

Synthese und funktionelle Dekoration bioaktiver Polymer-Materialien

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Andreas Peter Krause
geboren am 30.07.1983 in Salzgitter-Bad

2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2009 bis Mai 2012 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Koreferent: Prof. Dr. Mike Boysen

Tag der Promotion: 20.07.2012

Zusammenfassung

Andreas Peter Krause

Synthese und funktionelle Dekoration bioaktiver Polymer-Materialien

Schlagworte: Alginat - *tissue engineering* – Hydrogel – bioartifizielle Herzmuskel – bioorthogonale und Metall-freie Ligation – sequentielle und doppelte *Click* Prozesse

Die demographische Entwicklung weist eine immer älter werdende Bevölkerung in industrialisierten Ländern aus, gleichzeitig steigt der Bedarf an medizinischen Therapien. Insbesondere die Behandlung von Geweben im menschlichen Körper bedarf neuer, verbesserter Konzepte. Neue Behandlungsmethoden die eine Regeneration, einen vollständigen oder teilweisen Ersatz geschädigter Organe erlauben, könnten die medizinische wie auch wirtschaftliche Situation nachhaltig verbessern. Um die Herstellung bioartifizieller Organe oder Teile dessen in Zukunft zu realisieren, bedarf es funktioneller Gewebe. Die Präparation dieser Gewebe ist das Gebiet des *tissue engineering*, ein wesentliches Segment der Regenerativen Medizin.

Im Rahmen der Arbeit wurde das Biopolymer Alginat chemisch so gezielt modifiziert, dass dieses als biointelligentes *scaffold* für die Kultivierung von Herzmuskelgeweben eingesetzt werden konnte. Als adäquate Gerüst-Körper stellten sich Hydrogele heraus, welche in zwei unterschiedlichen Methoden präpariert wurden. Initial wurden methacrylierte Alginat, Hyaluronsäure und Gelatine radikalisch vernetzt. Dieses Verfahren generierte vorgeformte Gel-Körper. Zur Kultivierung von Myokardien wurden anschließend Zellmischungen aus Fibroblasten und Cardiomyocyten, die aus neonatalen Rattenherzen isoliert wurden, auf den Gelen ausgesiedelt. Da die kleinporige Struktur der Gele ein homogenes Einwachsen der Zellen inhibierte, konnten autonome Myokardien über diesen Ansatz jedoch nicht gezüchtet werden.

Deshalb wurde ein *in situ* gelierendes System entwickelt, was die Zugabe von Zellen vor der Gelbildung ermöglichte. Die in wässrigen Medien, bei Raumtemperatur, additivfrei ablaufende *in situ* Gelierung basiert auf Aldehydo- und Hydrazido-modifizierten Alginaten, die kovalent über Hydrazone verknüpft werden. Unter Beigabe von Collagen konnten komplexe dreidimensionale Herzmuskeln innerhalb von 14 Tagen gezüchtet werden. Anschließend wurde die Substitution des Collagens durch Konjugation definierter Adhäsionsfaktoren an das Alginat verfolgt. Dies konnte durch die bioorthogonale Ligation von zyklischen RGDfK-Pentapeptiden an Oxanorbornadien-modifizierte Alginat erreicht werden. Die per Literatur als *Click* Reaktionen definierten Ligations- und Vernetzungsschritte konnten sowohl in Form eines sequentiellen, als auch in einem doppelten *Click*-Prozesses am Alginat durchgeführt werden. Schließlich konnte die Adhäsion von Cardiomyocyten an RGD-funktionalisierte, *in situ* gelierte Alginat-Hydrogele, hergestellt über den schrittweisen *Click*-Prozess, gezeigt werden.

Abstract

Andreas Peter Krause

Synthesis and functional Decoration of bioactive Polymer-Materials

Keywords: alginate - tissue engineering – hydrogel – bioartificial cardiac tissue - bioorthogonal and metal free ligation – sequential and double click reaction

The demographic evolution depicts a growing older population in industrialized countries with a related increasing demand of medical therapies. In particular the treatment of soft parts within the human body requires novel concepts. Therefore new methods of treatment need to be developed which enable regeneration, replacement or reparation of organs, tissues or parts of it. These approaches could improve the situation for patients sustainable. In order to build up bioartificial organs functional tissues are required, this leads to the field of tissue engineering, an important area of regenerative medicine.

In this work, the biopolymer alginate was selectively modified, yielding bio-intelligent scaffolds for the cultivation of cardiac heart tissues. Hydrogels were proven to be the adequate constructs, obtained *via* two different approaches. In a first attempt, methacrylic alginate, hyaluronic acid and gelatine were cross-linked radically to give pre-mould gels. Afterwards cellmixtures of fibroblasts and cardiomyocytes, isolated from neonatal rat hearts, were seeded on the preformed gel samples. As the small porous structures of the gels inhibited cell ingrowth, complex cardiac tissues were not successfully cultivated.

In a second technique an optimized *in situ* gelling system was developed, which allowed to add the cells before gelation occurred. This system is based on aldehydo- and hydrazido-modified alginate strains, which were mixed in aqueous solution at room temperature without any additives, generating transparent, durable hydrogels through hydrazone cross-linking. Under addition of collagen, complex three-dimensional cardiac tissues were grown within 14 days. The substitution of collagen was traced by defined adhesion-factors subsequently. This attempt was accomplished by conjugation of cyclic RGDfK-pentapeptids to modified alginate components. The ligation was achieved in metal-free manner *via* functionalisation of alginate with oxanorbornadiene moieties. Ligation and cross-linkage, each literally termed as click reactions, could be performed in a sequential- as well as in a double-click process. Finally, the adhesion of neonatal rat cardiomyocytes to RGD-functionalized, *in situ* formed alginate hydrogels, produced in a sequential process, was introduced and confirmed successfully.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Regenerative Medizin	1
1.2	Gerüstmaterialien für das <i>tissue engineering</i>	3
1.3	Hydrogele	4
1.4	Biopolymere als Gerüstmaterialien	5
1.4.1	Hyaluronsäure	6
1.4.2	Gelatine	7
1.4.3	Alginat.....	8
1.5	Funktionalisierung von Makromolekülen: Ligationen & Vernetzung	13
1.5.1	Metall-katalysierte 1,3-dipolare HUISGEN'sche Cycloadditionen	14
1.5.2	Metall-freie 1,3-dipolare HUISGEN'sche Cycloadditionen	15
1.5.3	Thio-Click Reaktionen.....	17
1.5.4	Kondensationsreaktionen.....	19
1.5.5	Multiple Click-Reaktionen: Sequenzieller und doppelter Click.....	20
1.6	Die RGD Aminosäuresequenz als Zelladhäsionsfaktor	21
2	Zielsetzung	23
3	Alginat als Biopolymer für das <i>tissue engineering</i>	25
3.1	Allgemeine Vorbemerkungen.....	25
3.1.1	Biologisch-Medizinische Anforderungen	25
3.1.2	Chemische Derivatisierung der Polymere (Syntheseplanung)	25
3.2	Chemische Derivatisierung von Alginat	25
3.2.1	Synthesen in wässrigem Medium.....	26
3.2.2	Synthesen in organischen Medien	33
4	Radikalisch photovernetzbare Hydrogele	35
4.1	Synthese photovernetzbarer Alginat-Derivate.....	36
4.2	Herstellung von Hydrogelen über radikalische Vernetzung.....	38
4.2.1	Hydrogele aus methacryliertem Alginat	38
4.2.2	Hydrogel-Blends.....	41
4.3	Mechanische Eigenschaften methacrylischer Gele.....	43
4.4	Quellraten.....	47
4.5	Biologische Bewertung	50
4.5.1	Präparation der Zelltests	50
4.5.2	Auswertung der Zelltests	51
5	Kovalent <i>in situ</i> vernetzbare Hydrogele	55
5.1	Synthese von Aldehydo-Alginat	58
5.2	Synthese von Hydrazido-Alginat	60
5.3	Herstellung von Hydrogelen über kovalente <i>in situ</i> Vernetzungen	63
5.3.1	Alginat-Hydrogele.....	64
5.3.2	Hydrogel-Blends.....	66
5.4	Mechanische Eigenschaften	68
5.4.1	<i>in situ</i> Polymerisationsprozess.....	69
5.4.2	Amplitudensweep	72
5.4.3	Ergebnisse der mechanischen Untersuchungen.....	74
5.5	Quellraten.....	74
5.6	Biologische Bewertung	75
5.6.1	Präparation und Sterilisation der Polymerkomponenten	76
5.6.2	Präparation der Zellkulturen.....	76

Inhaltsverzeichnis

5.6.3 <i>Live/Dead</i> Assay: Biokompatibilität	77
5.6.4 Myokardiales <i>tissue engineering</i> im Bioreaktor	79
5.6.3 <i>in vivo</i> Implantate	84
5.7 Analyse der Hydrazonbindung auf molekularer Ebene der Monosaccharide	86
5.7.1 Aldehydo-Galacturonsäure	86
5.7.2 Hydrazido-Galacturonsäure	88
5.7.3 Bildung des Hydrazons zwischen Aldehydo- und Hydrazido-Galacturonsäure	89
5.8 Weitere kovalente Vernetzungsstrategien	90
5.8.1 Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition	91
5.8.2 Thiol vermittelte Vernetzungen	92
6 Polymer-Peptid Biokonjugate: Bioorthogonale Ligation zur Herstellung bioaktiver Hydrogele	97
6.1 Ligation cyclischer RGD-Peptide	97
6.2 Hydrogele aus Amid ligierten Alginat-Lysin Biokonjugaten	99
6.3 Imin ligierte Alginat-Peptid Biokonjugate	100
6.3.1 Problematik der Iminbindung für die RGD-Ligation	101
6.3.3 Konjugation des Tripeptids Asp-Val-Lys an Aldehydo-Alginat mit nachfolgender Reduktion	102
6.3.4 Konjugation des cyclischen RGDfK-Pentapeptids an Aldehydo-Alginat	104
6.3.5 Herstellung von cRGD dekorierten Alginat-Hydrogelen	105
6.3.6 Biologische Evaluierung von Imin-ligierten cRGD-Alginat-Hydrogelen	106
6.4 Triazol ligierte Alginat-Peptid Biokonjugate	109
6.4.1 Synthese des verlängerten Oxanorbornadiensystems	109
6.4.1 Synthese von Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginat	110
6.4.2 Ligation weiterer Azido-Derivate	112
6.5 Analyse der Produkte der Oxanorbornadien-medierten Cycloaddition über niedermolekulare Modelle	122
6.5.1 Synthese Oxanorbornadien-funktionalisierter Galacturonsäure	123
6.5.2 Umsetzung Oxanorbornadien-funktionalisierter Galacturonsäure mit Azidopentansäure	123
6.5.3 Synthese von 3-Trifluoromethylfuran Derivaten	125
6.5.4 Zusammenfassung	127
6.6 Herstellung Triazol-ligierter Alginat-RGD Hydrogele: Sequentielle versus Doppelte Click Strategie	128
6.6.1 Doppelte <i>Click</i> Strategie	128
6.6.2 Sequentielle <i>Click</i> Strategie	131
6.6.3 Biologische Evaluierung Triazol-ligierter Alginat-cRGD Hydrogele	133
7 Zusammenfassung und Ausblick	136
7.1 Zusammenfassung	136
7.2 Ausblick	140
8 Experimenteller Teil	142
8.1 Allgemeines	142
8.1.1 Verwendete Geräte	142
8.1.2 Verwendete Chemikalien	143
8.1.3 Grundsätzliches zur präparativen Durchführung	144
8.1.4 Analytische Methoden	144
8.4 Synthesen der Verbindungen 23 bis 127	146
9. Anhang	186
9.1 ¹ H-, ¹³ C- und ¹⁹ F-NMR Spektren der Verbindungen 19 bis 128	186

Inhaltsverzeichnis

9.2 Rheologische Messungen	227
9.2.1 Polymerisationsverlauf <i>in situ</i> gelierender Hydrogele	227
9.2.2 Polymerisationsverlauf <i>in situ</i> gelierender Hydrogele abhängig der Temperatur	228
9.2.3 Amplitudensweep <i>in situ</i> gelierender Hydrogele	229

Abkürzungen und Vorbemerkungen

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AEMA	Aminoethylmethacrylat
Ac	Acetyl
Alg	Alginat
Alg-Ald	Aldehydo-Alginat
Alg-Hyd	Hydrazido-Alginat
Äq.	Äquivalente
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
c	centi oder zyκλο
C	Konzentration
CM	Rattencardiomyozyten
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
δ	chemische Verschiebung
DIPEA	<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -proylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMEM	<i>DULBECCO's Modified EAGLE's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
ED	Ethylendiamin
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EHS	ENGELBRETH-HOLM-SWARM
Et	Ethyl
ESI	Elektronenspray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
g	Gramm
Gel	Gelatine

Abkürzungen und Vorbemerkungen

h	Stunde(n)
HMBC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HR	hoch aufgelöst (<i>high resolution</i>)
HRMS	hoch aufgelöste Massenspektrometrie
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HyA	Hyaluronsäure
HyA-Ald	Aldehydo-Hyaluronan
HyA-Hyd	Hydrazido-Hyaluronan
Hz	Hertz
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
k	kilo
Kap.	Kapitel
IR	Infrarot
L	Liter
Lsg.	Lösung
λ	Wellenlänge
m	milli oder Meter
M	molar
μ	mikro
Me	Methyl
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat
MS	Massenspektrometrie
mw	Mikrowelle
m/z	Masse pro Ladung
N	nano
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
Nr.	Nummer
PE	Petrolether
PBS	Phosphatgepufferte Salz-Lösung
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ppm	<i>parts per million</i>
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat

Abkürzungen und Vorbemerkungen

quant.	quantitativ
REM	Rasterelektronenmikroskop
R _F	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
<i>tert.</i>	tertiär
Tab.	Tabelle
TBABr	<i>tert</i> -Butylammoniumbromid
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium Tetrafluoroborat
Tf	Triflat (Trifluoromethansulfonat)
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluormethansulfonsäure
TM	unregistrierte Warenmarke (<i>unregistered trade mark</i>)
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
t _R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
Vergl.	vergleich
w/w	Gewichtsprozent
w/v	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel
2PP	2-Photonen-Polymerisation
3D	3 dimensional
°C	Grad Celsius
%	Prozent
®	registrierte Warenmarke (<i>registered trade mark</i>)

Abkürzungen und Vorbemerkungen

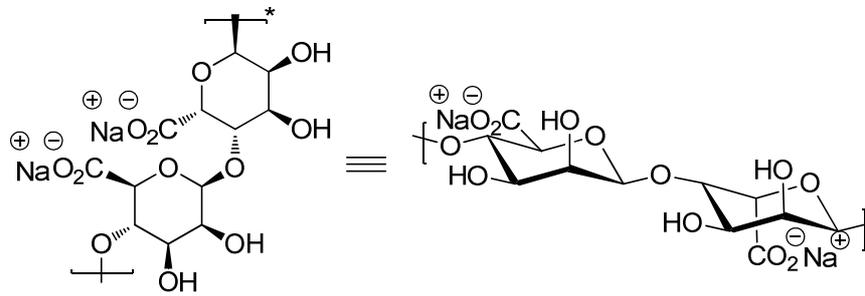
proteinogene Aminosäuren:

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Vorbemerkungen

Die Nummerierung der Atome in den modifizierten sowie den reinen Polymeren folgt nicht den IUPAC-Regeln, sondern erfolgt stringent einer willkürlich festgelegten Reihenfolge.

Die Darstellung von (Poly)Sacchariden erfolgt sowohl in der Sesselkonformation wie auch in der Aufsicht. Die Wahl der graphischen Darstellung erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit.



1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Organspenden retten Leben. Dieser bekannte Slogan ist Teil einer großen Werbekampagne der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung. Der Bedarf an Spenderorganen ist größer als das Angebot, lange Wartelisten sind die Folge.¹ Neben den beträchtlichen Wartezeiten ist die Transplantation eines Organs mit sehr hohen Kosten verbunden, summiert durch aufwendige Therapien in den Vor- und Nachbehandlungen. Würden der Medizin neue Behandlungsmethoden zur Verfügung stehen, die eine Regeneration oder den vollständigen bzw. teilweisen Ersatz von defekten Organen ermöglichen, könnte dies die medizinische und wirtschaftliche Situation nachhaltig positiv verändern. Die nötigen Techniken für eine effiziente Behandlung müssen zunächst jedoch etabliert werden. Diverse Strategien werden verfolgt, um defekte Organe *in vivo* wiederzubeleben oder Ersatzteile *in vitro* im Labor zu züchten. Dieser sich mit der Wiederherstellung von Zellen, Geweben oder Organen beschäftigende Forschungszweig wird als „Regenerative Medizin“ bezeichnet.

Biomedizinisch betrachtet, sind Organe komplexe Gewebe, ein Konstrukt aus gleichartigen und unterschiedlichen Zellen eingebettet in einer Matrix aus Proteinen und Mucopolysacchariden. Eine in der Klinik bereits bewährte Methode ist die Stammzellen basierte Therapie. So ist es in einigen Fällen möglich, Patienten körpereigene, bereits differenzierte adulte Stammzellen direkt in das defekte Gewebe zu injizieren und dieses somit lokal zu regenerieren.² Ist diese Therapie nicht zielführend oder sind die betroffenen Gewebe zu stark geschädigt, wird der Ansatz verfolgt, Ersatzteile im Labor zu kultivieren und diese anschließend zu implantieren.

Die Herstellung von künstlichen Geweben ist das Gebiet des *tissue engineering*. Im *tissue engineering* werden komplexe Gewebe aus der Kombination von biokompatiblen Materialien, Wachstumsfaktoren und Zellen gezüchtet (Abb. 1). Biokompatible Materialien fungieren als Gerüst, geben dem Gewebe seine dreidimensionale Struktur und können zusätzlich als Signalfaktoren wirken.³ Die integrierten Wachstums- oder Signalfaktoren kreieren eine biofunktionale Umgebung und bieten den Zellen ein angepasstes Umfeld.⁴

¹ F. L. Delmonico, B. Dominguez-Gil, R. Matesanz, L. Noel, *The Lancet* **2011**, 378, 1414-1418.

² R. R. Makkar, R. R. Smith, K. Cheng, K. Malliaras, L. E. J. Thomson, D. Berman, L. S. C. Czer, L. Marban, A. Mendizabal, P. V. Johnston, S. D. Russell, K. H. Schuleri, A. C. Lardo, G. Gerstenblith, E. Marban, *The Lancet* **2012**, 379, 895-904.

³ B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, N. A. Peppas, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3307-3329.

⁴ B.-S. Kim, I.-K. Park, T. Hoshihara, H.-L. Jiang, Y.-J. Choi, T. Akaike, C.-S. Cho, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, 36, 238-268.

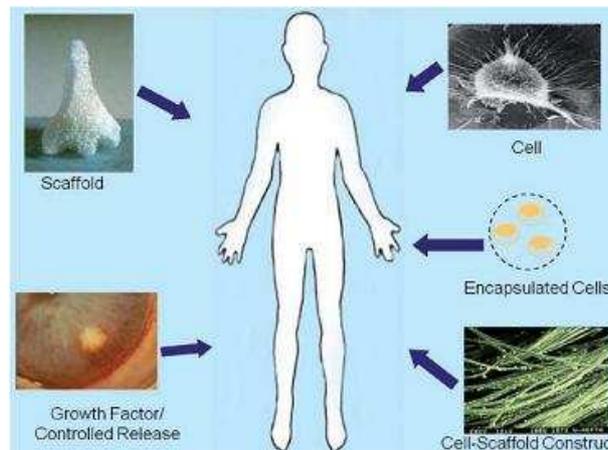


Abb. 1: Komponenten des *tissue engineerings* eingesetzt in der Regenerativen Medizin.⁵

Als Gerüst für medizinische und pharmazeutische Zwecke erhalten vor allem Biomaterialien verstärkt Aufmerksamkeit.⁶ Native Makromoleküle besitzen vielfältige Eigenschaften, die für das *tissue engineering* benötigt werden: Eine intrinsische Biokompatibilität, eine große Ähnlichkeit zur extrazellulären Matrix, geringe Zytotoxizität und eine hohe Immuntoleranz. Diese Faktoren machen sie im Vergleich zu synthetischen Materialien wesentlich geeigneter und somit für eine Gewebekultivierung für den klinischen Einsatz interessanter. Zu den etablierten Biomaterialien gehören sowohl Peptide wie auch Kohlenhydrate, die für den Aufbau variabler Konstrukte zumeist chemisch gezielt modifiziert werden.⁷ Dies ermöglicht es, Partikel im Nano- oder Mikromaßstab, zwei-dimensionale Strukturen wie Membranen und Verbände oder vollständige drei-dimensionale Gewebestrukturen zugenerieren.⁸

Die biologische Funktion der Gewebe wird grundsätzlich durch die zuvor beigefügten Zellen erhalten. Für eine erfolgreiche Zellkultivierung sind wichtige Voraussetzungen, dass die ausgesiedelten Zellen ihre Vitalität erhalten und Proliferation sowie Migration in Gegenwart des Gerüstmaterials gewährleistet werden. Werden Stammzellen eingesetzt, ist eine gezielte Differenzierung des jeweiligen Stammzelltypus (adulte, embryonale oder iPS-Zellen) wünschenswert.

Auf Grund der hohen Zahl an Herzkreislauferkrankungen ist die Regeneration des Herzens, ein aus medizinischer wie auch aus wirtschaftlicher Sicht, wichtiger Aspekt. Das Herz wird neben der Niere und der Leber in Deutschland als dritthäufigstes Organ transplantiert.⁹ Allein im Jahre 2010 gab es über 700 Neuanmeldungen, im Gegensatz

⁵ R. Langer, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3235–3236.

⁶ F. Burny, A. Steinbuchel, *Biomaterials and biodegradable Polymers and Macromolecules: Current Research and industrial Applications*, Elsevier Academic Press, San Diego, **1998**.

⁷ C. Griehl, S. Bieler, *Nachr. Chem.* **2011**, *59*, 942-947.

⁸ J. Lee, M. J. Cuddihy, N. A. Kotov, *Tissue Eng. Part B* **2008**, *14*, 61-90.

⁹ www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=yearlystats (Stand: 16.04.2012).

dazu stehen nur knapp 400 durchgeführte Herztransplantationen. Diese in den letzten zehn Jahren stetig vorhandene Diskrepanz führte zu einer beträchtlichen Zahl an wartenden Patienten. Ferner liegt die Funktionsrate der implantierten Herzen nach fünf Jahren bei ca. 70%. Diese Fakten verdeutlichen den essentiellen Bedarf nach geeigneten Behandlungsmethoden für die Regeneration lebenswichtiger Organe.

1.2 Gerüstmaterialien für das *tissue engineering*

Eines der gebräuchlichsten Gerüstmaterialien für die drei-dimensionale Kultivierung von Zellen ist das kommerziell erwerbliche MatrigelTM.^{10,11} Das aus ENGELBRETH-HOLM-SWARM (EHS) Mäusetumorzellen gewonnene Material wird aktuell von BD BIOSCIENCE vertrieben, eine Tochtergesellschaft der Firma BECTON DICKINSON.¹² Es besteht aus einer Mischung verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Laminin, Collagen IV, Heparansulfat und Entactin/Nidogen und beinhaltet zudem diverse Wachstumsfaktoren.¹²

Bei 4 °C liegt es in Form einer viskosen Flüssigkeit vor, die bei Erwärmung auf 37 °C zu einem festen Gel erstarrt. Diese Eigenschaft den Aggregatzustand dadurch zu verändern, dass die Umgebungstemperatur auf physiologische Bedingungen eingestellt wird, prädestiniert MatrigelTM für den Einsatz in der drei-dimensionalen Zellkultivierung. Präparativ ermöglicht es die Zellen im flüssigen Material homogen zu verteilen und anschließend durch Erwärmung, dieses in ein festes Gel zu überführen.¹³ Für eine Anwendung im klinischen Bereich ist der Einsatz von MatrigelTM jedoch nicht geeignet, da Chargen-abhängige Produkte, welche zudem aus Tumorzellen isoliert werden und tierischen Ursprungs sind, nicht für humane Therapien eingesetzt werden dürfen.

Aus diesem Grund wird nach neuen Materialien gesucht, die weder eine Chargenabhängigkeit noch potentielle Toxizität besitzen und/oder tierischen Ursprungs sind. Literaturrecherchen zeigen, dass eine Vielzahl verschiedener Polymere als Gerüstmaterial im Bereich des *tissue engineering*s Anwendung finden.¹⁴ Zum Aufbau biomimetischer Gewebe stellen sich besonders Polymere aus nativen Quellen, sogenannte Biopolymere, heraus. Auf Grund ihren intrinsischen Eigenschaften eignen sich einige dieser Biopolymere gezielt für spezielle Anwendungen in der Regenerativen Medizin.¹⁵ Zu den häufig eingesetzten nativen Polymeren zählen neben Polysacchariden wie Cellulose, Alginat oder Hyaluronsäure vor allem Proteine wie Collagen oder Gelatine.

¹⁰ D. J. Carey, M. S. Todd, C. M. Rafferty, *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 2254-2263.

¹¹ C. S. Hughes, L. M. Postovit, G. A. Lajoie, *J. Proteomics* **2011**, *11*, 675-690.

¹² www.bdbiosciences.com/cellculture/ecm/ecmtypes/index.jsp (Stand:30.04.2012).

¹³ T. Biederer, P. Scheiffele, *Nature Protoc.* **2007**, *2*, 670-676.

¹⁴ J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, J. M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves, R. L. Reis, *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 999-1030.

¹⁵ V. P. Shastri, A. Lendlein, *MRS Bulletin* **2010**, *35*, 571-577.

In der extrazellulären Matrix von Lebewesen bilden diese in Form von komplex aufgebauten Glykoproteinen den Hauptbestandteil des Gewebes.¹⁶

1.3 Hydrogele

Analog des kommerziell erwerblichen MatrigelsTM werden auch die auf Biopolymeren basierenden Gerüstmaterialien fast ausschließlich in Form von Hydrogelen verwendet. So stieg die Zahl der Veröffentlichungen bezüglich Hydrogele von ca. 100 im Jahre 1995 auf etwa 2300 im Jahre 2010.¹⁷ Per Definition sind Hydrogele drei-dimensionale, hydrophile Polymere, welche in der Lage sind, große Mengen an Wasser oder wasserbasierten Flüssigkeiten aufzunehmen.¹⁸ Auf Grund einer chemischen oder physikalischen Vernetzung werden eigentlich lösliche Homo- oder Copolymere in Wasser unlöslich, wobei während dieses Prozesses die eigentliche Netzwerkstruktur und damit die Form des Gels gebildet wird. Oftmals werden sie entsprechend des ionischen Charakters der Monomere als neutrale, anionische oder kationische Gele klassifiziert. Die Fähigkeit, große Mengen an Wasser aufzunehmen führt zu einem Quellen des Gels. Ist die Menge des aufgenommenen Wassers extrem groß, werden diese Körper als Superabsorber bezeichnet. Ihre Verwendung finden Hydrogele besonders im medizinischen wie auch im pharmazeutischen Sektor.¹⁷ In neuester Zeit werden Hydrogele vor allem in der Regenerativen Medizin eingesetzt.¹⁹ Dort werden sie als Gerüstsubstanz zum Gewebeaufbau, zum Wirkstofftransport, zur Wirkstofffreisetzung und als Vermittler oder Barriere zwischen Gewebe und Metalloberfläche eingesetzt. Geeignet sind Hydrogele für diese Therapien besonders durch ihre molekularen wie auch physikalischen Eigenschaften, welche eine große Analogie zur extrazellulären Matrix „ECM“ besitzen. Ferner sind sie für die Kultivierung von Zellen prädestiniert, da sie eine Diffusion von Nährmedien erlauben, den Zellen ein Gerüst zur Adhäsion liefern und Migration ermöglichen.

Die Vernetzungsstrategie die zur Bildung eines Gels führt, kann chemisch auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. *Ex vivo* werden die Polymerstränge zumeist photoinduziert radikalisch vernetzt, während kovalente oder ionische Bindungen ebenfalls *in vivo* zur Gelierung führen können. Die neueste Entwicklung der gezielten lasergesteuerten Polymerisation bietet darüber hinaus die Möglichkeit, gezielt Netzwerkstrukturen aufzubauen,²⁰ was die Anwendungspotentiale dieser Gelierungsstrategie enorm erweitert. Der Ansatz einer *ex vivo* radikalischen

¹⁶ F. T. Bosman, I. Stamenkovic, *J. Pathol.* **2003**, *200*, 423–428.

¹⁷ S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1387–1408.

¹⁸ N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27–46.

¹⁹ N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1715–1720.

²⁰ A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, L. Möller, G. Dräger, B. Chichkov, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 851–858.

Photovernetzung findet häufig dann Anwendung, wenn vorgeformte Körper für die Implantation oder Zellkultivierung benötigt werden.²¹

Verknüpfungsprozesse, die innerhalb des Organismus zur Hydrogelbildung befähigt sind, werden allgemein als injizierbare Systeme bezeichnet.^{22,23} Da diese Technik es erlaubt, Gele lokal durch Mischen zweier Komponenten zu bilden und diese entsprechend der Negativform individuell zu formen, wird sie ebenfalls als *in situ* Gelierung betitelt.²⁴ *In situ* gelierende Systeme können einen effektiven, homogenen Einschluss von Wirkstoffen/Zellen gewährleisten und bieten die Möglichkeit operative Eingriffe einfach und minimalinvasiv zu gestalten.²⁵ Dafür wird eine Mischung aus dem Gelvorläufer, den gelierenden Bestandteil(en), und der bioaktiven Komponente über eine Spritze in den Körper injiziert. Die Gelierung erfolgt anschließend auf Grund einer Veränderung der Temperatur, des pH-Wertes und/oder über chemische Reaktionen. Im Gegensatz zu ionischen können kovalent verknüpfte Netzwerke meist nur in Folge starker mechanischer Belastung zerstört werden. Die Varianz der kovalenten Bindungsarten ist dabei enorm. Chemisch kann die Bildung von Iminen, Triazolen, Hydrazonen, Disulfiden oder Thioethern zu einer Vernetzung führen. Innerhalb der letzten zehn Jahre hat sich hier besonders die *Click*-Chemie nach SHARPLESS²⁶ und MELDAL²⁷ als simple und effektive *in situ* Gelierungsmethode rasch entwickelt.²⁸

1.4 Biopolymere als Gerüstmaterialien

Bereits seit Mitte der neunziger Jahre finden Biomaterialien häufig Anwendung in der Medizin und Pharmazie.¹⁹ Sie werden für Implantate im Bereich der kardiovaskulären und plastischen Medizin oder auch für Zahn- oder Nervenrekonstruktionen genutzt. Darüber hinaus werden sie in orthopädischen Prothesen, ophthalmischen Systemen und für eine gezielte Pharmakotherapie eingesetzt. Als Biomaterialien werden dabei zumeist peptidische oder saccharidische Polymere genutzt. Unter den Polysacchariden gehören Spezies wie Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Cellulose, Alginate und Chitosan zu den weit verbreitetsten.¹⁷ Für das *tissue engineering* bieten Biomaterialien eine Vielzahl von Vorteilen, sie sind nicht toxisch, biokompatibel, unterstützen Zell-Zell und Zell-Matrix Wechselwirkungen und bieten meist adäquate physikalische und mechanische

²¹ B. Baroli, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, 81, 491–499.

²² M. K. Nguyen, D. S. Lee, *Macromol. Biosci.* **2010**, 10, 563–579.

²³ L. Yu, J. Ding, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1473–1481.

²⁴ S. R. van Tomme, G. Storm, W. E. Hennink, *Int. J. Pharm.* **2008**, 335, 1–18.

²⁵ Y. Li, J. Rodrigues, H. Tomas, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2193–2221.

²⁶ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 144, 2708–2711.

²⁷ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.

²⁸ C. M. Nimmo, M. S. Shoichet, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 2199–2209.

Eigenschaften.²⁹ Darüber hinaus sind einige der genannten Biopolymere vom menschlichen Körper durch Enzyme bioabbau- oder bioresorbierbar.

1.4.1 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure ist ein langkettiges Polysaccharid welches aus β -(1 \rightarrow 4) und β -(1 \rightarrow 3) verbrückten *N*-Acetyl-D-Glucosamine (GlcNAc) und D-Glucuronsäure (GlcA) Einheiten aufgebaut wird (Abb. 2). Die *O*-glykosidisch verbundenen Monomere ergeben ein lineares, zu den Kohlenhydraten zählendes, Glycosaminoglycan mit hohen Molekulargewichten.³⁰

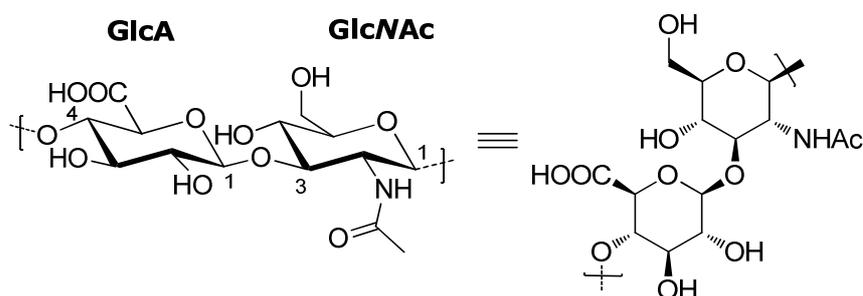


Abb. 2: Grundeinheiten der Hyaluronsäure in der Sessel- (links) und Stereokonformation (rechts).

Auf Grund seiner polyanionischen Struktur, die eine Vielzahl verschiedener Kationen, insbesondere einwertige Alkalimetallionen wie Na^+ oder K^+ bindet, wurde 1986 von der IUPAC Kommission der Name Hyaluronan eingeführt.³¹ Kommerziell erwerbliche Hyaluronsäure wird im Wesentlichen aus tierischen Quellen, wie dem Augenglaskörper des Rindes oder in einigen Fällen auch aus Bakterien wie den Streptokokken gewonnen.³² In seiner prominentesten Form liegt Hyaluronsäure als Natriumsalz mit Molekulargewichtsverteilungen (M_w) zwischen 500.000 bis 730.000 Da vor. In Wirbeltieren ist Hyaluronan neben den Proteinen Collagen, Fibrillin und Elastin ubiquitär in Binde-, Epithel- und Nervengewebe vorhanden und demzufolge ein wichtiger Bestandteil der ECM des menschlichen Organismus. Diese Tatsache macht Hyaluronsäure sowohl für die Humanmedizin,³³ als auch für die ästhetische Medizin^{34,35} interessant. Die in den monomeren Einheiten vorhandene Carbonsäurefunktion, die vicinalen Diolen wie auch

²⁹ J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S.S. Silva, L. F. Boesel, J. M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves, R. L. Reis, *J. R. Soc. Interface* **2007**, 4, 999–1030.

³⁰ G. Dräger, A. Krause, L. Möller, S. Dumitriu, *Handbook of Biodegradable Polymers: Synthesis, Characterization and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.

³¹ E. A. Balazs, T. C. Laurent, R. W. Jeanloz, *Biochem. J.* **1986**, 235, 903.

³² www.sigmaaldrich.com (Stand: 30.04.2012).

³³ G. D. Prestwich, *J. Controlled Release* **2011**, 155, 193-199.

³⁴ J.-E. Kim, J. M. Sykes, *Facial. Plast. Surg.* **2011**, 27, 523-528.

³⁵ P. Heden, G. Sellman, M. v. Wachenfeldt, M. Olenius, D. Fagrell, *Aesth. Plast. Surg.* **2009**, 33, 274–282.

die primären Alkohole ermöglichen es, die native Struktur der Hyaluronsäure chemisch zu manipulieren. Die Einführung von Methacrylateinheiten an den primären Alkoholen bietet einen Zugang zu photochemisch vernetzbaren Derivaten.^{36,37} Wird die Vernetzung der Hyaluronsäureketten in wässrigen Medien vollzogen, führt dies häufig zur Bildung von Hydrogelen, die gerade im Bereich des *tissue engineering*s breite Anwendung finden.^{17,29} Neben dieser Möglichkeit, Hyaluronsäurestränge zu vernetzen, kann dies ebenfalls auch unter nicht radikalischen Bedingungen geschehen. Die Bildung verschiedener Bindungsmotive wie Thiazolidine, Oximine oder Hydrazone kann zu einer kovalenten Vernetzung der einzelnen Ketten genutzt werden,^{38,39} wie auch Varianten in denen, meist artifizielle, Verknüpfungseinheiten eingesetzt werden.³⁸ Dazu müssen die nativen Hyaluronsäurestränge jedoch zuvor derivatisiert werden. Die Oxidation der Glucuronsäure am vicinalen Diol führt Aldehydgruppen ein, während die Carbonsäurefunktion zumeist durch stickstoffhaltige Nukleophile derivatisiert wird.⁴⁰

1.4.2 Gelatine

Die zu den Eiweißen zählende Gelatine gehört zu der Klasse der Collagene, da sie durch Denaturierung der drei-dimensionalen, tertiären Struktur der Collagene gewonnen wird. Strukturell ist Gelatine ein langkettiges Polypeptid, welches aus linear verknüpften Aminosäuren aufgebaut wird. Bis auf Tryptophan sind alle weiteren 21 essentiellen Aminosäuren in der Typ-A-Gelatine vertreten.⁴¹ Die drei häufigsten Bestandteile sind Glycin, Alanin und Prolin. Das Isolationsverfahren wird durch die Bezeichnung *A= acid processed* und *B= basic processed* gekennzeichnet. Typ-A-Gelatine wird folglich über ein saures Verfahren und Typ-B-Gelatine mit Hilfe des klassischen, alkalischen Verfahrens aus Collagen isoliert.

Eine der wichtigsten Eigenschaften von wässrigen Gelatinelösungen ist der thermoreversible Sol/Gel-Übergang im Temperaturbereich von 35-40 °C. Diese Fähigkeit der Gelatine, wässrige Lösungen bei physiologischen Bedingungen in ein Gel zu überführen erlaubt es, sie als gerüstformendes Material für die drei-dimensionale Zellkultivierung einzusetzen. Außerdem kann das Polypeptid durch eine gezielte Derivatisierung für spezielle medizinische Anwendungen nutzbar gemacht werden. Für chemische Modifizierungen werden hauptsächlich die ϵ -Aminofunktionen der Lysineinheiten in Betracht gezogen. Die Umsetzung mit Methacrylanhydrid erlaubt die Einführung von Methacrylaten, die eine photoinduzierte, radikalische Vernetzung

³⁶ K. S. Masters, D. N. Shah, L. A. Leinwand, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2005**, 26, 2517–2525.

³⁷ L. Möller, A. Krause, J. Dahlmann, I. Gruh, A. Kirschning, G. Dräger, *Int. J. Art. Organs* **2011**, 34, 93-102.

³⁸ D. A. Ossipov, S. Piskounova, J. Hilborn, *Macromolecules* **2008**, 41, 3971-3982.

³⁹ D. A. Ossipov, X. Yang, O. Varghese, S. Kootala, J. Hilborn, *Chem. Comm.* **2010**, 46, 8368–8370.

⁴⁰ P. Bulpitt, D. Aeschlimann, *Inc. J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 47, 152–169.

⁴¹ W. Babel, *Chem. unserer Zeit* **1996**, 30, 86-95.

einzelner Gelatinestränge ermöglicht.⁴² Die Inkorporation von Gelatine in Hydrogele ermöglicht es, die Ausrichtung von Zellen zu beeinflussen und somit eine Mikroarchitektur innerhalb der Gele zu generieren. Diese Technik konnte an diversen Zelltypen, darunter auch Stammzellen erfolgreich gezeigt werden.⁴³ Darüber hinaus lassen sich Lysinbausteine über ihre ϵ -Aminofunktion unter Bildung von Iminen an Aldehyde binden.⁴⁴ Reduktive Bedingungen führen anschließend zu nicht hydrolysierbaren Aminen und ermöglichen es, Gelatine kovalent an weitere (Bio-)Polymere zu binden.

1.4.3 Alginat

Alginat, auch Alginsäure genannt, ist ein in maritimen Territorien ubiquitär vorkommendes Biopolymer. Es gehört zur Familie der linearen Polysaccharide und wird fast ausschließlich aus nativen Quellen isoliert. Vorwiegend werden Alginat aus Braunalgen und zu einem geringen Teil auch aus Bakterienstämmen gewonnen. Bakteriell produzierte Alginsäuren kommen vornehmlich in zwei unterschiedlichen Bakteriengattungen, den *Pseudomonas* und *Azotobacter* vor,⁴⁵ wohingegen kommerziell erwerbliche Alginat ausschließlich aus dem Braunalgentyp *Phaeophyceae* geerntet werden.³² Strukturell enthält das als Copolymer aufgebaute Polysaccharid in seinen monomeren Einheiten an den C-6 Positionen je eine Carbonsäurefunktion. Auf Grund ihrer Säurestärke liegen Alginsäuren zumeist in Form negativ geladener Makromoleküle vor, vornehmlich mit Alkali- oder Erdalkalimetallen als Gegenionen. Während Alginat in Wasser mit monovalenten Alkalimetallen wie Natrium niedrig viskose Lösungen bilden, können divalente Erdalkalimetallionen wie Calcium persistente Hydrogele formen. Die Gelierung des Alginats erfolgt dabei über die Komplexierung des divalenten Kations zwischen zwei Alginatsträngen, für die primär *poly* L-Guluronsäure Sequenzen verantwortlich sind.⁴⁶ Die Struktur des erhaltenen Gels kann auf Grund der vorliegenden Koordinationsgeometrie, die helikale Ketten induziert, generell mit einem *egg-box* Modell beschrieben werden (Abb. 3).⁴⁷

⁴² J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5536-5544.

⁴³ H. Aubin, J. W. Nichol, C. B. Hutson, H. Bae, A. L. Sieminski, D. M. Cropek, P. Akhyari, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6941-6951.

⁴⁴ A. K. Jha, X. Xu, R. L. Duncan, X. Jia, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2466-2478.

⁴⁵ U. Remminghorst, B. H. A. Rehm, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1701-1712.

⁴⁶ D. Thom, G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 29-42.

⁴⁷ G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. G. C. Smith, D. Thom, *FEBS Letters* **1973**, *32*, 195-198.

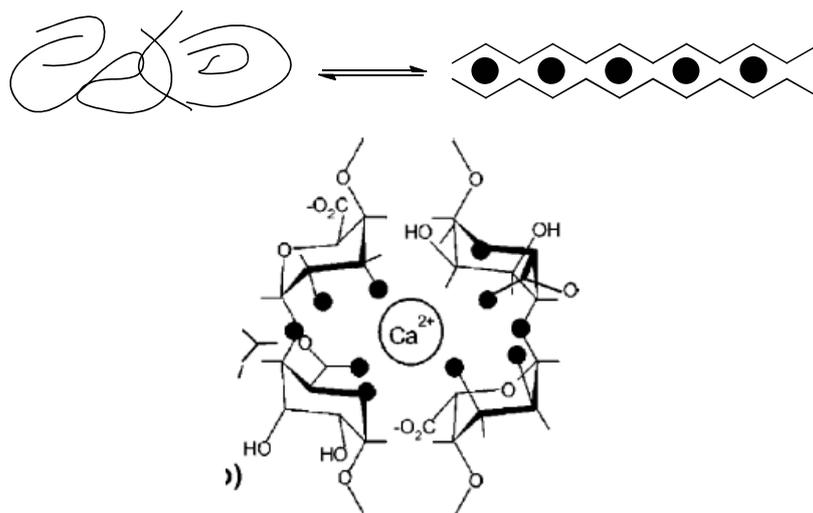
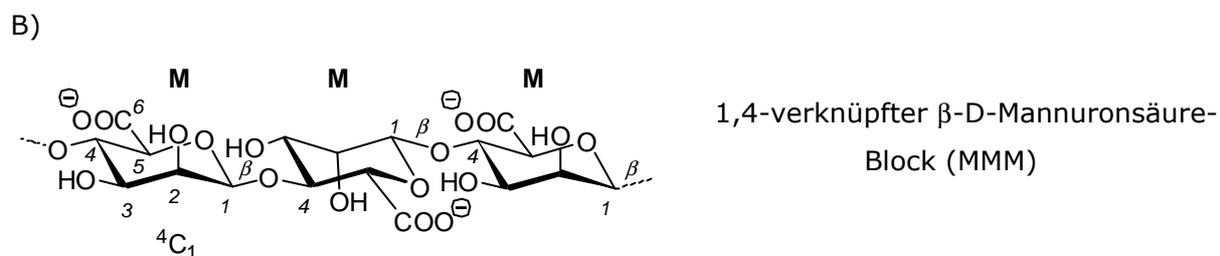
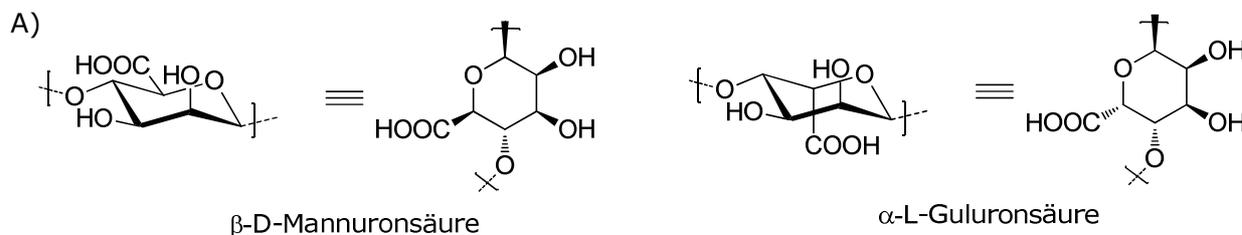


Abb. 3: oben: schematische Skizze des Polymers ohne Koordinationsgeometrie (links) und in Form des *egg-box* Modells (rechts); unten: detaillierte Darstellung des komplexierten Calcium-Ions zwischen den *poly* L-Guluronsäure Sequenzen.⁴⁸

1.4.3.1 Struktureller Aufbau der Monomere

Alginate werden aus zwei Monomereinheiten aufgebaut, den Uronsäuren β -D-Mannuronsäure (M) und α -L-Guluronsäure (G), die ein statistisch verteiltes, polydisperses Block-Copolymer ergeben. Beide Saccharide unterscheiden sich lediglich an der äquatorialen bzw. axialen Stellung der Carbonsäuren an C-6. Die monomeren Einheiten werden durch 1,4-glycosidische Bindungen zu einer linearen Kette verknüpft.



⁴⁸ P. Sikorski, F. Mo, G. Skjak-Braek, B. T. Stokke, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2098-2103.

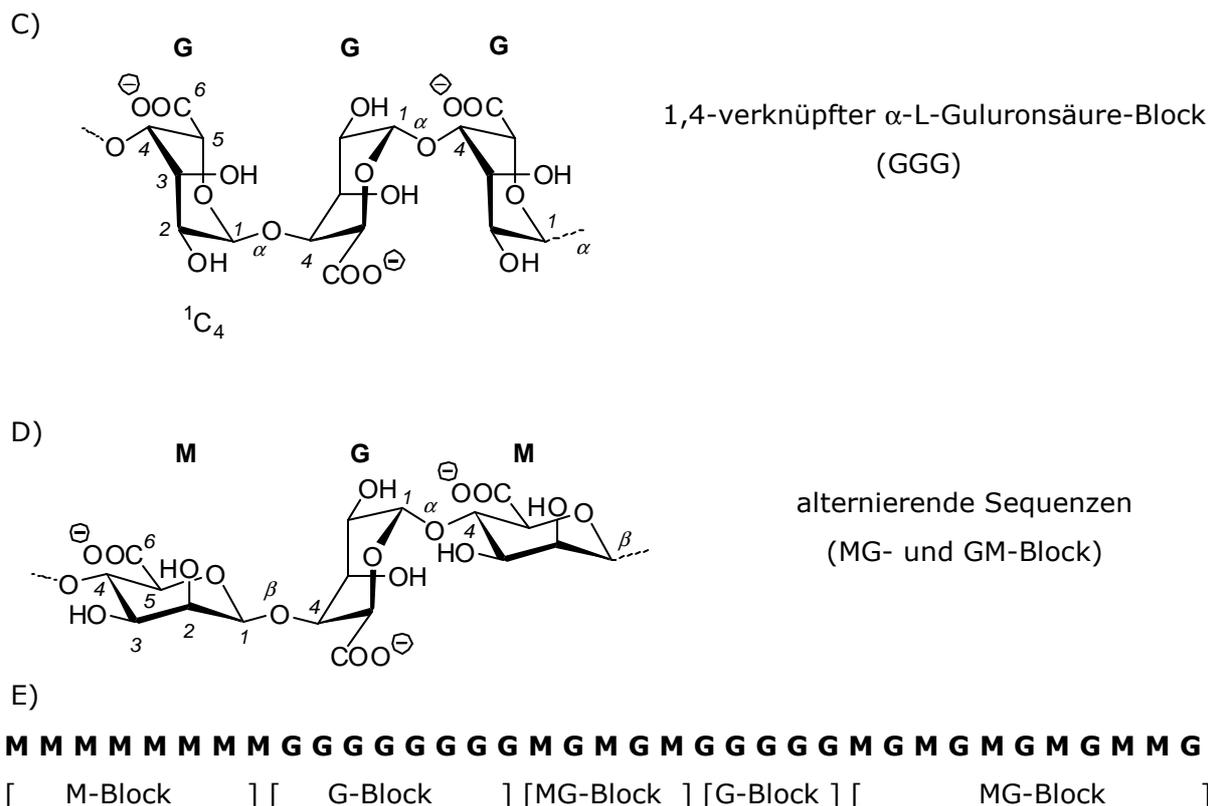


Abb. 4: A) Monomere der Alginsäure; B) homopolymere *MM*-Sequenz; C) homopolymere *GG*-Sequenz; D) alternierende *MG*-Sequenz und E) schematische Darstellung der allgemeinen Polymerstruktur, bestehend aus homopolymeren und alternierenden Einheiten.

Dabei können die beiden Uronsäuren entweder homopolymere Blöcke, die als *GG*- bzw. *MM*-Blöcke bezeichnet werden oder heteropolymere Blöcke, sogenannte *MG*-Blöcke, bilden (Abb. 4a). Die Polymerstränge liegen innerhalb der einzelnen Sequenzen in einer spezifischen Faltstruktur vor, die durch die Konfiguration der anomeren Zentren in den Monosacchariden verursacht wird. So wird die Mannuronsäure über eine diäquatoriale 4C_1 und die Guluronsäure über eine diaxiale 1C_4 Bindung mit dem folgenden Saccharid verbunden (Abb. 4b).⁴⁹ Die Abfolge der Monomereinheiten und damit einhergehend die gebildete Überstruktur ist abhängig von der Gattung der Alge und den individuellen Standortfaktoren. Alginate mit höherem Guluronsäureanteil bilden stärkere Gele, da diese vermehrt zur Kationen-Komplexierung befähigt sind. Alginate mit angereicherten *G*-Anteilen lassen sich auch synthetisch durch schwach saure Hydrolyse gewinnen.⁵⁰ Zuerst werden die Alginatestränge acidisch hydrolysiert bzw. gekappt und anschließend *G*- und *M*-Einheiten getrennt. Entscheidend für eine Separation ist, dass bei einem pH-Wert von 2.75 die Guluronsäuren protoniert und damit in unlöslicher Form vorliegen.

⁴⁹ E. D. T. Atkins, W. Mackie, E. E. Smolko, *Nature* **1970**, 225, 626-628.

⁵⁰ H. M. Lee, Y.-H. Yoon, W.-B. Lee, J.-K. Kim, *J Mater Sci: Mater Med* **2009**, 20, 1917-1926.

1.4.3.2 Chemische Modifizierungen der Alginat-Monomereinheiten

Die monomeren Uronsäuren des Alginats, die als Epimere definiert werden können, besitzen als wichtige Funktionalität neben den bereits erwähnten Carboxylaten an C-6 ein vicinales, sekundäres Diol an der C-2/C-3 Position.

Die chemische Derivatisierung erfolgt zumeist so, dass charakteristische Eigenschaften des Polymers spezifischen Anforderungen angepasst werden können. Zum einen können intrinsische, physikalische Parameter verbessert werden; zu diesen zählen eine erhöhte Gelstabilität, Löslichkeit, Bioabbaubarkeit und die mechanischen Eigenschaften. Zum anderen können vollkommen neue Eigenschaften, meist für medizinische Ansprüche, kreiert werden. Eine Modifizierung der Monomere ist grundsätzlich über verschiedene Ansätze denkbar, analog etablierter Kohlenhydrat- oder Peptid-basierter Synthesen. So könnten die Carbonsäureeinheiten oder die sekundären Alkohole chemisch derivatisiert, oder auch die Halbacetale geöffnet und damit die glykosidische Bindung gespalten werden. Dies würde mit einem Abbau des Polymers einhergehen und damit zu einer Verringerung des Molekulargewichts führen. Ebenfalls könnte die C-C Bindung des vicinalen Diols oxidativ gespalten werden. Abb. 5 zeigt die verschiedenen Angriffspunkte der möglichen synthetischen Ansätze explizit auf.

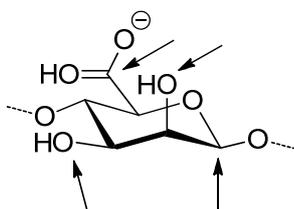


Abb. 5: Positionen im Monomer des Alginats an denen chemische Modifizierungen denkbar wären, exemplarisch gezeigt an der Mannuronsäureeinheit.

Synthesen die an organischen, niedermolekularen Substanzen etabliert wurden, können *per se* nicht auf große Moleküle übertragen werden. Auf Grund der langkettigen Struktur der Polymere ist die Reaktivität der jeweiligen Funktionsgruppen wesentlich verändert: Zum einen durch elektronische Veränderungen innerhalb des Makromoleküls, zum anderen durch sterische Abschirmung der einzelnen Positionen in Folge der jeweiligen Kettenanordnung bzw. Überstruktur. So können die Polymerstränge in strangförmiger, gefalteter oder zufälliger Anordnung bzw. Knäulung vorliegen.⁵¹ In Lösung vorliegende Polymere, die einen geringen hydrodynamischen Radius ausbilden, besitzen zudem eine unvorhersehbare Reaktivität bedingt durch die Hydrathülle an den reaktiven Zentren.

⁵¹ B. Tiede, *Makromolekulare Chemie: Eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

1.4.3.3 Anwendungen von Alginaten und deren Derivaten

Alginat werden zumeist wegen ihrer herausragenden Fähigkeit zur Gelierung eingesetzt, weshalb sie zahlreiche Anwendungen in den unterschiedlichsten Industriezweigen gefunden haben.⁵² So werden sie als Stabilisatoren, Emulgatoren oder Gelierungsmitteln in der Nahrungsmittelindustrie,⁵³ als strukturviskose Zusätze in der Textil- bzw. Papierindustrie und als Trägermaterial für Wirkstoffe in der Pharmaindustrie verwendet. Im medizinischen Sektor sind Alginat-Hydrogele besonders als künstliche Gewebestrukturen im Bereich des *tissue engineering* etabliert.^{54,55,56} Hier wurden sie bereits für diverse Organimplantate, orthopädische Eingriffe und als Verbandsmaterialien eingesetzt.¹⁷ Auch werden sie durch ihre Komplexfähigkeit häufig als Trägermaterialien für Zellen und Wirkstoffe/Medikamente verwendet.

Auf Grund ihrer Polymerstruktur und den diversen chemischen und damit verbundenden physikalischen Modifizierungsmöglichkeiten können an Biomaterialien, die aus Alginaten aufgebaut werden spezielle Parameter selektiv variiert werden.⁵⁷ Dies kann durch chemische Derivatisierung, Änderung der Molekulargewichtsverteilung, Einschränkung der Polydispersität oder Einsatz unterschiedlicher Polymerisationstechniken erfolgen. Die Modifikationsmöglichkeiten der Alginat sind diesbezüglich nicht nur auf Veränderungen in Lösung beschränkt, sondern können auch am Feststoff effektiv umgesetzt werden. Ferner können Alginat auch in amorphe Gel-⁵⁸ oder Glaszustände⁵⁹ überführt bzw. in diesen modifiziert werden.

⁵² A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Pept. Sci.* **2009**, *94*, 128-140.

⁵³ K. I. Draget, O. Smidsrod, G. Skjak-Braek, *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, Properties, Production and Patents*, Wiley-VCH, New York, **2005**.

⁵⁴ I. R. Matthew, R. M. Browne, J. W. Frame, B. G. Millar, *Biomaterials* **1995**, *16*, 275-278.

⁵⁵ T. Hasimoto, Y. Suzuki, K. Suzuki, T. Nakashima, M. Tanihara, C. Ide, *J. Mater Science: Mater Med.* **2005**, *16*, 503-509.

⁵⁶ C.-T. Chiu, J.-S. Lee, C.-S. Chu, Y.-P. Chang, Y.-J. Wang, *J. Mater Science: Mater Med.* **2008**, *19*, 2503-2513.

⁵⁷ K. I. Draget, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *21*, 47-55.

⁵⁸ N. A. Peppas, R. W. Kormeyer, *Hydrogels in medicine and pharmacy: fundamentals, Vol. 1*, CRC Press Inc., Boca Raton USA, **1986**.

⁵⁹ A. Eisenberg, *Glassy state and the glass transition, Phys. Prop. of Polym.*, ACS Washington DC USA, **1984**, 55-95.

1.5 Funktionalisierung von Makromolekülen: Ligationen & Vernetzung

Um dem Anspruch gerecht zu werden, von der Natur synthetisierte Polymere individuell bestimmten Anforderungen anzupassen, sind gezielte chemische Modifizierungen unumgänglich. Diese können den Aufbau von übergeordneten Strukturen in beliebigen zwei- oder dreidimensionalen Formen wie auch eine spezifische Dekoration der Polymere ermöglichen. Strategien um Polymere zu modifizieren, wurden nach CANALLE *et al.* grundsätzlich in die zwei Herangehensweisen „grafting from“ und „grafting onto“ eingeteilt.⁶⁰

Zu den aussichtsreichsten Ansätzen gehören die Biokonjugate. Der Aufbau dieser Konjugate ist ein aufstrebendes, multidisziplinäres Forschungsfeld, welches zunehmend Aufmerksamkeit im Bereich der Biomaterialien erfährt.⁶⁰ Durch individuelle Kombinationen von (Bio-)Polymeren mit Peptiden oder Naturstoffen ist es möglich, bestimmte Eigenschaften durch synergistische Effekte zu erzielen. So können Proteine oder Peptide dem Konjugat biofunktionelle Eigenschaften verleihen, während das Polymer Stabilität, Löslichkeit und Biokompatibilität mit sich bringt. Biologische Anforderungen an Biokonjugate werden zumeist von medizinischer Seite gestellt. Diese können ohne chemische Veränderung der Polymere jedoch häufig nicht erreicht werden. Aus diesem Grund sind variable dem jeweiligen System angepasste Ansätze, Biopolymere mit individuellen Peptiden/Proteinen zu dekorieren, essentiell.

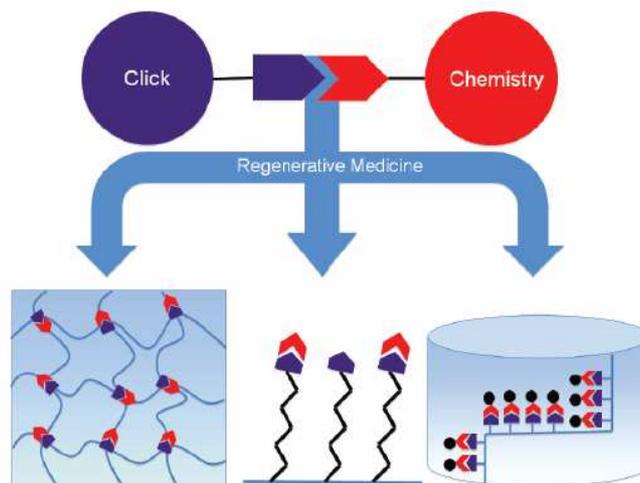


Abb. 6: Click-Reaktionen zur Bildung kovalenter Bindungen am Polymer, sowohl als Vernetzungsstrategie als auch zur Bildung von Biokonjugaten. Beispielhaft gezeigt an der Synthese von Biomaterialien für die Regenerative Medizin.²⁸

Diese als Ligationen betitelten Bindungsknüpfungen können über unzählige Reaktionsarten und Strukturelemente erfolgen. Ein Überblick über die Diversität dieses

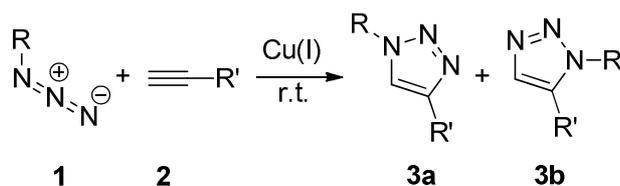
⁶⁰ L. A. Canalle, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 329–353.

Forschungsfelds geben die Übersichtsartikel von BERTOZZI *et al.*,⁶¹ HACKENBERGER und SCHWARZER⁶² und VAN HEST *et al.*⁶³ Idealerweise verlaufen diese Konjugationen in höchstem Maße chemoselektiv und in hohen Ausbeuten. So lassen sich Amide, Ester, Imine, Hydrazone, Disulfide und viele andere verknüpfende Bindungen zwischen den einzelnen Komponenten aufbauen. Unabhängig von der Art der Bindungsbildung haben sich Reaktionen, die per Definition als *Click* Prozesse bezeichnet werden, gerade im Bereich der Polymermodifizierung etabliert (Abb. 6).²⁸

1.5.1 Metall-katalysierte 1,3-dipolare HUISGEN'sche Cycloadditionen

Zum Aufbau von Materialien mit hoher struktureller Ordnung und definierten Eigenschaften ist die von SHARPLESS *et al.*⁶⁴ entwickelte *Click*-Chemie eine häufig genutzte Strategie.⁶⁵ Zumeist wird dabei die von HUISGEN entwickelte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Azid als *grafting onto* Technik verwendet. Da sich die Reaktion zweier Funktionalitäten bedient, die nur sehr selten in der Natur vorkommen, verläuft sie auch in biologischen Systemen äußerst selektiv und effektiv. Sie gehört damit zu den Reaktionen die nicht mit den Funktionalitäten natürlicher Moleküle konkurrieren und damit kann sie als bioorthogonal betitelt werden.^{66,61,67}

Zur Initiierung der Cycloaddition werden diverse Katalysatorsysteme eingesetzt, wobei bei den Übergangsmetallen vor allem Kupfer(I) verwendet wird. Folglich wird diese Reaktion häufig auch als Kupfer-Azid-Alkin-Cycloaddition kurz CuAAC bezeichnet. Das folgende Schema zeigt beispielhaft die Kupfer(I) vermittelte Synthese zwischen einem Alkin **1** und einem Azid **2**, die in der Bildung zweier regioisomerer Triazole **3a/3b** resultiert (Schema 1).



Schema 1: Reaktion der Kupfer(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Azid-Alkin-Cycloaddition und Bildung der korrespondierenden Triazole.

⁶¹ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108-7133.

⁶² C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182-10228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030-10074.

⁶³ S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8968-8989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806-8827.

⁶⁴ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.

⁶⁵ J.-F. Lutz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1036-1043.

⁶⁶ J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chem. Bio.* **2005**, *1*, 13-21.

⁶⁷ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.

Die hohe Effizienz, per Definition über 95% Ausbeute, bei milden Reaktionsbedingungen und die hohe Toleranz gegenüber weiteren funktionellen Gruppen haben den *Click*-Reaktionen zu ihrer außerordentlichen Reputation verholfen. So wurden in den letzten Jahren vermehrt Verknüpfungen zwischen unterschiedlichsten Funktionsgruppen entwickelt, die den Kriterien nach SHARPLESS *et al.*⁶⁴ entsprechen. Dabei wird die CuAAC auf Grund ihrer hohen Reaktivität und Selektivität sehr häufig als universale Ligationsmethode in den Polymer- bzw. Materialwissenschaften eingesetzt.⁶⁵ Im Bereich der biomedizinischen Chemie finden Alkin-Azid-Cycloadditionen ebenfalls besonderes Interesse,^{68,77,78} wobei hier Metall-freie Synthesen eine übergeordnete Bedeutung besitzen.⁶⁹ Die potentielle Toxizität der Metalle auf Organismen ist ein Ausschlusskriterium für biomedizinische Anwendungen. Somit wurden auch im Falle der *Click*-Chemie diverse Metall-freie Varianten entwickelt.⁷⁰

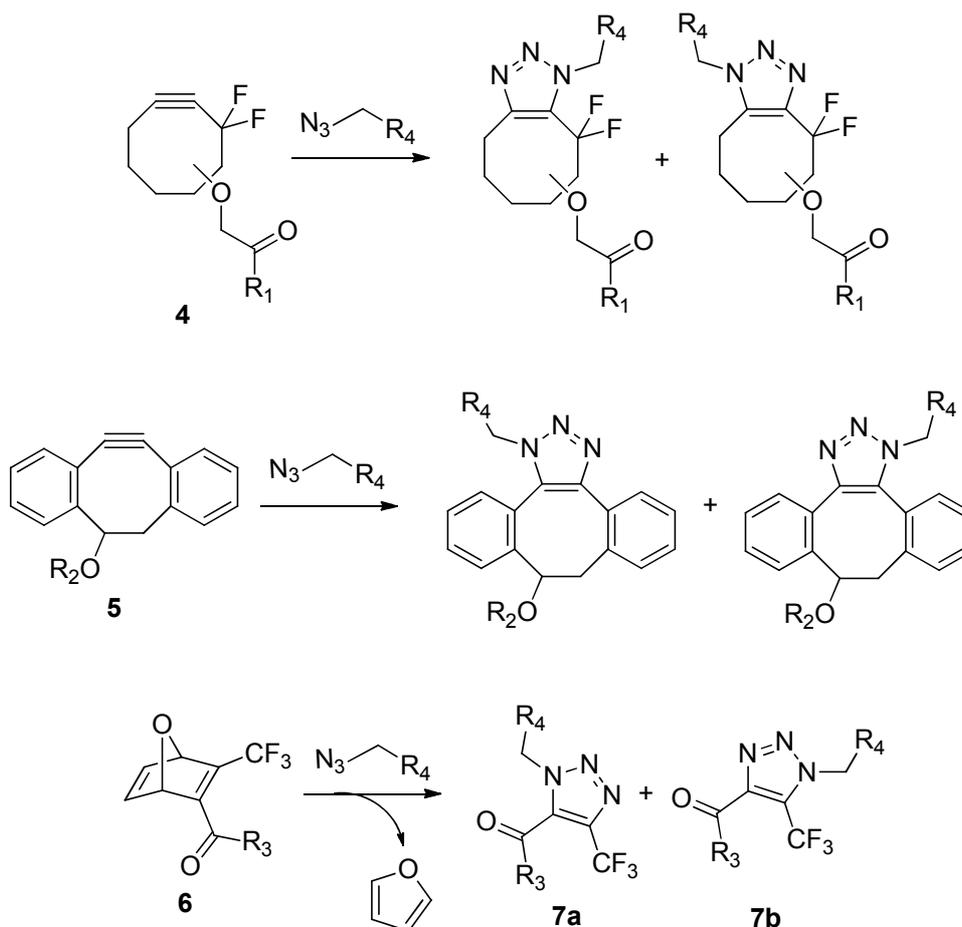
1.5.2 Metall-freie 1,3-dipolare HUISGEN'sche Cycloadditionen

Die zwei verbreitetsten Ansätze metallfreier Azid-Alkin-Cycloadditionen nutzen entweder organisch lösliche Dibenzo- oder Fluoro-substituierte Cyclooctine oder das Oxanorbornadien-System welches vornehmlich in polaren Solventien anwendbar ist.⁶⁹ Um Metall-freie Cycloaddition zu ermöglichen, sind hoch reaktive Alkin- bzw. Alkenspezies nötig; ansonsten erniedrigen die Metalle die Aktivierungsenergien der Reaktionen. Ohne den Einsatz von Katalysatoren wird dies durch die Absenkung des LUMOs eines Reaktanten und/oder implementierter Ringspannung ermöglicht. Zu den beiden bewährtesten Verbindungen gehört zum einen das Oxanorbornadien **6** und zum anderen die hoch gespannten Fluor- oder Dibenzo-substituierten Cyclooctine **4** und **5**. Schema 2 zeigt die genannten Derivate und die durch eine Azid-induzierte Cycloaddition erzeugten Produkte in Form zweier regioisomerer Triazole.

⁶⁸ W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15–54.

⁶⁹ J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.

⁷⁰ C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4998–5006.

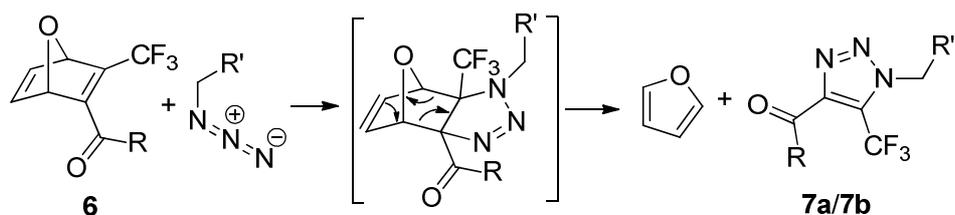


Schema 2: Etablierte Methoden metallfreier 1,3-dipolarer Cycloadditionen.

Da in unserem Fall die Metall-freie Ligation an Biopolymeren im wässrigen System durchgeführt werden soll, liegt das Augenmerk auf dem Oxanorbornadien-System entwickelt von VAN BERKEL *et al.*⁷¹ Dieses System ermöglicht Azid-induzierte Cycloadditionen in Wasser, bei Raumtemperatur ohne jegliche Additive oder Katalysatoren. Ferner werden keine toxischen Produkte gebildet. Die Chemoselektivität des Oxanorbornadiens gegenüber Aziden beruht auf einem vinylischen CF₃-substituierten Olefin. Die Trifluoromethylgruppe zieht Elektronendichte aus dem Olefin, wodurch dieses von Nucleophilen angegriffen werden kann. Um eine persistente Stabilität des Moleküls, vor allem in wässrigen Medien zu gewährleisten, wird das als Zwischenprodukt isolierte CF₃-substituierte Alkin in einer DIELS-ALDER Reaktion mit einem Furan in das Oxanorbornadien-System **6** überführt.⁷² Das CF₃-substituierte Alkin ist auf Grund seiner Instabilität unter atmosphärischen Bedingungen in Wasser nicht direkt einsetzbar.

⁷¹ S. S. van Berkel, A. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R.J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508.

⁷² Y. Su, C. Kasper, A. Kirschning, G. Dräger, S. Berski, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 1028–1033.



Schema 3: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Cycloaddition zwischen einem beliebigen Azid und dem Oxanorbornadien-System nach RUTJES und Mitarbeitern.⁷¹

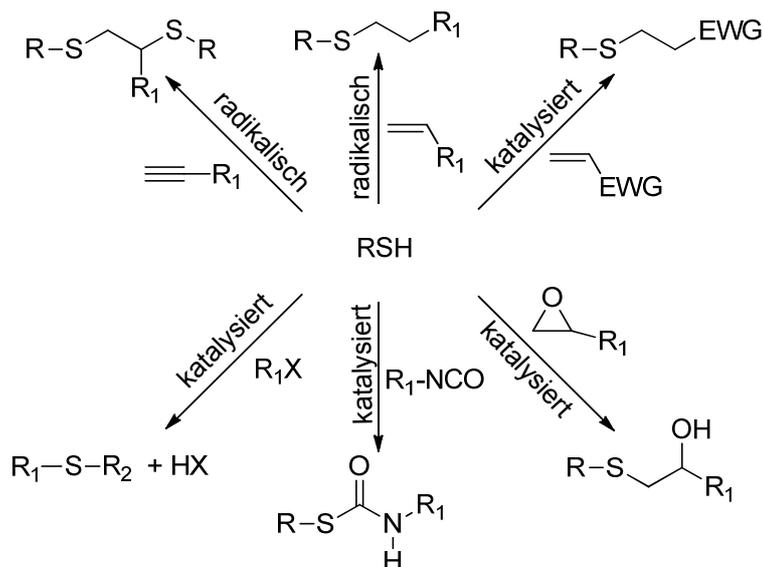
Die Reaktion wird durch den chemoselektiven Angriff des nukleophilen 1,3-dipolaren Azids an die elektronenärmste Doppelbindung ausgelöst, was zur Bildung eines Triazolin Intermediates führt. Die Trifluoromethylgruppe ist folglich entscheidend für die Selektivität. Anschließend läuft eine Retro-DIELS-ALDER Reaktion ab, in der Furan freigesetzt und das Triazol als Produkt gebildet wird (Schema 3). Die Reaktion ähnelt somit einem Additions-Eliminierungsmechanismus. Die Abspaltung des leichtflüchtigen Furans zieht das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte. Die gebildeten 1,2,3-Triazole können in Form von zwei Regioisomeren **7a** und **7b** vorliegen (Schema 2).

