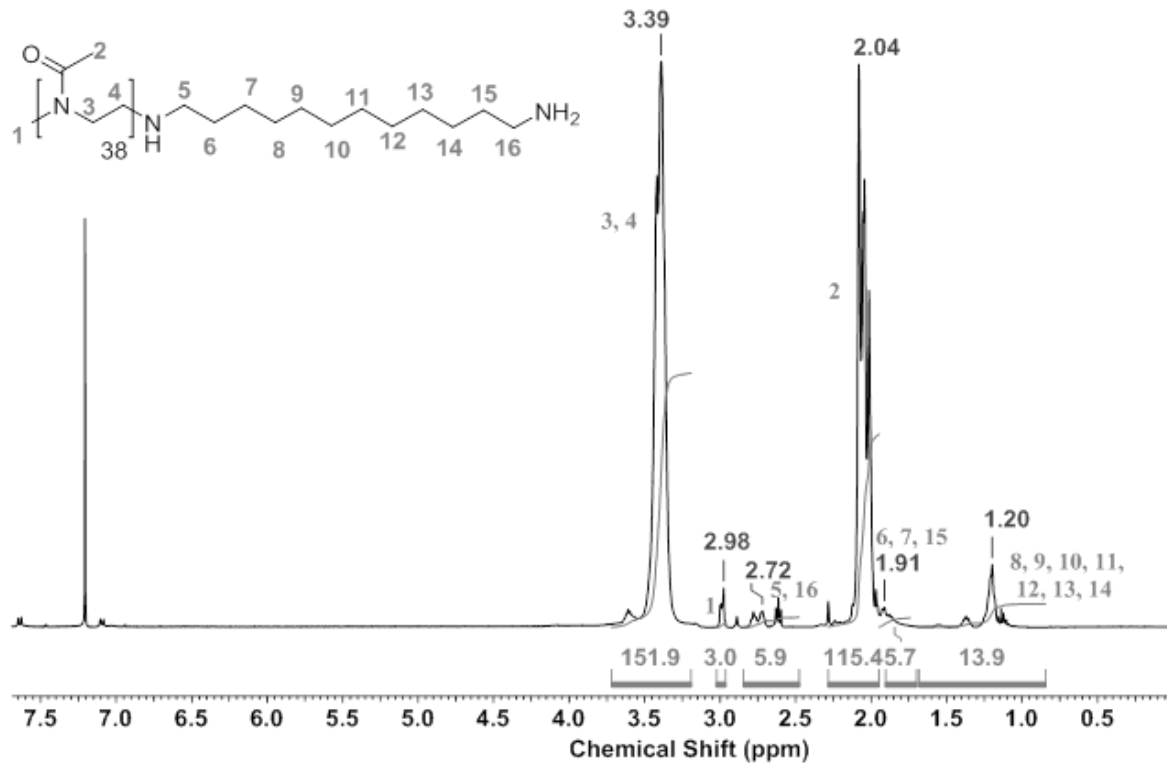


Abbildung 150: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMEO_{x38}-DODA.

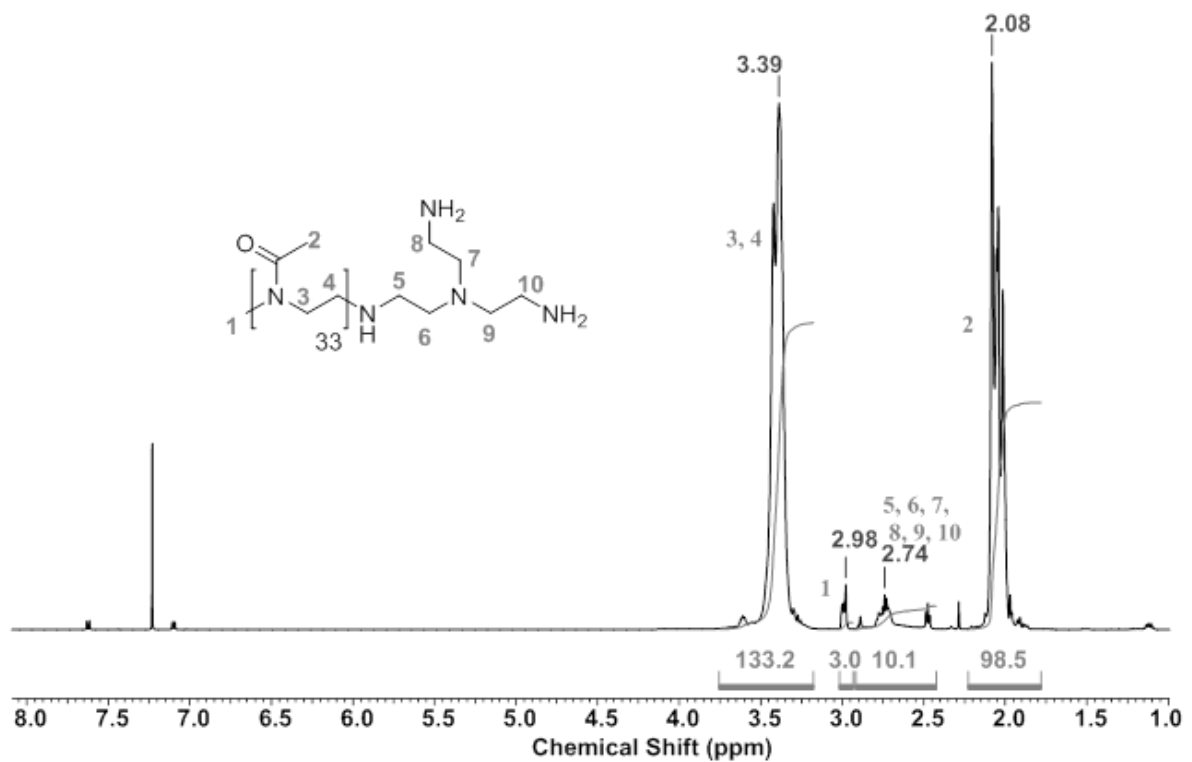


Abbildung 151: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMEO_{x33}-TREN.

Anhang

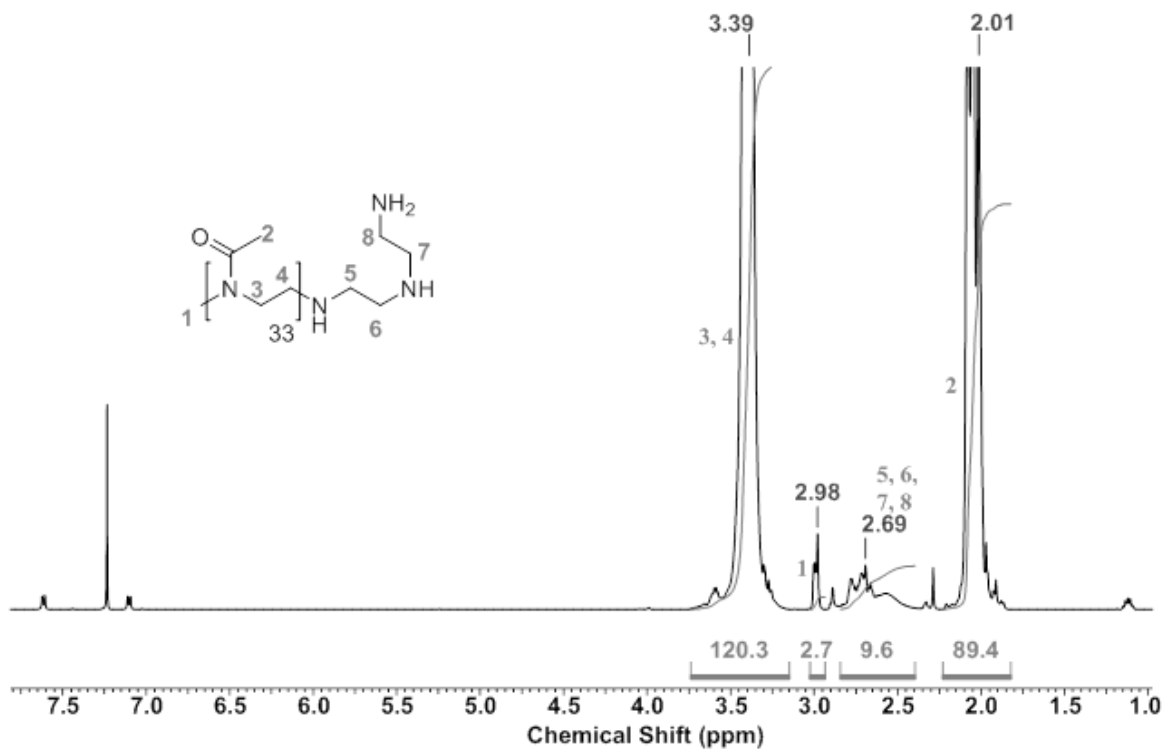


Abbildung 152: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMeO_{x33}-TET.

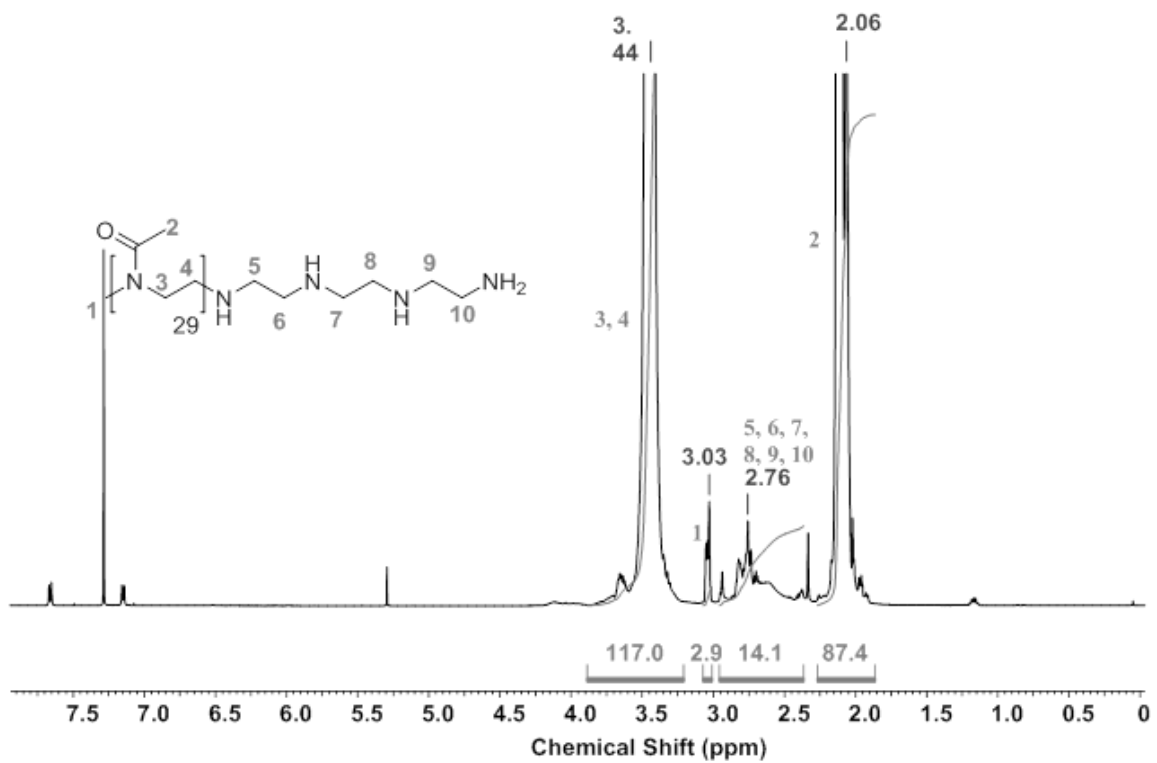


Abbildung 153: ¹H-NMR Spektrum von Me-PMeO_{x33}-TEP.

Anhang

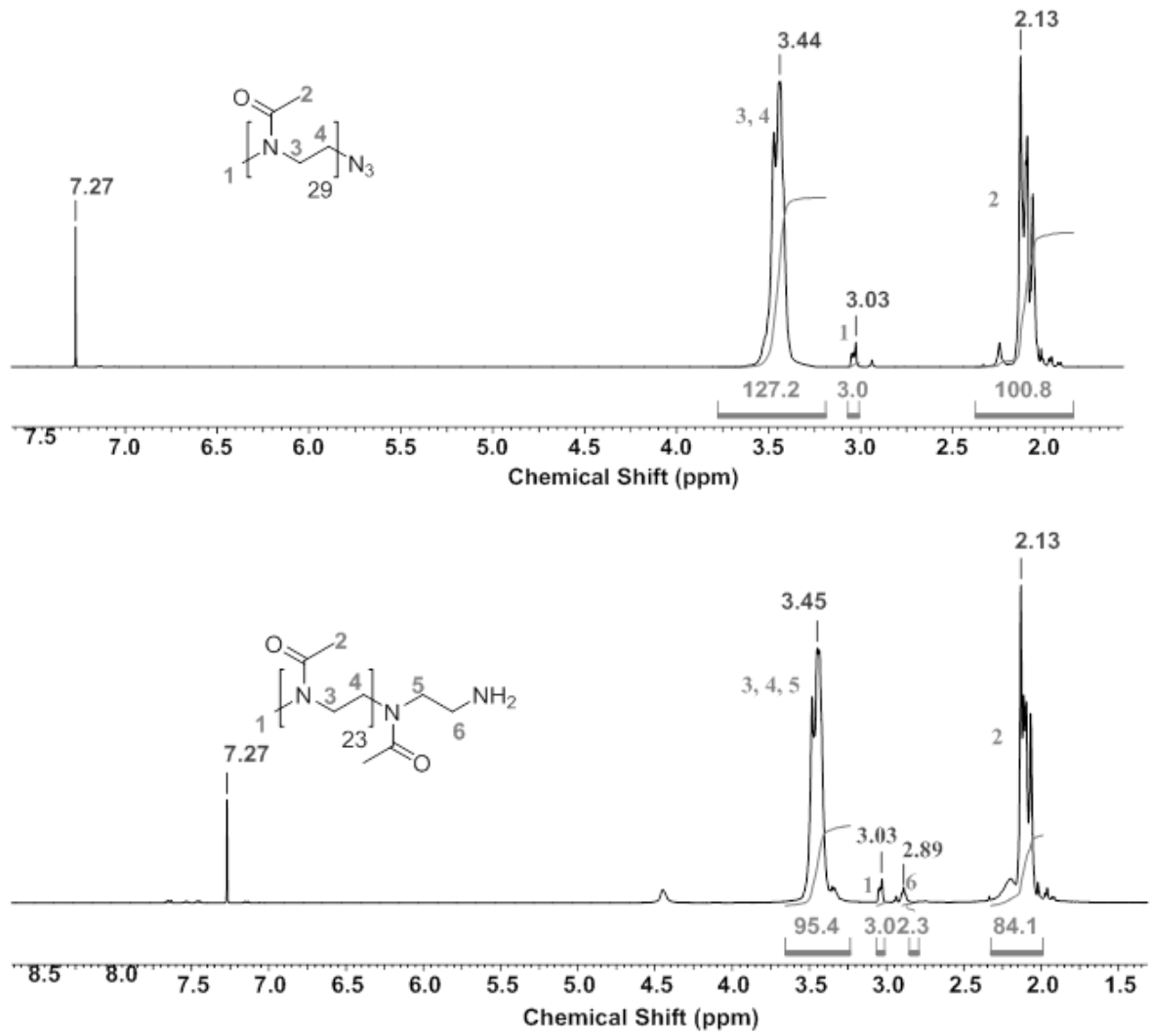


Abbildung 154: ¹H-NMR-Spektren von Me-PMeO_{x29}-N₃ (oben) und Me-PMeO_{x23}-NH₂ (unten).

Anhang

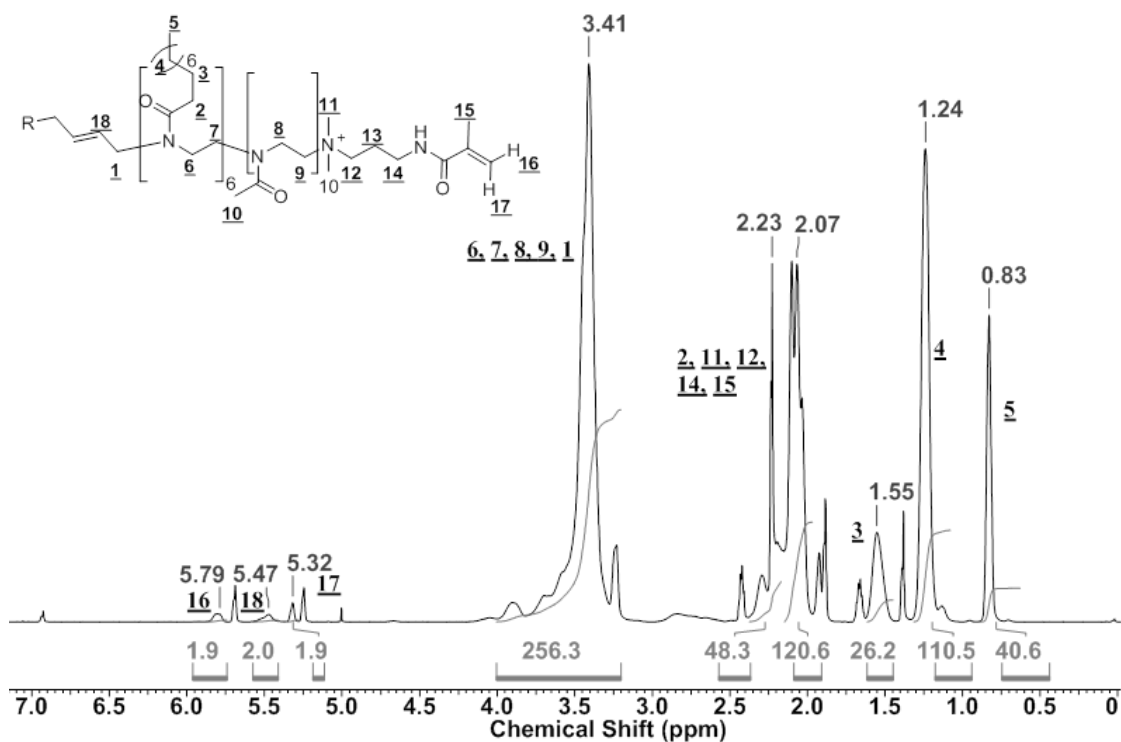


Abbildung 155: ^1H -NMR-Spektrum von MHM1.

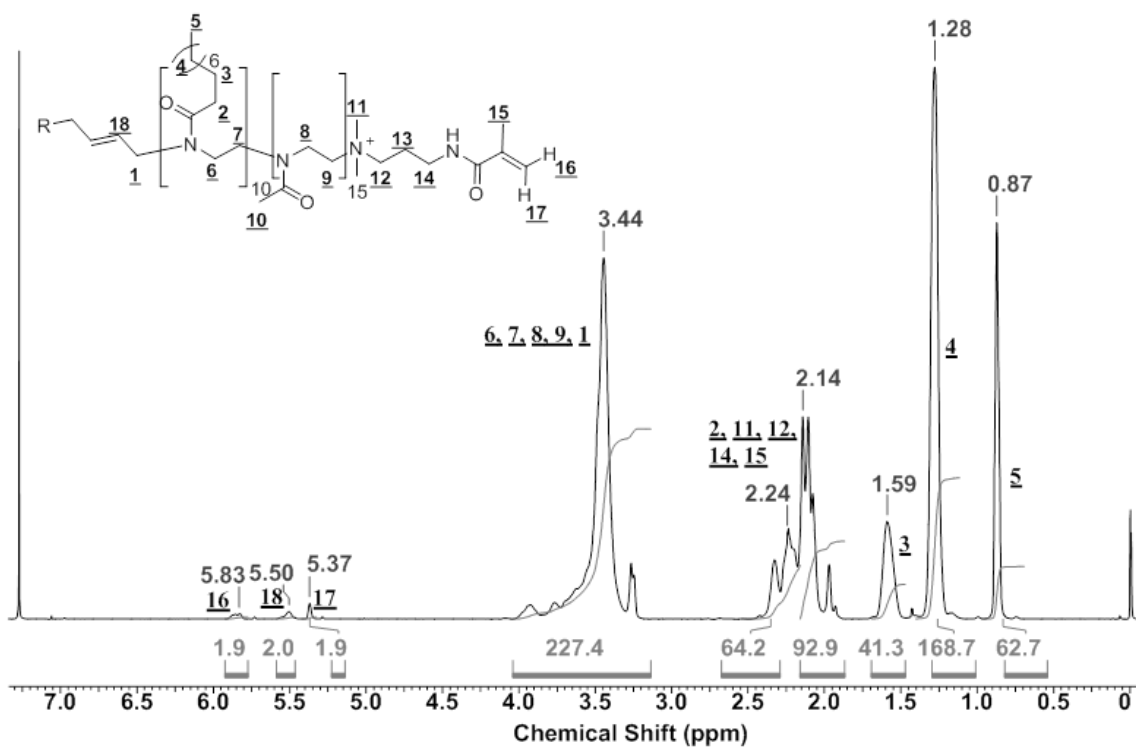


Abbildung 156: ^1H -NMR-Spektrum von MHM2.

Anhang

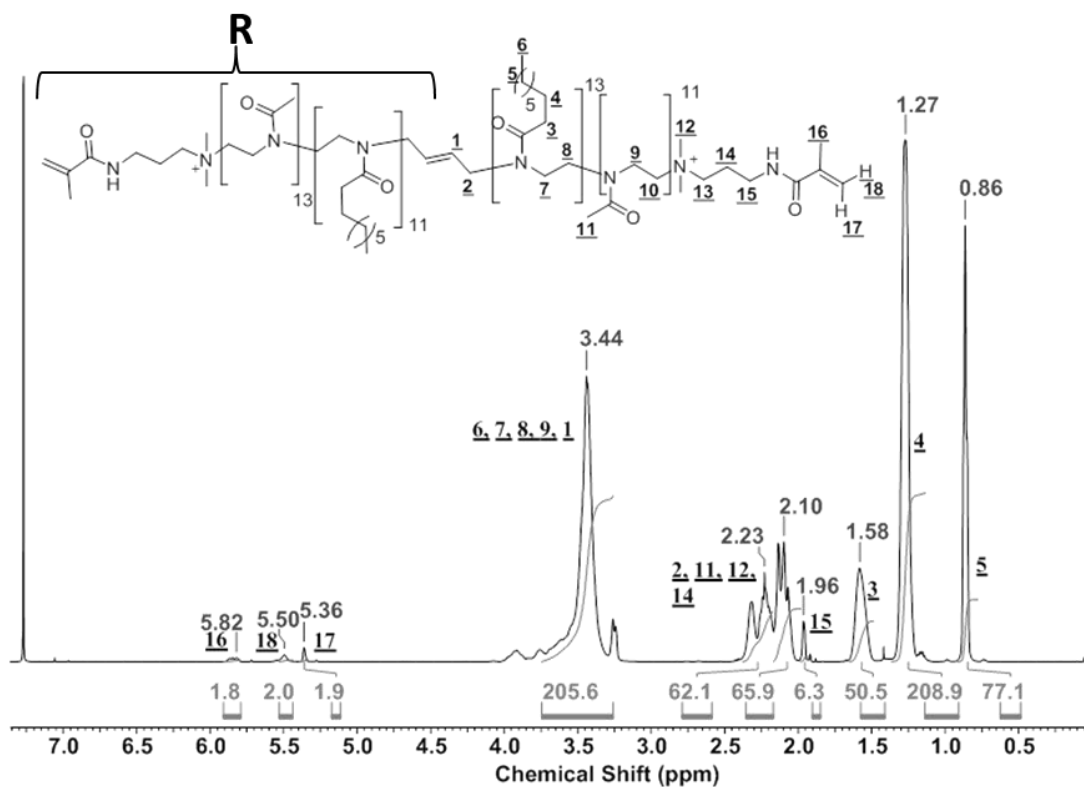


Abbildung 157: ¹H-NMR-Spektrum von MHM3.

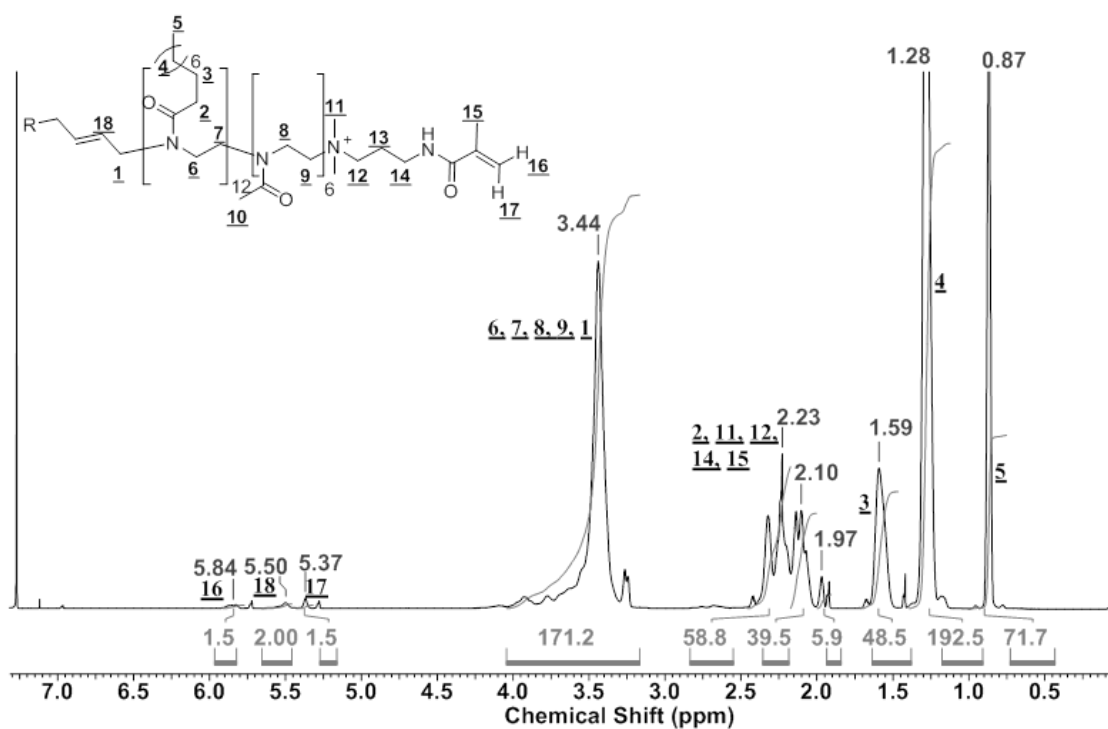


Abbildung 158: ¹H-NMR-Spektrum von MHM4.

Anhang

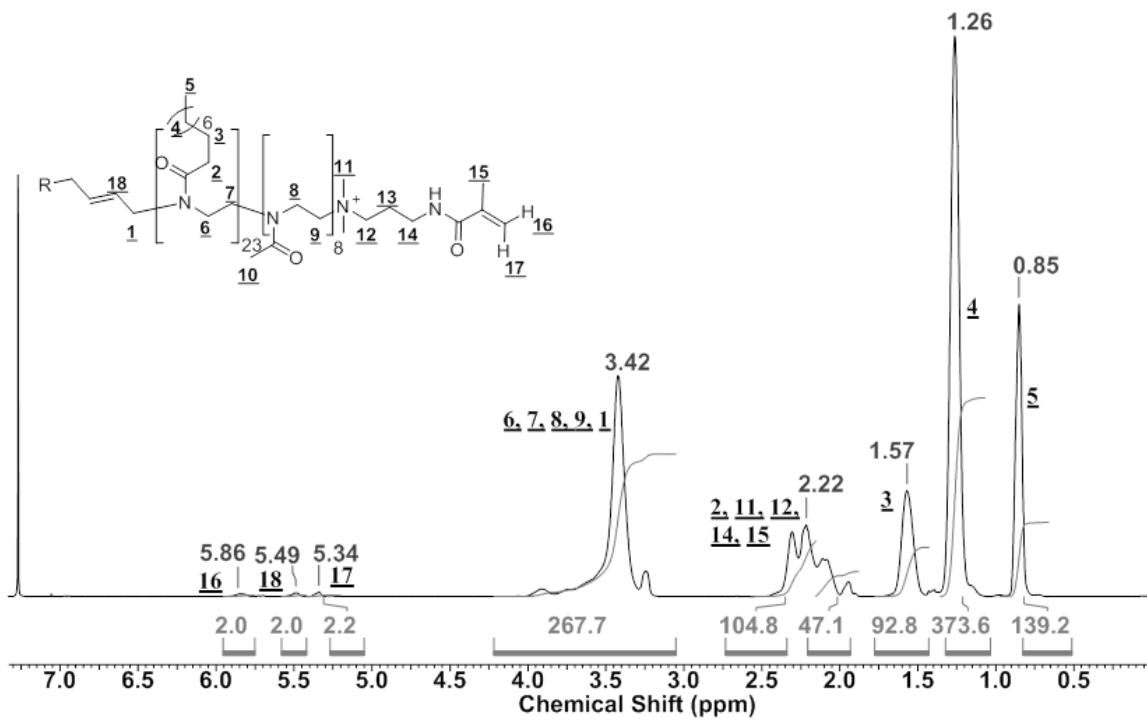


Abbildung 159: ^1H -NMR-Spektrum von MH5.

