

Biokonjugation

Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition mit RAFT-Polymeren als Biokonjugationsplattform

Ana Beloqui, Shivshankar R. Mane, Marcel Langer, Mathias Glassner, Dennis M. Bauer, Ljiljana Fruk, Christopher Barner-Kowollik* und Guillaume Delaittre*

Abstract: Wir stellen die Biokonjugation von Polymeren vor, die durch RAFT-Polymerisation mittels Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition durch ihren inhärenten terminalen Thiocarbo-nylthioest mit einem dienmodifizierten Modellprotein synthetisiert wurden und keine spezifische funktionelle Endgruppe tragen. Die quantitative Konjugation erfolgt im Verlauf einiger Stunden bei Raumtemperatur und nahezu neutralem pH-Wert und in Abwesenheit jeglichen Katalysators. Unsere Technologieplattform liefert thermoresponsive Biokonjugate, deren Aggregation allein durch die Polymerketten gesteuert wird.

Proteine sind essentielle Verbindungen in der modernen Medizin und Biotechnologie. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften bringen jedoch kritische Einschränkungen mit sich, insbesondere in Bezug auf Löslichkeit und Stabilität.^[1] Eine der wichtigsten Methoden zur Lösung dieser Probleme beruht auf der Anbindung synthetischer Polymerketten, um so genannte Protein-Polymer-Konjugate (PPK) herzustellen.^[2–6] Das bahnbrechende und bisher am häufigsten verwendete Polymer für PPK ist Polyethylenglykol (PEG). Die Verwendung anderer Polymere als PEG ermöglicht jedoch den Zugang zu einem breiteren Eigenschaftsspektrum und kann einige Unzulänglichkeiten von PEG,^[7–12] insbesondere seine Immunogenität,^[13,14] umgehen. In diesem Zusammenhang ist die reversible Additionsfragmentierungs-Transfer (RAFT)-Polymerisation eine der leistungsfähigsten syntheti-

schen Techniken, um auf Makromoleküle mit definierter Kettenlänge und (Endgruppen-)Funktionalität zuzugreifen.^[15–17] Eine der Methoden zur Erzielung von PPK auf RAFT-Basis besteht darin, ein Ende des synthetischen Polymers mit einem oder mehreren Resten auf der Proteinoberfläche reagieren zu lassen. Normalerweise wird hierzu das reaktive Ende des RAFT-Polymers durch das reinitiiierende Fragment – die so genannte R-Gruppe – eines speziell entwickelten Kettenübertragungsmittels (CTA) eingeführt.^[12] Die RAFT-Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition (RAFT-HDA) wurde vor etwa einem Jahrzehnt als komplementäre und hocheffiziente Methode zur Kettenend-Konjugation von RAFT-Polymeren ohne die Notwendigkeit der Einführung funktioneller R-Gruppen entwickelt.^[18–22]

RAFT-HDA ist auf RAFT-Agenten angewiesen, die eine C=S-Doppelbindung mit spezifisch eingestellten Elektronenmangel besitzen. Letzterer sollte ausreichend hoch sein, um HDA mit einer Reihe von Dienen zu ermöglichen, jedoch nicht zu hoch, damit eine gut kontrollierte RAFT-Polymerisation stattfinden kann. Während RAFT-HDA in organischen Lösungsmitteln Wärme, Katalysatoren oder hochaktive Dienpartner (z. B. Cyclopentadien oder o-Chinodimethane) erfordert,^[18–22] haben wir bereits gezeigt, dass eine schnelle RAFT-HDA in wässrigen Lösungen einfach durch Mischen der Komponenten bei Umgebungstemperatur und in Abwesenheit eines Katalysators erreicht wird, auch mit weniger

[*] Dr. A. Beloqui, Dr. S. R. Mane, Prof. Dr. G. Delaittre
Institute of Biological and Chemical Systems (IBCS), Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Deutschland)

Dr. A. Beloqui, Dr. S. R. Mane, Dr. M. Langer, Dr. M. Glassner, Prof. Dr. C. Barner-Kowollik, Prof. Dr. G. Delaittre
Macromolecular Architectures, Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry (ITCP), Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Engesserstr. 18, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
E-Mail: christopher.barner-kowollik@kit.edu

Dr. A. Beloqui
Department of Applied Chemistry (UPV/EHU), Avda. Manuel de Lardizabal 3, E-20018 Donostia – San Sebastian (Spanien)

Dr. A. Beloqui
IKERBASQUE, Basque Foundation for Science
Maria Diaz de Haro 3, E-48013 Bilbao (Spanien)


Dr. D. M. Bauer, Dr. L. Fruk
Center for Functional Nanostructures (CFN), Karlsruhe Institute of Technology (KIT)
Wolfgang-Gaede-Straße 1a, 76131 Karlsruhe (Deutschland)