1.5.3 Thio-Click Reaktionen

Neben der Kupfer-katalysierten Alkin-Azid *Click*-Chemie (CuAAC) zur Dekoration oder dem Aufbau von Makromolekülen gewinnt zunehmend eine abgewandelte Methode, die Thio-*Click* Chemie größere Bedeutung.⁷³ Die Thio-*Click* Reaktion beruht auf der Reaktivität endständiger Thiole, die unter moderaten Bedingungen in radikalisch oder katalytischen Prozessen neue Bindungen knüpfen können. Die hohe Nukleophilie der Thioleinheit ermöglicht es, ein wesentlich breiteres Spektrum an Reaktionspartnern, im Vergleich zur CuAAC, für die Ligation zu nutzen (Schema 4).

⁷³ C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowmann, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1355–1387.

Einleitung

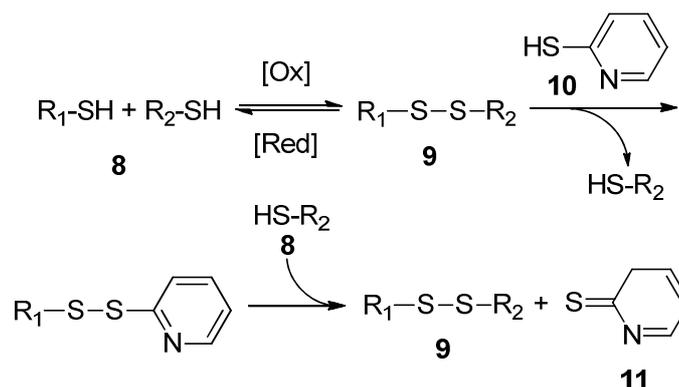


Schema 4: Variationen diverser radikalischer und Säure/Base oder Übergangmetall-katalysierter Thio-Click Reaktionen.

Radikalische Reaktionen in Gegenwart von Polymeren oder Proteinen können leicht zu ungewünschten Nebenreaktionen, Umlagerungen oder zu Veränderungen in der Sekundärstruktur führen. Reaktionen die unter Öffnung von Epoxiden, Additionen an Isocyanaten oder MICHAEL-Systemen ablaufen, bieten hingegen die Möglichkeit, gezielt Bindung aufzubauen. Mit Blick auf Polymer-Peptid Biokonjugate ist die MICHAEL-Addition in Form der Thio-Click Chemie deutlich gegenüber den Kupfer-katalysierten Alkin-Azid Cycloadditionen zu favorisieren.⁷³ Radikalische Additionen an Alkine erweitern das Repertoire zum Aufbau hochverbrückter Makromoleküle zusätzlich.⁷⁴ Das nötige exo-ständige Thiol ist im natürlich vorkommenden Cystein intrinsisch vorhanden, dies ermöglicht es, diese Aminosäure für eine Ligation zu verwenden. Ferner lassen sich Cysteine peptidisch an bereits vorhandene Aminosäuresequenzen anknüpfen, was ein erleichtertes Einführen der nötigen Thiolfunktion ermöglicht. MICHAEL-Additionen können anschließend an elektronenarme Verbindungen wie 1,2-Dehydroalanin oder methacrylische Verbindungen erfolgen.

Eine andere Variante, freie Thiole für die Konjugation einzusetzen, ist die Bildung von Disulfidbrücken. Ein weiterer Vorteil ist das einstellbare Gleichgewicht dieser Reaktion, welches in Folge oxidativer oder reduktiver Bedingungen bewusst auf die Seite der freien Thiole **8** oder der Disulfide **9** verschoben werden kann. Eine Möglichkeit, Disulfide irreversibel zu bilden kann durch Einsatz von 2-Thiopyridin **10** erreicht werden, da in diesem Fall das entstehende Pyridin-2-thion **11** dem Gleichgewicht entzogen wird (Schema 5).

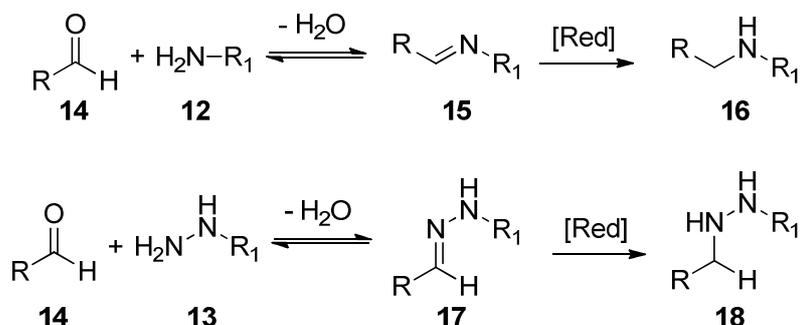
⁷⁴ D. Konkolewicz, A. Gray-Weale, S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18075-18077.



Schema 5: Gleichgewicht zwischen den freien Thiolen **8** und dem Disulfid **9**, welches unter Einsatz von 2-Thiopyridin **10** irreversibel auf die Seiten der Disulfide **9** verschoben wird.

1.5.4 Kondensationsreaktionen

Eine weitere Option, Konjugate zu generieren, ist mit der ausgeprägten Nukleophilie von stickstoffhaltigen Funktionen, wie die der Amine **12** oder Hydrazide **13** verbunden.⁶⁰ Die äußerst hohe Nukleophilie ermöglicht es, z.B. carbonylische Kohlenstoffe, wie Aldehyde **14** oder Ketone unter Wasserabspaltung anzugreifen. Die in diesen Kondensationsreaktionen gebildeten Imine **15** bzw. Hydrazone **17** können darauffolgend unter reduktiven Bedingungen in die korrespondierenden Amine **16** bzw. Alkylhydrazide **18** überführt werden (Schema 6). Da jede Peptidsequenz einen *N*-Terminus besitzt, ist diese Art der Verknüpfung bei peptidischen Verbindungen ebenfalls elegant zu realisieren.



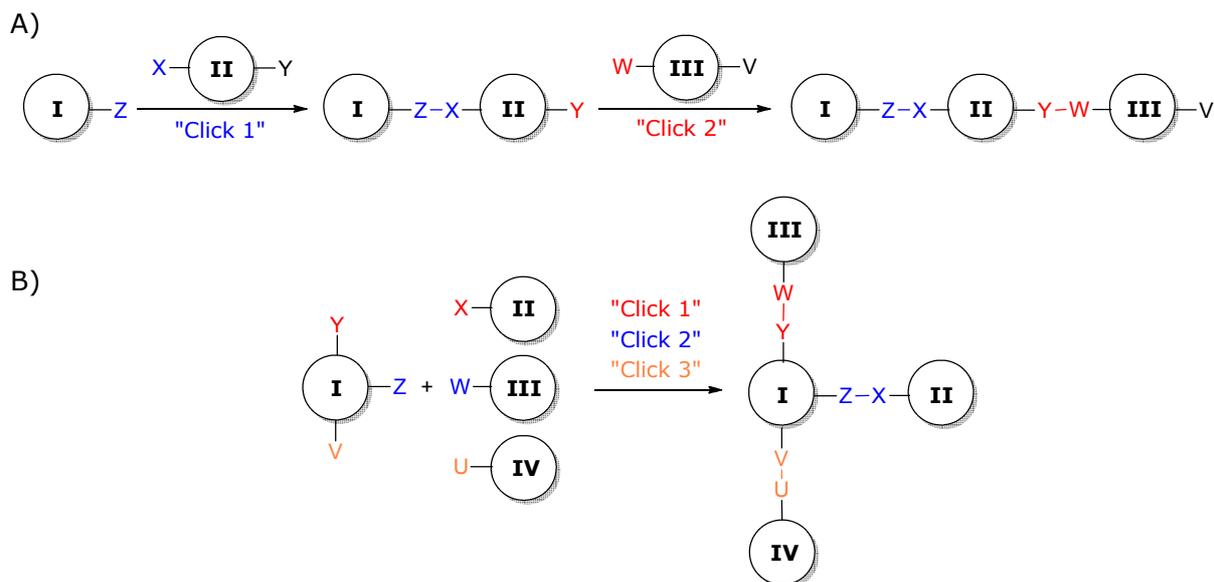
Schema 6: Stickstoff-getriebene Ligationen durch Bildung von Iminen **15** bzw. Hydrazonen **17** mit nachfolgender Reduktion in die korrespondierenden Amine **16** bzw. Hydrazide **18**.

Die reduktive Alkylierung über die SCHIFF'sche Base **15** stellt eine elegante und effiziente Technik dar, um gezielt Ligationen an ε-Aminogruppen des Lysins, vor allem in komplexen Proteinen, zu realisieren.⁶¹ Die Bildungen von Hydrazonen wurde ebenfalls als Konjugationstechnik eingesetzt; in dem beschriebenen Fall als *Labeling Strategie* für Radiopharmazeutika.⁷⁵

⁷⁵ T. Ganguly, B. B. Kasten, D.-K. Bucar, L. R. MacGillivray, C. E. Berkman, P. D. Benny, *Chem. Comm.* **2011**, 47, 12846-12848.

1.5.5 Multiple *Click*-Reaktionen: Sequenzieller und doppelter *Click*

Click-Reaktionen haben, wie in Kapitel 1.5.1 erläutert, die Variationsbreite der makromolekularen Chemie weitgehend revolutioniert.⁶⁸ Auf Grund der hohen Diversität dieser Reaktionen,⁶¹ wurden folgerichtig mehrere *Click*-Prozesse parallel oder in Reihe geschaltet (Schema 7).⁷⁶ Diese als orthogonale *Click-Click* beschriebenen Reaktionen erweitern das Repertoire des synthetischen Chemikers und ermöglichen einen eleganten Aufbau äußerst komplexer Moleküle.⁷⁶ Mit Hilfe des *Sequential-Click* Ansatzes konnten bereits multifunktionelle, drei-dimensionale Gerüstmaterialien für das *tissue engineering* hergestellt werden.^{77,78} In den genannten Beispielen wurden zellkompatible RGD-dekorierte Hydrogele durch Symbiose metallfreier Triazolsynthesen, radikalischer Thio-En-*Click* Reaktionen und photochemischen Esterspaltungen aufgebaut.⁷⁷ Die durch Tageslicht induzierte Thio-*Click* Reaktion gepaart mit dem UV-induzierten Polymerabbau ermöglichen es, bioaktive Hydrogele in jeder erdenklichen Form und Struktur zu generieren. Entscheidend für den gezielten Auf- oder Abbau des Netzwerkes war die Verwendung der 2PP-Lasertechnik.³⁰ Die Kombination von *Click* Reaktionen mit gezielter Schutzgruppentechnik ermöglicht ferner den sequentiellen Aufbau Peptid-basierter polyfunktionaler Biomoleküle.⁷⁹



Schema 7: Multiple-*Click* Reaktionen durchgeführt als A) Sequentieller *Click* und B) *Triple Click* Ansatz.

⁷⁶ M. Malkoch, R. J. Thibault, E. Drockenmüller, M. Messerschmidt, B. Voit, T. P. Russell, Craig J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14942-14949.

⁷⁷ C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Nature Chem.* **2011**, *3*, 925-931.

⁷⁸ C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nature Mater.* **2009**, *8*, 659-664.

⁷⁹ V. Aucagne, D. A. Liegh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507.

Simultan ablaufende *Click* Reaktionen werden als *Double-Click*^{80,81} oder als *Triple-Click*⁸² bezeichnet, und zwar abhängig von der Zahl der beteiligten Reaktanten. Sie erlauben den Aufbau komplexer, definierter biomolekularer Strukturen in Eintopf-Synthesen. Da in diesen Fällen die Reaktionen parallel erfolgen, werden diese Verbindungen äußerst effektiv und elegant aufgebaut. Um einen simultanen Reaktionsablauf zu ermöglichen, ist es essentiell, dass alle beteiligten Reaktionen chemoselektiv erfolgen. Vor kurzem veröffentlichten GALIBERT *et al.* die Synthese eines anspruchsvollen RGD-Verbundes mittels eines *Triple-Click* Prozesses.⁸³ In den einzelnen Konjugationen gelang es, die Synthesen von Oximen, Thioethern und Triazolen orthogonal durchzuführen. In einem ähnlichen Ansatz wurden eine Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition und eine Oximreaktion in paralleler Weise durchgeführt.⁸⁴

1.6 Die RGD Aminosäuresequenz als Zelladhäsionsfaktor

Die peptidische Arginin-Glycin-Asparagin RGD-Sequenz vermittelt die Adhäsion von Zellen an extrazelluläre *Matrices*.⁸⁵ Grundlage für die Adhäsion ist die Eigenschaft der RGD-Sequenz mit den Integrinen der Zellmembran, entsprechend einer Rezeptor-Substrat-Erkennung, zu interagieren. Dies ist nach neuesten Erkenntnissen sogar im Falle von Stammzellen möglich.⁸⁶ Die Integrine, die sich an der äußeren Zellmembran befinden, koordinieren dabei an die cyclische RGD-Sequenz über nicht kovalente Wechselwirkungen (Abb. 7). Somit fungiert die cyclische Aminosäuresequenz als Rezeptor. Kristallstrukturen von Integrin $\alpha V\beta 3$ komplexiert mit cyclischen RGD-Sequenzen aus extrazellulären Regionen zeigen, dass Arginin und Asparagin die Schlüsseleinheiten für eine erfolgreiche Erkennung sind.⁸⁷

⁸⁰ M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 944–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920–922.

⁸¹ X. Deng, C. Friedmann, J. Lahann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6652–6656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6522–6526.

⁸² L. I. Willems, N. Li, B. I. Florea, M. Ruben, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4507–4510.

⁸³ M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1901–1904.

⁸⁴ M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576–2579.

⁸⁵ E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science*, **1987**, *238*, 491–497.

⁸⁶ J. Yu, K. T. Du, Q. Fang, Y. Gu, S. S. Mihardja, R. E. Sievers, J. C. Wu, R. J. Lee, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7012–7020.

⁸⁷ J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151–155.

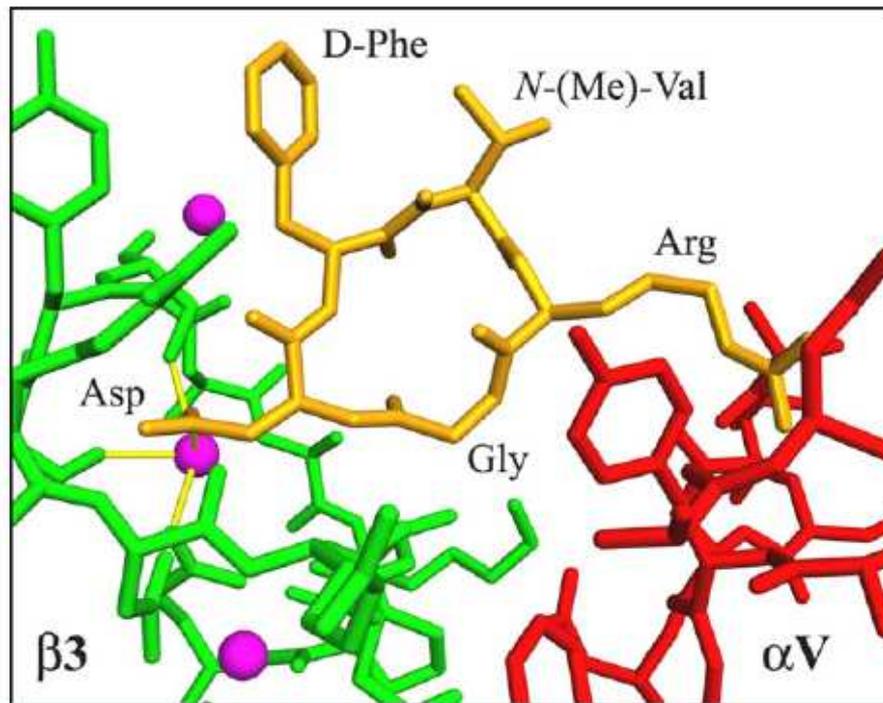


Abb. 7: Ausschnitt einer Kristallstruktur der extrazellulären Region des Integrins $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ komplexiert mit dem cyclischen Pentapeptid Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)-Val.⁸⁷

Die Abbildung zeigt, dass sich das Pentapeptid (Orange) zwischen den Schnittstellen der αV - (Rot) und β3 - (Grün) Untereinheiten des Integrins befindet. Nur drei (Asp-Gly-Arg) der fünf Aminosäuren des Peptides bilden signifikante Kontakte mit dem Integrin aus. Die Asparagineinheit ist zudem über eines von drei Mangan(II)-Ionen (Rosa) mit der β3 (Grün) Untereinheit koordiniert.

Die entscheidenden Wechselwirkungen für den Erkennungsprozess beruhen nach BELLA *et al.*⁸⁸ hauptsächlich auf intermolekularen Wasserstoffbrücken und der Metallkoordination. Neben den essentiellen Wechselwirkungen der Asparagin- und Arginin-Einheit, scheint die zentrale Glycineinheit in sehr engem Kontakt mit den weiteren Resten des Integrins zu stehen und somit über van-der-WAALS Wechselwirkungen eine Interaktion zu unterstützen.

⁸⁸ J. Bella, M. J. Humphries, *BMC Struct. Biol.* **2005**, 5:4.

2 Zielsetzung

Vorbemerkungen: Thematisch war die gesamte Arbeit in den Exzellenzcluster REBIRTH – FROM REGENERATIVE BIOLOGY TO RECONSTRUCTIVE THERAPY- eingebunden. Ziel war es, in enger Abstimmung mit der Medizinischen Hochschule Hannover „MHH“ Polymere für die medizinische Anwendung maßzuschneidern. Die Polymere mussten eng definierte biologische Funktionen erfüllen und in einem medizinischen Umfeld gehandhabt werden können. Der Einsatz der chemisch modifizierten Biopolymere für das myocardiale *tissue engineering* wurde konkret in Kooperation mit JULIA DAHLMANN, Junior Forschungsgruppe MYOCARDIALES TISSUE ENGINEERING (AG GRUH), erarbeitet. Innerhalb der Arbeitsgruppe POLYMER DESIGN unter der Leitung von GERALD DRÄGER wurden die Polysaccharide Alginat und Hyaluronsäure, sowie die peptidische Gelatine fokussiert. Die Makromoleküle Hyaluronsäure und Gelatine wurden in der Dissertation von LENA MÖLLER bearbeitet,⁸⁹ während der Fokus in dieser Arbeit auf dem Biopolymer Alginat lag.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Präparation von Gerüstmaterialien für eine drei-dimensionale Zellkultivierung im (Rahmen des) *tissue engineering*. Dazu sollten Biopolymere chemisch so verändert werden, dass sie die Bildung von Hydrogelen ermöglichen. Diese Gele sollten entsprechend ihrer medizinischen Verwendung passende physikalische Eigenschaften besitzen sowie eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Die physikalischen Charakteristika sind anhand mechanischer Messungen sowie an den Quellraten zu bestimmen. Darüberhinaus sind die biologisch-medizinischen Eigenschaften *in vitro* und idealweise *in vivo* zu evaluieren. Neben der Entwicklung des chemischen Zugangs zu Hydrogelen ist die Art der Bereitstellung zu optimieren. Letzteres beinhaltet die Reinigung, Sterilisation und Portionierung der modifizierten Polymerkomponenten bzw. der Gele für einen einfachen Einsatz im *tissue engineering*.

Als makromolekulares Grundgerüst sollte das Biopolymer Alginat dienen. Die molekulare Struktur des Polysaccharids sollte über chemische Modifizierungen der monomeren Einheiten so verändert werden, dass im Folgenden Ligationen und Vernetzungen möglich werden (Abb. 8). Dies sollte durch eine gezielte Einführung neuer Funktionalitäten oder reaktiver Zentren an oder in der Polymerkette erreicht werden. Das Ziel, persistente Hydrogele in wässrigen Medien zu generieren, sollte über eine kovalente Vernetzung der Polymerstränge erfolgen. Der Gelierungsprozess sollte dabei sowohl über radikalische wie auch über *in situ* ablaufende Verknüpfungsreaktionen ermöglicht werden, was jeweils adäquate Funktionalisierungen der Polymere erfordert. Auch sollte die Konjugation bioaktiver Moleküle wie der RGD-Peptide an das Polysaccharid, in einer möglichst bioorthogonalen Reaktionsführung, erfolgen.⁹⁰ Eine denkbare Ligationstechnik

⁸⁹ L. Möller, *Dissertation* **2012**, Leibniz Universität zu Hannover.

⁹⁰ R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 1589–1600.

Zielsetzung

stellt die bereits etablierte Metall-freie 1,3-dipolaren Cycloaddition am Oxanorbornadien-System dar.^{91,72} Diese sollte ebenfalls am Biopolymer Alginat verifiziert, etabliert und im Folgenden anhand von Modellreaktionen an Monosacchariden detailliert analysiert werden. Dies würde die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Identifizierung der gebildeten Reaktionsprodukte am Makromolekül betreffen.

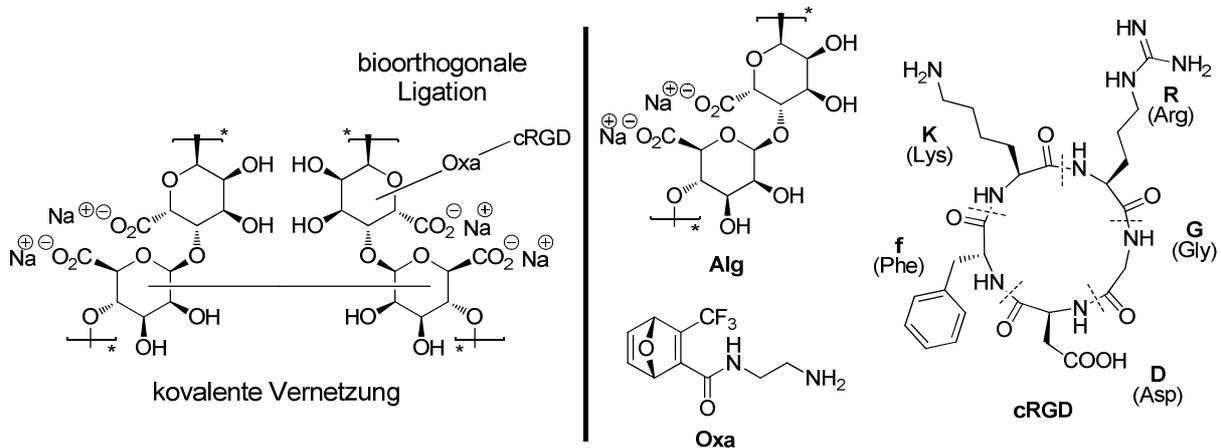


Abb. 8: Schematische Darstellung der angestrebten kovalenten Vernetzungs- wie auch bioorthogonalen Ligationsstrategie (links) und die dafür zur Verfügung stehenden Verbindungen Natrium-Alginat **Alg**, das Oxanorbornadien-Derivat **Oxa** sowie das cyclische RGDfK-Pentapeptid **cRGD** (rechts).

Im Anschluss sollten die Vernetzung- wie auch die Ligationstechnik in einer möglichst effektiven Strategie in Einklang gebracht werden. So sollte es möglich sein, bioaktive RGD-dekorierte Hydrogele *in situ* zu erzeugen, wobei die nötigen Polymerkomponenten konvergent, über jeweils möglichst wenige Syntheseschritte orthogonal generiert werden. Alle Reaktionen sollten dabei möglichst maximal den biologisch-medizinischen Anforderungen gerecht werden.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. I. GRUH, LEBAO Medizinische Hochschule Hannover, sollte die Herstellung bioartifizieller Herzmuskeln verfolgt werden. Für dieses Vorhaben werden Hydrogele benötigt, die als Gerüstmaterialien für eine dreidimensionale Gewebekultivierung verwendet werden können. So sollten unterschiedliche Hydrogel-Systeme über die genannten synthetischen Zugänge hergestellt und biologisch evaluiert werden. Im Folgenden sollten ebenfalls bioaktive RGD-dekorierte Hydrogele getestet werden. In beiden Fällen ist der gesamte Prozess, von der Bereitstellung der gelierenden (dekorierten) Komponenten bzw. der Gele bis zum schließlich gebildeten künstlichen Herzmuskel zu optimieren. Darüber hinaus ist die Implantation der Gele *in vivo* zu verfolgen.

⁹¹ S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pinggen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1805–1815.

3 Alginat als Biopolymer für das *tissue engineering*

3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

3.1.1 Biologisch-Medizinische Anforderungen

Die modifizierten Biopolymere sollen als Gerüstmaterial für Zellkulturen im Rahmen des *tissue engineering*s eingesetzt werden. Demzufolge waren multiple Anforderungen an Präparation, Funktionalisierung und medizinische Verträglichkeit gestellt. Die Gerüstkörper sollten folgende Anforderungen erfüllen:

- a. individuell formbar,
- b. chirurgisch implantierbar,
- c. applikationsabhängige mechanische und physikalische Eigenschaften,
- d. keine Toxizitätsprofile oder Chargenabhängigkeit,
- e. frei von tierischen Bestandteilen,
- f. als Implantat nicht immunogen,
- g. hohe intrinsische Biokompatibilität,
- h. idealerweise kontrolliert abbaubar bzw. resorbierbar und
- i. strukturell-molekular definiert.

Schließlich sollte die gezielte Derivatisierung der Polymere auf chemischem Wege möglich sein, ohne die zuvor genannten Parameter zu beeinflussen bzw. wenn diese nur vorteilhaft zu modifizieren.

3.1.2 Chemische Derivatisierung der Polymere (Syntheseplanung)

Auf Grund der in Kapitel 3.1.1 genannten biologisch-medizinischen Anforderungen ergeben sich diverse Restriktionen in der Syntheseplanung. Der Einsatz toxischer Reagenzien, sowie der Einbau nicht biokompatibler Substrate oder Funktionalitäten in das Biopolymer waren zu vermeiden. Die Löslichkeit der kommerziell erwerblichen Alginat-erzeugnisse ermöglicht lediglich Reaktionen in wässrigen Medien. Zudem ist die Wasserlöslichkeit der hergestellten Alginatderivate für eine Anwendung im Bereich des *tissue engineering*s essentiell. Diese Tatsache hat Einfluss auf mögliche Reaktanden und Reagenzien, da diese hydratisierbar sein sollten, sich aber nicht in wässrigen Systemen zersetzen dürfen. Zu stark saure oder alkalische Bedingungen sollten zudem vermieden werden, da diese zur Degradation der Biopolymere führen könnten. Insgesamt sollten alle Reaktionen unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, um die Biokompatibilität der Polymere zu erhalten.

3.2 Chemische Derivatisierung von Alginat

Alginat sind in Form von Alginsäuren als ihre Natrium-, Calcium-, Kalium- oder Ammonium-Salze oder in bereits modifizierter Form als Propylenglykolalginat

kommerziell erhältlich.³² Hauptsächlich wird Alginat aber als Natriumsalz eingesetzt, da dieses die größte Wasserlöslichkeit besitzt. Werden einwertige Kationen durch zweiwertige ersetzt, bilden wässrige Alginatlösungen umgehend Gele verschiedenster Stabilität aus (Kapitel 1.4.3 bzw. Kapitel 1.4.3.3).^{46,53} Da Alginate aus nativen Quellen isoliert werden, variieren ihre Kettenlängen, in Abhängigkeit von den jeweiligen Standortfaktoren, stark. Entsprechend ihrer Molekulargewichtsverteilung werden sie in vier unterschiedliche Kategorien gemäß ihrer Viskosität in Wasser eingeteilt und zwar in sehr geringe, geringe, mittlere und hohe Viskosität. Die Löslichkeit in wässrigen Systemen wird durch geringe Zusätze von organischen Solventien stark herabgesenkt. In polaren Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid sind Natrium-Alginate vollständig unlöslich.

Im Folgenden werden verschiedene Ansätze der gezielten Modifizierung der monomeren Einheiten beschrieben, so dass diese Derivate als Biomaterial für das *tissue engineering* eingesetzt werden können.

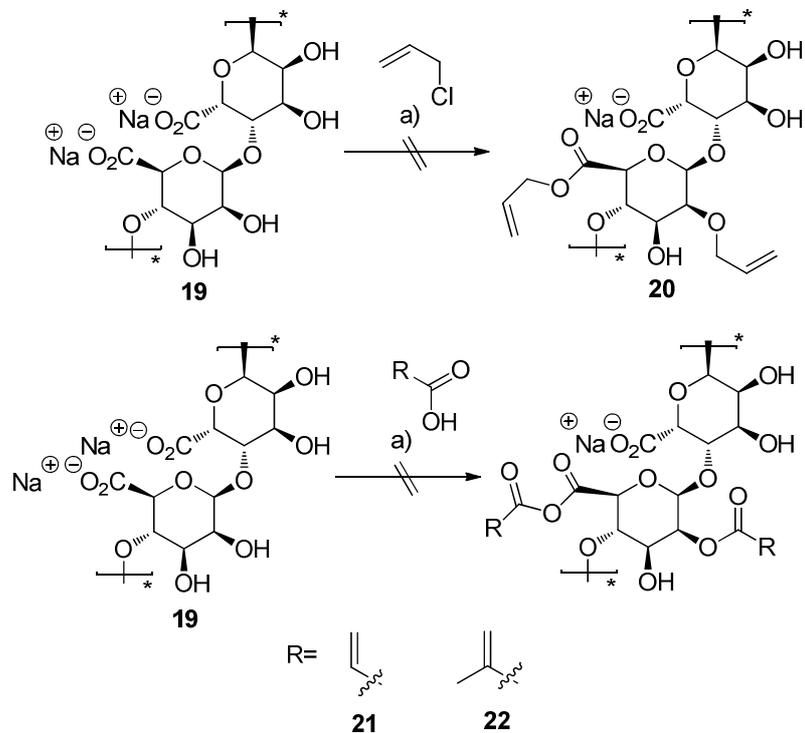
3.2.1 Synthesen in wässrigem Medium

Entsprechend der in Kapitel 1.4.3.2 beschriebenen molekularen Struktur der monomeren Einheiten lassen sich Modifizierungen vor allem über die Carbonsäuren an C-6 oder die vicinal ständigen, sekundären Alkohole an C-2/C-3 durchführen. Im alkalischen Milieu können sowohl die sekundären Alkoholate, wie auch das Carboxylat als nukleophile Spezies agieren. Des Weiteren lässt sich der elektrophile Kohlenstoff der Carbonsäure nukleophil angreifen. Die jeweiligen Ansätze, die Struktur des Polysaccharids zu modulieren, werden in den folgenden Kapiteln 3.2.1.1 und 3.2.1.2 näher beschrieben. Die Synthesen in wässrigem Medium wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, alle mit Natrium-Alginat *very low viscosity* durchgeführt.

3.2.1.1 Natrium-Alginat als nukleophile Spezies

Um die Reaktivität des Biopolymers als Nukleophil zu evaluieren, wurde dieses mit verschiedenen Reaktanden unter variierenden Bedingungen umgesetzt. Dabei wurden vor allem α,β -ungesättigte Reaktanten gewählt, da die Protonen alkyliischer, gesättigter Verbindungen in den ¹H-NMR Spektren sehr häufig mit den Signalen des Alginatrückgrates überlagern. In einem ersten Ansatz wurde Natrium-Alginat **19** in wässrigem, alkalischen Milieu bis zur Homogenität solvatisiert und mit Allylchlorid umgesetzt (Schema 8, oben) Entsprechend einer S_N2-Reaktion sollten die jeweiligen Ether- bzw. Esterderivate **20** des Alginats gebildet werden. Um zu überprüfen, ob sowohl das Carboxylat wie auch die sekundären Alkoholate eine ausreichende Nukleophilie besitzen, wurde das Chlorid im Überschuss eingesetzt. Ebenfalls wurden die polaren, hydrolysestabilen Verbindungen Acrylsäure und Methacrylsäure eingesetzt, die die

entsprechenden gemischten Anhydride bzw. Ester **21** und **22** generieren sollten (Schema 8, unten).



Schema 8: Umsetzung von Natrium-Alginat **19** mit Allylchlorid (oben), Acrylsäure oder Methacrylsäure (unten) zu den jeweiligen Derivaten **20-22**; a) DIPEA, H₂O.

Die erfolgreiche Derivatisierung konnte ¹H-NMR spektroskopisch nicht nachgewiesen werden; es wurden keine olefinischen Signale detektiert. Modifizierungen, bei denen das Polysaccharid als Nukleophil agierte, konnten auch durch Veränderung der Reaktionsbedingungen nicht nachgewiesen werden. Auch der Einsatz von Substraten wie Acrylsäure oder Methacrylsäure führten zu keinem positiven Ergebnis.

Im Falle der sekundären Alkohole an C-2 und C-3 könnte dieses auf die Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Solvenz zurückzuführen sein, die die Nukleophilie weiter herabsenken. Das vorliegende Carboxylat hingegen sollte auch in Wasser ein ausreichendes Angriffspotential besitzen. Hier spielt jedoch die Reaktivität bzw. die Löslichkeit der Reaktanden in wässrigem Milieu eine wichtige Rolle. Die Auswahl von Substraten, die in Wasser eine adäquate Elektrophilie besitzen, ohne zuvor hydrolysiert zu werden, ist stark eingeschränkt. Zudem wäre die Bildung inter- und intramolekularer Ester innerhalb bzw. zwischen den Alginatketten theoretisch möglich, da die sekundären Alkohole mit den Carboxylaten reagieren könnten. Auf Grund der erhaltenen negativen Resultate und der stark eingeschränkten Auswahl nicht hydrolysierbarer Substrate wurde diese Route nicht weiter verfolgt.

Einen erfolgreichen Ansatz, die sekundären Alkohole des Polymers zu acetylieren, zeigten SKJAK-BRAEK *et al.* auf.⁹² Um hohe Substitutionsgrade zu erzielen, wurden die Alginat zuvor mit Calcium geliert und diese anschließend in Gegenwart einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid umgesetzt. Das Alginat agiert dabei als nukleophile Spezies. Für unsere Ansprüche war diese Reaktion jedoch nicht anzustreben, da die Reaktionsführung über die Gelierung des Polymers verlief. Reaktionen an gelierten Alginaten haben zumeist inhomogene Substitutionsverteilungen zur Folge. Außerdem müssen im Anschluss die Gelkugeln wiederum vollständig gelöst werden, was nicht zwangsäufig quantitativ erfolgt.

Ein weitaus wichtigerer Aspekt von Veresterungen abzurücken, ist die potentielle Spaltbarkeit der Bindung in biologischen Systemen. Daher ist die Einführung von Funktionalitäten, „Spacern“ oder biologisch aktiven Molekülen über Esterbindungen für medizinische Anwendungen des Alginats zu vermeiden. Grund hierfür sind die ubiquitär vorhandenen Esterasen in Organismen, die eine Spaltung der Bindungen auslösen können und damit die gewünschten Derivatisierungen rückgängig machen.

3.2.1.2 Alginat als elektrophile Spezies

Das Kohlenstoffatom des Carboxylats eignet sich auf Grund seiner Elektrophilie gut für die Reaktion mit nukleophilen Spezies. Um die Reaktivität zu erhöhen, wird die Carboxylgruppe durch Einführung einer guten Abgangsgruppe zusätzlich aktiviert. Dies erfolgt häufig durch Bildung eines Aktivesters,⁹³ welcher oftmals *in situ* gebildet und direkt durch das eigentliche Nukleophil ersetzt wird. Auf Grund ihrer Funktionsweise werden die eingesetzten Verbindungen zur Bildung dieser Aktivester auch als Kupplungsreagenzien bezeichnet. Zu den gängigsten zählen neben *N*-Hydroxysuccinimidester, Imidoester und Maleimide, die Carbodiimide.⁹⁴ Die bekanntesten Vertreter der Carbodiimide sind das wasserlösliche 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid „EDC-HCl“ und die organisch löslichen Derivate *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid „DCC“ oder *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid „DIC“.^{95,96} Da Aktivester auf Carbodiimidbasis in Umlagerungen als Neben- oder Zwischenprodukte Harnstoffe oder Oxazolone generieren,⁹⁷ wurden Additive entwickelt, die diese Reaktion inhibieren. Zu diesen Co-Reagenzien gehören z.B. *N*-Hydroxysuccinimid „NHS“ oder 1-Hydroxybenzotriazol „HOBT“.⁹⁸ Diese Verbindungen

⁹² G. Skjak-Braek, S. Paoletti, T. Gianferrara, *Carbohydr. Res.* **1989**, *185*, 119-129.

⁹³ A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

⁹⁴ A. Sinz, *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 1225-1237.

⁹⁵ S. S. Wong, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 866-874.

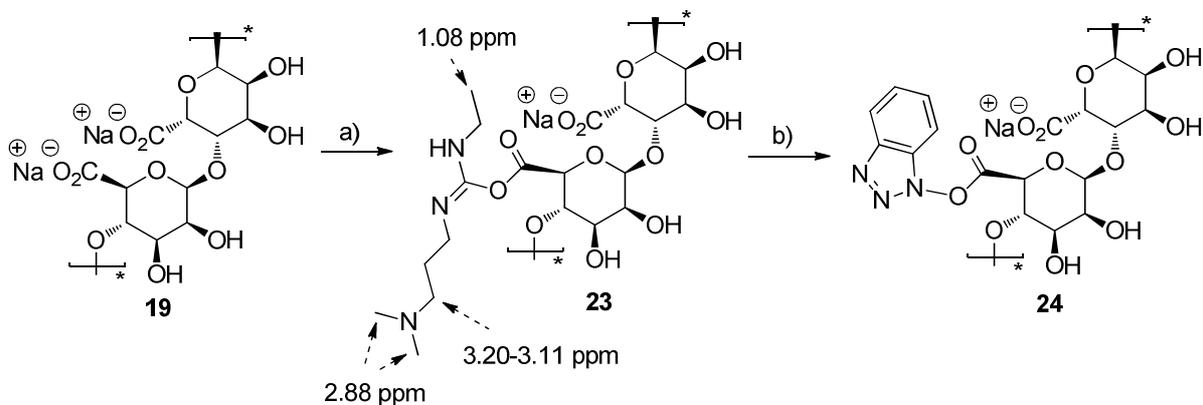
⁹⁶ De Los, F. DeTar, R. Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1020-1023.

⁹⁷ C. Auwera, M. J. O. Anteunis, *J. Pept. Protein. Res.* **1987**, *29*, 574-588.

⁹⁸ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.

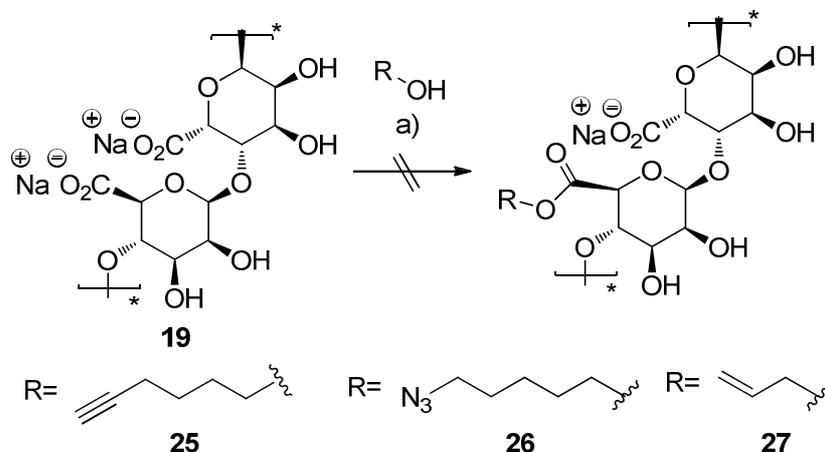
unterbinden zusätzlich den Verlust der Stereoinformation in α -Position, was besonders bei Peptidkupplungen von chiralen Aminosäuren essentiell ist.

In wässrigen Solventien erfolgte die Aktivierung von Natrium-Alginate **19** ausschließlich über die wasserlöslichen Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBT*H₂O (Schema 9). Die Bildung von Estern aus Carbonsäuren unter diesen Bedingungen ist auch als KECK-Reaktion bekannt.⁹⁹ Untersuchungen zur Stabilität der Aktivester **23** und **24** in Wasser zeigten, dass sich in Gegenwart von EDC-HCl und HOBT*H₂O lediglich Verbindung **23** bildet. Das ¹H-NMR Spektrum von **23** in D₂O zeigte charakteristische Verschiebungen der Methyl- und Methylen-Gruppen des EDC-Rests, während aromatische Signale, die auf Verbindung **24** schließen lassen, nicht identifiziert wurden.



Schema 9: Bildung des Aktivesters **23** bzw. **24** an der Carbonsäurefunktion des Alginats, beispielhaft gezeigt am Mannuronsäuremonomer; a) DIPEA, H₂O, EDC HCl; b) HOBT*H₂O.

Um gezielte Funktionalisierungen am Alginate zu erreichen, wurden auch Veresterungen in wässrigem, alkalischen Milieu untersucht. Zur Bewertung wurden die primären Alkohole 5-Hexin-1-ol **25**, 5-Azido-pentanol **26** und Allylalkohol **27** verwendet (Schema 10).



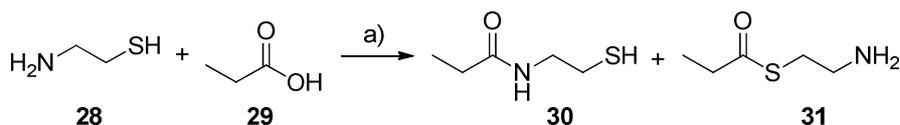
Schema 10: Veresterungen des Alginats **19** mit den primären Alkoholen 5-Hexin-1-ol **25**, 5-Azido-pentanol **26** und Allylalkohol **27**; a) DIPEA, H₂O, EDC-HCl, HOBT*H₂O.

⁹⁹ E. P. Boden, G. E. Keck, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2394-2395.

Diese besitzen allesamt charakteristische Funktionsgruppen, die einen eindeutigen analytischen Nachweis der umgesetzten Alginate erlauben sollten. Erfolgreiche Veresterungen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Sowohl $^1\text{H-NMR}$ - als auch IR-spektroskopische Untersuchungen zeigten keine charakteristischen Signale bzw. Banden der eingesetzten Reagenzien. Vielmehr deuteten die erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ Spektren darauf hin, dass das Alginate noch in Form des Aktivesters **23** (Schema 9) vorlag. Die Aktivierung der Carbonsäure verlief somit erfolgreich; ein nukleophile Angriff der Alkohole **25-27** blieb jedoch aus. Dies könnte zum einen auf die geringe Löslichkeit der Substrate und zum anderen auf eine verringerte Nucleophilie der primären Alkohole durch Hydratisierung zurückzuführen sein.

Die erfolgreiche Veresterung des Carboxylats am Alginate mit Dodecanol beschrieben hingegen YANG *et al.*¹⁰⁰ Die Reaktionsführung verlief säurekatalysiert im organischen Lösungsmittel bestehend aus Formamid und Dimethylformid unter Zugabe der Kupplungsreagenzien EDC und DMAP. Die Durchführung der Reaktion in organischen Lösungsmitteln und die Problematik der installierten Esterbindung (Kapitel 3.2.1.1) waren ausschlaggebend, diesen Ansatz nicht weiter zu nutzen.

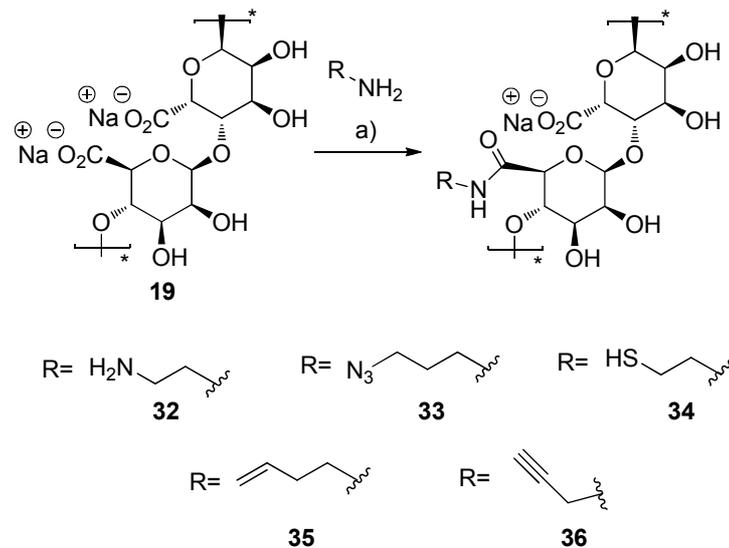
Da primäre Amine eine höhere Nucleophilie als primäre Alkohole besitzen, wurden diese im Folgenden eingesetzt. Die Reaktivität verschiedener Amino-Verbindungen wurde in wässriger, alkalischer Lösung unter Zusatz der Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBT*H₂O untersucht. Die Chemoselektivität von 2-Amino-ethanthiol **28** wurde zuvor am Testsubstrat Propionsäure **29** unter identischen Bedingungen zur Alginate-Funktionalisierung untersucht (Schema 11). Diese Reaktion sollte die Nucleophilie-Reihung zwischen primärem Amin und primärem Thiol bestimmen.



Schema 11: Reaktion zwischen Propionsäure **29** und 2-Amino-ethanthiol **28**; a) DIPEA, H₂O, EDC-HCl, HOBT*H₂O.

NMR spektroskopische Analysen ergaben, dass das Thiol im Vergleich zum Amin das stärkere Nucleophil ist. Im Falle der Testreaktion wurde ein Verhältnis des gebildeten Thioesters **31** zum Amid **30** von 2:1 erhalten. Dieses Ergebnis war für weitere Ansätze im Bereich der Thiol-modifizierten Alginate zu berücksichtigen (Kapitel 5.8.2). Die angestrebten Amidierungen des Alginats wurden mit den Reagenzien Ethylendiamin, 3-Azido-1-propanamin, 2-Amino-ethanthiol, 3-Buten-1-amin und Propargylamin durchgeführt (Schema 12).

¹⁰⁰ J. Yang, W. He, *Int. J. Bio. Macromol.* **2012**, *50*, 428-431.



Schema 12: Amidierungen von Alginate mit Ethylendiamin, 3-Azido-1-propanamin, 2-Aminoethanthiol, 3-Buten-1-amin und Propargylamin **32-36**; a) DIPEA, H₂O, EDC-HCl, HOBT·H₂O.

Die Modifizierung des Alginats konnte per NMR- und IR-Spektroskopie erfolgreich nachgewiesen werden. Im Falle von Propargylamin **36**, 3-Buten-1-amin **35**, 2-Aminoethanthiol **34** und Ethylendiamin **32** erfolgte dieses mit Hilfe der ¹H-NMR Spektroskopie. Das Spektrum von Alginate, funktionalisiert mit 3-Buten-1-amin **35**, zeigte charakteristische Protonensignale im Bereich von 5.10 ppm bis 5.90 ppm, während mit Propargylamin **36**, 2-Aminoethanthiol **34** und Ethylendiamin **32** derivatisierte Alginat charakteristische Peaks der Methylenheiten im Bereich von 1.80 ppm bis 3.60 ppm aufwies. Die Umsetzung mit 3-Azido-1-propanamin **33** konnte eindeutig mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden, da hier eine charakteristische Azid-Schwingung bei 2100 cm⁻¹ detektiert wurde.

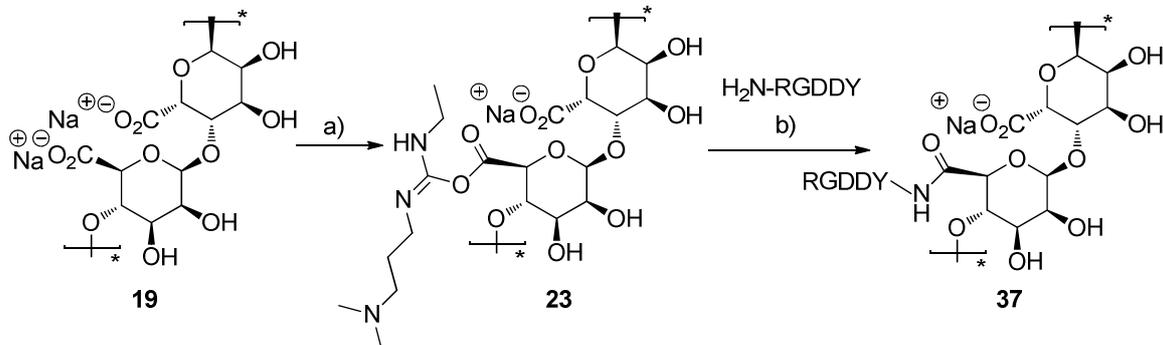
Diese Resultate zeigten, dass die Derivatisierung des Alginats über den nukleophilen Angriff primärer Amine möglich ist. Die peptidischen Bindungen wurden jeweils unter Zusatz der Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBT·H₂O unter basischen Bedingungen gebildet. Vergleichbare Resultate unter Einsatz anderer Kupplungsreagenzien zeigen die Veröffentlichungen von POLYAK *et al.*¹⁰¹ und GOMEZ *et al.*¹⁰² Ferner besteht für Amide nicht die stete Gefahr, im Organismus enzymatisch degradiert zu werden. Somit konnte eine persistente Bindung kreiert werden, die für die geplante medizinische Verwendung der modifizierten Alginat geeignet ist.

Die erfolgreiche Bindung der primären Amine bietet nun die Möglichkeit, Verbindungen die *per se* Aminogruppen beinhalten, direkt an das Alginate zu binden. Die wichtigsten Vertreter der Klasse von Aminoverbindungen sind die natürlichen Aminosäuren.

¹⁰¹ B. Polyak, S. Geresh, R. S. Marks, *Biomacromol.* **2004**, *5*, 389-396.

¹⁰² C.G. Gomez, G. Chambat, A. Heyraud, M. Villar, R. Auzely-Velty, *Polymer* **2006**, *47*, 8509-8516.

Entsprechend der beschriebenen Reaktivität der Alginate sollte eine Konjugation der Peptide über deren *N*-Terminus direkt möglich sein. Die erfolgreiche Funktionalisierung von Natrium-Alginat **19** mit linearen sowie zyklischen RGD-Peptiden unter Verwendung von EDC-HCl und NHS wurde von MOONEY und Mitarbeitern bereits gezeigt (Schema 13).^{103,104}



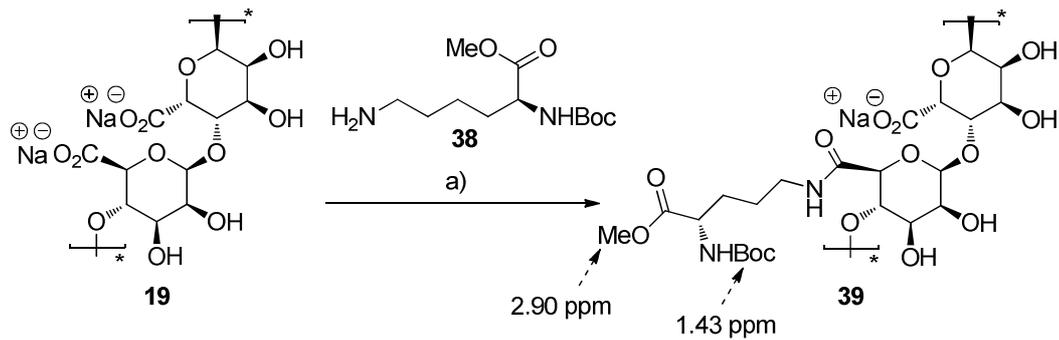
Schema 13: Synthese des RGD-Alginat Konjugats **37**; a) DIPEA, H₂O, EDC-HCl; b) NHS.¹⁰³

Generell ist eine Konjugation der RGD-Peptide analog zur Kupplungsstrategie nach ROWLEY *et al.*¹⁰³ jedoch zu vermeiden. Der Nachteil dieser Strategie ist mit der vorhandenen Asparaginsäure in der Peptid-Sequenz zu begründen. Werden Kupplungsreagenzien verwendet, können diese ebenfalls die Carbonsäurefunktion der Asparaginsäure zum Aktivester umsetzen. Dieses würde zum einen die Ausbildung eines β -turns im Peptid verhindern, da die nötigen Wasserstoffbrücken durch den sterischen Anspruch des Aktivesters nicht gebildet werden können. Dieser β -turn ist für die biologische Aktivität des Peptides jedoch essentiell. Zum anderen würde die Komplexierung biologisch essentieller Kationen unterdrückt werden. Die Bindung eines Mangan-(II)-Kations zwischen den Aminosäuren des Integrins Ser123, Ser121, Glu220 und dem Carboxylat des Asparagins ist essentiell für ein erfolgreiches *Docking*.⁸⁷ Aus diesen Gründen ist eine Derivatisierung der Asp-Einheit auszuschließen, da andernfalls die Rezeptoraffinität des RGD-Peptides wesentlich beeinflusst wäre.⁸⁸

Obleich die Verwendung von Kupplungsreagenzien nicht empfehlenswert ist, wurde die Synthese von ROWLEY reproduziert.¹⁰³ Als einfaches Peptid-Synthon wurde das Lysinderivat **38** gewählt, in dem sowohl der *N*- wie auch der *C*-Terminus geschützt vorliegen. Die ϵ -ständige Aminogruppe eines Lysins sollte zu einem späteren Zeitpunkt für die Ligation des cRGDFK **81** dienen, so dass **38** als geeignetes Modellsystem verwendet wurde. Unter den bereits studierten Bedingungen (Schema 12) wurde das Lysin-Alginat Konjugat **39** synthetisiert (Schema 14)

¹⁰³ J. A. Rowley, G. Madlambayan, D. J. Mooney, *Biomaterials* **1999**, *20*, 45-53.

¹⁰⁴ H. Park, S.-W. Kang, B.-S. Kim, D. J. Mooney, K. Y. Lee, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 895-901.

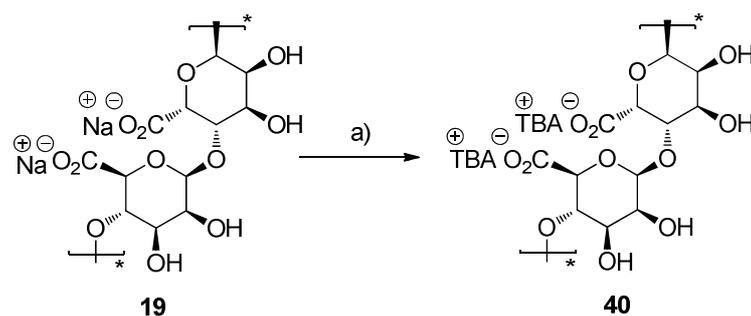


Schema 14: Herstellung des Lysin-Alginate Konjugats **39**; a) DIPEA, H₂O, EDC-HCl, HOBT*H₂O.

Der Nachweis für die Bindungsknüpfung wurde nach Dialyse und Lyophilisation mit Hilfe der ¹H-NMR Spektroskopie erbracht. In Verbindung **39** konnten die Signale des Methylesters, der Boc-Schutzgruppe und der Alkylkette identifiziert werden. Auch fanden sich mit geringer Intensität Signale die dem EDC-Aktivester **23** zuzuordnen sind, welche auf nicht vollständigen Umsatz deuten. Damit ließ sich das Biokonjugat **39** entsprechend den Angaben von ROWLEY *et al.*¹⁰³ erfolgreich herstellen.

3.2.2 Synthesen in organischen Medien

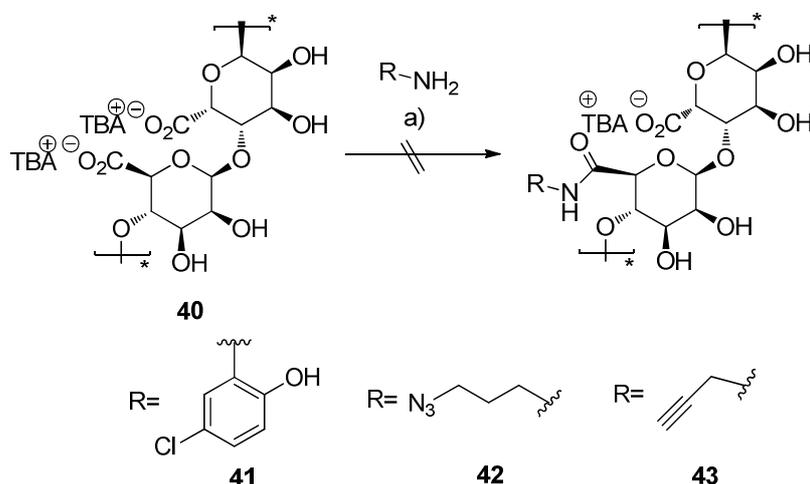
Die Löslichkeit von Alginate in polaren, organischen Solventien wird durch den Austausch der Natrium-Kationen im Alginate **19** mit Tetrabutylammonium-Ionen (TBA) erreicht. Die aliphatischen Butylreste des Tetrabutylammonium-Kations liefern die nötige Lipophilie, um das Alginate in organischen Solventien wie DMSO oder DMF löslich zu machen. Der Kationenaustausch wurde durch Einsatz eines mit Tetrabutylammoniumbromid beladenen Ionenaustauscher-Harzes erreicht (Schema 15).



Schema 15: Synthese von TBA-Alginate **40** durch Ionenaustausch; a) Amberlite IR-120, Tetrabutylammoniumbromid, H₂O.

Der erfolgreiche Kationenaustausch konnte über ¹H-NMR spektroskopische Messungen ermittelt werden. Die Signale der Butylreste des Ammonium-Ions fanden sich bei hohem Feld von $\delta = 3.21$ ppm, 1.70-1.59 ppm, 1.41-1.32 ppm und 0.94 ppm. Ferner war das hergestellte TBA-Alginate **40** in DMF und DMSO löslich. Diese gewünschte Löslichkeit wird allerdings nur bei vollständigem Ionenaustausch zu den Ammonium-Salzen erreicht. Die

Reaktivität des TBA-Alginats **40** in organischen Solventien wurde in Analogie zu den bereits beschriebenen Amidierungen (Kapitel 3.2.1.2) untersucht. Unter Zusatz der organisch löslichen Kupplungsreagenzien DCC bzw. DIC wurde TBA-Alginat **40** in DMSO sowohl mit 2-Amino-4-chlorphenol **41** als auch mit 3-Azido-1-propanamin **42** und Propargylamin **43** umgesetzt (Schema 16).



Schema 16: Reaktion von 2-Amino-4-chlorphenol **41**, 3-Azido-1-propanamin **42** und Propargylamin **43** mit TBA-Alginat **40** im organischen Lösungsmittel in die korrespondierenden Derivate; a) DIPEA, DMSO, DCC bzw. DIC, NHS.

Die charakteristischen Funktionsgruppen der Alginate derivate **41-43** sollten mittels NMR- oder IR-Spektroskopie bestimmt werden, was durch Probleme ihrer Löslichkeit in D_2O und $DMSO-d_6$ aber verhindert wurde. Auch die nach der Dialyse gegen wässrige Natriumchlorid-Lösung erhaltenen Natrium-Salze zeigten nicht die gewünschte Löslichkeit. Die Detektion der Azidofunktionalität in **42** über die IR-Spektroskopie gelang ebenfalls nicht, da sich keine Banden im Bereich von 2100 cm^{-1} fanden. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen, konnten VALLÉE *et al.*¹⁰⁵ und BABAK *et al.*¹⁰⁶ Derivatisierungen von TBA-Alginat erfolgreich in organischen Lösungsmitteln durchführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Untersuchungen unternommen, da eine gute Löslichkeit der Alginate derivate in Wasser für Anwendungen im Bereich des *tissue engineering* essentiell ist. Die gewünschte Löslichkeit konnte aber auch durch intensives Dialysieren der TBA-Alginate gegen eine hochkonzentrierte NaCl-Lösung nicht erreicht werden. Deshalb wurde von der Derivatisierung des Alginats in organischen Solventien Abstand genommen.

¹⁰⁵ F. Vallée, C. Müller, A. Durand, S. Schimchowitsch, E. Dellacherie, C. Kelche, J. C. Cassel, M. Leonard, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 223-228.

¹⁰⁶ V. G. Babak, E. A. Skotnikova, I. G. Lukina, S. Pelletier, P. Hubert, E. Dellacherie, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *255*, 205-210.

4 Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Photoinduzierte Vernetzungen finden vornehmlich Anwendung in radikalischen Kettenpolymerisationen. Radikalische Polymerisationen verlaufen sehr schnell und führen zu Polymeren mit hohen Molekulargewichten, oft in Korrelation mit großen Polydispersitäten in Folge multipler, nicht zu steuernder Umlagerungen.

Die hohen Verzweigungsraten lassen sich für die Herstellung von engmaschigen Polymernetzwerken im Bereich der biomedizinischen Chemie nutzen.²¹ Dafür werden native Biopolymere mit photoaktiven Funktionalitäten versehen. Die radikalische Vernetzung dieser modifizierten Biopolymere in Wasser führt anschließend dazu, dass die eigentlich wasserlöslichen Biopolymere, unlösliche Festkörper, sogenannte Hydrogele, bilden. Auf Grund der sehr schnell ablaufenden Kettenpolymerisation erfolgt die Hydrogelierung innerhalb sehr kurzer Zeit. Für biomedizinische Anwendungen kann die Präparation der Hydrogele sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* erfolgen.²¹ Wegen der sehr kurzen Gelierungszeit und der hohen Stabilität der geformten Gele werden diese häufig für das *tissue engineering* verwendet.¹⁰⁷ Die Herstellung der Gele *ex vivo* ermöglicht das Urformen entsprechend der gewählten Negativform, während die Vorteile der *in vivo* gebildeten Gele in einem nur minimal invasiven Eingriff liegen. Je nach Operationsmethodik können somit individuelle Hydrogel-Implantate für die jeweilige Indikation generiert werden.

Um eine radikalische Vernetzung zu erwirken, sind funktionelle Gruppen, meist mit ungesättigten Elementen nötig, die nach Zugabe eines Radikalstarters und energiereicher Bestrahlung die Polymerisation ermöglichen. Häufig werden methacrylische Vorläufer eingesetzt, mit denen die Biopolymere zuvor funktionalisiert werden. Problematisch ist die Durchführung radikalischer Polymerisationen in Gegenwart lebender Zellen. Die sowohl während des Radikalstarts als auch beim Kettenwachstum vorliegenden, hochreaktiven, radikalischen Spezies können mit den vorliegenden Zellen reagieren. Vornehmlich kann extrazellulär die Glykokalix der Zellmembran und trans- oder intrazelluläre Proteine oder die DNA angegriffen werden.¹⁰⁸ Diese Interaktionen können zu ungewollten Mutationen oder zur Apoptose der Zellen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die radikalischen Kettenreaktionen durch Zugabe des wasserlöslichen Radikalstarters Irgacure 2959 ausgelöst. Die Biokompatibilität des Radikalstarters wurde an diversen mammalischen Zelllinien bereits eingehend untersucht.¹⁰⁹ Dabei wurde eine minimale Toxizität in Abhängigkeit der eingesetzten

¹⁰⁷ J. L. Ifkovits, J. A. Burdick, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2369-2385.

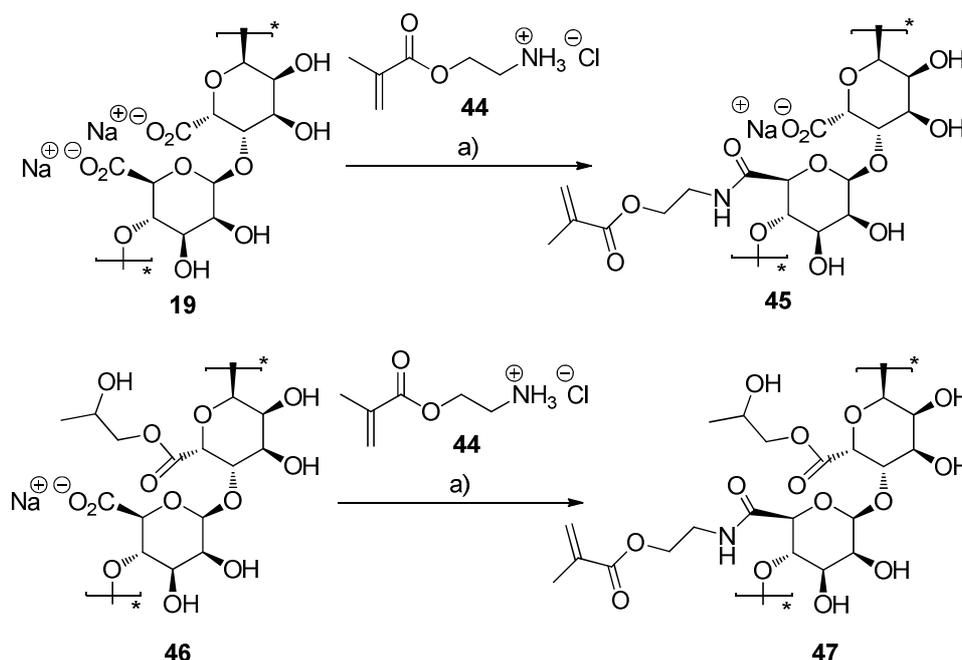
¹⁰⁸ N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, W. J. A. Dhert, *Biomaterials* **2009**, *30*, 344-353.

¹⁰⁹ C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, J. H. Elisseeff, *Biomaterials* **2005**, *26*, 1211-1218.

Konzentration der Verbindung identifiziert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Irgacure 2959 auf Stammzellen untersucht.¹⁰⁸ Die Fähigkeit zur Differenzierung wurde bei multipotenten Bindegewebszellen nicht beeinflusst, wohingegen Einflüsse auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten festgestellt wurden.

4.1 Synthese photovernetzbarer Alginat-Derivate

Um das Alginat **19** radikalisch in Wasser zu vernetzen, musste dieses zunächst mit Methacrylat funktionalisiert werden. In Anlehnung an eine Vorschrift von JEON *et al.*,¹¹⁰ wurde als wasserlösliche, methacrylische Verbindung 2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid „AEMA“ gewählt. Unter Verwendung der Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBt*H₂O konnte diese im wässrigen Milieu kovalent an das Polysaccharid gebunden werden. Dabei bewährte sich die Strategie, Substrate per Amidierungen an der C-6 Carbonsäure des Polysaccharids einzuführen (Kapitel 3.2.1). Die Reaktion wurde sowohl im basischen als auch im gepufferten Millieu (MES-Puffer, pH-Bereich 5.0-7.5) durchgeführt. Neben Natrium-Alginat **19** wurde auch das kommerziell erwerbliche Propylenglykol-Alginat **46** eingesetzt (Schema 17).



Schema 17: Funktionalisierung von Natrium- **19** und Propylenglykol-Alginat **46** mit AEMA **44**; a) DIPEA, EDC-HCl, HOBt*H₂O, H₂O.

In beiden Fällen konnte die erfolgreiche Funktionalisierung per ¹H-NMR Spektroskopie nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den von JEON *et al.* beschriebenen Ergebnissen,¹¹⁰ konnte der Belegungsgrad in Abhängigkeit von den eingesetzten

¹¹⁰ O. Jeon, K. H. Bouhadir, J. M. Mansour, E. Alsberg, *Biomaterials* **2009**, 30, 2724–2734.

Äquivalenten an „AEMA“ **44** eingestellt werden. Ferner wurde festgestellt, dass mit steigender Menge an „AEMA“ der Umsatz abnahm.

Wegen der besseren Löslichkeit des Natriumderivates **19** im Vergleich zum Propylenglykolderivat **46** wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem Natriumsalz **19** durchgeführt. Insgesamt wurden in neun verschiedenen Synthesen 0.2 bis 2.0 Äquivalente „AEMA“ eingesetzt (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die Belegungsraten der modifizierten Alginat **45** wurden mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestimmt (Abb. 9). Dafür wurden die Intensitäten der charakteristischen Methacrylatsignale ($\delta = 6.15$ ppm und 5.76 ppm) in das Verhältnis zum Alginatrückgrat ($\delta = 4.95\text{-}3.60$ ppm) gesetzt.

Die Funktionalisierung von Alginat mit Aminoethylmethacrylat unter Zugabe der Kupplungsreagenzien EDC und NHS führte zu identischen Ergebnissen laut $^1\text{H-NMR}$ Daten.^{110,111} Darüber hinaus wurden Signale bei $\delta = 2.90$ ppm, 1.35 ppm und 1.10 ppm detektiert, die verbliebenen, nicht substituierten EDC-Resten des Aktivesters **23** zuzuordnen sind.

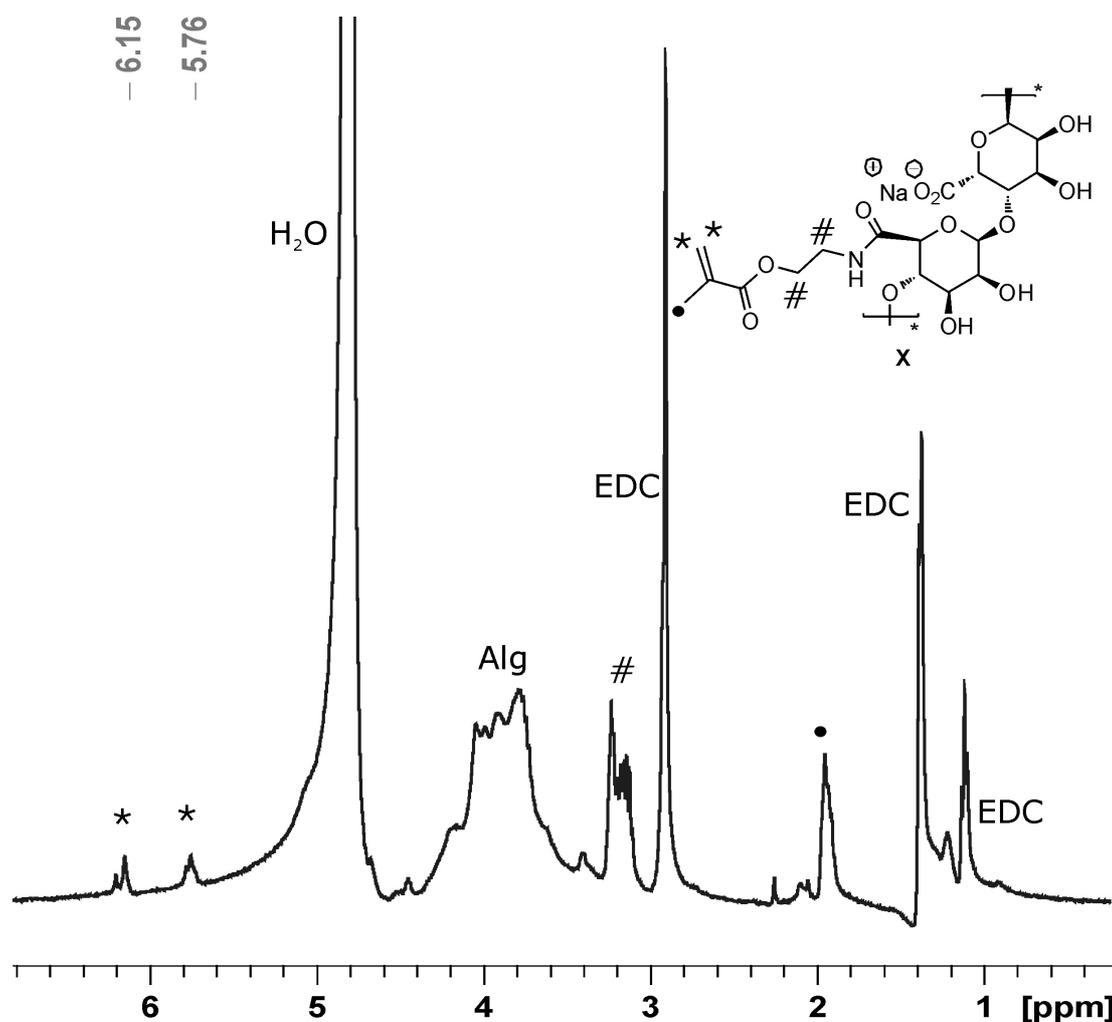


Abb. 9: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des methacrylierten Alginats **45** in D_2O , Umsetzung mit 1.2 Äquivalenten „AEMA“.

¹¹¹ O. Jeon, D. S. Alt, S. M. Ahmed, E. Alsberg, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3503-3514.

4.2 Herstellung von Hydrogelen über radikalische Vernetzung

Werden die methacrylierten Biopolymere Alginat, Hyaluronsäure und Gelatine in wässrigen Medien radikalisch vernetzt, so resultiert dieses in der Bildung stabiler Hydrogele. Dabei wurden die einzelnen Polysaccharid- bzw. Polypeptidketten zu einem engmaschigen, wasserunlöslichen Netzwerk verbunden. Die Kettenreaktion wird durch den Zerfall des Radikalstarters in Folge einer kurzzeitigen Bestrahlung mit kurzwelligem, ultraviolettem Licht eingeleitet. Als wasserlöslicher Radikalstarter wurde 2-Hydroxy-1-[4-(hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanon **48** „Irgacure 2959“ eingesetzt und die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen auf die Stabilität der Hydrogele untersucht. Dazu wurden Polymerisationen in Wasser im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 2.0% durchgeführt, wobei sich eine 1%ige wässrige Irgacure-Lösung als ideale Konzentration erwies. Als optimale Polymerkonzentration zur Bildung stabiler Hydrogele wurde ein Wert von 0.3% für die methacrylierten Alginat **45** bestimmt. Die Präparation der Gele erfolgte in lichtdurchlässigen *Culturewells*[™] mit Durchmessern von 0.3 mm bis 0.9 mm.