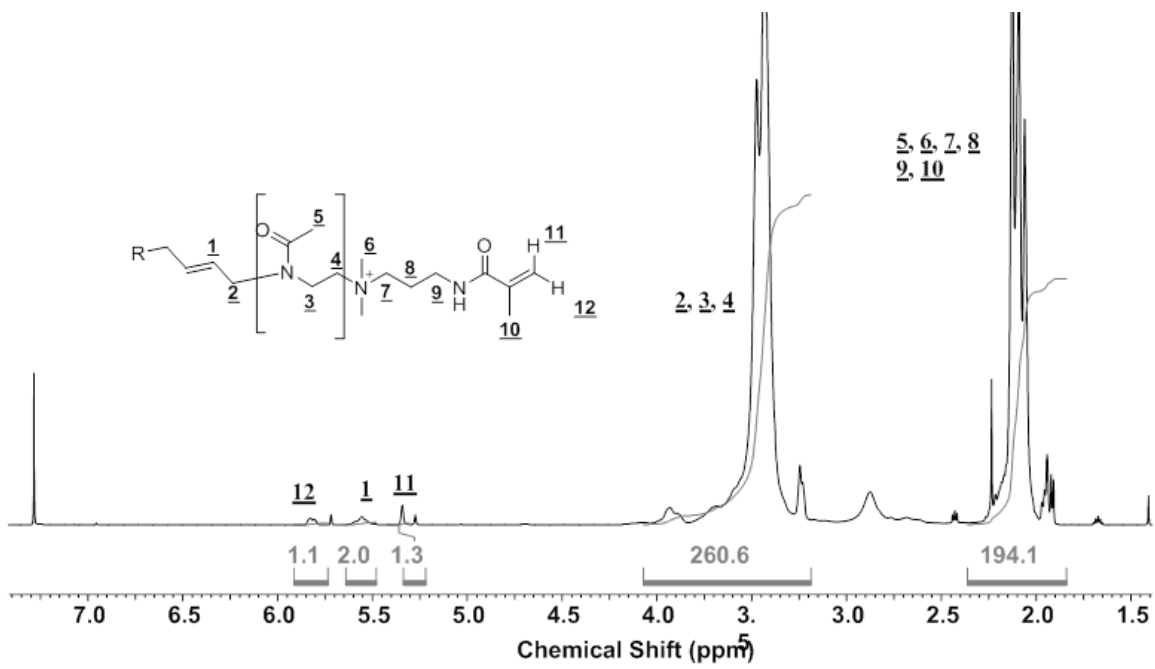


Abbildung 160: ^1H -NMR-Spektrum von M.

Anhang

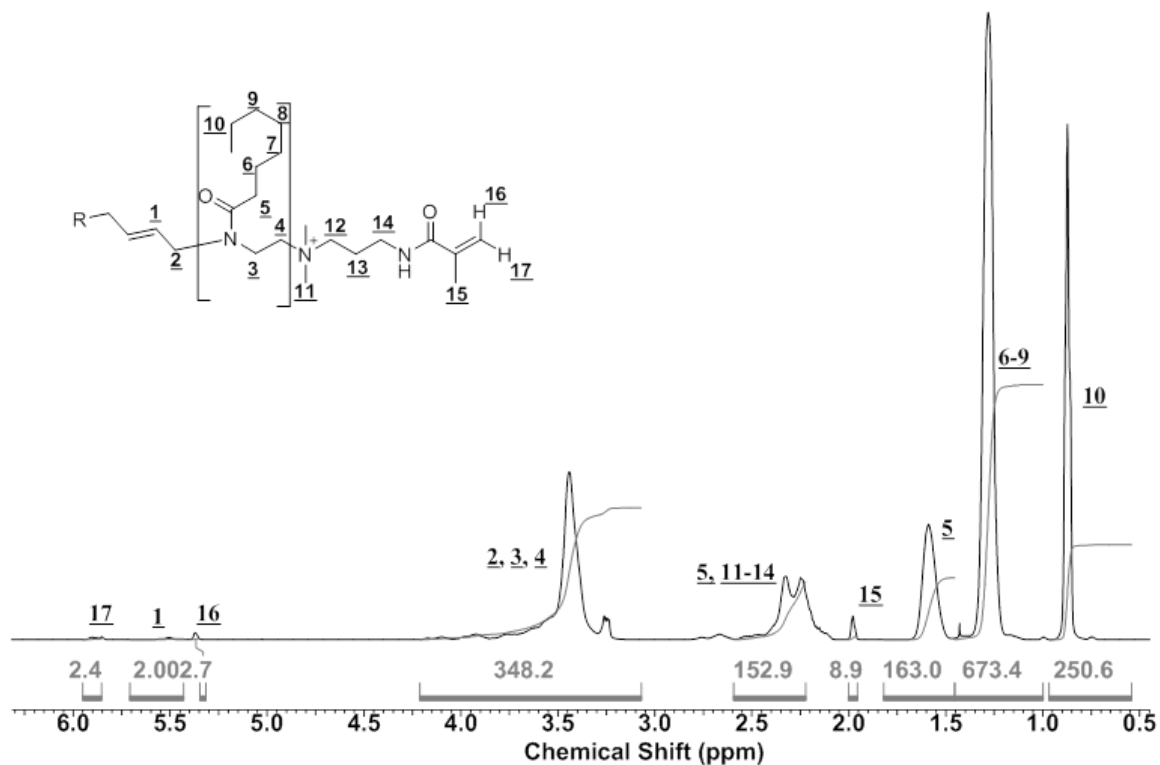


Abbildung 161: ^1H -NMR-Spektrum von H.

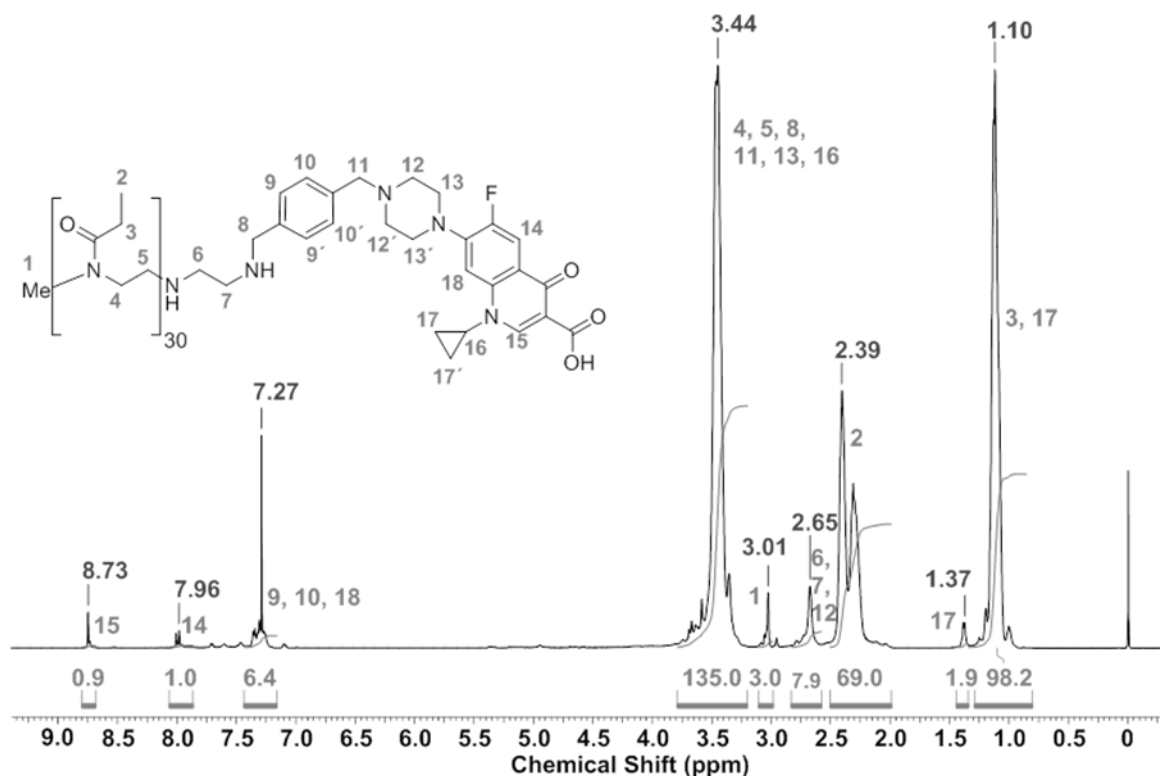


Abbildung 162: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₃₀-EDA-xCIP.

Anhang

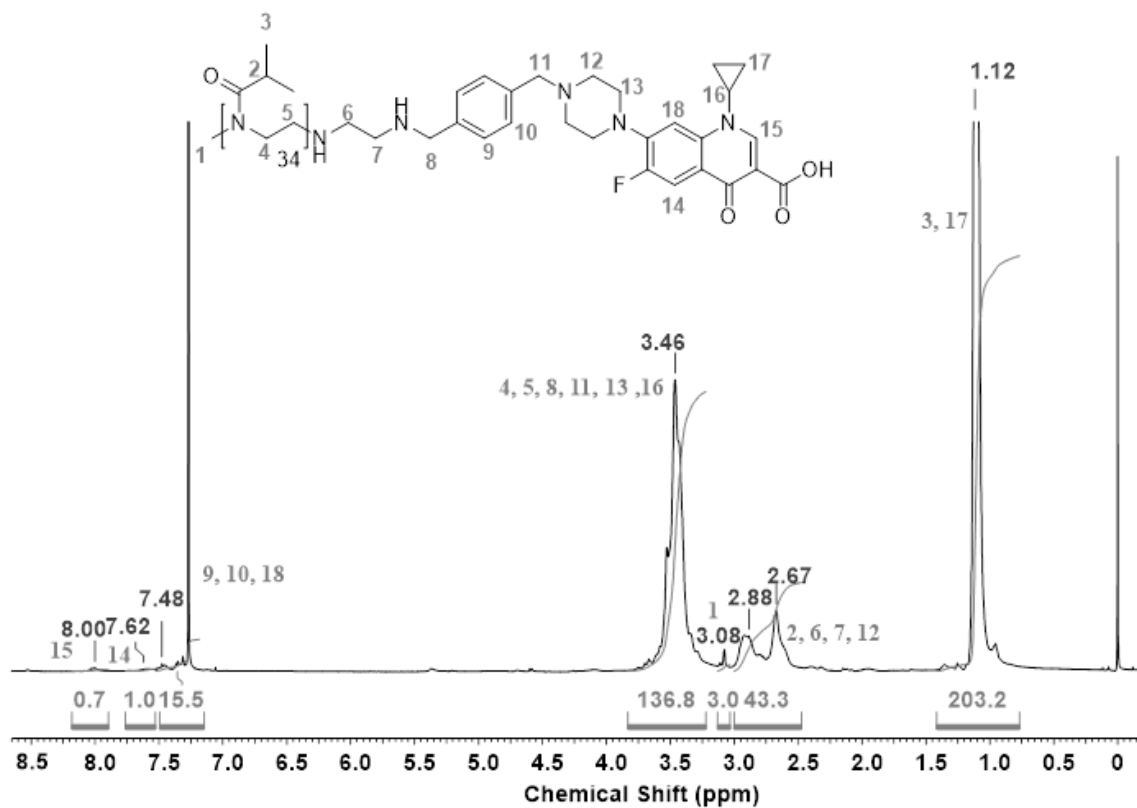


Abbildung 163: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PiPrOx₃₄-EDA-xCIP.

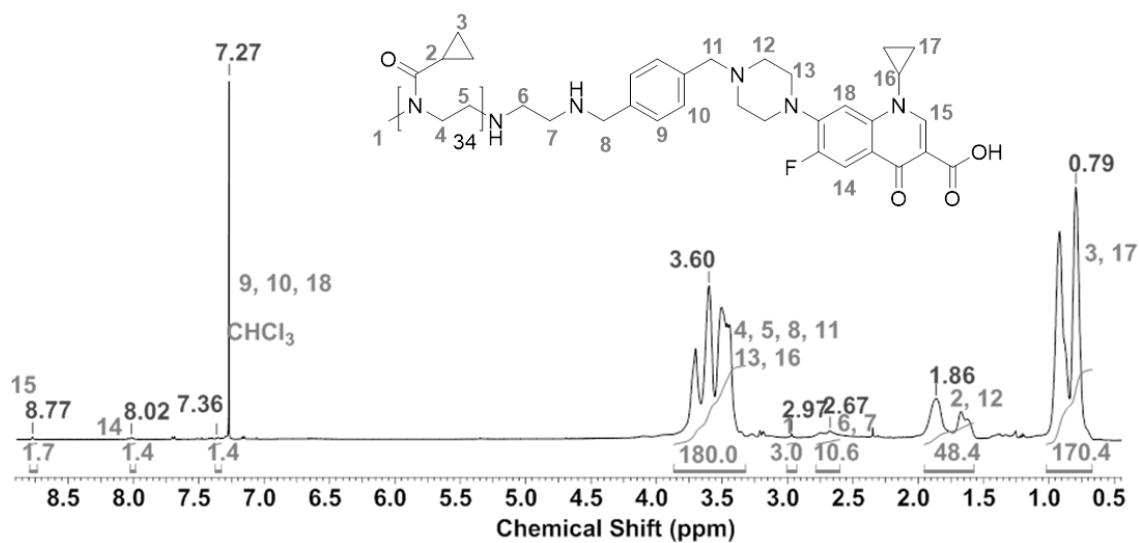


Abbildung 164: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PcPrOx₄₅-EDA-xCIP.

Anhang

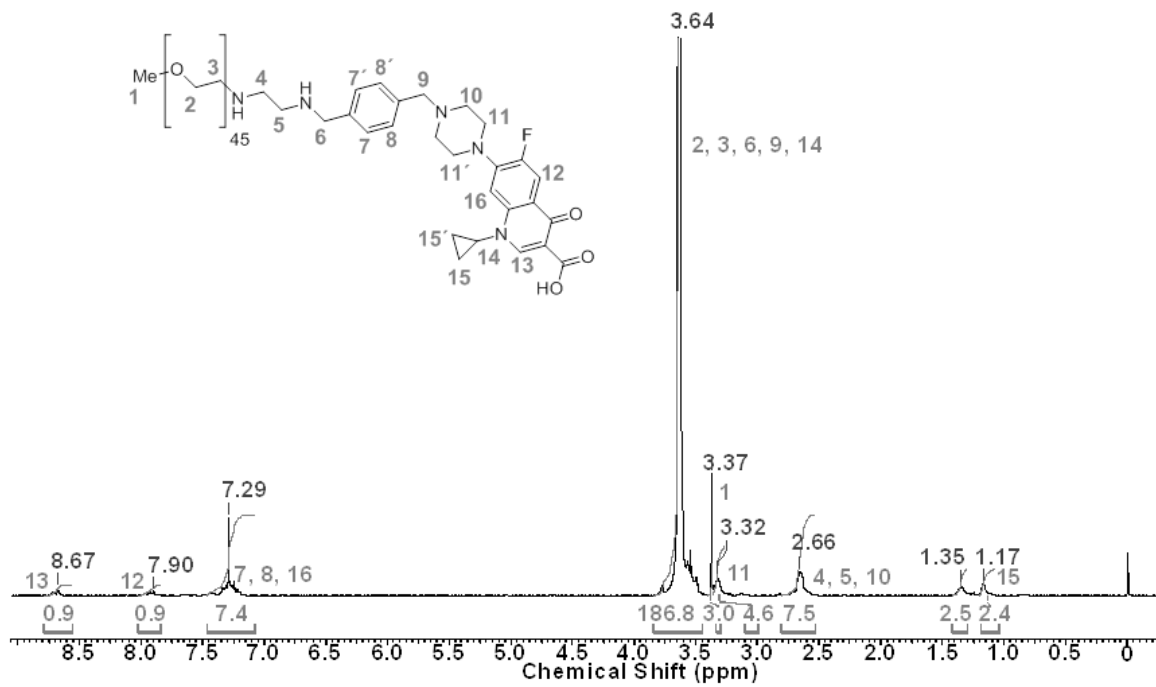


Abbildung 165: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PEG₄₅-EDA-xCIP.

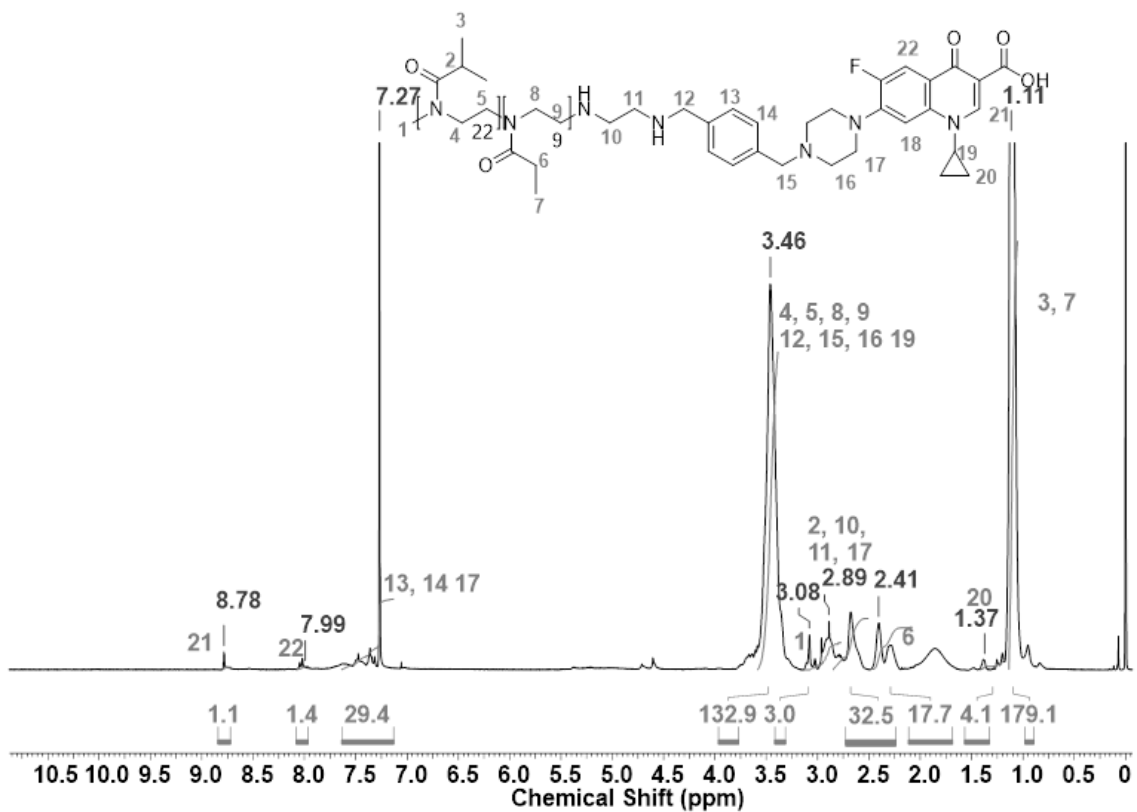


Abbildung 166: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PiPrOx₂₂-PEtOx₉-EDA-xCIP.

Anhang

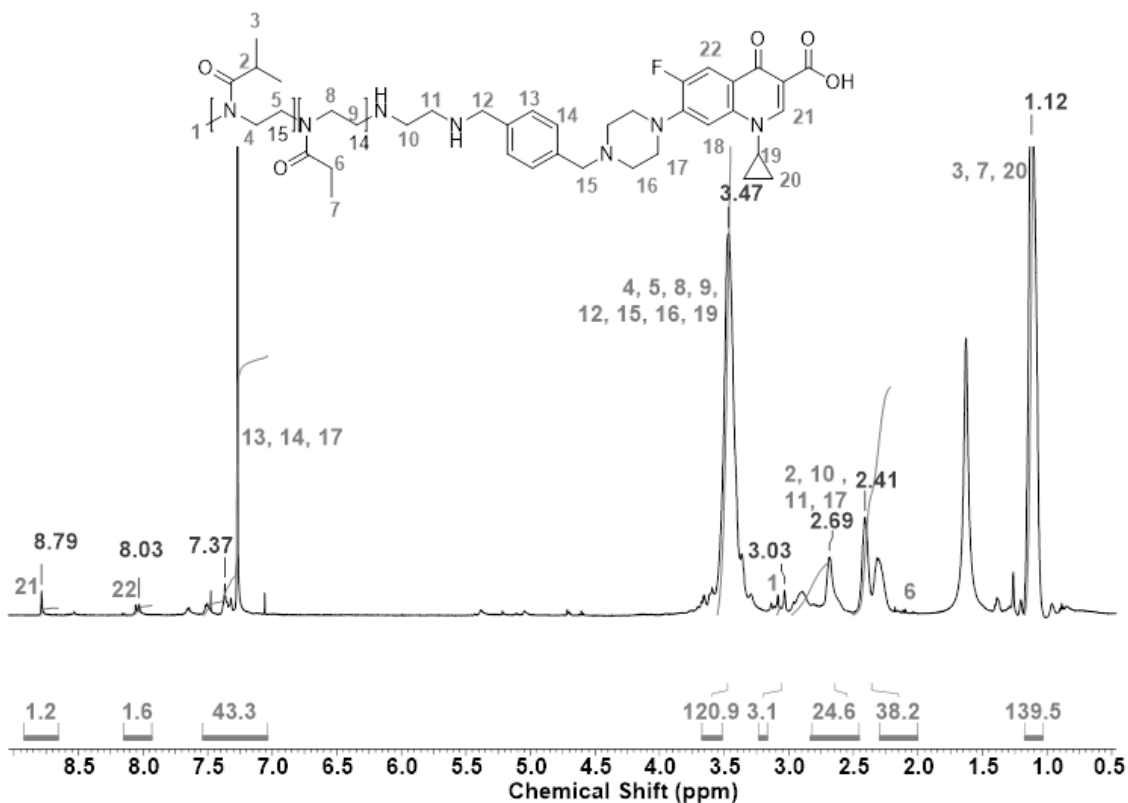


Abbildung 167: ^1H -NMR-Spektrum von Me-PiPrOx₁₅-PEtOx₁₄-EDA-xCIP.

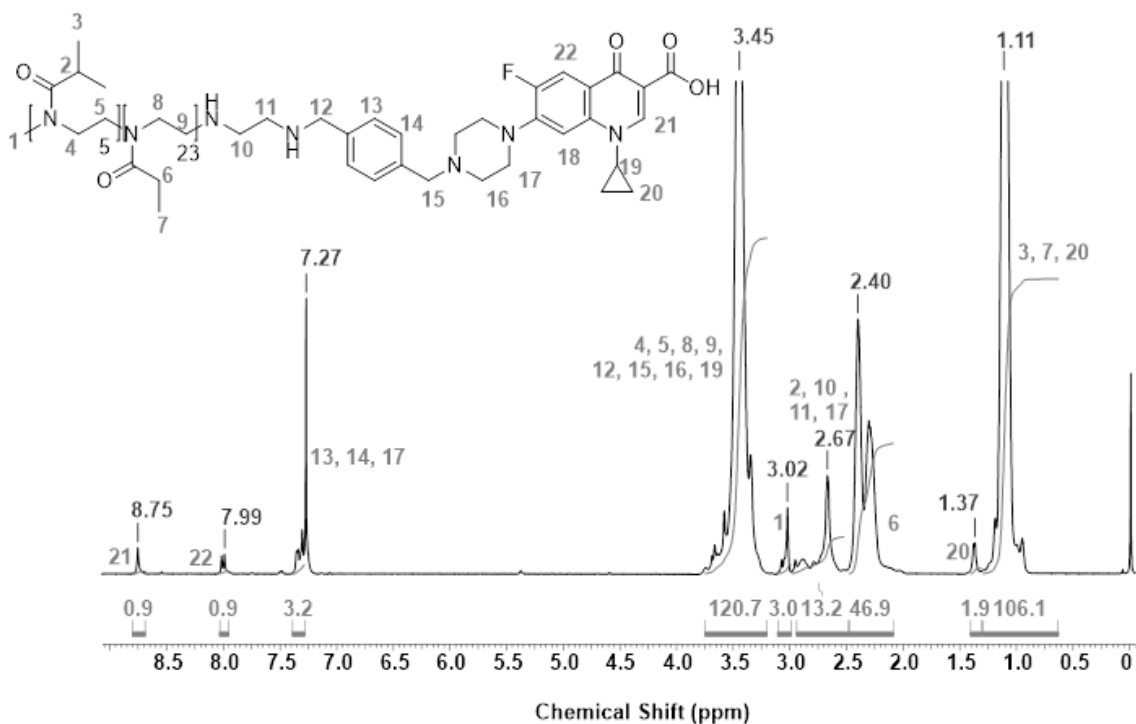


Abbildung 168: ^1H -NMR-Spektrum von Me-PiPrOx₅-PEtOx₂₃-EDA-xCIP.

Anhang

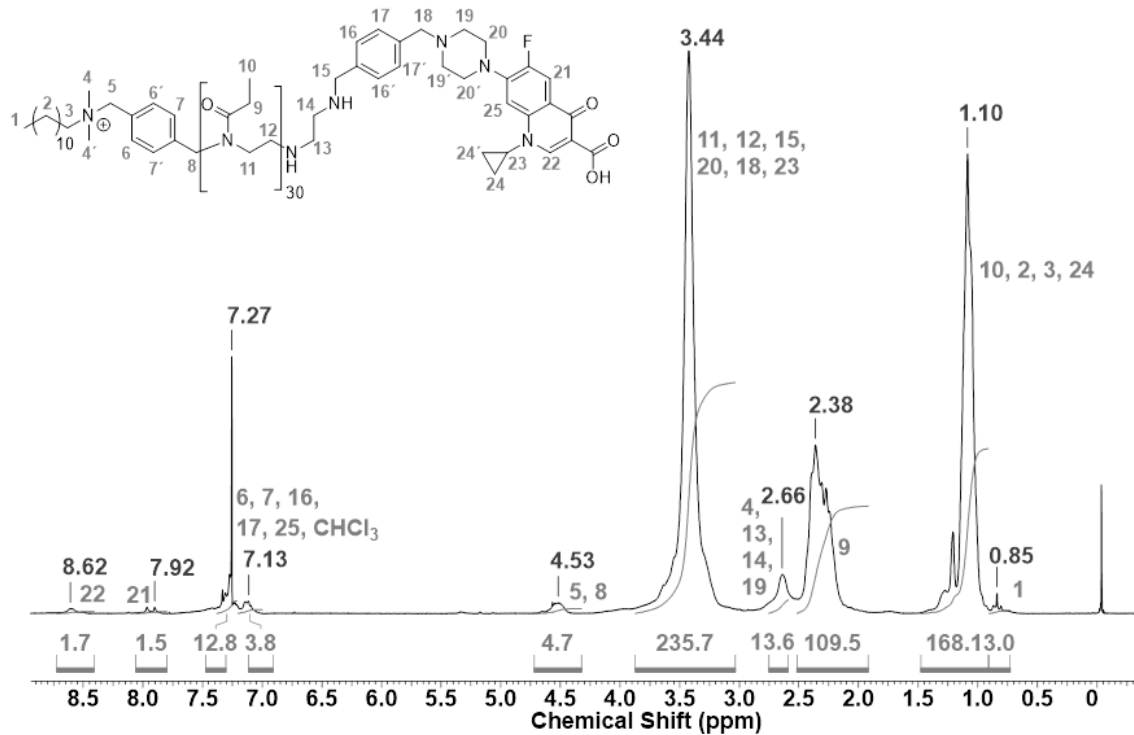


Abbildung 169: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DDA-X-PEtOx₅₈-EDA-xCIP.