Dr. L. Fruk
Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge, West Cambridge Site, Philippa Fawcett Drive, Cambridge CB3 0AS (UK)

Prof. Dr. C. Barner-Kowollik
Centre for Materials Science, Queensland University of Technology (QUT), 2 George Street, Brisbane, QLD 4000 (Australien)

Prof. Dr. C. Barner-Kowollik
School of Chemistry and Physics, Queensland University of Technology (QUT), 2 George Street, Brisbane, QLD 4000 (Australien)
E-Mail: christopher.barnerkowollik@qut.edu.au

Prof. Dr. G. Delaittre
Organic Functional Molecules, Organic Chemistry, University of Wuppertal, Gaußstrasse 20, 42119 Wuppertal (Deutschland)
E-Mail: delaittre@uni-wuppertal.de

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <https://doi.org/10.1002/ange.202005747> zu finden.

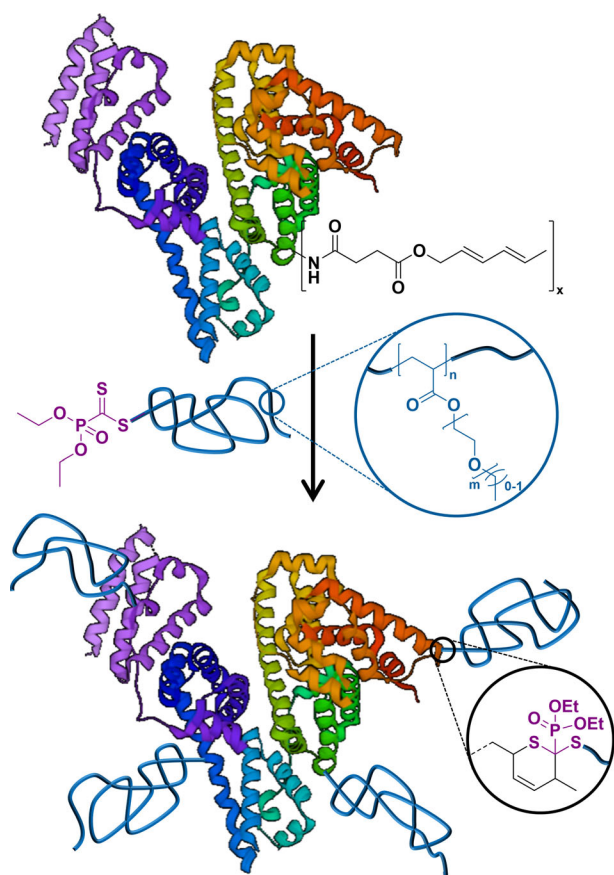
 © 2020 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

reaktiven Dienen.^[23] Solche milden Bedingungen scheinen ideal für die Funktionalisierung von Proteinen zu sein, die im Allgemeinen empfindlich auf Hitze oder Zusatzstoffe reagieren. Wichtig ist, dass die meisten, wenn nicht alle Cycloadditionen biorthogonal sind und somit eine ideale Plattform bieten, um Polymere spezifisch an Biomoleküle zu konjugieren.^[24] Im vorliegenden Beitrag berichten wir über die ersten Protein-Polymer-Konjugate, die über die RAFT-HDA-Route erhalten wurden (Schema 1).

Zunächst wurde eine Reihe von wasserlöslichen Acrylpolymeren auf der Basis von Ethylenglykol-Seitenketten synthetisiert: (i) Homopolymere von Triethylenglykol-Methylether-Acrylat (PmTEGA) und (ii) Copolymere von Diethylenglykol-Ethylether-Acrylat und Oligoethylenglykol-Methylether-Acrylat (P(eDEGA-co-mOEGA)). PmTEGA ist im nutzbaren Temperaturbereich von PPK wasserlöslich (<55–70°C)^[25–28] und kann den Proteinen einen *Stealth*-Charakter und eine verbesserte Löslichkeit verleihen. P(eDEGA-co-mOEGA)s weisen eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST) auf, die vom genauen Comonomer-Verhältnis abhängt,^[29,30] und bei möglicherweise nützlichen Temperaturen zu thermoresponsiven PPK führt. Responsive PPK^[31,32] sind besonders interessant für die Kontrolle der biomolekularen Aktivität,^[33] die gesteuerte reversible Selbstorganisation in biohybriden Nanostrukturen,^[34–38] sowie die schnelle Entfernung/Wiedergewinnung von Proteinen aus der