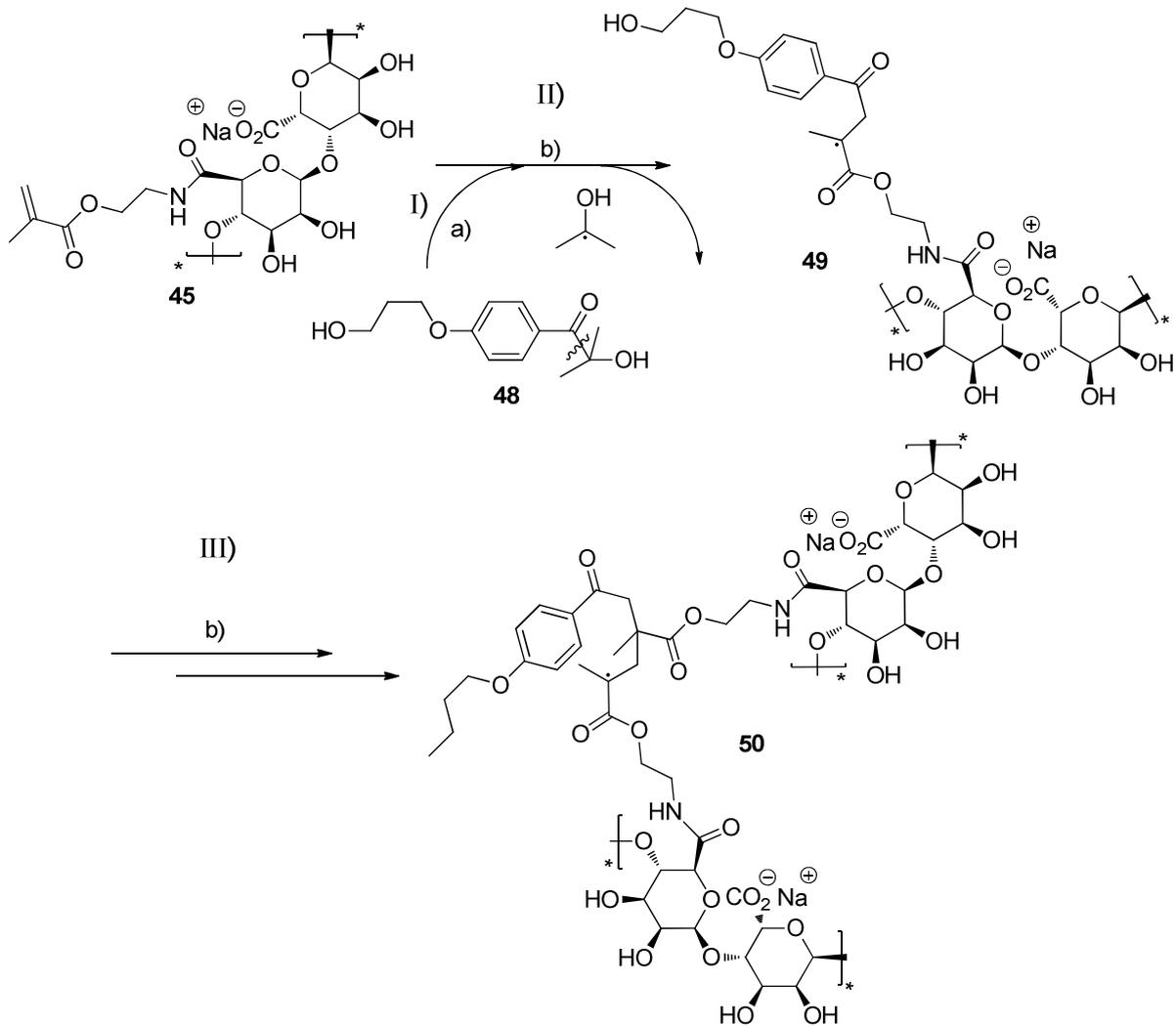
4.2.1 Hydrogele aus methacryliertem Alginat

Die in Wasser gelösten, methacrylierten Alginatderivate **45** sollten unter UV-Bestrahlung, in Gegenwart von Irgacure 2959, Hydrogele bilden. Der Einfluss unterschiedlicher Methacrylat-Belegungsraten von **45** auf die Stabilität der Gele wurde ebenfalls untersucht.

Schema 18 zeigt den Verlauf der radikalischen Kettenreaktion für die methacrylierten Alginat. Unter Bestrahlung mit energiereichem, kurzwelligem Licht wird der Radikalstarter **48** homolytisch in ein Carboxy- und ein Acyl-Radikal gespalten (Schema 18, Schritt I). Das äußerst reaktive Acylradikal reagiert nun mit der α,β -ungesättigten Esterfunktion des Alginats **45**. Diese Addition löst eine homolytische Bindungsspaltung im Olefin aus und generiert eine weitere radikalische Spezies **49** (Schema 18, Schritt II). Dieser Schritt stellt die Initiierung der Kettenreaktion dar. Anschließend erfolgt das Kettenwachstum durch Addition des Radikals **49** an weitere methacrylierte Alginat **45** (Schema 18, Schritt III). Die Multiplikation des letzten Schrittes resultiert in der Bildung eines engmaschigen Netzwerkes **50** und damit in der Gelierung des Polymers. Der Mechanismus der radikalischen Kettenreaktion basiert auf den Vorschlägen von JEON *et al.*^{110,111} und BONINO *et al.*¹¹²

¹¹² C. A. Bonino, J. E. Samorezov, O. Jeon, E. Alsberg, S. A. Khan, *Soft Matter* **2011**, 7, 11510-11517.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele



Schema 18: I) Zerfall des Radikalstarters Irgacure 2959 **48**; II) Auslösen der Kettenreaktion mit methacryliertem Alginat **45**; III) Verlauf der Kettenreaktion zwischen den einzelnen Alginatketten; a) H₂O, hv; b) H₂O.

Die hergestellten Hydrogele wurden lyophilisiert und unter Lichtausschluss gelagert. Die Bedingungen zur Erzeugung der Gele wurden durch Variation unterschiedlicher Parameter optimiert. So wurde der Belegungsgrad von **45** durch die Zugabe von unterschiedlichen Äquivalenten an Aminoethylmethacrylat **44** variiert (Kapitel 4.1). Die so erhaltenen, modifizierten Alginat wurden ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht und die Löslichkeit in Wasser getestet. Die Modifizierungen wurden sowohl für *low-viscosity* ($M_w > 100.000$ g/mol), als auch für *very low-viscosity* ($M_w < 100.000$ g/mol) Natrium-Alginat **19** durchgeführt. Die photochemische Vernetzung der 0.3%igen Polymerlösungen erfolgte in *Culturewells*[™] durch 10 minütige UV-Bestrahlung.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Tabelle 1: Umsetzung von *low-viscosity* Natrium-Alginat **19** mit Aminoethylmethacrylat **44**.

Äquivalente „AEMA“	Löslichkeit in H ₂ O	Hydrogel-Bildung
2.00	unlöslich	nicht möglich
1.50	löslich	möglich
1.00	löslich	möglich
0.50	löslich	möglich
0.45	löslich	möglich
0.20	löslich	nicht möglich
0.23	löslich	nicht möglich

Tabelle 2: Umsetzung von *very-low-viscosity* Natrium-Alginat **19** mit Aminoethylmethacrylat **44**.

Äquivalente AEMA	Löslichkeit in H ₂ O	Hydrogel-Bildung
1.50	löslich	möglich
1.00	löslich	möglich
0.50	löslich	möglich

Tabelle 1 und 2 zeigen, welche methacrylierten Alginate nach Vernetzung stabile Hydrogele bildeten. Der Einsatz von einem Äquivalent „AEMA“ **44** führte in beiden Fällen zur Bildung stabiler Hydrogele. Geringere Belegungsgraden von 0.5 Äquivalenten führten ebenfalls zur Gelierung. Diese Gele waren jedoch über einen längeren Zeitraum in Lösung nicht stabil. Wurden weniger als 0.2 Äquivalente „AEMA“ für die Funktionalisierung eingesetzt, konnten keine Hydrogele erhalten werden. Als optimales System kristallisierte sich *very-low-viscosity* Alginat **19**, funktionalisiert mit 1.5 Äquivalenten „AEMA“, heraus. Auf Grund der guten Löslichkeit des Alginats bei diesem Belegungsgrad, sowie der Qualität der erhaltenen Hydrogele, wurde dieses System für alle weiteren Gelierungsexperimente eingesetzt. Ebenfalls konnte Propylenglykol-Alginat **46** mit einem Äquivalent „AEMA“ erfolgreich polymerisiert werden. Die geringere Löslichkeit der modifizierten Propylenglykol-Alginate **47** machte dieses Protokoll für weitere Gelierungen jedoch nicht interessant.

BONINO *et al.* visualisierten den Verlauf der radikalischen Vernetzung von **45** mit Hilfe von rheologischen Messungen.¹¹² Der Einfluss des Methacrylierungsgrades, die Intensität der UV-Quelle und die Konzentration des Photoinitiators auf den Gelierungsprozess wurden bewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass der Gel-Punkt nach etwa 20 Minuten erreicht wird, wobei dieser, abhängig von den genannten Variablen, um wenige Minuten verschoben sein kann.

4.2.2 Hydrogel-Blends

Um das Spektrum der gelierfähigen Biopolymere zu erweitern, wurden neben Alginat ebenfalls Gelatine und Hyaluronsäure mit methacrylischen Einheiten versehen (Abb. 10). Die methacrylierten Derivate der Hyaluronsäure **51** und der Gelatine **52** wurden von L. MÖLLER,⁸⁹ der Literatur folgend synthetisiert.^{113,114} Dazu wurde der primäre Alkohol der Hyaluronsäure mit Glycidymethacrylat umgesetzt und die Lysineinheiten der Gelatine mit Methylmethacrylanhydrid modifiziert.

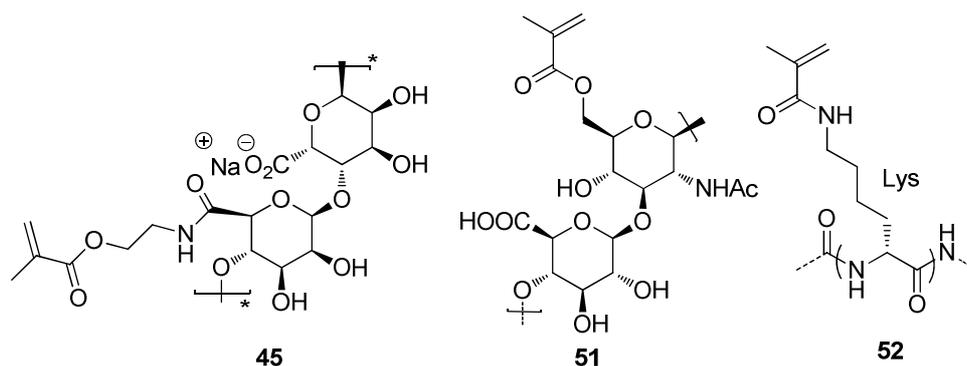


Abb. 10: Methacrylierte Derivate von Alginat **45**, Hyaluronsäure **51** und Gelatine **52**.

Somit war ein Zugang zu photopolymerisierbaren Makromolekülen aus drei unterschiedlichen nativen Quellen erreicht:

- Alginat, ein Vertreter der pflanzlichen Polymere, isoliert aus Braunalgen.
- Hyaluronsäure, isoliert aus bakteriellen Quellen (*Streptococcus equi*).
- Gelatine, ein tierisches Protein, gewonnen aus Rinderknochen.

Neben Gelen, die auf Basis eines Biopolymers erzeugt wurden, wurden auch Hydrogel-Komposite aus zwei verschiedenen Makromolekülen hergestellt. Die gewählten Biopolymere wurden dazu in 1%iger wässriger Initiatorlösung bis zur Homogenität gelöst und anschließend durch zehnmündige UV-Bestrahlung polymerisiert. Zunächst wurde der ideale Methacrylierungsgrad für jedes Biopolymer bestimmt. Die besten Resultate lieferte Alginat mit 30%iger, Hyaluronsäure mit 14%iger und Gelatine mit 100%iger Belegung. Ein umfassendes *Screening* (Abb. 11) lieferte anschließend Hydrogele aus den drei methacrylierten Biopolymeren mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Insgesamt wurden neun verschiedene Formulierungen aus **45**, **51** und **52** in Hydrogele überführt (Abb. 11). Während die Synthesen der methacrylierten Biopolymere Literatur bekannt sind,^{110,113,114} liefert die umfassende Untersuchung der Blends bisher nicht bekannte Resultate.

¹¹³ M. H. M. Oudshoorn, R. Rissmann, J. A. Bouwstra, W. E. Hennink, *Polymer* **2007**, *48*, 1915-1920.

¹¹⁴ A. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, *Biomacromol.* **2000**, *1*, 31-38.

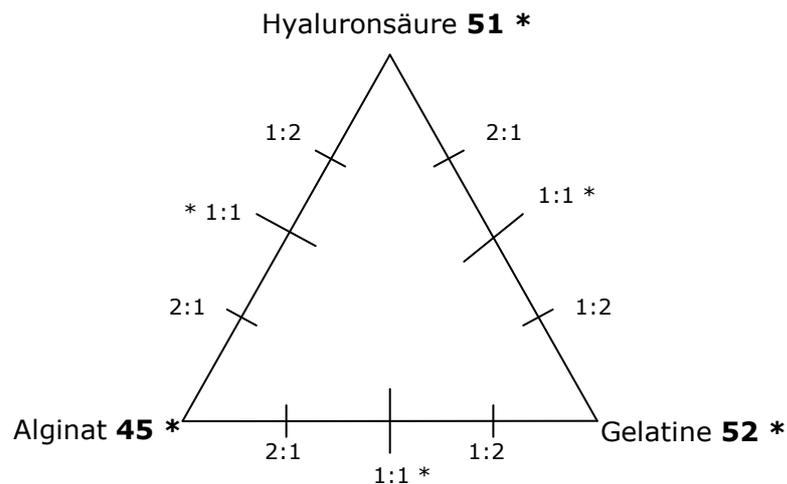


Abb. 11: Hergestellte Hydrogel-Komposite aus Alginate **45**, Hyaluronsäure **51** und Gelatine **52** in verschiedenen Zusammensetzungen.

Um die Eigenschaften der einzelnen Biopolymere und ihre Auswirkungen auf die erzeugten Komposite zu analysieren, wurden sechs Gele detailliert untersucht (Abb. 11, markiert mit Sternchen). So wurden drei Hydrogele aus den Biopolymeren **45**, **51** und **52** präpariert, drei weitere Probekörper bestanden aus den jeweiligen 1:1 Kompositen. Nach Herstellung der Proben wurden diese mechanischen und biomedizinischen Tests unterzogen (Kapitel 4.2.2.1 bis 4.5.2).

Zum Vergleich konnten lediglich für das Alginate-Hyaluronsäure Komposit Literaturdaten herangezogen werden.¹¹⁵ Weitere Hydrogel-Blends aus Biopolymeren, die ebenfalls unter radikalischen Bedingungen präpariert wurden, sind nicht bekannt.

4.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Exemplarisch wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) eines Gelatine-Gels und eines Komposits aus Alginate und Hyaluronsäure angefertigt. Alle gezeigten REM-Aufnahmen wurden im Institut für Mehrphasentechnik, Leibniz Universität Hannover, von T. CHAKRADEO angefertigt. Die Proben wurden horizontal geschnitten, mit Gold *gesputtert* und bei variierenden Elektronenspannungen vermessen. Die Aufnahmen zeigten, dass sowohl für das Komposit als auch für das Gelatine-Gel ein Netzwerk mit homogener Struktur erhalten wurde (Abb. 12). In beiden Gelen wurde ein sehr engmaschiges Polymernetzwerk erhalten. Die Netzwerkstruktur und die Porengrößen zeigten vergleichbare Dimensionen, die Porendurchmesser lagen im Mittel bei 10 μm , maximal bei 30 μm . Unterschiede zwischen den beiden Gelen waren in der Form der Poren erkennbar. Während das Gelatine-Gel runde Poren bildete, lagen diese im Gel-Blend elliptisch vor.

¹¹⁵ K. A. Smeds, M. W. Grinstaff, *J Biomed. Mat. Res.* **2001**, 54, 115-121.

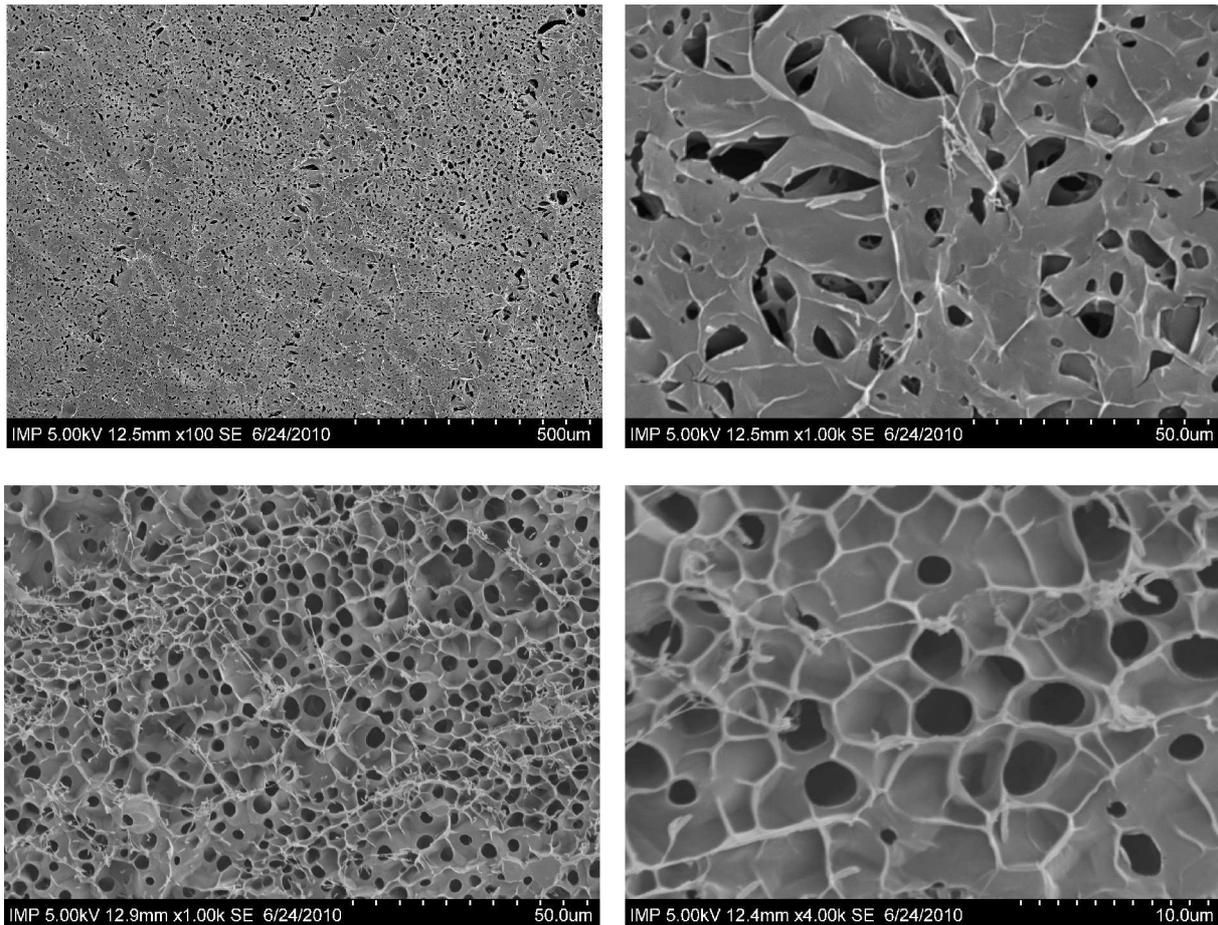


Abb. 12: REM-Aufnahmen des Hydrogel-Blends aus methacryliertem Alginat und Hyaluronsäure (oben) und des Gelatine-Hydrogels (unten).

REM-Aufnahmen von Alginat-Gelen nach SUN *et al.* zeigten ein ähnlich homogenes Strukturmuster, auch wenn in diesem Fall die Poren in größeren Dimensionen (max. 50 μm) vorlagen.¹¹⁶ Darüber hinaus lässt sich die Porendichte des Netzwerkes, abhängig vom Belegungsgrad des Polymers, nur in geringem Maße beeinflussen. Ein gezielter Strukturaufbau war in Folge der willkürlich, sehr schnell verlaufenden Photopolymerisation nicht möglich. Hier könnte die Laser induzierte 2-Photonen-Polymerisation „2PP“ eine Alternative liefern.²⁰

4.3 Mechanische Eigenschaften methacrylischer Gele

Die physikalischen Eigenschaften der Hydrogele wurden mit einem Rotationsrheometer (Physika MCR 501s; ANTON PAAR, Ostfildern, Deutschland) am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. -DIK- in Zusammenarbeit mit M. MÖWES bestimmt. Das Rheometer wurde für die Untersuchungen mit einer Fußplatte und einem Stempel (8 mm Durchmesser) bestückt. Die viskoelastischen Eigenschaften wurden im Amplitudensweep Modus in einem Bereich von 0.01% bis 100% Deformation und im Frequenzsweep Modus

¹¹⁶ J. Sun, W. Xiao, Y. Tang, K. Li, H. Fan, *Soft Matter*. **2012**, 8, 2398-2404.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

in einem Bereich von 0.1 Hz bis 100 Hz vermessen. In beiden Modi wurden das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' bestimmt. Alle Proben lagen in gefriergetrockneter Form vor und wurden vor den Messungen in $H_2O_{dest.}$ für 2 h gequollen.

In der ersten Messreihe, dem Amplitudensweep, wurden die mechanischen Eigenschaften der Gele bei zunehmender Deformation in einem oszillatorischen Verfahren analysiert. Dazu wurde das Drehmoment des Stempels regelmäßig erhöht, die Auslenkung konstant bei einer Frequenz von 1 Hz gehalten und die jeweilige Gegenkraft des Gels vermessen. Abb. 13 zeigt den Verlauf der Speichermodule (G') und der Verlustmodule (G'') für alle sechs vermessenen Hydrogele. Diese Werte geben Aufschluss über die Stabilität der einzelnen Biopolymere bzw. der Mischungen und ihr Verhalten unter Belastung.

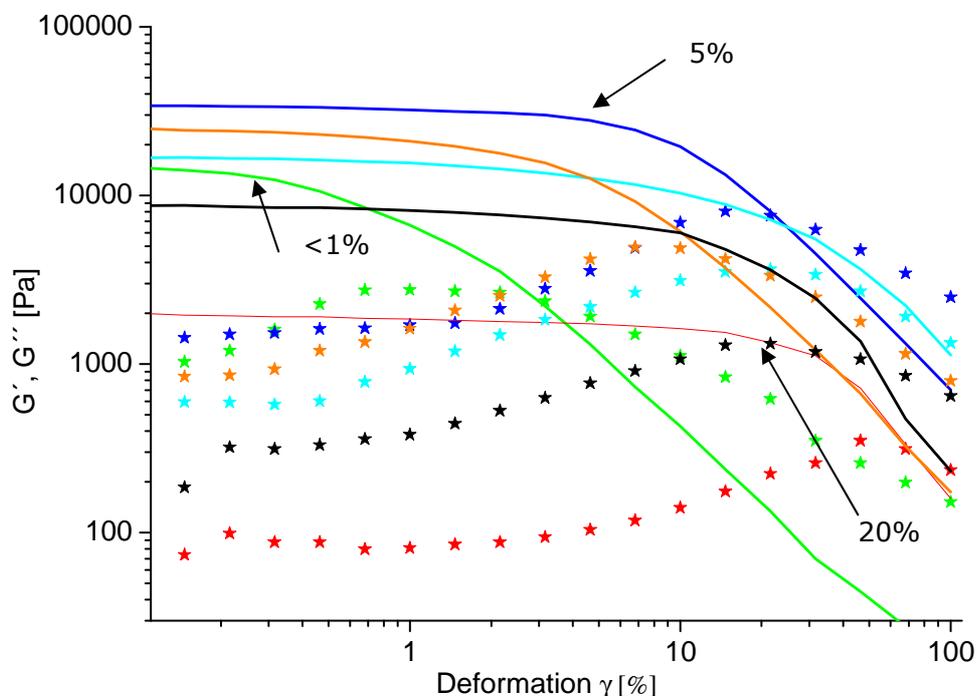


Abb. 13: Amplitudensweep photochemisch vernetzter Hydrogele. Die Speichermodule G' sind als Linie, die Verlustmodule G'' in Form von Sternen dargestellt. Die verschiedenen Gele sind in den folgenden Farben abgebildet: Hyaluronsäure (Grün), Gelatine (Rot), Alginat (Blau), Alginat/Gelatine 50:50 w/w (Hellblau), Hyaluronsäure/Gelatine 50:50 w/w (Schwarz) und Hyaluronsäure/Alginat 50:50 w/w (Orange).

Im Bereich kleiner Deformation blieben G' und G'' nahezu konstant; dies zeigte, dass alle Proben anfangs eine homogene Struktur besaßen und sich in einem linear viskoelastischen Zustand befanden. Da zu Beginn alle Werte von G' oberhalb von G'' lagen, mit vergleichbaren Differenzen für jedes Gel-System, befanden sich alle Proben im Grundzustand eines Festkörpers. Diese Tatsache, dass alle Gele in Form eines

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Festkörpers und nicht als hochviskose Flüssigkeiten vorlagen, ist die wichtigste Voraussetzung für Anwendungen im Bereich des *tissue engineering*s. Nur als Festkörper besitzen die Gele eine ausreichende Stabilität für die Zellkultivierung und eine Implantation *in vivo*. SMEDS *et al.* attestierten für photovernetzte Gele aus Alginat- und Hyaluronsäure sowie deren Komposite ebenfalls das Verhalten eines elastischen Festkörpers.¹¹⁵

Die Anfangswerte des Speichermoduls G' geben die Stabilität der jeweiligen Hydrogele wieder (Abb. 14). Alginat beinhaltende Gele haben eine äußerst feste Konsistenz, wohingegen Gelatine-Gele sehr weiche Konstrukte bilden. Die Werte der Blends ergeben sich weitgehend aus den Mittelwerten der Alginat-, Hyaluronsäure- und Gelatine-Gele.

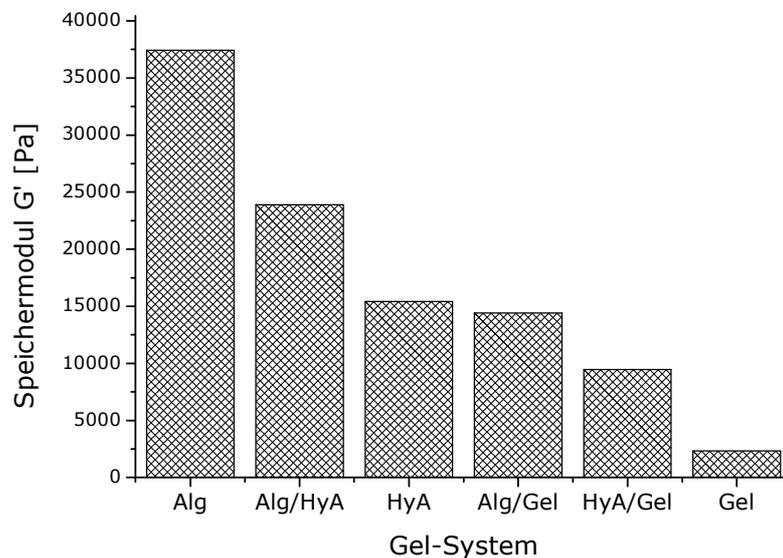


Abb. 14: Anfangswerte der Speichermodule G' aller sechs untersuchten Hydrogele. (Alg= Alginat, HyA= Hyaluronsäure und Gel= Gelatine)

Der Verlauf der Kurven bis zum Wendepunkt gibt das Verhalten der Gele unter Deformationsbedingungen an (Abb. 13). Das Hyaluronsäurenetzwerk besitzt folglich weder eine hohe Rigidität noch Elastizität, so dass dieses unter Belastung sehr schnell zerstört wird. Anders verhalten sich die steifen Alginat-Gele, da bei diesen die Belastbarkeit unter Deformation deutlich höher liegt. Der höchste Wert wurde für das Gelatine-Gel erreicht. Gelatine besitzt demnach die geringste Stabilität, gleichzeitig aber auch die mit Abstand höchste Flexibilität der drei Biopolymere.

Die Werte von G'' zeigten identische Resultate, da die Abnahme des Speichermoduls mit der Zunahme des Verlustmoduls einhergeht. Besonders anschaulich wird dies am Verlauf von G' und G'' der Hyaluronsäure Probekörper. Geht die Fähigkeit Energie zu speichern verloren - der Wert des Speichermoduls sinkt - so resultiert daraus ein Anstieg im Verlustwert und das Verlustmodul steigt.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Die Speicher- und Verlustmodule der Hydrogele wurden zusätzlich durch eine zweite Methode validiert. In den gemessenen Frequenzsweeps wurde die Deformation konstant bei 0.3% gehalten, während die Frequenz von 0.1 Hz bis 100 Hz erhöht wurde. Die Messresultate des Frequenzsweeps (Abb. 15) korrelieren mit denen des Amplitudensweeps. Die Werte von G' und G'' bei geringen Frequenzen repräsentieren das Verhalten der Gele bei kleinen physikalischen Stressbelastungen, während hohe Frequenzen zu hohen Belastungen der Gele führen. Wie schon durch Messung des Amplitudensweeps deutlich wurde, besitzen Alginate das höchste Speichermodul, Hyaluronsäuren einen mittleren Wert und Gelatine das geringste Modul. Identische Verhaltensmuster wurden bei den Verlustmodulen identifiziert. Die hohe Elastizität der Gelatine beim Amplitudensweep konnte bei hohen Frequenzen nicht reproduziert werden. Hier hielten Alginate und Hyaluronsäure deutlich höheren Stressbelastungen stand.

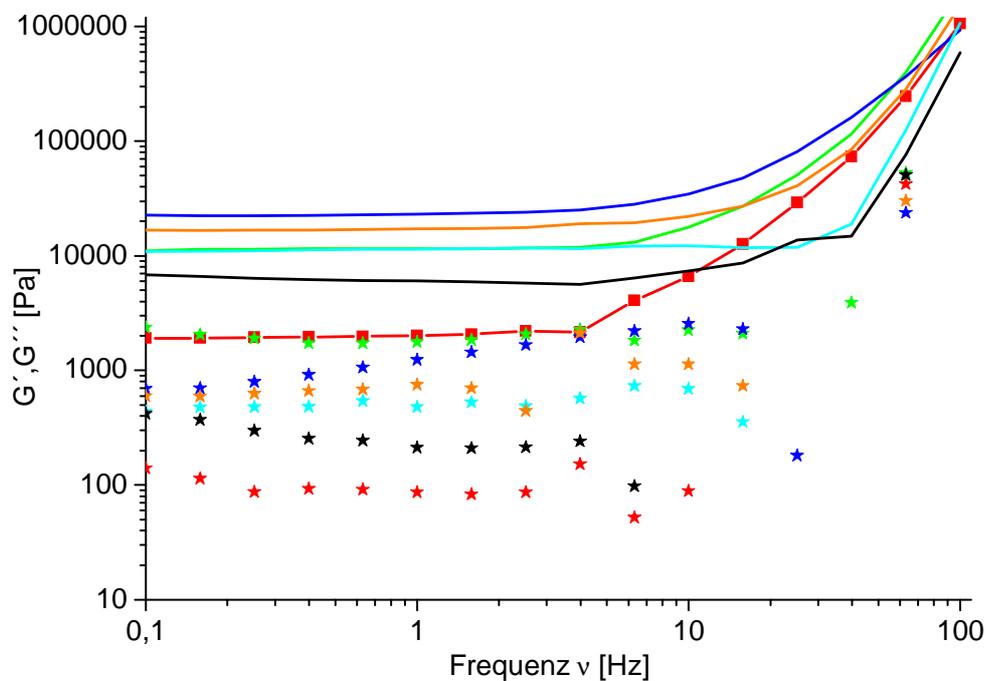


Abb. 15: Frequenzsweep photochemisch vernetzter Hydrogele. Die Speichermodule G' sind als Linie, die Verlustmodule G'' in Form von Sternen dargestellt. Die verschiedenen Gele sind wie folgt dargestellt: Hyaluronsäure (Grün), Gelatine (Rot), Alginate (Blau), Alginate/Gelatine 50:50 w/w (Hellblau), Hyaluronsäure/Gelatine 50:50 w/w (Schwarz) und Hyaluronsäure/Alginate 50:50 w/w (Orange).

Vergleichbare Resultate für methacrylierte Gelatine beschrieben VAN DEN BULKE *et al.*¹¹⁴ Der Wendepunkt des linear viskoelastischen Plateaus liegt dabei in einem ähnlichen Frequenzbereich, wobei die Werte von G' und G'' insgesamt geringer sind. Alginate mit einem Methacrylierungsgrad über 25% zeigten ebenfalls Speichermodule in Bereichen über 10^3 Pa.¹¹⁶ Gleiches galt für die Verlustmodule G'' mit etwa 1000 Pa. Ein konstant

viskoelastisches Plateau bis 10 Hz attestierten auch JEON *et al.*¹¹¹ für partiell oxidierte, photovernetzte, methacrylische Alginat-Gele. Die Module G' und G'' lagen hier allerdings bei höheren Werten.

Generell sind die Daten in der Literatur vergleichbar mit denen in der vorliegenden Arbeit. Dennoch sind die individuellen Werte sehr stark abhängig von Parametern, wie der Belegungsrate, der Bestrahlungs- bzw. Gelierungsdauer und dem Versuchsaufbau bei den rheologischen Untersuchungen. Absolute Werte sind deshalb kritisch zu betrachten; jedoch lassen sich aus den Resultaten des Amplitudensweeps (Abb. 13) und des Frequenzweeps (Abb. 15) für die einzelnen Biopolymere qualitative Eigenschaften ermitteln:

- Alginat besitzt die höchste Steifheit.
- Gele, die Alginat enthalten, besitzen die höchste Formstabilität und Festigkeit.
- Gelatine hat die geringste Rigidität, sie verformt sich leicht.
- Auf Grund der hohen Elastizität der Gelatine werden diese Gele aber erst bei hohen Belastungen zerstört.
- Hyaluronsäure ist weder ridige noch elastisch, unter Belastung wird das Netzwerk sehr schnell zerstört.

Die Vorteile der Hyaluronsäure liegen jedoch weniger in ihrem mechanischen Verhalten als in ihrer guten biologischen Kompatibilität und Abbaubarkeit in human-biologischer Umgebung. Dieses modulare System erlaubt es, gezielt Eigenschaften in Hydrogelen durch Polymermischungen einzustellen. Durch Variation der Polymerzusammensetzungen können Hydrogele mit spezifischen Stabilitäts- und Elastizitätseigenschaften generiert werden. Dies erlaubt es, die Eigenschaften des Gels auf die gewünschte biomedizinische Anwendung anzupassen, was für das *tissue engineering* besonders wichtig ist, da Gewebe in unterschiedlichen Körperteilen spezielle Belastungen erfahren.

4.4 Quellraten

Hinsichtlich einer medizinischen Anwendung im *tissue engineering* ist die Quelleigenschaft der Gele ebenfalls relevant. Grundsätzlich ist es wichtig, dass die Gele nur im geringen Maße aufquellen, damit sie ihre mechanischen Eigenschaften nicht wesentlich verändern und/oder ihre Form verlieren. Der Quellvorgang sollte folglich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht, bei der Aufnahme und Abgabe von Wasser identisch sind, erreichen. Ferner sollten die Gele nicht zu stark an Gewicht zunehmen, die Quellrate Q sollte unter einem Wert von 100 liegen. Die Formstabilität ist wichtig, damit der zu implantierende Gelkörper seine Struktur auch nach dem Quellvorgang beibehält, sowohl *ex vivo* wie auch *in vivo*.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Zur Bestimmung des Quellverhaltens wurden die gefriergetrockneten Gele (Durchmesser 6 mm) in je 5 mL Wasser bei 25 °C für 6 Std. gequollen. Die aufgenommene Menge an Wasser wurde anschließend gravimetrisch bestimmt. Dafür wurde das an der Oberfläche des Gels befindliche Wasser sorgfältig manuell entfernt und die Proben regelmäßig vermessen. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis die gequollenen Gele ein konstantes Gewicht erreicht hatten. Abb. 16 zeigt, dass alle Gelsysteme auch nach Quellen über zwei Tage in ihrer ursprünglichen Form vorlagen. Die Veränderung des Gewichtes in Abhängigkeit der Zeit ist in Abb. 17 graphisch dargestellt.

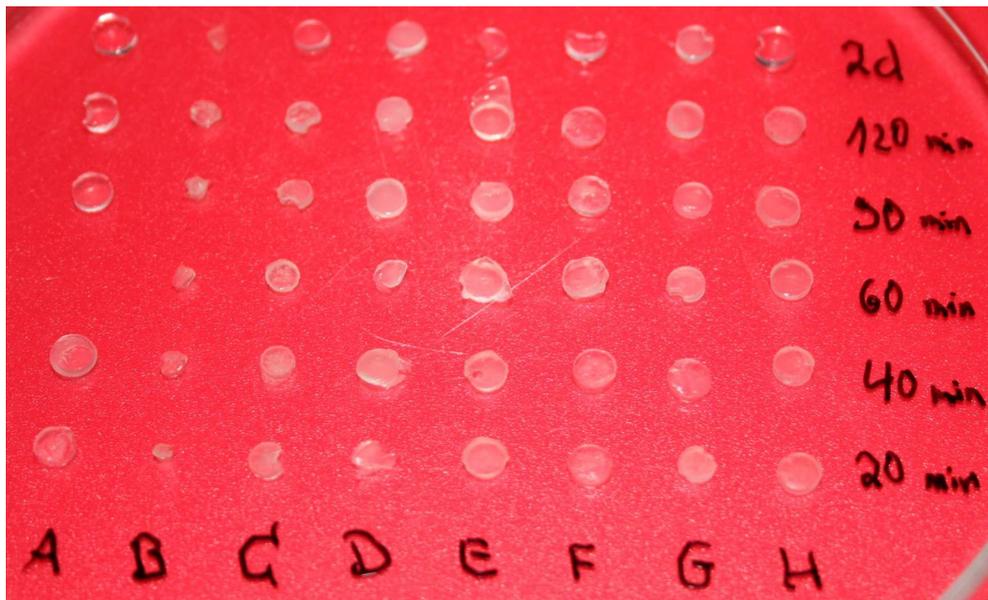


Abb. 16: In der Quellanalyse wurden acht verschiedene Zusammensetzungen untersucht: monokompositorische Gele A-C (Alginat, Hyaluronsäure und Gelatine), 1:1 Blends D-F und zwei 2:1 Komposite G+H. Die Probekörper wurden nach regelmäßigen Zeitabständen dem Quellmedium $H_2O_{dest.}$ entnommen.

Unabhängig von der jeweiligen Zusammensetzung wurde die ursprüngliche Form aller Gele erhalten. Die Zunahme des Gewichts und damit die Aufnahme an Wasser variierten in Abhängigkeit des eingesetzten Biopolymers.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

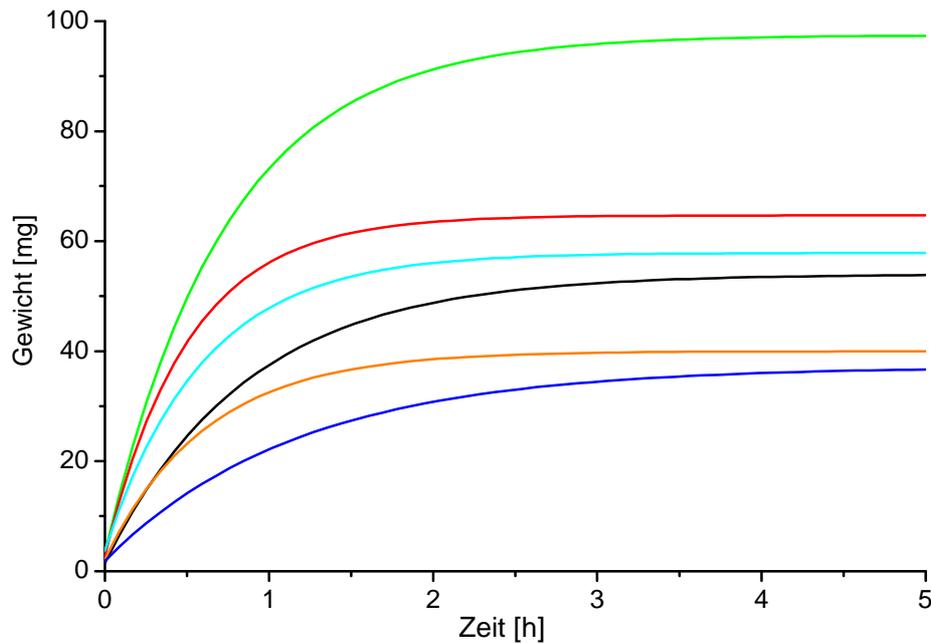


Abb. 17: Bestimmung des Quellverhaltens durch Messung des Gewichtes über die Zeit. Die verschiedenen Gel-Systeme werden in den folgenden Farben abgebildet: Hyaluronsäure (Grün), Gelatine (Rot), Alginat (Blau), Alginat/Gelatine 50:50 w/w (Hellblau), Hyaluronsäure/Gelatine 50:50 w/w (Schwarz) und Hyaluronsäure/Alginat 50:50 w/w (Orange).

Nach maximal fünf Stunden wurde für alle sechs Gel-Systeme ein konstantes Gewicht erreicht. Darüber hinaus deutet der Verlauf der Kurven an, dass das Gleichgewicht in fast allen Systemen bereits nach drei Stunden erreicht wurde. SMEDS *et al.* konnten für Alginat- und Hyaluronsäure-Gele sowie deren Komposit ein analoges Verhalten nachweisen.¹¹⁵ Die Sättigung wurde in allen Fällen innerhalb einer Stunde erreicht, anschließend wurden nur marginale Mengen an Medium aufgenommen.

Als charakteristischer Wert für das Quellverhalten wird der Quellwert Q bestimmt. Dieser gibt das Verhältnis des vollständig gequollenen Gels zum Trockengewicht des Polymers an. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Quellwerte Q der radikalisch polymerisierten Hydrogel-Systeme.

	Gel	HyA	Alg	HyA-Gel	Alg-Gel	Alg-HyA
Q	22.2	29.9	19.7	36.9	15.5	18.1

Alginat-Gele zeigten die geringsten Absorbereigenschaften, Hyaluronsäure-Gele wiesen die höchste Aufnahmefähigkeit auf und Gelatine-Gele lagen im Mittel. Die Werte der Blends zeigten kein stringentes Verhalten in Relation zu den nicht gemischten Gelen.

Die Resultate von MASTERS *et al.*, die Hyaluronsäure-Gele mit einem Methacrylierungsgrad von 100% untersuchten, liegen mit einem Wert von $Q = 24$ im

gleichen Bereich.³⁶ Auch die Quellwerte ($Q=20$) von NICHOL *et al.* für Gelatine-Gele sind vergleichbar.⁴² SUN *et al.* berichteten, dass Alginat-Gele einen Wert von $Q=14$ innerhalb von fünf Tagen erreichen.¹¹⁶ Auch JEON *et al.* beschrieben einen Wert von $Q=20$ für hochkonzentrierte Alginatlösungen.¹¹¹ Die jeweiligen Werte variieren dabei in Abhängigkeit vom Methacrylat-Belegungsgrad, der Konzentration des Radikalstarters und des Biopolymers, sowie vom gewählten wässrigen Medium. Wird lediglich einer dieser Parameter verändert, hat dieses bereits deutliche Einflüsse auf das Quellverhalten.^{110,111} Werden mehrere Variablen geändert, so sind die Ergebnisse nur noch in ihrer Tendenz vergleichbar.

4.5 Biologische Bewertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei saccharidische und ein peptidisches Makromolekül biologisch bewertet. Diese Divergenz erlaubte es, die verschiedenen Polymerklassen und Strukturtypen für ihre Eignung im *tissue engineering* zu untersuchen. Für klinische, humane Therapien sind tierische Produkte auf Grund ihres xenogenen Ursprungs, möglicher Kontamination mit Viren, Prionen oder anderen Pathogenen immunologisch inkompatibel. Im Falle der tierisch gewonnenen Gelatine könnte diese durch humane oder rekombinante Produkte ersetzt werden. Die biologischen Untersuchungen wurden mit Zellmischungen aus Bindegewebszellen (Fibroblasten) und Herzmuskelzellen (Cardiomyocyten), isoliert aus neonatalen Rattenherzen, durchgeführt. Alle biologischen Tests wurden von J. DAHLMANN aus der Arbeitsgruppe GRUH im LEBAO „Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe“ realisiert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf Studien zur Biokompatibilität und der Fähigkeit der Zelladhäsion gelegt.

4.5.1 Präparation der Zelltests

Die gefriergetrockneten Gele wurden zuerst für zwei Stunden im Kulturmedium DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM „DMEM“ rehydriert. Anschließend wurden die im Nährmedium aufgenommenen Zellmischungen auf allen Gelen ausgesät und bei 37 °C, 5% CO₂ und bei einer Luftfeuchte von 80% für 18 Stunden im Standardinkubator kultiviert. Während dieser Zeit sollte die Adhäsion der Zellen auf dem Gel erfolgen, da die Gele anschließend in 24-Loch Gefäße transferiert und für weitere sieben Tage bei täglichem Nährmediumwechsel kultiviert wurden. Dieser Schritt sollte die Überlebensfähigkeit und/oder eine eventuelle Proliferation der Zellen nachweisen.

In Falle von Cardiomyocyten kann der Nachweis einer erfolgreichen Adhäsion durch die visuelle Überprüfung mit einem Zellkulturmikroskop erfolgen. Dies ist möglich, da diese Zellen nach erfolgreicher Adhäsion umgehend charakteristische Kontraktionen auf dem Trägermaterial ausführen. Die Anheftung führt ebenfalls dazu, dass die Zellen von einer abgekugelten, verkapselten in eine langgestreckte Morphologie übergehen. Aktiv

kontrahierende Cardiomyocyten, die in einem gestreckten Zustand vorliegen, zeigen eine sehr gute Vitalität und Funktionsfähigkeit.

Nach siebentägiger Kultivierung wurden die Gele dem Medium entnommen und mit Formaldehyd fixiert. Nachfolgende Färbungen wurden mit Phalloidin Atto-488 und 4',6-Diamidino-2-phenylindol „DAPI“ durchgeführt. Dabei werden durch Phalloidin F-Actin Filamente im Zytoskelett nachgewiesen, während sich DAPI in Nukleobasen-reichen Regionen, wie den Zellkernen, anreichert. Zusätzlich wurden monoklonale Maus IgG1 Antikörper zusammen mit DyLight 549 markierten sekundären Antikörpern eingesetzt, die speziell sarkomerisches α -Actinin markieren. Da α -Actinin hauptsächlich in Muskelfibrillen vorkommt, weist dieser Antikörper spezifisch Muskelzellen wie Cardiomyocyten nach. Die gefärbten Gele wurden anschließend mit Hilfe eines Kryostaten bei -80 °C schockgefroren und geschnitten. Die Kryoschnitte ermöglichten es, Zellen im Inneren des Gelkörpers zu identifizieren.

4.5.2 Auswertung der Zelltests

Die biologischen Ergebnisse ebnen den Weg für die weitere Verwendung der Gele im Bereich des *tissue engineerings*. Neben dem Überleben der Zellen sollte idealerweise auch eine Adhäsion auf den Gelkörpern erfolgen, da nur dann ein biologisch funktionelles Gewebe gebildet werden kann. Da insgesamt sechs Gele getestet wurden, lässt sich sowohl das Verhalten jedes einzelnen Biopolymers als auch deren Einfluss auf das Blend betrachten.

Die Analyse der Zellkulturen zeigte, dass in Gegenwart aller getesteten Gele vitale, aktiv kontrahierende Zellen erkennbar waren, wobei ein Großteil der Zellen an den beschichteten Böden der Kulturplatten anhaftete. Weder die eingesetzten, modifizierten Biomaterialien, noch das Gelierungsverfahren hatten einen toxischen Einfluss auf die Vitalität der Zellmischungen. Die per Radikalreaktionen aus den methacrylierten Biopolymeren (Abb. 10) erzeugten Gele besaßen folglich eine gute Biokompatibilität.

Erfolgreiche Zelladhäsionen auf den Oberflächen der Gele konnten nur in Gegenwart von Gelatine nachgewiesen werden (Abb. 18). So wurde ein Anwachsen der Cardiomyocyten auf dem Gelatine-Gel (Abb. 18c), sowie den Gelatine-haltigen Blends mit Alginat (Abb. 18e) und Hyaluronsäure (Abb. 18f) detektiert.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

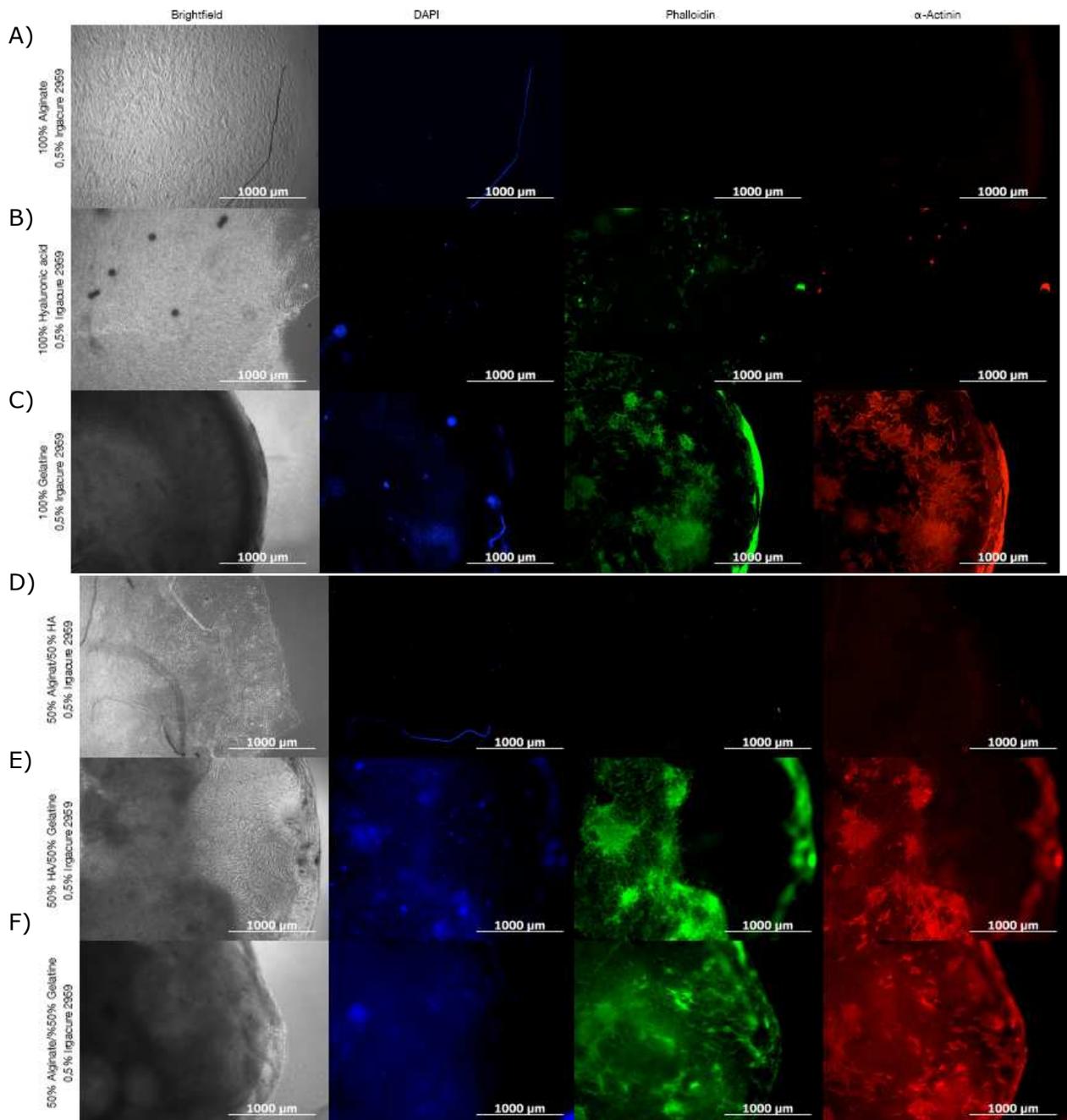


Abb. 18: Immunfluoreszenz-Färbungen der auf den methacrylichen Gelen ausgesiedelten Zellmischungen. Alle Gele wurden nach siebentägiger Kultivierung mit den Färbereagenzien DAPI, Phalloidin und dem gelabeltem Antikörper IgG1 Antikörper gefärbt; A) Alginate-Gel, B) Hyaluronsäure-Gel, C) Gelatine-Gel D) Alginate-Hyaluronsäure Blend, E) Hyaluronsäure-Gelatine Blend und F) Alginate-Gelatine Blend; jeweils polymerisiert in 0.5%iger wässriger Irigacure-Lösung.

Die Ergebnisse der Zellkulturen *in vitro* lassen folgende Schlüsse zu:

- Die Biopolymere Alginate und Hyaluronsäure sind biokompatibel, induzieren aber keine Zelladhäsion.
- Die peptidische Gelatine ermöglicht ein Anwachsen der Zellen auf den Gelen.

Radikalisch photovernetzbare Hydrogele

Im Falle des Gelatine-Gels wurde, neben einzelligen Kontraktionen, ebenfalls die Deformation des gesamten Gelkörpers beobachtet. Folglich besitzen die Polysaccharide keine zellspezifischen Adhäsionspunkte. Trotzdem spielen Alginate und Hyaluronsäure eine wichtige Rolle bei der mechanischen Stabilität der Gelatine-Blends, da Gelatine-Gele alleine sehr weiche Konstrukte bilden (Kapitel 4.3).

Als Nächstes wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen in das Gel-Innere bestimmt. Hierfür ist eine ausreichende Porosität im Bereich von 40 µm bis 150 µm Voraussetzung.¹¹⁷ Dies wurde mit Hilfe von Kryoschnitten untersucht. Wie Abb. 19 zeigt, wurden Zellbestandteile lediglich auf den Oberflächen der Gele identifiziert. In keinem der untersuchten Gele fand ein Einwachsen der Zellen statt und zwar unabhängig von der Anwesenheit der Gelatine. Diese Beobachtung korreliert mit den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der lyophilisierten Gele (Kapitel 4.2.2.1).



Abb. 19: Immunfluoreszenz-Färbungen des kryogeschnittenen Gelatine-Gels. Die Färbungen erfolgten nach siebentägiger Kultivierung mit den Färbereagenzien DAPI, Phalloidin und dem gelabeltem Antikörper IgG1.

Tabelle 4 zeigt die Resultate der biologischen Examination in einer Übersicht.

Tabelle 4: Zusammenfassung der biologischen Studien: Zellmischungen, isoliert aus neonatalen Rattenherzen, wurden auf Gelen aus methacryliertem -Alginate (Alg), -Hyaluronsäure (HyA), -Gelatine (Gel) und den jeweiligen 1:1 Kompositen ausgesiedelt.

	Vitalität	Adhäsion	Einwachsen
Alg	gegeben	nicht gegeben	nicht gegeben
HyA	gegeben	nicht gegeben	nicht gegeben
Gel	gegeben	gegeben	nicht gegeben
Alg/Gel	gegeben	gegeben	nicht gegeben
Alg/HyA	gegeben	nicht gegeben	nicht gegeben
HyA/Gel	gegeben	gegeben	nicht gegeben

¹¹⁷ J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, L. A. Griffith, *Tissue Eng.* **2001**, 7, 557-572.

JEON *et al.* präsentierten Daten von mesenchymalen Stammzellen, die ebenfalls auf radikalisch vernetzten Alginaten kultiviert wurden.¹¹¹ In dem gezeigten Fall wurden ca. 3% der Zellen innerhalb von vier Tagen auf den Hydrogelen adhären. Ein identisches Verhalten bezüglich Vitalität und Adhäsion, bei Zelltests mit Osteoblasten aus Mäusen, wiesen die Ergebnisse von SUN *et al.* auf.¹¹⁶ So konnte das Überleben der Zellen identifiziert werden, aber eine Änderung der Morphologie aus der abgekugelten in die gespreizte Form wurde zu keinem Zeitpunkt ermittelt. Erst nach Zugabe von Collagen fand eine Adhäsion der Zellen statt. In Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit fanden die Autoren, dass die Zytokompatibilität der photovernetzten Alginat-Gele vorliegt; die Adhäsion der Zellen jedoch nur in Gegenwart von Collagen erfolgte. Zudem wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Menge beigefügten Collagens, signifikante Verbesserungen in der Zellproliferation und der Anlagerung gefunden.

Die Vergleiche mit der Literatur verdeutlichen, dass die biologische Bewertung der photovernetzten Hydrogele repräsentative Daten lieferte (Tabelle 4). Folglich besitzen Hydrogele auf Basis saccharidischer Polymere keine geeigneten, funktionellen Domänen, um eine z.B. durch Integrine vermittelte Zelladhäsion auf dem Material einzuleiten. Die grundsätzliche Biokompatibilität der Biopolymere konnte dennoch gezeigt werden, was diese als formgebende Grundgerüste für weitere Untersuchungen prädestiniert. Die im Alginat verbliebende EDC-Harnstoff Reste (Abb. 9) besitzen außerdem keine toxischen Einflüsse wie bereits die Arbeiten von JEON *et al.*¹¹⁰ zeigten.

5 Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Hydrogele lassen sich durch chemische oder physikalische Vernetzungen *in situ* erzeugen. Die physikalische Vernetzung beruht auf ionischen oder Dipol-Dipol Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Polymeren. Diese Art der Bindung kann im menschlichen Körper jedoch wieder gebrochen werden: Besonders die durch Kationen vermittelten Vernetzungen sind anfällig gegenüber reversiblen Kationenaustausch mit den ubiquitär vorkommenden Alkali- oder Erdalkalimetallen des Körpers. Eine sehr häufig angewandte Gelierungstechnik ist die durch Calcium induzierte Hydrogelierung von Algin Säuren in Wasser (Kapitel 1.4.3). Die durch die divalenten Calcium-Ionen erzeugte Überstruktur der Alginatketten, die mit der Gelierung des Polymers einhergeht, lässt sich im Organismus durch Austausch mit Alkalimetallen jedoch leicht wieder lösen.

Um dieses Problem zu umgehen, werden ionische Verknüpfungsstrategien häufig durch kovalente ersetzt. Diese werden zumeist durch Photopolymerisationen (Kapitel 4) oder durch diverse Varianten der *Click*-Chemie realisiert.¹¹⁸ In die letzte Kategorie sind auch *in situ* gelierende Systeme einzuordnen, die ohne Zusatz von Katalysatoren in wässrigen Systemen ablaufen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Systeme besteht in der Möglichkeit, beide in Lösung vorliegende Reaktionspartner in den Körper zu injizieren und anschließend lokal zu polymerisieren. Das Prinzip der *in situ* gelierenden Systeme ist in Abb. 20 gezeigt.

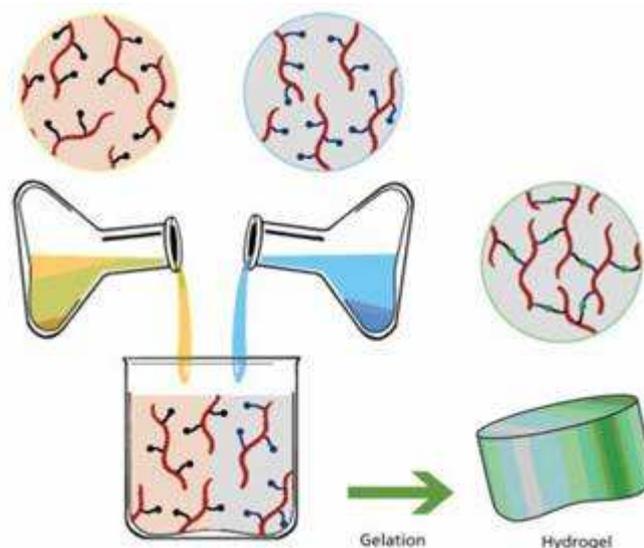


Abb. 20: Schematische Darstellung der *in situ* verlaufenden Polymerisation zwischen zwei funktionalisierten Polymer-Komponenten.¹¹⁹ Nach Mischen von wässrigen Lösungen beider Komponenten werden diese kovalent unter Bildung von Hydrogelen miteinander vernetzt.

¹¹⁸ M. van Dijk, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2001-2016.

¹¹⁹ D. A. Ossipov, K. Brännvall, K. Forsberg-Nilsson, J. Hilborn, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *106*, 60-70.

Den Variationen an Polymeren und kovalenten Verknüpfungsstrategien sind dabei kaum Grenzen gesetzt. Mit Blick auf biomedizinische Anwendungen finden zunehmend Biopolymere als Gerüstmaterial Verwendung,¹⁷ da diese die gewünschten Eigenschaften intrinsisch mitbringen.²⁵ So ist es für biomedizinische Anwendungen essentiell, dass die *in situ* ablaufenden Verknüpfungsreaktionen vollständig biokompatibel sind.²⁹ Die Gelierungsbedingungen sollten demzufolge physiologischen Anforderungen gehorchen: Dazu gehören

- a. Löslichkeit und Reaktivität der Polymerkomponenten in wässrigen Medien,
- b. ein Reaktionsverlauf bei einer Temperatur kleiner oder gleich 37 °C,
- c. die Abwesenheit von Katalysatoren oder Additiven, und/oder
- d. die Vermeidung der Bildung von toxischen (Neben-) Produkten.

Die Reaktionsbarriere zwischen den beiden funktionellen Gruppen, die zur Vernetzung führt, sollte dementsprechend sehr niedrig liegen. Ferner darf die Reaktion nicht stark exotherm verlaufen, damit kein zusätzlicher Zellstress auftritt.

In diesem Kontext haben vor allem Kondensationsreaktionen, bei denen Wasser als Nebenprodukt entsteht, besondere Bedeutung. Dazu gehören Reaktionen zwischen Aldehyden und Cysteinen, die zu Thiazolidinen führen, oder zwischen Aldehyden und Hydraziden bei denen Hydrazone entstehen. Diese Reaktionsarten erfüllen die genannten biomedizinischen Anforderungen weitestgehend. Einige vielversprechende Strategien, *in situ* Hydrogele über kovalente Bindungen zu generieren, wurden in den letzten Jahren sowohl auf Basis artifizieller als auch anhand natürlicher Polymere entwickelt (Abb. 21). Sie stellen die Grundlage der vorliegenden Forschungsarbeit dar.

So publizierten OSSIPOV *et al.* im Jahre 2007 die über Hydrazone vermittelte Vernetzung zweier Polymerstränge an Polyvinylalkohol.³⁸ Ein Jahre später erweiterten sie das Spektrum der Vernetzungstechniken und entwickelten eine Gelierung über Thiazolidine.¹¹⁹ Darüberhinaus beschrieben GURSKI *et al.* die kovalente *in situ* Gelierung von Hyaluronsäure, ebenfalls über eine Hydrazonbindung.¹²⁰ Diese Vernetzung verläuft zwischen Aldehydo- und Adipinsäuredihydrazid-funktionalisierten Hyaluronsäurederivate. Eine weitere Variante, Hyaluronsäure über Hydrazonbindungen zu vernetzen, wurde von OSSIPOV *et al.* 2010 veröffentlicht.³⁹ Die Einführung der Hydrazido-Funktion erfolgte in diesem Falle durch Fragmentierung von 2,2'-Dithiobis(ethyloxycarbonylhydrazid), welches zuvor an die Hyaluronsäurekette gekuppelt wurde. Die Vernetzung von Alginat über die Hydrazonbindung publizierten schließlich BOUHADIR *et al.*¹²¹ Sie verknüpften zwei Aldehydo-funktionalisierte Alginatstränge mit Adipinsäuredihydrazid.

¹²⁰ L. A. Gurski, A. K. Jha, C. Zhang, X. Jia, M. C. Farach-Carson, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6076–6085.

¹²¹ K. H. Bouhadir, E. Alsberg, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2001**, *22*, 2625–2633.

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Die erfolgreiche Herstellung von Hydrogelen über die Hydrazon-vermittelte Verknüpfung war die Grundlage für die *in situ* Gelierung von Alginat und Hyaluronsäure. In den folgenden Kapiteln wird die Synthese von Aldehydo- und Hydrazido-funktionalisieren Alginaten und die Gelierung dieser Komponenten beschrieben. Die Modifikation von Hyaluronsäure wurde von L. Möller durchgeführt.⁸⁹

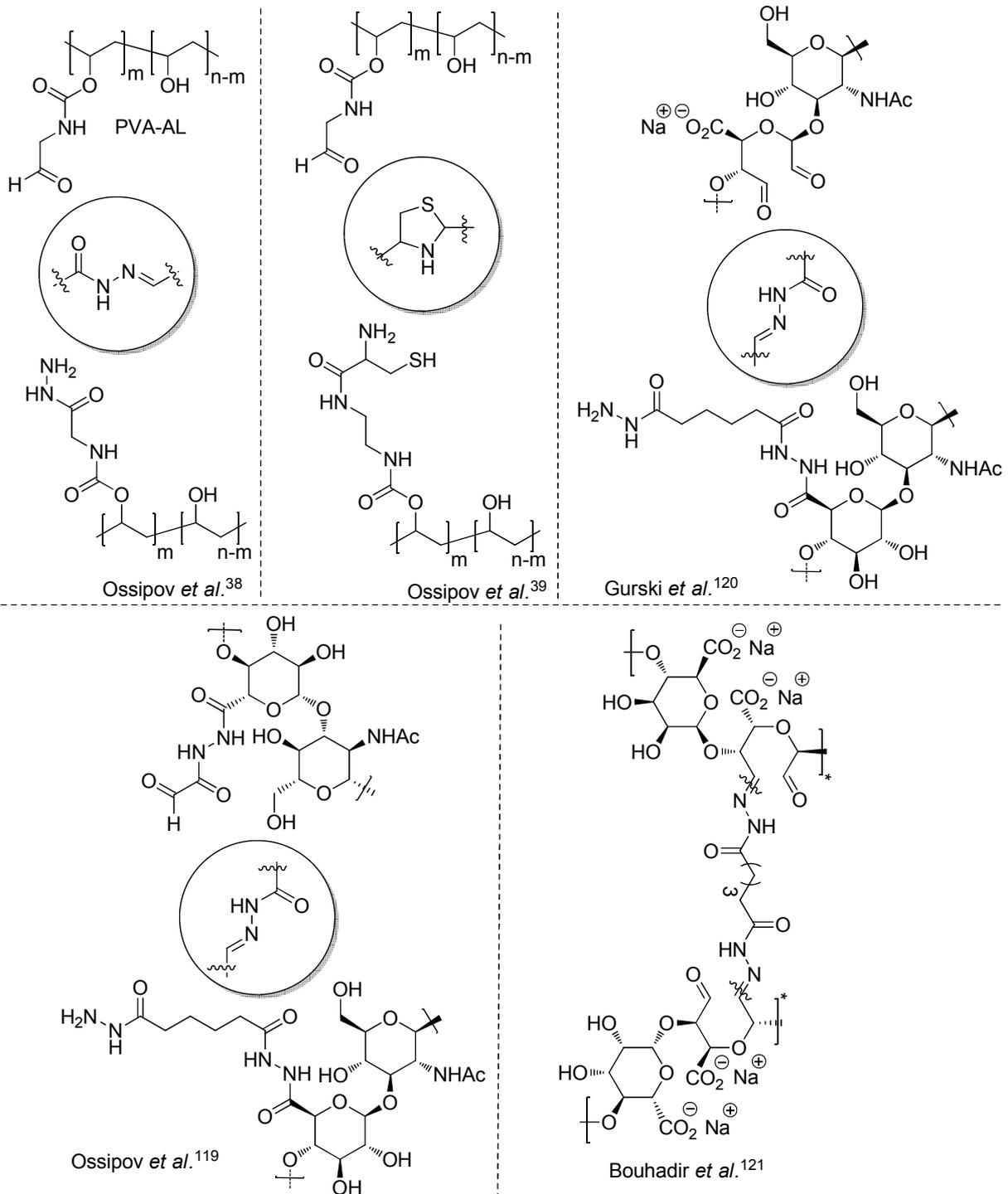
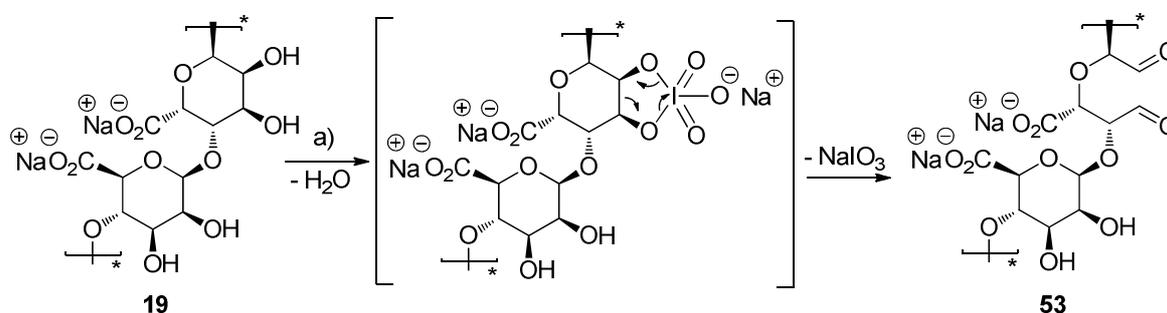


Abb. 21: Aktuelle Beispiele der *in situ* Hydrogelbildung über kovalente Bindungen.^{38, 39, 119, 120, 121}

5.1 Synthese von Aldehydo-Alginat

Die Oxidation von Polysacchariden mit Natriumperiodat, die mit der CRIGEE Oxidation an niedermolekularen Verbindungen vergleichbar ist, stellt eine weitläufig etablierte Synthese zur Darstellung von Aldehyden in Biopolymeren dar. Neben Alginat^{122,123} und Hyaluronsäure¹²⁴ wurden mit dieser Methode auch Dextrane¹²⁵ in die entsprechenden Dialdehydo-Derivate überführt. Im Falle des Alginats verläuft die Reaktion unter Spaltung eines C2/C3-Diols in die entsprechenden Dialdehyde. Umfangreiche Studien zu diesem Ansatz und den physikalischen Eigenschaften der erhaltenen oxidierten Alginat wurden bereits von GOMEZ *et al.* ermittelt.¹²⁶ In Schema 19 ist der Reaktionsmechanismus der Oxidation von Natrium-Alginat **19** mit NaIO₄ gezeigt



Schema 19: Reaktionsmechanismus der Oxidation von Alginat **19** in die entsprechenden Aldehydo-Alginat **53**; a) NaIO₄, H₂O.

Die Identifizierung der generierten Aldehyde **53** erfolgte durch Färben der dialysierten, wässrigen Alginatlösung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, während die Quantifizierung mit Hilfe der ¹H-NMR Spektroskopie erreicht werden konnte. Der Versuch, den Oxidationsgrad über einen Purpald-Assay, wie von L. MÖLLER⁸⁹ beschrieben, zu bestimmen, lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Dieser Assay ermöglicht die UV/VIS spektroskopische Quantifizierung von Aldehyden nach chemischer Überführung in eine chromophore Gruppe.

Die ¹H-NMR spektroskopische Analyse des Aldehydo-Alginats **53** erfolgte in D₂O (Abb. 22). Analog zu GOMEZ *et al.* lag **53** in wässriger Lösung ausschließlich in Form der Aldehyd-Hydrate **54** vor (Abb. 22),¹²⁶ so dass die charakteristischen Protonen bei einer Verschiebung von 5.10 ppm bis 5.65 ppm anzutreffen sind (Abb. 22). Durch Integration dieser Signale im Verhältnis zum Alginatrückgrat konnte gezeigt werden, dass die

¹²² K. Y. Lee, K. H. Bouhadir, D. J. Mooney, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1129-1134.

¹²³ K. H. Bouhadir, K. Y. Lee, E. Alsberg, K. L. Damm, K. W. Anderson, D. J. Mooney, *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 945-950.