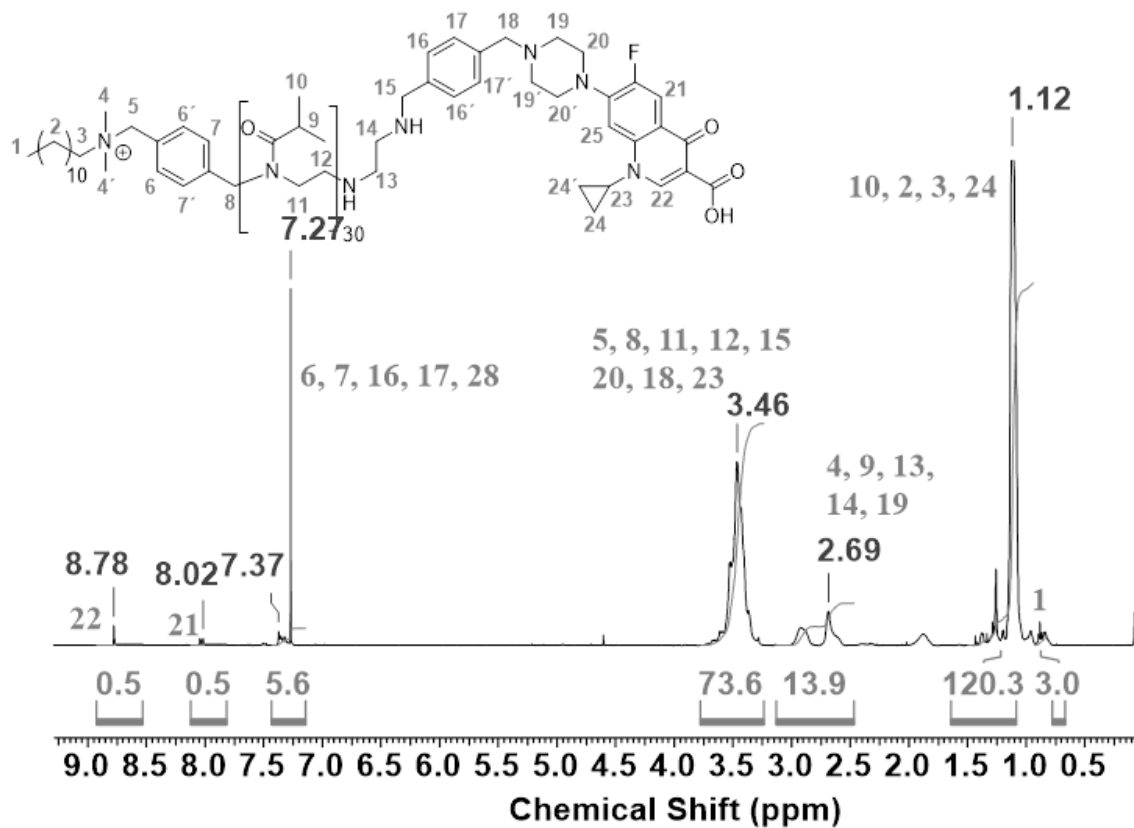


Abbildung 170: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DDA-X-PiPrOx₁₈-EDA-xCIP.

Anhang

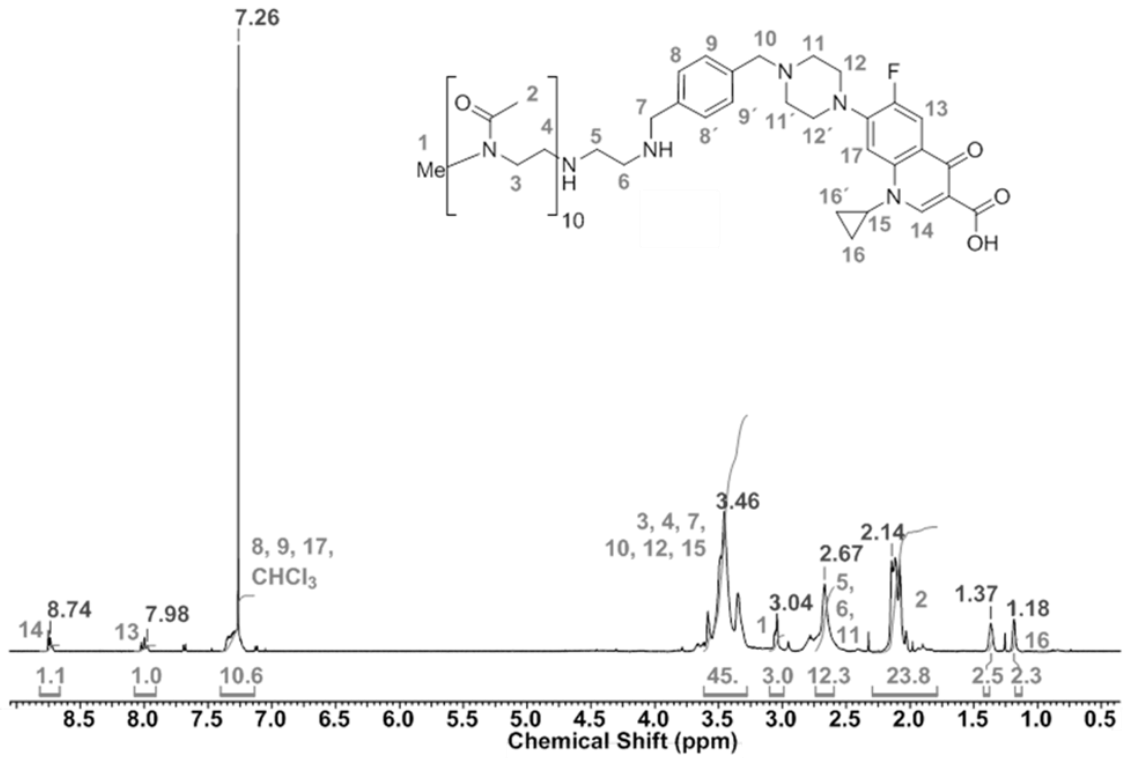


Abbildung 171: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeO_{x10}-EDA.xCIP.

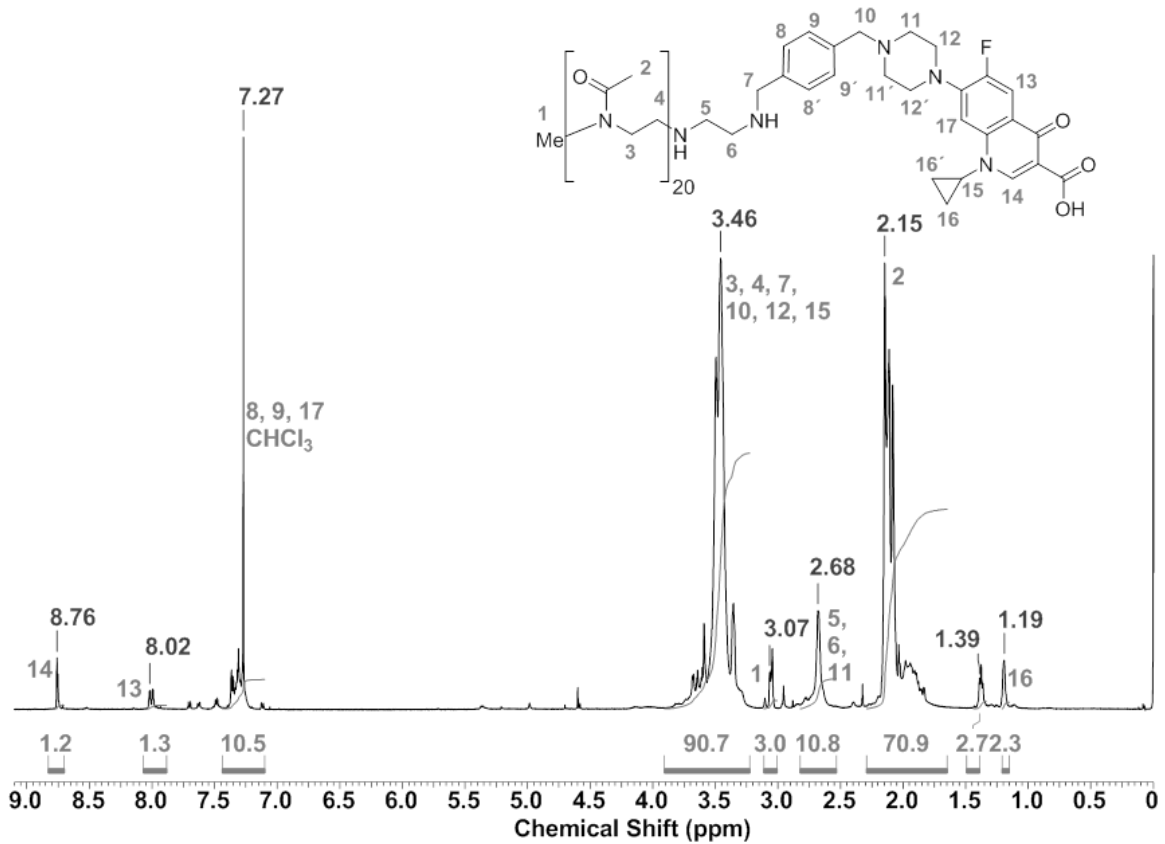


Abbildung 172: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeO_{x20}-EDA.xCIP.

Anhang

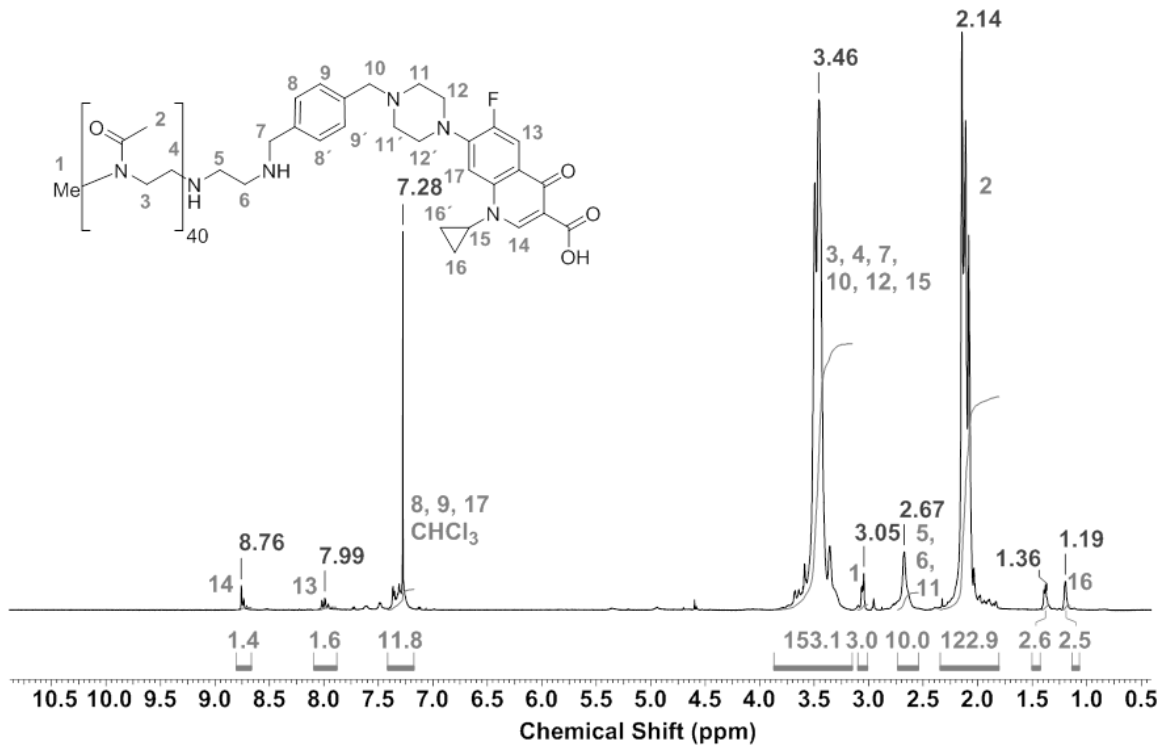


Abbildung 173: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Me-PMeOx₄₀-EDA.xCIP.

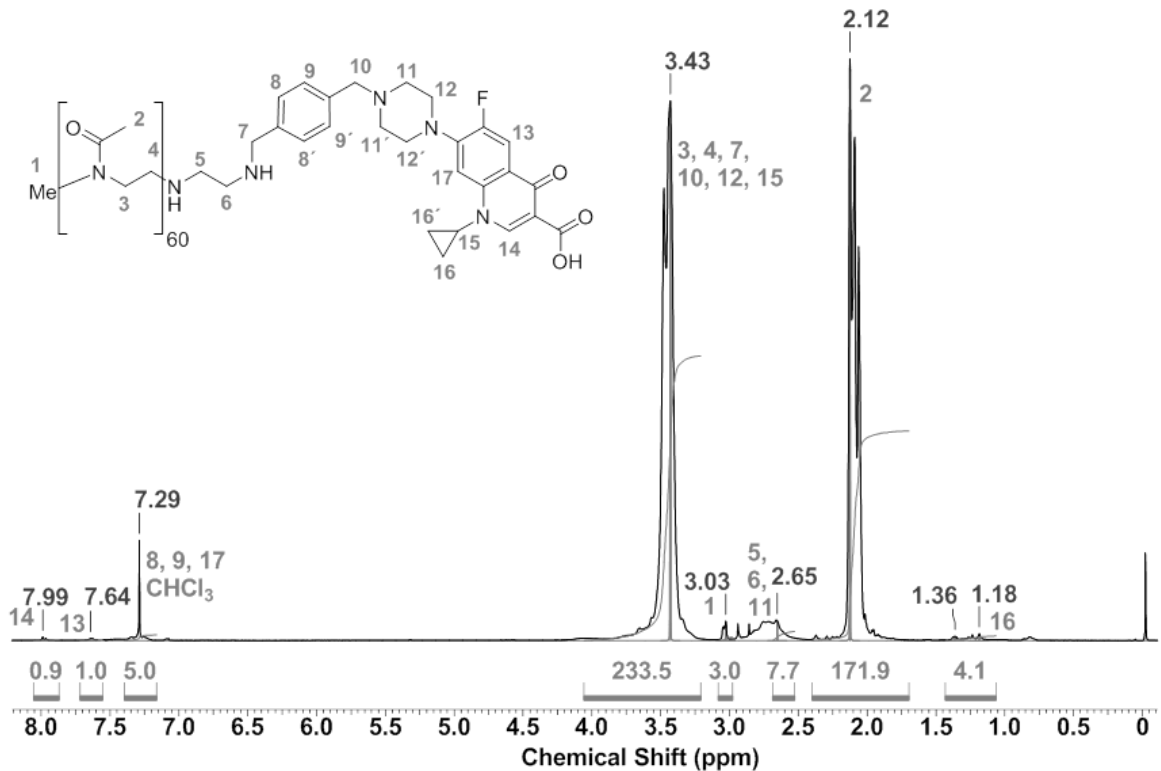


Abbildung 174: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Me-PMeOx₆₀-EDA.xCIP.

Anhang

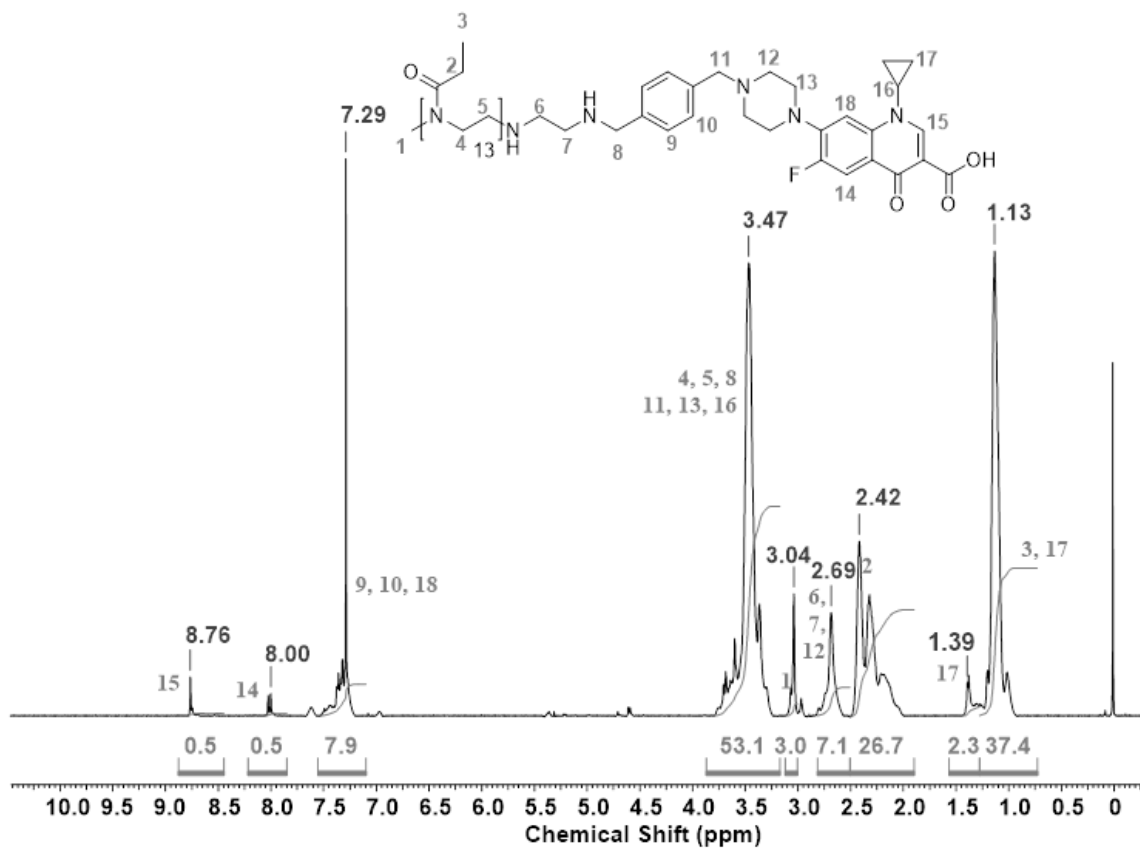


Abbildung 175: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₁₃-EDA-xCIP.

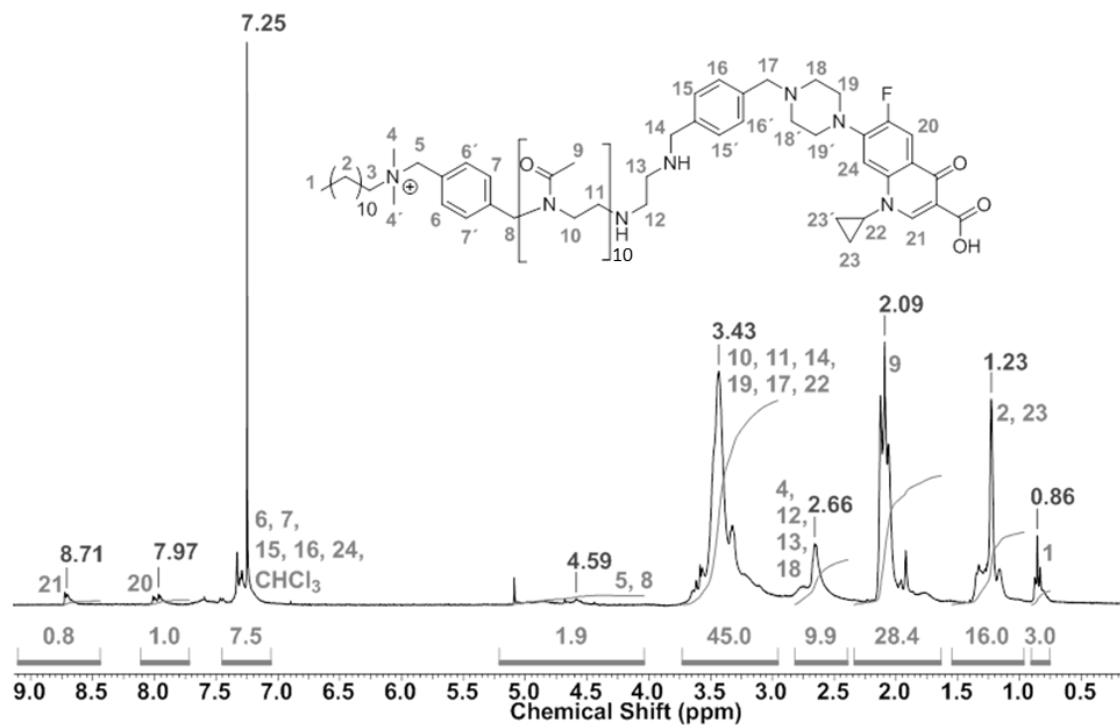


Abbildung 176: ¹H-NMR-Spektrum vom DDA-X-PMeOx₁₁-EDA-xCIP.

Anhang

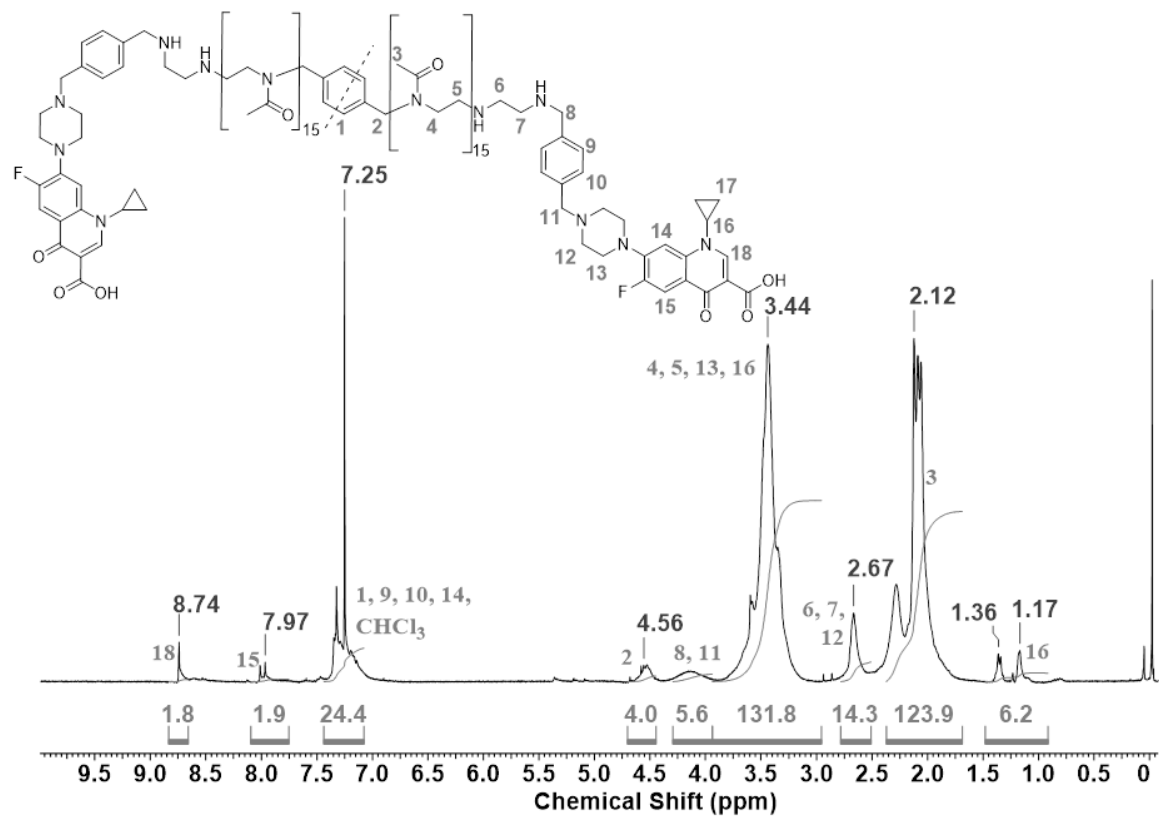


Abbildung 177: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des beidseitig funktionalisierten xCIP-Konjugats CIPx-EDA-PMeOx-DBB-PMeOx-EDA-xCIP

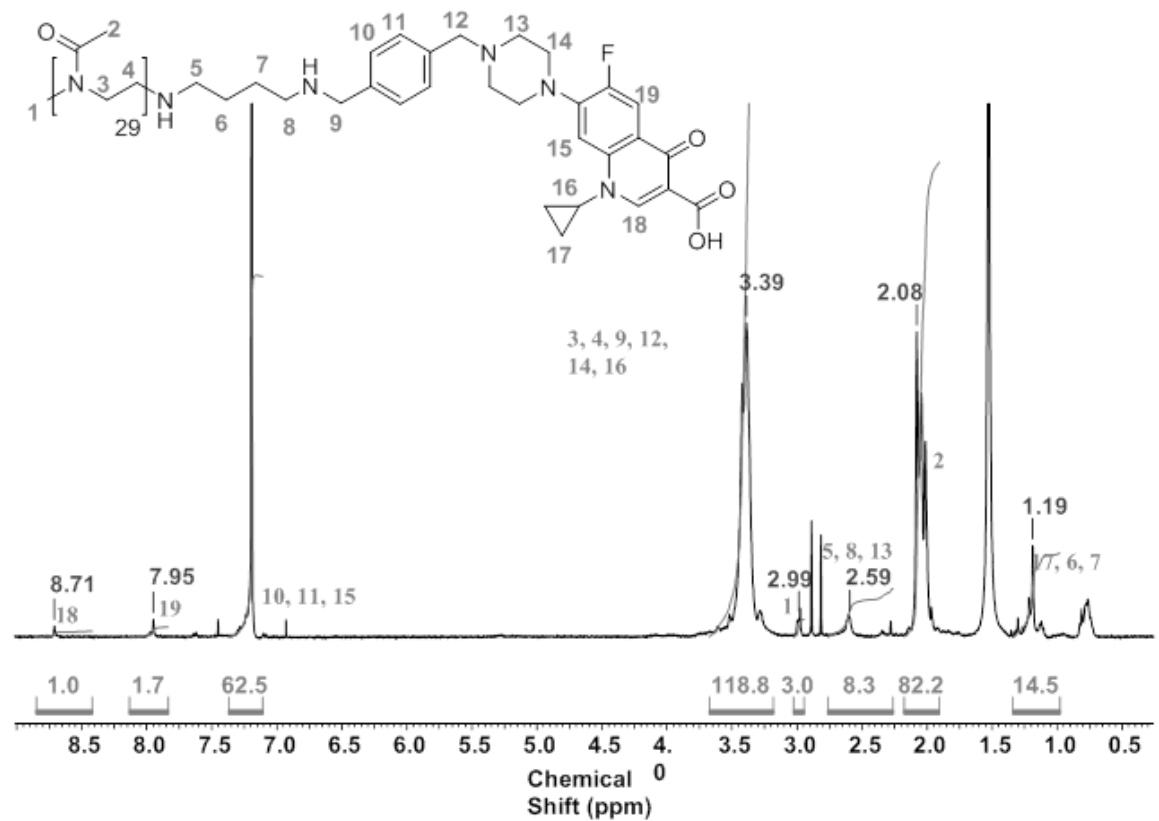


Abbildung 178: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Me-PMeOx₂₉-BDA-xCIP.

Anhang

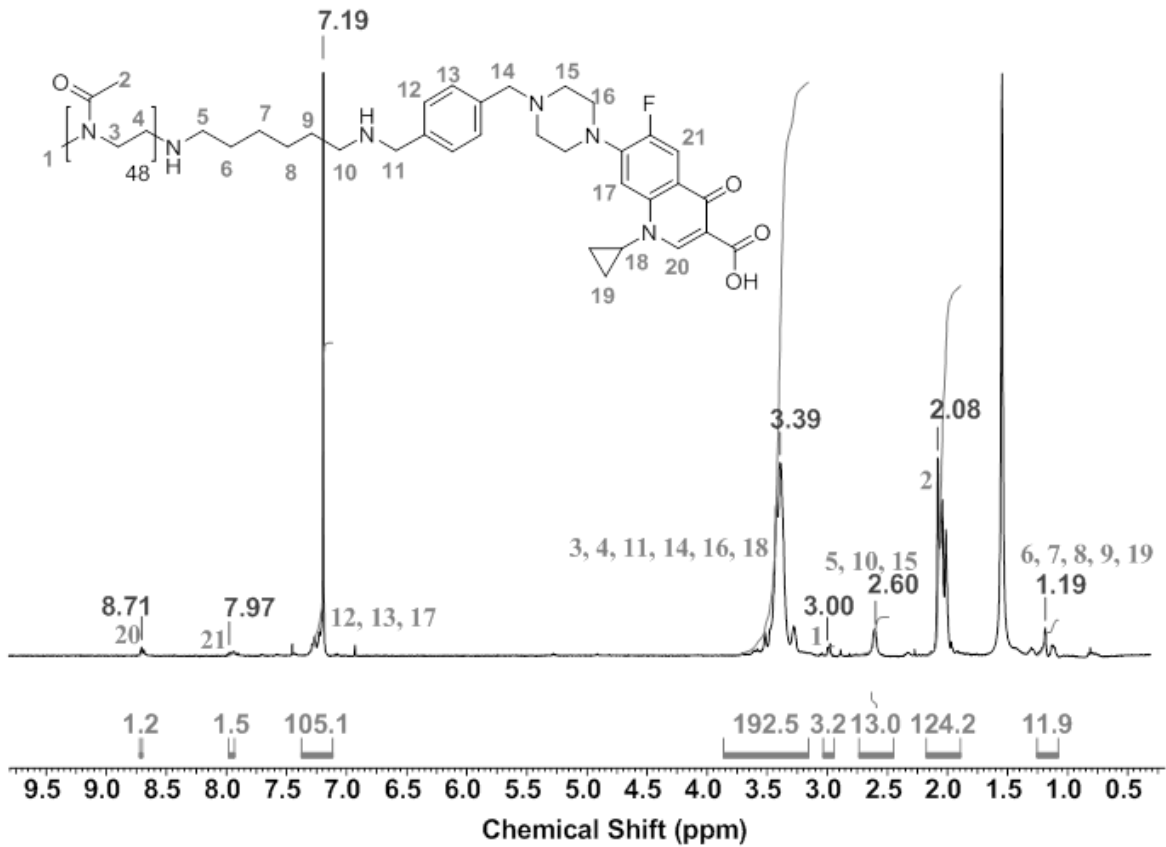


Abbildung 179: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₄₈-HDA-xCIP.