Lösung.^[39,40] Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ähnliche Polymere mit kurzen Oligoethylenglykol-Seitenketten nicht die ungewünschte Antigenität von PEG aufweisen.^[41] 2-Cyanoprop-2-yl-diethoxyphosphoryldithioformiat (CPDPDT) wurde als CTA eingesetzt, weil es gleichzeitig die kontrollierte Polymerisation von Acrylaten und die Synthese von Polymeren mit einer terminalen C=S-Bindung ermöglicht, die ausreichend elektronenarm ist, um eine schnelle HDA-Cycloaddition zu bewirken.^[23] Wie in Abbildung 1 gezeigt, wurden PmTEGAs mit zahlenmittleren Molmassen M_n von 2000 bzw. 6000 g mol^{-1} und geringen Dispersitäten ($D=1.1\text{--}1.2$) erhalten (**PmTEGA2000** bzw. **PmTEGA6000**). In ähnlicher Weise wurden P(eDEGA-co-mOEGA)s **CoP15000** bzw. **CoP18000**, mit M_n von 15000 bzw. 18000 g mol^{-1} ($D=1.3$) durch CPDPDT-vermittelte RAFT-Copolymerisation hergestellt. Alle Polymere zeigten das klassische Absorptionsmaximum bei 327 nm (Abbildung S8), charakteristisch für den $\pi\rightarrow\pi^*$ Übergang in der Diethoxyphosphoryldithioformiat-Endgruppe.

Für Biokonjugationsreaktionen, die nicht auf natürlichen Aminosäuren basieren, können reaktive Proteine entweder durch Gentechnik^[42] oder einfache posttranslationale chemische Modifikation^[43] gewonnen werden. Aufgrund seiner



Schema 1. Synthese von Bovin-Serumalbumin-Polymerkonjugaten durch RAFT-HDA, wie im vorliegenden Beitrag beschrieben.

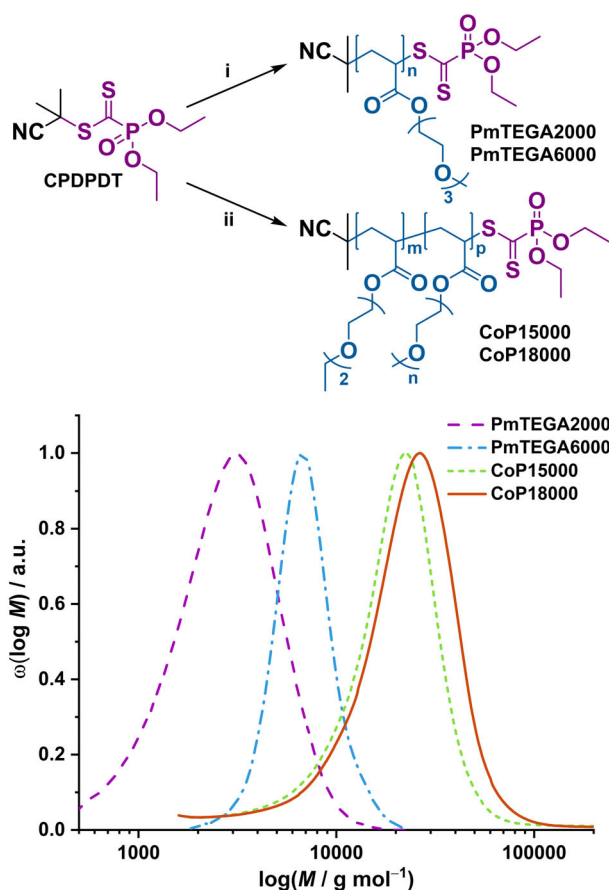


Abbildung 1. (Oben) Syntheseweg für Polyacrylate auf Oligoethylglykolbasis durch RAFT-Polymerisation in Gegenwart von 2-Cyanoprop-2-yl-diethoxyphosphoryldithioformiat (CPDPDT). (i) mTEGA, AIBN, Ethanol, 60°C. (ii) eDEGA:mOEGA 80/20 mol mol⁻¹, AIBN, Ethanol, 60°C. (Unten) Entsprechende SEC-Spuren.

einfachen Umsetzbarkeit haben wir uns hier für Letzteres entschieden. Um Dieneinheiten einzuführen, wurde der difunktionelle Linker 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl(hexa-2,4-dien-1-yl)succinat **DSS** (siehe Hintergrundinformationen), bestehend aus einer Sorbylgruppe und einem Succinimidylester auf beiden Seiten, in zwei einfachen Schritten synthetisiert und mit den Lysinresten des Modellproteins Bovin Serumalbumin (BSA) umgesetzt. Das dien-funktionalisierte BSA (**dBSA**) blieb im wässrigen Medium vollständig löslich und zeigte keine signifikante Veränderung im Zirkulardichroismus (CD)-Spektrum (Abbildung S14). Die massenspektrometrische Analyse zeigte die Einlagerung von durchschnittlich 6–7 Dien-Gruppen pro Proteinmolekül, d. h. $x = 6-7$ in Schema 1 (Abbildung S10).