¹²⁴ O. P. Varghese, W. Sun, J. Hilborn, D. A. Ossipov, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8781-8783.

¹²⁵ S. P. Hudson, R. Langer, G. R. Fink, D. S. Kohane, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1444-1452.

¹²⁶ C. G. Gomez, M. Rinaudo, M. A. Villar, *Carbohydr. Polym.* **2007**, *67*, 296-304.

Oxidation des Biopolymers proportional zur eingesetzten Menge an NaIO_4 erfolgte (Abb. 22 und Tabelle 5).

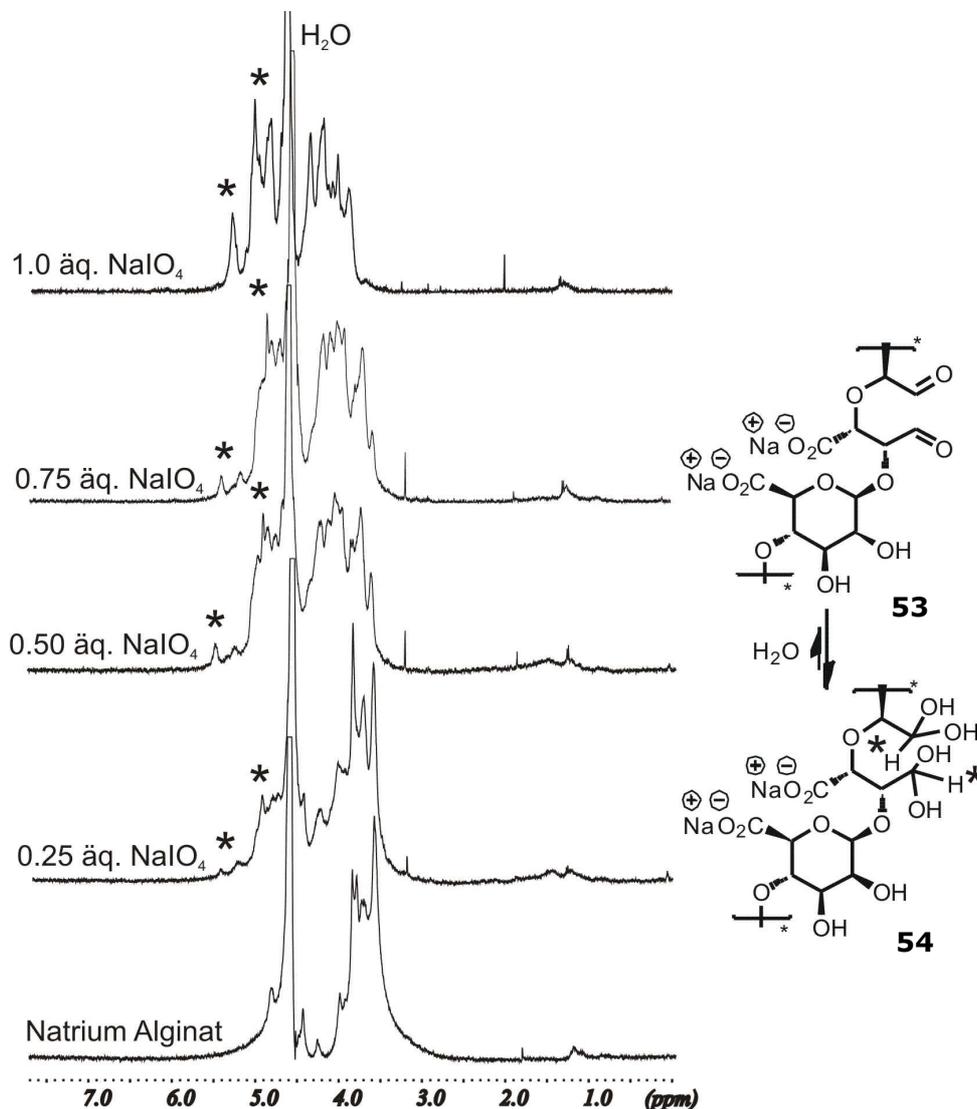


Abb. 22: $^1\text{H-NMR}$ Daten von Aldehydo-Alginat **53** in D_2O mit steigender Menge zugesetzten Natriumperiodats.

Tabelle 5: Oxidationsgrad von Natrium-Alginat **53** bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ Analyse.

Äquivalente NaIO_4	Oxidationsgrad
0.15	ca. 15 %
0.25	ca. 25 %
0.50	ca. 50 %
0.75	ca. 75 %
1.00	>95 %
3.00	>95 %
6.00	>95 %

Zusätzlich wurden die synthetisierten Alginat-Aldehyde **53** IR-spektroskopisch analysiert. Die IR-Daten zeigten eine charakteristische C-O Streckschwingung der Aldehydfunktionen bei 1729 cm^{-1} (Abb. 23). Diese Daten korrelieren gut mit denen von BOUHADIR *et al.*, die einen Wert von 1730 cm^{-1} bzw. 1735 cm^{-1} publizierten.^{123,127}

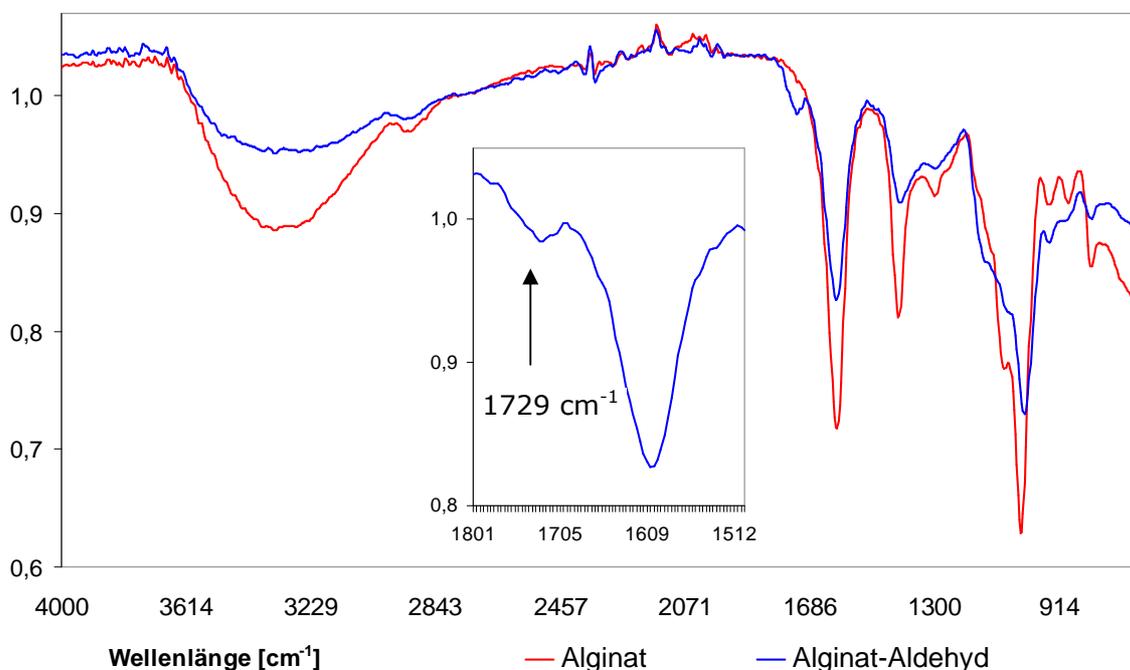


Abb. 23: IR-Spektren von Alginat **19** (Rot) und Alginat-Aldehyd **53** 100% Oxidation (Blau), gemessen mit einem ATR IR-Spektrometer.

BOUHADIR und LEE *et al.* beschreiben, dass die Oxidation des Polysaccharides mit einem partiellen Zerfall der Polymerkette einhergeht.^{122,123} Die gebildeten Dialdehyde **54** schwächen die benachbarten Zentren, so dass diese unter Verkürzung der Kettenlänge fragmentieren. Die Molekulargewichtsverteilung der oxidierten Alginate ist im Vergleich zu den unbehandelten Alginaten deutlich kleiner. Bei einem Oxidationsgrad von 85% verringerte sich das Molekulargewicht M_w dabei um einen Faktor von etwa 1,2.¹²² Dieses Charakteristikum führt zu einer sehr guten Löslichkeit der sonst eher sehr viskosen Alginsäuren und erhöht die Bioabbaubarkeit des Polymers.¹¹¹

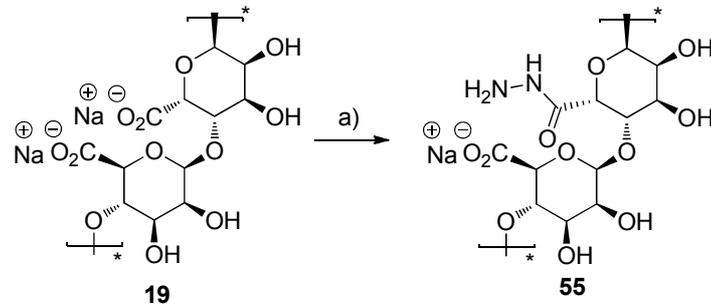
5.2 Synthese von Hydrazido-Alginat

Für eine über Hydrazone vernetzte Gelierung ist neben der Aldehydo- eine Hydrazido-funktionalisierte Polymerkomponente nötig. Die bisherigen Ansätze, Hydrazide in Polysaccharide zu implementieren, wurden über den Verlängerungsbaustein Adipinsäuredihydrazid,¹²⁰ oder durch eine Fragmentierungskaskade erreicht.^{39,124} In beiden

¹²⁷ K. H. Bouhadir, D. S. Hausmann, D. J. Mooney, *Polymer* **1999**, 40, 3575–3584.

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Variante war die Hydrazido-Funktionalität über eine alkyliche Kette an das Polymer gebunden. Die direkte Einführung der Hydrazido-Gruppe ohne eine Verlängerungseinheit an der Carbonsäure wurde meines Wissens bisher nicht beschrieben. Die Synthese des Hydrazido-Alginats **55** erfolgte mit Hilfe der in *Kapitel 2.7* erläuterten Methodik, wobei Hydrazin-Hydrat als Nukleophil gewählt wurde (Schema 20).



Schema 20: Umsetzung von Natrium-Alginat **19** in das korrespondierende Hydrazid **55**; a) DIPEA, EDC, HOBT, $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_2O .

Die erfolgreiche Einführung des Hydrazids konnte durch Färben der dialysierten Polymerlösung mit dem Reagenz Ninhydrin nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte das IR-Spektrum eine Schulter im Bereich der C-O Stretschwingungen bei 1664 cm^{-1} (Abb. 24), welche die Anwesenheit einer Amidgruppe andeutet. Die geringe Intensität ist der benachbarten Bande hoher Intensität bei 1640 cm^{-1} geschuldet, die den C-O Stretschwingungen der Carbonsäuren im Alginat zuzuordnen ist.

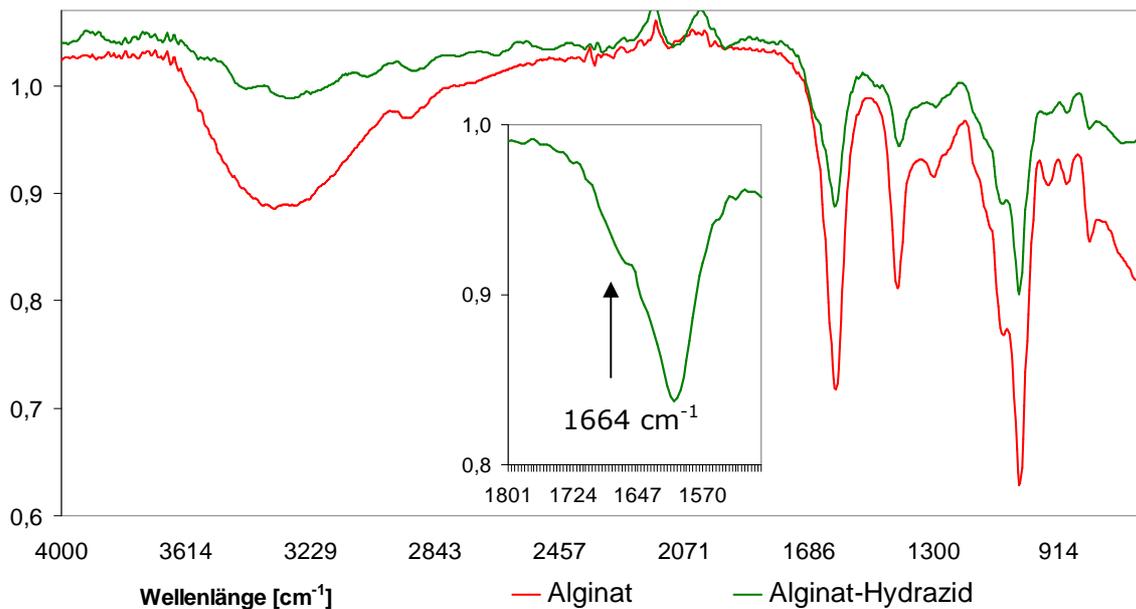


Abb. 24: IR-Spektren von Alginat **19** (Rot) und Hydrazido-Alginat **55** (Grün), gemessen mit einem ATR IR-Spektrometer.

Die eingeführte Hydrazido-Funktionalität konnte mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie in D_2O nicht detektiert werden, da charakteristische Protonensignale auf Grund von Wasserstoffbrücken mit dem Lösungsmittel nicht identifiziert werden konnten. Die Verbrennungs- „CHN“ Analyse zeigte dagegen, dass mit steigendem Anteil von Hydrazin-Hydrat, ein ebenfalls steigender Wert für Stickstoff im modifizierten Alginat **55** gefunden wurde (Tabelle 6). So stieg dieser von 5% bei 0.5 Äquivalenten auf 7.4% bei 16.0 Äquivalenten zugesetzten $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ an.

Neben der CHN-Analyse diente der 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure „TNBS“-Assay zur Bestimmung des Derivatisierungsgrades.¹²⁸ Die primäre Aminogruppe im Hydrazid wird dabei mit TNBS umgesetzt, wobei ein Chromophor erhalten wird, welches bei 335 nm absorbiert. Die Intensität des Maximums konnte UV-spektrometrisch bestimmt werden, was die quantitative Analyse durch Vergleich mit einer Eichreihe ermöglichte. Der TNBS-Assay zeigte, dass der Derivatisierungsgrad nicht parallel zur Menge an Hydrazin-Hydrat stieg. Vielmehr ließ sich auch durch den Einsatz eines vierfachen Überschusses von Hydrazin-Hydrat keine Derivatisierung über 20% erreichen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Derivatisierungsgrad von Hydrazido-Alginat **55** in Abhängigkeit variierender Äquivalente von $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, quantifiziert mit dem TNBS-Assay und der Elementaranalyse.

Äquivalente $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Derivatisierungsgrad (TNBS-Assay)	Elementaranalyse
0.50	15 %	C: 33.4%, H: 5.8%, N: 5.1%
1.00	23 %	C: 33.4%, H: 5.7%, N: 5.4%
2.00	18 %	C: 33.6%, H: 5.6%, N: 5.5%
4.00	17 %	C: 34.3%, H: 6.1%, N: 5.9%
16.00	- %	C: 34.6%, H: 6.2%, N: 7.4%

Diese Resultate zeigen, dass ein erhöhter Stickstoffanteil, gemessen durch die Elementaranalyse, nicht mit einer größeren Anzahl primärer Amine (Hydrazide), identifiziert durch den TNBS-Assay, einhergeht. Mit steigender Menge von zugesetztem Hydrazinhydrat scheint neben der Funktionalisierung der Carbonsäuren, auch eine intra- wie auch intermolekulare Verknüpfung zweier Carboxylgruppen zu erfolgen. Diese Verknüpfung führt zur Vernetzung der Polymerstränge und erhöht die Molekulargewichtsverteilung M_w deutlich. Werden vier oder mehr Äquivalente Hydrazin-Hydrat eingesetzt, so resultiert dies in einer verringerten Löslichkeit der Hydrazido-Alginat **55**. Als idealer Wert für die anschließende Hydrogelierung wurde ein Belegungsgrad von 25% ermittelt. Hydrazido-Alginat mit diesem Belegungsgrad zeigen

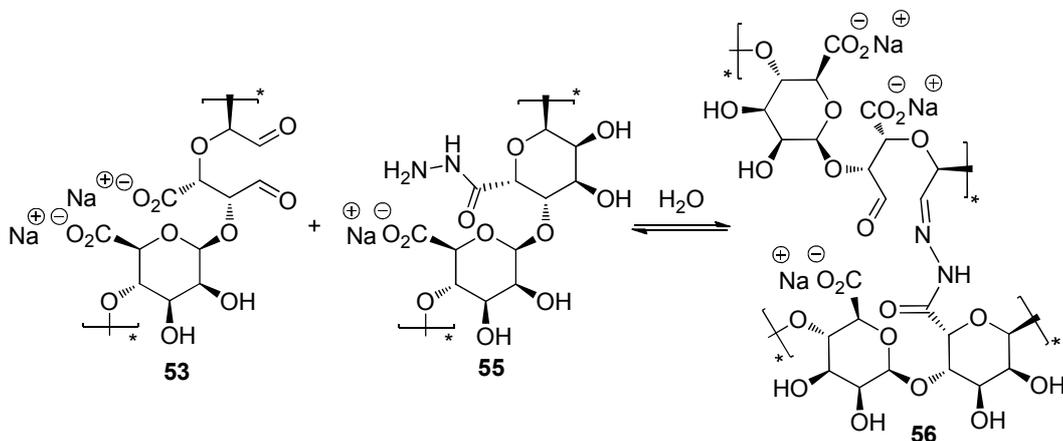
¹²⁸ K. Satake, T. Okuyama, T. Shinoda, *J. Biochem.* **1960**, 47, 654-660.

eine gute Löslichkeit und ermöglichen die Herstellung homogener, transparenter Hydrogele.

5.3 Herstellung von Hydrogelen über kovalente *in situ* Vernetzungen

Die in Abb. 21 aufgeführten Literaturbeispiele zeigen, dass das Mischen äquimolarer Mengen Aldehydo- und Hydrazido-funktionalisierter Polymerkomponenten in wässrigen Lösungen zur Bildung von Hydrogelen führt. In Analogie dazu wurden Aldehydo-Alginat **53** und Hydrazido-Alginat **55** jeweils in wässriger Lösung bis zur Homogenität gelöst, miteinander vermischt und für wenige Minuten inkubiert. Ohne Erhöhung der Temperatur oder Zugabe weiterer Additive bildeten sich transparente Hydrogele. Die Gelierungsdauer korrelierte dabei sowohl mit der Konzentration der Komponenten im Solvenz, als auch mit dem Grad der Derivatisierungen. Konzentriertere Polymerlösungen beschleunigten den Gelierungsprozess (<1 Min.). Entscheidend für eine rasche Hydrogelierung ist zudem die Homogenität der Polymerlösungen, die vollständige Löslichkeit der Aldehydo- und Hydrazido-Komponente im jeweiligen Medium. Als idealer Wert für beide Polymerkomponenten wurde eine 1%ige (w/v) Lösung in H₂O_{dest.} bestimmt. Desweiteren führte ein höherer Belegungsgrad in den Aldehydo- bzw. Hydrazido-Komponenten auch zur schnelleren Gelierung. Die stabilsten Gele wurden mit Aldehydo-Alginat **53** bei 100%igem Oxidationsgrad und mit Hydrazido-Alginat **55** bei 25%igem Derivatisierungsgrad erhalten. Wurden Komponenten mit geringerem Derivatisierungsgrad eingesetzt, nahm die Stabilität der gebildeten Gele linear ab. Für die Herstellung von durablen Hydrogelen in Wasser oder isotonischen Kochsalzlösungen ist mindestens ein Oxidationsgrad von 30% für die Aldehydo-Komponente nötig.

Chemisch betrachtet beruht der Gelierungsprozess auf der Bildung multipler Hydrasonbindungen, die die Polymerketten untereinander vernetzen und somit ein komplexes Netzwerk erzeugen. Da die Bildung der Hydrazone eine Kondensationsreaktion ist und die Gelierung in Wasser erfolgt, befindet sich der gesamte Prozess in einem Gleichgewicht (Schema 21).



Schema 21: Gelierung der Alginat **53** und **55** durch Verknüpfung über die Hydrasonbindung.

Auf Grund des makromolekularen Systems reichen jedoch insgesamt wenige Verknüpfungspunkte aus, um ein stabiles Hydrogel **56** zu bilden.

Neben dem Belegungsgrad der beiden Komponenten hängt die Stabilität der gebildeten Hydrogele auch vom gewählten Medium ab. Hydrogele, die in H₂O_{dest.} oder isotonischer Kochsalzlösung hergestellt wurden, zeigten dauerhafte Stabilität über mehrere Wochen. Ferner konnten Gele in Nährmedien wie DMEM gebildet werden. Diese wurden jedoch nur mit Alginaten erhalten, die zu 100% die Aldehydo- und zu 30% die Hydrazido-Komponente überführt wurden. Hydrogele, die in Nährmedien unter Zugabe von Zellen gebildet wurden, zeigten eine deutlich beschleunigte Polymerisation. Im Falle einer erfolgreichen Zelladhäsion vermittelt die Anlagerung der Zellen zusätzlich die Verknüpfung der einzelnen Polymerstränge und unterstützt somit den Gelierungsprozess.

Da die Gelierung über Hydrazonbindungen erfolgt, können diese in wässrigen Medien hydrolysieren. Biologische Untersuchungen (Kapitel 5.6) und die Bestimmung des Quellverhaltens (Kapitel 5.5) wiesen jedoch die Stabilität der Gele über einen längeren Zeitraum aus. Vergleichbare Resultate beschrieben SHI *et al.*, die die Hydrazonbindung zur Markierung Aldehydo-funktionalisierter Proteine mit Fluorophoren nutzten. Basierend auf UV-spektrometrischen Messungen gaben sie an, dass die Bindung eine gute Hydrolysestabilität unter physiologischen Bedingungen besitzt.¹²⁹ Bezüglich der Hydrolyseempfindlichkeit *in vitro* postulierten TAN *et al.*, die Chitosan und Hyaluronsäure über Iminbindungen vernetzten, dass Hydrogele unter physiologischen Bedingungen einer nur sehr langsamen Hydrolyse ausgesetzt sind.¹³⁰

5.3.1 Alginat-Hydrogele

Die auf Basis von Aldehydo-Alginat **53** und Hydrazido-Alginat **55** hergestellten Hydrogele **56** wurden sowohl mit physikalischen wie auch biologischen Verfahren untersucht, wobei rheologische Messungen und das Quellverhalten zur physikalischen Charakterisierung dienten und *in vitro* und *in vivo* Tests für die biologische Bewertung herangezogen wurden. Die Netzwerkstrukturen der erzeugten Gele wurden ferner über REM-Aufnahmen der Oberflächen untersucht. Für alle Untersuchungen wurden 1%ige wässrige Lösungen des Hydrazido-Alginats **55** mit 25%iger Belegung (1-2 mg in 100 µL H₂O_{dest.}) und 2%iger wässrige Lösungen des Aldehydo-Alginats **53**, 100%ig oxidiert (1-2 mg in 50 µL H₂O_{dest.}), zur Präparation der Gele verwendet. Durch Mischen gleicher Volumina beider Lösungen in einem 2:1 Verhältnis wurden die Alginat-Gele in *Culturewells*[™] hergestellt. Die einzelnen Schritte der Gelierung sind in Abb. 25 beispielhaft gezeigt.

¹²⁹ X. Shi, Y. Jung, L.-J. Lin, C. Liu, C. Wu, I. K. O. Cann, T. Ha, *Nat. Methods* **2012**, 9, 499-503.

¹³⁰ H. Tan, C. R. Chu., K. A. Payne, K. G. Marra, *Biomaterials* **2009**, 30, 2499-2506.

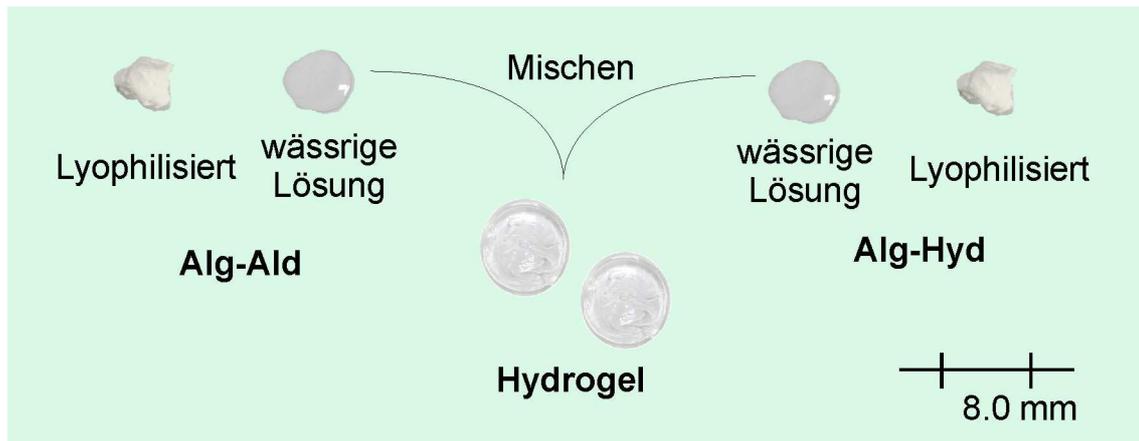


Abb. 25: Schematische Darstellung der präparativen Durchführung des *in situ* Gelierungsprozesses.

Die Technik der *in situ* Gelierung ermöglicht es, Gele in jeglichen zwei- und dreidimensionalen Formen herzustellen, wobei diese durch die Wahl der Negativform bestimmt wird. Die Polymernetzwerke wurden, analog zu den radikalisch polymerisierten Hydrogelen (Kapitel 4.2.2.1), mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Proben wurden dafür gefriergetrocknet, horizontal geschnitten, *besputtert* und bei variierenden Elektronenspannungen vermessen (Abb. 26). Alle gezeigten REM-Aufnahmen wurden am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. –DIK– von Dr. A. DIEKMANN angefertigt.

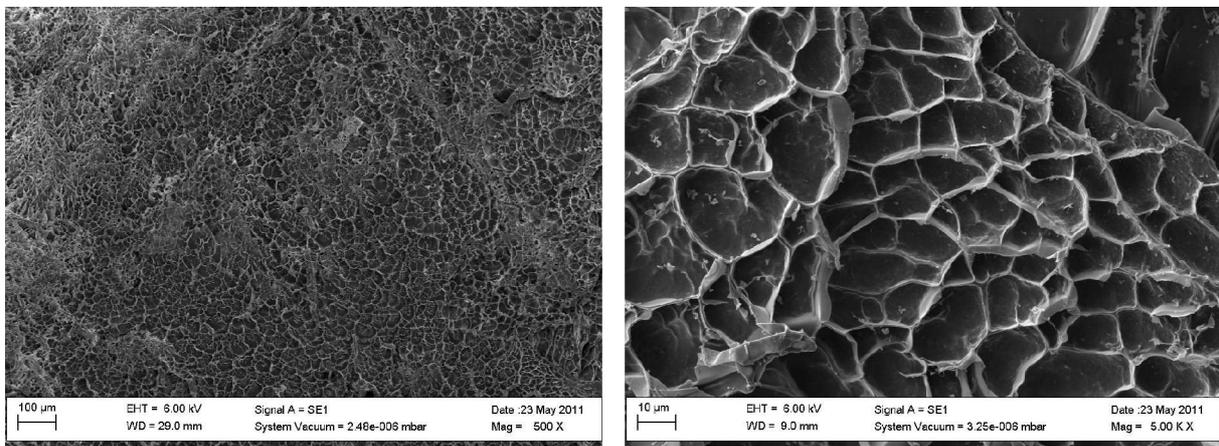


Abb. 26: REM Aufnahme des lyophilisierten *Alg-Ald/Alg-Hyd*-Hydrogels in unterschiedlichen Auflösungen.

Die Aufnahmen zeigten, dass die *in situ* Gelierung in der Bildung eines homogenen Netzwerks resultierte. Poren in Größenordnungen von 40-150 µm, die ein Einwachsen von Zellen ermöglichen sollten,¹¹⁷ waren jedoch nicht vorhanden. Das gefriergetrocknete Gel lag in Form eines geschlossen, wabenartigen Gerüsts mit einem maximalen Porendurchmesser von ca. 20 µm vor.

Die Netzwerkstrukturen der Gele in Lösung lassen sich mit Hilfe der *environmental scanning electron microscopy* „ESEM“ untersuchen.¹³¹ Diese Technik ermöglicht es, rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei geringem Vakuum zu erhalten, was bedeutet, dass z.B. Hydrogele in gequollenem Zustand untersucht werden können. MOURA *et al.* verglichen die Porengrößen von lyophilisierten Hydrogelen (SEM) mit denen im gequollenen Zustand (ESEM).¹³² Die Poren in gequollenen Gelen zeigten nur geringe Veränderungen im Verhältnis zu den trockenen Proben. Die Durchmesser der Poren lagen in Folge der Wasseraufnahme nur leicht vergrößert vor. Der Übergang zwischen lyophilisierten und gequollenen Gelen hat auch nach KANG *et al.* nur geringen Einfluss auf die Porengröße.¹³³ Folglich müssten Gele, damit ein Einwachsen von Zellen möglich wird, bereits vor dem Quellvorgang Poren in ausreichenden Dimensionen vorweisen. Diese Eigenschaft konnte somit auch in unseren Untersuchungen bestätigt werden (Kapitel 4.5.2).

Ferner untersuchten KANG *et al.* den Einfluss der Temperatur, die für das Einfrieren der Proben verwendet wurde, auf die Porengrößen der lyophilisierten Hydrogele.¹³³ Je geringer die Temperatur beim Gefrieren, desto kleiner waren die gebildeten Poren. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Netzwerkstruktur, mechanischem Verhalten und Gefriertemperatur ermittelt werden. Ein vergleichbares Resultat erhielten PARK *et al.*, die den Einfluss der Trocknungsmethode auf das geformte Netzwerk bei Chitosan-Gelen bestimmten.¹³⁴

Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Hydrogele (Abb. 12, Abb. 26, Abb. 28) nicht zwangsläufig die reale Netzwerkstruktur widerspiegeln, die direkt nach der chemischen Vernetzung erhalten wurde. Die Porengröße und die dreidimensionale Struktur des Gels werden durch den Gefriertrocknungsprozess wesentlich beeinflusst. Dies zeigt, dass Wasser als Porogen eingesetzt werden kann, insbesondere wenn gezielte Frierungstechniken angewendet werden.¹³⁵

5.3.2 Hydrogel-Blends

Der Zugang zu den gelierungsfähigen Komponenten der Hyaluronsäure,⁸⁹ Hyaluronsäure-Aldehyd **57** und Hyaluronsäure-Hydrazid **58**, erlaubt es, Hydrogel-Blends herzustellen (Abb. 27). Durch Mischen von Hyaluronsäure-Aldehyd **57** mit Alginat-Hydrazid **55** und *vice versa*, wurden stabile Hydrogele generiert. Dafür wurden 1%ige wässrige Lösungen

¹³¹ J. S. Shah, A. Beckett, *Micron* **1979**, *10*, 13-23.

¹³² M. J. Moura, H. Faneca, M. P. Lima, M. H. Gil, M. M. Figueiredo, *Biomacromol.* **2011**, *12*, 3275-3284.

¹³³ H.-W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada, *Biomaterials* **1999**, *20*, 1339-1344.

¹³⁴ H. Park, K. Park, D. Kim, *J. Biomed. Mat. Res. Part A* **2006**, *76*, 144-150.

¹³⁵ S. Van Vlierberghe, V. Cnudde, P. Dubruel, B. Masschaele, A. Cosijns, I. De Paepe, P. J. S. Jacobs, L. Van Hoorebeke, J. P. Remon, E. Schacht, *Biomacromol.* **2007**, *8*, 331-337.

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

der Hydrazido-Komponente (1-2 mg **55** oder **58** in 100 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) und 2%ige wässrige Lösungen der Aldehydo-Komponente (1-2 mg **53** oder **57** in 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) zur Präparation der Gele verwendet. Durch Mischen gleicher Volumina beider Lösungen in einem 2:1 Verhältnis wurden die Blends in *Culturewells*[™] hergestellt. Die Präparation der Komposite erfolgte analog zu Abb. 25.

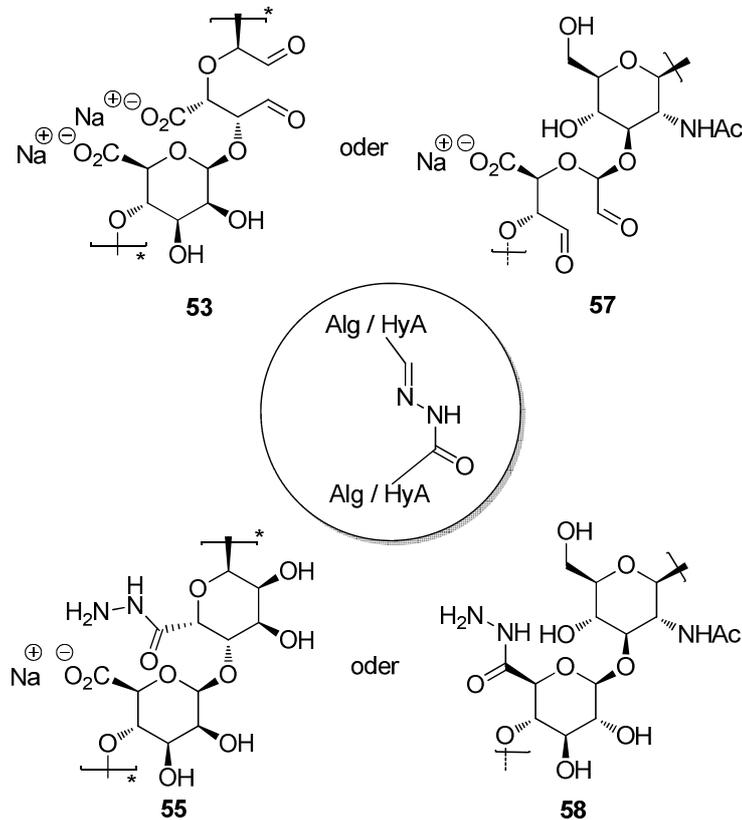


Abb. 27: Herstellung von Hydrogel-Blends durch Mischen wässriger Lösungen von *HyA-Ald* **57** oder *Alg-Ald* **53** mit *HyA-Hyd* **58** oder *Alg-Hyd* **55**.

Dieser Ansatz stellt zur Zeit die einzige Methode dar, Alginate und Hyaluronsäure durch eine kovalente Verknüpfung *in situ* in Hydrogel-Blends zu überführen. Neben dem Derivatisierungsgrad beider Komponenten und dem Einfluss der Konzentration der wässrigen Polymerlösungen, wurde die Gelierungsdauer auch durch die jeweilige Komposition wesentlich beeinflusst, was rheologische Messungen bewiesen (Kapitel 5.4.1, Abb. 29). Desweiteren wurden von den Hydrogel-Blends *Alg-Ald/HyA-Hyd* und *HyA-Ald/Alg-Hyd* rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 28). Die Proben wurden analog zu Kapitel 5.3.1 präpariert und von Dr. A. DIEKMANN am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. –DIK- vermessen.

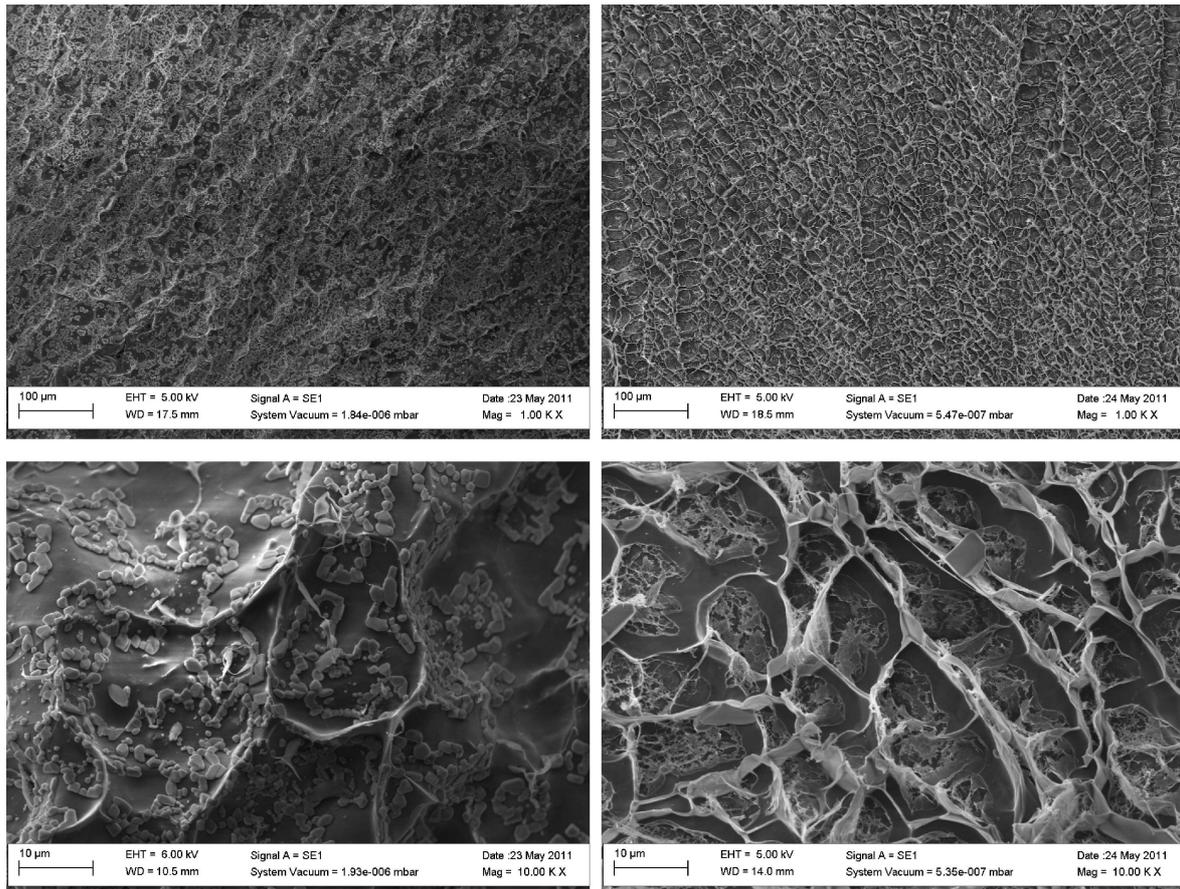


Abb. 28: REM Aufnahmen lyophilisierter *HyA-Ald/Alg-Hyd* (links) und *Alg-Ald/HyA-Hyd* (rechts) Hydrogele.

Die Makrostrukturen beider Blends lagen in Form geschlossener, wabenartiger Netzwerke vor, wobei die Regelmäßigkeit des Netzwerkes im Detail jedoch variierte. Das langsam gelierende System *Alg-Ald/HyA-Hyd* bildete ein deutlich homogeneres Netzwerk (Abb. 28, rechts) als das sehr schnell gelierende System *HyA-Ald/Alg-Hyd* (Abb. 28, links). Die hohe Polymerisationsgeschwindigkeit scheint die Bildung eines homogenen Netzwerkes zu stören. Die durchschnittliche Größe der Waben, lag analog zum Alginate-Gel, für beide Blends bei ca. 25 nm.

5.4 Mechanische Eigenschaften

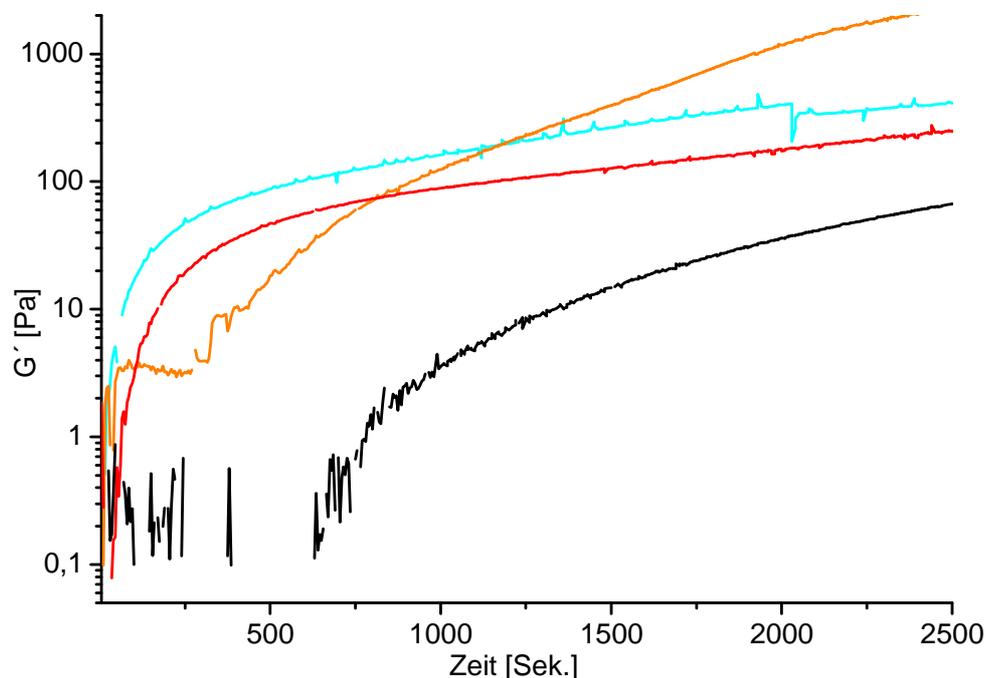
Die rheologischen Untersuchungen der *in situ* gebildeten Hydrogele wurden mit einem Rotationsrheometer (Physika MCR 501s; ANTON PAAR, Ostfildern, Deutschland) am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie e.V. –DIK– in Zusammenarbeit mit M. MÖWES durchgeführt. Die Temperatur des Rheometers wurde während der Messungen mit einem Peltier-Element konstant auf 20 °C gehalten. Alle Messvorgänge wurden in einem klimatisierten Raum bei 23 °C und bei 35% Luftfeuchte ausgeführt.

Der Verlauf und somit die Dauer des *in situ* Polymerisationsprozesses wurde durch Messen des Speichermodules G' und des Verlustmodules G'' über die Zeit verfolgt.

Anschließend wurden die Gele einem Amplitudensweep unterzogen. Der Polymerisationsprozess wurde bei einer konstanten Normalkraft von 0.01 N über einen Zeitraum von 2500 s beobachtet. Die Messungen für jedes Gelkomposit wurden dreimal durchgeführt. Die anschließende Messung des Amplitudensweeps erfolgte bei Deformationswerten von 0.01% bis 1000%. Da zwischen den unterschiedlichen Messmethoden gewisse Zeiträume für den Umbau und die Kalibrierung des Gerätes nötig waren, besteht eine Diskrepanz zwischen den Endwerten von G' nach dem Polymerisationsprozess und den Anfangswerten von G' des Amplitudensweeps. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf den Gelierungsprozess für den Blend *Alg-Ald/HyA-Hyd* untersucht.

5.4.1 *in situ* Polymerisationsprozess

Der Verlauf der Polymerisationen wurde für alle Hydrogel-Zusammensetzungen (*Alg-Ald/HyA-Hyd*, *HyA-Ald/HyA-Hyd*, *HyA-Ald/Alg-Hyd* und *Alg-Ald/Alg-Hyd*) über die Zeit gemessen (Abb. 29). Die Speichermodule G' stiegen stetig, da mit Verknüpfung der Polymere größere Polymerkonstrukte entstanden, die höhere Molekulargewichte und damit höhere Reibungskräfte zur Folge hatten. Gleichzeitig stieg auch der elastische Anteil G'' , da die Vernetzung zu einer erhöhten Elastizität des Netzwerkes führte.



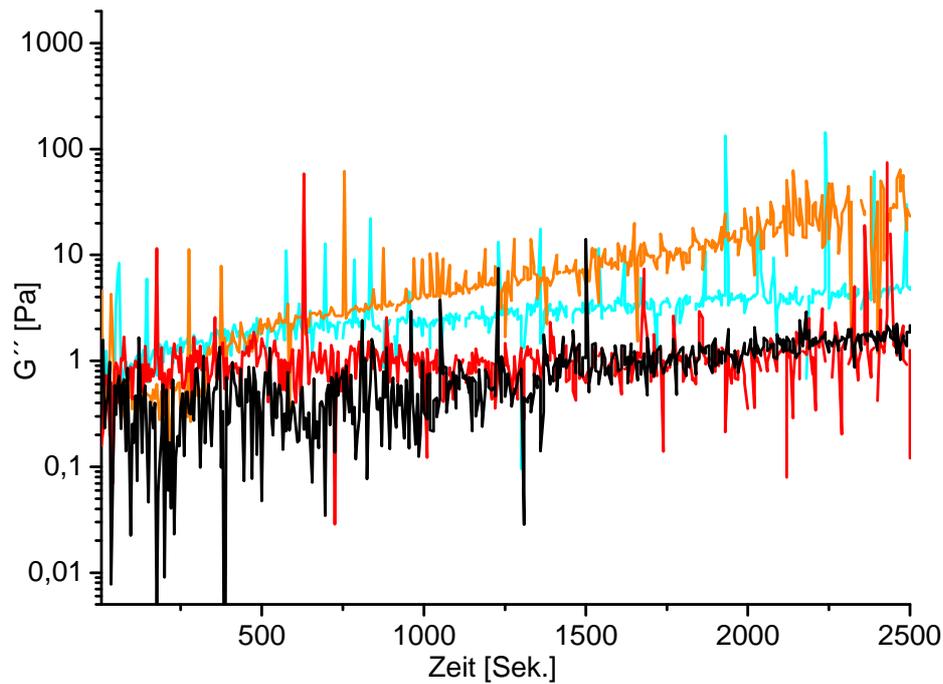


Abb. 29: Logarithmisch aufgetragene Speichermodule G' (oben) und Verlustmodule G'' (unten), als Funktion der Zeit. Gemessen wurden die Gel-Systeme: Alg-Ald/Alg-Hyd (Orange), Alg-Ald/HyA-Hyd (Schwarz), HyA-Ald/Alg-Hyd (Hellblau) und HyA-Ald/HyA-Hyd (Rot).

Der Gelierungsprozess der Alginate-Gele ließ sich in zwei Stufen einteilen (Abb. 29, oben). Zu Beginn der Vernetzung wurde nach kurzer Zeit ein stationärer Zustand in Form eines Plateaus erreicht, nach Entknäulung der viskosen Alginatestränge schritt die Verknüpfung wieder voran und das Speichermodul stieg wiederum. Die Inkubationszeiten und die maximal erreichten Speichermodule G' der Gele nach 2500 s sind in Abb. 30 gezeigt.

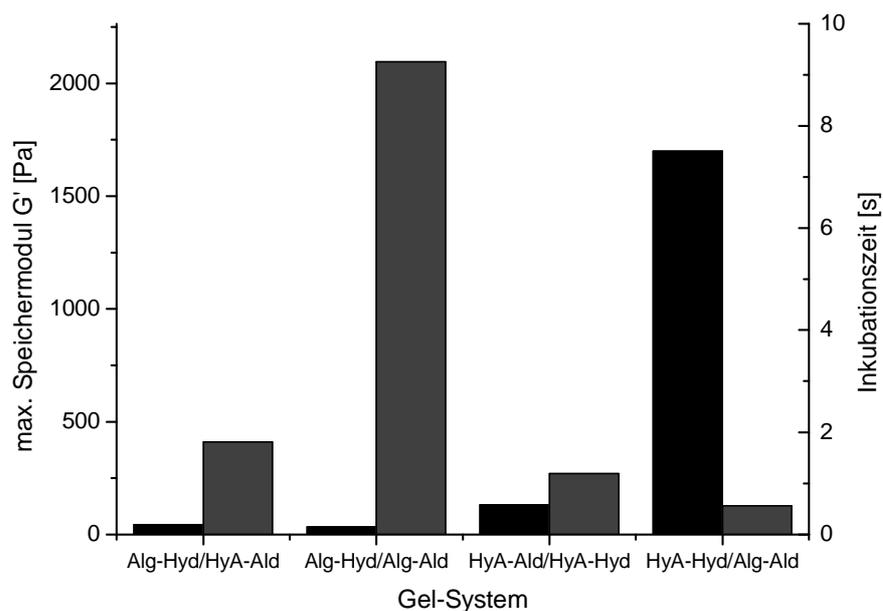


Abb. 30: Maximale Speichermodule G' (Schwarz) und Inkubationszeiten (Grau) aller Gele im Überblick.

Bis auf den Blend *Alg-Ald/HyA-Hyd*, welcher erst nach 780 s zu gelieren begann, erfolgte die Vernetzung bei den anderen Systemen innerhalb einer Minute. Dabei deutet sich an, dass die Komponente Hyaluronsäure-Aldehyd auf Grund der geringeren Viskosität und des verringerten Molekulargewichtes die höhere Beweglichkeit besitzt. Dieses Verhalten resultiert in einer verbesserten Zugänglichkeit der Aldehyde innerhalb der Polymerstränge, so dass diese Komponente am Reaktivsten ist. Die hohe Viskosität der Alginate hingegen führte zu langsameren Gelierungen; dieses zeigt der Vergleich zwischen *Alg-Ald* und *HyA-Ald* deutlich. (Abb. 29, oben). Allerdings verzögerte die Komponente *HyA-Hyd* die Gelierung. Im Gegensatz zu *Alg-Hyd* ist in *HyA-Hyd* nur jede vierte monomere Saccharideinheit mit der Hydrazido-Funktionalität versehen, während in *Alg-Hyd* jedes dritte Saccharid derivatisiert vorliegt. Folglich gelieren die Hydrazide des Alginats schneller mit *Alg-Ald* oder *HyA-Ald* als die Hydrazide der Hyaluronsäure.

Insgesamt zeigten die Messungen, dass Alginat im Vergleich zu Hyaluronsäure das rigidere Biopolymer ist, da Alginat-Gele mit Abstand die größten Werte für G' erreichten. Diese Eigenschaft des Alginats wurde bereits für radikalisch polymerisierte Hydrogele beobachtet (Kapitel 4.5, Abb. 13). Die anionische Struktur der Alginatkette kann hier als mögliche Erklärung angeführt werden, welche in Gegenwart von Kationen helikale, dicht gepackte Anordnungen annehmen kann (Kapitel 1.4).

Da die beschriebene Hydrogelierung, unter Verwendung der Aldehydo- und Hydrazido-Komponenten des Alginats bzw. der Hyaluronsäure, neu entwickelt wurde, können nur ähnliche Systeme (Abb. 21) als Referenz herangezogen werden. Ein vergleichbares Ergebnis liefert das auf Hyaluronsäure basierende Gelsystem von OSSIPOV *et al.*³⁹ Mit $G' = 247$ Pa in PBS-Puffer findet man dort für das über Hydrazon-Bindungen vernetzte Gel einen fast identischen Wert im Vergleich zu dem hier entwickelten System (Abb. 30).

Zusätzlich wurde der Polymerisationsverlauf bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Damit ein Austrocknen der Gele während des Messvorganges verhindert wird, wurde die Messung bei 20 °C wie auch bei 25 °C durchgeführt, statt bei der physiologischen Temperatur von 37 °C. Um den Einfluss der Temperatur eindeutig studieren zu können, wurde für diese Messungen der sehr langsam gelierende Blend *Alg-Ald/HyA-Hyd* verwendet (Abb. 31).

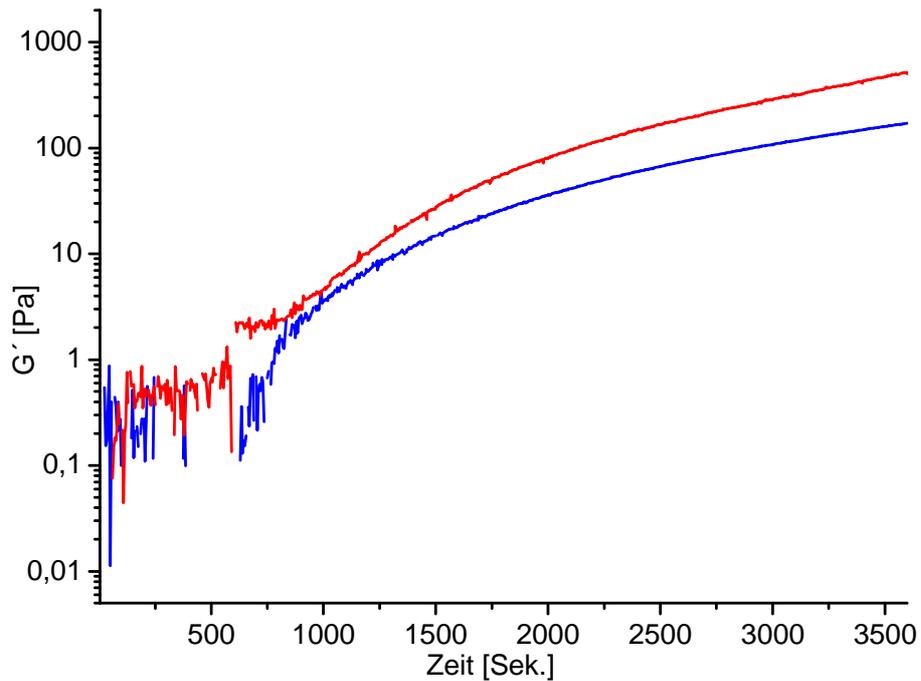


Abb. 31: Logarithmisch aufgetragenes Speichermodul G' als Funktion der Zeit, gemessen für das Gel-System *Alg-Ald/HyA-Hyd* bei 20°C (Blau) und 25°C (Rot).

Die Inkubationszeit war von der Temperatur unbeeinflusst, da signifikante Abweichungen erst nach ca. 680 s detektiert werden konnten. Anschließend wurden jedoch bei höherer Temperatur größere Werte für G' erreicht. Das bedeutet, dass die Polymerisation bei 25 °C deutlich schneller abläuft. Der maximal erreichte Wert nach 3600 s war bei 25 °C mit $G' = 463$ Pa etwa viermal höher als bei 20 °C mit $G' = 98$ Pa. Bei höheren Temperaturen ist sicherlich eine stärkere BROWN'sche Bewegung der Polymerketten gegeben, was zu einer geringeren Viskosität der Lösungen und folglich zu einer erhöhten Reaktivität führte. Der Verlauf des Speichermoduls entspricht damit den Erwartungen, da die Kinetik proportional abhängig von der Temperatur ist.

5.4.2 Amplitudensweep

Der Amplitudensweep wurde direkt nach Durchführung der Polymerisationsmessung bestimmt. Dabei korrelieren die Anfangswerte von G' (Abb. 32) auf Grund der fortschreitenden Vernetzung nicht mit den Endwerten von G' nach der Polymerisationsmessung (Abb. 29).

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

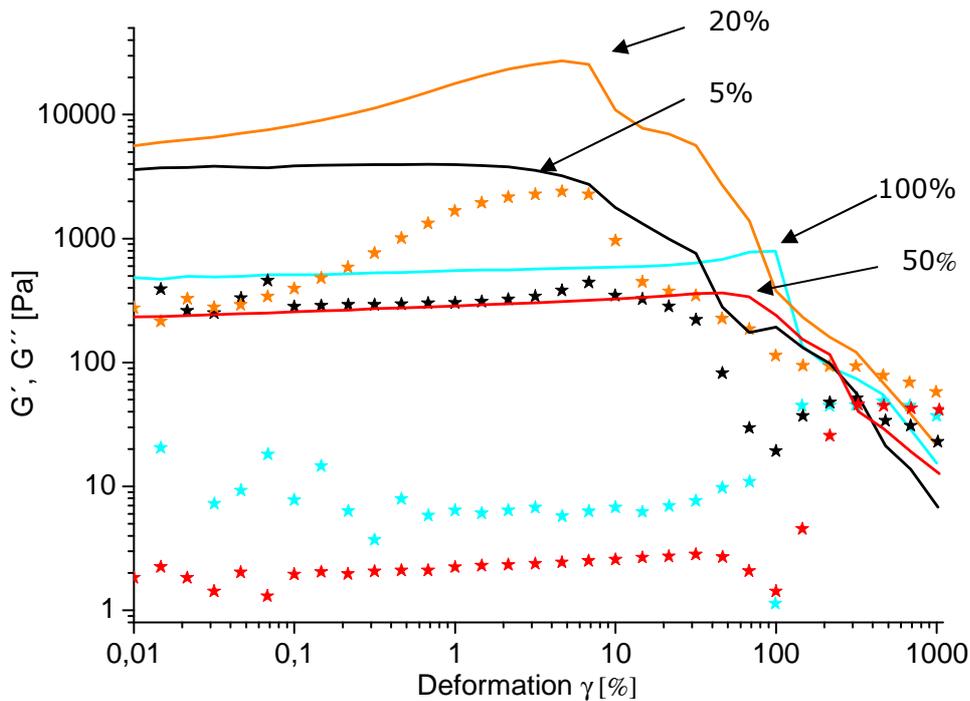


Abb. 32: Logarithmisch aufgetragener Amplitudensweep bei steigender Deformation γ , gemessen für die Gel-Systeme: *Alg-Ald/Alg-Hyd* (Orange), *Alg-Ald/HyA-Hyd* (Schwarz), *HyA-Ald/Alg-Hyd* (Hellblau) und *HyA-Ald/HyA-Hyd* (Rot). Die Speichermodule G' sind als Linie, die Verlustmodule G'' in Form von Sternen dargestellt.

Im Bereich kleiner Deformationen bis zu $\gamma = 1\%$ wurde ein nahezu konstantes Speichermodul G' für alle vier Gele erhalten, erst bei höheren Belastungen wurden die Netzwerke zerstört. Das Verhalten der Gele *HyA-Ald/HyA-Hyd* und *HyA-Ald/Alg-Hyd* ist ähnlich. Die Werte der Speichermodule G' liegen deutlich unterhalb der anderen beiden Gele, der Wendepunkt wird aber erst bei sehr hohen Deformationswerten über $\gamma = 50\%$ erreicht. Dies zeigt, dass diese beiden Systeme gute elastische Eigenschaften besitzen, die jedoch mit einer geringeren Steifheit der Gele einhergeht. Dieses Verhalten korreliert mit den Resultaten der methacrylischen Gele (Kapitel 4.3).

Die Gele *Alg-Ald/Alg-Hyd* und *Alg-Ald/HyA-Hyd* zeigen ein konträres Verhalten. Ihre Rigidität ist wesentlich ausgeprägter, die Netzwerke wurden jedoch bereits bei geringen Deformation unter $\gamma = 10\%$ zerstört. Dabei zeigte das Alginate-Gel einen abweichenden Verlauf, da dieses unter Deformation zuerst ein höheres Speichermodul erreichte. Dieses Verhalten kann durch eine unter Belastung induzierte post-Polymerisation erklärt werden. Die anliegende Deformation erhöhte die Flexibilität des sehr viskosen Alginate-Gels, die Knäulung der Ketten wurde dadurch verringert und verbliebene, intakte Funktionalitäten konnten weitere Vernetzungsreaktionen eingehen. Dies bedeutet, dass die Vernetzungsrate mit größeren Deformationen erst erhöht wird und anschließend das Gel unter zu hohen Belastungen mechanisch zerstört wird.

5.4.3 Ergebnisse der mechanischen Untersuchungen

Der Einsatz zweier unterschiedlicher Biopolymere mit jeweils zwei reaktiven Komponenten lässt die Bildung eines modularen Gel-Systems zu. Dies ermöglicht es, individuelle Gele mit speziellen Verhaltensweisen, abgestimmt auf den jeweiligen Bedarf der biomedizinischen Verwendung, zu produzieren:

- Alginate erhöht die Steifheit und Formstabilität der Gele,
- Hyaluronsäure verbessert die Elastizität, insbesondere unter Belastung,
- mit steigender Temperatur erfolgt eine beschleunigte Gelierung,
- der Gelierungsbeginn wird durch die Temperatur nicht beeinflusst und
- die Inkubationszeit ist für jedes Gel-System individuell.

Diese Informationen über das Gelierungsverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften sind essentiell für eine effektive Gel-Herstellung für das *tissue engineering*. Je nach Zelltyp und vorgesehenem Implantationsort werden unterschiedliche Ansprüche an das Gewebe gestellt. Vor allem für den operativen Eingriff, der eigentlichen Implantation, ist eine ausreichende Rigidität entscheidend. Für das angestrebte myocardiale *tissue engineering* sind Gewebe von Nöten, die eine gewisse Festigkeit besitzen, gleichzeitig aber auch Kontraktionen der Herzmuskelzellen erlauben, was elastische Eigenschaften erfordert. Diese komplexen Anforderungen wurden vor allem bei der Ausführung aktiver und passiver Kräfte des Herzmuskelgewebes deutlich (Kapitel 5.6.2.3).

5.5 Quellraten

Zur Bestimmung der Quellraten wurden zylindrische Gele mit 3 mm Durchmesser hergestellt und nach Lyophilisation das Quellverhalten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ untersucht. Die Gele wurden in 5 mL Wasser bei 25 °C gequollen und fünfmal innerhalb von 48 Std. gewogen (Abb. 33). Die Quellwerte Q geben das Verhältnis des vollständig gequollenen Gels zum Trockengewicht der Probe an. Insgesamt wurden für jedes Gelsystem drei Proben präpariert, jede Wägung insgesamt dreimal wiederholt und die Messwerte gemittelt. Eine konstante Quellrate Q wurde für nahezu alle Gele nach 20 Std. erreicht. Lediglich das Hyaluronsäure-Gel benötigte einen längeren Zeitraum (30 Std.) bis das Gleichgewicht erreicht wurde. Ein konstanter Quellwert bedeutet, dass nach einem bestimmten Zeitpunkt ein maximales Gewicht in Folge der Wasseraufnahme erreicht wird und keine weiteren Änderungen bezüglich Form oder Größe erfolgen. Diese Formstabilität ist ein wichtiger Faktor für *in vivo* Implantationen. Gel-Implantate sollten ihre ursprünglich durch die Form festgelegte Dreidimensionalität nicht wesentlich verändern. Auch ein zu starkes Quellen des Gelkörpers ist zu vermeiden, da dies zu Quetschungen des umliegenden Gewebes führen kann.

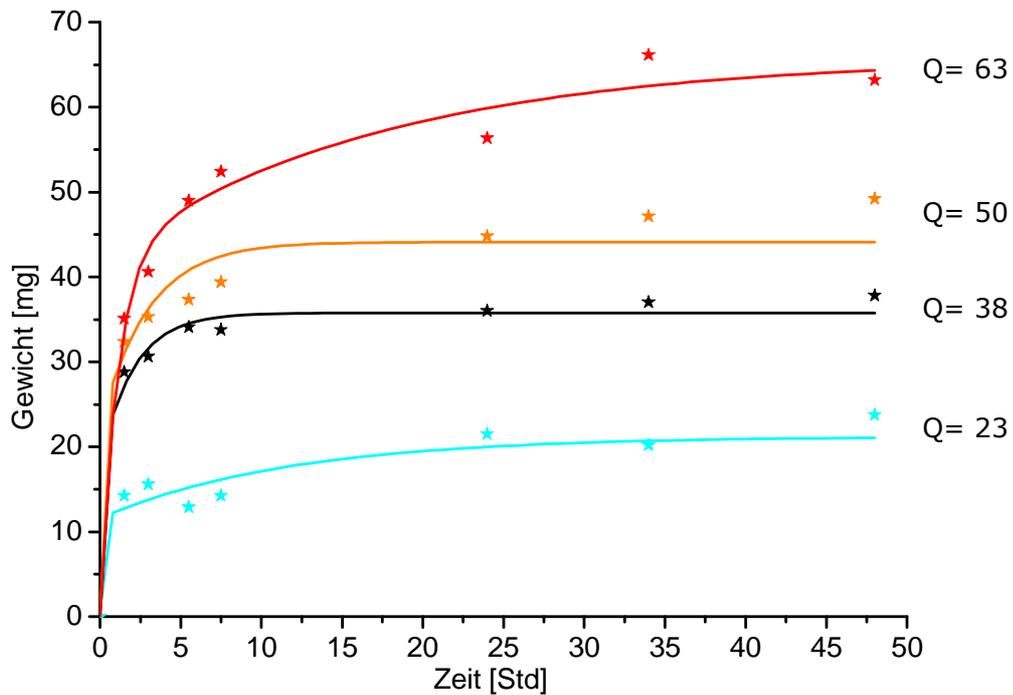


Abb. 33: Quellraten Q als Funktion der Zeit: *Alg-Ald/Alg-Hyd* (Orange), *Alg-Ald/HyA-Hyd* (Schwarz), *HyA-Ald/Alg-Hyd* (Hellblau) und *HyA-Ald/HyA-Hyd* (Rot). jeweils als 1:1 (w/w) Zusammensetzungen.

Die erhaltenen Werte liegen im Vergleich mit der Literatur in ähnlichen Dimensionen. BOUHADIR und Mitarbeiter beschrieben einen Wert von $Q = 30$ für Alginate-Gele, die ebenfalls über Hydrazone vernetzt wurden (Abb. 21).¹²¹ Darüber hinaus zeigten Alginate-Aldehyde die über divalente Calcium-Ionen vernetzt wurden, einen Wert zwischen 21 und 26.¹³⁶ Hyaluronsäure-Gele, die ebenfalls über Hydrazone zwischen Aldehydo- und Adipinsäuredihydrazid-verlängerten Hyaluronsäuren vernetzt wurden, ergaben einen Wert von $Q = 42$.¹³⁷

5.6 Biologische Bewertung

Die biologische Bewertung der *in situ* gebildeten Hydrogele erfolgte sowohl *in vitro* wie auch *in vivo*. *In vitro* wurde die Züchtung von bioartifiziellen Herzmuskeln verfolgt (*myocardiales tissue engineering*).¹³⁸ Grundlegende Erkenntnisse in diesem Bereich wurden bereits bei den Zelltests mit den radikalisch polymerisierten Gelen gewonnen (Kapitel 4.5.2). Diese zeigten, dass die Polysaccharide eine sehr gute Biokompatibilität *in vitro* aufwiesen, die Adhäsion von Zellen jedoch nur in Gelatine-haltigen Gelen nachgewiesen werden konnte. Dies bedeutet, dass sowohl Alginate wie auch

¹³⁶ T. Boontheekul, H.-J. Kong, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2005**, 26, 2455–2465.

¹³⁷ D. A. Ossipov, S. Piskounova, O. P. Varghese, J. Hilborn, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 2247–2254.

¹³⁸ H. Jawad, N. N. Ali, A. R. Lyon, Q. Z. Chen, S. E. Harding, A. R. Boccaccini, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, 1, 327–342.

Hyaluronsäure grundsätzlich als Gerüstmaterial geeignet sind, sie aber auf Grund fehlender Adhäsionsdomänen keine komplexe Gewebekonstruktion bewirken. Für das myokardiale *tissue engineering* eignen sich diese beiden Polysaccharide insbesondere aufgrund der modularen Einstellbarkeit ihrer physikalischen Eigenschaften. Um komplexe Gewebe zu generieren, ist jedoch die Zugabe von Adhäsionsfaktoren nötig, so wie bereits erfolgreich für Gelatine gezeigt wurde (Kapitel 4.5.2).

Darüber hinaus wurden Biokompatibilitäts- und Abbau-Studien mit Lucifer-Geld markierten Gelen *in vivo* an haarlosen Mäusen durchgeführt. Diese sollten zeigen, wie sich *ex vivo* präparierte und anschließend implantierte Gele im lebendigen Organismus verhalten. Das Augenmerk bei diesen Untersuchungen lag auf der Bestimmung einer langfristigen Verträglichkeit und Bioabbaubarkeit.

5.6.1 Präparation und Sterilisation der Polymerkomponenten

Im Zuge der biologischen Untersuchungen war das Präparationsverfahren der Polymer-Komponenten für das *tissue engineering* zu optimieren. Da der Gelierungsprozess in Gegenwart der Zellen erfolgte, sollten die eingesetzten Komponenten den vorher genannten biomedizinischen Anforderungen entsprechen. Aus diesem Grund werden einzelne Reinigungsschritte kurz erläutert.

Die Dialyse der derivatisierten Polysaccharide erfolgte zuerst über drei Tage mit destilliertem Wasser und anschließend zwölf Stunden mit Endotoxin-freiem, sterilem Wasser. Alle verwendeten Gefäße, Pipetten usw. wurden vor Benutzung autoklaviert. Die im Medium des letzten Wasserwechsels gelösten Polymere wurden mit einem Sterilfilter der Porengröße 0.22 µm sterilisiert und danach lyophilisiert. Die gefriergetrockneten, modifizierten Polymerkomponenten wurden wiederum in Endotoxin-freiem Wasser gelöst, in identischen Volumina in sterile EPPENDORF Cups überführt und diese erneut gefriergetrocknet. Die Polymer-Komponenten lagen somit in steriler, konservierter Form vor und zwar portioniert für den direkten Einsatz als *in situ* gelierbares System im *tissue engineering*.

5.6.2 Präparation der Zellkulturen

Die biologischen Untersuchungen wurden im LEBAO „Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe“ von J. DAHLMANN in der Arbeitsgruppe GRUH durchgeführt. Das Präparationsverfahren der *in situ* Gelierung in Gegenwart von Zellen wurde in Kooperation erarbeitet.

Die gefriergetrockneten, portionierten Aldehydo- bzw. Hydrazido-Komponenten des Alginats oder der Hyaluronsäure wurden separat in DMEM (im Falle der modifizierten Hyaluronsäuren) oder in H₂O_{dest.} (im Falle der modifizierten Alginate) bei 60°C bis zur vollständigen Homogenität gelöst. Die Konzentrationen der erhaltenen Polymerlösungen betragen jeweils 1% (w/v). Die eingesetzten Zellmischungen wurden anschließend in der

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Hydrazido-Komponente bis zur Homogenität suspendiert und durch Zugabe der Aldehydo-Komponente geliert (Abb. 34). Die Inkubationszeit bis zur vollständigen Gelierung betrug mindestens 45 Min. bei 37 °C. Anschließend wurden die Gele mit Nährmedium überschichtet und in einem Standard-Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte mit täglichem Medium-Wechsel kultiviert.



Abb. 34: Schematische Darstellung zur Präparation zellbeladener, *in situ* geformter Hydrogele.¹³⁹ Rote Körper deuten Zellen an, während graue/ blaue Stränge die beiden Polymerkomponenten visualisieren. Als Negativform für das myocardiale *tissue engineering* wurde eine Teflon-Gießwanne eingesetzt.¹⁴⁰

5.6.3 *Live/Dead* Assay: Biokompatibilität

Zur Überprüfung der Zytotoxizität der *in situ* hergestellten Hydrogele wurden *Live/Dead* Assays durchgeführt. Toxische Eigenschaften könnten beispielsweise von den vorhandenen Aldehydo- oder Hydrazido-Funktionalitäten in den Biopolymeren, den gebildeten Hydrazonen oder den Reaktionsenergien ausgehen. Die Biokompatibilitätsstudien erfolgten mit Zellmischungen aus neonatalen Rattencardiomyocyten und Fibroblasten, die in die Gele eingekapselt wurden. Die Färbung der Zellen zum Nachweis der Zellvitalitäten erfolgte mit einem kommerziell erwerblichen *Live/Dead* Assay. Lebende Zellen wurden durch eine grüne, abgestorbene Zellen durch eine rote Färbung visualisiert. *Alg-Ald/Alg-Hyd*-Gele wie auch der *HyA-Ald/Alg-Hyd* Blend wurden mit dem gelierten Protein Collagen verglichen (Abb. 35).

¹³⁹ J. Dahlmann, *unveröffentlichte Ergebnisse*, Medizinische Hochschule Hannover, **2012**.

¹⁴⁰ G. Kensah, I. Gruh, J. Vierung, H. Schumann, J. Dahlmann, H. Meyer, D. Skvorc, A. Bär, P. Akhyari, A. Heisterkamp, A. Haverich, U. Martin, *Tissue Eng. Part C* **2011**, *17*, 463-474.