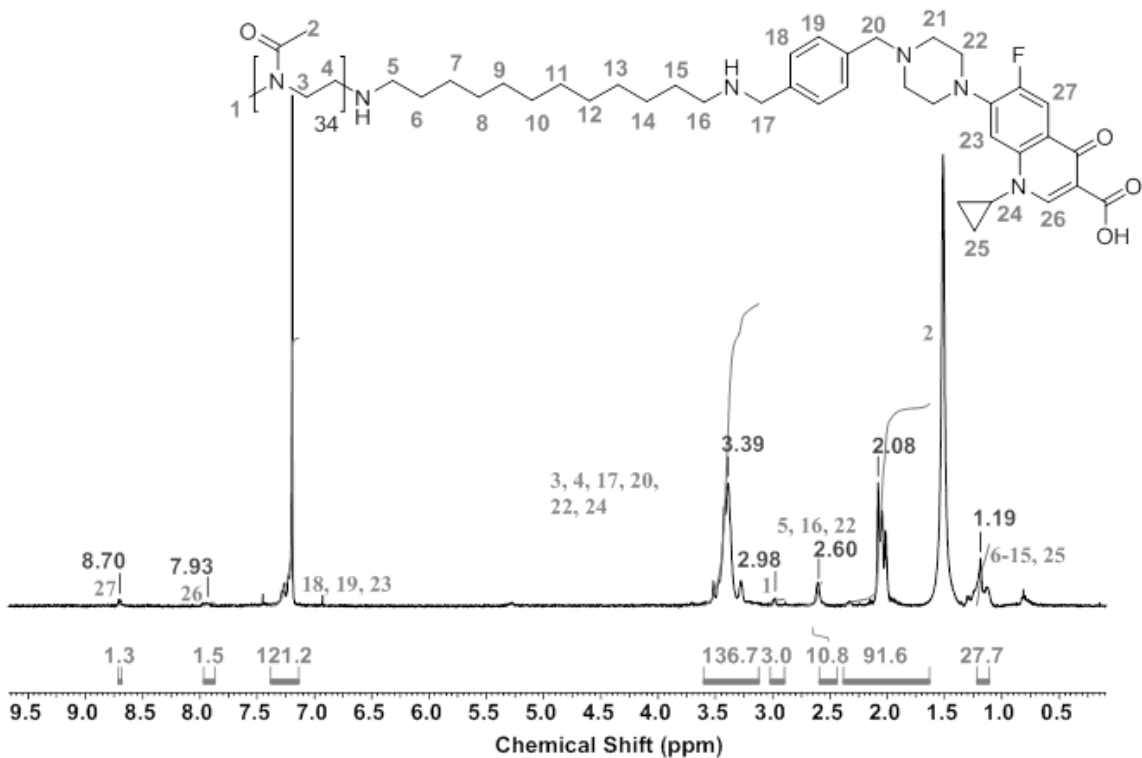


Abbildung 180: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₄₈-DODA-xCIP.

Anhang

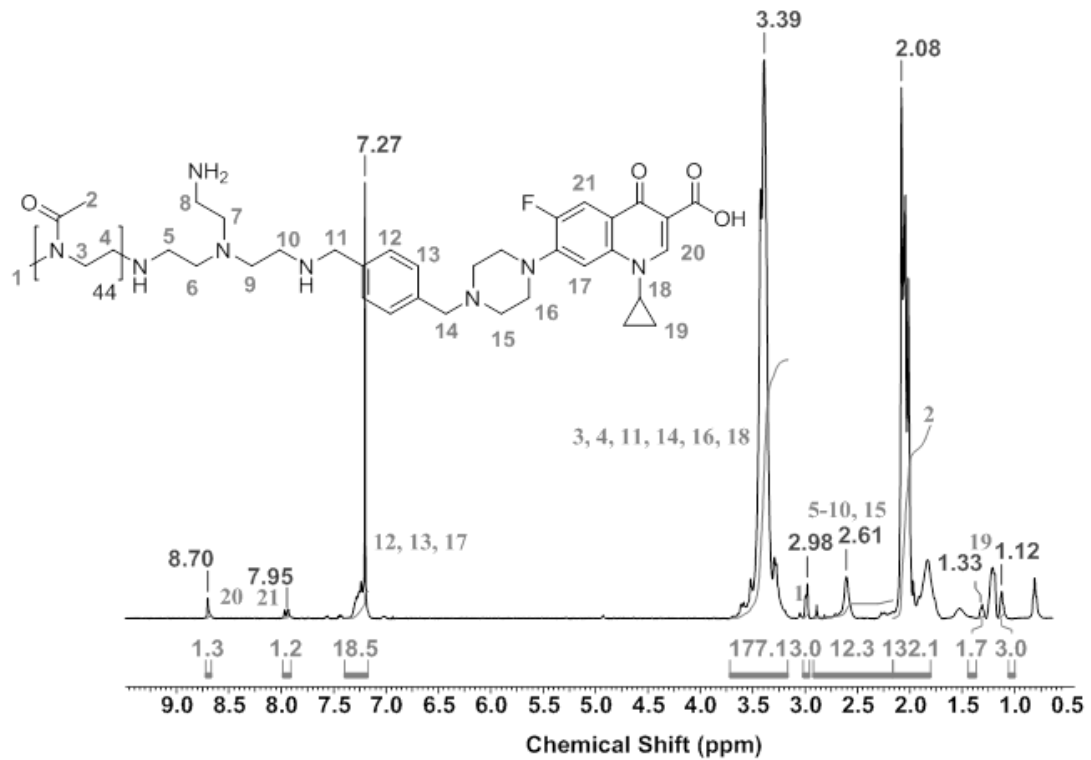


Abbildung 181: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Me-PMeOx₄₄-TREN-xCIP.

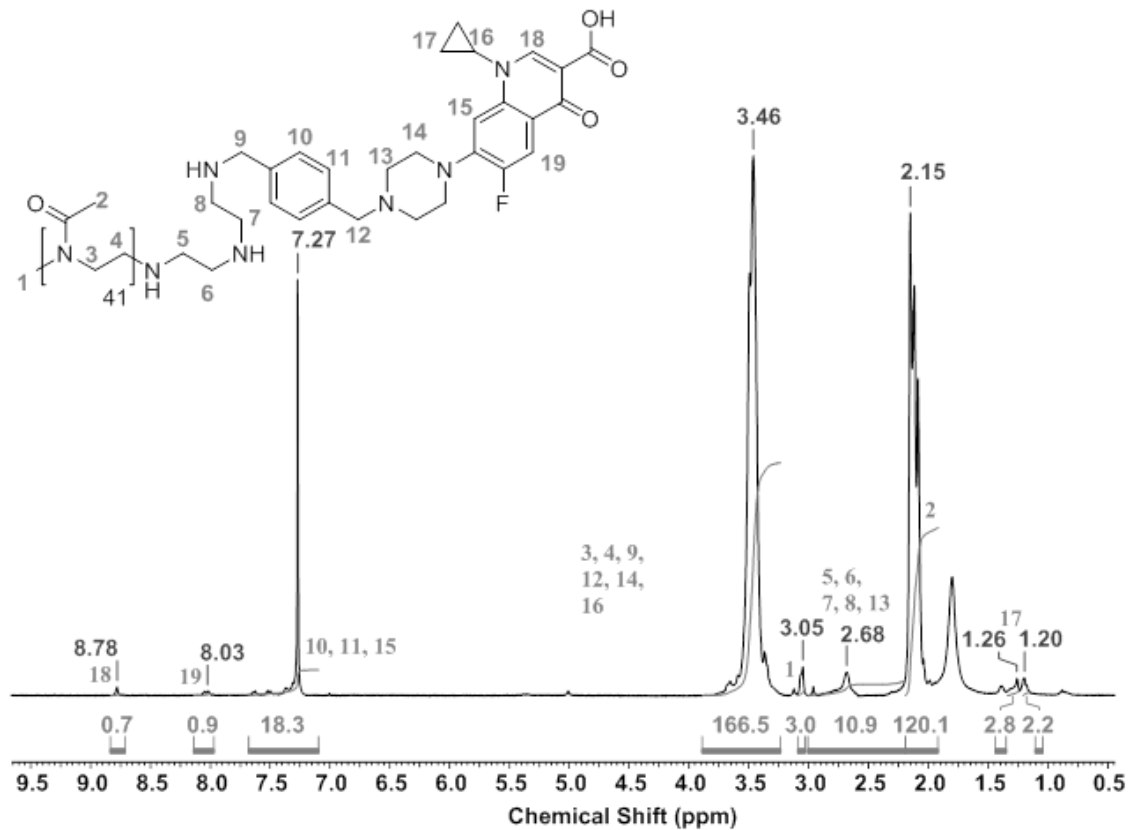


Abbildung 182: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Me-PMeOx₄₄-TET-xCIP.

Anhang

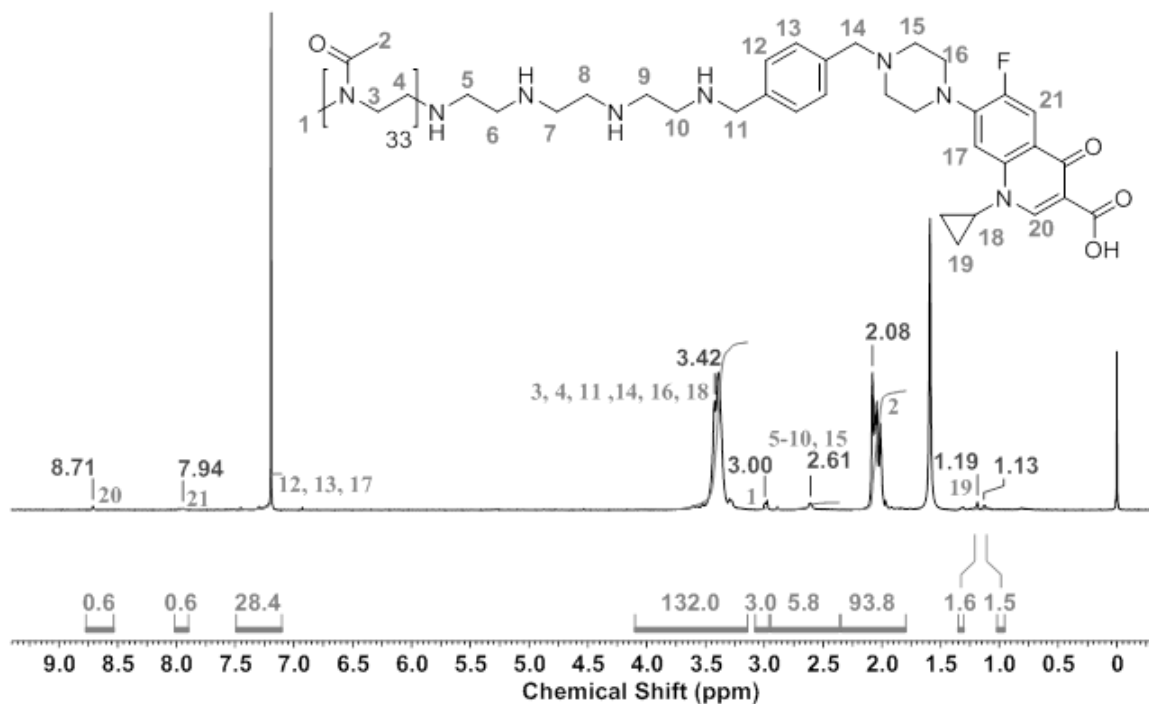


Abbildung 183: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PMeO x_{44} -TEP-xCIP.

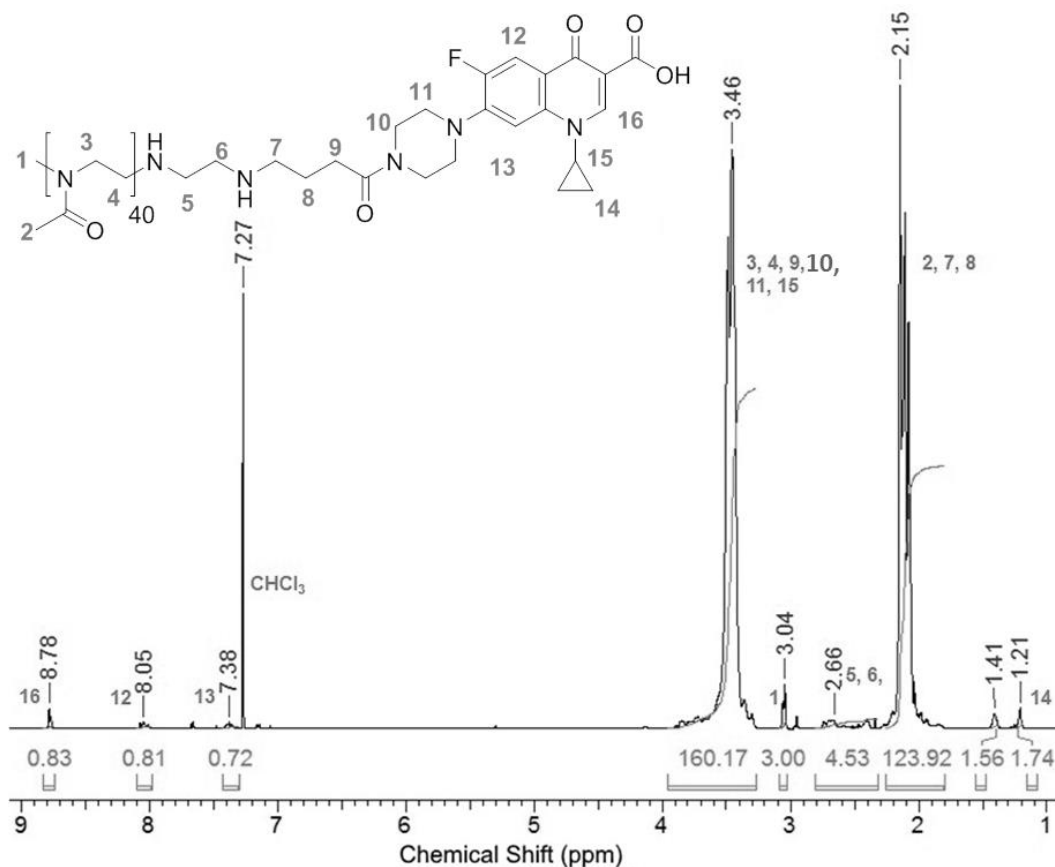


Abbildung 184: ^1H -Spektrum von Me-PMeO x_{40} -EDA-bCIP.

Anhang

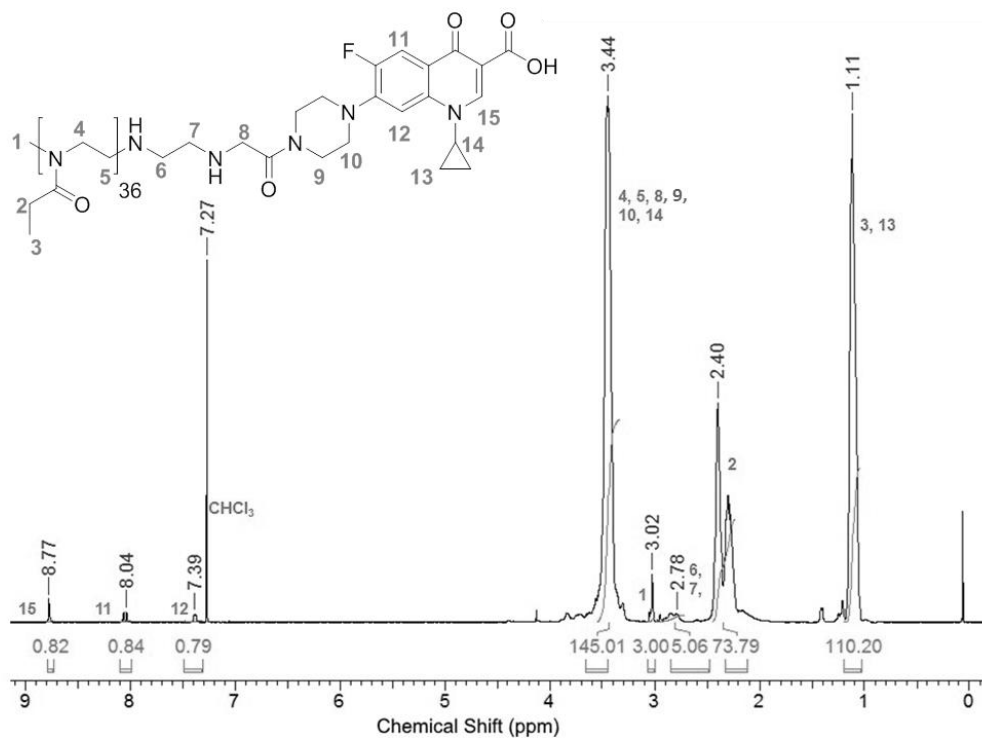


Abbildung 185: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₃₆-EDA-eCIP.

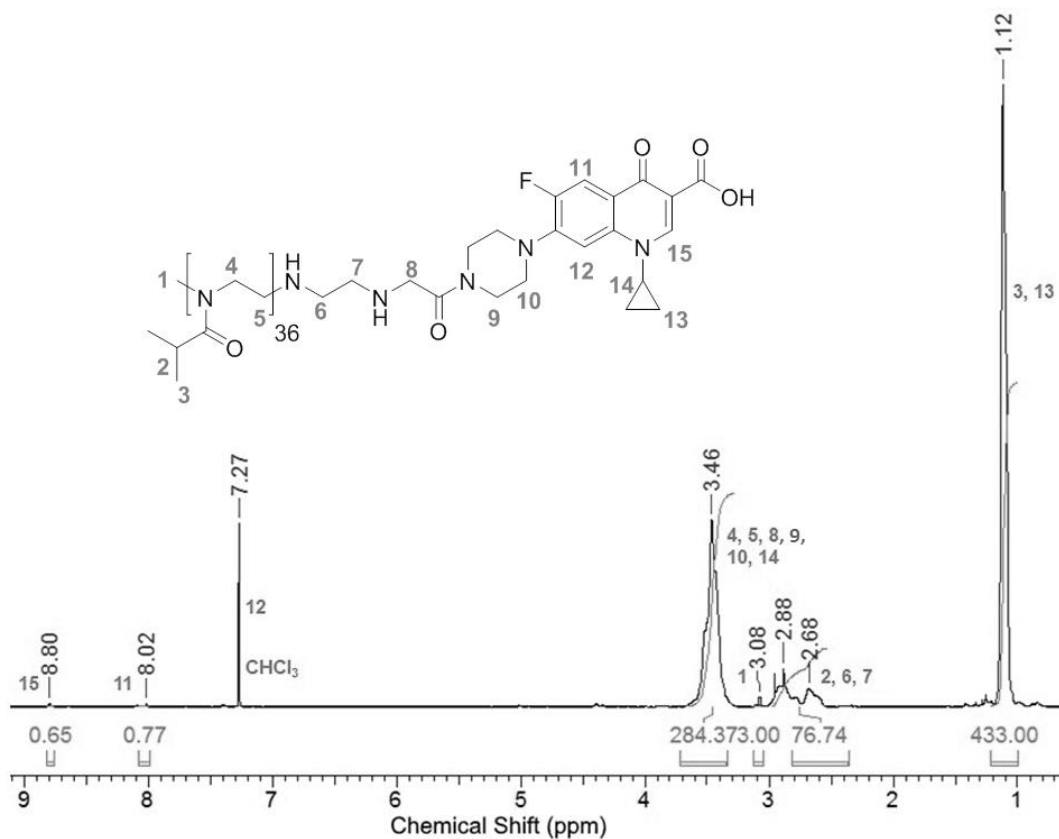


Abbildung 186: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PiPrOx₇₁-EDA-eCIP.

Anhang

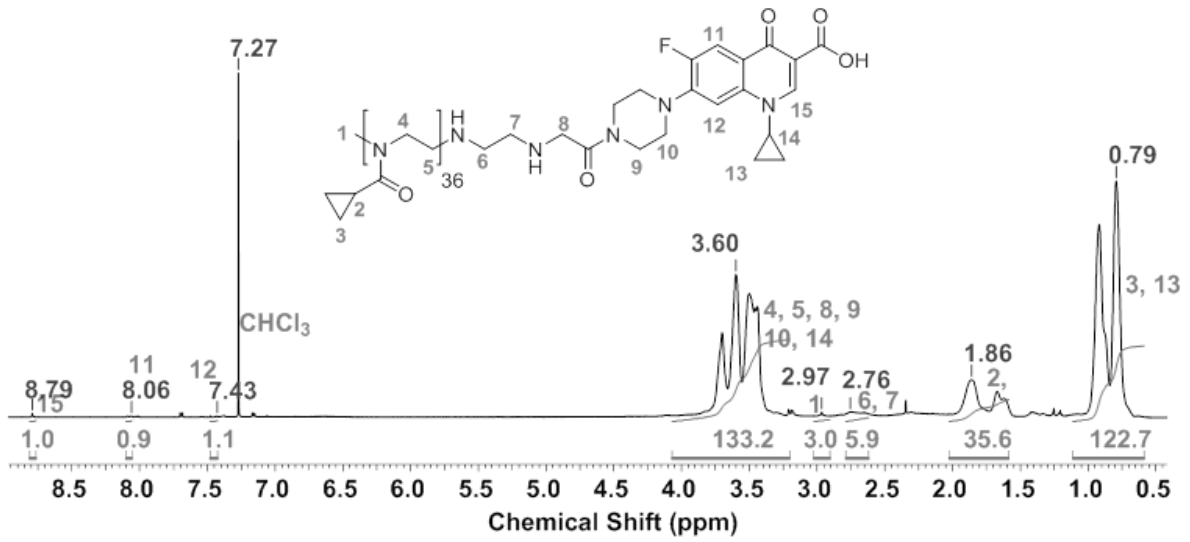


Abbildung 187: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PcPrOx₃₃-EDA-eCIP.

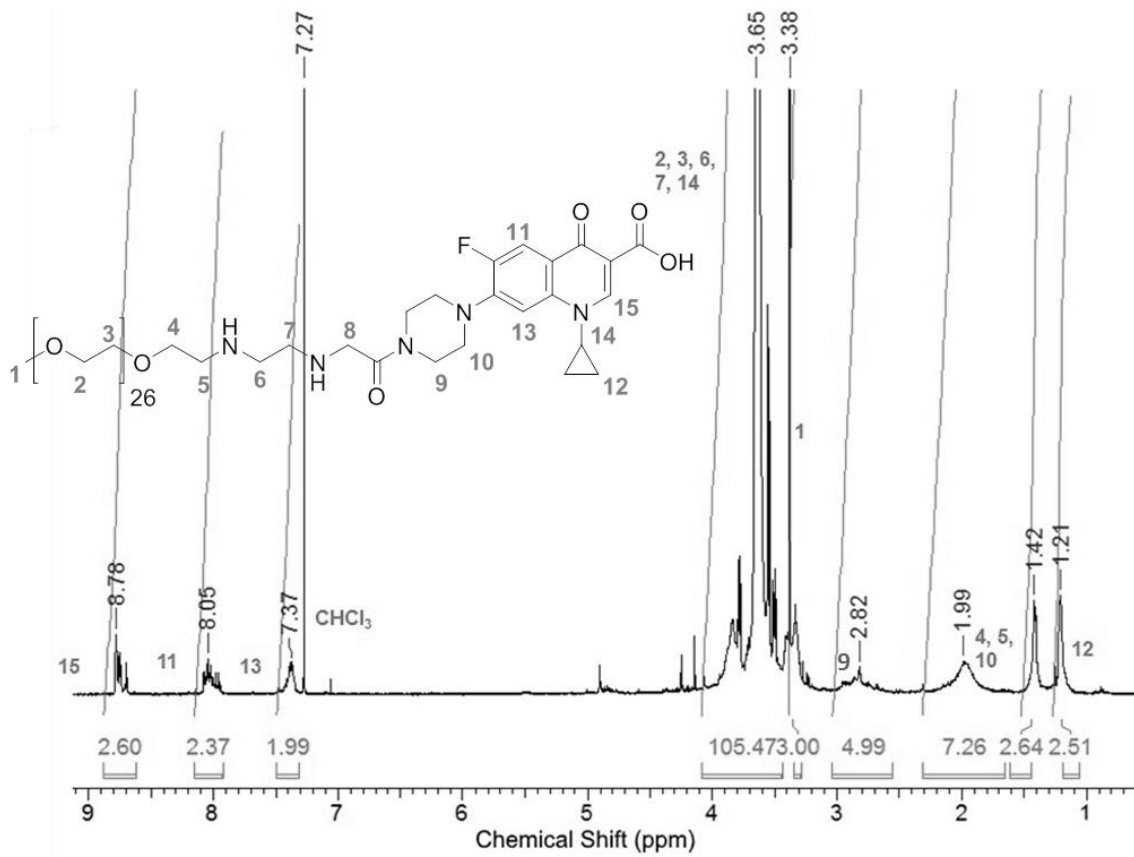


Abbildung 188: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PEG₂₆-EDA-eCIP.

Anhang

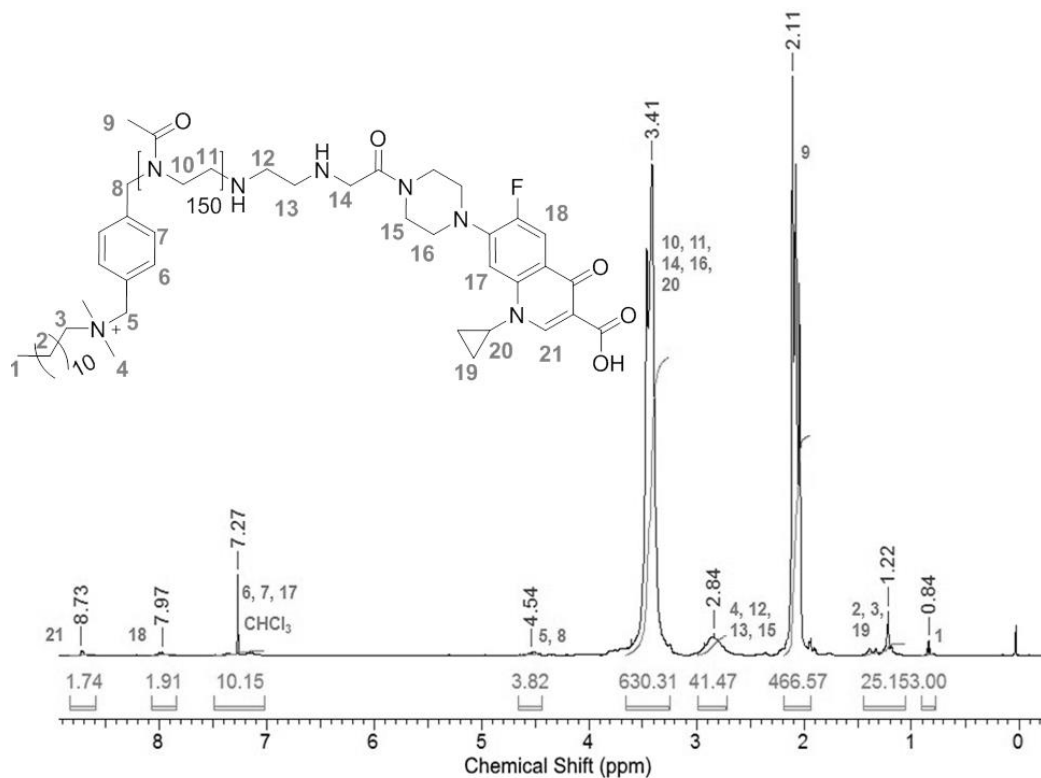


Abbildung 189: ^1H -Spektrum von DDA-X-PMeOx150-EDA-eCIP.

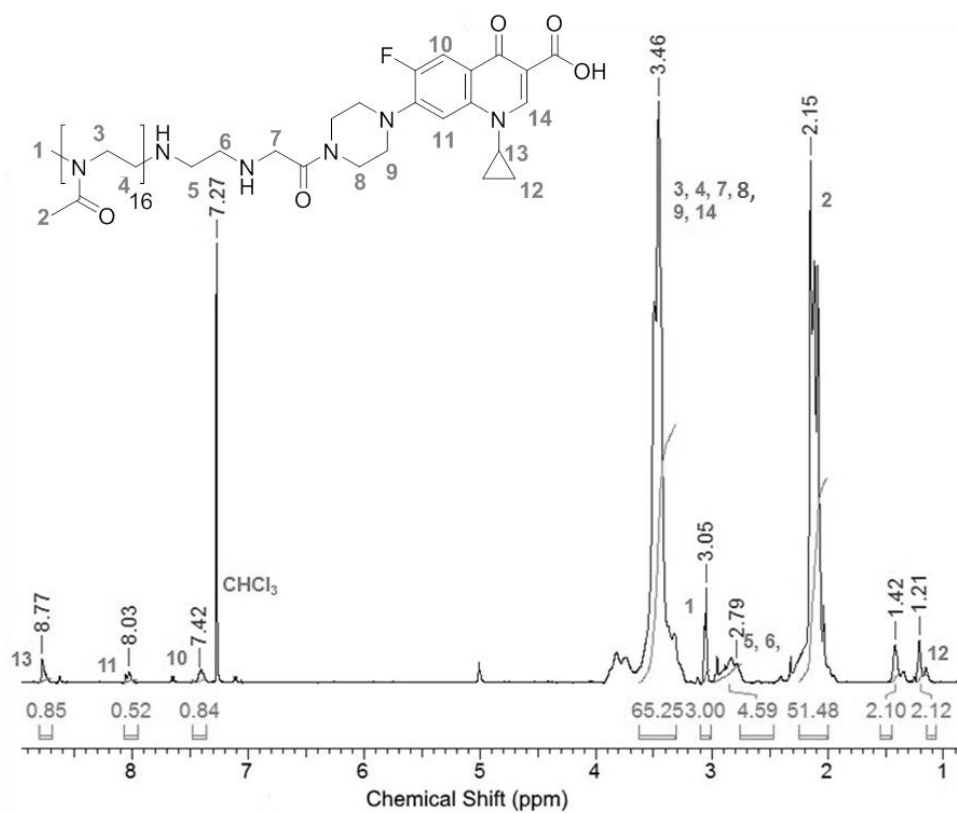


Abbildung 190: ^1H -Spektrum von Me-PMeOx₁₆-EDA-eCIP.