Die Protein-Polymer-Konjugation wurde durch einfache Inkubation von **dBSA** mit den RAFT-Polymeren in wässrigen Puffern, in Abwesenheit von Katalysator und bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei den ersten Experimenten wurde beobachtet, dass die charakteristische violette Farbe der RAFT-Polymer-Stammlösungen in wässrigen Medien mit der Zeit verblasste. Es ist bekannt, dass RAFT-Endgruppen empfindlich auf eine Reihe von Reagenzien reagieren, meist primäre Amine und basische Bedingungen,^[44] und dass eine Verfärbung der RAFT-Polymere einen Endgruppenverlust impliziert. Aus diesem Grund untersuchten wir dieses Phänomen durch UV-Vis-spektroskopische Messungen von **PmTEGA6000**-Lösungen in verschiedenen wässrigen Puffern. Wie erwartet, führten die Grundbedingungen zur schnellsten Abnahme der Absorption bei 327 nm und damit zur schnellsten Deaktivierung (Abbildung S11). Insbesondere die Inkubation in Bicarbonatpuffer bei pH 9,15 oder Tris-Puffer bei pH 8,1 führte zu einem sofortigen vollständigen Abbau. Ein Phosphatpuffer bei gleichem pH-Wert war weniger schädlich. Ein Absinken des pH-Wertes führte weiterhin zu einem deutlich langsameren Abbau. Schließlich wurde Natriumphosphatpuffer (50 mM bei pH 6,0) für die Biokonjugation ausgewählt, da er den besten Kompromiss zwischen dem langsamen Abbau und nahezu neutralen Bedingungen bot. Bevor die Protein-Polymer-Konjugation untersucht wurde, wurden Modell-HDA-Konjugationsreaktionen mit **DSS** durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die Absorption bei 327 nm in Reaktionsgemischen aus **PmTEGA6000** und **DSS** im Vergleich zum Polymer allein signifikant schneller abnahm (Abbildung S12). Höhere Mengen an **DSS** (2 und 3 Äquivalente) führten zu einem schnelleren Verschwinden der charakteristischen RAFT-Teilabsorption, ein deutliches Zeichen für die an der C=S-Doppelbindung auftretende HDA-Reaktion.^[23]

Es wurde eine Reihe von Bedingungen geprüft, um die optimalen Bedingungen für die Biokonjugation von Polymeren zu bestimmen. Mischungen mit verschiedenen **PmTEGA6000**:**dBSA**-Molverhältnissen wurden in Natriumphosphatpuffer bei pH 6,0 in Übernacht-Reaktionen hergestellt. Wie in den durch SDS-PAGE erhaltenen Gelen und den entsprechenden Intensitätsplots (Abbildung 2 A) beobachtet, erzeugten höhere Polymer:Protein-Verhältnisse Spezies mit höheren Molmassen. Mit 80 Äq. und mehr wurden Konjugate mit durchschnittlich 6 bis 7 gepfropften Polymerketten erhalten, wie aus der ca. 40 kDa Verschiebung abgeleitet wurde. Es