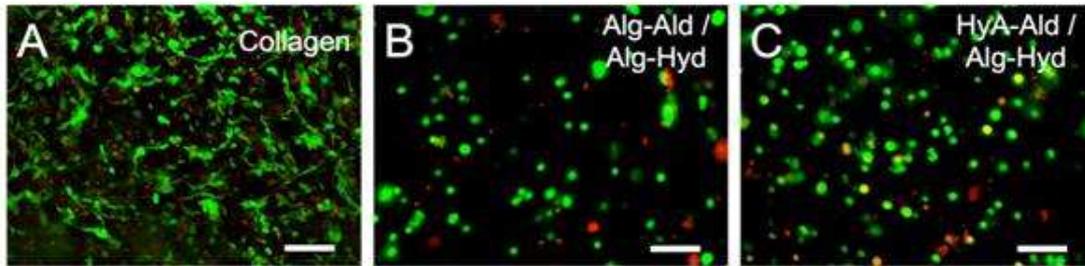


Abb. 35: *Live/Dead* Assay *in situ* gelierter Hydrogele. Die Färbungen der Zellmischungen, isoliert aus neonatalen Rattenherzen, erfolgten nach dreitägiger Kultivierung. A) Collagen-Gel, B) Alginate-Gel und C) Hyaluronsäure-Alginat Blend.¹³⁹

Die Kompatibilitätsstudien zeigten, dass sowohl das Alginate-Gel wie auch der Alginate-Hyaluronsäure Blend eine sehr gute Zellverträglichkeit aufweisen. Nur wenige Zellen wurden als nicht vital identifiziert. Für die Gel-Systeme *Alg-Ald/HyA-Hyd* und *HyA-Ald/HyA-Hyd* wurden keine repräsentativen Studien durchgeführt.¹³⁹ Zusammenfassend wies der *Live/Dead* Assay eine sehr gute Biokompatibilität für

- die Aldehydo-Komponente,
- die Hydrazido-Komponente,
- die gebildeten Hydrason-Bindungen und
- die Reaktionsführung des Gelierungsprozesses

aus. Eine Zell-Adhäsion, -Migration oder -Spreizung konnten jedoch auch bei dieser Gelierungsmethodik nicht nachgewiesen werden. Dies ist anhand der abgekugelten, runden Form der Zellen bzw. der Zellagglomerate zu erkennen (Abb. 35 B,C). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, ausgesiedelt in geliertem Collagen, adhäsives Verhalten, was an der langgestreckten Morphologie der Zellen erkennbar ist (Abb. 35 A). Proteine wie Gelatine (Kapitel 4.5.2) oder Collagen besitzen somit adäquate Erkennungseinheiten für eine Integrin-vermittelte Zelladhäsion.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang zu den Ergebnissen von JEON *et al.*,¹¹¹ die methacrylierte, partiell oxidierte Alginate radikalisch in Hydrogele überführten. Ihre Daten dokumentieren, dass nur ca. 11% der mesenchymalen Stammzellen, die auf den Gelen ausgesiedelt wurden, ein adhäsives Verhalten zeigen. Wiederum ist die veränderte, gespreizte Morphologie der Zellen hierfür diagnostisch. JEON *et al.* postulierten, dass die erfolgreiche Adhäsion auf die eingeführten Aldehydo-Funktionalitäten zurückzuführen war, die mit den Glykopeptiden der Glykokalix auf der ECM reagierten.¹¹¹

Obwohl die Vitalität und die teilweise erfolgte Adhäsion in diesem Falle sogar für Stammzellen gefunden wurde, ist die Methode der Induzierung kritisch zu betrachten. Da die Zelladhäsion über eine chemische Bindung mit dem ECM erfolgte, sind nachhaltige Schäden oder Modulationen in den Stammzellen nicht auszuschließen. Eine biologisch ausgelöste Adhärenz, ausgelöst über nicht kovalente Wechselwirkungen ist, besonders

für Stammzellen, deutlich zu bevorzugen. Diese könnte z.B. über Peptide, wie der RGD-Sequenz erfolgen, was die natürliche Situation der Zell-Zell Erkennungsprozesse nachahmen würde.⁸⁸

5.6.4 Myokardiales *tissue engineering* im Bioreaktor

Zur Präparation bioartifizieller Herzmuskelstränge wurden Zellmischungen eingesetzt, die aus neonatalen Rattenherzen gewonnen wurden. Die Herstellung der Gele und die Kultivierung im Bioreaktor erfolgten analog zu dem etablierten Protokoll (Kapitel 5.6.2). Basierend auf den Resultaten des *Live/Dead* Assays (Kapitel 5.6.2.1), wurde den Polymerkomponenten humanes Collagen I zugesetzt. Dieses sollte die Adhäsion der Zellen ermöglichen und damit die Bildung eines komplexen Gewebes unterstützen. Die finale Konzentration der Matrixlösung betrug 1.2 mg/mL humanes Collagen I, 0.2% *w/v* Aldehydo- und 0.2% *w/v* Hydrazido-Komponente bei einem Gesamtvolumen von 250 μ L.

Der Fortschritt der Gewebebildung wurde in regelmäßigen Abständen per Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMRM), welcher sich in metabolisch aktiven Mitochondrien anlagert, die besonders in Herzmuskelzellen in großer Anzahl vorhanden sind. Die Kultivierung im Bioreaktor ermöglichte es, die Zellkontraktionen über Kraftmessungen zu charakterisieren. Nach 14 Tagen im Inkubator wurden die aktiven und passiven Kräfte der gebildeten Myokardien vermessen.

Die folgenden Ergebnisse entstammen der Forschungsarbeit von J. DAHLMANN.¹³⁹ Da diese für die vorliegende Arbeit jedoch essentiell sind, werden sie kurz umrissen. Insgesamt wurden drei unterschiedliche, mit Collagen versetzte Hydrogel-Systeme untersucht: das Alginat-Gel *Ald-Ald/Alg-Hyd/Collagen* (AAC), das Hyaluronsäure-Gel *HyA-Ald/HyA-Hyd/Collagen* (HHC) und das Gel-Komposit *HyA-Ald/Alg-Hyd/Collagen* (HAC). Daneben wurde ein Collagen-Gel (C) als Kontrollmatrix eingesetzt. Das Verhalten der Zellen in den unterschiedlichen Gel-Systemen von Tag 0 bis Tag 13 ist in Abb. 36 gezeigt. In Folge der erfolgreichen Zelladhäsion, wurden innerhalb von 14 Tagen komplexe Myokardien gebildet. In allen Gelen wurden gestreckte, längsausgerichtete Cardiomyocyten identifiziert, die ein autonom kontrahierendes Gewebe ergaben. Dabei resultierte die Bildung der Gewebe in einer deutlichen Veränderung der Gele im Vergleich zu ihrer ursprünglichen Form.

In Collagen-Gelen konnte eine sehr schnelle Verdichtung des Konstrukts beobachtet werden, wobei die Gewebe nach 13 Tagen sehr gerade, dünne Stränge formten (Abb. 36 A). Die Formänderung der Polysaccharid-haltigen Gele dauerte wesentlich länger und führte zu verbreiterten Geweben (Abb. 36 B-D). Das Verdichten der Konstrukte konnte hier vor allem in der Gewebemitte beobachtet werden, während die Bereiche an den Enden nur wenig verändert vorlängen. Gele auf Alginatbasis bildeten Gewebe mit dem größten Durchmesser in der Mitte (Abb. 36 B). Das Verhalten des Alginat-Hyaluronsäure

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Blends liegt zwischen dem der Gele HAC und AAC, was wiederum die Modularität des gesamten Systems unterstreicht. Analog zu den Resultaten der mechanischen Untersuchungen (Kapitel 5.4.3), lassen sich, abhängig von der Gel-Zusammensetzung, individuelle Gewebe kultivieren.

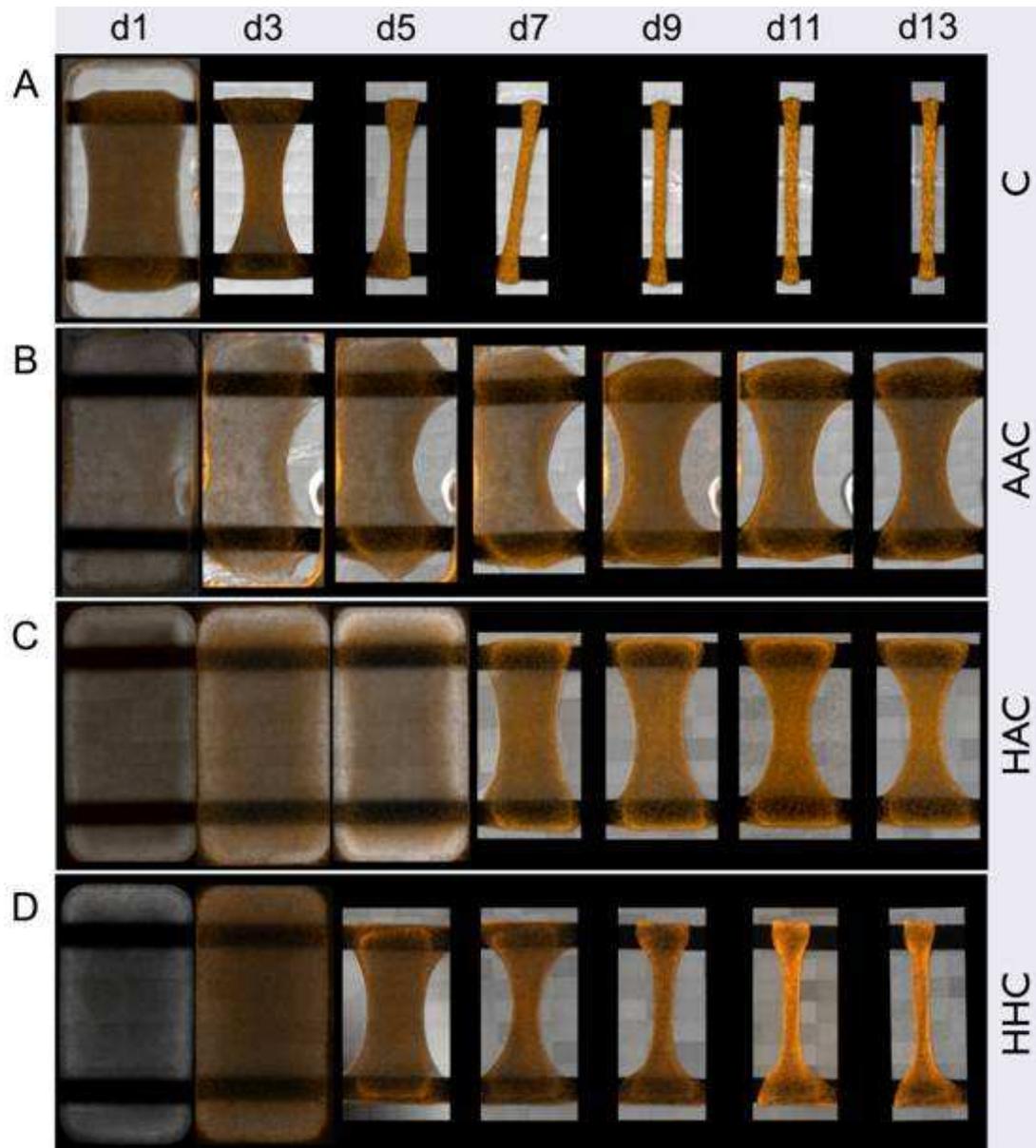


Abb. 36: Fortschritt der Gewebeerwicklung visualisiert per Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 13 Tagen. Kultiviert wurden neonatalen Rattenherzzellmischungen in Collagen-Gelen (A) und mit Collagen versetzten (B) Alginat-Gelen, (C) Alginat-Hyaluronsäure-Blends und (D) Hyaluronsäure-Gelen.¹³⁹ Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMRM).

Myokardien gelten grundsätzlich als funktionelle Synzytien, was bedeutet, dass alle Zellen weiterhin morphologisch voneinander getrennt vorliegen, ihr Zytoplasma aber über *Gap-junctions* miteinander verbunden ist. Diese Verbindungsstellen sind essentiell für die elektronische Kopplung der Cardiomyocyten, was in einem homogen kontrahierenden Muskelstrang resultiert. Die Stärke der Kontraktion ist abhängig von den

Konzentrationsgradienten der Calcium Ionen in den *Gap-junctions*, den transmembranen Ionenkanälen der Zellen. Dieser Gradient und damit die Stärke des Muskels lässt sich mit Hilfe der *Patch-Clamp* Methode bestimmen.¹⁴¹

Kraftmessungen wurden nach Tag 14 in den eigens angefertigten Bioreaktoren durchgeführt (Abb. 37). Dazu wurden die Frequenzen des spontan kontrahierenden Gewebes vermessen, aktive und passive Kräfte bestimmt und daraus die am Gewebe anliegenden Spannungen errechnet. Anschließend wurden die Konstrukte schrittweise gedehnt und wiederum aktive und passive Kräfte bestimmt.

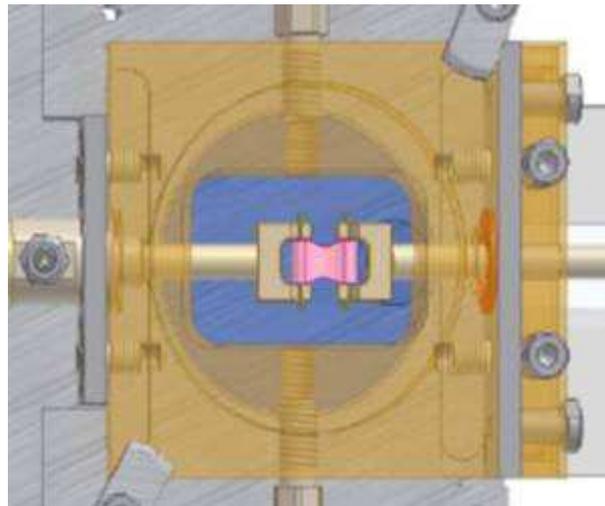


Abb. 37: Bioreaktor, entwickelt in der AG GRUH, zur Kraftmessung von bioartifiziellen myokardialen Geweben.¹⁴⁰

Die individuellen Werte der Messungen sind der Arbeit von J. DAHLMANN zu entnehmen.¹³⁹ Insgesamt zeigten alle Polysaccharid-Gele für fast alle Parameter ein besseres Ergebnis als die Collagenreferenz. Sowohl der minimale Durchmesser des Myokards, als auch die Frequenz der Kontraktionen lagen deutlich oberhalb des Collagens. Gewebe auf Basis der Biopolymere entwickelten deutlich höhere aktive wie auch passive Kräfte, im Vergleich zur Collagenreferenz. Die maximale passive Kraft wurde im Alginat-Gel AAC mit einem achtfach höheren Wert, im Vergleich zum Collagen-Gel erreicht. Die höchste aktive Kraft wurde für das Hyaluronsäure-Gel HHC mit einem dreifach höheren Wert zum Collagen-Gel detektiert. Basierend auf diesen Werten und den Durchmessern der Gewebestränge an der schmalsten Stelle, wurden aktiv und passiv anliegende Spannungen berechnet. Hier zeigten Hyaluronsäure-Gele herausragende Werte für aktive wie auch passive Spannungen. Sowohl das Alginat-Gel AAC wie auch der Alginat-Hyaluronsäure Blend HAC lagen bei den passiven Spannungen im Bereich des Collagens, bei den aktiven Spannungen blieben jedoch weit hinter den Werten des Collagens zurück.

¹⁴¹ O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, *Pflügers Arch.* **1981**, 391, 85-100.

Die höhere Elastizität der Hyaluronsäure scheint für das myocardiale *tissue engineering* größere Vorteile zu liefern, als die rigideren Alginate. Die Verhaltensweisen der Biopolymere in der Gewebekultivierung ließen sich, basierend auf den mechanischen Untersuchungen (Kapitel 5.4), sehr gut interpretieren.

Die Ergebnisse der *in vitro* Kulturen lassen sich wie folgt zusammenfassen. LEOR *et al.* beschrieben in einem im Jahr 2005 erschienen richtungsweisenden Artikel die Entwicklung von biomimetischen Materialien der „dritten Generation“, für das myokardiale *tissue engineering*.¹⁴² Diese sollten so konstruiert sein, dass sie die Zell-Matrix Erkennung auf molekularer Ebene stark begünstigen und somit die physische Architektur der natürlichen ECM imitierend verbessern. Für die Züchtung implantierbarer Herzmuskeln setzten ZIMMERMANN *et al.* verschiedene Kriterien an.¹⁴³ Die Konstrukte sollten

- kontraktile,
- elektrophysiologisch stabil,
- mechanisch robust,
- elastisch und
- biokompatibel

sein. Darüber hinaus sollten sie die Fähigkeit zur Vaskularisierung vor oder nach der Implantation besitzen. Bezüglich des in dieser Arbeit entwickelten *in situ* gelierenden Systems, konnten nach den mechanischen und biologischen Untersuchungen nahezu alle oben genannten Punkte erfüllt werden. Die physikalischen Anforderungen wurden in rheologischen Analysen und Quellstudien betrachtet (Kapitel 5.4 und 5.5) und eine entsprechende Rigidität bei gleichzeitiger Flexibilität nachgewiesen. Die biologische Bewertung (Kapitel 5.6) attestierte die Kontraktilität, die elektrophysiologische Stabilität und eine sehr gute Biokompatibilität.

Das Zusammenspiel dieser Parameter sollte es ermöglichen, native Herzmuskeln mit adäquaten funktionellen und morphologischen Eigenschaften zu züchten, die ihre Vitalität auch nach der Implantation bewahren.¹⁴³ Die Kombination von mechanischer, elektrischer und funktioneller Verflechtung sollte vor allem in verbesserten systolischen und diastolischen Werten erkennbar sein. Letztere Werte wurden in den *in vitro* gezüchteten BCT's anhand der aktiven und passiven Kräfte bestimmt. Dabei konnten exzellente Ergebnisse für Gewebe auf Basis der neu entwickelten, polysaccharidischen Matrices attestiert werden.¹⁴⁴ Die weitgehende Erfüllung der Kriterien,¹⁴² sowie die positiven

¹⁴² J. Leor, Y. Amsalem, S. Cohen, *Pharmacol. Ther.* **2005**, *105*, 151-163.

¹⁴³ W.H. Zimmermann, I. Melnychenko, T. Eschenhagen, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1639-1647.

¹⁴⁴ J. Dahlmann, A. Krause, L. Möller, G. Kensah, M. Möwes, A. Diekmann, U. Martin, A. Kirschning, I. Grub, G. Dräger, **2012**, in Vorbereitung.

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

Resultate der biologischen Untersuchungen, offenbarten das Potential der *in situ* gelierenden Matrices für weitere Anwendungen im *tissue engineering*. Ein offener Punkt zur Optimierung des Systems ist die Fähigkeit zur Angiogenese. Hier könnten Adhäsionsfaktoren, wie RGD-Peptide oder VEGF Proteine Abhilfe schaffen. Die Einbettung von RGD-Peptiden wird im weiteren Verlauf der Arbeit ausführlich behandelt (Kapitel 6).

5.6.3 *in vivo* Implantate

Neben *in vitro* Testreihen mit neonatalen Rattencardiomyocyten (Kapitel 5.6.2) wurden ebenfalls *in vivo* Studien durchgeführt. Diese Tests an lebenden Tieren sollten die Kompatibilität der Hydrogele im Organismus zeigen. Die Studien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. F. WITTE und Dr. I. BARTSCH realisiert (Abteilung Implantatimmunologie, CrossBIT –Verbundzentrum für Biokompatibilität und Implantatimmunologie in der Medizintechnik- Hannover). Um die notwendige Zahl an Versuchstieren einzuschränken und gleichzeitig die implantierten Gele *in vivo* zu verfolgen, wurde das „Fluoreszenz Imaging System“ Maestro™ verwendet. Dieses Fluoreszenzmikroskop erlaubt es, fluoreszierende Substanzen im Körper lebender Nagetiere, wie Mäuse zu visualisieren. Der Wellenlängenbereich des Gerätes liegt zwischen 500 nm und 950 nm,¹⁴⁵ so dass Fluoreszenz-markierte Probekörper einige Millimeter unterhalb der Haut detektiert werden können. Dabei hängt die Fluoreszenzintensität vom gewählten Fluorophor und den Absorptionseigenschaften des umgebenden Gewebes ab. Um zusätzliche Lichtbrechungen zu vermindern, wurden für die Untersuchungen genetisch veränderte, haarlose Mäuse verwendet.

Im Rahmen der Studie wurden zwei weibliche, haarlose Mäuse über einen Zeitraum von 56 bzw. 125 Tagen beobachtet und Fluoreszenzmessungen an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 35, 43, 49 und 56 durchgeführt. Für histologische Untersuchungen wurde eine Maus nach 56 Tagen euthanasiert, während die Zweite für eine Langzeitstudie über 125 Tage beobachtet wurde. Die Implantation der Probekörper erfolgte subkutan im Bereich der Schultern beider Tiere, wobei pro Tier jeweils zwei Gele eingesetzt wurden (Abb. 38).

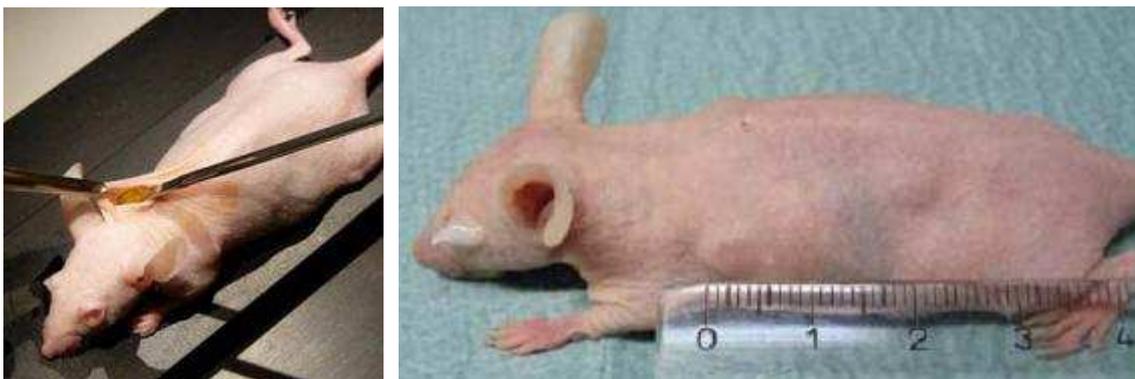


Abb. 38: Implantation des Fluoreszenz-markierten *Alg-Hyd/HyA-Ald* Gels im Schulterbereich des ersten Versuchstieres (links). Messung der Größe des subkutan implantierten Gels an Tag 14 postoperativ (rechts).

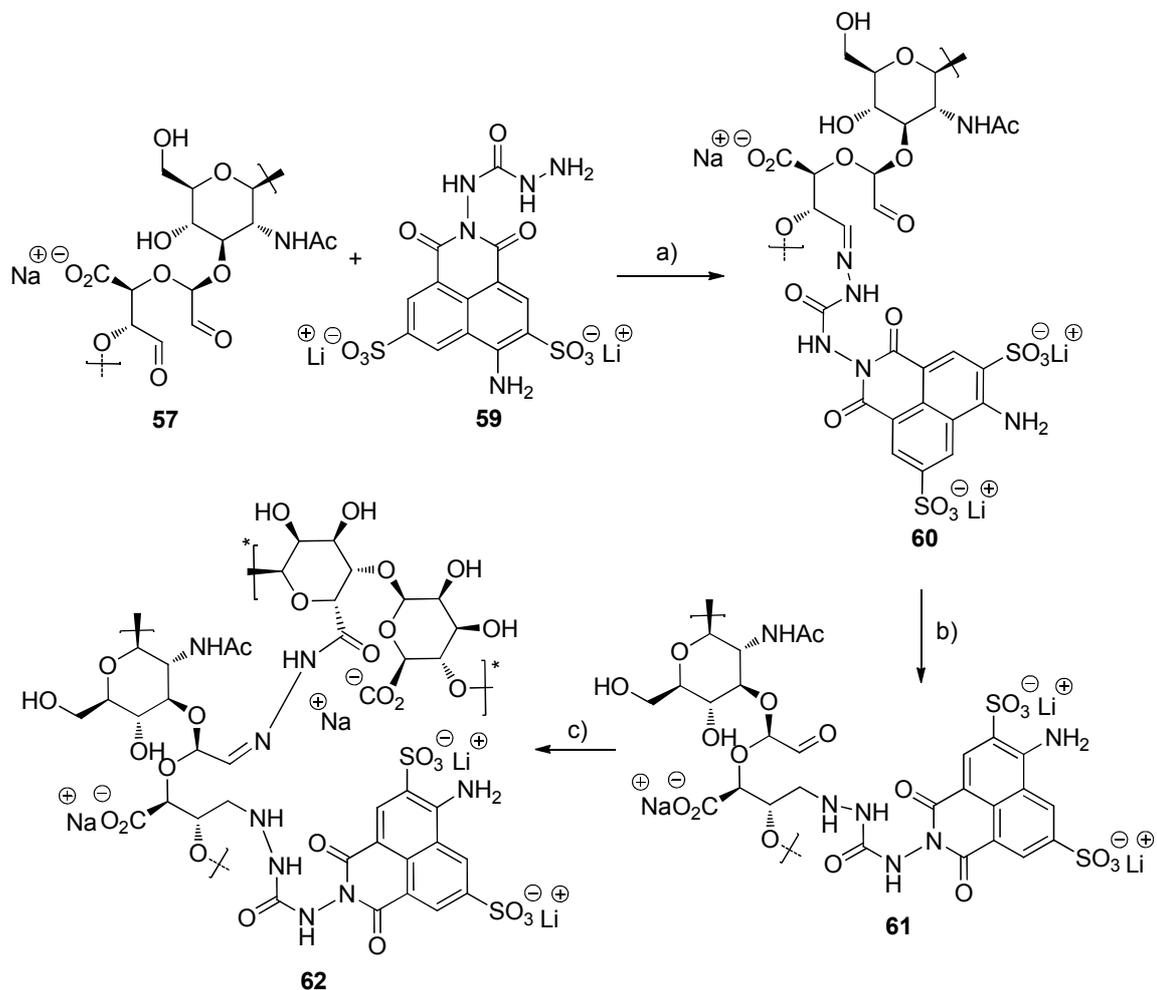
Als Fluorophor wurde die wasserlösliche, nicht toxische Verbindung Lucifer-Gelb gewählt, welche Absorptionsmaxima bei 428 nm und 280 nm zeigt. Da Lucifer-Gelb über

¹⁴⁵ www.caliperls.com/products/preclinical-imaging/maestro (Stand: 15.03.2012).

Kovalent *in situ* vernetzbare Hydrogele

eine Hydrazido-Funktionalität verfügt, wurde es an die Aldehydo-Komponente der Biopolymere konjugiert. Zur Anknüpfung wurde **59** zuerst mit der Aldehydo-Komponente der Hyaluronsäure **57** umgesetzt und das gebildete Addukt **60** direkt mit $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ reduziert. Anschließend wurde die zu 15% mit Lucifer-Gelb dekorierte Aldehydo-Hyaluronsäure **61** erschöpfend dialysiert. Dieser umfassende Dialyseprozess garantierte, dass nicht kovalent gebundene oder hydrolysierbare Fluorophore vollständig entfernt wurden.

Die Herstellung der Hydrogele erfolgte unmittelbar vor der Implantation. Die markierte Aldehydo-Komponente **61** wurde mit äquimolaren Mengen des Hydrazido-Alginats **55** umgesetzt (Schema 22), was in der Bildung gelb fluoreszierender Hydrogele resultierte. Die einzelnen Reaktionsschritte, sowie die Optimierung der reduktiven Bedingungen wurden von L. MÖLLER untersucht.⁸⁹



Schema 22: Markierung der Hyaluronsäure Aldehydo-Komponente **57** mit Lucifer-Gelb **59** und anschließender Reduktion des Adduktes **60**. Durch Zugabe von Hydrazido-Alginat **55** konnte der Fluoreszenz-markierte Blend **62** generiert werden; a) H_2O ; b) $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$, H_2O ; c) H_2O , *Alg-Hyd*_{aq}.

Die ausführlichen Beschreibungen der *in vivo* Studie sind der Veröffentlichung von MÖLLER *et al.* zu entnehmen.¹⁴⁶ Zusammenfassend wurden nach der Explantation der Gele und der histologischen Untersuchung folgende Resultate ermittelt:

- Alle Gele wiesen eine sehr gute Biokompatibilität auf.
- Entzündungs- oder Immunreaktionen wurde nicht festgestellt.
- Keine Abkapselungen von Geweben im Bereich des Implantates.
- Alle Gele wurden postmortem nahezu vollständig explantiert.
- Die Morphologie, die Größe und das Gewicht der Gele blieb nahezu konstant.
- Die sehr gute mechanische Stabilität wurde über einen längeren Zeitraum nachgewiesen.

Der biologische Abbau konnte in keinem Versuchstier nachgewiesen werden, wobei eine partielle Degradation nicht auszuschließen war. Dieses bedeutet, dass weder ein enzymatischer Abbau der Hyaluronsäure über körpereigene Hyaluronidasen erfolgte, noch die Hydrazonbindungen zwischen den Polymeren hydrolysiert wurden. Weiterführende Studien zum enzymatischen Abbau der Hyaluronsäure-Gele und den Aldehydo- sowie Hydrazido-Komponenten sind den Resultaten von L. MÖLLER zu entnehmen.⁸⁹ Ein möglicher Grund für die verlangsamte bzw. inhibierte Degradation in dieser *in vivo* Studie könnte der Implantationsort der Gele sein. Dieser liegt im Bereich der Schultern und somit Bereich des Skelettmuskelgewebes, welches geringere metabolische Aktivität besitzt.

5.7 Analyse der Hydrazonbindung auf molekularer Ebene der Monosaccharide

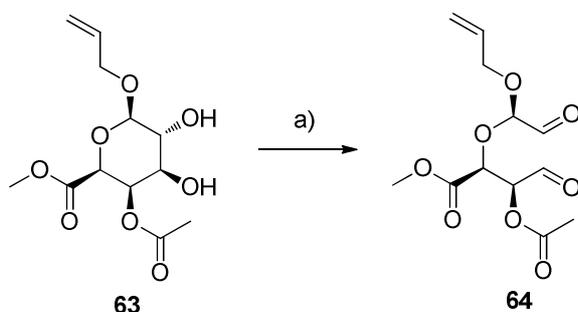
Die Bildung der Hydrazon-Bindung, die die Grundlage für die Vernetzung der Biopolymere ist, konnte an den makromolekularen Strukturen nicht im Detail analysiert werden. Als Konsequenz wurde die Hydrazonbildung auf niedermolekularer Ebene am Beispiel von Modellsubstanzen untersucht. Die nötigen Aldehydo- und Hydrazido-Funktionalitäten wurden in das Monosaccharid Galacturonsäure eingeführt und beide Komponenten anschließend in Wasser zur Reaktion gebracht. Die Synthese der Galacturonsäurederivate sowie die anschließende Bildung des Hydrazons wurden massenspektrometrisch und per NMR-Spektroskopie untersucht.

5.7.1 Aldehydo-Galacturonsäure

Die Synthese des Aldehydo-Galacturonsäure Derivats **64** erfolgte analog zur Oxidation der Polysaccharide Alginat und Hyaluronsäure (Kapitel 5.1). Der nach Voss *et al.*¹⁴⁷

¹⁴⁶ L. Möller, A. Krause, I. Bartsch, A. Kirschning, F. Witte, G. Dräger, *Macromol. Symp.* **2011**, 309/310, 222–228.

synthetisierte 1-Allyloxy-4-acetyl-galacturonsäuremethylester **63** wurde in Wasser unter Zugabe von Natriumperiodat oxidiert (Schema 23). Zum einen steht für die Oxidation der Galacturonsäure **63** nur das Diol an der C-2/C-3 Position zur Verfügung, was der Situation am Alginat entspricht und zum anderen wird das gebildete Oxidationsprodukt gegen Eliminierungs- oder Zerfallsreaktionen durch die Schutzgruppen an den C-1, C-4 und C-5 Positionen stabilisiert.



Schema 23: Oxidation des 1-Allyloxy-4-acetyl-galacturonsäuremethylesters **63**; a) NaIO₄, BaCO₃, H₂O.

Die erfolgreiche Synthese des Dialdehyds **64** konnte mittels ¹H-, ¹³C- und 2D-NMR Spektroskopie (HSQC) in D₂O, sowie durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden. Das Signal des Aldehyds wurde im ¹H-NMR bei 8.44 ppm und im ¹³C-NMR bei 171.1 ppm detektiert. Wie in Abb. 39 gezeigt, bestätigte das HSQC-NMR Spektrum die erfolgreiche Bildung durch die ¹J Kopplung des Protonen- mit dem Kohlenstoffsignal.

Um den Zerfall der Verbindung **64** in Gegenwart der Periodate und den in der Reaktion gebildeten Iodaten zu verhindern, wurde dem Reaktionsgemisch Bariumcarbonat zugesetzt. Dieses bildet in Wasser unlösliche Bariumiodate bzw. Bariumperiodate, so dass alle verbliebenen Iodoverbindungen nach der Reaktion aus der Lösung entfernt werden konnten. Die Aldehydo-Galacturonsäure **64** konnte nach Lyophilisation in Form eines Feststoffgemisches mit diversen Salzen gewonnen werden. Die Isolierung der Verbindung ohne Fällung der Iodate war nicht möglich.

¹⁴⁷ A. Voss, N. Nemati, H. Poghosyan, H.-U. Endress, A. Krause, C. Vogel, *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods, Volume 1*, Paul Kovac (Ed.), CRC Press, **2011**.

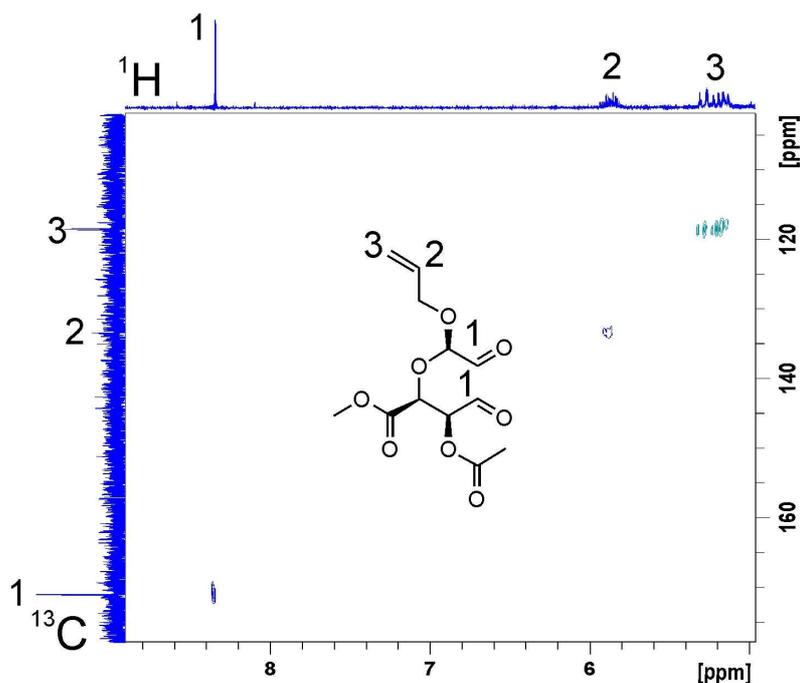
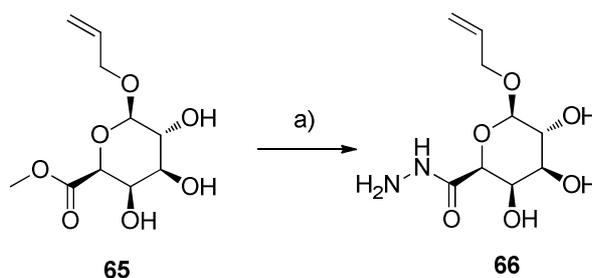


Abb. 39: Ausschnitt des HSQC-NMR Spektrums des Aldehydo-Galacturonsäure Derivats **64** in D_2O .

5.7.2 Hydrazido-Galacturonsäure

Die Herstellung des Hydrazido-Galacturonsäure Derivats **66** erfolgte durch Umsetzung des Galacturonsäuremethylesters **65** mit Hydrazin-Hydrat in Methanol (Schema 24). Die Synthese des 1-Allyloxy-galacturonsäuremethylesters **65** erfolgte ebenfalls nach einer Vorschrift von Voss *et al.*¹⁴⁷ Die Unlöslichkeit des gebildeten Hydrazido-Derivats **66** in Methanol erlaubte eine einfache Isolierung des Produktes durch Filtration.

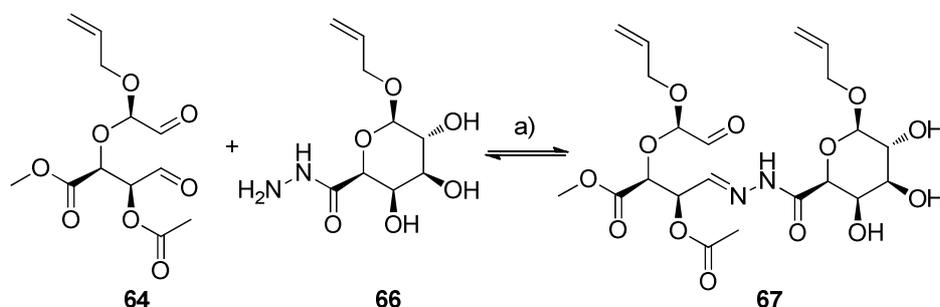


Schema 24: Synthese des Hydrazido-Galacturonsäure Derivats **66**; a) $N_2H_4 \cdot H_2O$, MeOH.

Die Bildung des Hydrazids konnte mittels 1H - und ^{13}C -NMR Spektroskopie in D_2O , massenspektrometrisch sowie durch Elementaranalyse nachgewiesen werden. Die Einführung der Hydrazido-Funktionalität über Aktivester-Chemie in Analogie zur Synthese des Hydrazido-Alginats **55** (Kapitel 5.2) gelang nicht.

5.7.3 Bildung des Hydrazons zwischen Aldehydo- und Hydrazido-Galacturonsäure

Aldehydo-Galacturonsäure **64** wurde mit Hydrazido-Galacturonsäure **66** in D₂O gemischt (Schema 25) und die Bildung des Hydrazons **67** NMR-spektroskopisch untersucht.



Schema 25: Gleichgewicht des Hydrazons **67** mit dem Aldehydo- **66** und dem Hydrazido-Derivat **64** der Galacturonsäure; a) D₂O.

Anhand von ¹H-, ¹³C-, HSQC- und HMBC-NMR Spektroskopie ließ sich die Bildung des Hydrazons **67** nachweisen. Das charakteristische Signal der Hydrazonbindung konnte im ¹H-NMR Spektrum bei 8.04 ppm und im ¹³C-NMR Spektrum bei 148.1 ppm nachgewiesen werden. Zusätzlich offenbarte das HSQC-NMR Spektrum die erfolgreiche Bildung des Hydrazons durch die ¹J Kopplung des Protonensignals mit dem Kohlenstoffsignal (Abb. 40). Die Signale des Aldehyds **64** (Abb. 39) sind in den ¹H- und ¹³C-NMR Spektren deutlich zu tieferem Feld verschoben (Abb. 40). Die Lage des Gleichgewichts der Reaktion konnte durch die Signalintensitäten des Aldehyds **64** und des gebildeten Hydrazons **67** bestimmt werden.

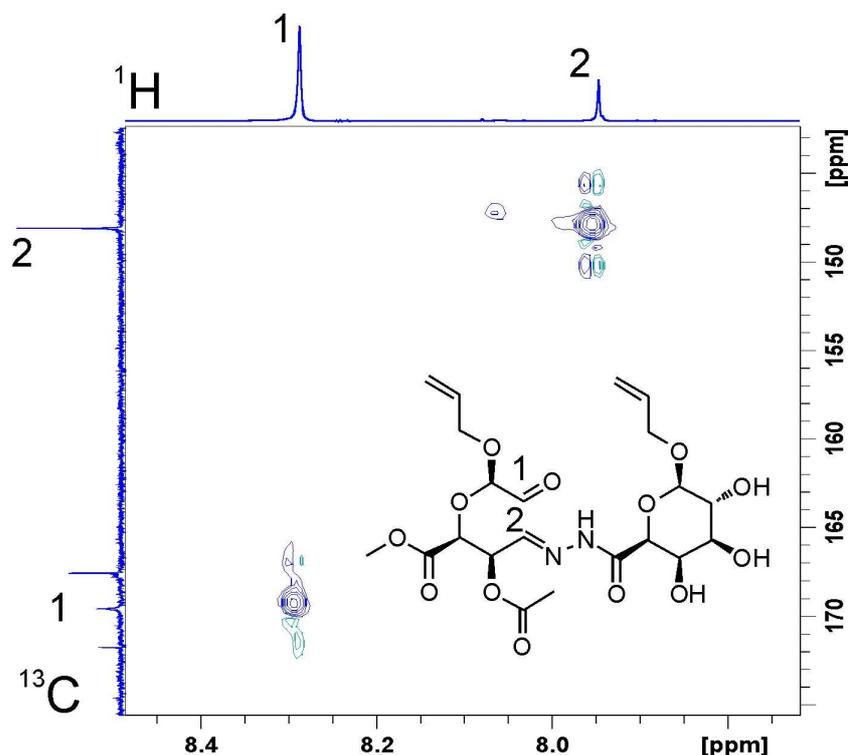


Abb. 40 Ausschnitt des HSQC-NMR Spektrums nach Mischen der Aldehydo- **64** und Hydrazido- **67** Derivate der Galacturonsäure in D_2O . Die ^1J Kopplung zeigt die Bildung des Hydrazons **67** an.

Die Bestimmung der Signalintensitäten in den ^1H -NMR spektroskopischen Messungen zeigte, dass bei einem neutralen pH-Wert das Gleichgewicht zwischen Hydrazon **67** und Aldehyd **64** in einem Verhältnis von 3:1 auf Seiten des Aldehyds **64** liegt. Nach Zugabe geringer Mengen einer 1M HCl_{aq} Lösung (pH-Wert ca. 4), ließ sich das Gleichgewicht auf die Seite des Hydrazons verschieben, was anhand variierender Signalintensitäten bestimmt wurde.

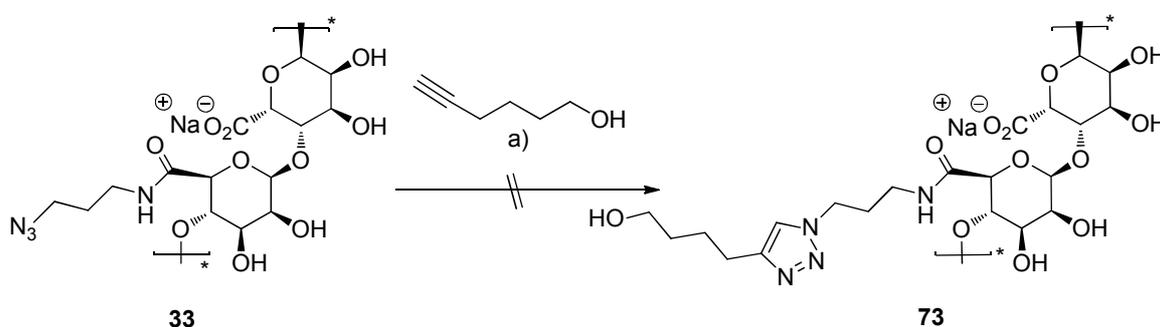
5.8 Weitere kovalente Vernetzungsstrategien

Neben diversen Kondensationsreaktionen,^{38,119} können ebenfalls *Click*-Reaktionen²⁶ für die kovalente Vernetzung von Polymeren und damit zur *in situ* Hydrogelierung genutzt werden. Verschiedene *Click*-Reaktionen wurden sowohl an aromatischen als auch an aliphatischen Makromolekülen realisiert⁶⁸ und auf unterschiedliche Biopolymere übertragen.²⁸ Dextrane und Hyaluronsäuren wurden bereits über Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloadditionen vernetzt.¹¹⁸ Im Falle der Hyaluronsäure wurden die nötigen Alkino- und Azido-Funktionalitäten an der Carbonsäure eingeführt. Daneben gehören Kupfer-freie Alkin-Azid-Cycloadditionen oder Thio-*Click* Varianten zu den etablierten metallfreien Methoden, um peptidische Makromoleküle in Hydrogele zu überführen.¹⁴⁸

¹⁴⁸ C. A. DeForest, E. A. Sims, K. S. Anseth, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 4783–4790.

5.8.1 Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition

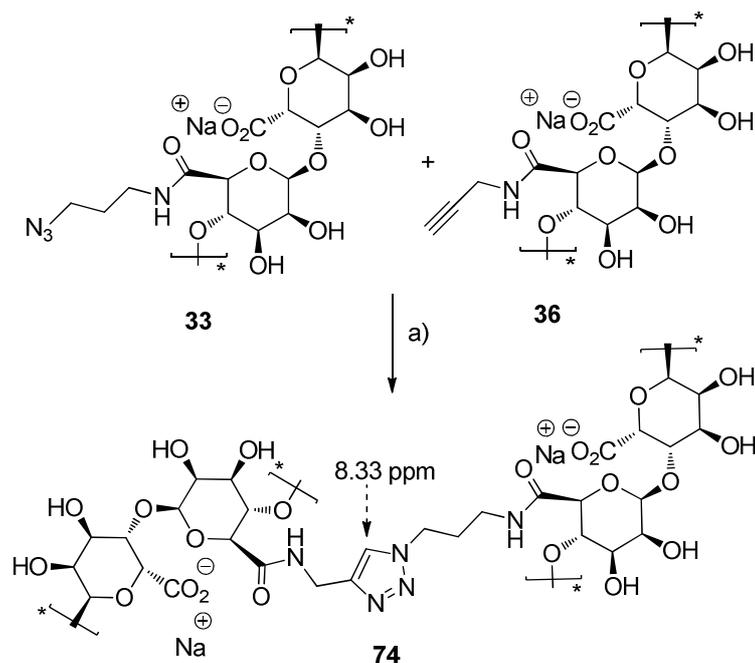
Um eine Kupfer-katalysierte Vernetzung der Alginatstränge zu ermöglichen, sind Alkino- und Azido-funktionalisierte Derivate nötig. Die Einführung der Azido- und Alkino-Funktionalitäten erfolgte analog zu den bereits entwickelten Synthesen (Kapitel 3.2.1.2). Die Reaktionsbedingungen für die Kupfer-vermittelten Cycloadditionen am Alginat wurden zuerst am Beispiel einer Modellreaktion bestimmt. Dazu wurde Azido-Alginat **33** mit 5-Hexyn-1-ol in Wasser unter Zugabe von Kupfer(II)-sulfat umgesetzt. Die benötigte, aktive Kupfer(I)-Spezies wurde *in situ* generiert, indem das Reduktionsmittel Natriumascorbat im Überschuss eingesetzt und die Reaktion in entgastem Lösungsmittel durchgeführt wurde (Schema 26).



Schema 26: Umsetzung von Azido-Alginat **33** mit 5-Hexyn-1-ol; a) CuSO₄*5 H₂O, Natriumascorbat, H₂O, *tert*-Butanol.

Die Bildung des Cycloadditionsprodukts **73** konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Nach Dialyse und Lyophilisation der Alginatlösung, wurde ein blaues, unlösliches Polymer gewonnen.

Die Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die Verknüpfung von Azido-Alginat **33** mit Alkino-Alginat **36** (Schema 27) resultierte ebenfalls in einem blauen, sehr schlecht löslichen Polymer. Auch mehrmalige, intensive Dialyse gegen wässrige EDTA-Lösung und H₂O_{dest.} zur Komplexbildung und Entfernung der Kupfer-Kationen resultierte weder in einer Entfärbung noch in einer verbesserten Löslichkeit der Polymersuspension **74**. Die ¹H-NMR Spektroskopie lieferte aber einen Hinweis, dass die Cycloaddition dennoch erfolgreich verlaufen war. So wurde nach zweitägiger Messzeit ein Signal bei 8.33 ppm detektiert, was auf die Bildung des Triazols hindeutet.



Schema 27: Kupfer-katalysierte Vernetzung von Azido-Alginat **33** mit Alkino-Alginat **36**; a) CuSO₄*5 H₂O, Natriumascorbat, H₂O, *tert*-Butanol.

Die persistente blaue Färbung des Polymers zeigte allerdings, dass sich die zugesetzten Kupfer-Ionen nicht vollständig aus dem Polymer entfernen ließen. Dies könnte zum einen auf eine ionische Wechselwirkung der Kupfer-Kationen mit den Carboxylatgruppen im Alginat zurückzuführen sein. In diesem Fall könnten divalente Kupfer(II)-Ionen, analog zur Calcium induzierten Vernetzung der Polymerstränge (*egg-box* model, Kapitel 1.4.5), auch die Bildung einer Überstruktur vermitteln. Zum anderen wäre die Koordination der Kupfer-Ionen an das π -System der gebildeten Triazole denkbar. Da keine vollständige Entfernung des Metalls möglich war, wurde von einer Metall-katalysierten Vernetzung Abstand genommen. In Hinblick auf eine medizinische Nutzung der Polymere und der toxischen Wirkung der Metalle auf Organismen, wurden im Folgenden Metall-freie Reaktionen zur Modifizierung und/oder Vernetzung der Biopolymere untersucht.

5.8.2 Thiol vermittelte Vernetzungen

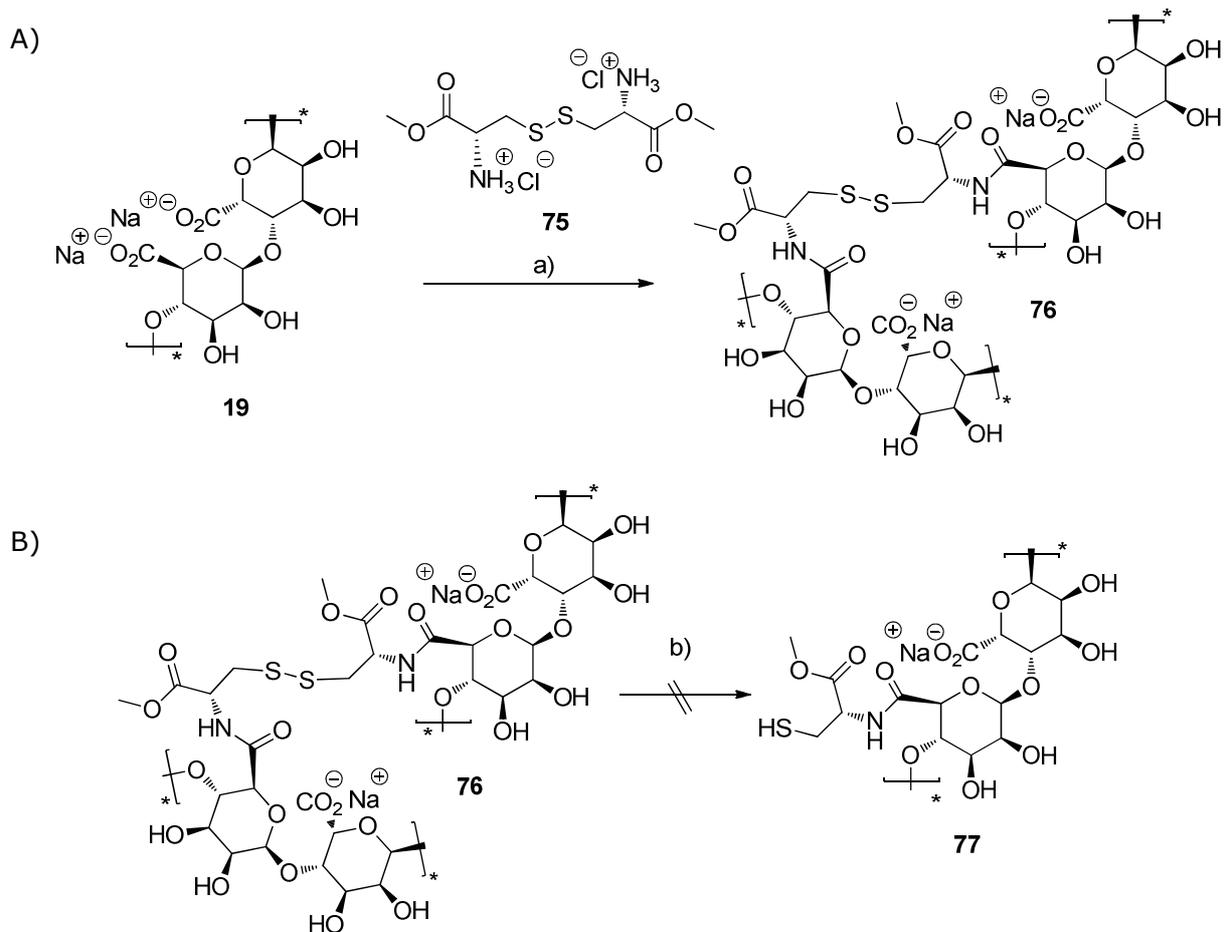
Jüngste Veröffentlichungen von LUTZ *et al.*¹⁴⁹ und BERTOZZI *et al.*⁶¹ zeigten, dass neben der klassischen Azid-Alkin-Cycloaddition weitere Verknüpfungsstrategien zur Ligation oder Vernetzung genutzt werden können. Insbesondere bioorthogonale Verknüpfungen, die in biologischen Systemen nicht mit ihrer Umgebung reagieren, rücken vermehrt ins Interesse.^{61,90} So wurde die Kupplung von Thiolen an elektronenarme olefinische Bindungen, entsprechend einer MICHAEL-Addition, als Thio-Click Reaktion etabliert.⁷³ Auch Disulfide können für biomimetische Konjugationen genutzt werden (Kapitel 1.5.3). In der

¹⁴⁹ J. F. Lutz, H. Schlaad, *Polymer* **2008**, 49, 817-824.

Natur werden Disulfidbrücken unter oxidativen Bedingungen aus freien Thiolen gebildet, während diese unter reduktive Bedingungen wiederum gespalten werden.

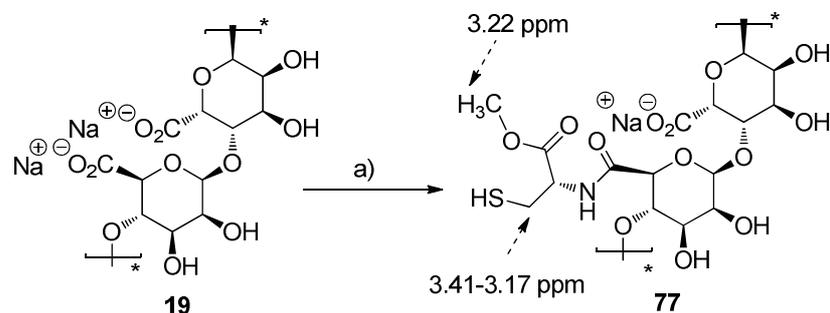
Um die genannten Ligationsstrategien auf das Biopolymer Alginat zu übertragen, sind entsprechend funktionalisierte Derivate nötig. Unabhängig davon, ob im Folgenden die Thio-*Click* Reaktion realisiert oder aber Disulfidbrücken gebildet werden sollen, ist im ersten Schritt die Synthese eines Thiol-modifizierten Alginats nötig wie in *Kapitel 3.2.1.2* beschreiben. Da in diesem Ansatz 2-Amino-ethanthiol **28** eingesetzt wurde, erfolgte die Anbindung jedoch nicht chemoselektiv, was anhand einer Modellreaktion mit Propionsäure bereits gezeigt werden konnte (Schema 11).

Um das Problem des nicht chemoselektiven Angriffes zu umgehen, aber gleichzeitig den biomimetischen Ansprüchen gerecht zu werden, wurde Natrium-Alginat **19** zuerst mit Cystin funktionalisiert. Das erhaltene Konjugat sollte im Folgenden durch Zugabe von 1,4-Dithiothreitol „DTT“ in die freien Thiole gespalten werden. Im ersten Schritt wurde Cystindimethylester-Hydrochlorid **75** an Alginat **19** gebunden. Auf Grund der doppelten Funktionalität von **75** und der daraus resultierenden Gefahr der Vernetzung wurde ein unlösliches Polymer **76** erhalten (Schema 28 A). Versuche, die Polymersuspension anschließend durch Zugabe von DTT wieder in Lösung zu bringen, scheiterten (Schema 28 B). Die starke Knäulung der Polymere verhinderte wahrscheinlich die Reduktion der Disulfide und somit eine verbesserte Löslichkeit von **76** in wässrigen Solventien.



Schema 28: A) Anknüpfung des Cystins **75** an Natrium-Alginat **19** und B) Spaltung des Disulfids **76** in die freien Thiole **77**; a) DIPEA, EDC, HOBT, H₂O; b) DTT, H₂O.

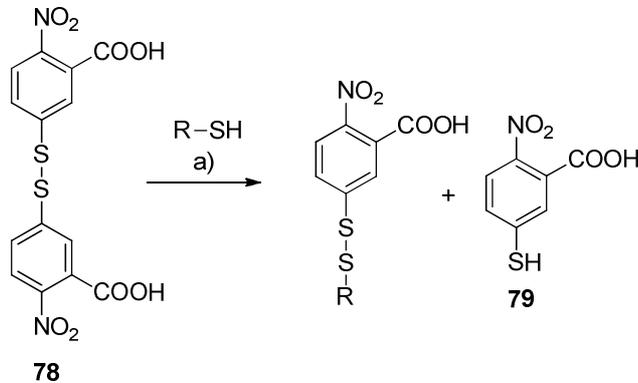
Auf Grund dieser Resultate wurde die Anknüpfung des Cystinmethylesters **75** mit anschließender Spaltung der Disulfide als Eintopfvariante durchgeführt (Schema 29). Sie lieferte schließlich das Thiol-modifizierte Alginat **77**.



Schema 29: Synthese des Thiol-modifizierten Alginats **77**; a) DIPEA, EDC, HOBT, DTT, H₂O, **75**.

Der Nachweis der freien Thiole erfolgte neben der ¹H-NMR Spektroskopie (3.22 ppm, 3.41-3.17 ppm) auch durch Färbung der wässrigen Polymerlösung mit 5,5'-Dithiobis-2-

nitrobenzoesäure **78** (ELLMANS Reagenz, DTNB).¹⁵⁰ In Gegenwart freier Thiole wird DTNB gespalten, so dass 5-Thio-2-nitrobenzoesäure **79** entsteht, welche eine gelbliche Färbung aufweist (Schema 30).



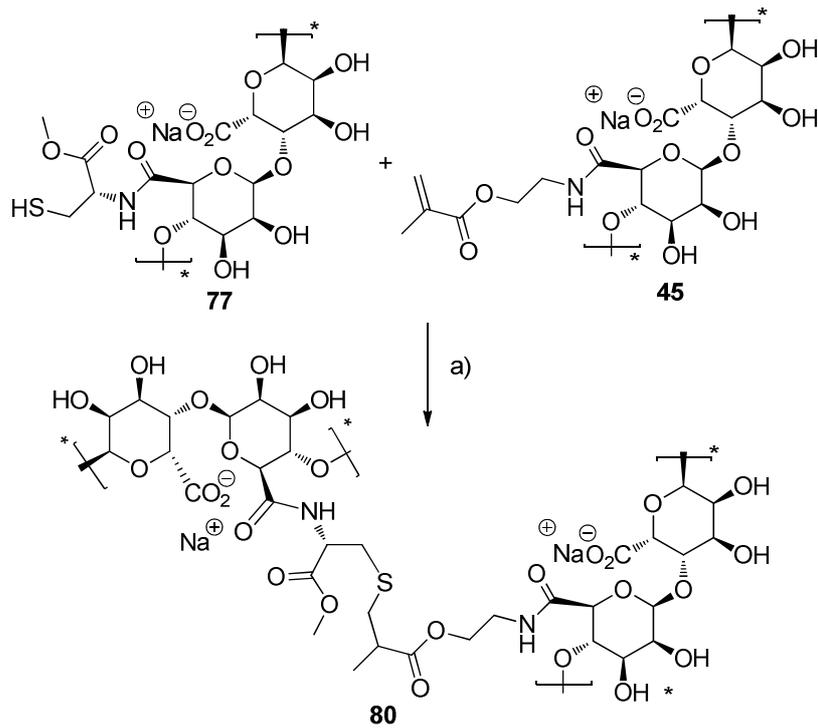
Schema 30: Reaktionsmechanismus von ELLMAN´s Reagenz **78**; a) H_2O , Phosphatpuffer pH= 8.0.

In Gegenwart von Luftsauerstoff flockten die Thiol-modifizierten Alginat **77** nach kurzer Zeit in wässriger Lösung wieder aus, was sich durch die Oxidation der Thiole in die korrespondierenden Disulfide erklären lässt. Das Gleichgewicht zwischen **77** und **76** konnte dennoch über den pH-Wert eingestellt werden. So lag dieses in leicht saurem Milieu (pH ~ 4) auf Seite der gut löslichen, freien Thiole **77**, während im alkalischen Milieu (pH ~ 8) vermehrt die schwer löslichen Disulfide **76** gebildet wurden. Über einen längeren Zeitraum konnte das Thiol-modifizierte Alginat **77** aber nur in Gegenwart reduzierender Reagenzien, wie DTT oder Mercaptoethanol, in Lösung gehalten werden. Die Bildung von Hydrogelen in Folge der Bildung von Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Alginatketten wurde jedoch nicht erreicht.

Wie bereits erwähnt können ebenfalls Thio-Click Reaktionen zur Vernetzung oder Konjugation eingesetzt werden (Kapitel 1.5.3). Einen sehr eleganten Ansatz publizierten DEFOREST *et al.*,^{77,78} die zeigten, dass radikalisch katalysierte Thio-Click Reaktionen zum Aufbau hochstrukturierter Hydrogele genutzt werden können.

Die nicht radikalische Thio-Click Variante bedient sich der MICHAEL-Addition eines Thiol-Reaktanden mit einem elektronenarmen Olefin. Typische MICHAEL-Systeme sind α,β -ungesättigte Ester oder andere Carbonylverbindungen, welche häufig als Strukturelemente in nativen Molekülen auftreten. Als passendes MICHAEL-System zur Ligation mit **77** wurde das bereits synthetisierte methacrylische Alginat **45** verwendet (Kapitel 4.1). Die Thio-Click Reaktion zur Hydrogelierung wurde durch das Mischen von **45** mit **77** im wässrigen System untersucht (Schema 31).

¹⁵⁰ G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70–77.



Schema 31: Vernetzung des Alginats durch MICHAEL-Additionen zwischen Thiol- **77** und methacrylisch funktionalisiertem Alginat **45**; a) H₂O, Phosphat-Puffer pH= 7.2.

Analog zur *in situ* Gelierung über die Hydrazonbildung (Kapitel 5.6) konnten auch Alginat-Hydrogele über den Thio-Click Ansatz erzeugt werden. Das Mischen der in Wasser gelösten Komponenten **45** und **77** (je 2% w/v) bei Raumtemperatur erzeugte zunächst stabile Hydrogele **80**. Über einen längeren Zeitraum quollen diese jedoch sehr stark auf. Die mechanische Stabilität der Hydrogele **80** war zu gering, um die ursprüngliche Form zu bewahren. Ferner musste die Disulfidbildung durch Zugabe von reduktiven Reagenzien unterdrückt werden, was jedoch gleichzeitig den Ablauf der MICHEAL-Addition inhibierte. Für mögliche Anwendungen im Bereich des *tissue engineering*s konnten diese Gele somit nicht verwendet werden. Dennoch wurde die Machbarkeit der Thio-Click Reaktion als Verknüpfungsstrategie am Alginat erstmals realisiert.

6 Polymer-Peptid Biokonjugate: Bioorthogonale Ligation zur Herstellung bioaktiver Hydrogele

Die Konjugation bioaktiver Verbindungen wie Aminosäuren, Peptide oder Proteine an Biopolymere (Alginat, Hyaluronsäure usw.) liefert Biokonjugate, die aktuell intensiv beforscht werden.⁶⁰ Biokonjugate vereinen die positiven Eigenschaften der einzelnen Komponenten, während die individuellen, nachteiligen Eigenschaften idealerweise kompensiert werden. Proteine oder Peptide verleihen dem Konjugat dabei zumeist Biofunktionalität, während die Polymere Stabilität, Löslichkeit, Biokompatibilität und mechanische sowie physikalische Vorteile gewährleisten.

In *Kapitel 1.5* wurden bereits verschiedene Ansätze zum Aufbau diverser Konjugatarchitekturen beschrieben. Die Variationsbreite der Ligationsmethoden nimmt dabei stetig zu. Allein über die Azido-Funktionalität sind eine ganze Reihe spezifischer Ligationen möglich.¹⁵¹ Diese Vielfalt ermöglicht es, Konjugationsreaktionen orthogonal durchzuführen und damit komplexe Konjugatarchitekturen zu synthetisieren.⁸³ Zwei Schlagwörter spielen in diesem Bereich eine besondere Rolle: Dies sind zum einen Metallfreie Reaktionen,⁶⁹ welche insbesondere in der chemischen Biologie einen übergeordneten Rang einnehmen und zum anderen bioorthogonale Ligationen.⁶⁷ Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass die beteiligten Funktionalitäten chemoselektiv miteinander reagieren, wobei sie gleichzeitig inert für die biologische Umgebung sind. Dies trifft vor allem auf funktionelle Gruppen zu, die selten oder gar nicht in nativen Systemen vorhanden sind.

6.1 Ligation cyclischer RGD-Peptide

Im Folgenden werden Untersuchungen zur *in situ* Gelierung von Alginat beschrieben (Kapitel 5.6), wobei zusätzlich bioaktive Molekülen eingeführt werden. Dabei sollte die gewählte Ligationsmethodik einen effektiven Zugang zu intelligenten Biomatrices¹⁵² ermöglichen. Als wichtiges, bioaktives Molekül wurde das cyclische RGD-Pentapeptid gewählt (Kapitel 1.6). Die RGD-Sequenz dient als Erkennungsfaktor für den Dockingprozess der Zellintegrine, so dass Zellen auf RGD-dekorierten Oberflächen anhaften können. Bislang konnte die Adhäsion von Cardiomyocyten an die entwickelten Gele nur durch Zugabe von Collagen oder Gelatine erreicht werden (Kapitel 4.5 und 5.6.2). Für die Kultivierung humaner Zellen ist die Zugabe tierisch gewonnener Substanzen, wie Collagen oder Gelatine, jedoch kaum möglich (Kapitel 4.5). Aus diesem Grund sollte das cyclische RGD-Pentapeptid **81** die Zelladhäsion induzieren. Um das

¹⁵¹ M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168–1184.

¹⁵² P. Lazarovici, M. Li, A. Perets, M. J. Mondrinos, S. Lecht, C. D. Koharski, P. R. Bidez III, C. M. Finck, P. I. Lelkes, *Intelligent Biomatrices and Engineered Tissue Constructs in Drug Testing in vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology* by U. Marx, V. Sandig (Ed.), WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.

cyclische RGD in das Hydrogel-System zu implementieren, musste entweder die Aldehydo- oder die Hydrazido-Komponente der Biopolymere mit dem Peptid versehen werden. Daher musste eine Synthesestrategie entwickelt werden, die es erlaubte, sowohl das Peptid als auch die nötigen Aldehydo- bzw. die Hydrazido-Funktionalitäten einzuführen. Im Folgenden wurden verschiedene Ligationmethoden untersucht, die kompatibel mit dem Einbau der Aldehyde bzw. Hydrazide in den Alginatsträngen sein sollten. Das RGD-Pentapeptid stand in Form zweier unterschiedlicher Derivate zur Verfügung. In einem war die Lysineinheit „K“ mit einem primären Amin **81**, in einem weiteren mit einem Azid **82** versehen (Abb. 41).¹⁵³

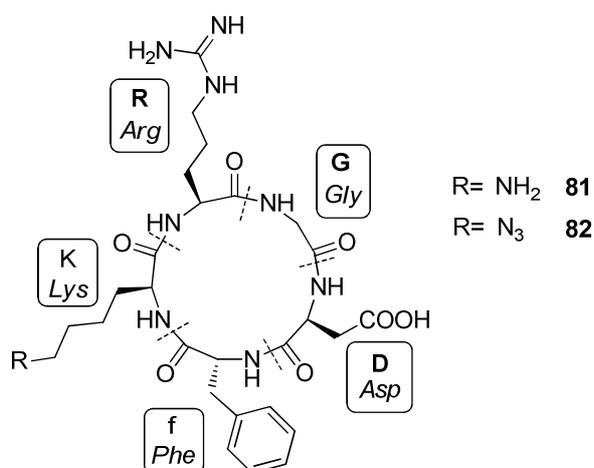


Abb. 41: Struktureller Aufbau der von PALEČEK *et al.* synthetisierten Amino- **81** wie auch Azido-Derivate **82** des cyclischen RGDfK-Pentapeptids.¹⁵³

Entsprechend bisheriger Veröffentlichungen sind für ein durch die RGD-Sequenz induziertes Integriredocking nur geringe Konzentrationen des Peptides nötig. Diese liegen im Vergleich zu den gelierenden Polysaccharid-Komponenten in mikro- bzw. nanomolaren Anteilen vor.^{86,154} Zur Anbindung von Peptiden an Urnsäure-basierte Polymere, wie z.B. Alginat, werden weitläufig klassische Kupplungsreagenzien zur Amidierung eingesetzt. Die Konjugation von cyclischem RGD an die Carbonsäure des Alginats erfolgte nach Rowley *et al.* mittels EDC-HCl und NHS (Kapitel 3.2.1.2, Schema 13).¹⁰³ Diverse Alginat-Oligopeptid-Konjugate sind seit einiger Zeit auch kommerziell erhältlich.¹⁵⁵ Diese werden ebenfalls über Aktivesterintermediate erhalten. Die unerwünschten Effekte, die der Einsatz von Kupplungsreagenzien mit sich bringt, wurde in den *Kapiteln 1.4* und *3.2.1.2* diskutiert. In den folgenden Kapiteln werden daher verschiedene Möglichkeiten präsentiert, sowohl das Amino- **81** als auch das Azidoderivat **82** des cyclischen

¹⁵³ J. Paleček, G. Dräger, A. Kirschning, *Synthesis* **2011**, *4*, 653-661.

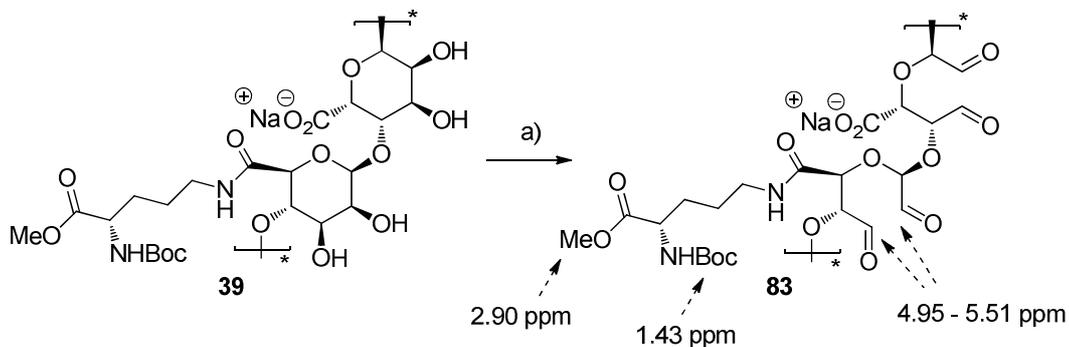
¹⁵⁴ S. J. Bidarra, C. C. Barrias, M. A. Barbosa, R. Soares, P. L. Granja, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1956-1964.

¹⁵⁵ www.novamatrix.biz/Technology/Alginat/NOVATACHPeptide.aspx (Stand 20.03.2012).

Pentapeptids an das Polysaccharid Alginat zu ligieren, ohne dabei Kupplungsreagenzien zu verwenden.

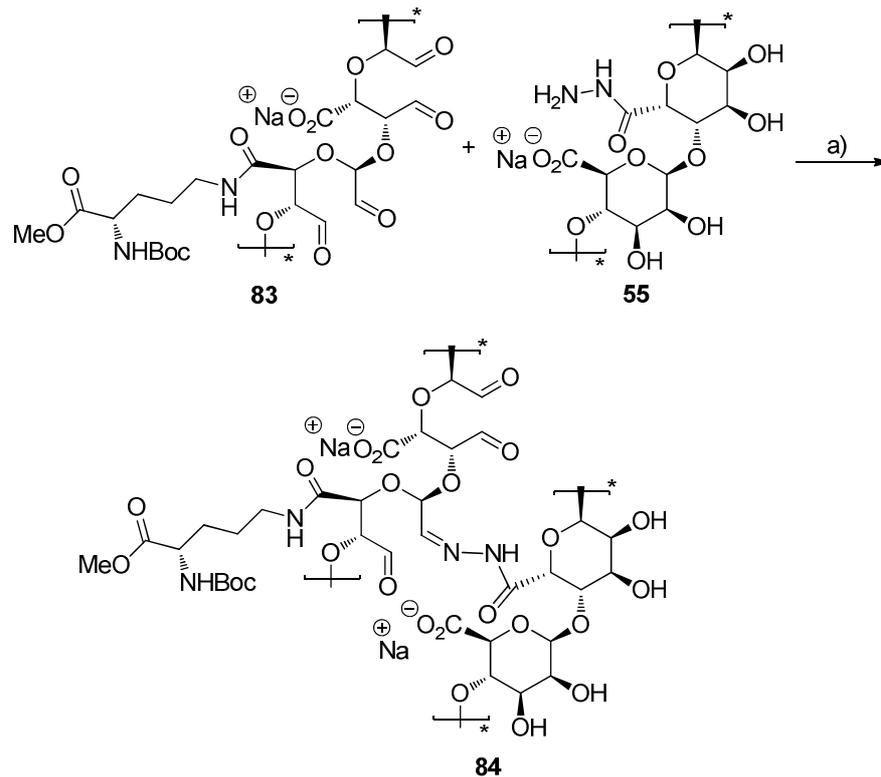
6.2 Hydrogele aus Amid ligierten Alginat-Lysin Biokonjugaten

Trotz der Nachteile einer Aktivester-vermittelten Konjugation, wurde in ersten Untersuchungen diese Strategie mit der Aminosäure Lysin erprobt; insbesondere die Vereinbarkeit des Ligations- mit dem Gelierungsschritt standen dabei im Zentrum des Interesses. Die Einführung des Lysins erfolgte an der Aldehydo-Komponente im Alginat, da für die Hydrazido-Komponente keine entsprechende Möglichkeit zur Amid-Konjugation bekannt ist. Die Präparation des mit dem *N*-Boc-Lysinmethylester dekorierten Alginats **39** erfolgte unter den bereits entwickelten Bedingungen (Kapitel 3.2.1.2). Anschließend wurde **39** mit Natriumperiodat in das Lysin-dekorierte Aldehydo-Alginat **83** überführt (Schema 32).