Anhang

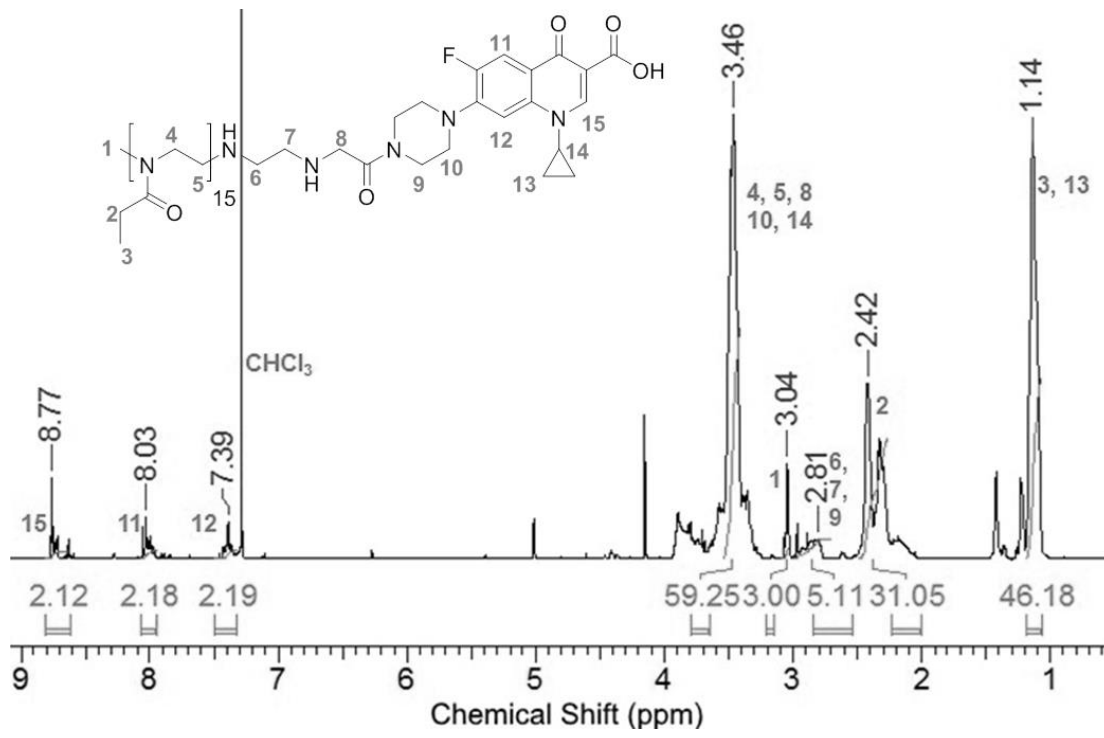


Abbildung 191: ¹H-Spektrum von Me-PEtOx₁₅-EDA-eCIP.

Anhang

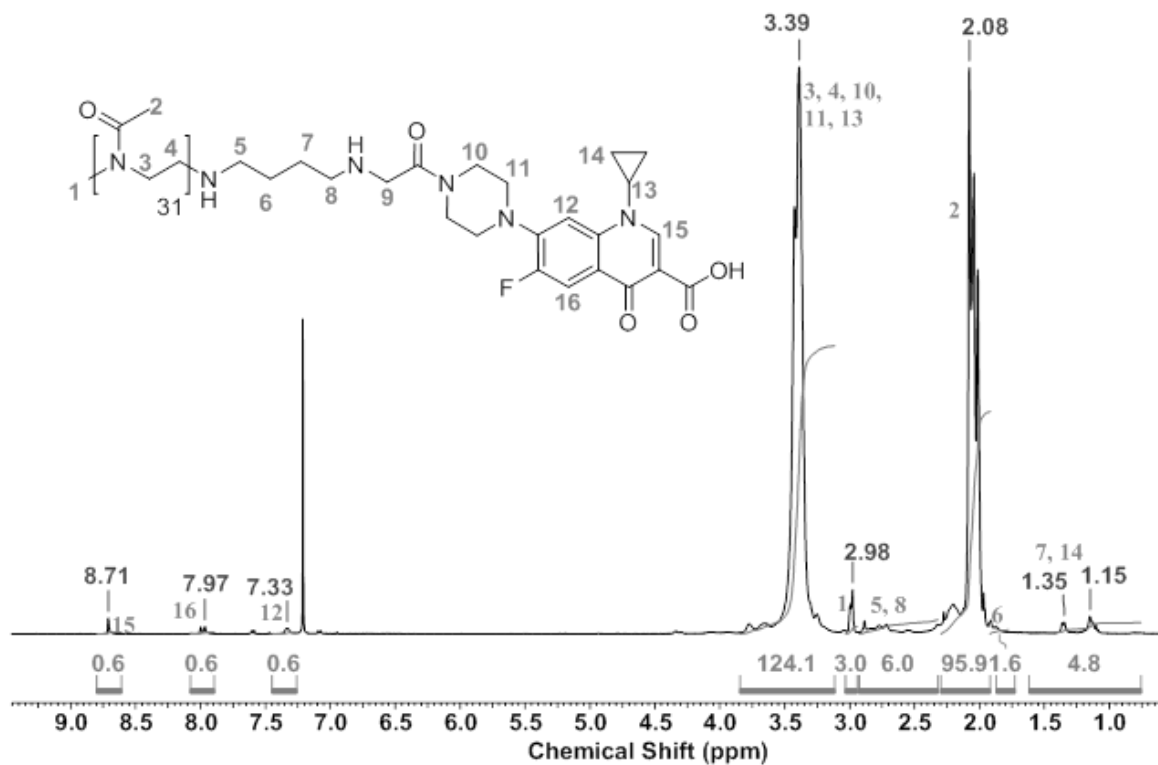


Abbildung 192: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₃₁-BDA-eCIP.

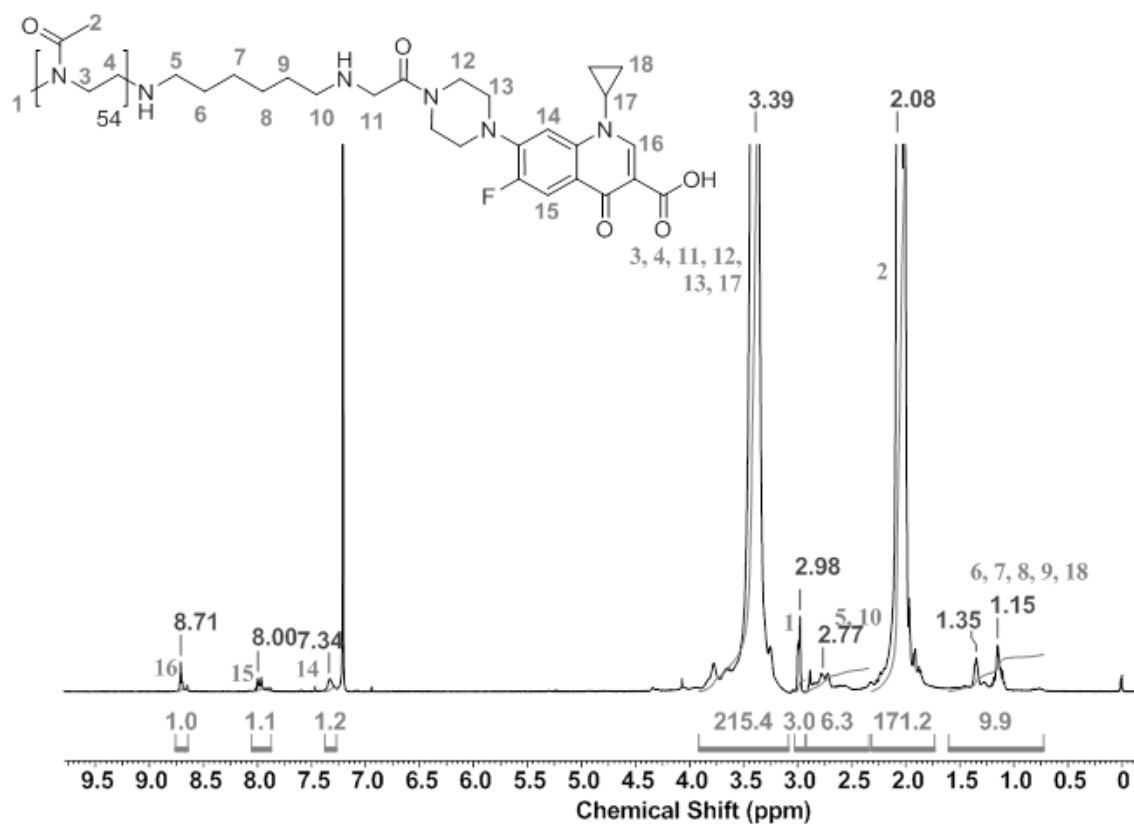


Abbildung 193: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₅₄-HDA-eCIP.

Anhang

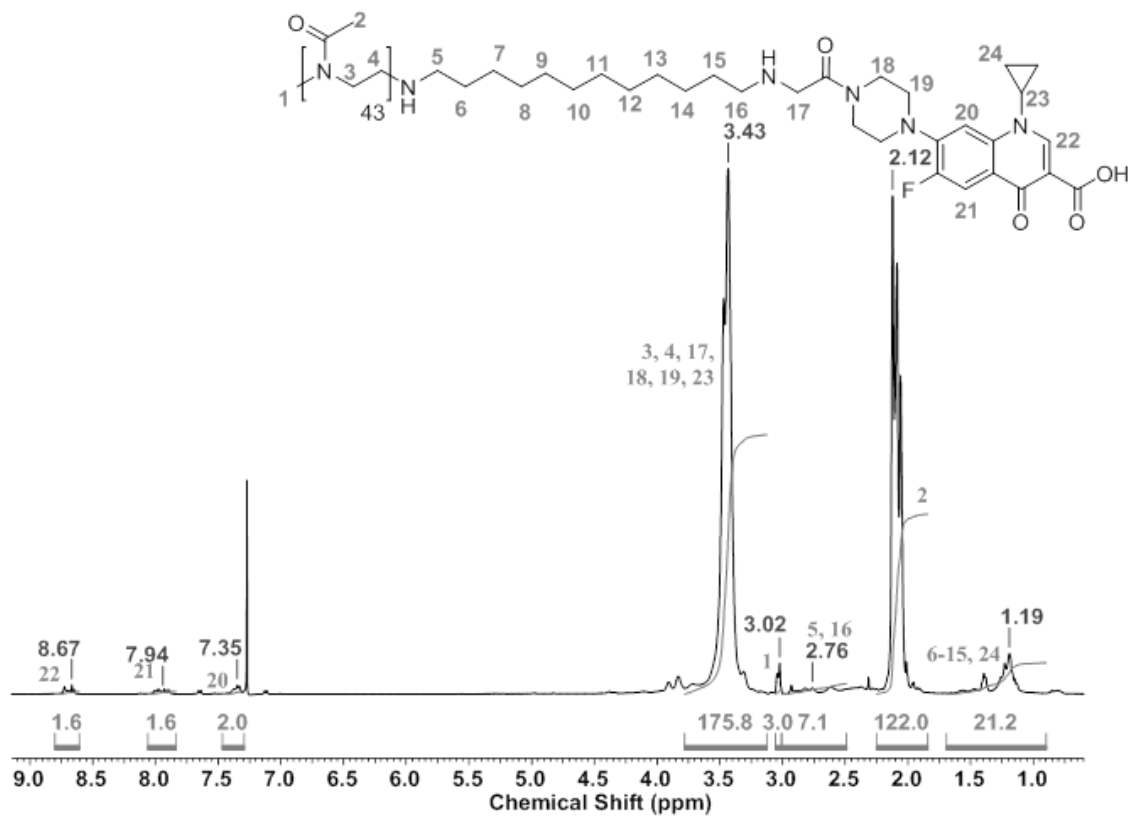


Abbildung 194: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₄₃-DODA-eCIP.

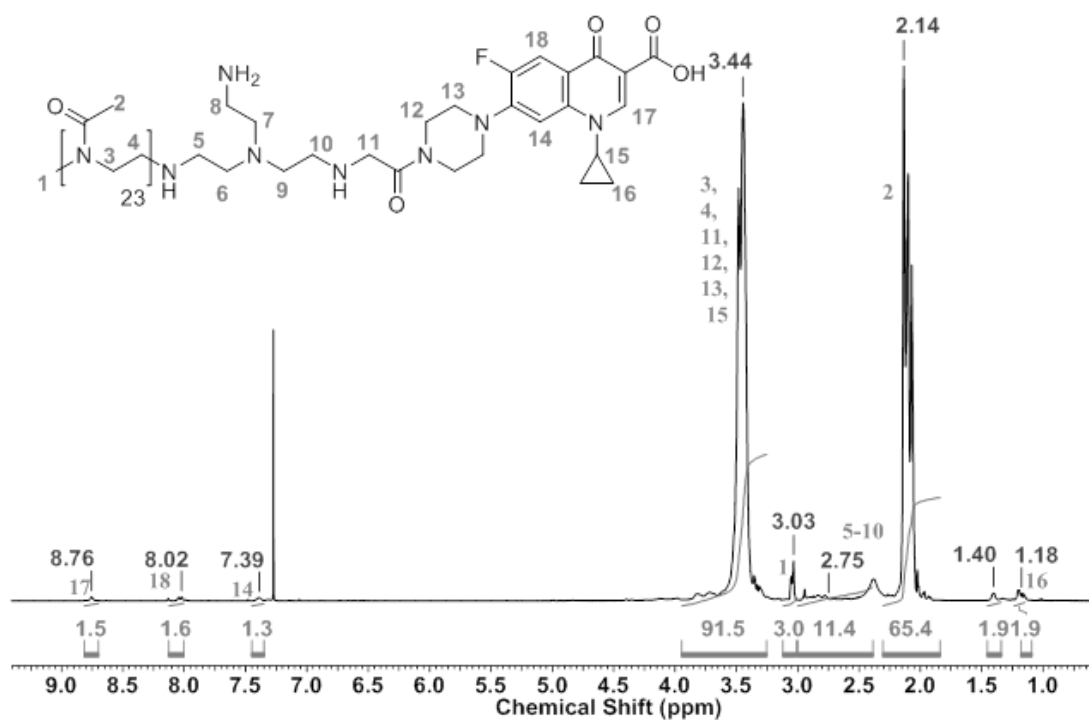


Abbildung 195: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeOx₂₃-TREN-eCIP.

Anhang

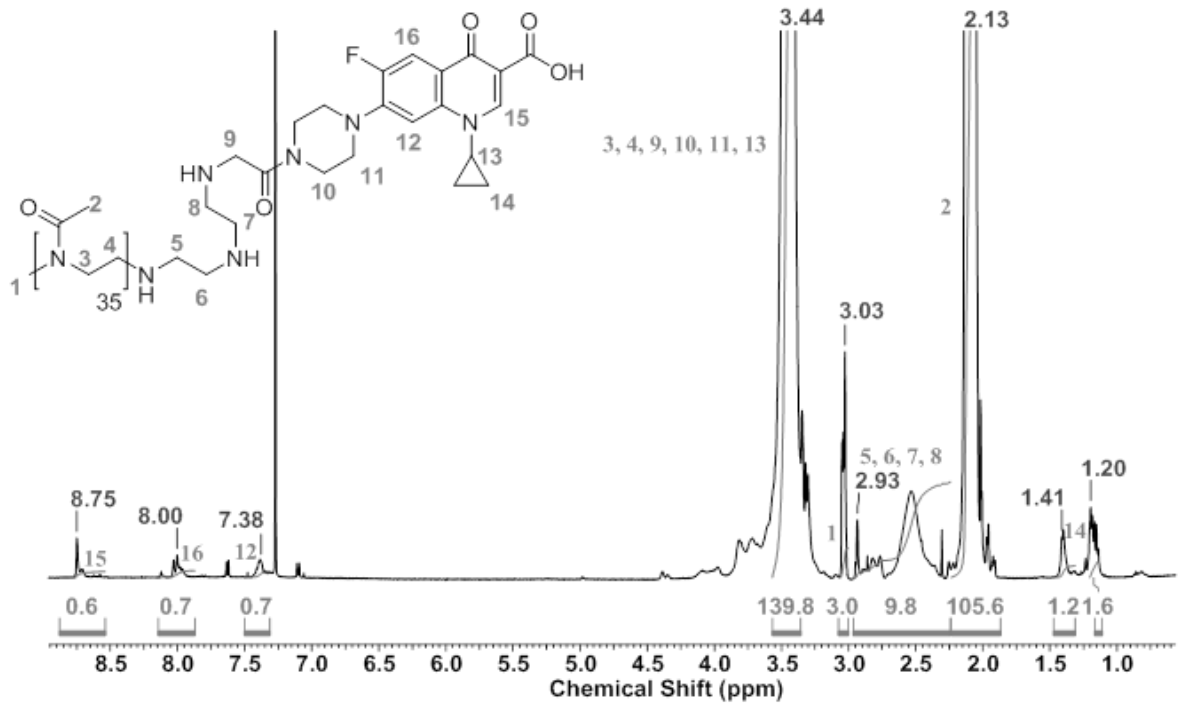


Abbildung 196: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeO_x₃₅-TET-eCIP.

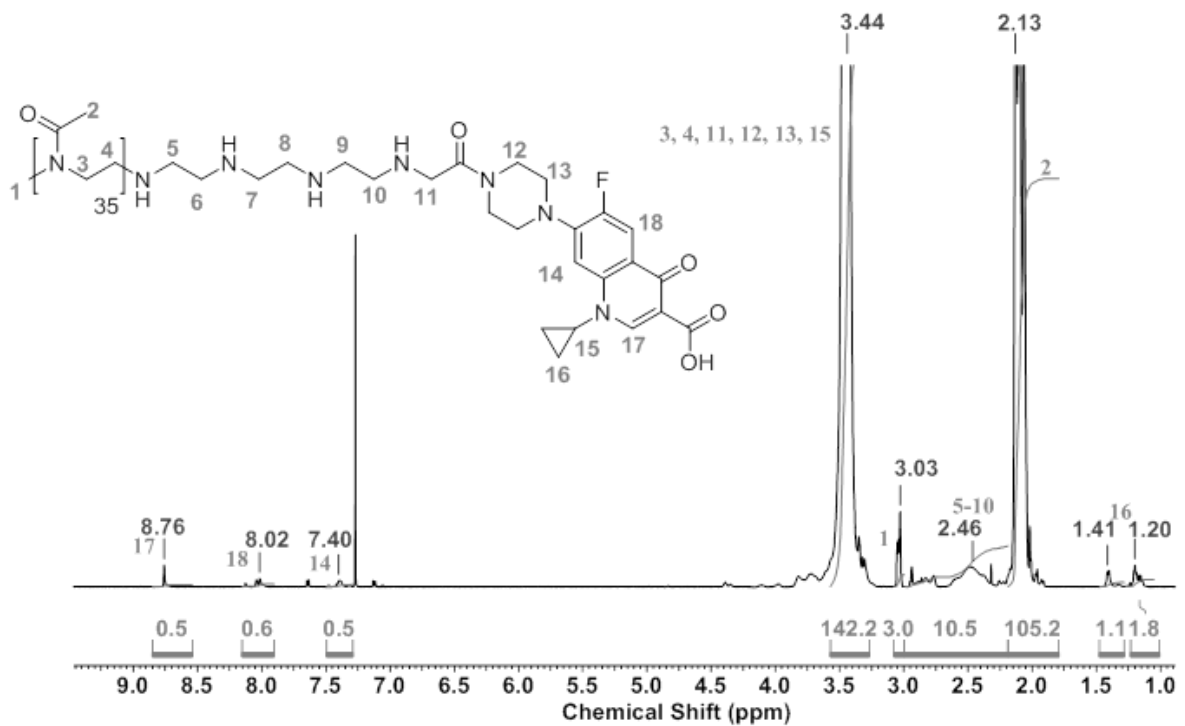


Abbildung 197: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PMeO_x₃₅-TEP-eCIP.

Anhang

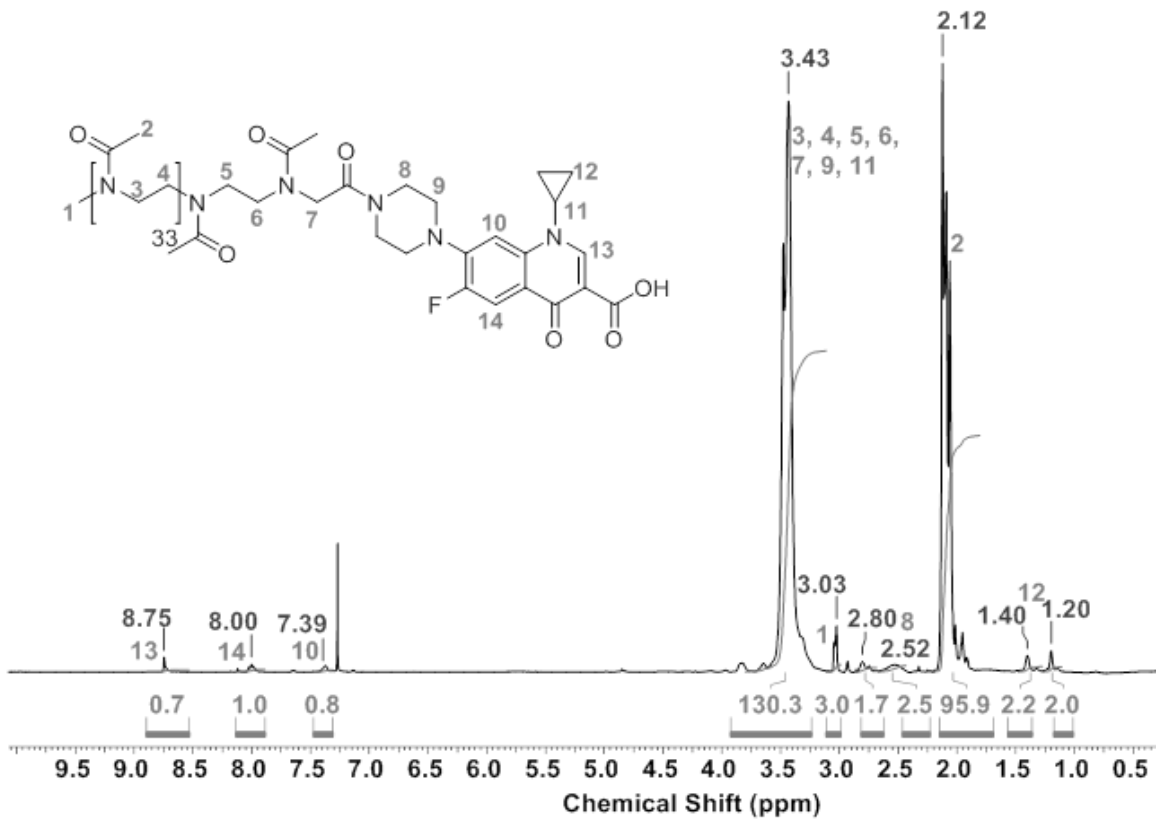


Abbildung 198: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PMOx-eCIP.

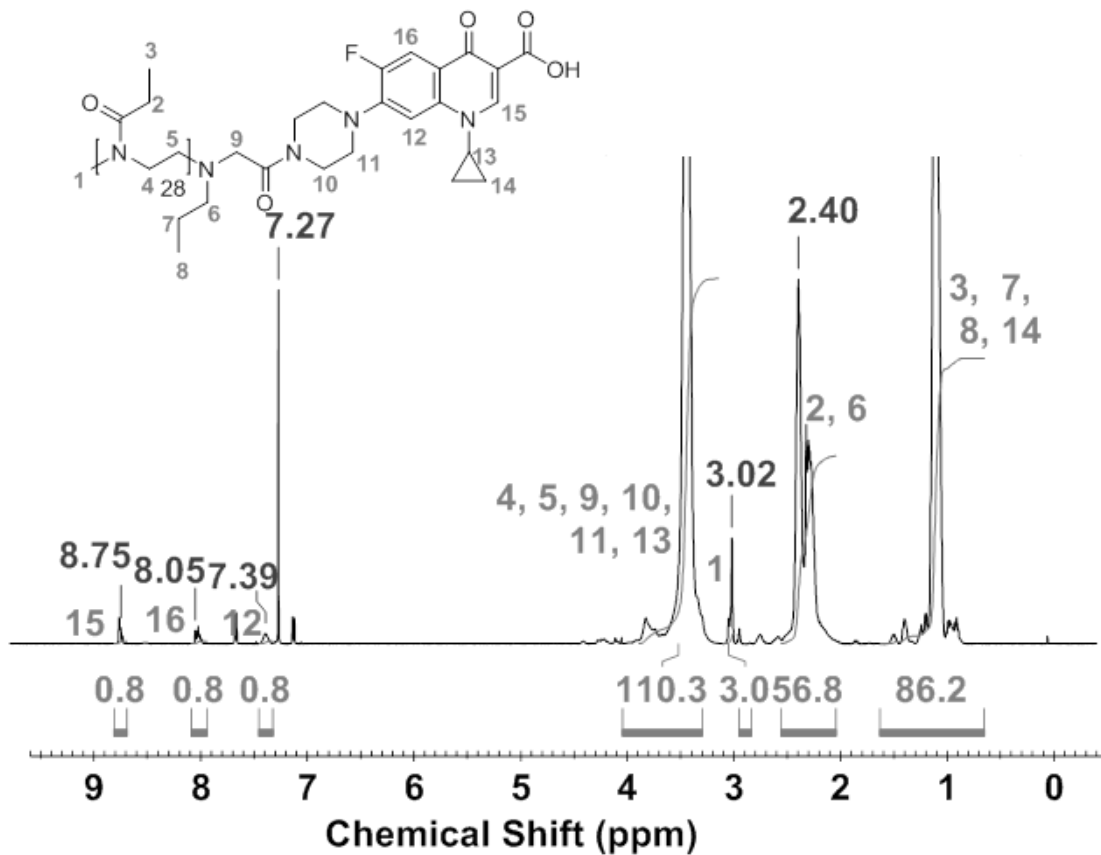


Abbildung 199: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₂₈-pCIP.

Anhang

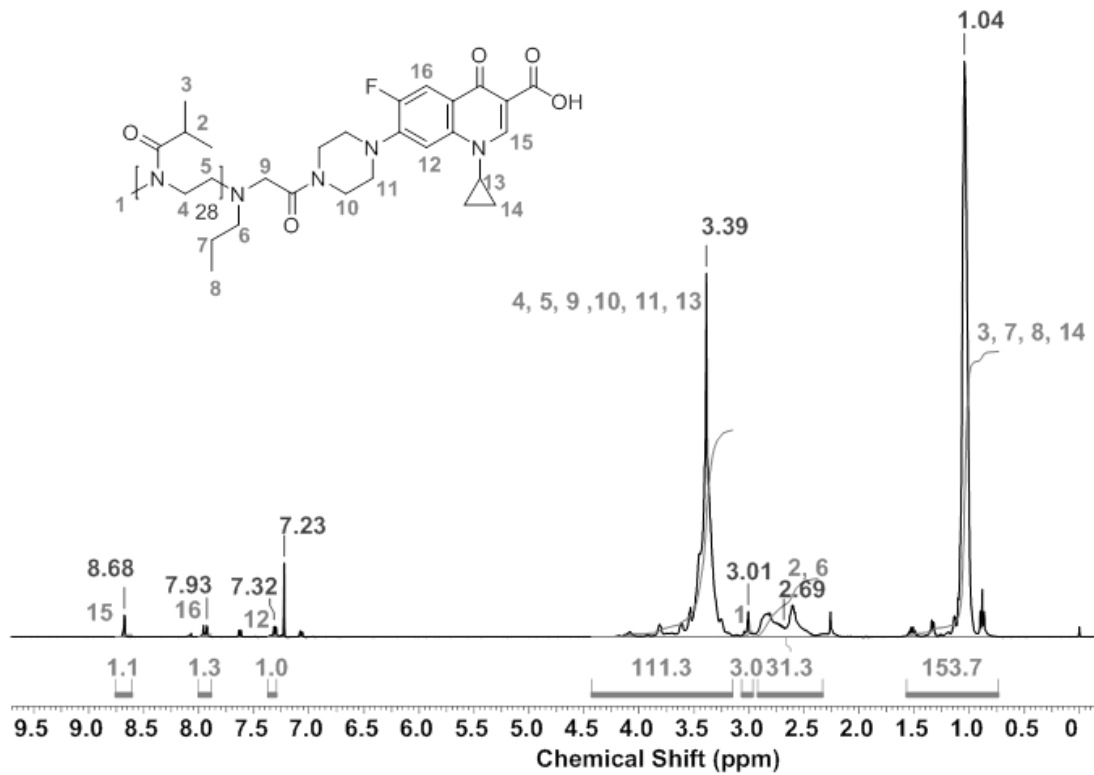


Abbildung 200: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PiPrOx₂₈-pCIP.