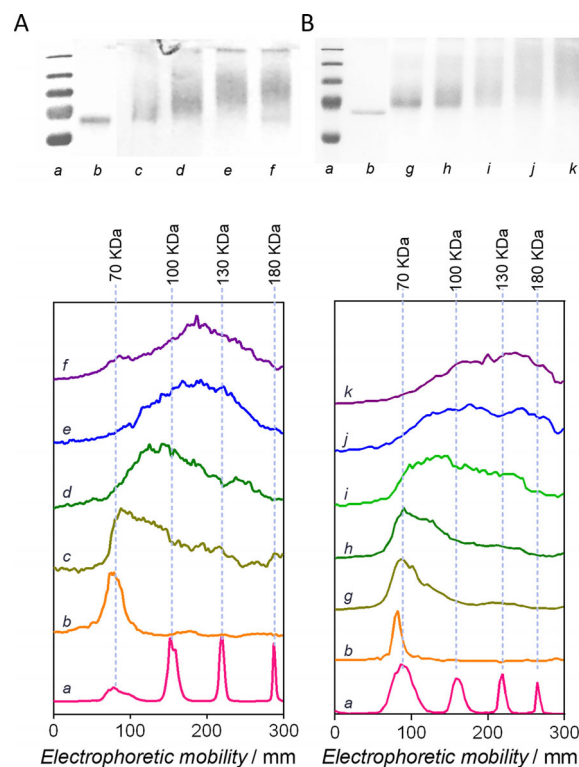


Abbildung 2. Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gele von BSA-Konjugaten, die durch RAFT-HDA mit **PmTEGA6000** erhalten wurden (oben) und entsprechende Elektrophoretogramme (unten). (A) Variation des **[PmTEGA6000]:[dBSA]**-Verhältnisses bei einer festen Reaktionszeit von 12 h: 25 (c), 50 (d), 80 (e), und 100 (f). (B) Variation der Reaktionszeit bei einem festen **[PmTEGA6000]:[dBSA]**-Verhältnis von 100: 1 h (g), 2 h (h), 4 h (i), 6 h (j) und 8 h (k). Die Molekulargewichts-Proteinleiter (a) und die Referenzprobe (b, **dBSA**) sind als Referenzen hinzugefügt.

kann daher angenommen werden, dass unter diesen Bedingungen alle zugänglichen Diengruppen innerhalb des Proteins über die HDA-Reaktion gekoppelt wurden. Darüber hinaus wurde die Kinetik der Reaktion mit einem 100-fachen molaren Überschuss an Polymer überwacht (Abbildung 2 B). Die Reaktion wurde zu verschiedenen Inkubationszeiten gestoppt, indem das nicht reagierte **PmTEGA6000** durch Zentrifugation unter Größenausschluss entfernt wurde. Wir beobachteten, dass die Konjugation der ersten beiden Polymerketten an **dBSA** innerhalb von nur 1–2 h erfolgte, wobei das vollständig konjugierte Protein nach 6 h erhalten wurde. Die ersten leicht erreichbaren Dienmoleküle könnten schnell reagieren, während die Anlagerung weiterer Polymerketten an tiefer liegenden Dienen und aufgrund der zunehmenden sterischen Einschränkungen durch bereits gepfropfte Polymerketten sicherlich verlangsamt wird. Darüber hinaus wurde die erfolgreiche Herstellung der Konjugate **dBSA-PmTEGA2000** und **dBSA-PmTEGA6000** auch durch eine Verschiebung der hydrodynamischen Durchmesser-Verteilung im Vergleich zu der des freien Proteins bestätigt, die durch dynamische Lichtstreuung (DLS) gemessen wurde (Abbildung S13). Auch hier war die Protein-Sekundärstruktur von der Modifikation nicht betroffen, wie die CD zeigt (Abbildung S14). BSA ist zwar kein Enzym, besitzt aber eine Esterase-Aktivität, die zur weiteren Beurteilung von Modi-

fikationen genutzt werden kann. In einem kolorimetrischen Esterase-Test auf Glycerylacetatbasis (Abbildung S16) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen BSA und **dBSA-PmTEGA6000** beobachtet, was die Erhaltung der Proteinstruktur und -stabilität bestätigt.

Die Konjugation von funktionellen Polymeren an Proteine führt zu PPK mit spezifischen Eigenschaften. Hier wurde die RAFT-HDA-Konjugation mit den thermoresponsiven P(eDEGA-co-mOEGA)-Copolymeren **CoP15000** und **CoP18000** durchgeführt (siehe Abbildung 1). DLS-Messungen zeigten einen signifikanten Zuwachs des durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmessers von $6,5 \pm 0,8$ nm für **dBSA** auf $7,9 \pm 1,2$ und $9,1 \pm 1,5$ nm nach der Konjugationsreaktion mit **CoP15000** bzw. **CoP18000** (Abbildung 3), was die erfolgreiche Konjugation bestätigt. Wie bei **PmTEGA6000** zeigten die CD-Messungen keine Veränderung der Sekundärstruktur von BSA durch die Pfropfung von **CoP15000** und **CoP18000** (Abbildung S15).

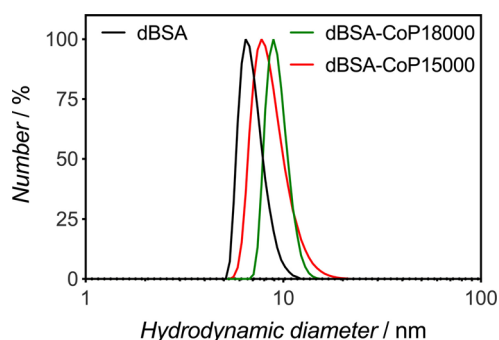


Abbildung 3. Zahlenbasierte hydrodynamische Durchmesser-Verteilungen für BSA-Konjugate, die durch RAFT-HDA mit den P(eDEGA-co-mOEGA)-Copolymeren **CoP15000** und **CoP18000** erhalten wurden. **dBSA** ist als Referenz dargestellt.