Schema 32: Oxidation des Lysin-dekorierten Alginats **39** zu der Aldehydo-Komponente **83**; a) H₂O, NaIO₄.

Die Einführung der Aldehyde in das dekorierte Alginat **83** verlief ohne Zersetzung des Konjugats, wobei die Oxidation quantitativ in Bezug auf die eingesetzte Menge von Periodat erfolgte (vgl. Kapitel 5.1). Die Identifizierung von **83** wurde anhand charakteristischer ¹H-NMR Signale erreicht.

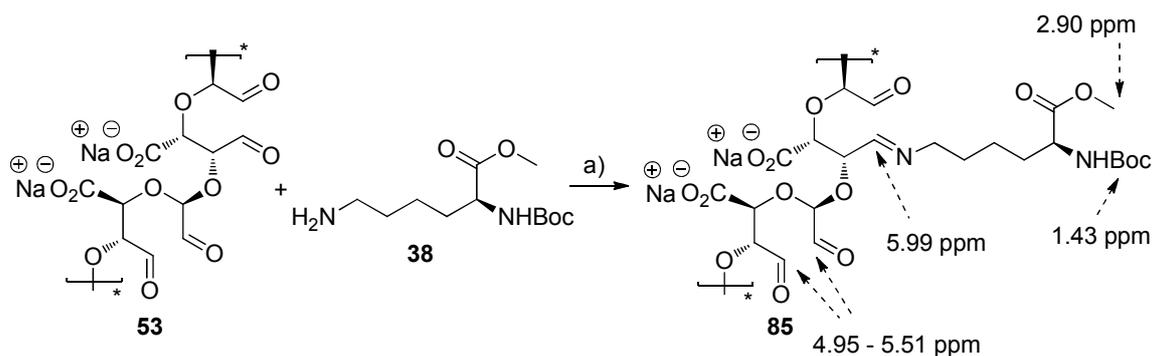


Schema 33: Herstellung des Amid-gebundenen Lysin dekorierten *in situ* hergestellten Alginate-Hydrogels **84**; a) H₂O.

Anschließend wurde der Lysin-dekorierte Aldehyd **83** unter Zugabe von Hydrazido-Alginat **55** in wässriger Lösung hydrogeliert (Schema 33). Die Gelierung erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren (Kapitel 5.3.1). Somit konnten stabile Lysin-dekorierte Hydrogele **84** über diese Ligationsvariante erfolgreich generiert werden.

6.3 Imin ligierte Alginate-Peptid Biokonjugate

Zunächst wurde die Imin-Bindung als Ligationsstrategie am Beispiel einfacher Aminosäuren etabliert. Als Modellsubstanz wurde das am *N*- und *C*-Terminus geschützte Lysinderivat **38** eingesetzt, um der späteren Ligation des RGD-Peptides **81** möglichst nahe zu sein. Die Verknüpfungsstrategie über eine Imin-Bildung erlaubt es, Aldehydo-Alginat **53** ohne weitere Modifizierungen einzusetzen. Außerdem werden keinerlei Additive oder Aktivierungsreagenzien benötigt. Die Verwendung der Aldehydo-Funktionalität für die Ligation senkt allerdings die Anzahl verbleibender Funktionalitäten für die spätere Gelierung. Im Falle der später eingesetzten RGD-Peptide werden jedoch nur kleine Anteile der Aldehydo-Funktion benötigt, so dass der folgende Gelierungsprozess nicht eingeschränkt werden sollte. In einem ersten Ansatz wurde der kommerziell verfügbare *N*-Boc-L-Lysinmethylester **38** mit Aldehydo-Alginat **53** in H₂O_{dest.} umgesetzt (Schema 34).



Schema 34: Lysin-dekoriertes Aldehydo-Alginat **85** konjugiert über die Iminbindung; a) H₂O.

Die erfolgreiche Anbindung des *N*-Boc-Lysinmethylesters **38** an das oxidierte Polymer **53** konnte ¹H-NMR spektroskopisch nachgewiesen werden. Desweiteren zeigte das Lysin-dekorierte Alginat **85** eine deutliche Rotfärbung. Diese Färbung hellte jedoch während des Dialyseprozesses gegen destilliertes Wasser mit der Zeit wieder auf. Dieses ist ein charakteristischer Hinweis darauf, dass die gebildeten Imine der Hydrolyse unterliegen. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Konjugation des Fluorophors Lucifer-Gelb, welches ebenfalls über Imine angeknüpft wurde, nachgewiesen werden.⁸⁹ Mit Blick auf die spätere Ligation der cyclischen RGD-Peptide gilt es, diese hydrolytische Spaltung zu unterbinden, weshalb im Folgenden die Reduktion des Imins untersucht wurde.

6.3.1 Problematik der Iminbindung für die RGD-Ligation

Um die Hydrolyse der Iminbindung zu inhibieren, wurde die selektive Reduktion zum korrespondierenden sekundären Amin verfolgt. Denn eine Hydrolyse im Nährmedium könnte ungewünschte Nebeneffekte haben:

- RGD-Moleküle in Lösung würden kompetitiv an die Integrine der Zellen binden, sie wären im Vergleich zu makromolekular gebundenen Peptiden sogar wesentlich beweglicher und würden schneller an die Integrine andocken (Abb. 42 A).
- Die Integrin-Bindungsdomänen würden abgesättigt und ein Anheften an das eigentlich dafür vorgesehene *scaffold* wäre nicht mehr möglich (Abb. 42 B).
- Da nicht kovalente Erkennungsprozesse reversibel ablaufen, könnten in Lösung befindliche Peptide zudem das Ablösen bereits gedockter Integrine bewirken (Abb. 42 C), was wiederum ein temporäres Ablösen der Zellen vom Biomaterial, Polymer oder vom Gel zur Folge hätte.

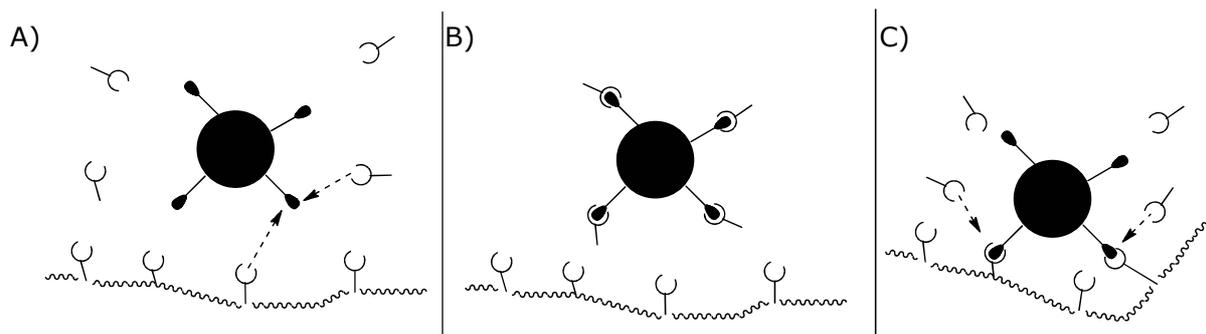
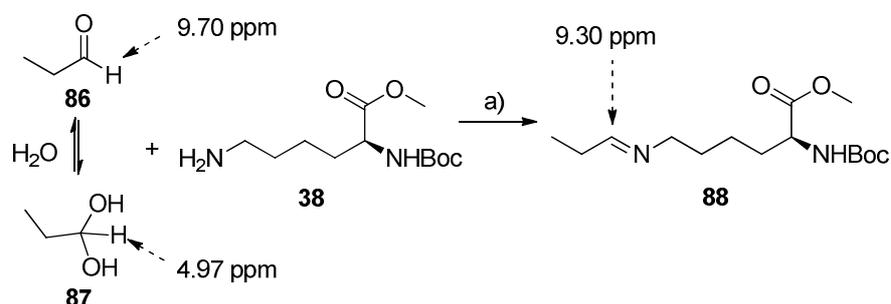


Abb. 42: Varianten des kompetitiven *Dockings* zwischen gebundenen und ungebundenen RGD-Peptiden (offene Halbkreise) an die Integrine der äußeren Zellmembran (dunkle Ellipsen).

Aus diesen Gründen ist die quantitative Reduktion der primär gebildeten Imine in die korrespondierenden Amine anzustreben.

6.3.1.1 Modellreaktion: Nachweis der Iminbildung

Für die Iminbildung wurde die Reaktion von Propionaldehyd **86** und dem *N*-Boc-Lysin **38** als Modellreaktion untersucht (Schema 35). Zudem wurde das vorgelagerte Gleichgewicht des Aldehyds **86/87** in wässriger Lösung betrachtet.



Schema 35: Gleichgewicht des Aldehyds **86** mit seinem Hydrat **87** in wässriger Lösung und Konjugation mit *N*-Boc-Lysin **38** zum korrespondierenden Imin **88**; a) H_2O .

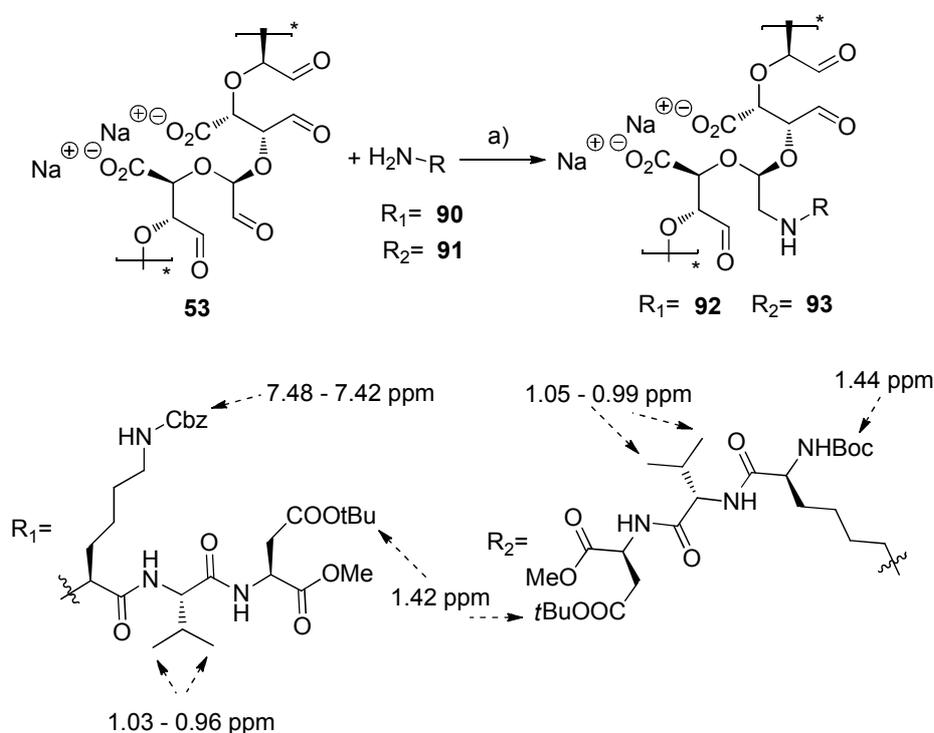
Die ^1H -NMR spektroskopische Analyse zeigte erstens, dass Propanal in Wasser in einem 1:1 Gemisch aus Aldehyd-Hydrat **87** und dem freien Aldehyd **86** vorliegt. Zweitens konnte die Bildung des Imins **88** durch Detektion des Imin-Protons verifiziert werden. Insgesamt lag in der Lösung ein Gemisch aus vier unterschiedlichen Verbindungen in nahezu gleichen Anteilen vor: Neben dem freien Aldehyd **86** und dem Aldehyd-Hydrat **87** konnten das Lysinderivat **38** und das Imin-Konjugat **88** detektiert werden.

6.3.3 Konjugation des Tripeptids Asp-Val-Lys an Aldehydo-Alginat mit nachfolgender Reduktion

Die Konjugation großer, unpolarer Verbindungen mit Alginat hat eine verringerte Löslichkeit des Polysaccharides in Wasser zur Folge. Deshalb wurde vor der anvisierten

Ligation des RGD-Peptids die tripeptidische Sequenz Asp-Val-Lys **90/91** als weitere Modellsubstanz eingesetzt. Die selektive Schützung der Lysin-Einheit am *N*-Terminus bzw. am ϵ -Amin lieferte den Zugang zu den beiden Derivaten **90** und **91**.

Unter den etablierten Bedingungen wurden die Tripeptide **90** und **91** mit Aldehydo-Alginat **53** umgesetzt, wobei die beiden Reaktionsansätze durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid *in situ* reduziert wurden (Schema 36). Die Wahl des milden Reduktionsmittels Na(CN)BH₃ erlaubt die selektive Reduktion des intermediär gebildeten Imins. Gleichzeitig müssen die verbliebenen Aldehydo-Gruppen in den Imin-dekorierten Aldehydo-Alginate **92** bzw. **93** für die folgende Hydrazon-Gelierung erhalten bleiben. Deshalb sind starke Reduktionsmittel wie LiAlH₄, NaBH₄ usw. hier ungeeignet.



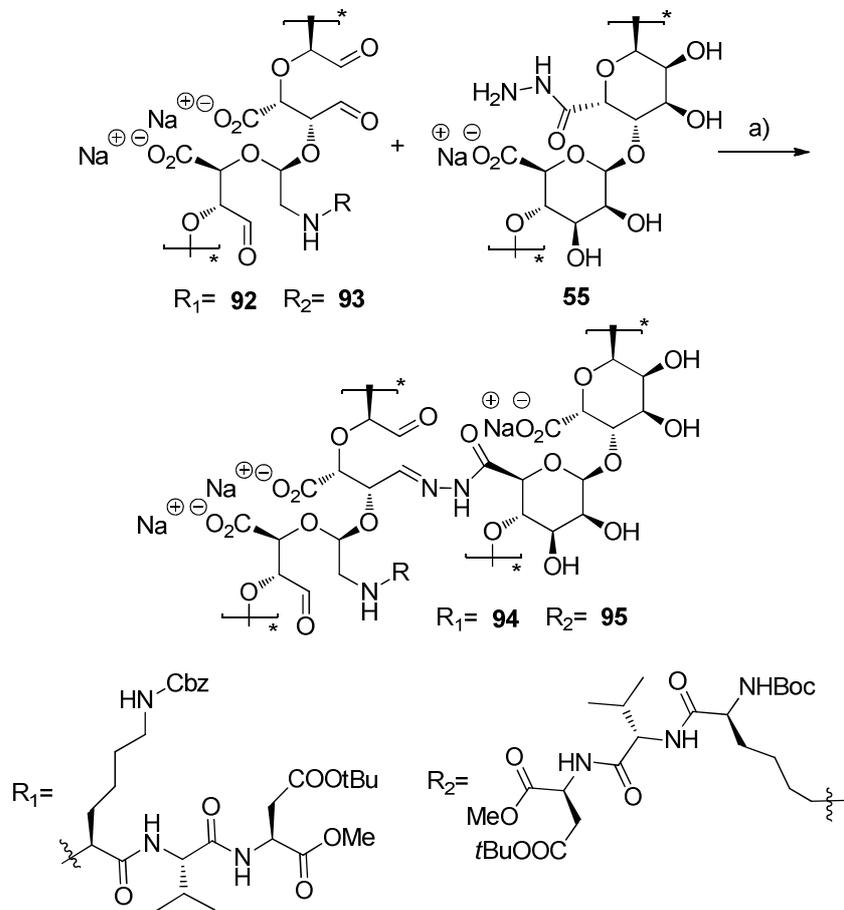
Schema 36: Umsetzung des α -Amino- **90** und ϵ -Amino- **91** Derivats der tripeptidischen Sequenz Asp-Val-Lys mit Aldehydo-Alginat **53** und anschließender Reduktion; a) H₂O, Na(CN)BH₃.

Die ¹H-NMR spektroskopische Analyse zeigte, dass die Kupplungen der Tripeptide **90** und **91** an das Aldehydo-Alginat **53** erfolgreich verliefen. Ob die Konjugate **92** und **93** in Form der Imine oder der sekundären Amine vorlagen, konnte nicht geklärt werden. Sowohl das Imin-Signal, als auch das des sekundären Amins, konnten auf Grund der stark verbreiterten Signalsätze der ¹H-NMR Spektren nicht eindeutig detektiert werden.

Im nachfolgenden Schritt wurden die mit dem Tripeptid dekorierten Aldehydo-Alginate **92** bzw. **93** unter Zugabe von Hydrazido-Alginat **55** in wässriger Lösung in stabile Hydrogele überführt (Schema 37). Die Herstellung der Gele **94** und **95** erfolgte nach dem bereits beschriebenen Verfahren innerhalb kurzer Reaktionszeiten bei Raumtemperatur (Kapitel 5.3.1). Die Präparation *in situ* gelierender, Peptid-dekorierter

Polymer-Peptid Biokonjugate: bioorthogonale Ligation

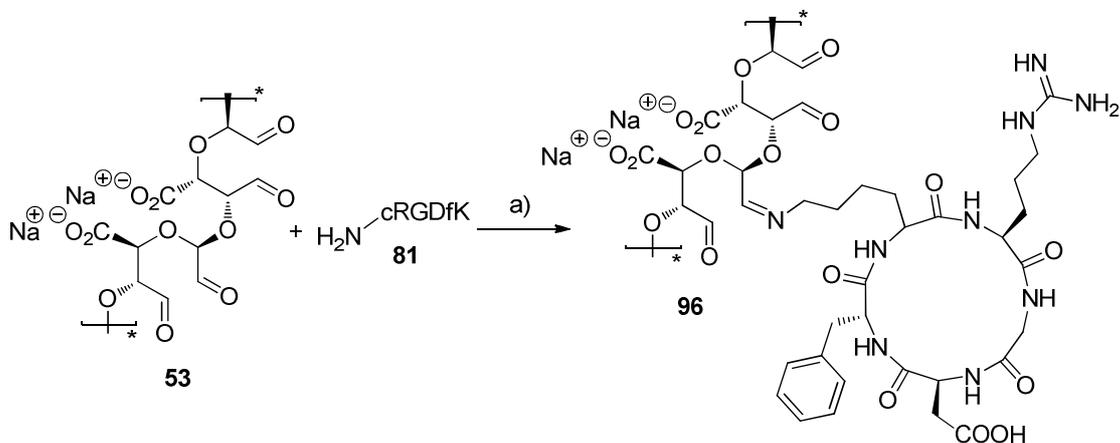
Alginate-Hydrogele konnte somit erfolgreich verifiziert werden, so dass im nächsten Schritt die Ligation des bioaktiven RGD-Peptids **81** verfolgt wurde.



Schema 37: Herstellung der Tripeptid dekorierten Alginate-Hydrogele **94** und **95**; a) H₂O.

6.3.4 Konjugation des cyclischen RGDfK-Pentapeptids an Aldehydo-Alginate

Analog zur Ligation der tripeptidischen Sequenz Lys-Asp-Val wurde das Aminoderivat des cyclischen RGD-Peptids **81** via Iminbindung an Aldehydo-Alginate **53** konjugiert (Schema 38).



Schema 38: Konjugation des Amino-cRGDs **81** an Aldehydo-Alginate **53** via Imin-Bildung; a) H₂O.

Nach Fällung, Dialyse und Lyophilisation des Polymers konnte das RGD-modifizierte Aldehydo-Alginat **96** gewonnen werden. Auf Grund der nicht reproduzierbaren Umsetzung mit $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ wurde auf den Reduktionsschritt verzichtet. Eine erschöpfende Dialyse sollte das vollständige Entfernen nicht gebundener RGD-Moleküle erreichen. Als *proof of principle* dieser Methode wurde einmalig Aldehydo-Alginat **53** mit einem sehr hohen Anteil an RGD **81** dekoriert. So sollte der Nachweis der erfolgreichen Konjugation per NMR-Spektroskopie belegt werden.

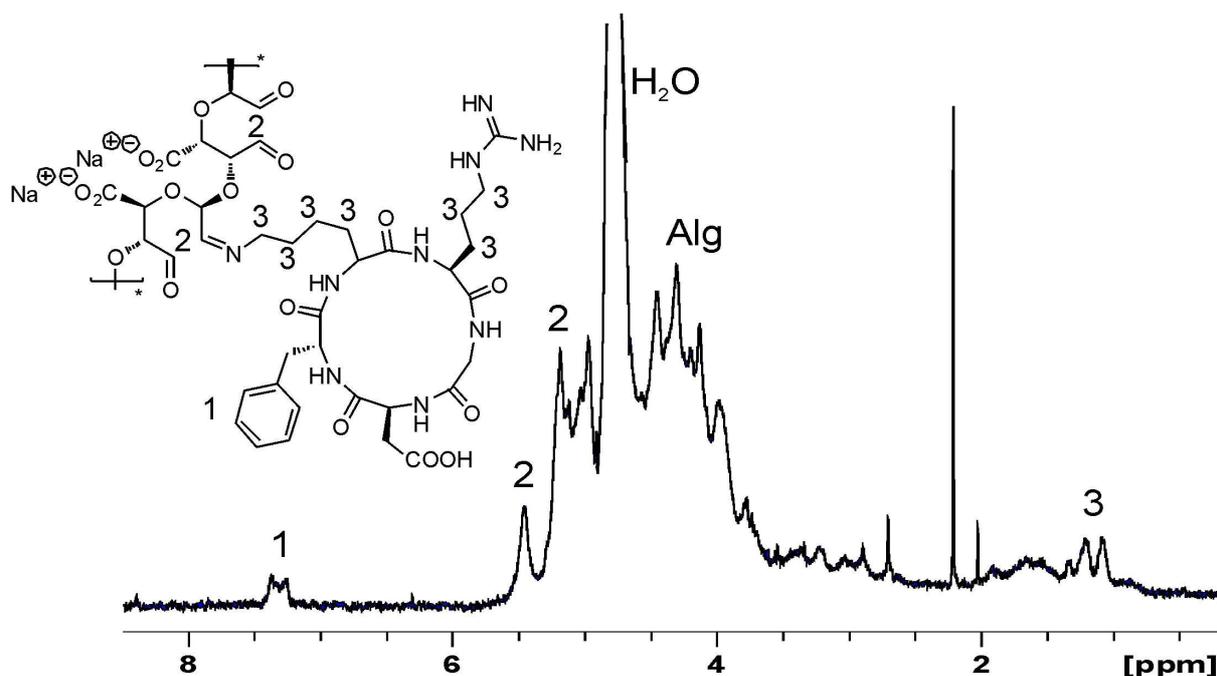
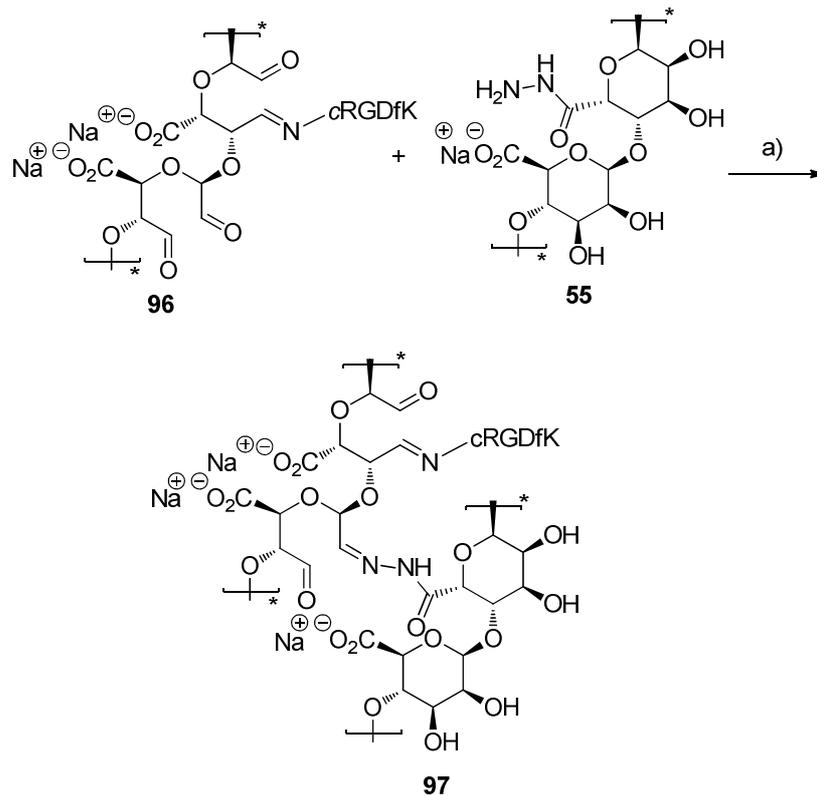


Abb. 43: ^1H -NMR Spektrum des Imin-gebundenen cRGD-Alginat-Aldehyd Konjugats **96** in D_2O .

Abb. 43 zeigt das ^1H -NMR Spektrum nach der erfolgreichen Synthese des cRGD Aldehydo-Alginats **96**. Die Anwesenheit von Phenylalanin wird durch die aromatischen Protonensignale bei $\delta=7.40$ ppm belegt, während Signale im Bereich von $\delta= 5.00$ - 5.50 ppm charakteristisch für Hydrate von Aldehyden sind. Die Signale zwischen $\delta= 3.80$ - 4.80 ppm zeigen das Alginatrückgrat, diejenigen zwischen $\delta= 1.11$ - 1.70 ppm sind den Methylengruppen der Lysin- und Arginin-Einheiten zuzuordnen. Alle weiteren RGD-dekorierten Aldehydo-Alginats **96** und die aus diesen generierten Hydrogele besaßen eine Belegung außerhalb des Empfindlichkeitsbereiches des NMR-Spektrometers.

6.3.5 Herstellung von cRGD dekorierten Alginat-Hydrogelen

Das Mischen der RGD-dekorierten Aldehydo-Alginats **96** mit äquimolaren Mengen von Hydrazido-Alginat **55** in wässriger Lösung resultierte in der Hydrogel-Bildung (Schema 39). Die Gelierung erfolgte durch Bildung der Hydrazone **97** zwischen den Hydraziden des Alginats **55** und den Aldehydo-Funktionen des cRGD-modifizierten Alginats **96**.



Schema 39: Herstellung von cRGD-dekorierten Alginat-Hydrogelen **97** via Imin-Ligation; a) H₂O.

Auf diesem Wege konnten erstmals Imin-ligierte, cRGD-dekorierte Alginat-Hydrogele hergestellt werden. Die bereits etablierte Methode der *in situ* Gelierung (Kapitel 5.3) erlaubte es, die biofunktionellen Hydrogele für ihre Anwendung im *tissue engineering* zu untersuchen. Dafür war es wichtig, dass sich die Hydrogelierung in destilliertem Wasser, isotonischer Kochsalzlösung sowie im Nährmedium DMEM durchführen ließ. Biologische Studien mit lebenden Zellen in *in vitro* Kulturen erfolgten an der Medizinischen Hochschule Hannover.

6.3.6 Biologische Evaluierung von Imin-ligierten cRGD-Alginat-Hydrogelen

Die biologischen Studien sollten zeigen, dass die Inkorporation der cRGD-Einheiten eine Zelladhäsion in den Hydrogelen auslöst und damit auf Collagen oder andere tierische Proteine für das myokardiale *tissue engineering* verzichtet werden kann (Kapitel 5.6.2.3). Die Tests wurden im LBAO „Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe“ von J. DAHLMANN in der Arbeitsgruppe GRUH durchgeführt. Die Präparation der zellbeladenen Hydrogele erfolgte analog zu den bereits entwickelten Protokollen (Kapitel 5.6.2).

Die Kultivierung der aus neonatalen Rattenherzen gewonnenen Zellmischungen in den *in situ* gelierten RGD-dekorierten Alginat-Hydrogelen führte aber nicht zur Bildung komplexen Herzmuskelgewebes. Die nicht erfolgte Gewebbildung war jedoch nicht zwangsläufig auf ein Ausbleiben der Zelladhäsion zurückzuführen. Vielmehr schien es den

Zellen nicht möglich zu sein, innerhalb des Gels zu migrieren. Das bloße Anhaften der Cardiomyocyten reicht nicht aus, um eine elektronische Kopplung zu ermöglichen und somit ein funktionelles Synzytium zu bilden.

Da im drei-dimensionalen Hydrogel keine Zelladhäsion nachgewiesen werden konnte, wurde die Kultivierung der Zellen im zwei-dimensionalen System untersucht. Bei diesem Verfahren wurden die cRGD-dekorierten Alginat-Hydrogele **97** zuerst präpariert und anschließend Zellen auf den Geloberflächen ausgesiedelt. Die erhaltenen Resultate der kultivierten Zellmischungen aus Fibroblasten und Cardiomyocyten zeigt Abb. 44. Zur Quantifizierung der Zelladhäsion wurden Gele **97** mit unterschiedlichen Peptid-Belegungsgraden hergestellt. Die in Abb. 44 angegebenen Verhältnisse der RGD-Peptide in den Hydrogelen basieren auf den maximal möglichen Belegungsgraden. Für die Berechnung wurde von vollständigen Umsätzen bei der Iminbildung ausgegangen.

Die Zellfärbungen erfolgten nach dreitägiger Kultivierung mit drei verschiedenen Immunfluoreszenzfarbstoffen. Fibroblasten wurden grün durch Proylhydroxylase 4 (rPH4), Cardiomyocyten wurden rot durch Titin-Antikörper und Zellkerne wurden blau durch DAPI markiert.

Es zeigte sich deutlich, dass im Falle des *Blanks* (Hydrogel **56**) die Zellen abgekugelt vorlagen, was bedeutete, dass diese nicht auf dem Material anhafteten. War es den Zellen hingegen möglich an passenden Erkennungsdomänen anzudocken, bildeten sich Adhäsionspunkte aus und die Zellen gingen in eine gestreckte Form über. Mit steigendem Anteil an cyclischem RGD in den Gelen konnten schließlich vermehrt lang gestreckte, adhärenente Zellen beobachtet werden.

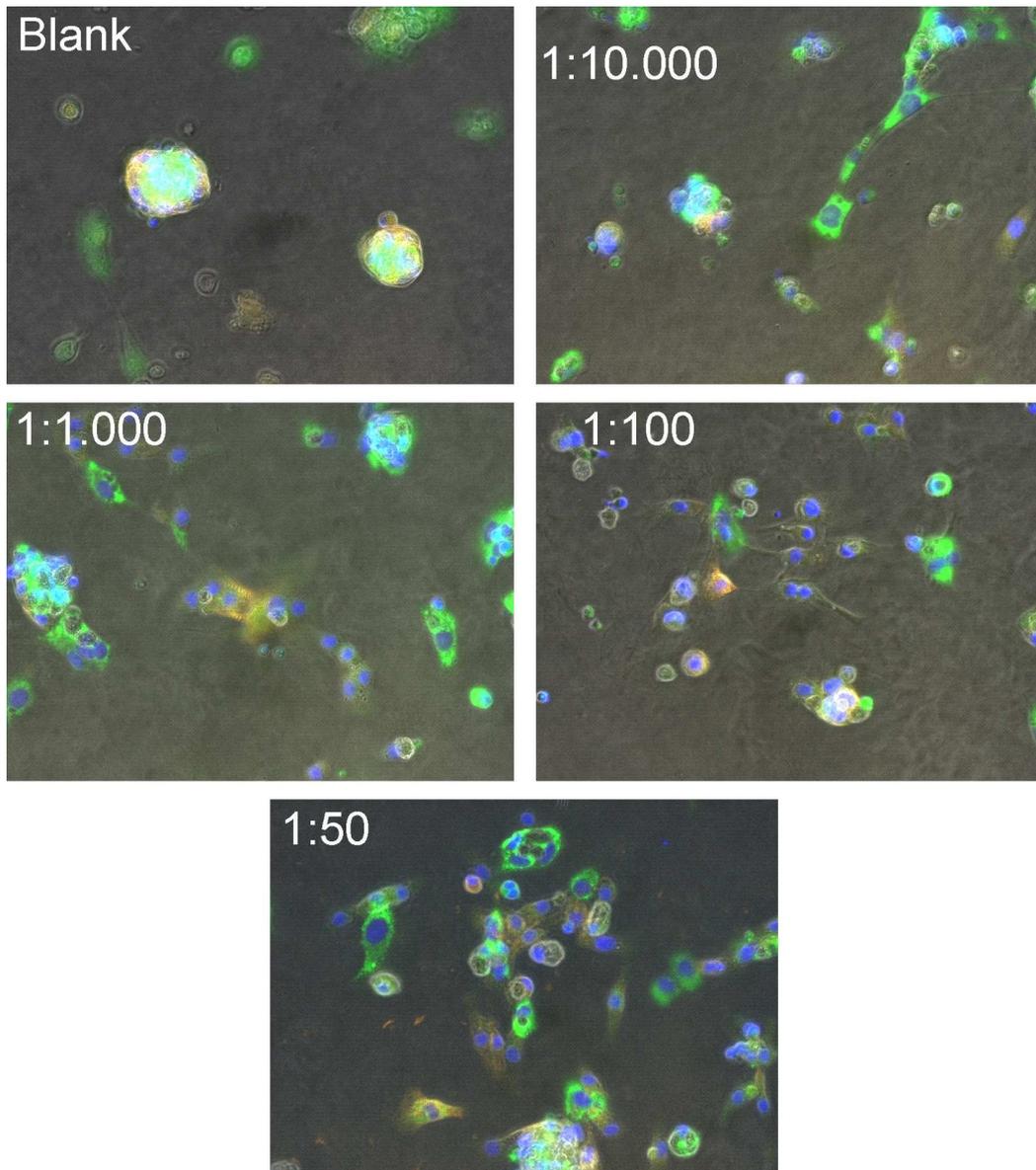


Abb. 44: Zellmischungen aus Fibroblasten und Cardiomyocyten ausgesiedelt auf cRGD dekorierten Alginat-Hydrogelen **97**, gezeigt im Fluoreszenzmikroskop; Alginat-Gel **56** ohne cRGD „Blank“; cRGD ligiert an jede 10.000ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 1.000ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 100ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 50ste monomere Einheit des Alginatstranges (Rot: Titin, Grün: rPH4, Blau: DAPI).¹³⁹

Die Studie konnte die Aktivität der Imin-ligierten cyclischen RGD-Peptide in den Hydrogelen erfolgreich nachweisen. Darüber hinaus war die Korrelation zwischen der Anzahl konjugierter RGD-Peptide und adhärenter Zellen erkennbar. Unabhängig von einer absoluten Zellzählung, konnte in allen Fällen eine RGD-vermittelte Anlagerung der Zellen gefunden werden. Somit hatten die Art der chemischen Ligation, wie auch der Hydrogelierungsprozess, keine negativen Auswirkungen auf die zelladhäsive Aktivität der cyclischen RGD-Moleküle. Ferner konnte erstmals die Integrin-vermittelte Zelladhäsion in

den *in situ* gelierten Alginat-Hydrogelen in Abwesenheit von Collagen oder Gelatine gezeigt werden.

6.4 Triazol ligierte Alginat-Peptid Biokonjugate

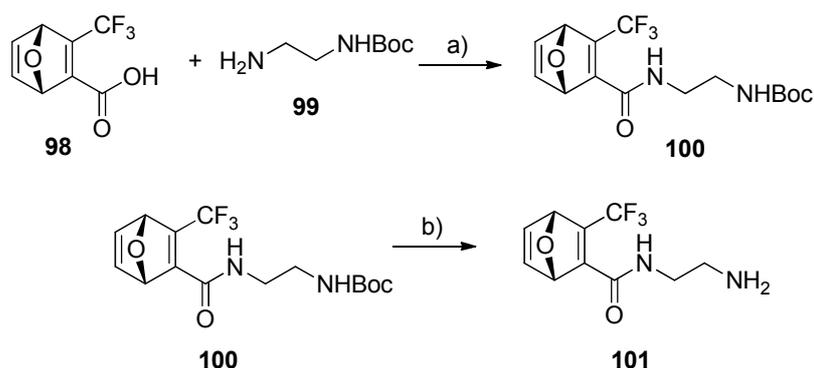
Neben den dargestellten Konjugationsvarianten der Amid- (Kapitel 6.2) und der Imin-Bindung (Kapitel 6.3) gibt es zahlreiche weitere Ligationsstrategien. Einige ausgewählte Ansätze wurden in *Kapitel 1.3* detailliert erläutert, so auch die 1,3-dipolaren Metall-freien Cycloadditionen.^{156,157} Eine Variante der Metall-freien Cycloaddition bedient sich der Reaktion zwischen einem elektronenarmen Oxanorbornadien mit einem Azid,⁹¹ wobei diese alle Anforderungen an moderne Ligationsmethoden erfüllt. Die Reaktion verläuft

- in wässrigen Medien,
- bei Raumtemperatur,
- ohne Zugabe von Additiven oder Katalysatoren,
- und die gebildeten Produkte und Nebenprodukte sind nicht toxisch.

Diese Cycloaddition ist in Analogie zu den klassischen Azid-Alkin Cycloadditionen ebenfalls bioorthogonal.

6.4.1 Synthese des verlängerten Oxanorbornadiensystems

Die Synthese der 3-Trifluoromethyl-7-oxa-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carbonsäure **98** erfolgte nach einer Synthese von Su *et al.*⁷², die auf der Veröffentlichung von RUTJES und Mitarbeitern fusst.⁷¹ Das Carboxylat **98** wurde mit *N*-Boc-geschütztem Ethylendiamin **99** unter Aktivesterbedingungen verlängert und anschließend unter sauren Bedingungen entschützt **101** (Schema 40).



Schema 40: Synthese des Oxanorbornadienderivats **100** und nachfolgende Entschützung zu Verbindung **101**; a) DCM, DMAP, EDC-HCl; b) TFA, DCM.

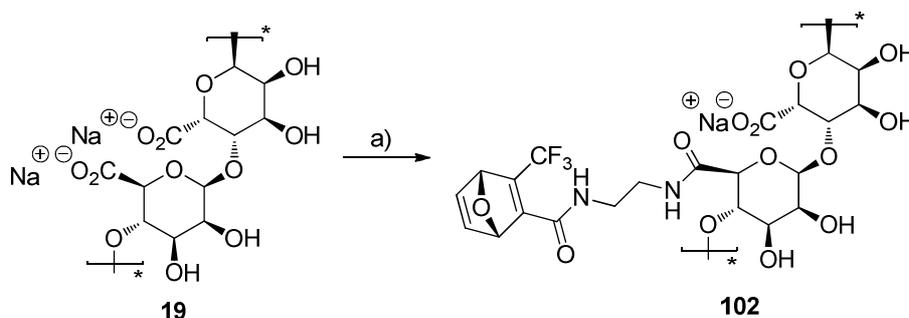
¹⁵⁶ C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1852–1855.

¹⁵⁷ S. A. Meeuwissen, M. F. Debets, J. C. M. van Hest, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1783–1795.

Die Verlängerung des Oxanorbornadiens mit Ethylendiamin **101** ermöglicht die Knüpfung mit der Carboxylgruppe an C-6 in Alginat **19**.

6.4.1 Synthese von Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginat

Im Folgenden wurde das Oxanorbornadien-Derivat **101** unter den etablierten Aktivesterbedingungen (Kapitel 3.2.1.2) mit dem Alginat **19** gekuppelt (Schema 41).



Schema 41: Synthese des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102**; a) DIPEA, EDC-HCl, HOBT*H₂O, **101**, H₂O.

Die erfolgreiche Funktionalisierung wurde NMR-spektroskopisch belegt. Insbesondere bei hohen Belegungsgraden konnten die charakteristischen Signale des Oxanorbornadiensystems eindeutig detektiert werden. Auf Grund ihrer Nachbarschaft zur Trifluormethylgruppe bzw. zum Amid weisen die Protonen an den Etherbrückenköpfen unterschiedliche chemische Verschiebungen auf (δ = 5.74 ppm, 1H; 5.84 ppm, 1H). Die Signale des terminalen Olefins besitzen hingegen unveränderte chemische Verschiebung (δ =7.36 ppm, 2H).

In Abb. 45 sind ¹H-NMR Spektren des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102** bei unterschiedlichen Belegungsgraden gezeigt. Sie lassen keine exakte Bestimmung des Belegungsgrads zu, sondern liefern semiquantitative Informationen in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge von **101**. Eine Belegung über 70% führte zu wasserunlöslichen Alginatderivaten. Für medizinisch-biologische Anwendungen ist die Löslichkeit der modifizierten Alginate jedoch essentiell, so dass 70% Belegung als Maximalwert für biomedizinische Anwendungen zu betrachten ist.

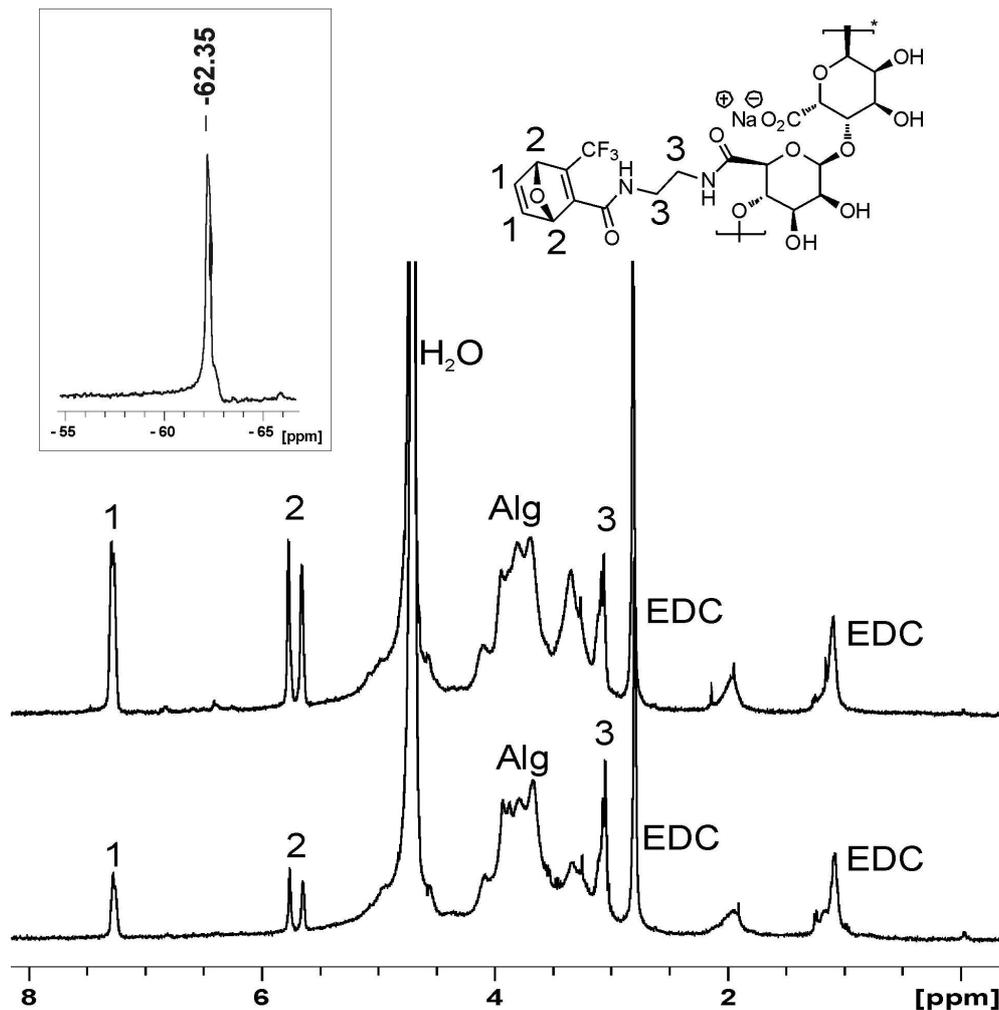


Abb. 45: ^1H -NMR Spektren des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102** bei unterschiedlichen Belegungsgraden in D_2O : ca. 70% (oben), ca. 30% (unten). Im Fenster ist das ^{19}F -NMR Spektrum beider Verbindungen gezeigt.

Die CF_3 -Gruppe ermöglichte es, das Oxanorbornadien-funktionalisierte Alginat **102** mit Hilfe der ^{19}F -NMR Spektroskopie zu analysieren. Die Detektion eines singulären Fluorsignals bei $\delta = -62.4$ ppm ist neben der ^1H -NMR Spektroskopie der zweite Beleg für die erfolgreiche Reaktion mit dem Polymer (Abb. 45, kleines Fenster). Ferner war es möglich, den Belegungsgrad einzustellen, was für spätere Ligationen von großem Vorteil ist. Denn die maximale Anzahl der cRGD-Azide, die mit dem Polymer konjugiert werden sollen, kann nun direkt durch den Grad der Oxanorbornadienbelegung eingestellt werden. Sollte das Polymer nur zu 30% mit bioaktiven Molekülen versehen werden, so muss das Alginat nur mit 30%iger Oxanorbornadienbelegung hergestellt werden. Die Ligation der Azide kann in diesen Fällen mit einem deutlichen Überschuss durchgeführt werden, was die Geschwindigkeit des Konjugationsprozesses wesentlich beschleunigt. Da die Ligation ohne jegliche Additive gelang, konnten die im Überschuss eingesetzten Konjugate per Dialyse einfach reisoliert werden. Damit konnte die

Oxanorbornadien-vermittelte Metall-freie Ligation effektiv und effizient am Biopolymer durchgeführt werden.

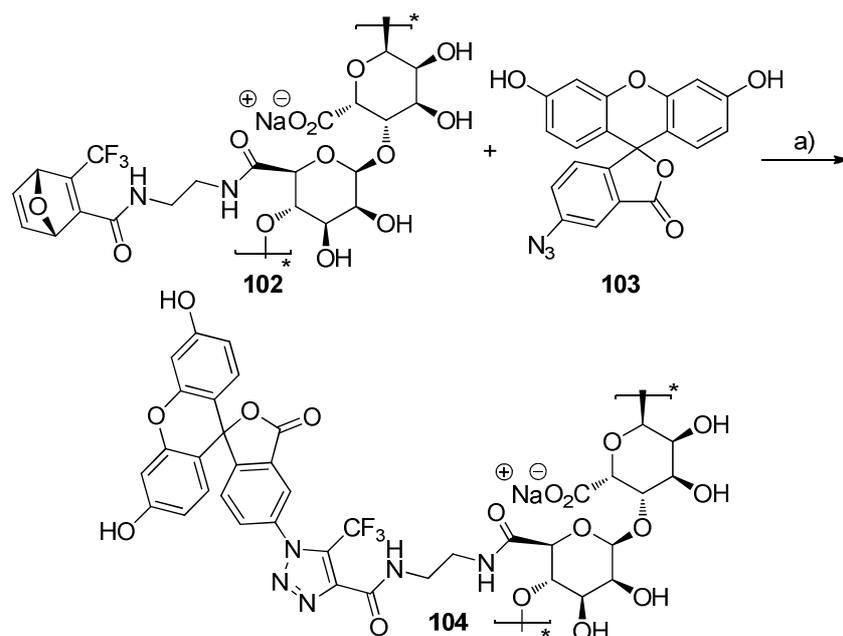
Die Verwendung von Alginat mit einem hohen Belegungsgrad erlaubt es zudem, unterschiedliche Azido-Derivate sequenziell oder orthogonal an das Polymer zu ligieren, sofern diese jeweils unterschüssig eingesetzt werden. Dieser Ansatz liefert Alginat-Konjugate die mit unterschiedlichen bioaktiven Molekülen dekoriert vorliegen. Diese Variante ist vor allem für die komplexen Anforderungen des *tissue engineering*s von Vorteil. Die multiple Ligation würde es ermöglichen, sowohl Wachstums-, Erkennungs- und/oder Vaskularisierungsfaktoren an die Alginate zu konjugieren und somit multifunktionale Alginat-Hydrogele herzustellen.

6.4.2 Ligation weiterer Azido-Derivate

Um die Reaktivität des Oxanorbornadien-Systems am Polymer zu überprüfen, wurden weitere Azido-Derivate mit Verbindung **102** umgesetzt. Das *proof of principle* erfolgte mit Azido-Fluorescein **103**, die Bestimmung der Ligationsprodukte mit Azido-valeriansäure **105** bzw. Azido-Boc-Lysin **107** und die für biologische Zwecke relevante Funktionalisierung wurde mit Azido-cRGD **82** durchgeführt. Der Reaktionsverlauf der Cycloaddition wurde für die Azido-pentansäure **105** und das Azido-RGD **82** $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisch verfolgt.

6.4.2.1 Umsetzung mit Azido-Fluorescein

Die Reaktivität des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102** in Wasser wurde mit Azido-Fluorescein **103** überprüft (Schema 42).

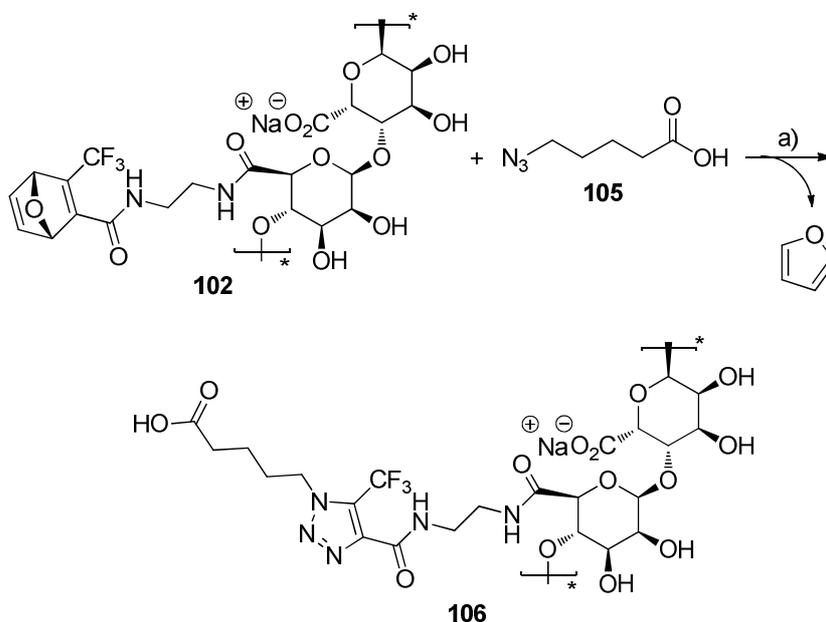


Schema 42: Umsetzung des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102** mit dem Fluorescein-Azid **103**; a) H_2O .

Nach Fällung, Dialyse und Gefriertrocknung wurde das gelb gefärbte, fluoreszierende Polymer **104** erhalten, welches in Wasser eine geringe Löslichkeit aufwies und sich einer detaillierten $^1\text{H-NMR}$ Analyse entzog. Der Versuch, das Absorptionsmaximum des Fluorophors UV-photometrisch zu bestimmen, führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Die gelbliche Färbung, sowie die Unlöslichkeit in Wasser lassen dennoch auf eine erfolgreiche Konjugation schließen.

6.4.2.2 Umsetzung mit Azidopentansäure

Die Reaktivität des funktionalisierten Alginats **102** konnte schließlich mit Hilfe der wasserlöslichen Azido-Pentansäure **105** ermittelt werden. Die Verbindung **102** wurde mit einem Äquivalent Azidopentansäure **105** in Wasser bei neutralem pH-Wert über zwei Tage umgesetzt (Schema 43).



Schema 43: Umsetzung des Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginats **102** mit Azidopentansäure **105**; a) H₂O.

Sämtliche Signale im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **106** lagen verbreitert vor, was die Bindung zum Polymer anzeigte (Abb. 46). Den Methylenheiten des Pentans konnten die Signalen bei $\delta = 4.57$ ppm (2H), 2.35 ppm (2H), 1.49 ppm (2H) und 1.56 ppm (4H) zugeordnet werden; die weiteren Signale sind dem Ethylendiamin und/oder dem Alginatrückgrat von **106** zuzuordnen.

Da für die Signale der Pentaneinheit ein doppelter Datensatz erhalten wurde, deutete dies auf die Bildung zweier Regioisomere des Triazols hin. Besonders charakteristisch konnte dies für die CH₂-Einheit in α -Position zum Triazol festgestellt werden, welche in Abhängigkeit zum Regioisomer entweder bei $\delta = 4.67$ ppm oder bei $\delta = 4.55$ ppm lag. Das Ausbleiben charakteristischer Signale bei $\delta = 5.74$ ppm, 5.87 ppm und 7.38 ppm zeigte,

dass die Oxanorbornadien-vermittelte 1,3 dipolare Cycloaddition am Polymer quantitativ verlief.

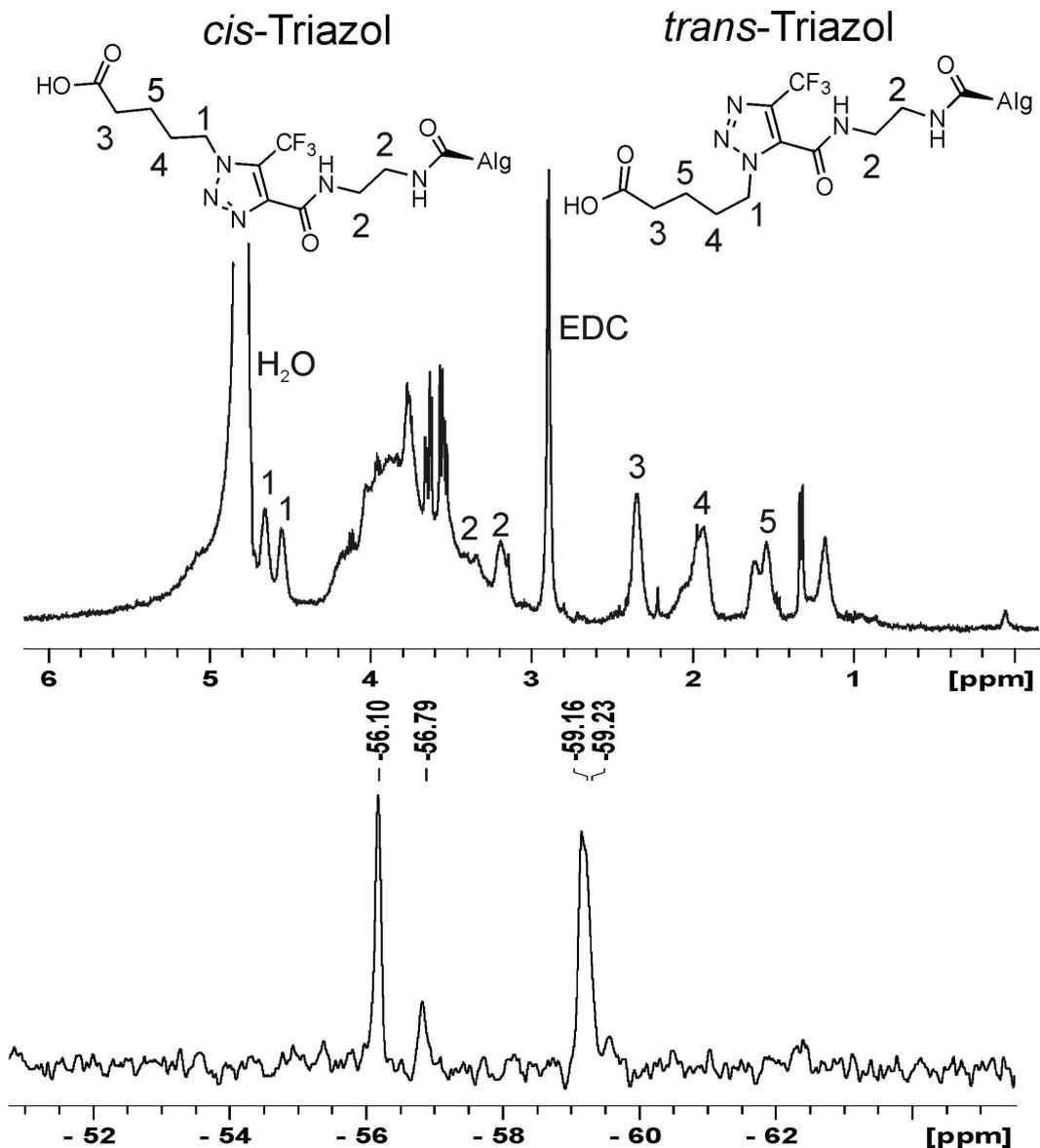


Abb. 46: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (oben) und $^{19}\text{F-NMR}$ Spektrum (unten) des Alginat-Pentansäure Konjugats **106** in D_2O .

Die Entstehung des leichtflüchtigen Furans erlaubte es, den Reaktionsverlauf $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisch in Echtzeit zu verfolgen. Es war zu erkennen, dass die Signalintensitäten der Oxanorbordien-Einheit ($\delta = 5.76$ ppm 1H, 5.84 ppm 1H, 7.36 ppm 2H) abnahmen, während zeitgleich die Intensität der Signale am Furan ($\delta = 6.48$ ppm 1H, 7.55 ppm 1H) zunahm (Abb. 47).

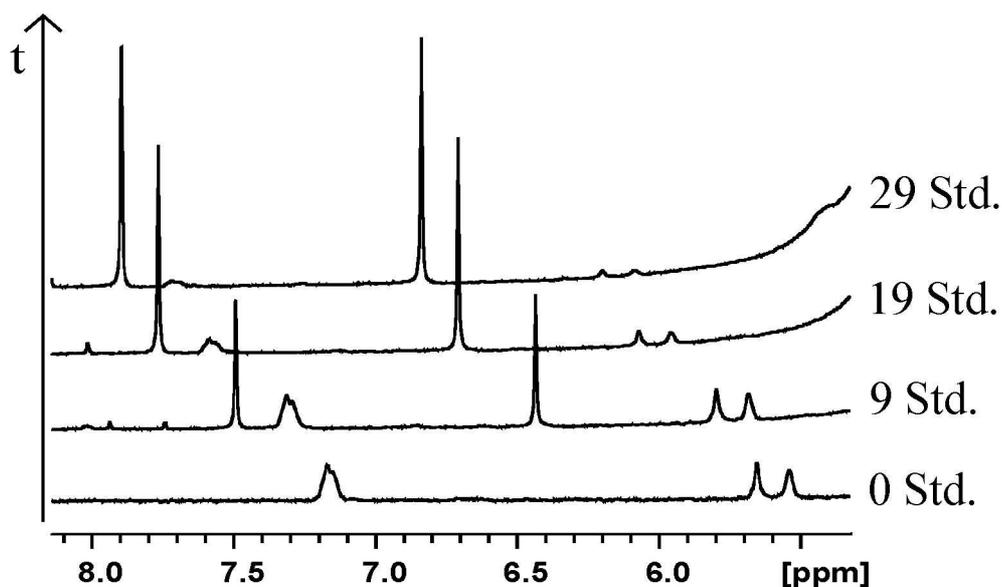


Abb. 47: Verlauf der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Azidopentansäure **105** und Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginat **102** anhand charakteristischer Signale; der Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums zeigt die Reaktion über insgesamt 29 Stunden. Die Abzisse bezieht sich nur auf das untere Spektrum.

Eine interne Kalibrierung ermöglichte es, den Zeitverlauf des Umsatzes zu ermitteln. Als Referenz wurde das Signal bei $\delta = 2.88$ ppm gewählt, welches verbliebenen EDC-Aktivesterverbindungen zuzuordnen ist (Schema 9). Mit Hilfe dieser Kalibrierung konnten die Intensitäten der Signale des Oxanorbornadiens und des Furans relativ zueinander bestimmt werden. Der Verlauf der Signalintensitäten wurde an einem charakteristischen Proton der beiden Verbindungen berechnet (Abb. 48).

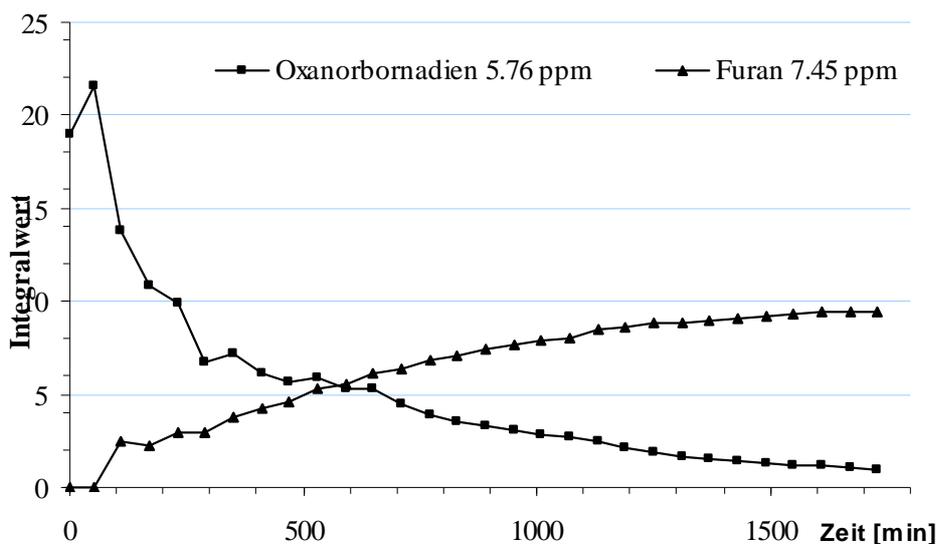


Abb. 48: Verlauf der Cycloaddition, berechnet anhand der Signalintensitäten der Oxanorbornadien-Einheit und des analog dazu gebildeten Furans; referenziert an einem konstanten Signal bei 2.88 ppm.

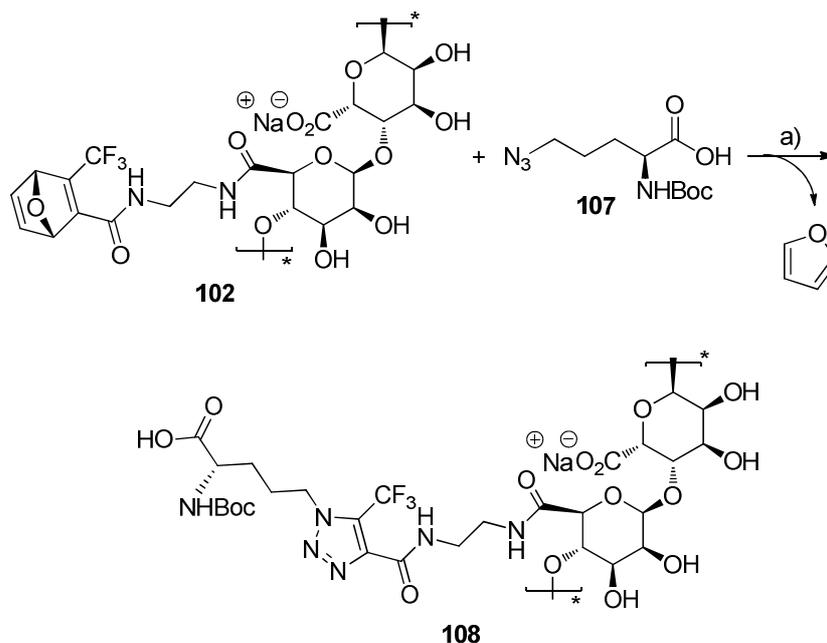
Nach ca. 30 Stunden konnte ein nahezu vollständiger Umsatz der Cycloaddition in Wasser ermittelt werden. Die hohe Flüchtigkeit des Furans führte dazu, dass die theoretisch erwarteten Signalintensitäten der Verbindung (Integralwert ca. 20) nicht detektiert werden konnten. Eine chemoselektive Auslösung der Cycloaddition nach Zugabe des Azido-Derivats, ließ sich ebenfalls NMR-spektroskopisch zeigen. Die Beständigkeit des Oxanorbornadien-modifizierten Alginats **102** bei unterschiedlichen Temperaturen in Wasser erlaubte es, die Verbindung in großem Maßstab herzustellen und anschließend über einen längeren Zeitraum zu lagern. Die in der Literatur beschriebene Reaktivität des Systems in wässrigen Lösungsmitteln,^{71,91,157} konnte somit erstmals am Polymer verifiziert und darüber hinaus der zeitliche Verlauf der Cycloaddition in Echtzeit verfolgt werden.

Bezüglich der Struktur der Produkte, die in der Retro DIELS-ALDER Reaktion gebildet wurden, erbrachte die ¹H-NMR Analyse jedoch keinerlei Klärung. Das in der Cycloaddition gebildete Furan konnte nicht direkt auf die Bildung der Triazole rückschließen, auch wenn die Bildung des Heterozyklus nach dem Reaktionsmechanismus zu erwarten ist (Schema 3). Einen Aufschluss erbrachte die ¹⁹F-NMR Spektroskopie, da die Trifluoromethylgruppe (-CF₃) sowohl im Edukt **102**, als auch im Produkt **106** vorhanden ist. In Abhängigkeit vom jeweiligen Strukturmotiv sollte diese eine individuelle chemische Verschiebung erfahren. Abb. 46 zeigt das erhaltene ¹⁹F-NMR Spektrum des Konjugats **106** nach erschöpfender Dialyse.

Der quantitative Verlauf der Reaktion konnte, analog zur ¹H-NMR Spektroskopie (Abb. 47), anhand des Signals der Ausgangsverbindung **102** bestimmt werden, welches nicht mehr detektiert wurde (Abb. 46, $\delta = -62.5$ ppm). Stattdessen konnten Signale bei $\delta = -56.1$ ppm, -56.8 ppm, -59.1 ppm und -59.2 ppm identifiziert werden. Die Anzahl lässt darauf schließen, dass insgesamt vier neue Verbindungen bei der Cycloadditionsreaktion zwischen **102** und **105** gebildet wurden. Eine Zuordnung der Signale gelang mit den bisherigen Informationen nicht, so dass die Reaktion anhand von Modellstudien auf niedermolekularer Ebene eingehender analysiert wurde (Kapitel 6.5).

6.4.2.3 Umsetzung mit Azido-Boc-Lysin

Um die Ergebnisse der Ligation von **105** zu verifizieren, wurde die Cycloaddition ebenfalls mit Azido-Boc-Lysin **107** durchgeführt. Die Analyse der ¹H- und ¹⁹F-NMR Spektroskopie sollten zeigen, ob für beide Azido-Derivate **105** und **107** ähnliche Datensätze erhalten werden. Hierfür wurde ebenfalls das Oxanorbornadien-funktionalisierte Alginat **102** mit einer Belegungsrate von 70% verwendet.



Schema 44: Cycloaddition von Azido-Boc-Lysin **107** mit dem Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginat **102**; a) H₂O.

Auf Grund der erworbenen Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Cycloaddition (Abb. 48), wurde die Reaktion für 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend erschöpfend dialysiert. ¹H-NMR spektroskopische Analysen wiesen die erfolgreiche Ligation nach. Außerdem wurde das identische Signalmuster erhalten. Die Verschiebung der CH₂-Einheit in α -Position zum Triazol wurde ebenfalls bei $\delta = 4.66$ ppm und 4.55 ppm erhalten; auch die weiteren zu den Methylenheiten gehörenden Signale zeigten jeweils einen doppelten Signalsatz (Abb. 49).

Ferner wurde ermittelt, ob bei Verwendung substöchiometrischer Mengen von **107** nach Dialyse und Gefriertrocknung überschüssige Oxanorbornadien-Einheiten weiterhin intakt vorlagen. Dies würde weitere Ligationen ermöglichen, was bereits in *Kapitel 6.4.1* angemerkt wurde. Abb. 49 zeigt die ¹H-NMR Spektren der Reaktion von **102** mit 0.5 bzw. 1.0 Äquivalenten des N₃-Boc-Lysins **107**. Die erfolgreiche Ligation konnte in beiden Spektren anhand der charakteristischen Protonensignale der Boc-Schutzgruppe identifiziert werden. Bei der Verwendung von einem Äquivalent **107** (Abb. 49, unten) wurde, im Gegensatz zum Azidopentansäure-Alginat-Konjugat **106**, kein vollständiger Umsatz erreicht. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese Beobachtung auf eine verringerte Löslichkeit, resultierend aus der hydrophoben Boc-Schutzgruppe, oder auf sterische Gründe zurückzuführen war.

Die ¹⁹F-spektroskopische Analyse vom Lysin-dekorierten Alginat **108** bestätigte den unvollständigen Umsatz bei Einsatz eines Äquivalents **107** (Abb. 49, unten).

Vergleichend zum Konjugat **106** (Abb. 46, unten) wurde ein ^{19}F -NMR Datensatz mit identischem Signalmuster erhalten. Das Konjugat **108** zeigte ebenfalls ^{19}F Resonanzen bei $\delta = -56.1$ ppm, -56.8 ppm, -59.1 ppm und -59.2 ppm (Abb. 49, unten).