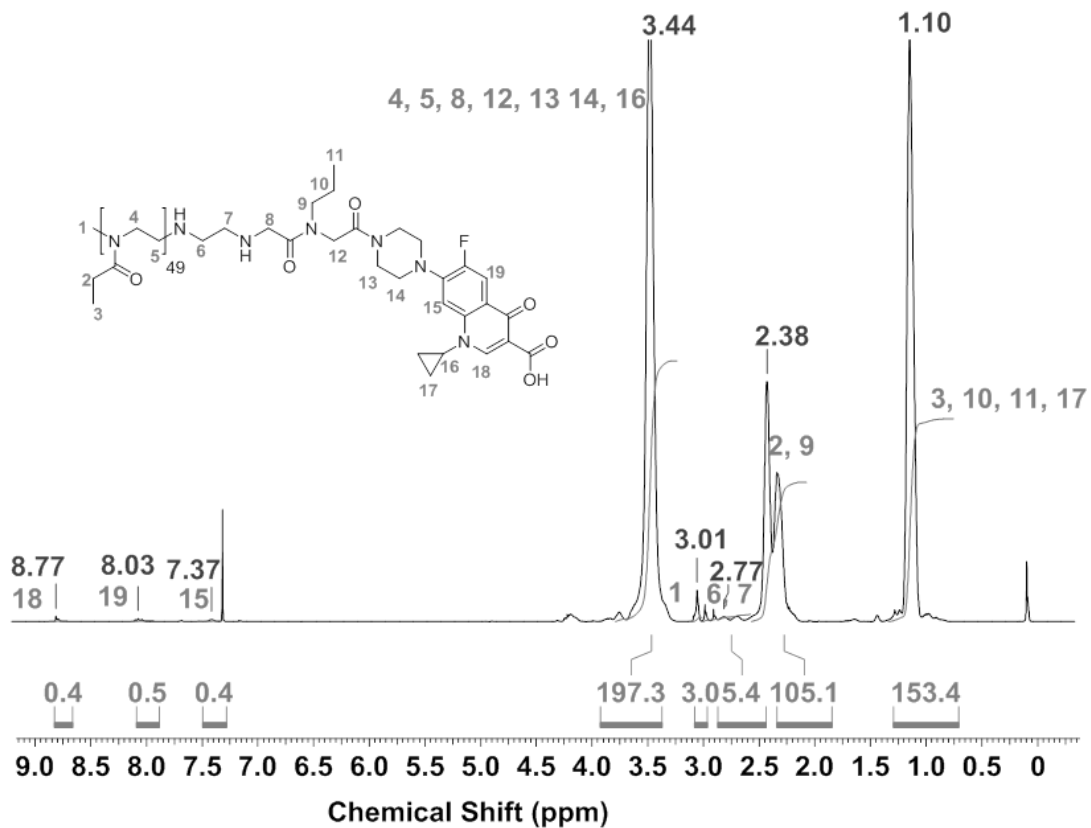


Abbildung 201: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₄₉-EDA-peCIP.

Anhang

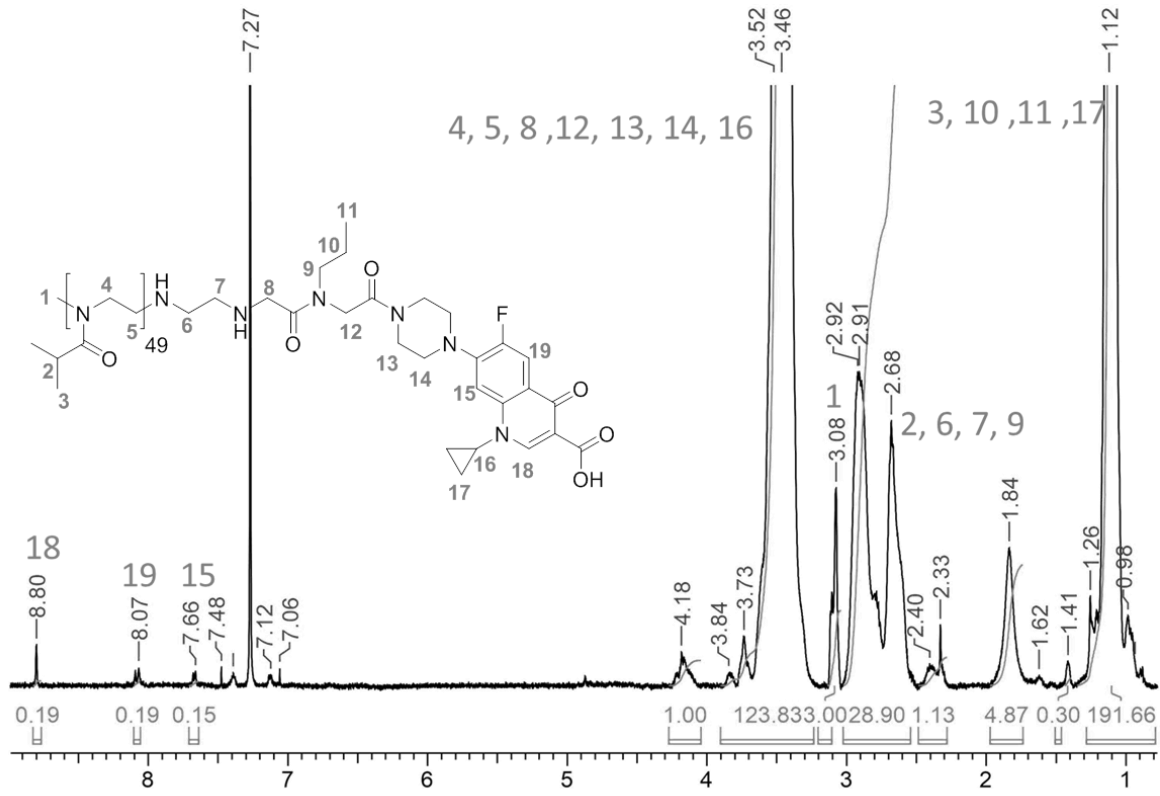
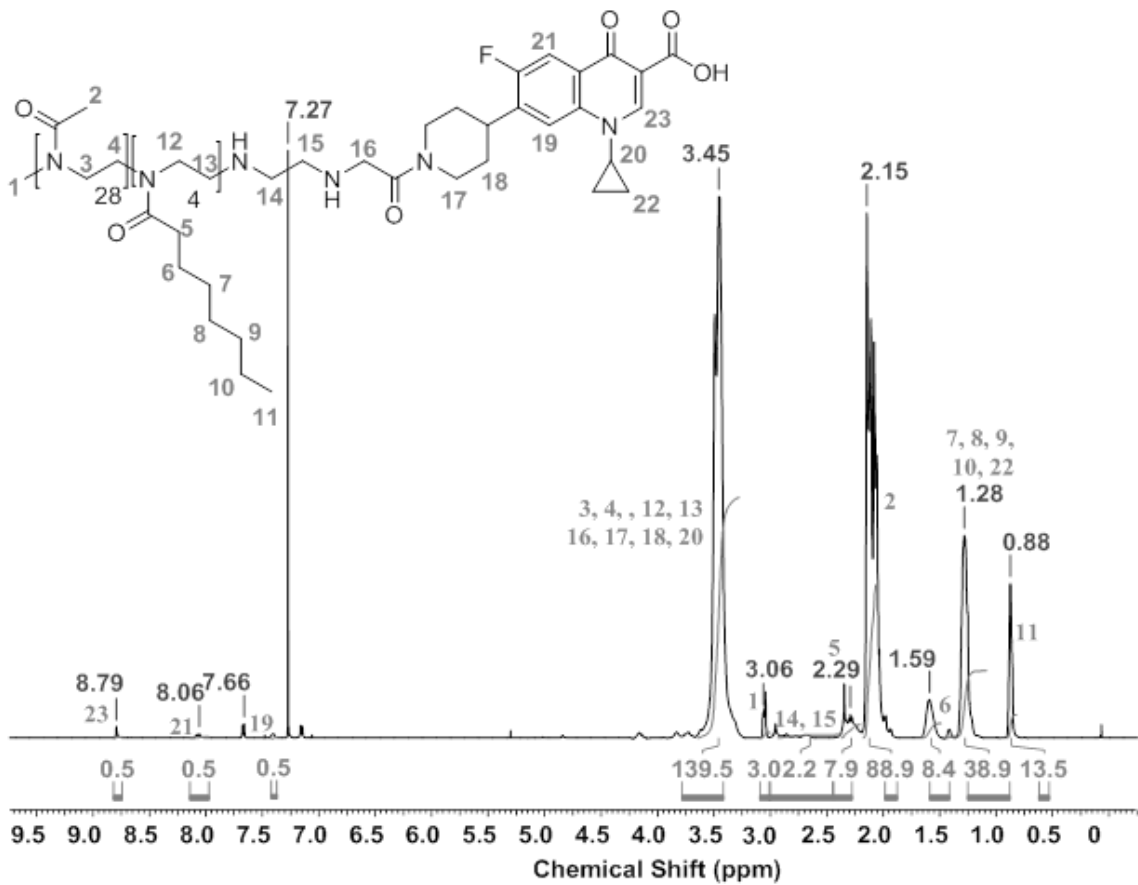


Abbildung 202: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PiPrOx₃₁-EDA-peCIP.



Anhang

Abbildung 203: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO $_{28}$ -PHepO $_4$ -EDA-eCIP.

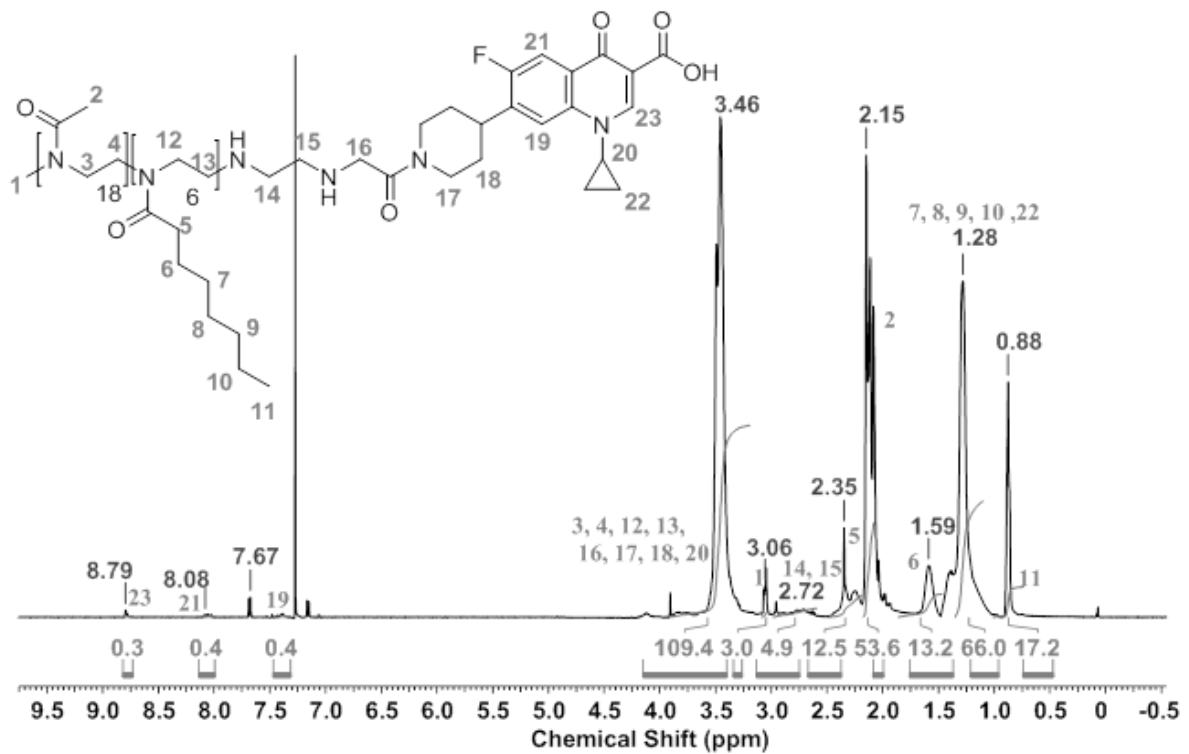


Abbildung 204: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO $_{18}$ -PHepO $_6$ -EDA-eCIP.

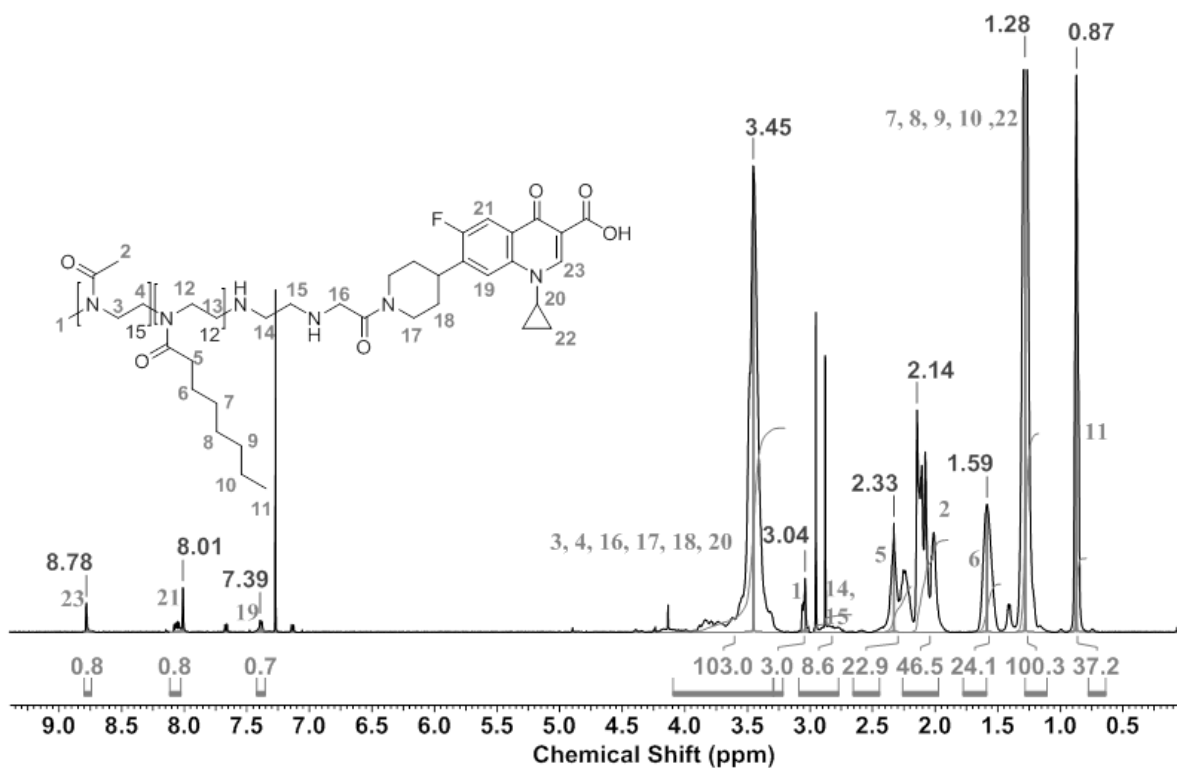


Abbildung 205: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO $_{15}$ -PHepO $_{12}$ -EDA-eCIP.

Anhang

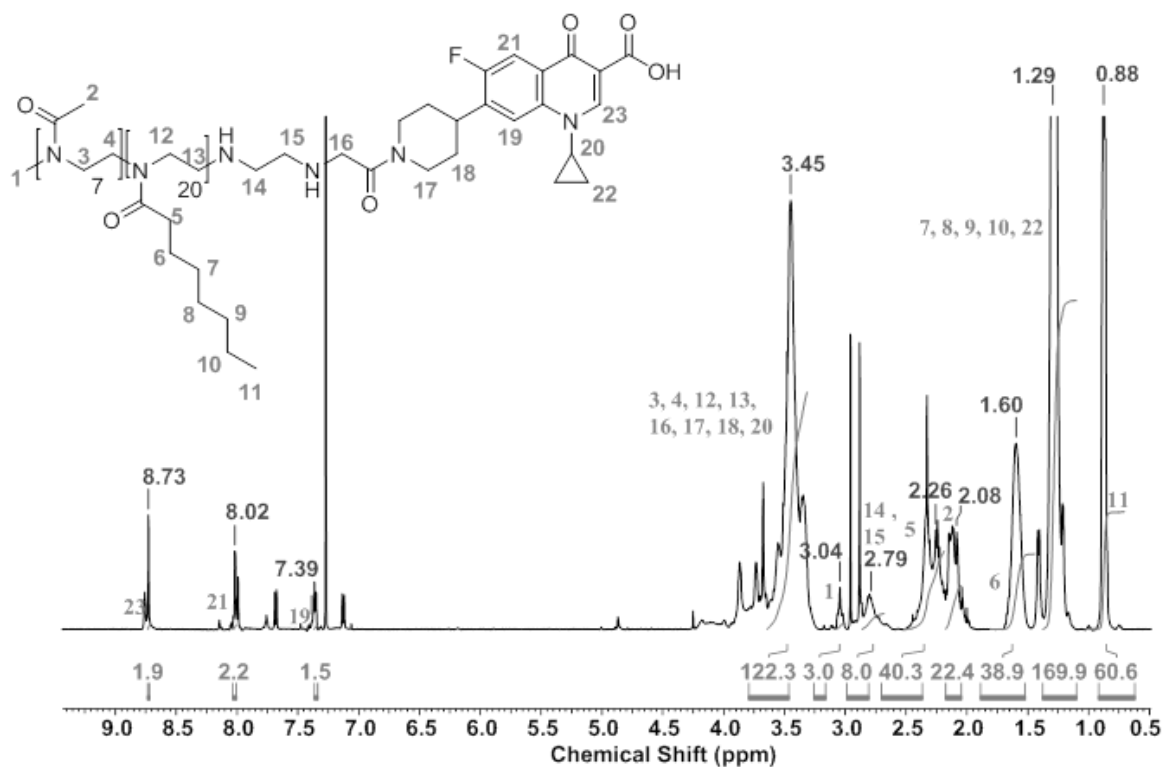


Abbildung 206: ^1H -NMR-Spektrum von Me-PMeOx₇-PHepOx₂₀-EDA-eCIP.

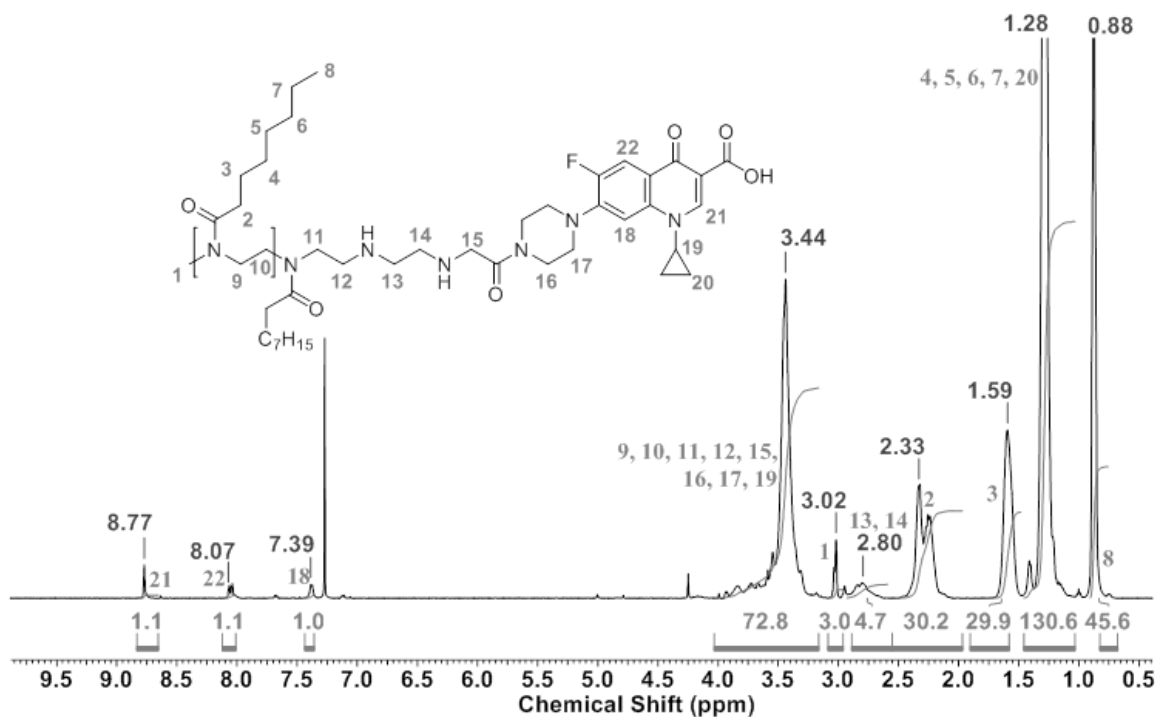


Abbildung 207: ^1H -NMR-Spektrum von Me-PHepOx₁₈-EDA-eCIP.

Anhang

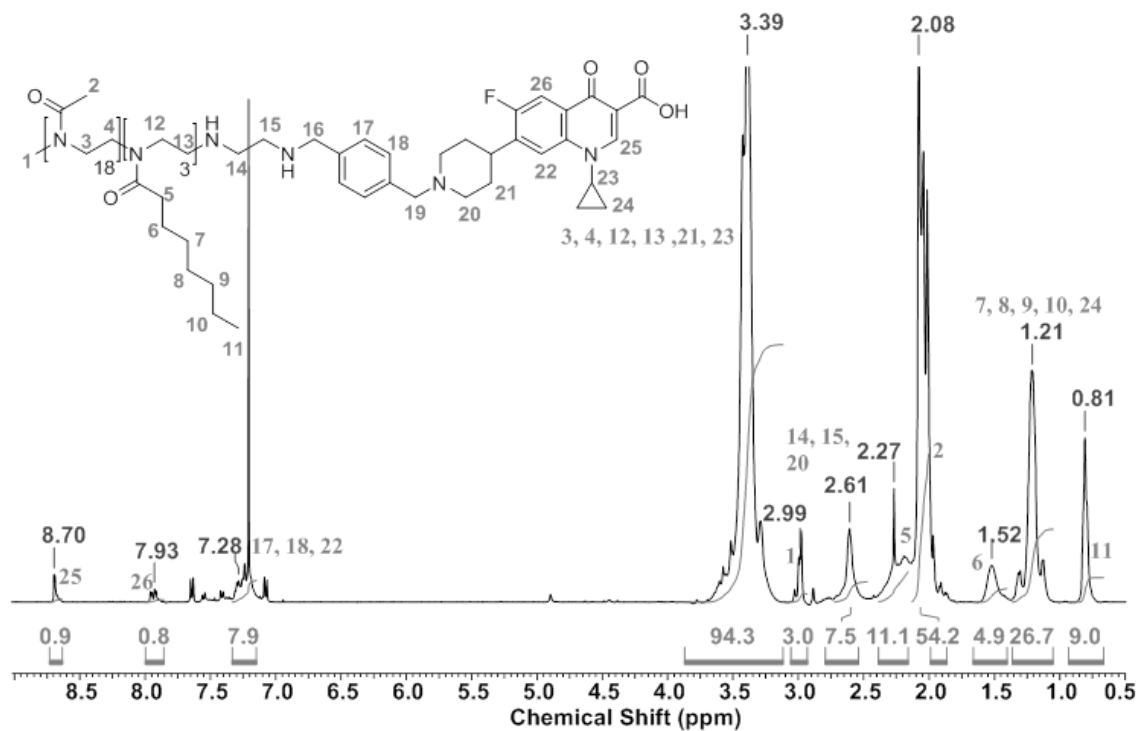


Abbildung 208: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO_{x18}-PHepO_{x3}-EDA-xCIP.

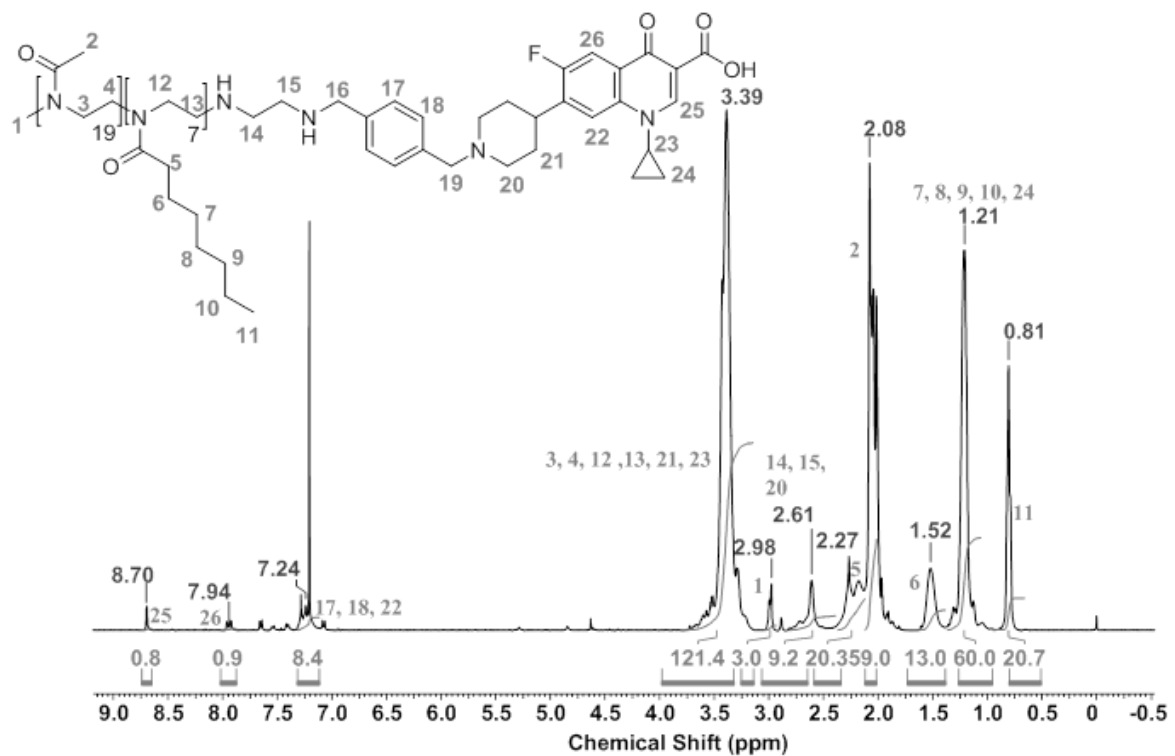


Abbildung 209: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO_{x19}-PHepO_{x7}-EDA-xCIP.

Anhang

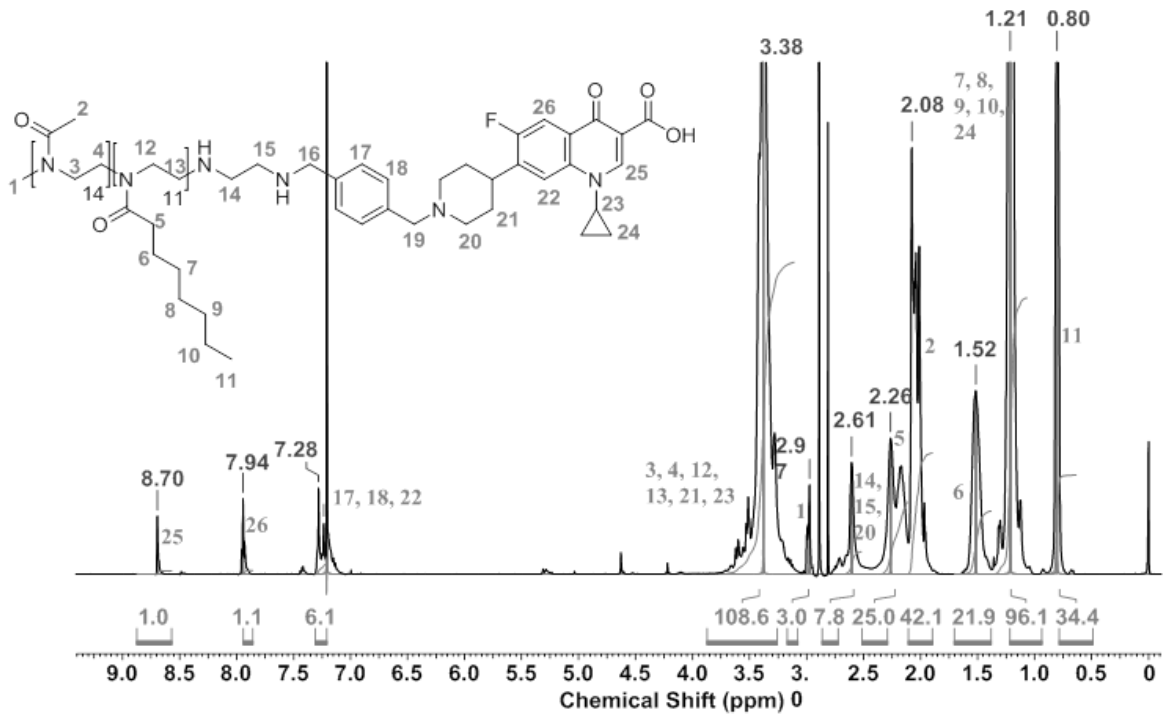


Abbildung 210: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO_{x14}-PHepO_{x11}-EDA-xCIP.