Das thermoresponsive Verhalten der neu erzeugten BSA-Konjugate wurde anschließend ausgewertet. P(eDEGA-co-mOEGA)-Copolymere zeigen typischerweise ein abstimmbares thermoresponsives Verhalten über den Bereich von 25–75 °C, abhängig von ihrer Comonomerzusammensetzung und Molmasse.^[29,30] Der thermische Übergang ist leicht über eine Zunahme der Trübung der Probe nachweisbar, die mit einem UV-Vis-Spektrophotometer gemessen werden kann (Abbildung 4A). Wir legten eine Heizrampe von 40 bis 55 °C auf wässrige Lösungen der Polymere **CoP15000** und **CoP18000** an und überwachten die Absorption bei 670 nm, einer Wellenlänge, bei der keine Interferenz mit möglichen Chromophoren auftreten kann. Wir beobachteten, dass, während **CoP18000** bei Temperaturen über 45 °C eine Trübung zeigte, die Trübung der **CoP15000**-Probe erst über 48 °C festgestellt werden konnte. Für die Polymere **CoP15000** und **CoP18000** haben wir Trübungspunkte (Temperatur bei 50 % der maximalen Absorption) von 49,5 und 46,5 °C gemessen.

Schließlich untersuchten wir, wie sich die thermoresponsiven Eigenschaften von P(eDEGA-co-mOEGA)-Copolymeren auf ihre entsprechenden BSA-Konjugate übertragen ließen. Es sollte beachtet werden, dass sich BSA zuvor als

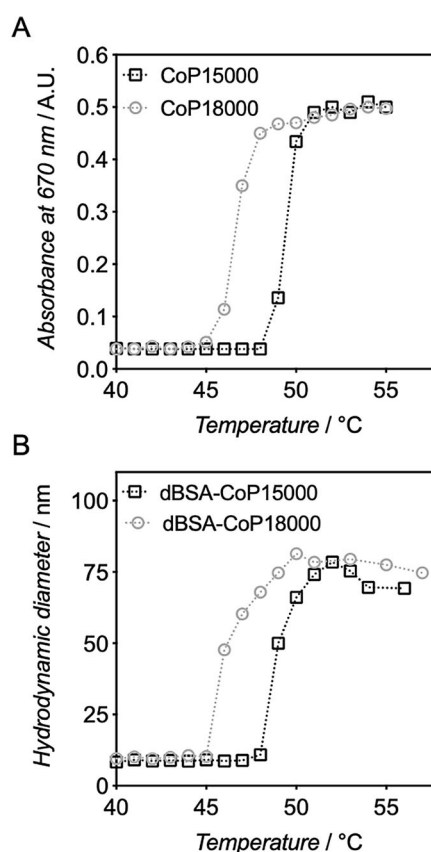


Abbildung 4. (A) Entwicklung der bei 670 nm mit steigender Temperatur gemessenen Trübung für wässrige Lösungen von **CoP15000** und **CoP18000** (15 µM in PBS). (B) Entwicklung der zahlenmittleren hydrodynamischen Durchmesser der Konjugate **dBSA-CoP15000** und **dBSA-CoP18000** mit der Temperatur, gemessen mit DLS. In beiden Fällen wurden die Messungen in 1 °C-Schritten und einer Stabilisierungszeit von 5 Minuten vor der Aufnahme durchgeführt.

stabil im betrachteten Temperaturbereich (d.h. unter 60 °C) erwiesen hat^[45,46] und dass in jedem Fall die Übergangstemperaturen durch Variation der Zusammensetzungen der Copolymere moduliert werden könnten. Da die Trübung des Mediums die temperaturinduzierte Aggregation der Polymerkomponenten implizierte, wird erwartet, dass die Gesamtgröße der PPK bei Temperaturen höher als der LCST zunimmt, wobei die Proteinkomponente die Aggregate stabilisiert.^[34] Die gereinigten PPK wurden daher einer Aufheizrampe unterzogen und gleichzeitig der hydrodynamische Durchmesser der Partikel gemessen. Wie in Abbildung 4B dargestellt, erhöhte sich der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser von $7,9 \pm 1,2$ bzw. $9,1 \pm 1,5$ nm bei 40 °C auf 69 ± 5 bzw. 77 ± 4 nm bei 55 °C für die Konjugate **dBSA-CoP15000** bzw. **dBSA-CoP18000**. Interessanterweise stimmen die Startwerte der Aggregation der PPK gut mit denen überein, die für die Polymere allein gemessen wurden und die Trübungspunkte nehmen nur leicht ab: 48,6 und 45,8 °C für **dBSA-CoP15000** bzw. **dBSA-CoP18000** gegenüber 49,5 und 46,5 °C für die entsprechenden freien Polymere. Die Polymere sind physikalisch an das Protein-Gegenstück gebunden, und das Protein scheint die temperaturinduzierte physikalische Aggregation der Polymere nicht signifikant zu stören.