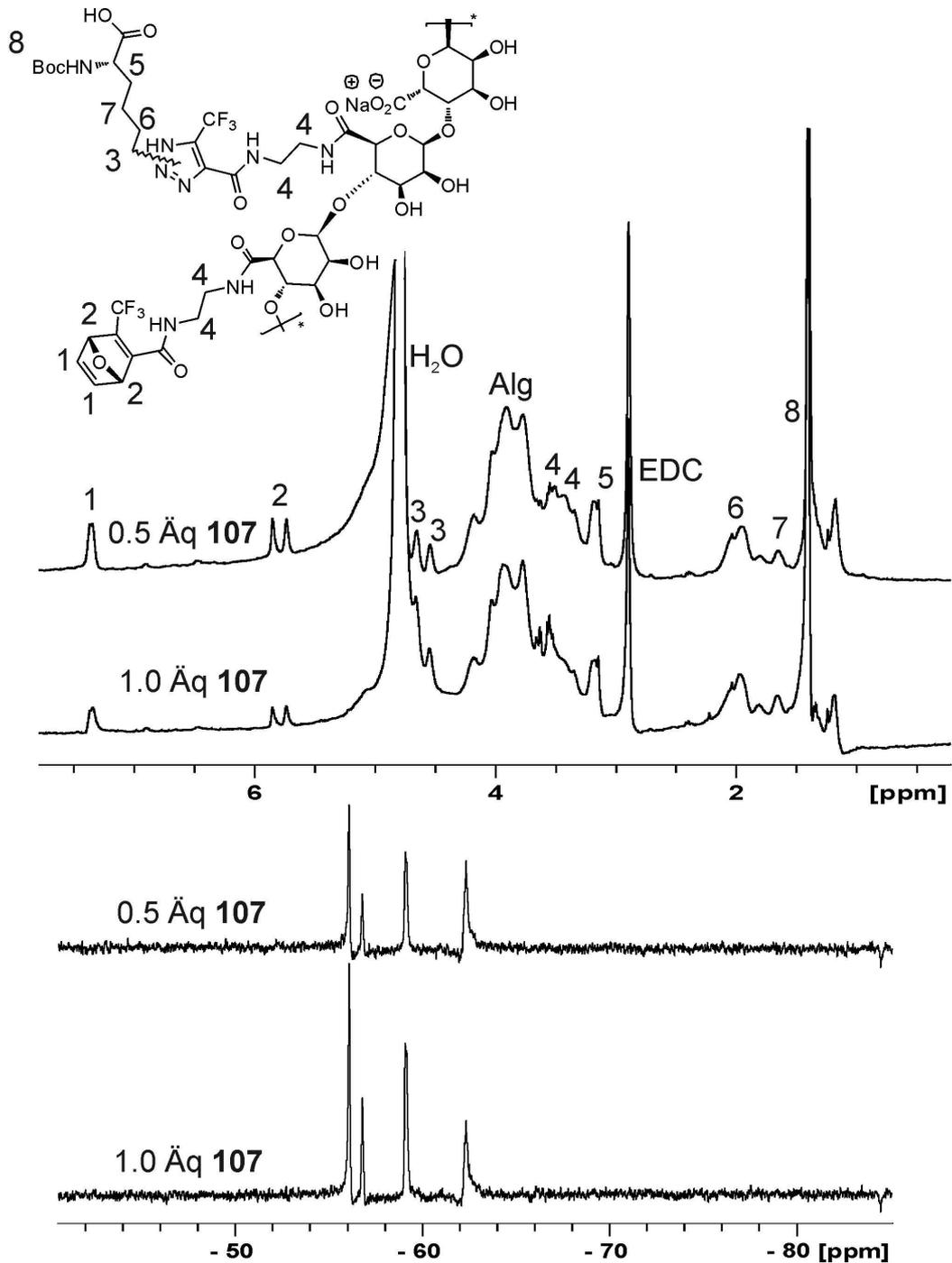
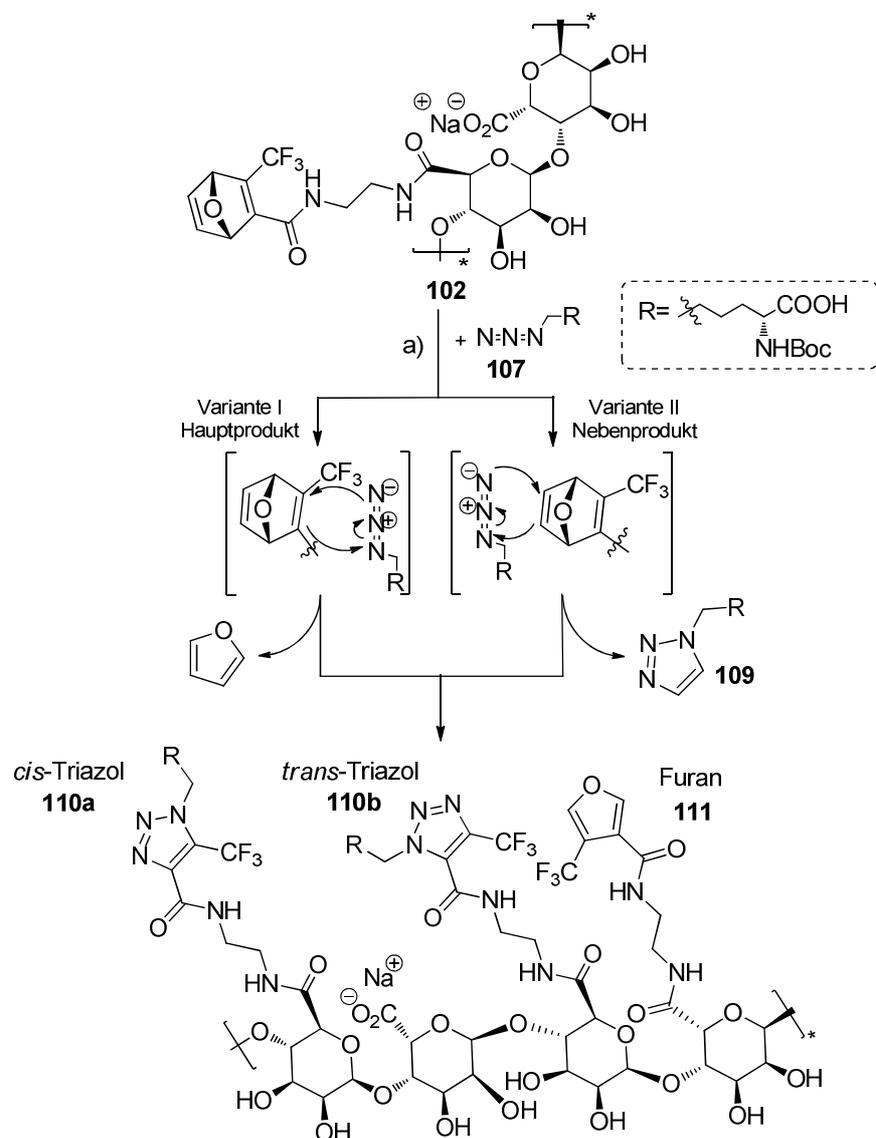


Abb. 49: ^1H -NMR- (oben) und ^{19}F -NMR-Spektren (unten) der Reaktionen von Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginat **102** mit 0.5 Äq. bzw. 1.0 Äq. Azido-Boc-Lysin **107** in D_2O .

Dies bedeutet, dass, unabhängig von der Natur des Azido-Derivats, ein identischer Satz von Cycloadditionsprodukten gebildet wurde. RUTJES und Mitarbeiter beschrieben die Bildung von zwei regioisomeren Triazolen als Hauptprodukte, sowie von einem

Furanderivat als Nebenprodukt (Kapitel 1.5.2).⁷¹ Damit sollten sich die beiden regioisomen Cycloadditionsprodukte *cis*-**110a** und *trans*-**110b** und das Furanderivat **111** über die ¹⁹F-NMR Spektroskopie zuordnen lassen.

Schema 45 zeigt den von RUTJES postulierten Reaktionsmechanismus,⁷¹ der die Bildung der drei genannten Produkte durch einen unterschiedlichen chemo- bzw. regioselektiven Angriff erklärt.



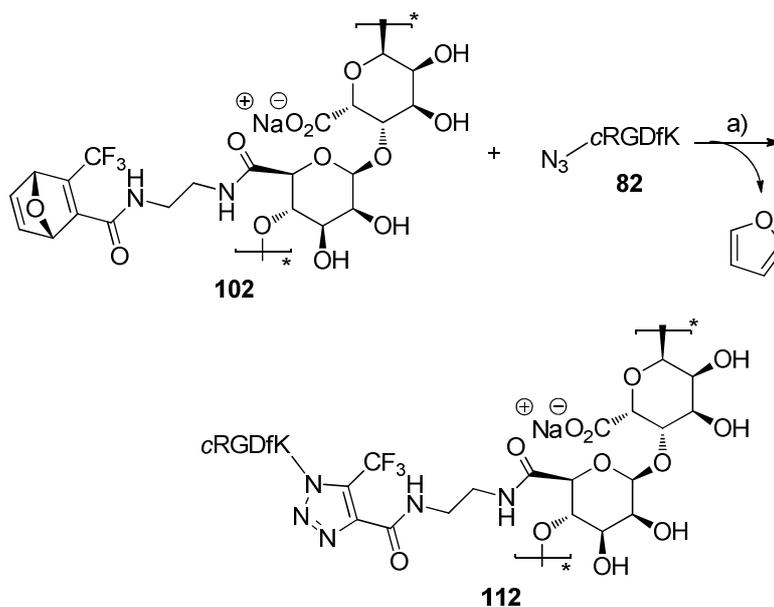
Schema 45: Mögliche Produkte der Oxanorbornadien-medierten Ligation am Alginat **102** in Abhängigkeit vom chemo- und regioselektiven Angriff des Azido-Derivats **107**; a) H_2O .

6.4.2.4 Umsetzung mit Azido-cRGDfK

Abschließend wurde die Metall-freie Ligation des bioaktiven Azido-Pentapeptids **82** verfolgt. Die Reaktion des cRGD-Peptids mit dem Oxanorbornadien-System wurde bereits von RUTJES *et al.* mit niedermolekularen Reaktionspartnern beschrieben,⁹¹ Die Anbindung an ein Biopolymer über eine Metall-freie Cycloaddition ist bis heute nicht publiziert. Einen

vergleichbaren Ansatz veröffentlichten DE FOREST *et al.*, indem sie die RGD-Sequenz an ein modifiziertes Polypeptid über die Thio-Click Reaktion ligierten.¹⁵⁶

Die Ligation des cRGD-Peptids **82** erfolgte an Alginate **102** mit einem 30%igen Funktionalisierungsgrad. Eine höhere Belegung mit cRGD setzt die Löslichkeit des Polymer-Konjugats **112** in Wasser sehr stark herab. Damit die Reaktion rasch und mit vollständigem Umsatz verlaufen konnte, wurde das cRGD **82** im Überschuss eingesetzt. Das mit der Oxanorbornadien-Einheit funktionalisierte Alginate **102** konnte erfolgreich wenn auch nicht vollständig mit den RGD-Peptiden **82** versehen werden (Abb. 50)



Schema 46: Cycloaddition des Azido-cRGDfKs **82** an das Oxanorbornadien-funktionalisierte Alginate **102**; a) H₂O.

Alle weiteren cRGD-Alginate Konjugate, auch jene, die für die biologischen Untersuchungen verwendet wurden (Kapitel 6.6.3), wurden nach diesem Protokoll hergestellt. Der Konjugationsnachweis erfolgte wiederum ¹H-NMR- und ¹⁹F-NMR-spektroskopisch. Im ¹H-NMR Spektrum konnte das Pentapeptid anhand der aromatischen Signale der Phenylalanineinheit (Phe) und den Methylenheiten des Arginins (Arg) nachgewiesen werden (Abb. 10; vgl. auch Abb. 43).

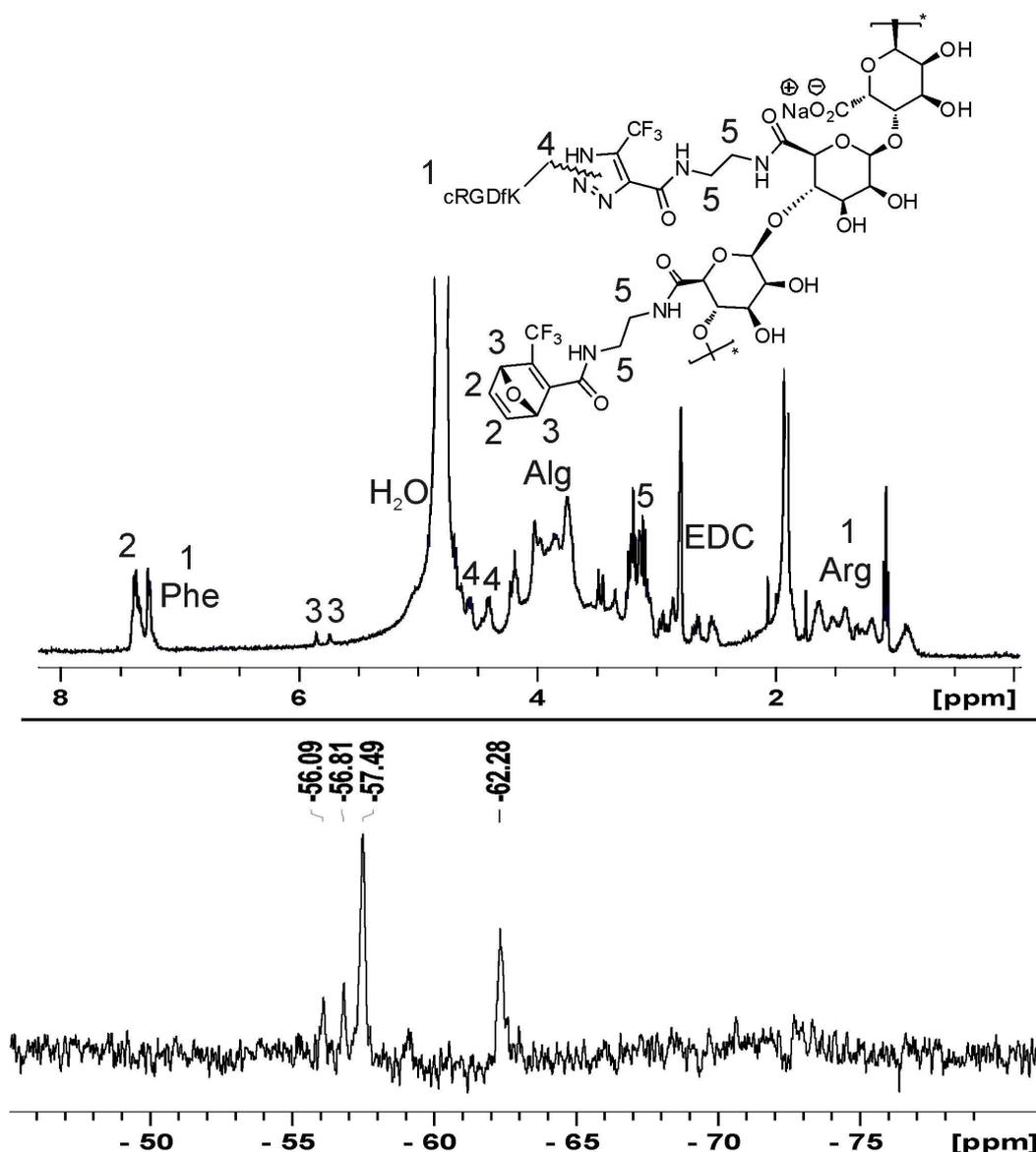


Abb. 50: $^1\text{H-NMR}$ - (oben) und $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektrum (unten) der Reaktionen von Oxanorbornadien funktionalisiertem Alginat **102** mit dem Azido-cRGDFK **82** in D_2O .

Im Vergleich zu den Ligationen der Azido-Pentansäure **105** (Abb. 46) und des Azido-Boc-Lysins **107** (Abb. 49), wurde ein anderes Signalmuster mit geringen Abweichungen in den Signalverschiebungen erhalten. Nicht umgesetzte Oxanorbornadiene wurden durch das charakteristische ^{19}F -Signal bei $\delta = -62.3$ ppm identifiziert. Die ^{19}F Signale bei $\delta = -56.1$ ppm, -56.8 ppm, und -57.5 ppm ließen sich den Reaktionsprodukten zuordnen. Die sterisch anspruchsvollen cRGD-Peptide beeinflussen die Signallagen und führen zu einer veränderten Zahl an Reaktionsprodukten.

Ferner wurde der Reaktionsverlauf, wie in Kapitel 6.4.2.2 (Abb. 47) beschrieben, über die Entstehung des Furans durch $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse verfolgt. Um die Löslichkeit des Konjugats **112** zu garantieren, wurde Alginat **102** mit einer 30%igen Oxanorbornadien-Funktionalisierung verwendet und 0.5 Äquivalente cRGD **82** zugesetzt. Dieses substöchiometrische Verhältnis führte dazu, dass nur die Hälfte der

Norbornadien-Einheiten umgesetzt wurden. Wie Abb. 51 zeigt, wurden mit fortschreitender Reaktionszeit keine weiteren Veränderungen in den Signalintensitäten detektiert, so dass von einer vollständig verlaufenden Ligation ausgegangen werden kann.

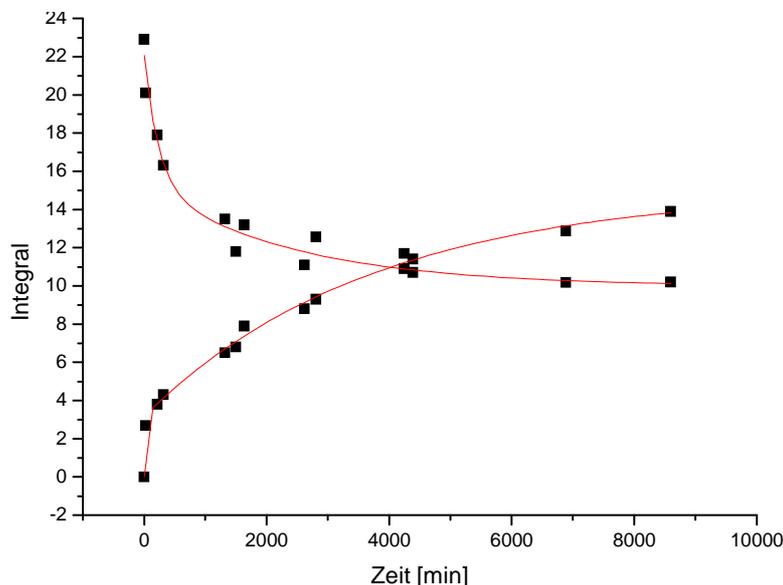


Abb. 51: Verlauf der Ligation des cRGDs **82** an **102**; dargestellt anhand der Signalintensitäten des Oxanorbornadien-Systems (abnehmend) und des analog dazu gebildeten Furans (zunehmend) über die Zeit (bestimmt an je einem charakteristischen Proton beider Verbindungen, Furan $\delta = 7.47$ ppm und Oxanorbornadien $\delta = 5.76$ ppm).

Der Kurvenverlauf deutet zu Beginn der Reaktion einen schnellen Umsatz an. Nach ca. vier Tagen (250 Stunden) wird dann ein nahezu konstanter Wert erreicht. Im Vergleich zu den vorher untersuchten Cycloadditionen (Kapitel 6.4.2.2 und 6.4.2.3) verlängerte sich die Reaktionsdauer merklich von einem auf drei Tage.

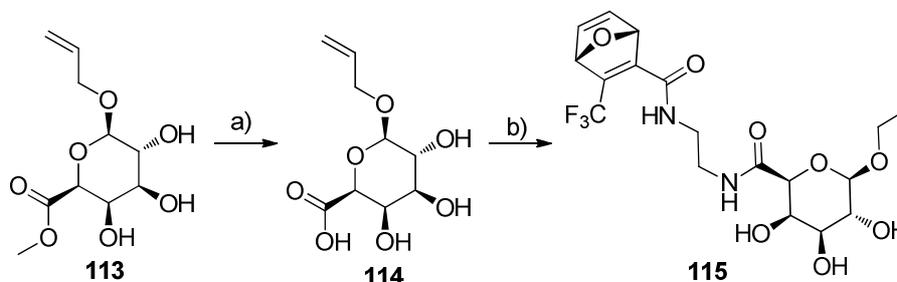
6.5 Analyse der Produkte der Oxanorbornadien-medierten Cycloaddition über niedermolekulare Modelle

Die Produkte der Metall-freien Cycloaddition am Alginat konnten auf makromolekularem Level nicht eindeutig identifiziert und zugeordnet werden. Deshalb sollten niedermolekulare Modellsubstanzen präpariert werden und diese mit Hilfe der ^{19}F -NMR-Spektroskopie durch Vergleich zugeordnet werden. Dazu wurden die beiden regioisomeren Triazole *cis*-**110a** und *trans*-**110b**, sowie das als Nebenprodukt entstehende Furan **111**, in Form der entsprechender Monosaccharide synthetisiert und anschließend analysiert (Schema 48 und Schema 50). Die ^{19}F -NMR Spektren der Monosaccharid-Derivate sollten anschließend mit den Daten der Alginat-Konjugate **106** und **108** verglichen werden (Abb. 49 und Abb. 50). Die Galacturonsäure diene als

monosacharidisches Modell für die Uronsäuren des Alginats. Hierfür musste Methyl(allyloxy- β -D-galactopyranosid)uronat **113** nach einer Vorschrift von Voss *et al.* synthetisiert werden.¹⁴⁷

6.5.1 Synthese Oxanorbornadien-funktionalisierter Galacturonsäure

Die Funktionalisierung des Galactopyranosids **113** mit der Oxanorbornadien-Einheit gelang ebenfalls über das mit Ethylendiamin verlängerte Derivat **101**. Die Synthese von **101** ist *Schema 40* zu entnehmen. Damit die Kupplung unter den etablierten Bedingungen über das primäre Amin der Verbindung **101** erfolgen konnte (Kapitel 6.2.1, *Schema 41*), wurde das Methyluronat **113** zuvor verseift. Die Verseifung des Methylesters **113** erfolgte in wässrigem Medium unter Zugabe von Lithiumhydroxid. Anschließend konnte 1-Allyl- β -D-Galacturonsäure **114** mit dem Oxanorbornadien-System **101** derivatisiert werden.

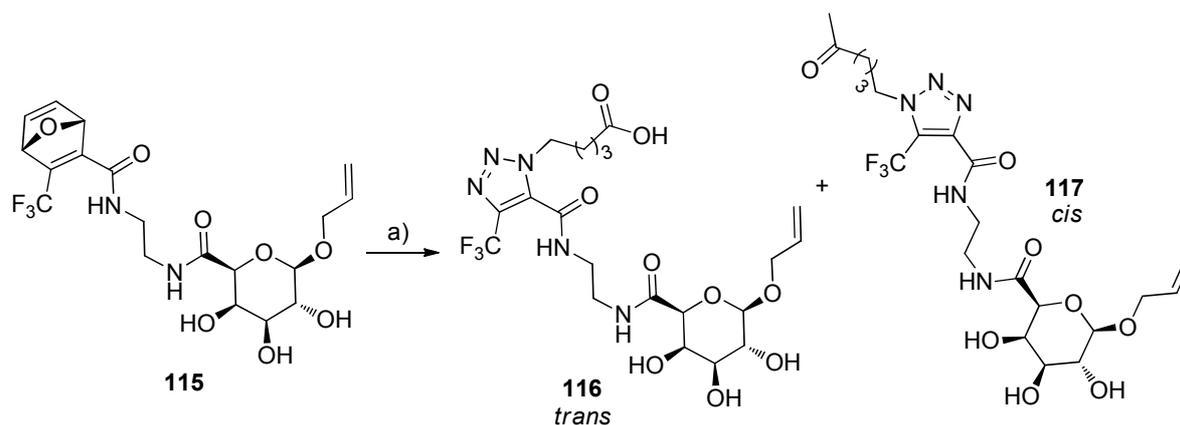


Schema 47: Verseifung von Methyluronat **113** und anschließende Synthese des Oxanorbornadien-funktionalisierten Galactopyranosids **115**; a) LiOH, H₂O; b) DIPEA, TBTU, **101**, H₂O.

Sowohl die Verseifung als auch die nachfolgende Funktionalisierung wurden per Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Zur Aktivierung der Carbonsäure **114** wurde *O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat „TBTU“ eingesetzt. Komplexe Kupplungsreagenzien wie „TBTU“ vereinen die Eigenschaften eines Carbodiimids mit denen eines Benzotriazols wodurch eine höhere Reaktivität erreicht und die Gefahr von Umlagerungen verringert wird. Die Isolierung von **115** erfolgte abschließend per präparativer HPLC.

6.5.2 Umsetzung Oxanorbornadien-funktionalisierter Galacturonsäure mit Azidopentansäure

Um vergleichbare Ligationsprodukte zu generieren, wurde die funktionalisierte Galacturonsäure **115** ebenfalls mit Azidopentansäure **105** umgesetzt (*Schema 48*). Die Metall-freie Cycloaddition fand somit unter gleichen Reaktionsbedingungen wie im Falle des Polymers statt (vgl. *Schema 43*).



Schema 48: Erwartete Produkte **116** und **117** nach Umsetzung des mit Oxanorbornadien funktionalisierten Galactopyranosids **115** mit Azidopentansäure **105**; a) H_2O , **105**.

Nach dreitägiger Reaktionszeit wurde die Mischung per präparativer HPLC gereinigt und die Fraktionen anschließend NMR spektroskopisch untersucht. Die Daten der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren, sowie die HQSC- und HMBC-Korrelationen ermöglichten es, die zwei isolierten Fraktionen den Verbindungen **116** und **117** zuzuordnen.

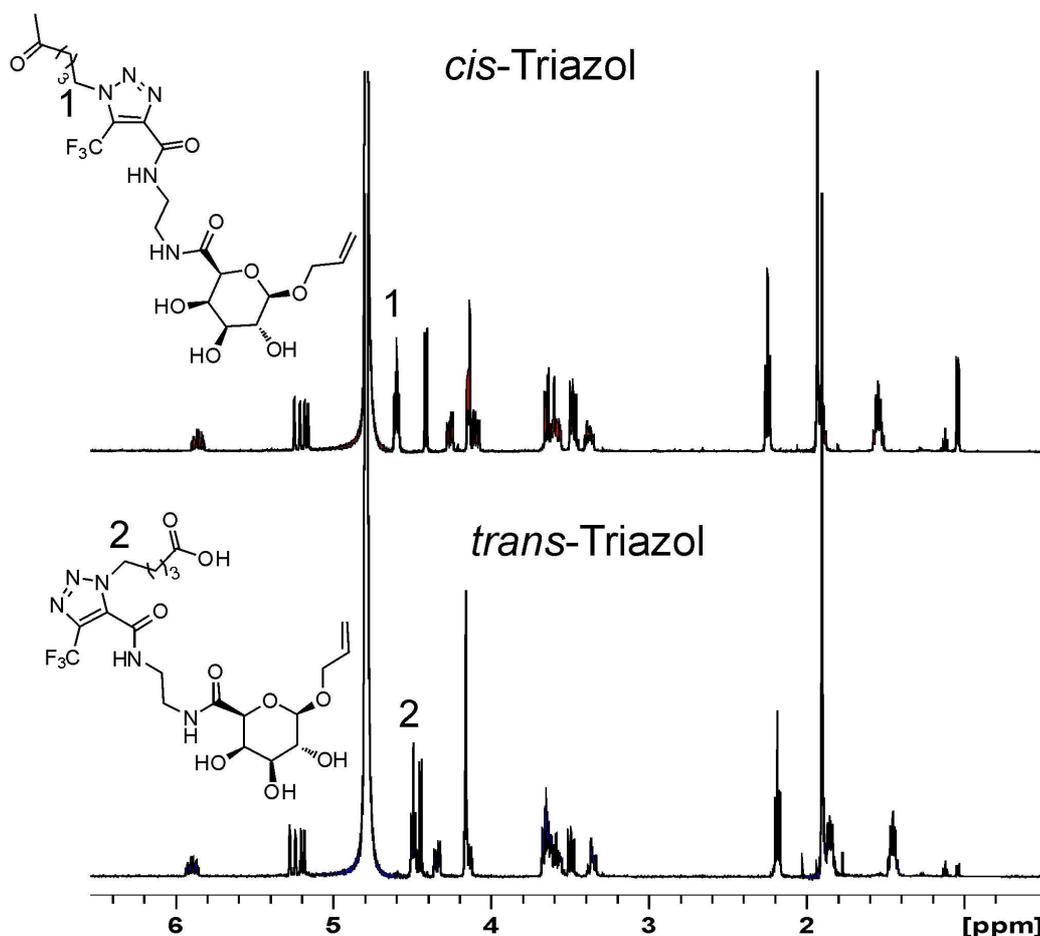


Abb. 52: ^1H -NMR Spektren der isolierten Triazole **116** und **117** in D_2O . Das 5-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol **116** konnte dem *cis*-Isomer und das 4-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol **117** dem *trans*-Isomer zugeordnet werden.

Die beiden regioisomeren Triazole unterschieden sich in den Protonen- bzw. Kohlenstoff-Spektren in nur einer Position signifikant. Aus Abb. 52 wird deutlich, dass nur die Protonen der Methyleninheit in α -Position zum Triazol eine deutliche Abweichung aufweisen. Im Vergleich zum *cis*-Isomer **116** $\delta = 4.60$ ppm liegt das verschobene Signal für das *trans*-Isomer **117** bei $\delta = 4.49$ ppm. Im ^{19}F -NMR-Spektrum konnte das Signal bei $\delta = -56.3$ ppm dem *cis*-Regioisomer **116** und das *trans*-Regioisomer **117** dem Signal bei $\delta = -59.3$ ppm zugeordnet werden (Abb. 53 D+E). Beide Signale korrelieren sehr gut mit denen der Alginat-Konjugate der Azidopentansäure **106** bzw. des Azido-Boc-Lysins **108** (Abb. 53 B+C).

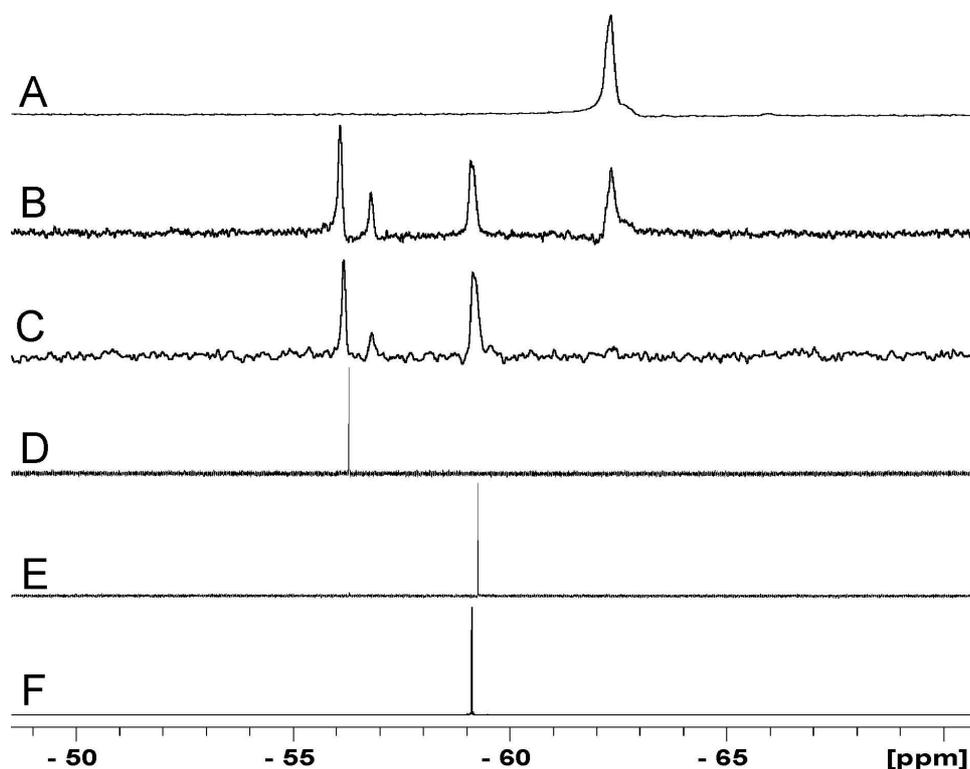


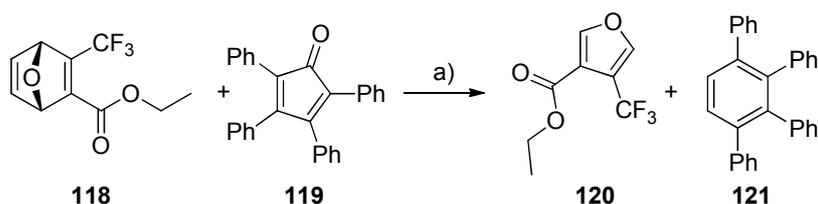
Abb. 53: ^{19}F -NMR Spektren in D_2O : A) Oxanorbornadien-funktionalisiertes Alginat **102**; B) Alginat-Konjugat **108** mit 0.5 Äquivalenten Azido-Boc-Lysin; C) Alginat-Konjugat **106** mit 1.0 Äquivalenten Azidopentansäure; D) *cis*-Triazol des Galactopyranosids **116**; E) *trans*-Triazol des Galactopyranosids **117**; F) Furanderivat **124**.

Somit konnten zwei der vier Cycloadditionsprodukte mit Hilfe der ^{19}F -NMR Spektroskopie identifiziert und zugeordnet werden. Die beiden Signale bei $\delta = -56.3$ ppm **116** und $\delta = -59.3$ ppm **117** entsprachen den beiden *cis* bzw. *trans* Triazolisomeren **110a** und **110b**.

6.5.3 Synthese von 3-Trifluoromethylfuran Derivaten

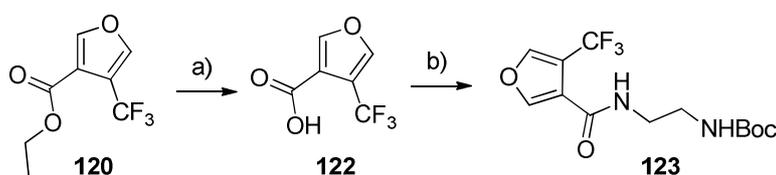
Zwei der vier Signale, bei $\delta = -56.8$ ppm und -59.2 ppm sind bis dato noch nicht identifiziert. Anlehnend an die Resultate von RUTJES *et al.*⁷¹ und der Hypothese, dass ein

Azid-Angriff an die sterisch ungehinderte, aber elektronenreichere Doppelbindung alternativ erfolgen kann, was zur Bildung eines Furan-haltigen Konjugats führen würde (Schema 45), wurde ein analoges Modellfuran synthetisiert. Als Ausgangsverbindung wurde das 3-(Trifluoromethyl)-4-ethoxycarbonylfuran **120** nach einer Vorschrift von NEZIS *et al.* hergestellt.¹⁵⁸ Die Synthese von **120** erfolgte durch Umsetzung des Oxanorbornadienethylesters **118** mit Tetraphenylcyclopentadienon **119** in einer Reaktionskaskade basierend auf einer DIELS-ALDER und einer Retro-DIELS-ALDER Reaktion. Tetraphenylbenzol **121** wurde dabei als Nebenprodukt gebildet, welches sich säulenchromatographisch vom Produkt **120** abtrennen ließ.



Schema 49: Synthese des 3-(Trifluoromethyl)-4-ethoxycarbonylfurans **120** analog zur Vorschrift von NEZIS *et al.*¹⁵⁸; a) Toluol, μW .

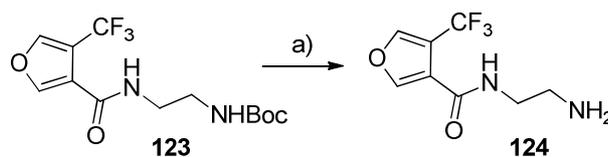
Mit dem Ziel, eine möglichst ideale Modellsubstanz zum Furan-Konjugat des Alginats zu generieren (Verbindung **111**, Schema 45), wurde das Furanderivat **120** im nachfolgenden Schritt verseift und anschließend mit *N*-Boc-geschütztem Ethylendiamin **99** verlängert.



Schema 50: Überführung von **120** in die freie Carbonsäure **122** und anschließende Verlängerung in das Furanderivat **123**; a) LiOH_{aq} , THF; b) DIPEA, PyAOP, DMF, **99**.

Die Aktivierung der Carbonsäure **122** wurde mit 7-(Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat „PyAOP“ erreicht, ein Phosphoniumanalogon des bereits eingesetzten „TBTU“s. Abschließend wurde die Boc-Schutzgruppe durch saure Katalyse entfernt und das wasserlösliche Amin **124** freigesetzt.

¹⁵⁸ A. Nezis, J. Fayn, A. Cambon, *J. Flour. Chem.* **1991**, 53, 197-299.



Schema 51: Entfernung der Boc-Schutzgruppe zur Freisetzung des verlängerten Furanderivats **124**; a) CH₂Cl₂, TFA.

Die nicht literaturbekannten Furanderivate **122-124** wurden vollständig charakterisiert und zusätzlich ¹⁹F-NMR-spektroskopisch vermessen. Ein, den Datensätzen der Alginat-Konjugate **106** und **108** (Abb. 53 B,C) vergleichbares Signal, konnte für das Ethylendiamin-verlängerte Furan **124** gefunden werden (Abb. 53 F). Das wasserlösliche Furanderivat **124** zeigte eine identische Verschiebung im ¹⁹F-NMR Spektrum, wie die nicht zugeordneten Signale in den Alginat-Konjugaten **106** und **108** bei $\delta = -59.1$ ppm. Damit konnte die Bildung und Existenz des Alginat-gebundenen Furan-Konjugats **111** belegt werden (Schema 45).

6.5.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe von Modellsubstanzen und der ¹⁹F-NMR Spektroskopie konnten drei der vier Cycloadditionsprodukte der Alginat-Konjugate **106** und **108** identifiziert werden (Abb. 53).¹⁵⁹ Die Synthese der regioisomeren Galacturonsäurederivate **116** und **117** erlaubte es, die Signale bei $\delta = -56.3$ ppm und -59.3 ppm den beiden *cis*- bzw. *trans*-regioisomeren Triazolen **110a** und **110b** am Alginat zuzuordnen. Desweiteren wurde das Signal bei $\delta = -59.1$ ppm als dem Furan-Konjugat **111** zugehörig identifiziert. Das Postulat, dass der chemoselektive Angriff des Azids die Cycloadditionsprodukte **110a** und **110b** bzw. **111** generiert, konnte somit nachgewiesen werden (Schema 45). Das Signal bei $\delta = -56.7$ ppm im ¹⁹F-NMR Spektrum konnte bisher keinem Produkt zugeordnet werden. Auf welchem Reaktionsweg eine weitere Polymer-gebundene und fluorsubstituierte Verbindung entstehen könnte und welche Struktur ihr zugewiesen werden kann, konnte nicht aufgeklärt werden.

Die Intensitäten der Signale geben Aufschluss über das Produktverhältnis der Cycloadditions-Konjugate **106** und **108** (Abb. 53 B,C). In beiden Fällen wurde das *cis*-Reioisomer **110a** mit ca. 35% gebildet. Die benachbarten Signale des *trans*-Regioisomers **110b** und des Furanderivats **111** ergeben zusammen 55% (im Verhältnis von ca. 1:1) und die nicht bekannte Verbindung wurde mit einem Anteil von ca. 10% gebildet. Im Vergleich zu den Ergebnissen von RUTJES und Mitarbeitern,⁷¹ die die Bildung des Furan-Konjugats **111** auf niedermolekularer Ebene in nur ca. 5% der Fälle erhielten, änderte sich dieses Verhältnis auf makromolekularer Ebene deutlich. Dies kann auf Knäulungen des Polymers in Lösung und den daraus resultierenden sterisch veränderten

¹⁵⁹ A. Krause, A. Kirschning, G. Dräger, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5547-5553.

Ansprüchen zurückzuführen sein. Deshalb erfolgte der Angriff des Azids am elektronisch ungeeigneteren Olefin des Oxanorbornadien-Bicyclusses wesentlich häufiger.

Das von Rutjes entwickelte Oxanorbornadien-System wurde erfolgreich auf das Biopolymer Alginat übertragen und damit erstmals auf makromolekularer Ebene angewandt. Die Cycloadditionsprodukte der am Polymer durchgeführten Ligation wurden identifiziert und somit die Ergebnisse, die die Autoren auf niedermolekularer Level erhielten,^{71,91,160} bestätigt.

6.6 Herstellung Triazol-ligierter Alginat-RGD Hydrogele: Sequentielle versus Doppelte Click Strategie

Das *Kapitel 1.5* beschrieb verschiedene Techniken, wie Makromoleküle untereinander z.B. per *Click*-Reaktionen vernetzt oder mit bioaktiven Verbindungen versehen werden können. Sehr komplexe Konjugate werden zunehmend durch Kombination mehrerer *Click*-Prozesse aufgebaut, die in Reihe⁷⁹ oder parallel⁸² durchgeführt werden. Einige Arten multipler *Click*-Reaktionen wurden bereits in *Kapitel 1.5.5* näher vorgestellt.

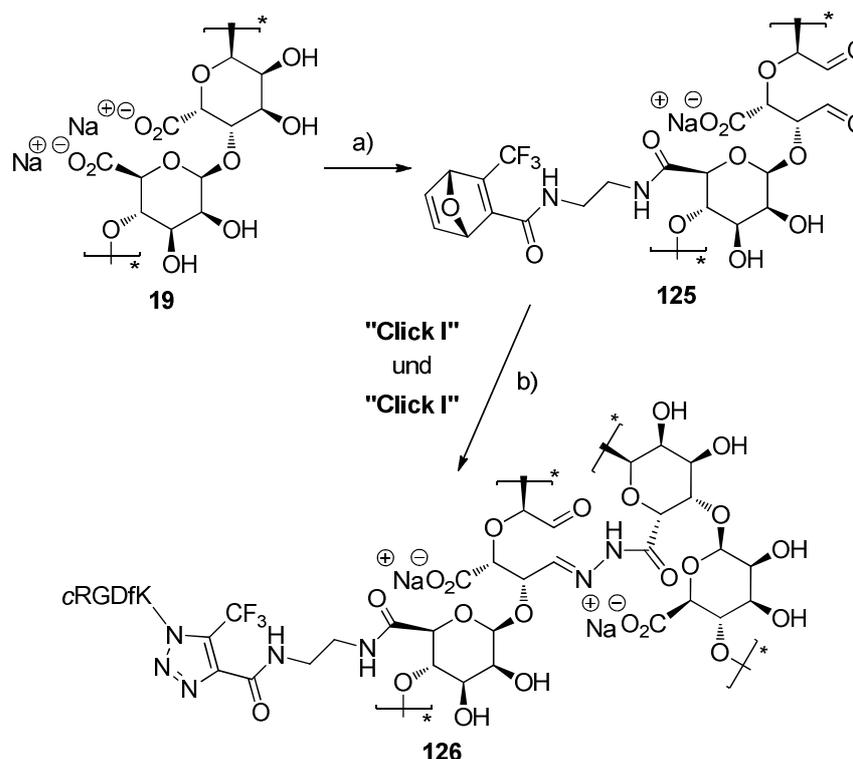
Nachdem in *Kapitel 6.4* die erfolgreiche Oxanorbornadien-medierte Ligation am Alginat erfolgreich vorgestellt wurde, und im darauf folgenden *Kapitel 6.5* detailliert die dazugehörige Analyse beschrieben wurde, war die Präparation bioaktiver Hydrogele der nächste Schritt. Das Herstellungsverfahren sollte analog zu den Imin-gebundenen und mit cRGD-dekorierten Alginat-Hydrogele erfolgen (*Kapitel 6.3.5*). Folglich wurde die Konjugation des Pentapeptids **82** über die Metall-freie 1,3-dipolare Cycloaddition und der *in situ* Gelierungsprozess durch die Hydrazonbildung angestrebt.^{75,157} In den folgenden Kapiteln werden unterschiedliche Strategien vorgestellt, wie beide Reaktionen für eine effektive Herstellung von Hydrogelen kombiniert werden können. Grundlage für die Realisierung der gewünschten Kombinationsvielfalt sind die gewählten, hoch chemoselektiv verlaufenden Reaktionen. Die Metall-freie Ligation benötigt Oxanorbornadien-, der Vernetzungsschritt hingegen Aldehydo-funktionalisiertes Alginat. Dabei können beide funktionelle Gruppen im Alginat unabhängig voneinander, orthogonal eingeführt werden, was ebenfalls für die sich anschließenden Triazol- und Hydrazon-*Click* Prozesse gilt.

6.6.1 Doppelte *Click* Strategie

cRGD-dekorierte Alginat-Hydrogele konnten über die doppelte *Click*-Strategie in nur zwei Eintopfschritten hergestellt werden. Im ersten Schritt wurden gleichzeitig das Oxanorbornadien-System wie auch die Aldehydo-Funktionalitäten in das Polysaccharid eingeführt (Synthese siehe *Kapitel 5.1* und *6.4.1*). Nach Dialyse und Lyophilisation

¹⁶⁰ P. Laverman, S. A. Meeuwissen, S. S. van Berkel, W. J. G. Oyen, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, O. C. Boerman, *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 749–757.

konnte das Oxanorbornadien-funktionalisierte Aldehydo-Alginat **125** erhalten werden. Die Alginat-Komponente **125** erlaubte die Durchführung einer sich anschließenden Metall-freien 1,3-dipolaren Cycloaddition mit nachfolgender Hydrazon-vermittelter Hydrogelierung in einem Schritt. Beide *Click*-Prozesse verliefen in einem Reaktionsansatz ohne Isolierung des Zwischenprodukts und entsprachen damit formal einer *Double-Click* Reaktion (Schema 52).



Schema 52: Die Oxidation und Funktionalisierung des Alginats mit dem Oxanorbornadien-System lieferte **125**. Die anschließend im Sinne eines *Double-Click* Prozesses durchgeführten Reaktionen ergaben das cRGD-dekorierte Alginat-Hydrogel **126**; a) H₂O, NaIO₄, DIPEA, EDC; HOBt, **101**; b) H₂O, Azido-cRGD **82**, Hydrazido-Alginat_{aq} **55**.

Der Nachweis der erfolgreichen Einführung beider Funktionalitäten im *Double-Click* Vorläufer **125** erfolgte per ¹H-NMR Spektroskopie (Abb. 54). Abhängig von den zugesetzten Äquivalenten von Oxanorbornadien **101** und Natriumperodat, konnten beide Derivatisierungsgrade unabhängig voneinander eingestellt werden. Somit war es möglich, sowohl den Grad der Dekoration, als auch die Gelierungsdauer/Stabilität der nachfolgend gebildeten Hydrogele **126**, vor dem eigentlichen *Click* Prozess einzustellen. Für die Präparation stabiler cRGD-dekorierte Hydrogele **126** wurde die Alginat-Komponente **125** mit 30%iger Oxanorbornadien-Funktionalisierung und 100%igem Oxidationsgrad hergestellt.

Eine Einschränkung des *Double-Click* Prozesses ist, dass das eingesetzte Azido-Derivat keine weiteren nukleophilen Positionen im Molekül besitzen sollten. Nukleophile, die

potentiell mit den Aldehyden des Alginats reagieren könnten, würden die nachfolgende Hydrogelierung unterbinden. Eine Konkurrenzsituation zum Angriff des Hydrazides sollte daher vermieden werden. Dadurch ist die Wahl der bioaktiven Azido-Derivate grundsätzlich eingeschränkt. Im Fall des eingesetzten cRGDs **82** stellt dies aber keine Hürde dar, da die Nucleophilie der basischen Guanidineinheit in Wasser nur sehr gering ist.

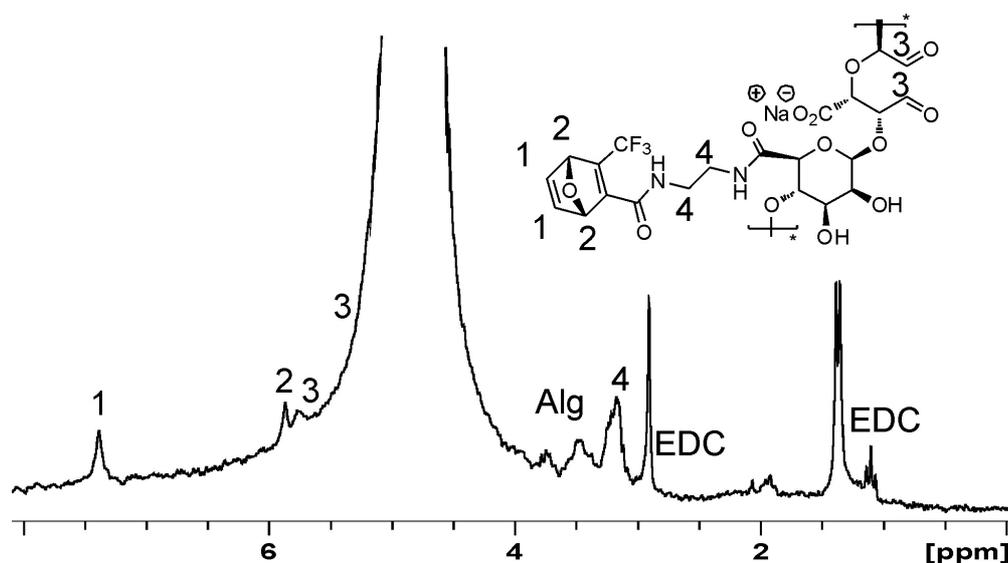


Abb. 54: ¹H-NMR Spektrum des Oxanorbornadien-funktionalisierten Aldehydo-Alginats **125** in D₂O.

Die per *Double-Click* hergestellten Gele **126** wurden für biologische Studien nicht eingesetzt. Die Herstellung der Gele erweist sich als sehr effektiv, besitzt aber einige präparative Nachteile. Die Gelierung erfolgt direkt nach Konjugation der RGD-Peptide, was bedeutet, dass alle wässrigen Lösungen bereits in gelierungsfähigen Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Für biologische Untersuchungen ist es aber essentiell, alle nicht kovalent gebundenen RGD-Moleküle zu entfernen (Kapitel 6.3.1). Folglich musste die Reaktionslösung nach der Ligation zunächst dialysiert werden. Dieser Dialyseschritt führte dazu, dass die gewünschten Konzentrationen nicht mehr gegeben waren und das Polymer erneut gefriergetrocknet werden musste. Anschließend musste das lyophilisierte RGD-dekorierte Aldehydo-Alginat **125** wieder in H₂O gelöst werden, um durch Zugabe von Hydrazido-Alginat **55** geliert zu werden. Aus dem synthetischen Eintopfprozess wurde somit im präparativen Sinne ein zweistufiges Verfahren. Die RGD-dekorierten Alginat-Gele **126** konnten grundsätzlich über die *Double-Click* Synthese erfolgreich hergestellt werden; für nachfolgende biologische Tests war dieses Präparationsverfahren jedoch unvorteilhaft.

6.6.1.1 Oxidationsempfindlichkeit des Oxanorbornadiensystems

Die Einführung der Aldehyde in das Polysaccharid erfolgte durch Oxidation mit NaIO_4 . Für die Synthese des Oxanorbornadien-funktionalisierten Aldehydo-Alginats **125** war somit die Stabilität des Oxanorbornadien-Systems gegenüber dem milden Oxidationsmittel Natriumperiodat erforderlich. Die Beständigkeit von **98** gegenüber NaIO_4 unter neutralen, wässrigen Bedingungen wurde sowohl massenspektrometrisch, als auch NMR-spektroskopisch überprüft. Das Oxanorbornadien-funktionalisierte Aldehydo-Alginat **125** konnte daher in einem Eintopf-Protokoll hergestellt werden.

6.6.2 Sequentielle Click Strategie

Neben der *Double-Click* Strategie wurde auch die *Sequential-Click* Strategie zur Herstellung bioaktiver Alginat-Gele genutzt. Im Gegensatz zum vorherigen Doppel-Click Protokoll, benötigt diese Methode insgesamt drei statt zwei Syntheseschritte. Zunächst wird Alginat mit dem Oxanorbornadien funktionalisiert, dialysiert und gefriergetrocknet, wodurch Verbindung **102** generiert wird. Anschließend wird die erste *Click*-Reaktion, die 1,3-dipolare Cycloaddition, unter Zugabe von Azido-cRGD **82** durchgeführt. Die Reaktion konnte per ^1H -NMR Spektroskopie verfolgt werden. Nach drei Tagen war der Umsatz vollständig (vgl. Abb. 51) und das Alginat wurde durch Zugabe von Natriumperiodat oxidiert. Dieser zweistufige Eintopf-Prozess generiert die gelierfähige, mit cRGD-dekorierte Aldehydo-Alginat Komponente **127** (Abb. 55 und Schema 53).

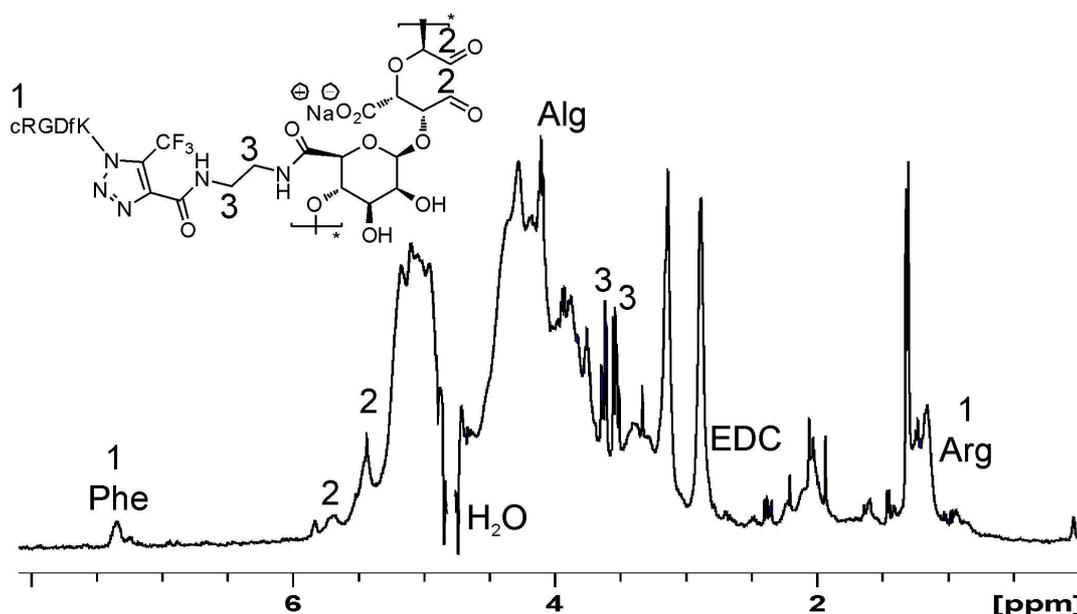
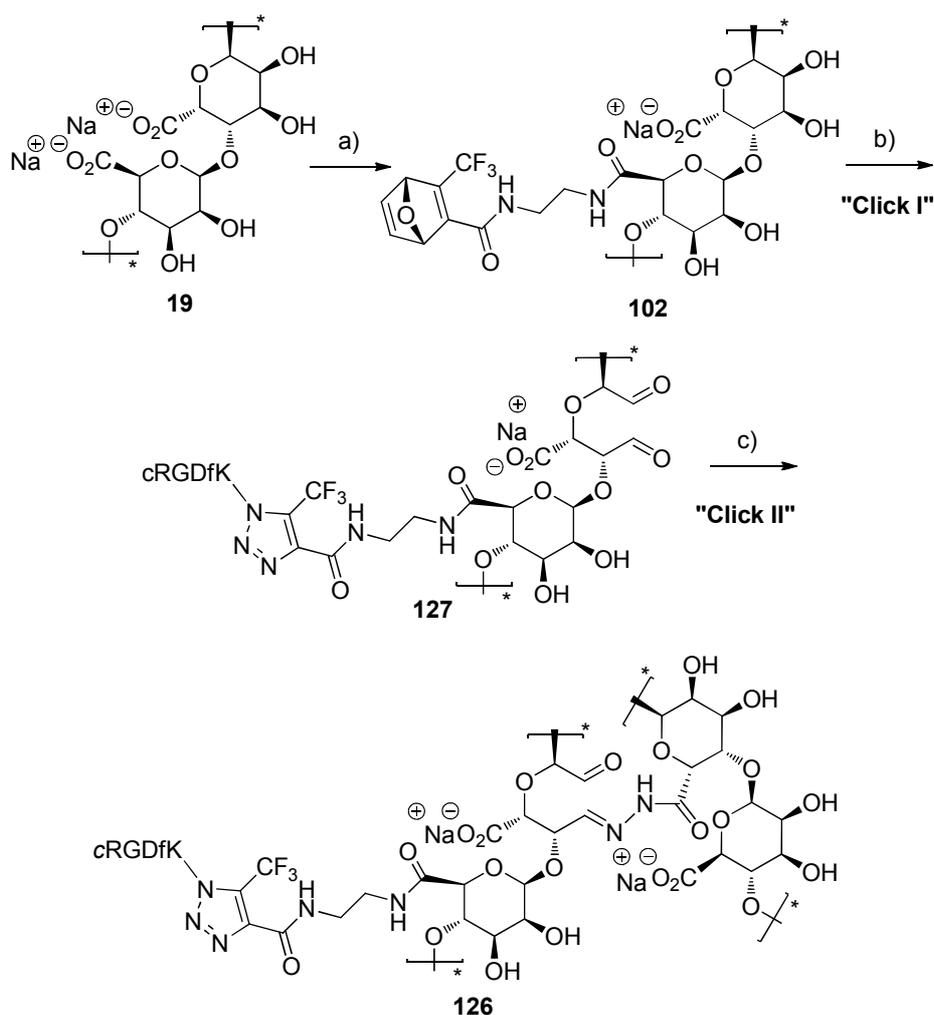


Abb. 55: ^1H -NMR Spektrum des cRGD-dekorierten Aldehydo-Alginats **127** in D_2O .

Die Hydrogelierung erfolgt durch Zugabe der in Wasser gelösten Hydrazido-Alginat Komponente **55**. Die zweite *Click*-Reaktion, die Bildung des Hydrazons, resultiert in der Vernetzung der Polymerketten und somit in der Hydrogelierung (Schema 53).



Schema 53: Zuerst wird Alginat **19** mit dem Oxanorbornadien-System **101** funktionalisiert. Anschließend wird Azido-RGD **82** Metall-frei an Verbindung **102** konjugiert und *in situ* zum Aldehydo-Alginat **127** oxidiert. Die Gelierung **126** erfolgt durch Zugabe der in Wasser gelösten Hydrazido-Alginat Komponente **55**; a) DIPEA, EDC; HOBT, **101**, H₂O; b) Azido-cRGD **82**, NaIO₄, H₂O; c) Hydrazido-Alginat_{aq} **55**.

Das mit cRGD dekorierte Alginat-Hydrogel **126** konnte somit in zwei nacheinander geschalteten *Click* Prozessen erzeugt werden. Auch bei diesem Ansatz ließ sich die Dekorationsdichte an cRGD durch den Grad der Oxanorbornadien-Funktionalisierung und die Gelierung durch den Oxidationsgrad steuern.

Als Einschränkung für die *Sequential-Click* Methode ist zu berücksichtigen, dass die konjugierten bioaktiven Verbindungen keine oxidationsempfindlichen Positionen aufweisen dürfen, da die Ligation vor der Natriumperiodat medierten Oxidation erfolgt. Im Falle des eingesetzten cRGDs **82** war dies nicht problematisch, da hier keine oxidationsempfindlichen Positionen oder Funktionalitäten vorhanden sind.

Diese schrittweise Herstellung von RGD-dekorierten Hydrogelen erwies sich für biologische Studien als wesentlich praktischer. Die gelierungsfähigen Aldehydo- und

Hydrazido-Komponenten des Alginats konnten auf konvergentem Wege synthetisiert werden. Sie wurden anschließend dialysiert, sterilisiert und gefriergetrocknet. Der letzte Schritt, die *in situ* Hydrogelierung, erfolgte durch Lösen von **127** im wässrigen Medium unter Zugabe des Hydrazido-Alginats **55**.

6.6.3 Biologische Evaluierung Triazol-ligierter Alginat-cRGD Hydrogele

Die RGD-dekorierten Alginat-Hydrogele **126** wurden für die biologischen Studien gemäß dem bereits entwickelten Protokoll vorbereitet (Kapitel 6.3.6). Alle Zelltests wurden von J. DAHLMANN in der Arbeitsgruppe GRUH im LEBAO, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem sequenziellen *Click* Prozess. Anschließend wurde eine Zellmischung, isoliert aus neonatalen Rattenherzen, auf den vollständig gelierten Gelen ausgesiedelt.

Zur Herstellung der cRGD-dekorierten Alginat-Hydrogele **126** wurde die Aldehydo-Komponente **102** mit 30%iger Oxanorbornadien-Funktionalisierung bei vollständiger Oxidation gewählt. Dabei wurde die Dekorationsdichte an cRGD variiert, um den quantitativen Einfluss des Peptids auf die Zelladhäsionsrate zu bestimmen. Abb. 56 zeigt das Verhalten der Zellmischungen in Abhängigkeit von der Anzahl ligierter cRGD-Moleküle nach dreitägiger Kultivierung.

Die in Abb. 56 angegebenen Anteile der RGD-Peptide in den Hydrogelen basieren auf den maximal möglichen Belegungsgraden. Für die Berechnung wurde von vollständigen Umsätzen bei der Metall-freien Cycloaddition ausgegangen. Die Zellfärbungen erfolgten über drei unterschiedliche Immunfluoreszenzfarbstoffe. Fibroblasten wurden grün durch Proylhydroxylase 4 (rPH4), Cardiomyocyten wurden rot durch Titin-Antikörper und Zellkerne wurden blau durch DAPI gefärbt. Im Fall des *Blanks* und der RGD-Belegungsichte von 1:10.000 wurden ausschließlich abgekugelte Zellen detektiert, was bedeutet, dass bei diesen Probestkörpern keine Zellen auf der Oberfläche der Gele adhären wurden. Ein ähnliches Verhalten wurde im Fall der Imin-ligierten RGD-Hydrogele erhalten (Kapitel 6.3.6). Mit steigendem Anteil konjugierter cRGD-Moleküle, 1:1.000 bis 1:50, wurden vermehrt Zellen in einer lang gestreckten Morphologie nachgewiesen (Abb. 56). Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass, äquivalent zur Anzahl konjugierter RGD-Moleküle die Menge adhärenter Zellen steigt.

Diese Verhaltensweisen belegen zum einen die grundsätzliche Aktivität der Triazol-ligierten cRGD-Peptide. Zum anderen konnte eine Korrelation zwischen der Zahl konjugierter RGD-Moleküle und der Zahl adhärenter Zellen gefunden werden. Unabhängig von einer absoluten Zellzählung konnte eine RGD-vermittelte Anlagerung der Zellen erreicht werden. Die Art der chemischen Ligation sowie auch der Hydrogelierungsprozess hatten weder auf die zelladhäsive Aktivität der cyclischen RGD Moleküle noch auf die Vitalität der Zellen negativen Auswirkungen.¹⁶¹

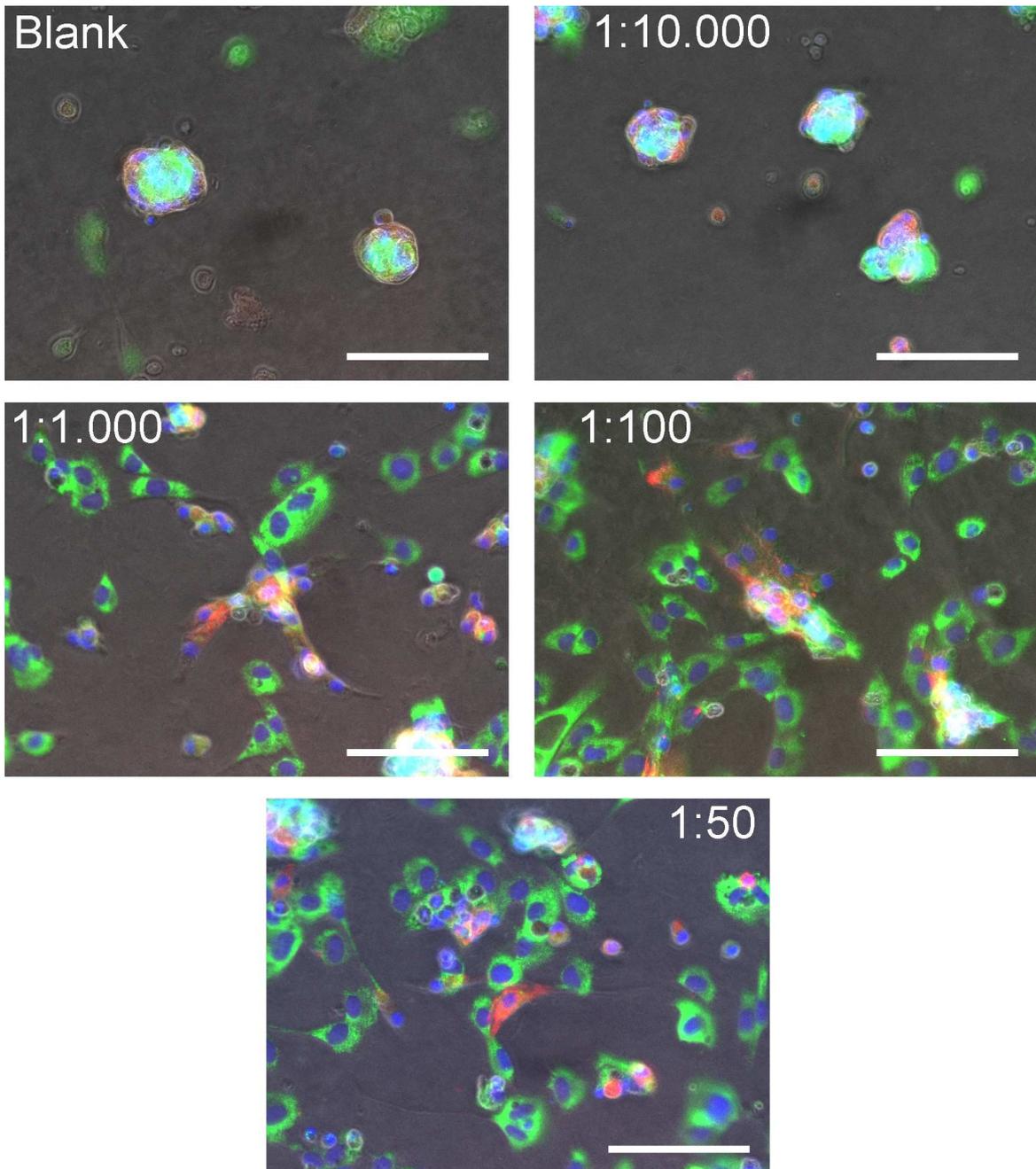


Abb. 56: Zellmischungen aus Fibroblasten und Cardiomyocyten, ausgesiedelt auf cRGD dekorierten Alginat-Hydrogelen **126**, gezeigt im Fluoreszenzmikroskop; Alginat-Gel ohne cRGD „Blank“; cRGD ligiert an jede 10.000ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 1.000ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 100ste monomere Einheit des Alginatstranges; cRGD ligiert an jede 50ste monomere Einheit des Alginatstranges (Rot: Titin, Grün:rPH4, Blau: DAPI). Maßstabsskala: 100 μm .¹⁶¹

Im Vergleich zu den Imin-konjugierten RGD-Gelen **97** waren hier deutlich mehr adhärenente Zellen erkennbar, bei gleicher Anzahl theoretisch konjugierter RGD-Moleküle. Dies ist wahrscheinlich auf die Umsätze in den jeweiligen Ligationsreaktionen zurückzuführen. Die 1,3-dipolare Cycloaddition lief nachweislich mit sehr hohen

¹⁶¹ A. Krause, J. Dahlmann, L. Möller, I. Gruh, A. Kirschning, G. Dräger, **2012**, in Vorbereitung.

Umsätzen ab (Abb. 50 und Abb. 51), die Imin-konjugierten Peptide unterlagen dagegen während des Dialyseprozesses der partiellen Hydrolyse. Diese Vermutung schien sich in den Zelltests zu bestätigen. Bei theoretisch identischen RGD-Belegungsgraden, war die Zahl adhärenter Zellen im Fall der Metall-freien Cycloaddition wesentlich höher (Abb. 44 und Abb. 56). Demzufolge ist die irreversible, Metall-freie Cycloaddition mit dem Oxanorbornadien-System gegenüber der reversiblen, hydrolysierbaren Imin-Ligation zu bevorzugen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

Das Thema der Arbeit behandelte die Herstellung von „intelligenten“, bioaktiven Hydrogelen für das *tissue engineering* im Rahmen der Regenerativen Medizin. Die entwickelten Gele wurden als Gerüstmaterial für die komplexe, dreidimensionale Zellkultivierung eingesetzt. Als Gerüstmaterial wurden native Makromoleküle gewählt, wobei der Fokus in dieser Arbeit auf das Biopolymer Alginat gerichtet war. Ein synthetischer Schwerpunkt lag auf den Gelierungsprozessen, über die die kovalente Vernetzung der Polymerstränge erfolgte. Ferner fokussierte sich die Arbeit auf die Dekoration der Polymere und die gezielte Einführung bioaktiver Moleküle. Neben Alginat wurden Hyaluronsäure und Gelatine verwendet, letztere wurden bereits in der Dissertation von L. MÖLLER bearbeitet.⁸⁹

Initial wurde die durch UV-Strahlung induzierte, radikalische Vernetzung der Polymere angestrebt. Neben Alginat wurden auch Hyaluronsäure und Gelatine mit methacrylischen Substraten modifiziert. Aus diesen wurden Gele bestehend aus einem Material wie auch diverse Blends durch Mischen der Polymere erzeugt. Die rapide verlaufenden Kettenpolymerisationen lieferten in wässrigen Medien Hydrogele mit sehr engmaschigen, kleinporigen Netzwerken, wie REM Aufnahmen belegten. Die physikalische Charakterisierung offenbarte, dass alle drei Biopolymere unterschiedliche Eigenschaften besaßen. Diese Diversität ermöglichte es, Gele mit individuellen Charakteristika, insbesondere auch synergistische Effekte, durch gezielte Zusammensetzungen zu kreieren. Ferner gaben mechanische Messungen über verschiedene Belastungstests detaillierte Informationen bezüglich der Stabilität sowie der Elastizität der Biopolymere, sowie den aus diesen generierten Gel-Kompositen.

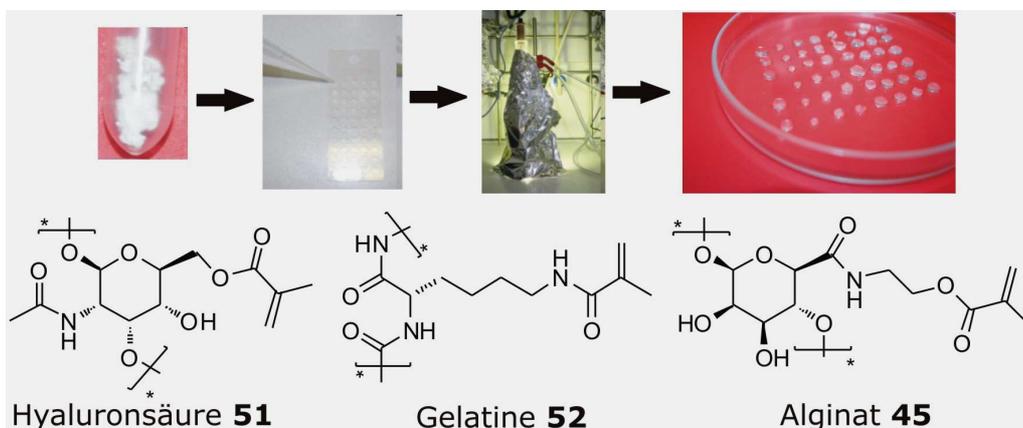


Abb. 57: Herstellungsprozess der radikalisch vernetzten Hydrogele (oben), realisiert durch Verknüpfung der methacrylierten Biopolymere Hyaluronsäure **51**, Gelatine **52** und Alginat **45** (unten).

Zusammenfassung

Insgesamt wurde ein modulares System aufgebaut, was es erlaubte, methacrylische Gele mit individuellen Merkmalen für eine gezielte Gewebekultivierung herzustellen. Auf Grund des hohen Energieeintrags bei der Bestrahlung und der Präsenz hoch reaktiver Radikale während der Vernetzung, erfolgte die biologische Bewertung erst nach der vollständigen Gelierung. *In vitro* Tests mit Zellmischungen, isoliert aus neonatalen Rattenherzen, zeigten sehr gute Biokompatibilitäten aller Gele an. Die gewünschte Adhäsion wurde jedoch nur für Gele basierend auf Gelatine beobachtet. Die Migration der Zellen in das kleinporige Netzwerk konnte in keinem der präparierten Gel nachgewiesen werden.

Für die Bereitstellung einer zweiten Generation von Gelen wurde ein verbessertes Verfahren entwickelt, welches die Gelierung in Gegenwart der Zellen ermöglichte. Dieses Zwei-Komponenten-System erlaubte es, die Zellen vor der Gelbildung homogen in den wässrigen Polymer-Lösungen zu verteilen. Als kovalente, *in situ* Vernetzungsstrategie wurden verschiedene Reaktionen untersucht, wobei sich die Hydrazon-vermittelte Verknüpfung als herausragend erwies. Die Bildung der Hydrazone beruhte auf spontan ablaufenden Kondensationsreaktionen zwischen Aldehydo- und Hydrazido-funktionalisierten Polymeren. Dieses Gel-System konnte sowohl auf Alginate wie auch auf Hyaluronsäure übertragen werden, was wiederum den Zugang zu einem modularen System eröffnete. Die Einführung der Hydrazide erfolgte über eine neuartige Reaktionsführung, während die Aldehyde über ein bereits etabliertes Verfahren erzeugt wurden. Die finale Gelierung erfolgte ohne Zugabe weiterer Additive, direkt nach Mischen beider Komponenten in wässrigen Medien.

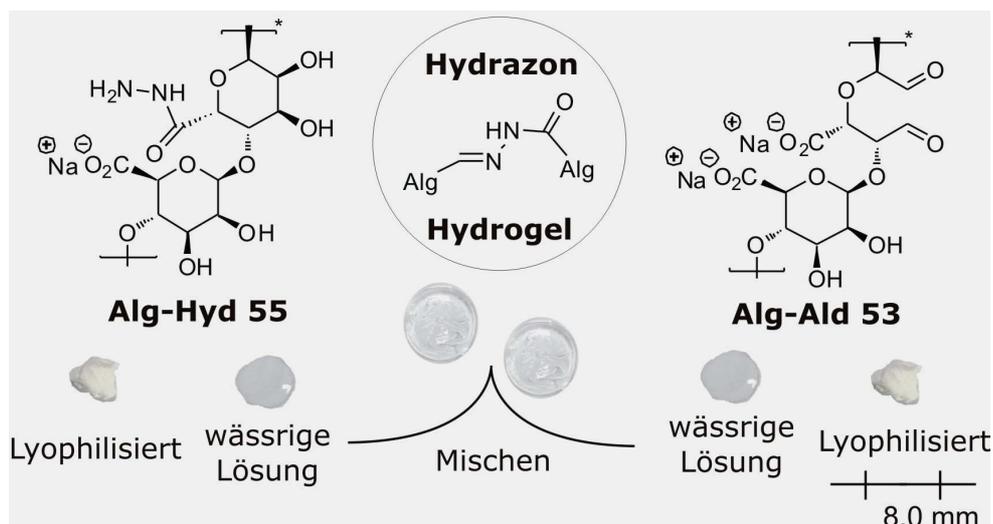


Abb. 58: Herstellungsprozess des *in situ* gelierenden Hydrogel-Systems, basierend auf Reaktionen zwischen Aldehydo- **53** und Hydrazido- **55** modifizierten Polymer-Komponenten, die eine kovalente Hydrazon-Vernetzung generieren, beispielhaft gezeigt am Polysaccharid Alginate.