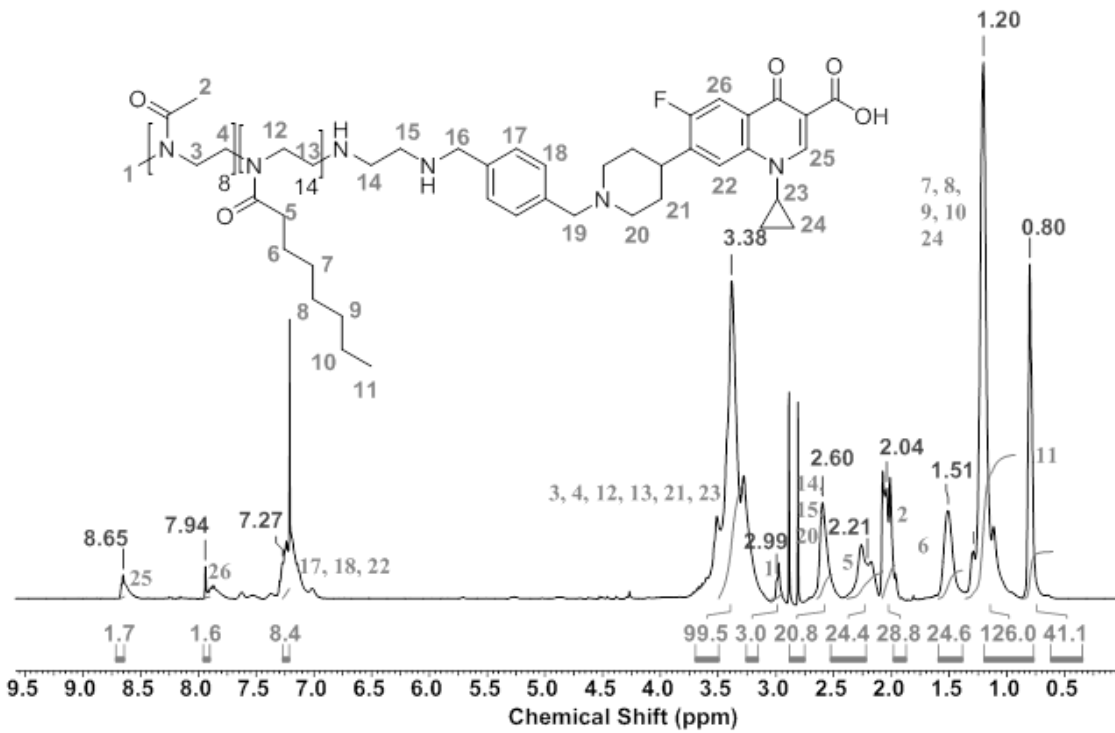


Abbildung 211: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Me-PMeO_{x8}-PHepO_{x14}-EDA-xCIP.

Anhang

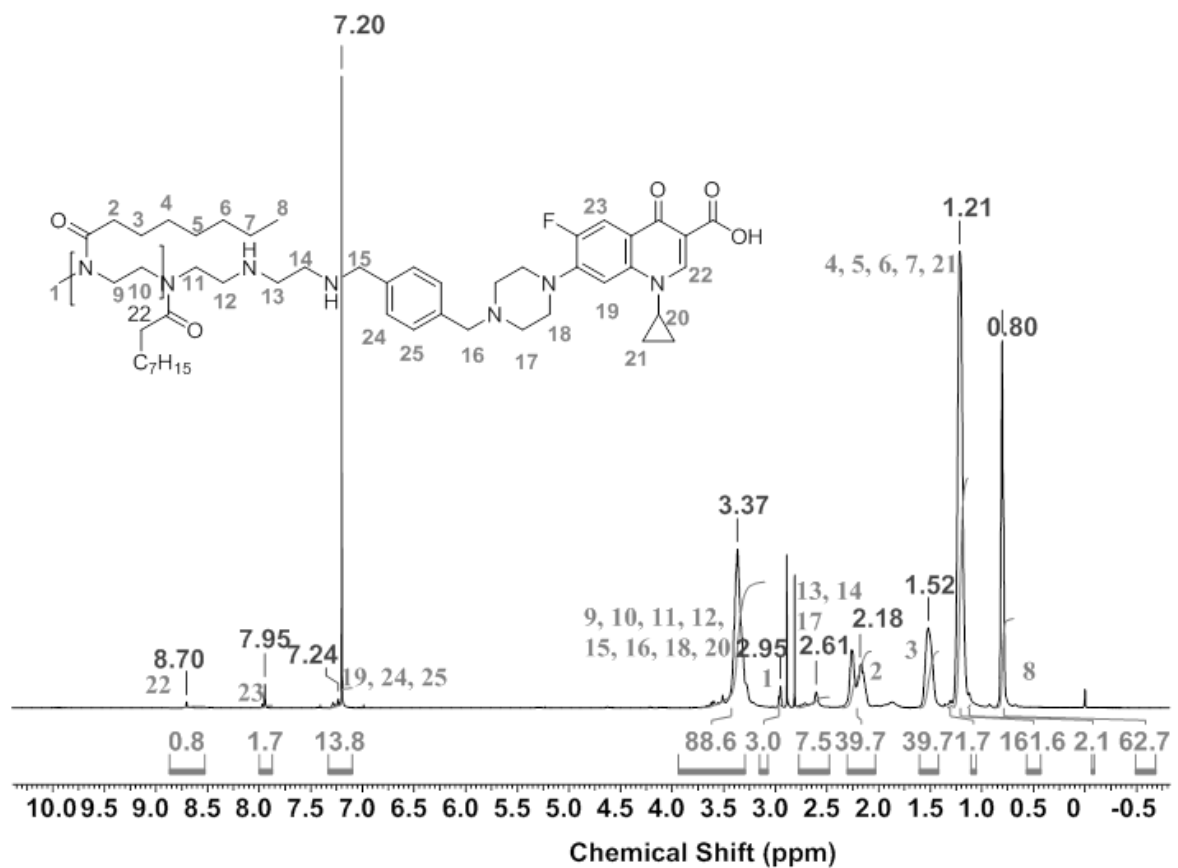


Abbildung 212: ¹H-NMR-Spektrum von Me-PHepOx₂₀-EDA-xCIP.

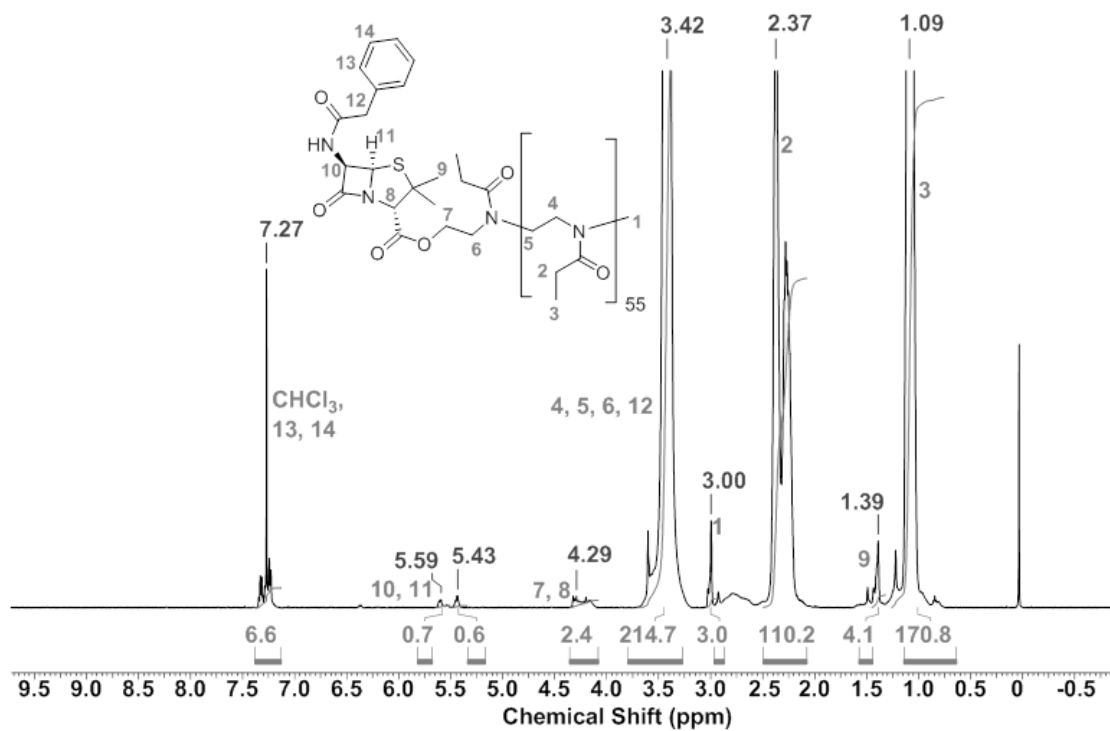


Abbildung 213: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-PEtOx₅₃-PenG.

Anhang

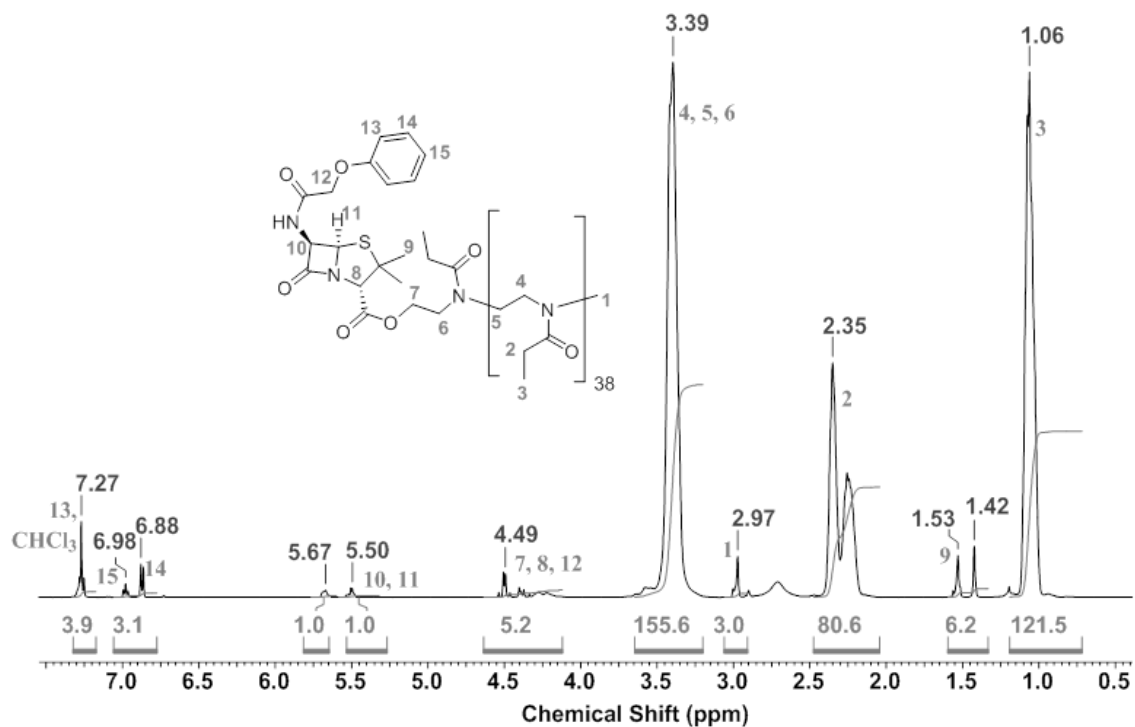


Abbildung 214: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PeOx₃₉-PenV.

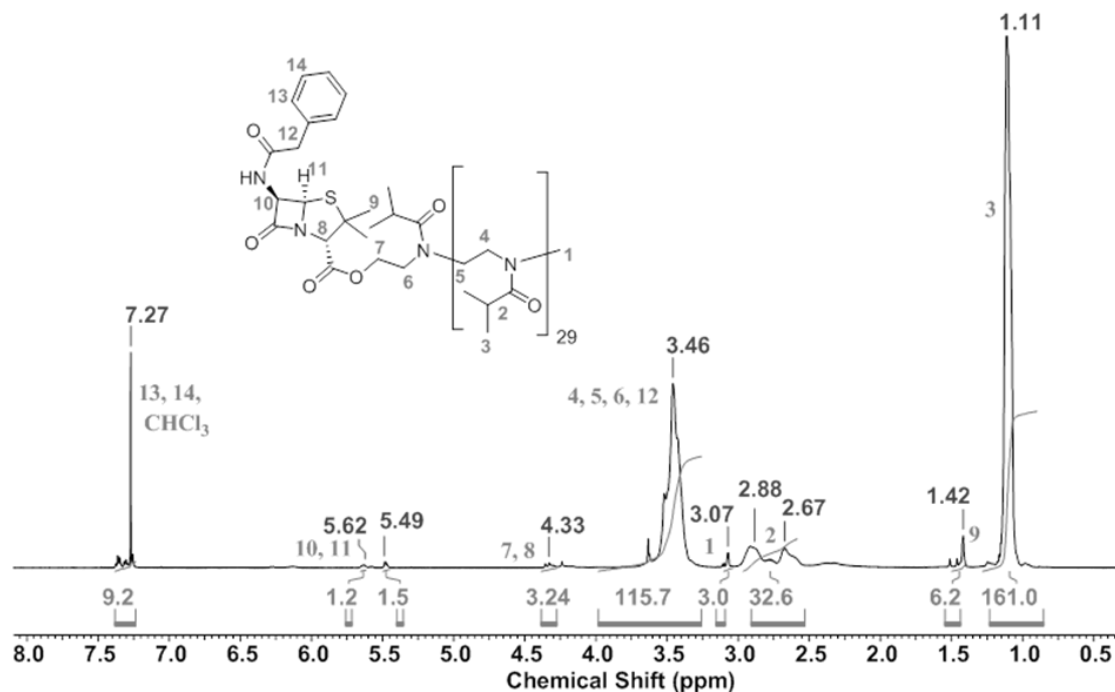


Abbildung 215: ^1H -NMR-Spektrum vom Me-PiPrOx₂₉-PenG.

Anhang

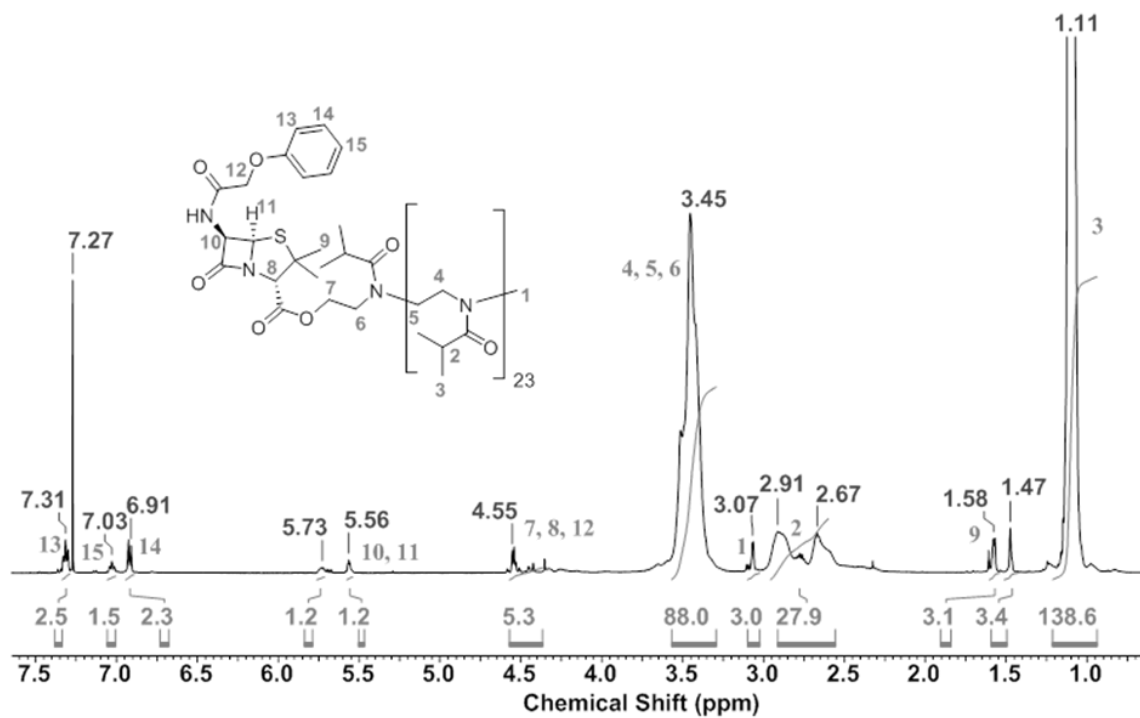


Abbildung 216: ¹H-NMR-Spektrum vom Me-P/PrOx₂₂-PenV.

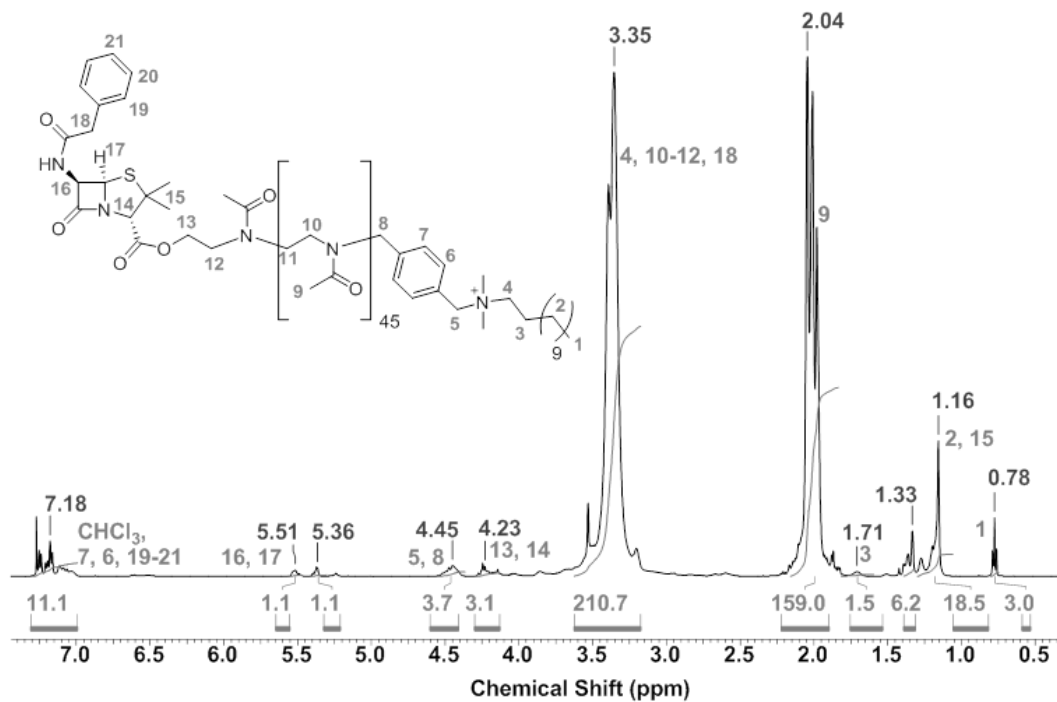


Abbildung 217: ¹H-NMR-Spektrum vom DDA-X-PMeOx₅₂-PenG.

Anhang

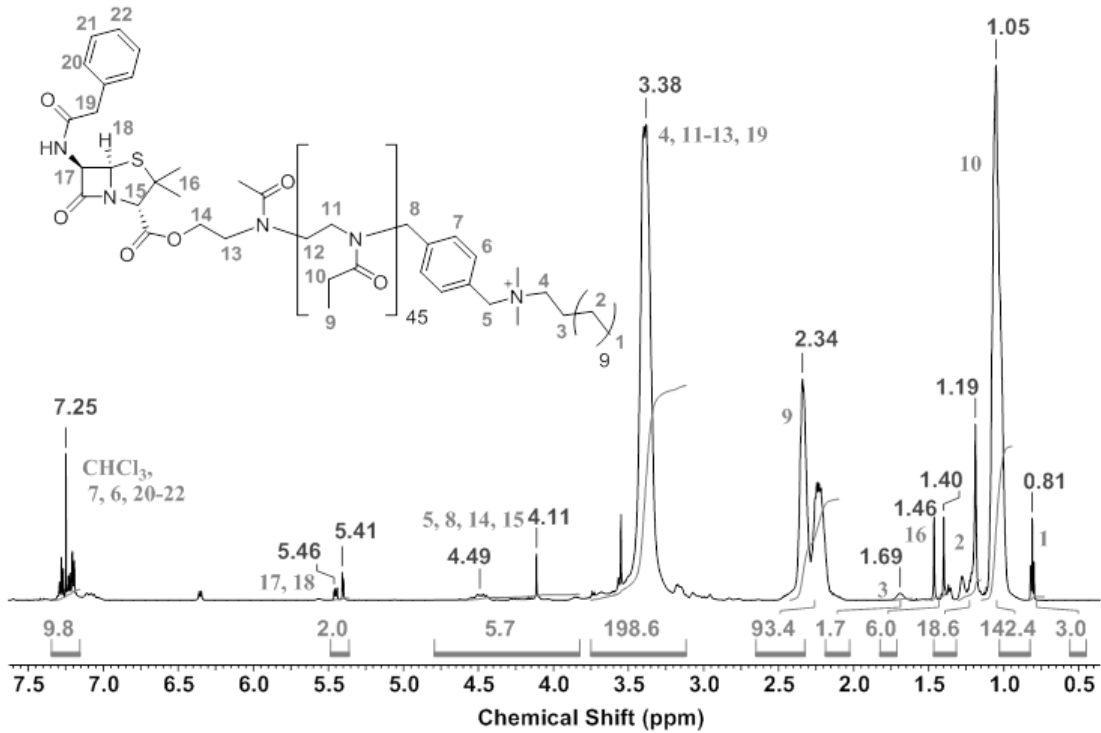


Abbildung 218: ^1H -NMR-Spektrum vom DDA-X-PEtOx₅₀-PenG.

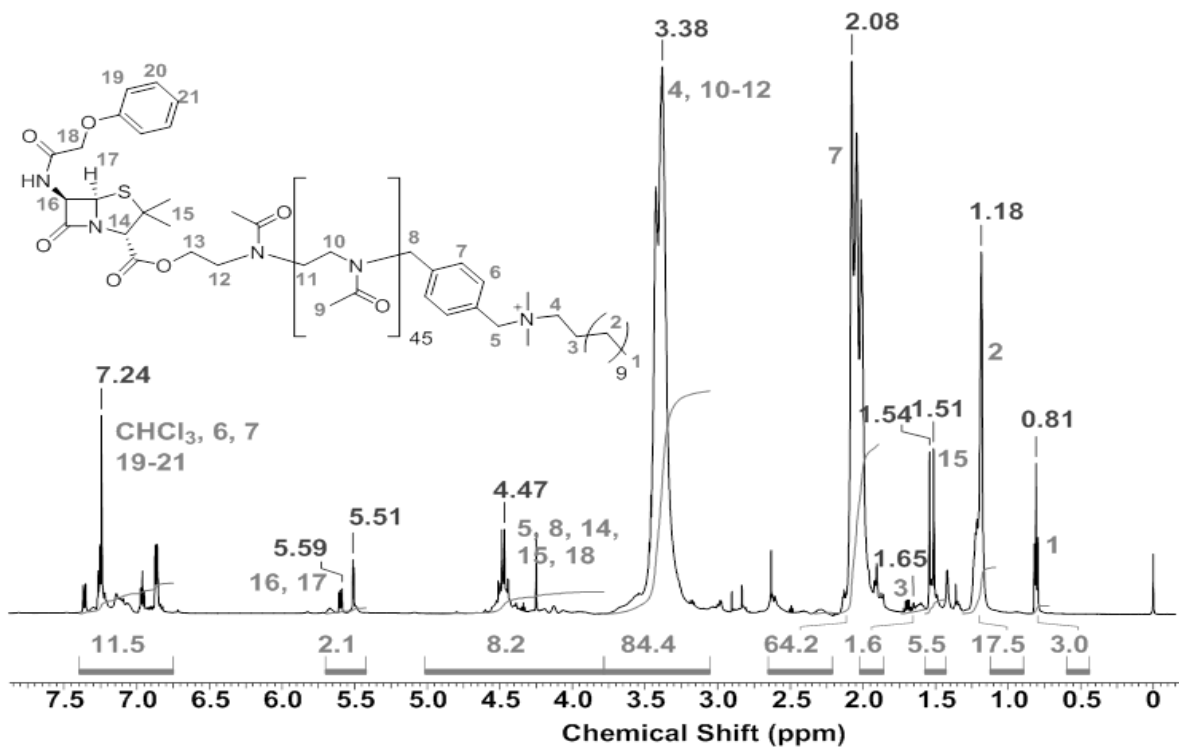


Abbildung 219: ^1H -NMR-Spektrum vom DDA-X-PMeOx₂₂-PenV.

Anhang

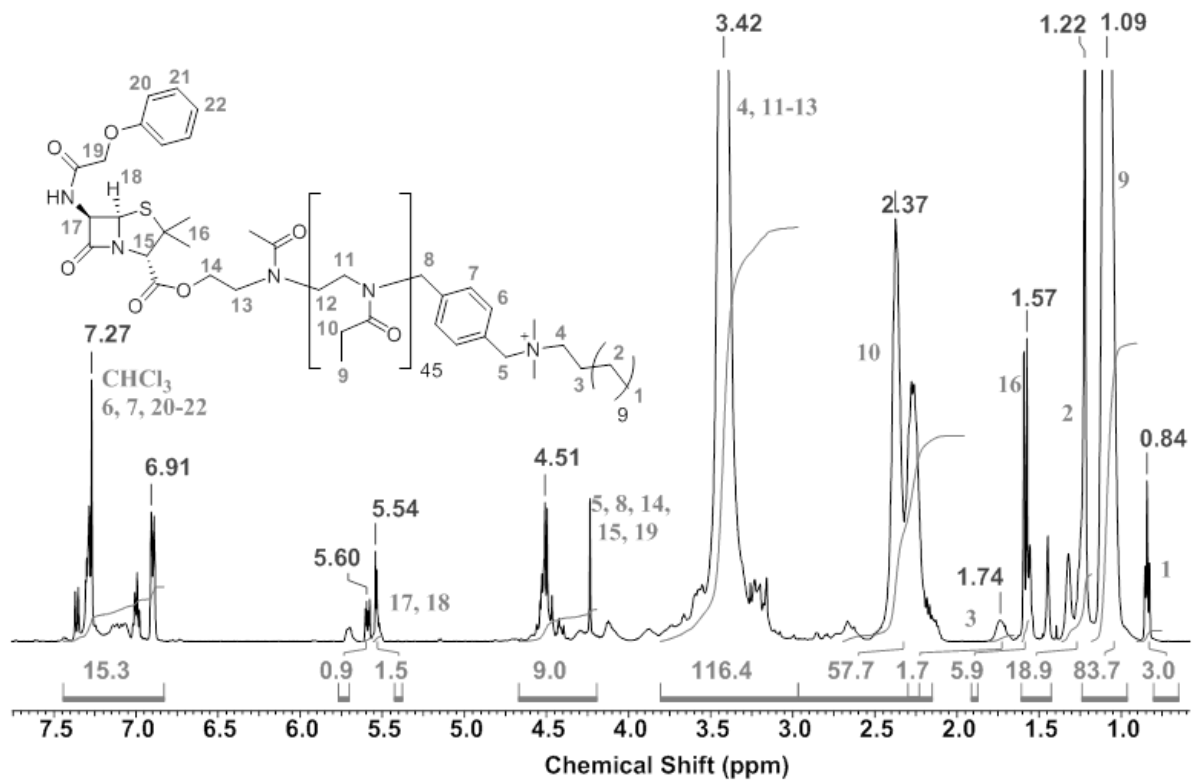


Abbildung 220: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom DDA-X-PEtOx₂₉-PenV.