Zusammenfassend stellen wir die Anwendung der RAFT-HDA-Chemie zur katalysatorfreien Protein-Polymer-Konjugation unter milden Bedingungen (Umgebungstemperatur, nahezu neutraler pH-Wert) vor. Mit dieser Methode haben wir die Oberfläche von BSA sowohl mit bis zu 7 hydrophilen Polymerketten als auch mit thermoresponsiven Polymeren ausgestattet. Die Reaktion des dienfunktionalisierten Proteins mit dem RAFT-basierten Diethoxyphosphoryldithioester-Polymer ist relativ schnell, pH-abhängig und kann mittels UV-Vis-Spektroskopie und SDS-PAGE überwacht werden. Letztendlich zeigen wir, dass die thermoresponsiven Eigenschaften der Polymere auf die Protein-Polymer-Konjugate übertragen werden und ähnliche Phasentrennungstemperaturen aufweisen. Das derzeitige Verfahren beinhaltet eine Vorkonditionierung des Proteins durch kovalente Verankerung reaktiver Dien-Gruppen. Eine weitere Steuerung des Biokonjugationsgrades und -ortes ist sicherlich durch die Einführung einer genetisch kodierten unnatürlichen Aminosäure, die die Diengruppe enthält, möglich.^[42,47]

Danksagung

A.B. dankt der Spanischen Forschungsagentur (AEI) für die Mittel im Rahmen des Programms Ramón y Cajal (RYC2018-025923-I) und Retos Aufruf (PID2019-110239RB-I00). C.B.-K. bedankt sich für die Finanzierung durch das Australian Research Council (ARC) im Rahmen eines Laureate Fellowships sowie die kontinuierliche maßgebliche Unterstützung durch die Queensland University of Technology (QUT) im Rahmen des Centers for Materials Science. G.D. dankt dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Fördermittel Nr. 031A095C) für die finanzielle Unterstützung (Molecular Interaction Engineering Program, Biotechnologie 2020). Dem Levkin-Labor (IBCS, KIT) wird für den Zugang zum DLS gedankt. Dank gilt Frank Kirschhöfer, Boris Kühn und Dr. Gerald Brenner-Weiss (IFG, KIT) für den Zugang zu und die Unterstützung bei der MALDI-ToF-Spektrometrie. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

-
- [1] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne, D. S. Katayama, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 544–575.
 [2] B. Le Droumaguet, J. Nicolas, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 563–598.
 [3] M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1352–1373.
 [4] J. H. Ko, H. D. Maynard, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8998–9014.
 [5] A. J. Russell, S. L. Baker, C. M. Colina, C. A. Figg, J. L. Kaar, K. Matyjaszewski, A. Simakova, B. S. Sumerlin, *AIChE J.* **2018**, *64*, 3230–3245.
 [6] T. A. Wright, R. C. Page, D. Konkolewicz, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 434–454.