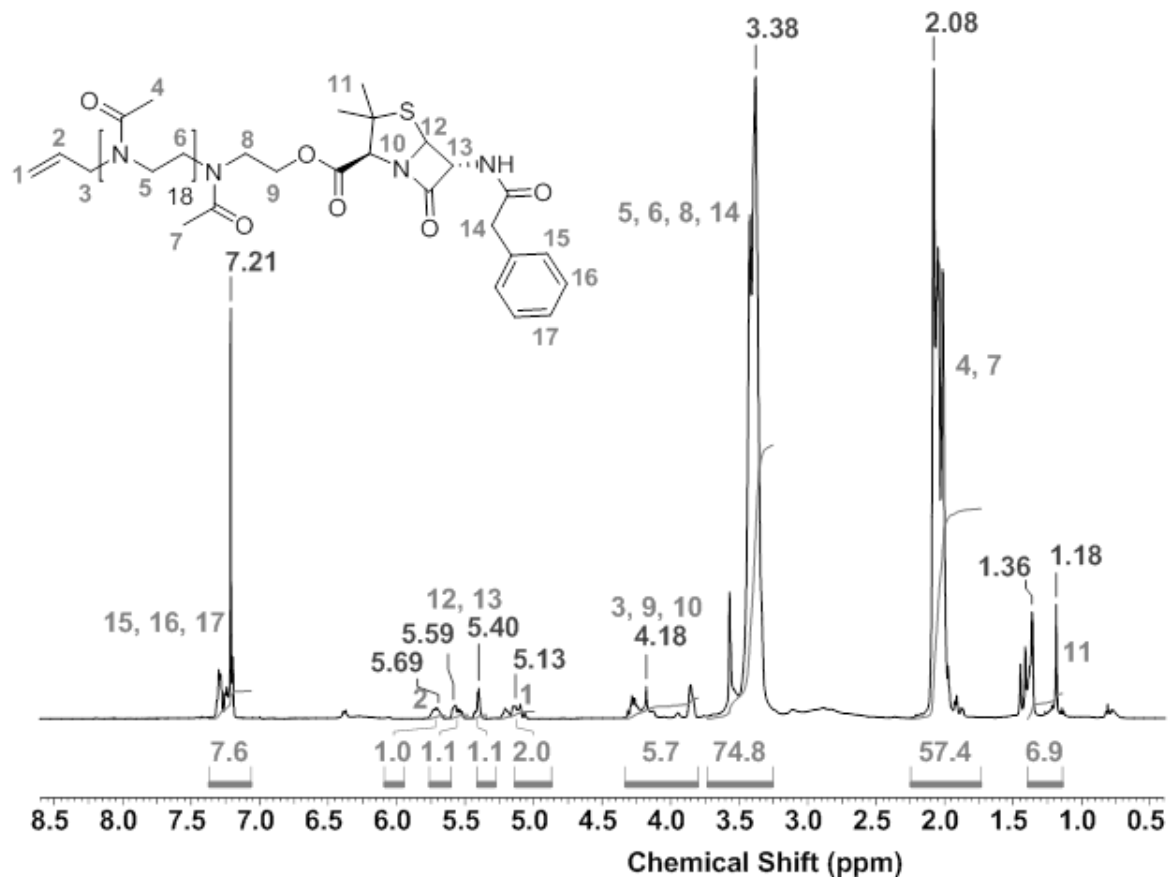


Abbildung 221: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Allyl-X-PMeOx₁₈-PenG.

Anhang

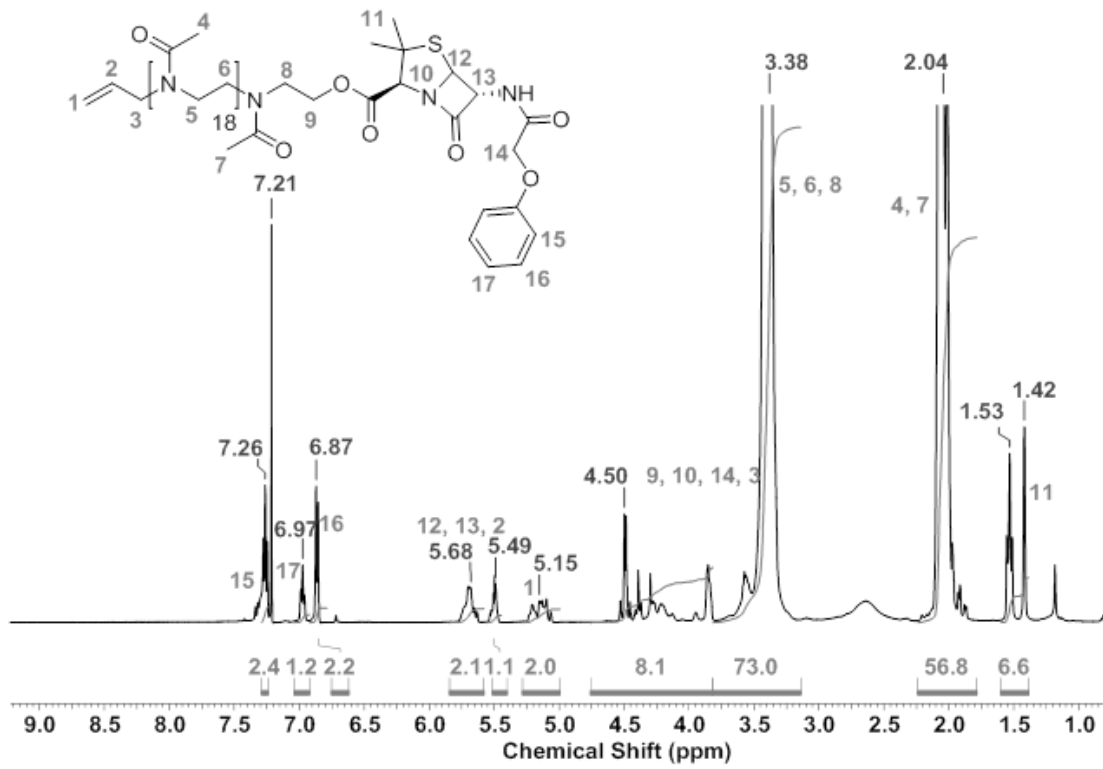
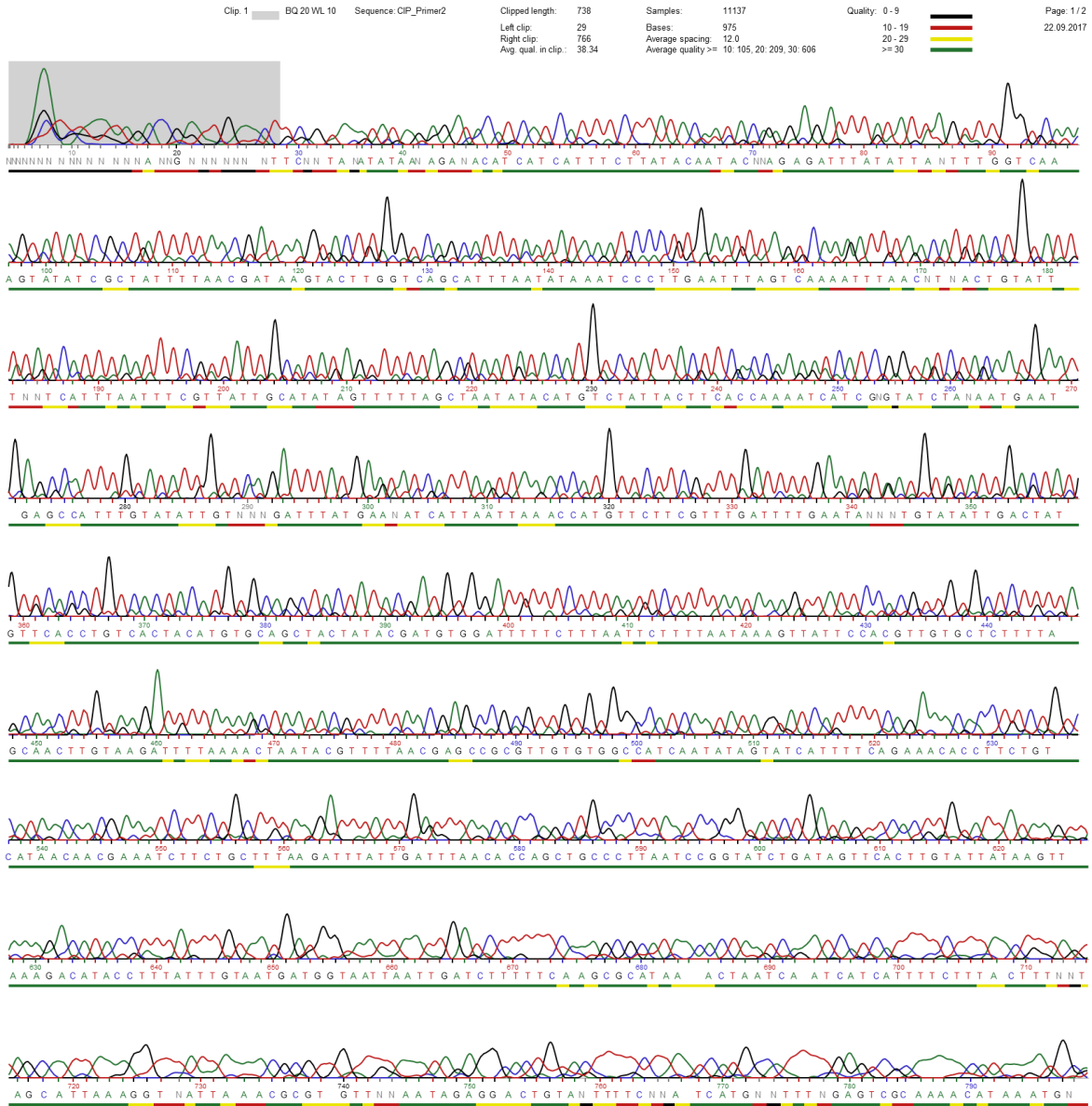


Abbildung 222: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Allyl-X-PMeO $_x$ -PenV.

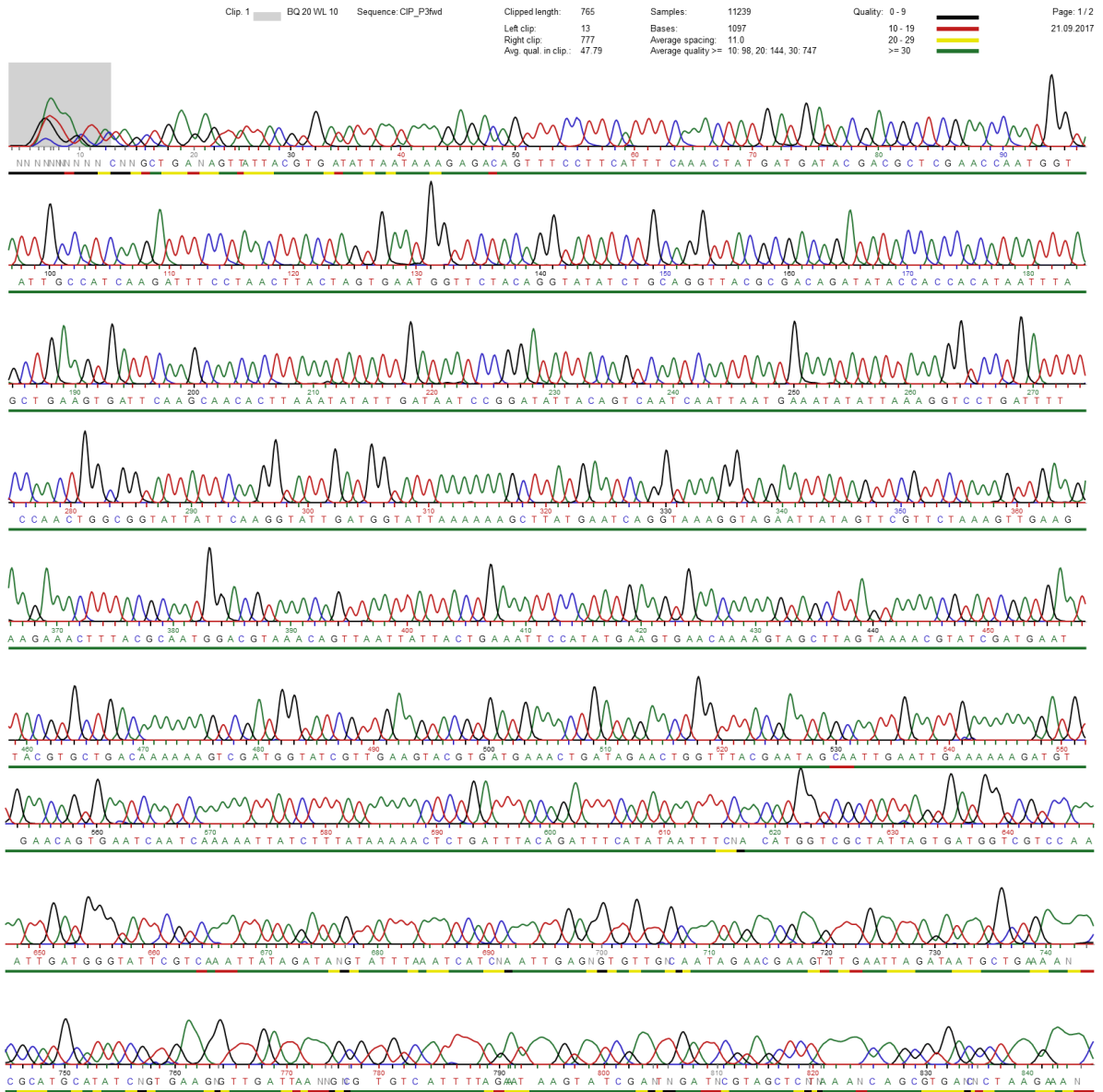
Anhang

Primer 2



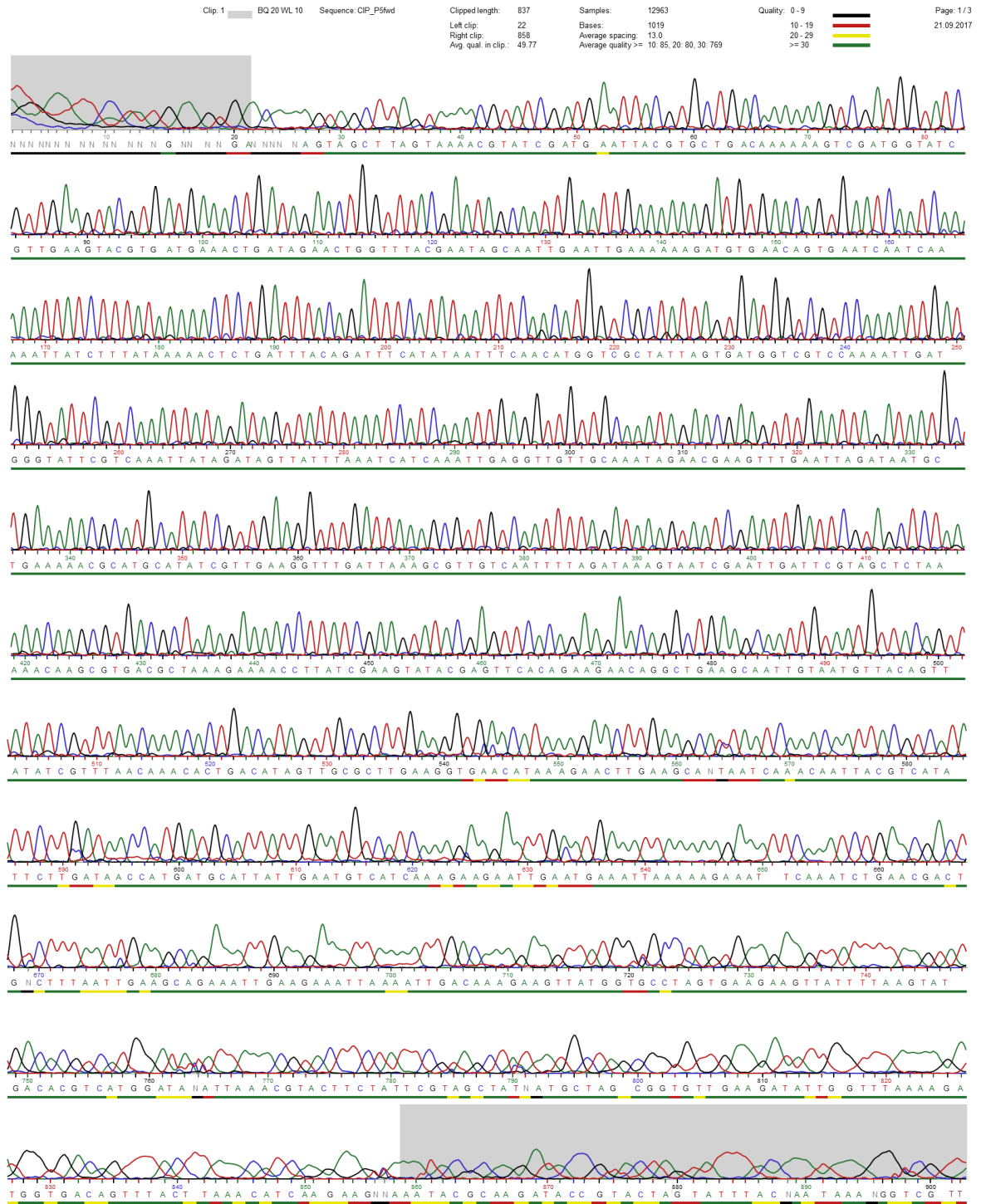
Anhang

Primer 3



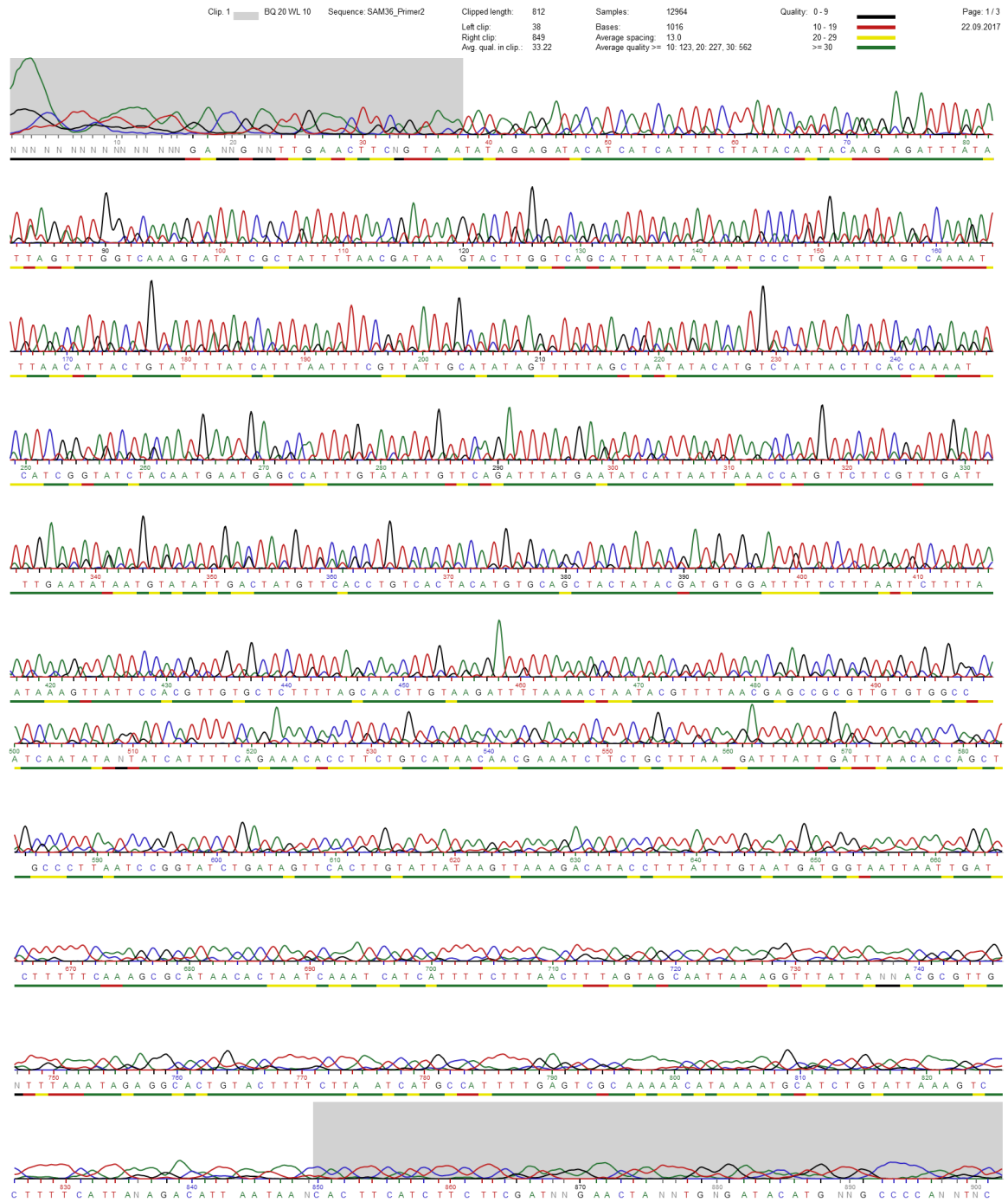
Anhang

Primer 5



Anhang

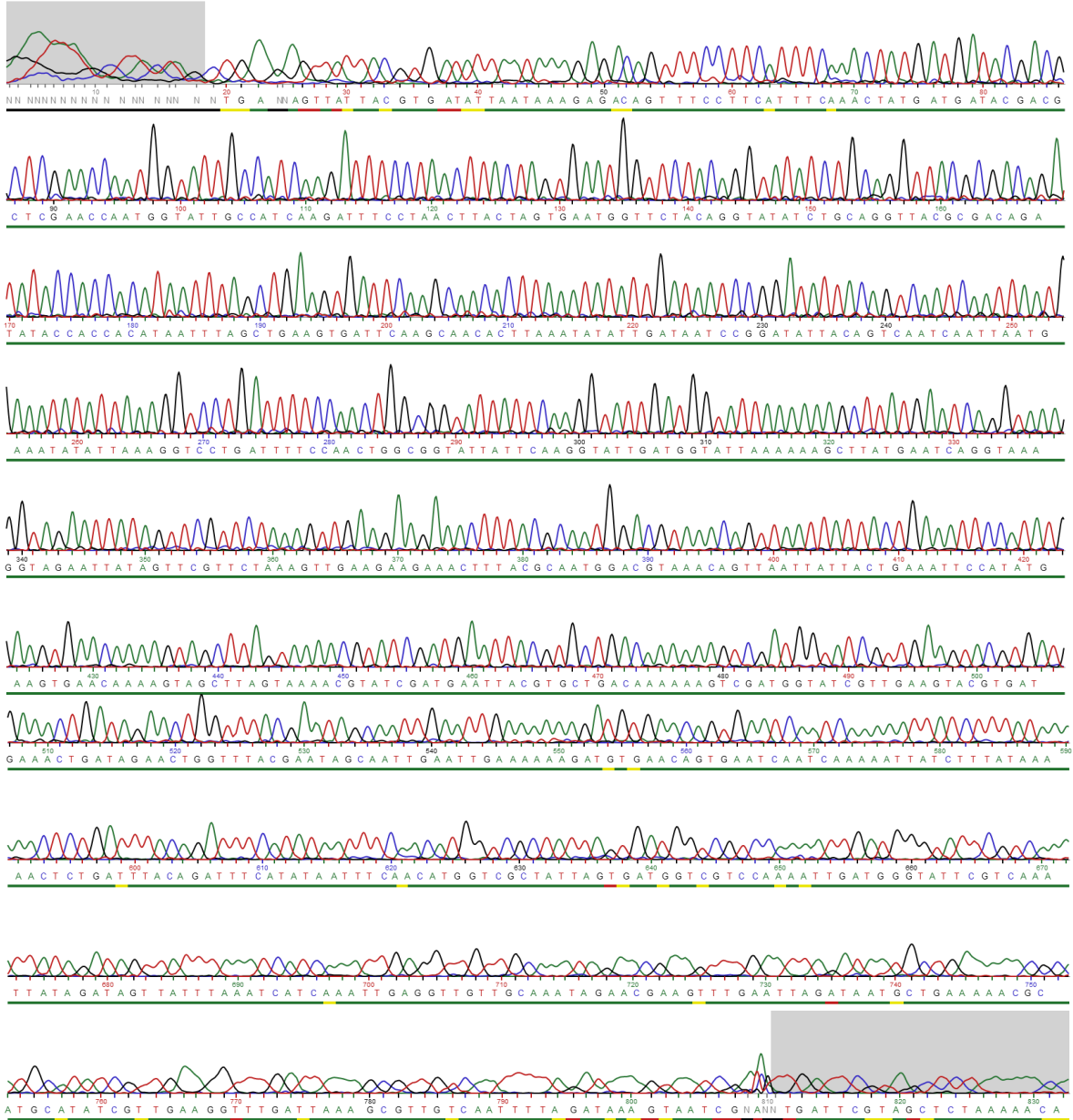
Primer 2



Anhang

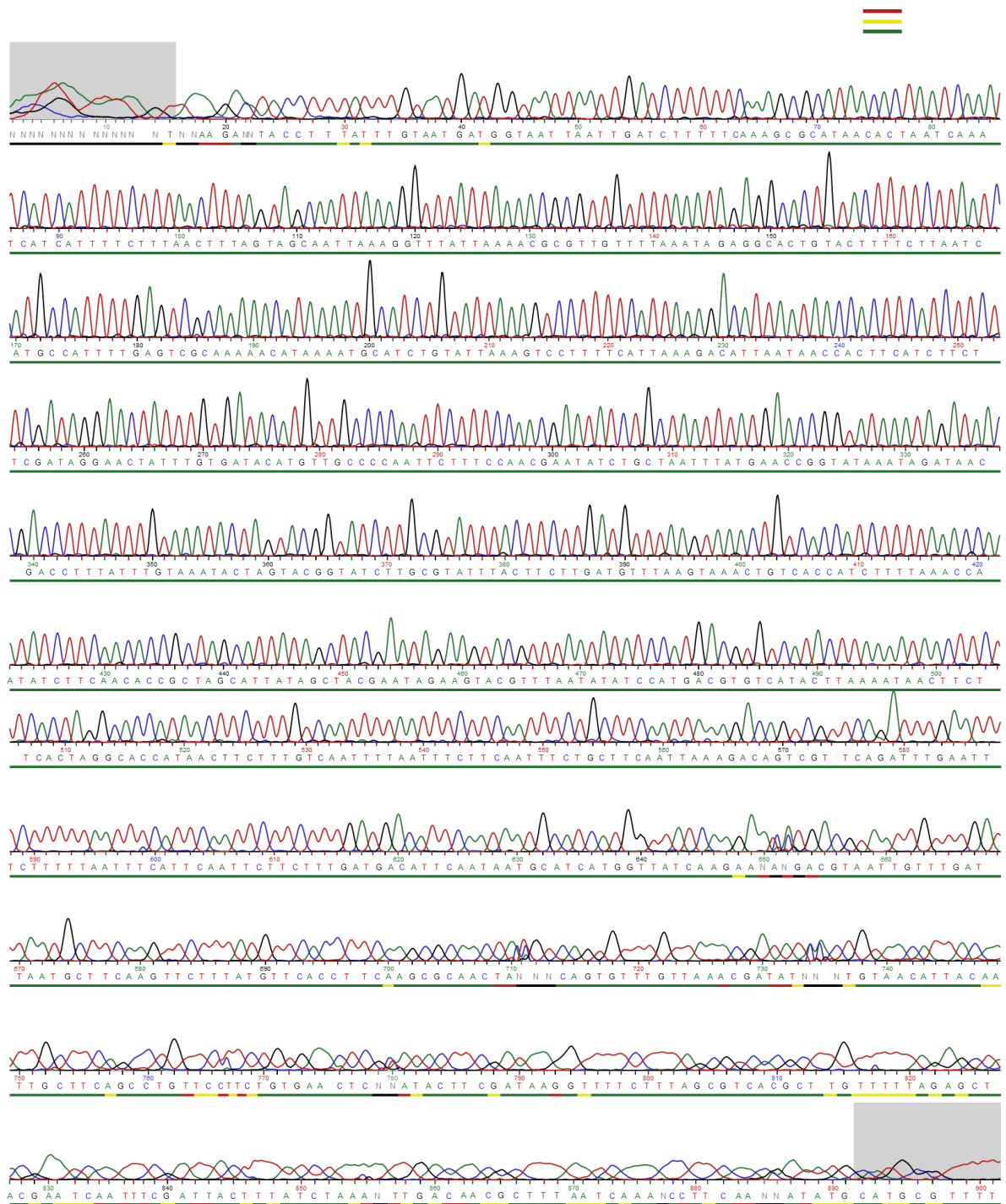
Primer 3

Clip: 1 BQ 20 WL 10 Sequence: SAM3E_P3fwd Clipped length: 792 Samples: 12962 Quality: 0 - 9 Page: 1/3
Left clip: 19 Bases: 1018
Right clip: 810 Average spacing: 13.0
Avg. qual. in clip.: 52.02 Average quality >= 10: 75, 20: 75, 30: 789 >= 30



Anhang

Primer 4



Anhang

Primer 5