- [7] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6430–6452.
 [8] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1900–1918.
 [9] E. M. Pelegri-O'Day, E.-W. Lin, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14323–14332.
 [10] Y. Qi, A. Chilkoti, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 181–193.
 [11] T. T. Hoang Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, N. P. Truong, *Polymers* **2020**, *12*, 298.
 [12] J. Morgenstern, G. Gil Alvaradejo, N. Bluthardt, A. Belouqui, G. Delaittre, J. Hubbuch, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4250–4262.
 [13] R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette, *Expert Opin. Drug Delivery* **2012**, *9*, 1319–1323.
 [14] H. Schellekens, W. E. Hennink, V. Brinks, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1729–1734.
 [15] C. Barner-Kowollik, *Handbook of RAFT Polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
 [16] S. Perrier, *Macromolecules* **2017**, *50*, 7433–7447.
 [17] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 1634–1644.
 [18] S. Sinnwell, A. J. Inglis, T. P. Davis, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.* **2008**, 2052–2054.
 [19] A. J. Inglis, S. Sinnwell, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2411–2414; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2447–2450.
 [20] J. P. Blinco, V. Trouillet, M. Bruns, P. Gerstel, H. Gliemann, C. Barner-Kowollik, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4435–4439.
 [21] M. Glassner, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 83–87.
 [22] K. K. Oehlenschlaeger, J. O. Mueller, N. B. Heine, M. Glassner, N. K. Guimard, G. Delaittre, F. G. Schmidt, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 762–766; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 791–796.
 [23] M. Glassner, G. Delaittre, M. Kaupp, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7274–7277.
 [24] G. Delaittre, N. K. Guimard, C. Barner-Kowollik, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1296–1307.
 [25] F. Hua, X. Jiang, D. Li, B. Zhao, *J. Polym. Sci. Part A* **2006**, *44*, 2454–2467.
 [26] O. Grimm, S. C. Maßmann, F. H. Schacher, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 2674–2685.
 [27] G. Vancoillie, D. Frank, R. Hoogenboom, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1074–1095.
 [28] N. Badi, *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *66*, 54–79.
 [29] K. Skrabania, J. Kristen, A. Laschewsky, Ö. Akdemir, A. Hoth, J. F. Lutz, *Langmuir* **2007**, *23*, 84–93.
 [30] C. Boyer, M. R. Whittaker, M. Luzon, T. P. Davis, *Macromolecules* **2009**, *42*, 6917–6926.
 [31] I. Cobo, M. Li, B. S. Sumerlin, S. Perrier, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 143–159.
 [32] B. Trzebicka, R. Szweda, D. Kosowski, D. Szweda, Ł. Otulakowski, E. Haladjova, A. Dworak, *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *68*, 35–76.
 [33] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 517–525.
 [34] C. Lavigneur, J. G. García, L. Hendriks, R. Hoogenboom, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 333–340.
 [35] H. Li, M. Li, X. Yu, A. P. Bapat, B. S. Sumerlin, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1531.
 [36] C. K. Wong, A. J. Laos, A. H. Soeriyadi, J. Wiedenmann, P. M. G. Curmi, J. J. Gooding, C. P. Marquis, M. H. Stenzel, P. Thordarson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5317–5322; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 5407–5412.
 [37] D. Moatsou, J. Li, A. Ranji, A. Pitto-Barry, I. Ntai, M. C. Jewett, R. K. O'Reilly, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1890–1899.

- [38] L. Jiang, J. S. Bonde, L. Ye, *Macromol. Chem. Phys.* **2018**, *219*, 1700597.
- [39] I. Mukherjee, S. K. Sinha, S. Datta, P. De, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2286–2293.
- [40] Y. Wu, Z. Cai, S. Wu, W. Xiong, S. Ma, *Biopolymers* **2018**, *109*, e23222.
- [41] Y. Qi, A. Simakova, N. J. Ganson, X. Li, K. M. Luginbuhl, I. Ozer, W. Liu, M. S. Hershfield, K. Matyjaszewski, A. Chilkoti, *Nat. Biomed. Eng.* **2016**, *1*, 2.
- [42] J. W. Chin, *Nature* **2017**, *550*, 53–60.
- [43] E. Baslé, N. Joubert, M. Pucheault, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213–227.
- [44] A. B. Lowe, C. L. McCormick, in *Handb. RAFT Polym.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 235–284.
- [45] A. Michnik, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2003**, *71*, 509–519.
- [46] V. A. Borzova, K. A. Markossian, N. A. Chebotareva, S. Y. Kleymenov, N. B. Poliansky, K. O. Muranov, V. A. Stein-Margolina, V. V. Shubin, D. I. Markov, B. I. Kurganov, *PLoS One* **2016**, *11*, e0153495.
- [47] A. H. St. Amant, F. Huang, J. Lin, K. Rickert, V. Oganessian, D. Lemen, S. Mao, J. Harper, M. Marelli, H. Wu, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 8489–8493; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 8577–8581.

Manuscript received: April 20, 2020

Accepted manuscript online: July 30, 2020

Version of record online: ■■■■■, ■■■■■

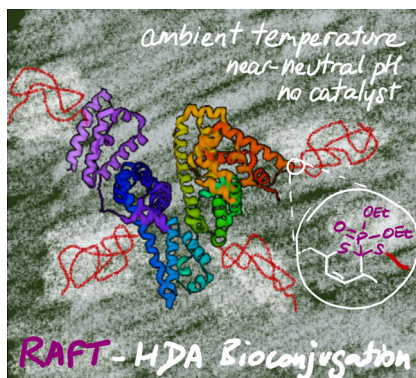
Zuschriften



Bikonjugation

A. Beloqui, S. R. Mane, M. Langer,
M. Glassner, D. M. Bauer, L. Fruk,
C. Barner-Kowollik,*
G. Delaittre* _____ ■■■■-■■■■

Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition mit
RAFT-Polymeren als
Bikonjugationsplattform



Polymere, die durch RAFT-Polymerisation mit Thiocarbonylthio-Transfer-Agentien mit einer elektronenarmen Kohlenstoff-Schwefel-Doppelbindung erhalten werden, werden durch Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition biokonjugiert, ohne dass andere reaktive Endgruppen erforderlich sind. Diese Ligation erfolgt über einige Stunden, bei Raumtemperatur und nahezu neutralem pH-Wert, ohne Katalysator.