Zusätzlich wurde die Bildung des Hydrazons auf niedermolekularer Ebene anhand von Modellreaktionen an Derivaten der Galacturonsäure analysiert. Hier konnte über die

Zusammenfassung

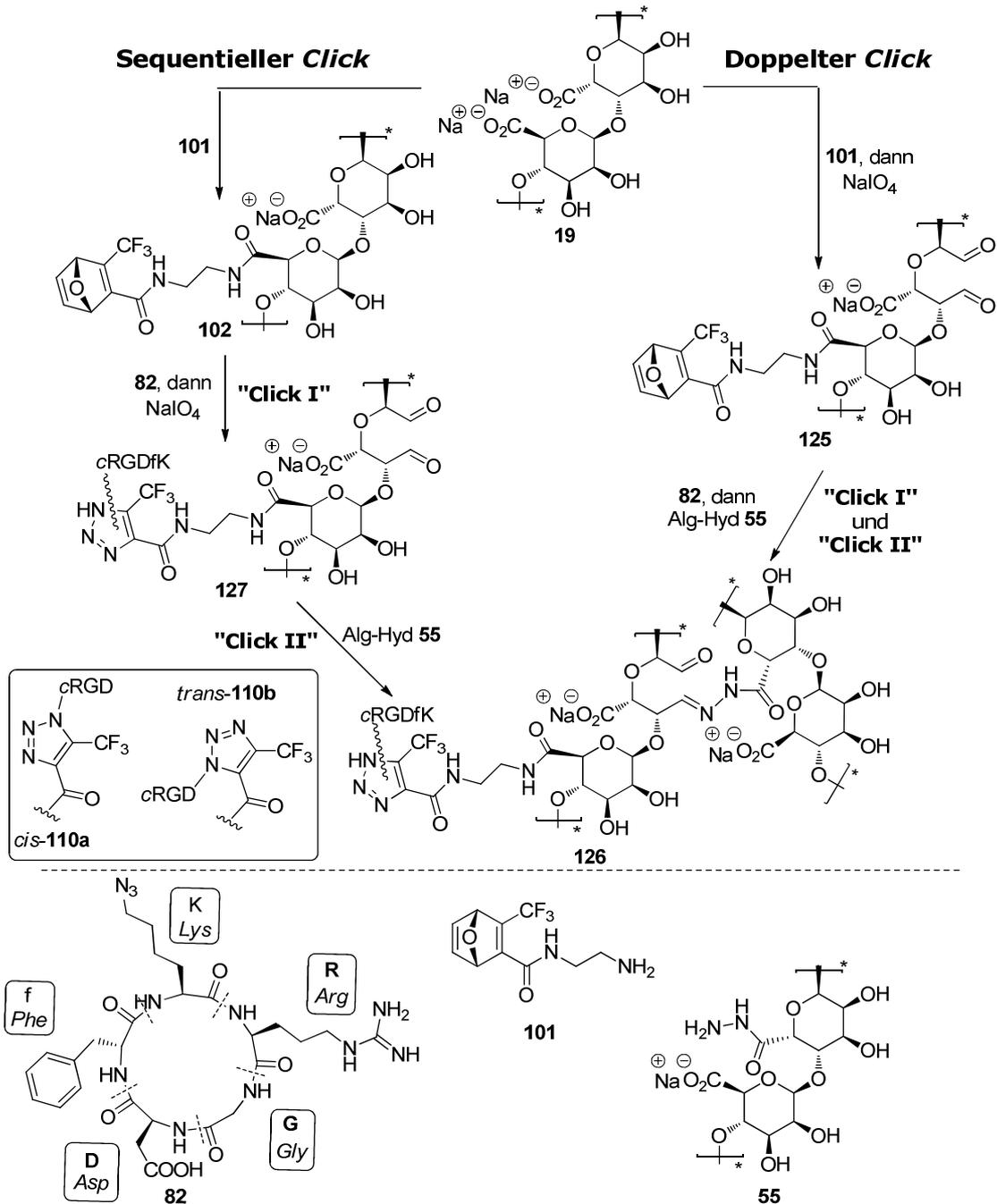
HSQC-Methode der NMR-Spektroskopie das Gleichgewicht zwischen Aldehyd und Hydrazone bei neutralem pH-Wert mit einem Verhältnis von 3:1 bestimmt werden. Analog zu den radikalisch erzeugten Gelen, wurde diese zweite Generation von Hydrogelen ebenfalls physikalisch charakterisiert. Die mechanischen Messungen dokumentierten wiederum spezifische Eigenschaften bezüglich Rigidität und Elastizität für die beiden Polysaccharide. Die Gelierungsdauer unterscheidet sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Gel-Zusammensetzung in geringem Maße. Die Quellwerte deckten auf, dass alle Gele ein konstantes Volumen innerhalb weniger Stunden erreichten, ohne ihre ursprüngliche Form zu verändern. Biologische Studien mit Zellmischungen aus neonatalen Rattenherzen belegten, dass die Mehrzahl der Zellen ihre Vitalität über den gesamten *in situ* Gelierungsprozess bewahrten (*Life-Dead Assay*). Die Zelladhäsion fand auch bei diesem System nur in Gegenwart von Proteinen statt. Unter Zugabe von Collagen konnten komplexe Myokardien (BCTs) innerhalb von 14 Tagen kultiviert und die aktiven wie auch passiven Kräfte des Muskels im Bioreaktor bestimmt werden. Ferner wurde die Bereitstellung der Polymer-Komponenten für ein steriles, effektives myocardiales *tissue engineering* optimiert. Langzeitstudien mit Fluoreszenz-markierten Gelen in haarlosen Mäusen belegten darüber hinaus eine vollständige *in vivo* Biokompatibilität. Ein enzymatischer oder hydrolytischer Abbau der Gele konnte bei diesen Tests aber nicht ermittelt werden.

Damit die Zelladhäsion auch ohne Zugabe von Collagen erfolgt, wurden im Folgenden cyclische RGD-Peptide eingesetzt. Diese wurden über verschiedene Ligationsstrategien kovalent an Alginat gebunden. Ein erster Ansatz basierte auf Imin-gebundene RGD-Alginat-Hydrogele, die per *in situ* Verfahren gebildet wurden. Zelltests mit Cardiomyocyten visualisierten die erfolgreiche Adhäsion und lieferten damit ein *proof of principle* des Konzeptes. Anschließend wurde eine irreversible, kovalente Konjugation am Polymer etabliert. Dazu wurde das Alginat mit dem Oxanorbornadien-System funktionalisiert **102** und Azido-RGD **82** in einer Metall-freien 1,3-dipolare Cycloaddition an dieses ligiert. Diese bioorthogonale Reaktion konnte erstmals auf makromolekularer Ebene realisiert und der Verlauf der Cycloaddition in Echtzeit per ¹H-NMR Spektroskopie in D₂O verfolgt werden. Die Analyse der gebildeten Ligationsprodukte am Polymer erfolgte anhand von Modellreaktionen mit adäquaten Monosacchariden. Mit Hilfe der ¹⁹F-NMR Spektroskopie konnten zwei regioisomere Triazole *cis*-**110a** und *trans*-**110b** als Hauptprodukte und ein Furanderivat als Nebenprodukt identifiziert werden.

Als nächstes galt es, die Metall-freie Ligation mit der kovalenten *in situ* Hydrazone-Gelierung in Einklang zu bringen. Beide Reaktionen werden nach aktueller Literatur als *Click* Reaktionen betitelt.^{75,157} Die Chemoselektivität der Cycloadditions- sowie der Kondensations-Reaktion, erlaubte es, die Prozesse variabel als *Double*- oder *Sequential-Click* durchzuführen. Der *Double-Click* generierte RGD-dekorierte Alginat-Hydrogele in zwei orthogonalen Eintopfsynthesen. Die sequentielle Reaktionsführung beinhaltete drei

Zusammenfassung

statt zwei Schritte. Bei dieser Strategie erfolgten Dekoration und Vernetzung nacheinander. Für biologische Studien erwies sich die letztere Methode als wesentlich praktischer, so dass Adhäsionsstudien mit RGD-funktionalisierten Gelen, generiert über den *Sequential-Click*, durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen belegten das erfolgreiche Anheften der Zellen an die Gel-Oberflächen, wobei die Anzahl adhärenter Zellen in etwa linear zur eingesetzten Menge der RGD-Peptide stieg. Im Vergleich zu den hydrolysierbaren Imin-Konjugaten, lieferten die Triazol-gebundenen RGD-Peptide wesentlich bessere Resultate.



Schema 54: Herstellung der RGD-dekorierten Alginat-Hydrogele **126** über den *Double-*, wie auch den *Sequential-Click* Ansatz. Die Metall-freie Cycloaddition am Oxanorbornadien-funktionalisierten Alginat **102** bzw. **125** resultierte in der Bildung zweier regioisomerer Triazole **110a** und **110b**.

7.2 Ausblick

Die Resultate der biologischen Tests zeigten, dass im Falle der radikalisch vernetzten Hydrogele ein Einwachsen der Zellen in das Innere nicht möglich ist, da die engmaschigen Netzwerke der Gele in ihren Dimensionen zu klein waren. Die Verwendung einer energiereichen UV-Quelle mit breitem Spektrum erzeugte eine Vielzahl reaktiver Radikale. Diese lösten parallel verlaufende Kettenreaktionen aus, was zu einem äußerst hohen Vernetzungsgrad führte.

Ein aktuell sehr vielversprechendes Forschungsfeld, die lasergesteuerte Photovernetzung, sollte diese Problematik umgehen. Diese sogenannte 2-Photonen-Polymerisation „2PP“ erlaubt den gezielten Aufbau drei-dimensionaler Netzwerke, da nur wenige Radikale lokal durch kurzpulsige Laser gebildet werden. Dadurch wird es möglich, Festkörper in unzähligen, definierten Porenstrukturen und Größen zu generieren. Die Verwendung dieser Technik erfolgte in Kooperation mit dem Laserzentrum Hannover. Dort konnte bereits gezeigt werden, dass Gelatine-Gele in einer komplexen drei-dimensionalen Struktur aufgebaut werden können.²⁰ Die gezielte Vernetzung methacrylierter Alginat würde die Möglichkeit bieten, diese ebenfalls definiert aufzubauen. Ein weiterer Ansatz, strukturierte Gelnetzwerke zu erhalten, könnte über den Lyophilisations-Prozess erreicht werden. Hier wäre die Herstellung von Cryogelen denkbar, in denen Poren durch das gezielte Auftauen gefrorener Hydratcluster gebildet werden.

Ebenfalls könnten weitere bioabbaubare Polymere in die Gele implementiert werden. Ein enzymatischer Abbau sollte es den Zellen dann ermöglichen, das sie umgebende Gelmaterial teilweise zu degradieren, um so eine eigene Matrices zu produzieren.

Bezüglich des *in situ* gelierenden Systems sollte das Augenmerk auf eine drei-dimensionale Zellkultivierung der RGD-dekorierten Gele gelegt werden. Aktuell konnte die RGD-induzierte Zelladhäsion nur im zwei-dimensionalen System erreicht werden. Analog zu den Ergebnissen des myocardialen *tissue engineering*s unter Zugabe von Collagen, ist auch im Falle der RGD-dekorierten Gele die Kultivierung autonom kontrahierender Myokardien zu verfolgen. Da die RGD-Sequenz spezifisch die Adhäsion der Zellen auslöst, sind weitere Signalfaktoren für eine komplexe Gewebekonstruktion nötig. Hier könnte die Ligation weiterer, spezieller Faktoren Abhilfe schaffen, die die Zellmigration und/oder die Vaskularisierung der Gewebe unterstützen. Insbesondere Faktoren, wie die der VEGF-Familie, könnten wichtige Fortschritte liefern. Diese könnten ebenfalls über das etablierte Oxanorbornadien-System an das Alginat ligiert werden.

Natürlich könnten neben den bereits evaluierten Vernetzungs- und Ligations-Strategien weitere kovalente Bindungstypen untersucht werden. Besonders Verknüpfungen, die unter physiologischen Bedingungen abgebaut werden, könnten das Ziel resorbierbarer

Ausblick

Gele zu erhalten, vermehrt in den Fokus bringen. Als ein sehr vielsprechender Ansatz gilt der enzymatische Abbau von Polymeren über Metalloproteasen.⁷⁸

Abb. 57 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit bereits untersuchten (Verbindungen **33-126**) und, basierend auf diesen Derivaten, weitere mögliche Ligations- und Verknüpfungsreaktionen.

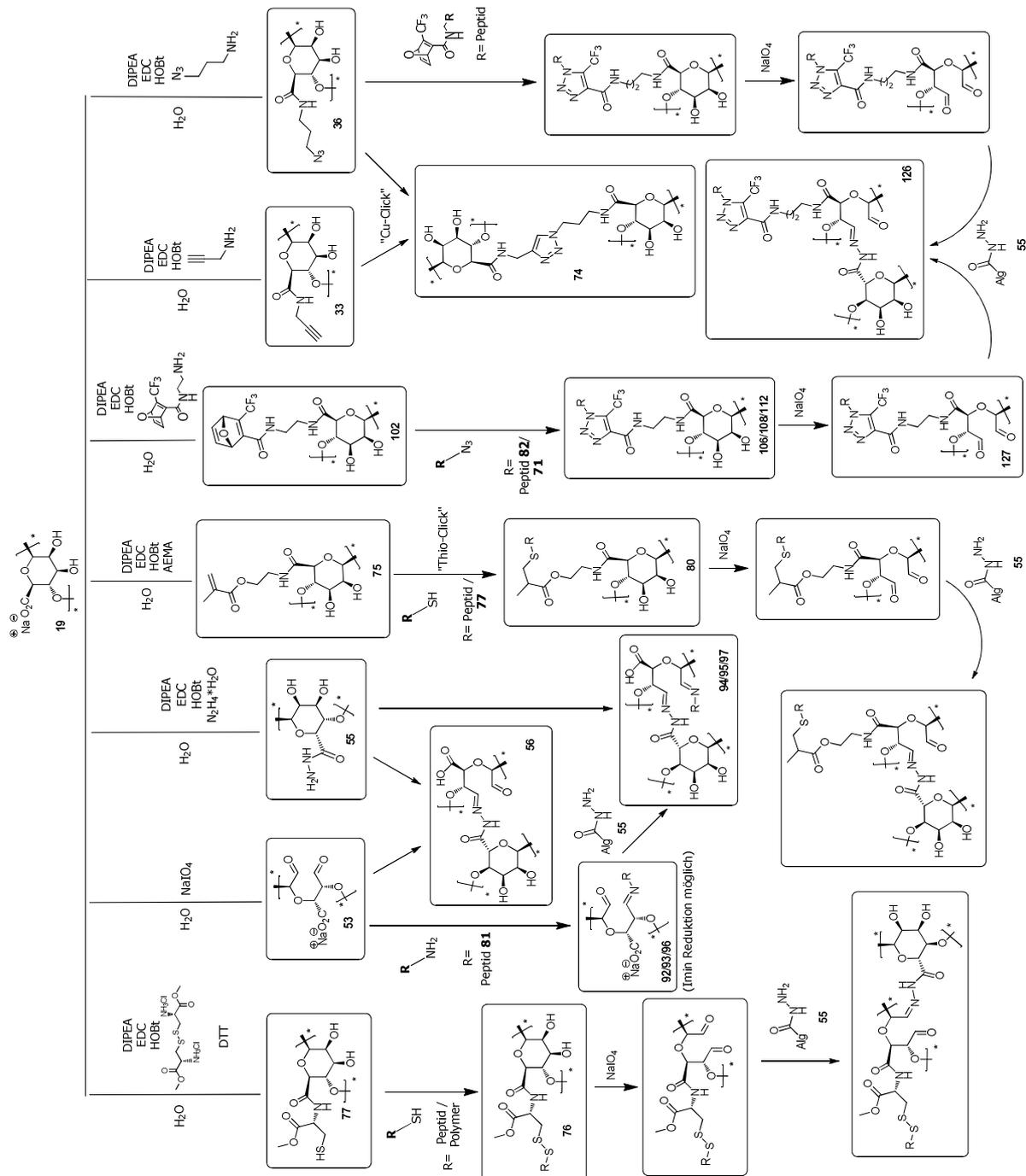


Abb. 59: Übersicht der bereits realisierten Ligationen und Verknüpfungen am Alginat (Verbindungen **33-126**) und den in Zukunft denkbaren Reaktionsstrategien.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

8.1.1 Verwendete Geräte

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Alle ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten DPX-200 (200 MHz), Advance-400 oder DPX-400 (400 MHz) der Firma BRUKER, Karlsruhe (Deutschland) gemessen. Die jeweiligen deuterierten Lösungsmittel sind den analytischen Daten zu entnehmen, wobei diese in allen Fällen von DEUTERO, Kastellaun (Deutschland) bezogen wurden. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in parts per million (ppm) im Vergleich zum Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels und die Kopplungen (J) der Signale sind in Hertz (Hz) angegeben. In den ^1H -NMR-Spektren ist die Multiplizität der Signale in Klammern mitangegeben und ist wie folgt abgekürzt: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multipllett. In den ^{13}C -NMR-Spektren ist der Bindungsgrad der Kohlenstoffkerne ebenfalls in Klammern angegeben und wie folgt abgekürzt: p = primär, s = sekundär, t = tertiär und q = quartär. Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen vorhandenen Wasserstoffatome wurde nach der DEPT 135 Methode bestimmt. Sofern nötig wurden zusätzliche NMR Experimente wie ^1H - ^1H -Korrelationsspektren (COSY) oder ^1H - ^{13}C -Experimente (HMQC, HMBC, HSQC) durchgeführt. Die Nummerierungen der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome in den NMR-Daten wurden pragmatisch festgelegt.

Hochdruckchromatographie (HPLC): Präparative HPLC-Chromatographie wurde mit der Anlage MERCK HITACHI LaChrom (Pumpe: L-7150, Interface D-7000 und einem Diode-Array-Detektor L-7450 $\{\lambda = 220\text{-}400\text{ nm}\}$) betrieben. Dabei wurde als stationäre Phase eine C-18-P_[A]Trentec Reprosil 120 C 18 AQ (5 mm, 250 mm Durchmesser: 25 mm) Säule verwendet.

Massenspektrometrie (MS): Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem MICROMASS LCT (Manchester, UK) mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695, Milford, USA). Alternativ wurden die Messungen an einer Acquity-UPLC Anlage (WATERS) gekoppelt mit einem QTOF Premier Massenspektrometer (WATERS) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI). Angegeben sind die berechnete und die gefundene Masse. Des Weiteren wurden Massenspektren von solchen Verbindungen die nicht über eine ESI-Analytik vermessen werden konnte mit einem Gerät des Typs FINNIGAN MAT 312 (EI) bei einem Ionisierungspotential von 70 eV aufgenommen.

Experimenteller Teil

Mikrowellengerät: Mikrowellenreaktionen wurden mit einer Discover S-Class Mikrowelle der Firma CEM GMBH (Kamp-Lintfort, Deutschland) mit einer maximalen Leistung von 300 Watt durchgeführt.

IR-Spektroskopie: IR-Spektren wurden mit einem ATR-FT-IR Spektrometer (vector 22) von BRUKER gemessen.

Photochemie: Als UV-Lichtquelle für Polymerisationsreaktionen wurde eine Niederdruck-Quecksilberlampe TNN 15/32 mit einer Leistung von 15 W und einer Spannung von 55 V verwendet, die Licht bei 254 nm emittiert.

Säulenchromatographie: Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland) Korngröße: 40-63 μm unter leichtem Überdruck durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden einfach destilliert; das Eluentenverhältnis ist in den jeweiligen Versuchsvorschriften angegeben.

Dünnschichtchromatographie (DC): Analytische Chromatographie wurde mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ (MERCK, Darmstadt, Deutschland) Schichtdicke: 0.2 mm durchgeführt. Die Indikation erfolgte mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$ oder durch Färbung mit Kaliumpermanganat-, Ninhydrin-, Iod- und Cer(IV)-tauchreagenzien und anschließender Wärmezufuhr.

Schmelzpunkte: Schmelzpunkte wurden mit dem Heiztischmikroskop Optimelt der Firma SRS (STANFORD RESEARCH SYSTEMS, Sunnyvale, USA) bestimmt.

Elementar Analysen (CHN): Elementaranalysen mit einem Vario EL Gerät (ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME, Deutschland) durchgeführt.

Gefriertrocknung: Die Lyophilisation der Polymere erfolgte durch Sublimation gefrorener wässriger Polymerlösungen mit dem Gerät Alpha 2-4 (CHRIST, Clausthal, Deutschland).

Dialyse: Die Dialyse der Polymere erfolgte in den Dialyseschläuchen Visking (CARL ROTH, Deutschland) mit einer Ausschlussgrenze MWCO von 14.000 g/mol.

8.1.2 Verwendete Chemikalien

Lösungsmittel: Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen *pro analysi* Qualität und wurden über Molekularsieb (4 Å) gelagert. Ferner wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet.

Deuterierte Lösungsmittel: Zur Messung der NMR-Spektren wurden die vollständig deuterierten Lösungsmittel Wasser, Chloroform, Dimethylsulfoxid und Methanol verwendet. Deuteriochloroform wurde über Natrium gelagert.

Chemikalien: Die Polysaccharide Natrium Alginat *-low-viscosity-* und Natrium Alginat *-very low viscosity-* wurden von ABCR und Propylenglykol-Alginat von *spectrumchemicals* (Gardena, CA, USA) bezogen. Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren bei den Firmen *Acros Organics*, *Fluka* und *Aldrich* kommerziell erhältlich.

8.1.3 Grundsätzliches zur präparativen Durchführung

Alle Reaktionen der Alginat wurden als 1%ige (*w/v*) Lösungen angesetzt. Um homogene Gemische zu erhalten, wurden die Alginat unter starkem Rühren gelöst und anschließend bei 50°C bis zur vollständigen Homogenität temperiert. Synthesen, die unter Zugabe von Kupplungsreagenzien verliefen, wurden nach folgendem Muster durchgeführt. Zuerst wurden die Reaktionslösungen durch Zugabe von Pufferreagenzien oder Basen auf einen gewünschten pH-Wert gebracht, anschließend wurde das Kupplungsreagenz und, sofern vorhanden, das Co-Aktivierungsreagenz zugegeben. Nach einstündigem Rühren und Bildung des Aktivesterintermediates wurde das eigentliche Nukleophil zugegeben. Die Beendigung der Reaktion, inklusive Reinigung, erfolgte durch Fällen der wässrigen Polymerlösung in organischem Solvens. Nach Sedimentation oder ggf. nötiger Zentrifugation des Polymers wurde dieses vom organischen Solvens getrennt und wiederum in destilliertem Wasser gelöst. Abschließend erfolgte die Dialyse gegen wässrige Natriumchlorid-Lösung und/oder destilliertem Wasser über mehrere Tage, bei mindestens dreimal täglichem Wechsel des Dialysemediums. Die Trocknung der Polymere erfolgte durch Lyophilisation. Sofern im Text nicht anders erwähnt, wurde das Natrium Alginat *-very low-viscosity-* eingesetzt.

Zur radikalischen Polymerisation methacrylierter Polymere wurde eine 1%ige Initiatorlösung durch Lösen von Irgacure 2959 (11.4 mg) in H₂O_{dest.} (1170 mL) hergestellt.

8.1.4 Analytische Methoden

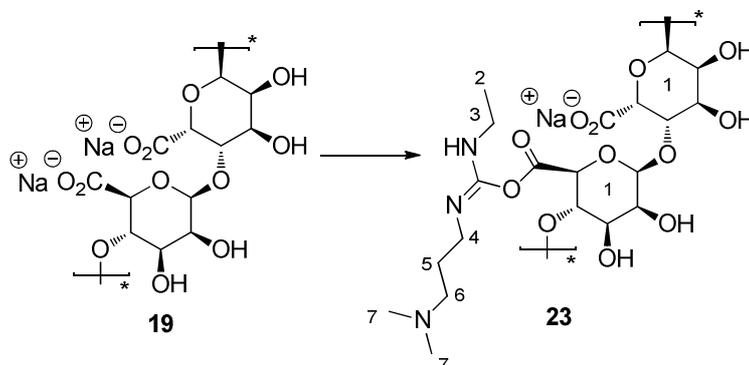
Die Analytik der durchgeführten Reaktionen erfolgte mit Hilfe der ¹H-NMR- oder IR-Spektroskopie. Auf Grund der hohen Viskosität des Alginats und dessen Derivaten (Löslichkeit: ca. 3 mg in 1 mL D₂O) konnten lediglich ¹H-NMR Spektren erhalten werden. Für eine ¹³C-spektroskopische Analyse wurden Substanzmengen benötigt, die die Viskosität der Lösung so stark erhöhten, dass die Relaxationszeiten zwischen den einzelnen Pulsen zu gering wurden. Eine Verringerung der Pulsfrequenz brachte keine entscheidenden Verbesserungen. Verbindungen mit charakteristischen Infrarot (IR)-

Experimenteller Teil

Schwingungen konnten *via* Infrarot-Spektroskopie verifiziert werden. Um kovalente Bindungen nach Modifizierung der Biopolymere zu validieren, wurden alle Proben vor der Analyse in einem organischen Lösungsmittel gefällt und anschließend intensiv, mindestens drei Tage bei täglichem dreimaligen Wasserwechsel, gegen destilliertes Wasser dialysiert.

8.4 Synthesen der Verbindungen **23** bis **127**

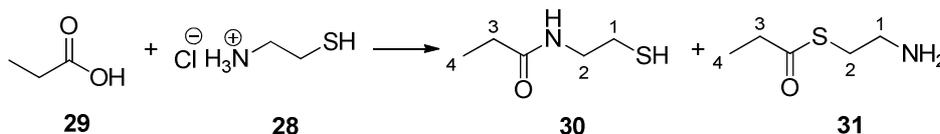
8.4.1 Synthese des Alginat-Aktivesters **23**



Zu einer homogenen Lösung von Natrium Alginat **19** (50.0 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (5 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (62 μL , 0.38 mmol, 1.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (34.1 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (72.6 mg, 0.38 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (20 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das funktionalisierte Alginat **23** (45.8 mg, 0.19 mmol, 79%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 3.20-3.11 (m, 2H, H-6), 2.91-2.86 (m, 6H, H-7), 1.93-1.86 (m, 4H, H-4, H-5), 1.35 (q, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.04 Hz, 2H, H-3), 1.08 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.03 Hz, 3H, H-2) ppm.

8.4.2 Synthese von *N*-(Mercaptoethyl)-propionamid **30**



Propionsäure **29** (99 μL , 1.35 mmol, 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (15 mL) gelöst, Triethylamin (411 μL , 2.97 mmol, 2.2 Äq), 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (310 mg, 2.03 mmol, 1.5 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (520 mg, 2.7 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und die Lösung für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurde 2-Aminoethan-1-thiol **28** (153 mg, 1.35 mmol, 1.0 Äq) gegeben und diese für weitere 10 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Diethylether (10 mL), 1M wässriger HCl-Lösung (1 mL) und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (5 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wiederholt mit Dichlormethan (je 5 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und bei vermindertem Druck die Lösungsmittel entfernt. Es wurde ein Feststoffgemisch

Experimenteller Teil

von *N*-(2-Mercaptoethyl)-propionamid **30** und Thiopropionsäure-(2-aminoethyl)ester **31** (115.6 mg, 0.87 mmol, 64%) in einem 1:2 Verhältnis erhalten.

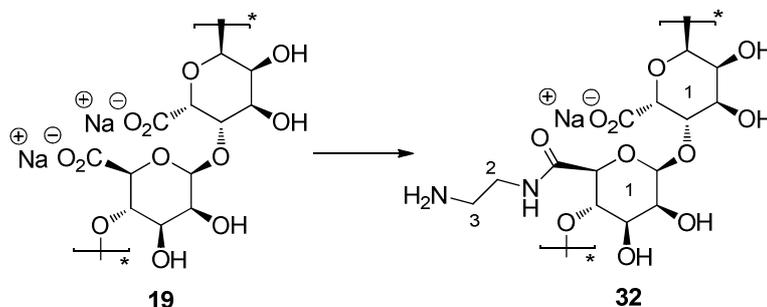
N-(2-Mercaptoethyl)-propionamid **30**:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 3.44 (t, ³J_{H,H} = 6.66 Hz, 2H, H-2), 2.97 (t, ³J = 6.83 Hz, 2H, H-1), 2.21-2.16 (m, 2H, H-3), 1.12-1.06 (m, 3H, H-4) ppm. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₅H₁₁NOSNa⁺: 156.0459 [M+Na]⁺, gefunden 156.0456.

Thiopropionsäure-(2-aminoethyl)ester **31**:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 3.28 (m, 2H, H-2), 2.79 (t, ³J_{H,H} = 6.66 Hz, 2H, H-1), 2.17-2.12 (m, 2H, H-3), 1.09-1.05 (m, 3H, H-4) ppm. **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₅H₁₁NOSNa⁺: 156.0459 [M+Na]⁺, gefunden 156.0456.

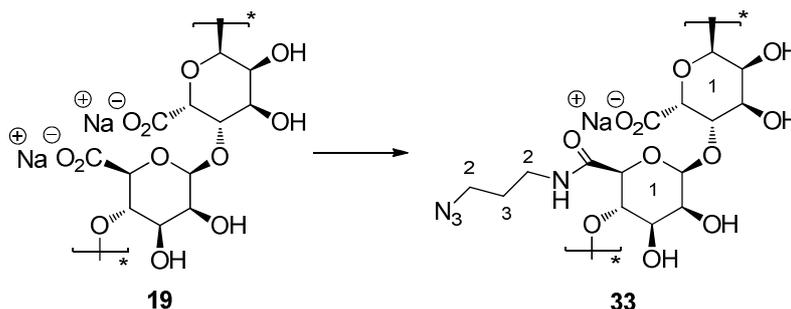
8.4.3 Funktionalisierung von Alginat mit Ethylendiamin **32**



Zu einer homogenen Lösung von Natrium Alginat **19** (50.0 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq) in H₂O_{dest.} (5 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (62 μ L, 0.38 mmol, 1.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (34.1 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (72.6 mg, 0.38 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. In diese Reaktionslösung wurde Ethylendiamin (25.4 μ L, 0.38 mmol, 1.5 Äq) getropft und die Mischung weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (20 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Amino-funktionalisierte Alginat **32** (40.8 mg, 0.17 mmol, 67%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 3.66-3.54 (m, 2H, H-2), 3.23-3.17 (m, 2H, H-3) ppm.

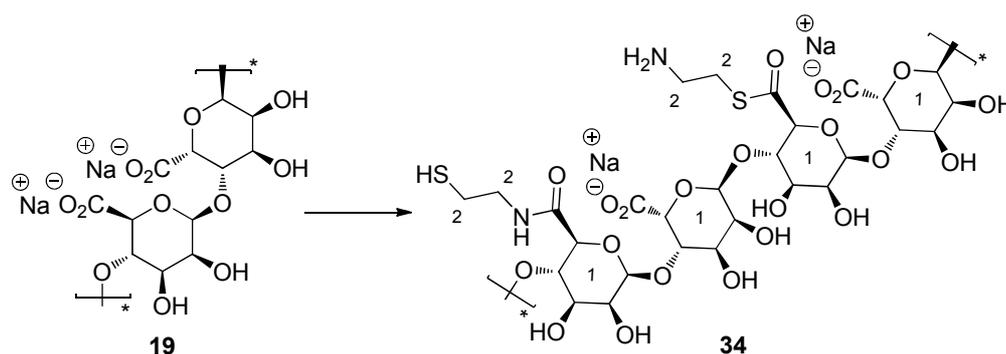
8.4.4 Funktionalisierung von Alginat mit 3-Azido-pentamin **33**



Zu einer homogenen Lösung von Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (10 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (208 μL , 1.26 mmol, 2.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (156.0 mg, 1.02 mmol, 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (244.5 mg, 1.26 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurden 3-Azido-pentamin (75 μL , 0.75 mmol, 1.5 Äq) getropft und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Azido-funktionalisierte Alginat **33** (95.2 mg, 0.33 mmol, 65%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 4.95\text{-}3.60$ (m, 7H, H-1), 3.45 (m, 1H, H-2), 3.34 (m, 1H, H-2), 3.27 (m, 1H, H-2), 3.20 (m, 1H, H-2), 2.04 (m, 1H, H-3), 1.88 (m, 1H, H-3) ppm; **APX-IR** 2106 cm^{-1} (m, N_3); **Elementar-Analyse**: gef. C: 33.3%, H:5.4%, N:5.7%, ber. C: 41.5%, H: 5.9%, N: 19.3%.

8.4.5 Funktionalisierung von Alginat mit 2-Aminoethan-1-thiol **34**



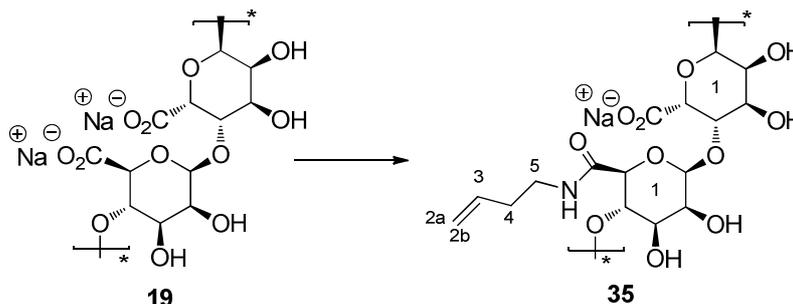
Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in MES-Pufferlösung (10 mL: 0.5 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat und 5 mM Natriumchlorid) homogen gelöst. Dazu wurden 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (156.0 mg, 1.02 mmol, 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (244.5 mg, 1.26 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurden 2-Aminoethan-1-thiol (68.8 mg, 0.61 mmol, 1.2 Äq) gegeben und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL)

Experimenteller Teil

gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das sowohl Thio- als auch Amino-funktionalisierte Alginat **34** (85.6 mg, 0.36 mmol, 71%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 4.95\text{-}3.60$ (m, 7H, H-1), 3.36-3.4 (m, 2H, H-2), 3.22-3.18 (m, 2H, H-2), 2.92-2.89 (m, 2H, H-2), 2.88-2.86 (m, 2H, H-2) ppm.

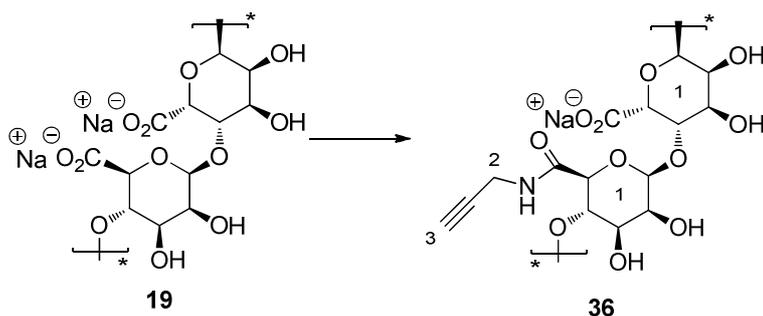
8.4.6 Funktionalisierung von Alginat mit 3-Buten-1-amin-Hydrochlorid **35**



Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in MES-Pufferlösung (10 mL, 0.5 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat und 5 mM Natriumchlorid) homogen gelöst. Dazu wurden 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (156.0 mg, 1.02 mmol, 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (244.5 mg, 1.26 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und diese Lösung für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurden 3-Buten-1-amin (53.4 mg, 0.75 mmol, 1.5 Äq) gegeben und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das modifizierte Alginat **35** (95.6 mg, 0.42 mmol, 82%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 5.85$ (m, 1H, H-3), 5.17 (m, 1H, H-2a), 5.11 (m, 1H, H-2b), 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 3.36-3.34 (m, 2H, H-5), 2.34-2.25 (m, 2H, H-4) ppm; **Elementar-Analyse**: gef. C: 32.8%, H:5.4%, N:1.1%, ber. C: 49.2%, H: 5.8%, N: 5.8%.

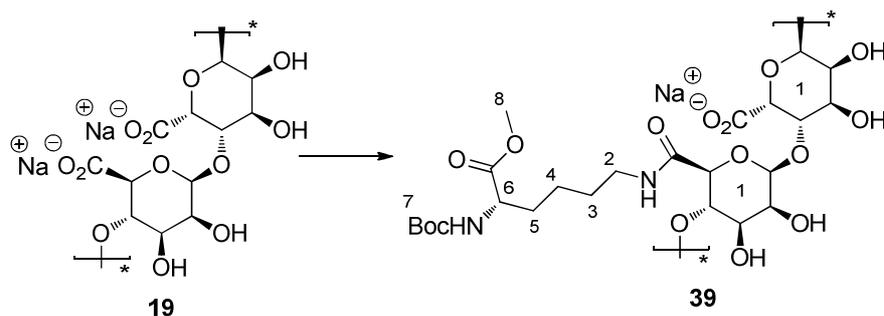
8.4.7 Funktionalisierung von Alginat mit Propargylamin **36**



Zu einer homogenen Lösung von Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (10 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (208 μL , 1.26 mmol, 2.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (156.0 mg, 1.02 mmol, 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (244.5 mg, 1.26 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurde Propargylamin (48 μL , 0.75 mmol, 1.5 Äq) getropft und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das modifizierte Alginat **36** (101.8 mg, 0.48 mmol, 94%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 2.73 (m, 1H, H-2), 2.64 (m, 1H, H-2), 1.89 (m, 1H, H-3) ppm; **Elementar-Analyse**: gef. C: 33.8%, H:5.2%, N:1.5%, ber. C: 49.2%, H: 5.8%, N: 5.8%.

8.4.8 Herstellung von *N*-Boc-Lysinmethylester-funktionalisiertem Alginat **39**



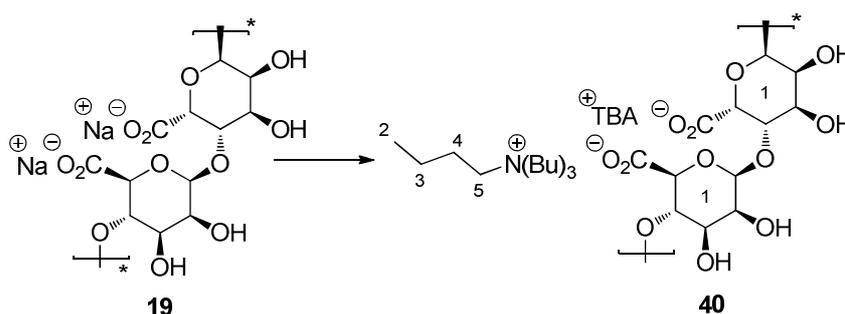
Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in MES-Pufferlösung (10 mL: 0.5 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat und 5 mM Natriumchlorid) homogen gelöst. Zu der Lösung wurden *N*-Hydroxysuccinimid (58.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (96.5 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) zugegeben, für 1 h gerührt und anschließend *N*-Boc-L-Lysinmethylester-Hydrochlorid (150.5 mg, 0.61 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Lysin

Experimenteller Teil

dekorierte Alginat **39** (92.0 mg, 0.022 mmol, 43%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 4.95\text{--}3.60$ (m, 7H, H-1), $3.21\text{--}3.10$ (m, 5H, H-2, H-6, H-5), 2.90 (s, 3H, H-8), 1.43 (s, 9H, H-7), $1.22\text{--}1.18$ (m, 4H, H-3, H-4) ppm; **Elementar-Analyse**: gef. C: 35.0%, H: 5.6%, N: 3.1%, ber. C: 51.9%, H: 7.4%, N: 6.1%.

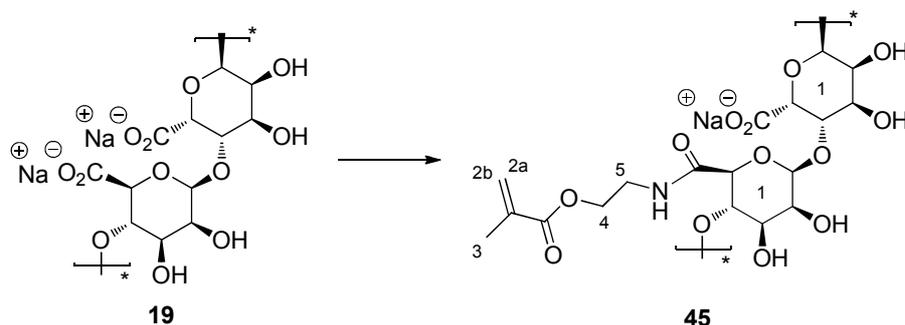
8.4.9 Synthese des Alginat Tetrabutylammonium-Salzes **40**



Amberlit IR-120 H^+ (100 mL) wurde mit Methanol, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und erneut mit Methanol bis zur Farblosigkeit des Filtrats gewaschen. Anschließend wurde Natronlauge (1N, 1000 mL) zugegeben und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bis zur Neutralität des Filtrats gewaschen. Die Beladung des Ionenaustauschers erfolgte mit 10-fachem Mengenüberschuss an Tetrabutylammoniumbromid. TBA-Bromid (10.0 g) wurde zusammen mit dem gereinigten Harz (100 mL) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (100 mL) gegeben und die Suspension für 24 h gerührt. Der Ionenaustauscher wurde filtriert und bis zur Farblosigkeit des Filtrats mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült. Nachfolgend wurde Natrium Alginat **19** (1.0 g, 5.05 mmol) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (100 mL) gelöst, der beladene Ionenaustauscher in die Lösung gegeben und die Suspension für 24 h gerührt. Nach Filtration des Ionenaustauschers wurde dieser wiederholt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und die erhaltene wässrige Lösung lyophilisiert. Es wurde das Tetrabutylammoniumbromid-Salz des Alginats **40** (1.03 g, 3.00 mmol, 60%) als farbloses, watteartiges Polymer erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 4.95\text{--}3.60$ (m, 7H, H-1), 3.21 (t, $^3J = 8.36$ Hz, 2H, H-5), $1.70\text{--}1.59$ (m, 2H, H-4), $1.41\text{--}1.32$ (m, 2H, H-3), 0.94 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 3H, H-2) ppm.

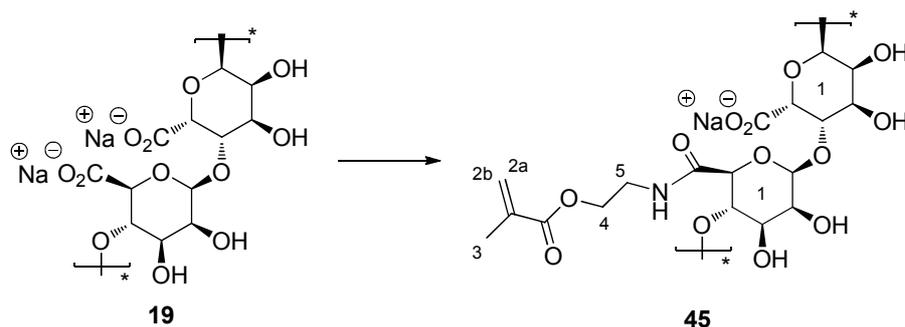
8.4.10 Funktionalisierung von Alginat mit Aminoethylmethacrylat **45** in MES-Puffer



Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in MES-Pufferlösung (10 mL, 0.5 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat und 5 mM Natriumchlorid) homogen gelöst. Dazu wurden 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (68.3 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (145.2 mg, 0.75 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1h gerührt. Zu dieser Mischung wurden unterschiedliche Äquivalente von Aminoethylmethacrylat gegeben (siehe Tabelle 3) und die erhaltene Lösung für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das methacrylierte Alginat **45** (115.0 g, 0.37 mmol, 72%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 6.15 (m, 1H, H-2a), 5.76 (m, 1H, H-2b), 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 3.17-3.07 (m, 4H, H-4, H-5), 1.94-1.86 (m, 3H, H-3) ppm.

8.4.11 Funktionalisierung von Alginat mit Aminoethylmethacrylat **45**



Zu einer homogenen Lösung von Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) in H₂O_{dest.} (10 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (125 μ L, 0.75 mmol, 1.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (68.3 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (145.2 mg, 0.75 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurden variierende Mengen von 2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid (Tabelle 7) gegeben und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL)

Experimenteller Teil

gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das methacrylierte Alginat **45** (105.3 mg, 0.33 mmol, 66%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

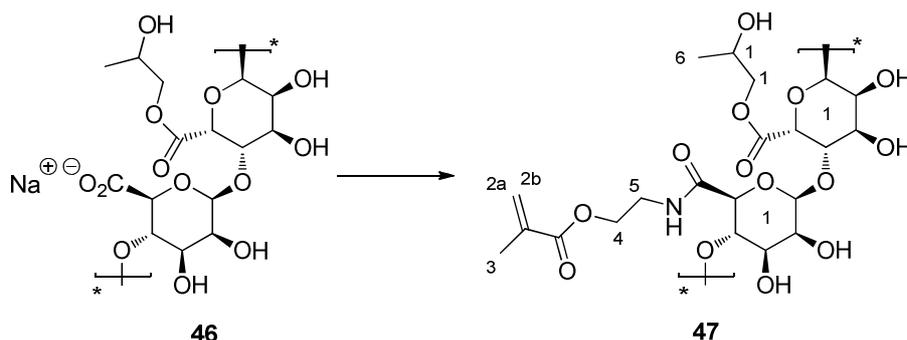
Tabelle 7: Eingesetzte Mengen von Aminoethylmethacrylat **44**.

Äquivalente	Molzahl [mmol]	Masse [mg]
2.00	1.01	167.3
1.20	0.61	101.0
1.00	0.51	84.5
0.50	0.25	41.4
0.45	0.23	38.1
0.23	0.12	19.9
0.20	0.10	16.5

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 6.16 (m, 1H, H-2a), 5.74 (m, 1H, H-2b), 4.95-3.60 (m, 7H, H-1), 3.24-3.12 (m, 4H, H-4, H-5), 1.96-1.92 (m, 3H, H-3) ppm.

Entsprechend der eingesetzten Menge an AEMA **44** änderte sich das integrale Verhältnis der Protonen des Alginatrückgrats zur Aminoethylmethacrylateinheit.

8.4.12 Funktionalisierung von Propylenglykol-Alginat mit Aminoethylmethacrylat **47**



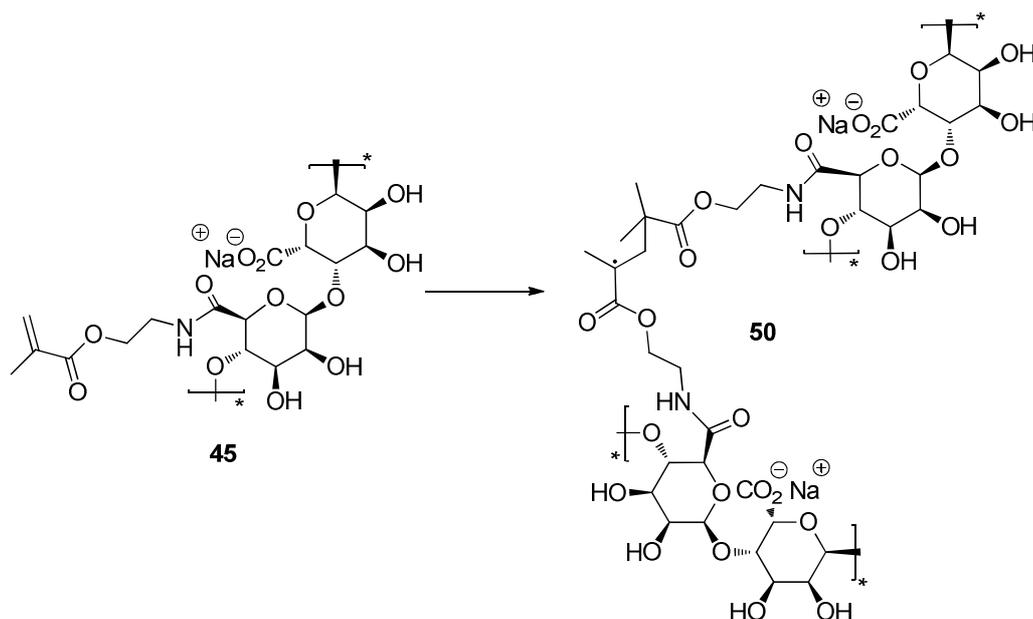
Zu einer homogenen Lösung von Propylenglykol Alginat **46** (100.0 mg, 0.43 mmol, 1.0 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (10 mL) wurden *N,N*-Diisopropylethylamin (106 μL , 0.64 mmol, 1.5 Äq.), 1-Hydroxybenzotriazol-Monohydrat (57.8 mg, 0.43 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (122.9 mg, 0.64 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Zu dieser Mischung wurde 2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid **44** (71.2 mg, 0.43 mmol, 1.0 Äq) gegeben und die Lösung weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das methacrylierte

Experimenteller Teil

Propylenglykol Alginat **47** (95.8 mg, 0.33 mmol, 78%) wurde als farbloses, watteartiges Polymer erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 6.14 (m, 1H, H-2a), 5.71 (m, 1H, H-2b), 4.95-3.50 (m, 9H, H-1), 3.22-3.14 (m, 4H, H-4, H-5), 1.94-1.87 (bs, 3H, H-3), 1.26-1.10 (m, 3H, H-6) ppm.

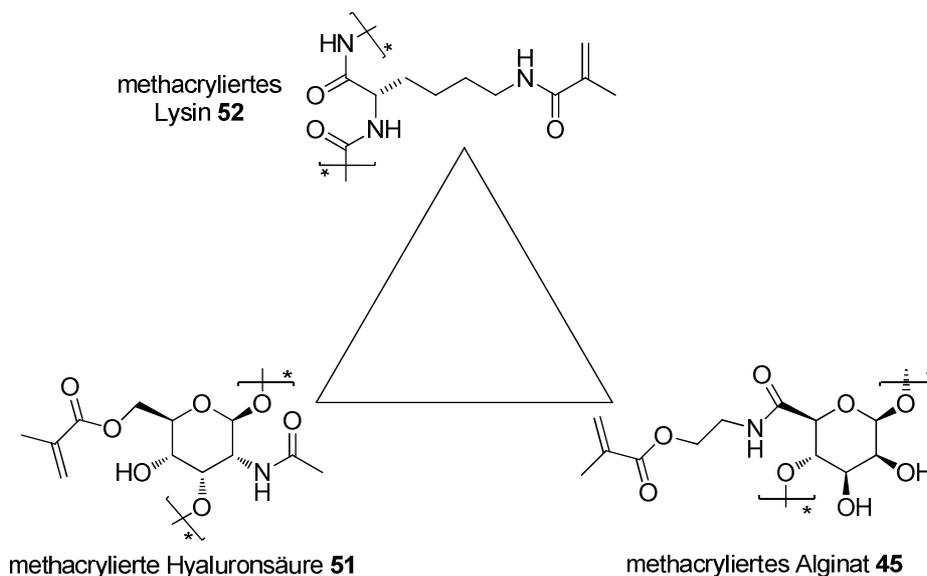
8.4.13 Hydrogele aus methacryliertem Alginat **50**



Methacryliertes Alginat **45** (95.8 mg) wurde in 1%iger wässriger Initiator-Lösung (100 μ L) durch Temperieren für 1 h bei 50°C bis zur Homogenität gelöst. Die erhaltene polymere 3%ige Lösung wurde in *Culturewells*[™] mit einem Lochdurchmesser von 3 mm pipetiert und anschließend für 30 Min. mit ultraviolettem Licht einer Quecksilberlampe bestrahlt. Die gebildeten Hydrogele wurden aus den *Culturewells*[™] entfernt und lyophilisiert.

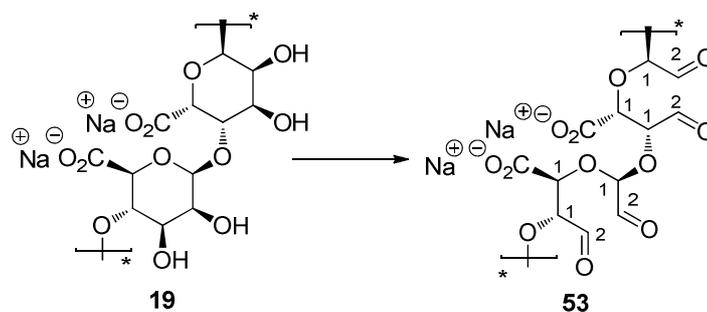
Experimenteller Teil

8.4.14 Hydrogele aus den methacrylierten Biopolymeren: Alginat **45**, Hyaluronsäure **51** und Gelatine **52**



Methacryliertes Polymer (3 mg) wurde in 1%iger wässriger Initiator-Lösung (100 μ L) durch temperieren für 1 h bei 50°C gelöst. Die homogenen 3%igen Lösungen wurde in *Culturewells*[™] mit einem Lochdurchmesser von 3 mm pipetiert und anschließend für 30 Min. mit ultraviolettem Licht einer Quecksilberlampe bestrahlt. Die Zusammensetzung der jeweilig hergestellten Blends wurde durch Einwaage der Polymere bestimmt. Die gebildeten Hydrogele wurden aus den *Culturewells*[™] entfernt und lyophilisiert.

8.4.15 Herstellung von Aldehydo-Alginat **53**



Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol) wurde in H₂O_{dest.} (10 mL) bis zur Homogenität gelöst. Dazu wurden unter Lichtausschluss variierende Mengen (Tabelle 8) von Natriumperodat zugegeben und die Reaktionslösung 24 h gerührt. Die Lösung wurde für 3 Tage gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das oxidierte Alginat **53** (95.0 mg, 0.48 mmol, 94%) wurde in Form eines weißen, watteartigen Polymers erhalten.

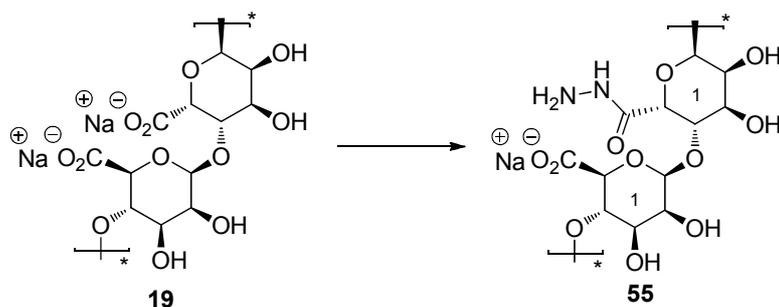
Experimenteller Teil

Tabelle 8: Eingesetzte Mengen von NaIO₄ per 100 mg Natrium Alginat **19**.

Äquivalente	Mohlzahl [mmol]	Masse [mg]
0.15	0.07	16.2
0.25	0.12	26.7
0.50	0.25	53.5
0.75	0.37	80.2
1.00	0.51	107.0
3.00	1.53	320.8
6.00	3.06	641.7

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 5.51–4.95 (m, 2H, H-2), 4.95–3.60 (m, 3H, H-1) ppm.

8.4.16 Herstellung von Hydrazido-Alginat **55**



Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in H₂O_{dest.} (10 mL) bis zur Homogenität gelöst. In diese Lösung wurden *N,N*-Diisopropylamin (85 μ L, 0.51 mmol, 1.0 Äq), 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (116.0 mg, 0.75 mmol, 1.5 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (193.5 mg, 1.01 mmol, 2.0 Äq) gegeben, für 1 h gerührt und anschließend wurden variierende Mengen (Tabelle 9) von Hydrazin-Hydrat zugegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktion verfärbte sich die Lösung gelb. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Hydrazido-Alginat **55** (90.0 mg, 0.42 mmol, 82%) wurde als farbloses, watteartiges Polymer erhalten.

Experimenteller Teil

Tabelle 9: Eingesetzte Mengen an $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per 100 mg Natrium Alginat **19**.

Äquivalente	Mohlzahl [mmol]	Volumen [μL]
0.50	0.25	12.7
1.00	0.51	25.1
3.00	1.53	89.1
6.00	3.06	178.2
16.00	8.16	475.4

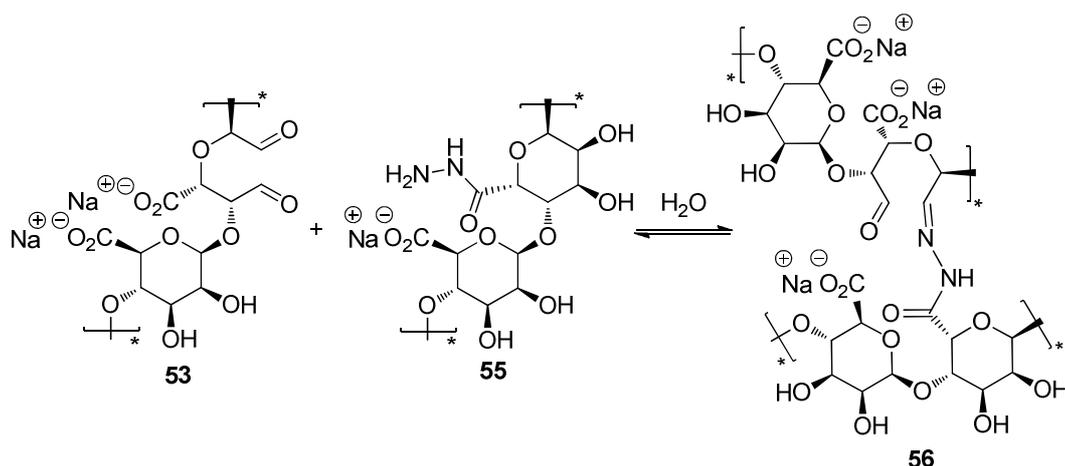
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 3.60–4.95 (m, 7H, H-1) ppm;

Elementar-Analyse: gef. Siehe Tabelle 10, ber. C: 40.9%, H: 6.4%, N: 13.7%.

Tabelle 10: Ergebnisse der CHN-Analyse des Hydrazido-Alginats **55**.

Äquivalente $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	CNH-Analyse
0.50	C: 33.4%, H: 5.8%, N: 5.1%
1.00	C: 33.4%, H: 5.7%, N: 5.4%
3.00	C: 33.6%, H: 5.6%, N: 5.5%
6.00	C: 34.3%, H: 6.1%, N: 5.9%
16.00	C: 34.6%, H: 6.2%, N: 7.4%

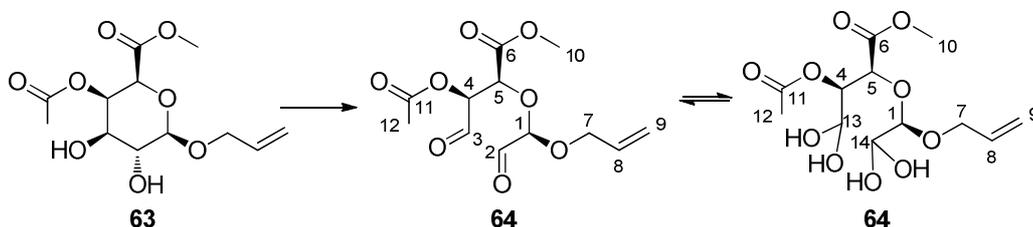
8.4.17 Hydrogele aus Aldehydo-Alginat **53** und Hydrazido-Alginat **55**



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen wurden Aldehydo-Alginat **53** (2 mg) und Hydrazido-Alginat **55** (2 mg) in wässrigem Medium (100 μL) unter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Als wässrige Medien wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, isotonische Kochsalzlösung oder Nährmedium verwendet. Beide Polymerlösungen wurden unter Rühren miteinander vermischt. Entsprechend des jeweilig vorliegenden

Oxidationsgrades der einen Polymerkomponente und des Derivatisierungsgrades der anderen Komponente variierte die Dauer der Gelierung zwischen einer und zehn Minuten.

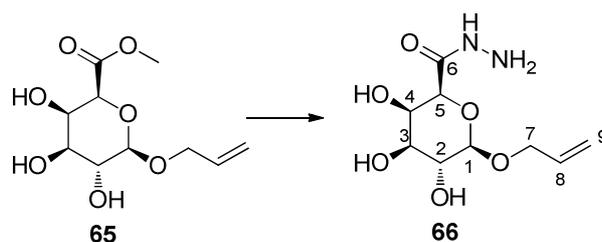
8.4.18 Oxidation von Methyl(allyl-4-O-acetyl- β -D-galactopyranosid)urinats **63**



Unter Lichtausschluss wurden Methyl(1-allyl,4-O-acetyl- β -D-galactopyranosid)urinats¹⁴⁷ **63** (50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq) und Natriumperodat (55.8 mg, 0.26 mmol, 1.5 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) gelöst. Nach 30 Min. wurde das Reaktionsgemisch mit Bariumcarbonat (51.3 mg, 0.26 mmol, 1.5 Äq) versetzt, dieses für weitere 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0°C gekühlt. Die ausgefallenen Bariumsalze wurden abfiltriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und die erhaltene Lösung gefriergetrocknet. Das oxidierte Galactopyranosid **64** (52.8 mg, 0.18 mmol, 89%) konnte als farbloser Feststoff gewonnen werden, welcher ohne weitere Reinigung in weiteren Reaktionen eingesetzt wurde. Die Isolierung des oxidierten Galacturonsäurederivates ohne Zerfall des Moleküles konnte nicht erreicht werden.

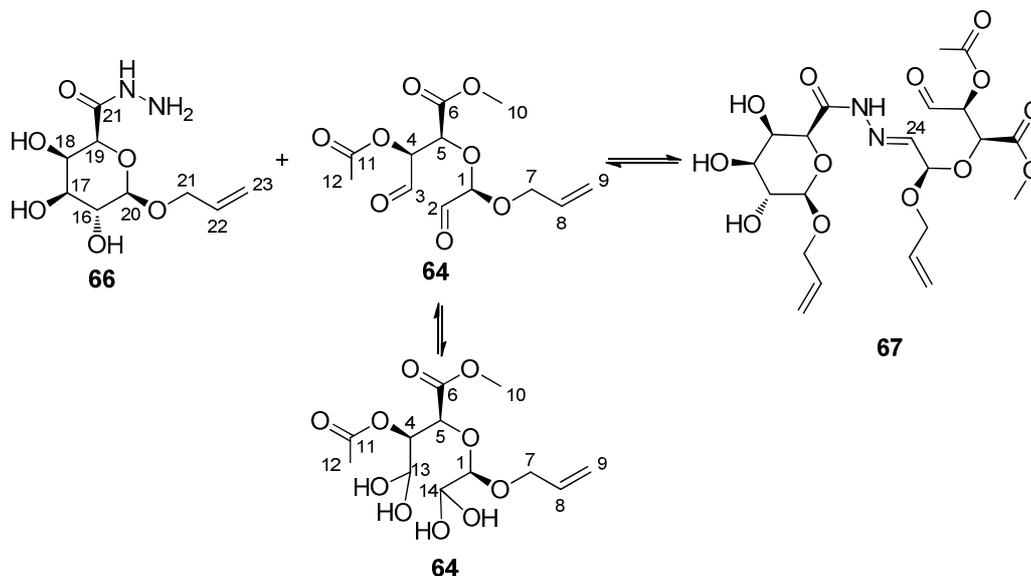
¹H-NMR (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 8.44 (s, 1H, H-2, H-3), 5.97 (m, 1H, H-8), 5.37 (dd, $^3J_{9,8(\text{E})}$ = 16.07 Hz, $^2J_{9,9}$ = 1.71 Hz, 1H, H-9), 5.27 (dd, $^3J_{9,8(\text{Z})}$ = 9.05 Hz, $^2J_{9,9}$ = 1.19 Hz, 1H, H-9), 4.46 (m, 1H, H-7), 4.49 (d, $^3J_{1,2(\text{aa})}$ = 7.85 Hz, 1H, H-1), 4.47 (d, $^3J_{5,4(\text{ae})}$ = 1.02 Hz, 1H, H-5), 4.42 (m, 1H, H-7), 4.28 (dd, $^3J_{4,5(\text{ea})}$ = 1.02 Hz, $^3J_{4,3(\text{ea})}$ = 3.75 Hz, 1H, H-4), 4.24 (m, 1H, H-7), 3.83 (s, 3H, H-10), 3.74 (dd, $^3J_{3,2(\text{aa})}$ = 9.90 Hz, $^3J_{3,4(\text{ae})}$ = 3.41 Hz, 1H, H-13), 3.59 (dd, $^3J_{2,3(\text{aa})}$ = 9.90 Hz, $^3J_{2,1(\text{aa})}$ = 8.19 Hz, 1H, H-14), 3.38 (s, 3H, C-12) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, D_2O): δ = 175.0 (q, C-6), 171.1 (q, C-3, C-2), 170.5 (q, C-11), 133.4 (t, C-8), 118.8 (s, C-9), 101.4 (t, C-1), 74.1 (t, C-5), 72.1 (s, C-13), 70.7 (s, C-7), 70.1 (s, C-14), 69.6 (t, C-4), 48.9 (p, C-10), 23.3 (p, C-12) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{Na}$: 347.0954 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gefunden 347.0939 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

8.4.19 Hydrazido-(1-allyloxy- β -D-galactopyranosid)urinat **66**



1-Allyloxy-galacturonsäuremethylester¹⁴⁷ **65** (50 mg, 0.202 mmol, 1.0 Äq) wurde in Methanol (2 mL) gelöst, Hydrazin-Hydrat (29 μ L, 0.605 mmol, 3.0 Äq) zugetropft und die Lösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert, mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst und gefriergetrocknet. Eine Erhöhung der Ausbeute konnte durch Zugabe von Petroleumether zum Filtrat und nachfolgender Kristallisation gewonnen werden. Hydrazido-Galactopyranosid **66** (29 mg, 0.117 mmol, 58%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes gewonnen.

¹H-NMR (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 6.00 (m, 1H, H-8), 5.39 (dd, $^3J_{\text{trans}}$ = 17.24 Hz, 2J = 1.54 Hz, 1H, H-9), 5.30 (dd, $^3J_{\text{cis}}$ = 9.73 Hz, 2J = 0.85 Hz, 1H, H-9), 4.49 (d, $^3J_{\text{aa}}$ = 7.85 Hz, 1H, H-1), 4.43 (m, 1H, H-7), 4.29 (d, $^3J_{\text{ae}}$ = 1.02 Hz, 1H, H-5), 4.23 (dd, $^3J_{\text{ea}}$ = 0.68 Hz, $^3J_{\text{ea}}$ = 2.73 Hz, 1H, H-4), 4.27 (m, 1H, H-7), 3.72 (dd, $^3J_{\text{aa}}$ = 9.90 Hz, $^3J_{\text{ae}}$ = 3.41 Hz, 1H, H-3), 3.56 (dd, $^3J_{\text{aa}}$ = 9.90 Hz, $^3J_{\text{aa}}$ = 7.85 Hz, 1H, H-2); **¹³C-NMR** (100 MHz, D_2O): δ = 168.8 (q, C-6), 133.2 (t, C-8), 118.7 (s, C-9), 101.5 (t, C-1), 74.5 (t, C-5), 72.3 (t, C-3), 70.7 (s, C-7), 70.2 (t, C-2), 69.0 (t, C-4); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$: 271.0906 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gefunden 271.0893 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; **Elementar-Analyse**: ber. C: 43,5%, H: 6,5%, N: 11,3%; gef. 40,2%, H: 6,9%, N: 10,7%.

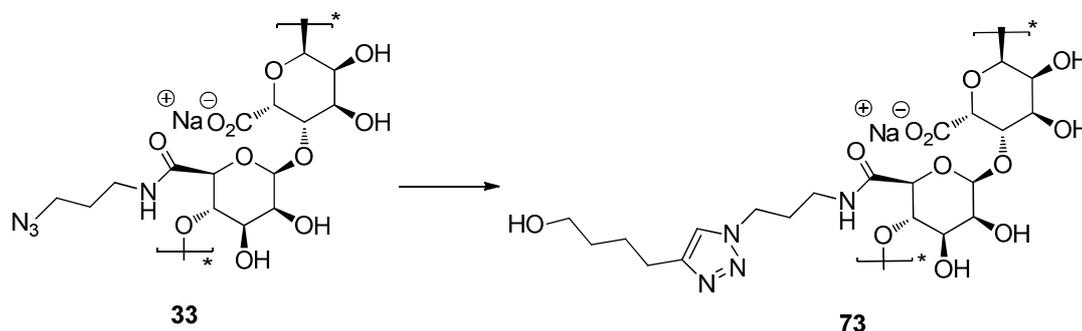
8.4.20 Hydrazonbildung zwischen Hydrazido- **66** und Aldehydo- **64**
 Galacturonsäure


Das Aldehydo-Derivat des Galactopyranosids **64** (20 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq) wurde mit dem Hydrazido-Derivat des Galactopyranosids **66** (23.3 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq) in Wasser (5 mL) gelöst und für 1 h gerührt. Nach Lyophilisation wurde ein weißer Feststoff (41.8 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq) isoliert, welcher in deuteriertem Methanol und deuteriertem Wasser weiter untersucht wurde. Die Identifizierung der Hydrazonebindung **67** wurde mittels HSQC-Spektroskopie erreicht werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 8.38 (s, 1H, H-2, H-3), 8.04 (s, 1H, H-24), 6.00 (m, 1H, H-22), 5.97 (m, 1H, H-8), 5.39 (dd, $^3J_{\text{trans}} = 17.24$ Hz, $^2J = 1.54$ Hz, 1H, H-23), 5.37 (dd, $^3J_{9,8(\text{E})} = 16.07$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.71$ Hz, 1H, H-9), 5.30 (dd, $^3J_{\text{cis}} = 9.73$ Hz, $^2J = 0.85$ Hz, 1H, H-23), 5.27 (dd, $^3J_{9,8(\text{Z})} = 9.05$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.19$ Hz, 1H, H-9), 4.49 (d, $^3J_{\text{aa}} = 7.85$ Hz, 1H, H-20), 4.49 (d, $^3J_{1,2(\text{aa})} = 7.85$ Hz, 1H, H-1), 4.46 (m, 1H, H-7), 4.47 (d, $^3J_{5,4(\text{ae})} = 1.02$ Hz, 1H, H-5), 4.42 (m, 1H, H-7), 4.43 (m, 1H, H-21), 4.29 (d, $^3J_{\text{ae}} = 1.02$ Hz, 1H, H-19), 4.28 (dd, $^3J_{4,5(\text{ea})} = 1.02$ Hz, $^3J_{4,3(\text{ea})} = 3.75$ Hz, 1H, H-4), 4.27 (m, 1H, H-21), 4.24 (m, 1H, H-7), 4.23 (dd, $^3J_{\text{ea}} = 0.68$ Hz, $^3J_{\text{ea}} = 2.73$ Hz, 1H, H-18), 3.83 (s, 3H, H-10), 3.74 (dd, $^3J_{3,2(\text{aa})} = 9.90$ Hz, $^3J_{3,4(\text{ae})} = 3.41$ Hz, 1H, H-13), 3.72 (dd, $^3J_{\text{aa}} = 9.90$ Hz, $^3J_{\text{ae}} = 3.41$ Hz, 1H, H-17), 3.59 (dd, $^3J_{2,3(\text{aa})} = 9.90$ Hz, $^3J_{2,1(\text{aa})} = 8.19$ Hz, 1H, H-14), 3.56 (dd, $^3J_{\text{aa}} = 9.90$ Hz, $^3J_{\text{aa}} = 7.85$ Hz, 1H, H-16), 2.15 (s, 3H, H-12) ppm.

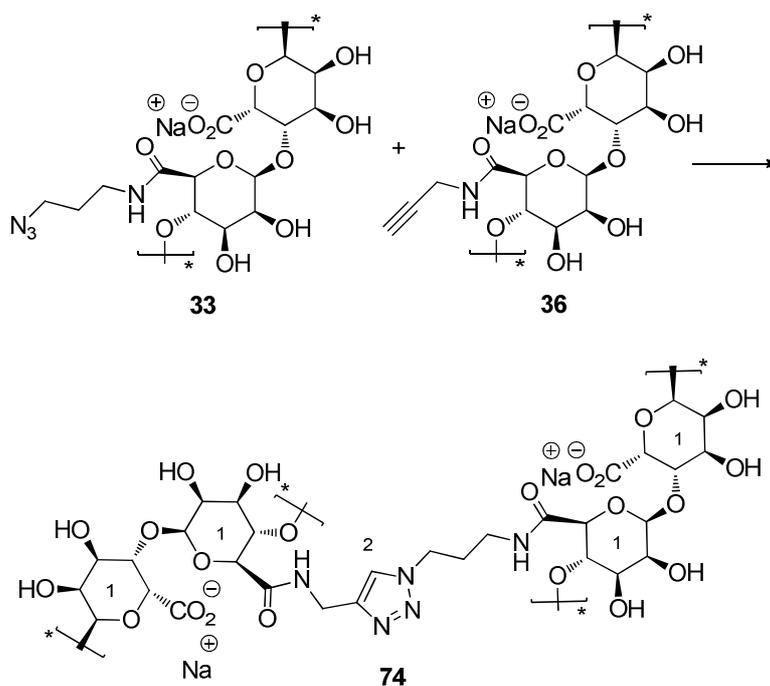
Experimenteller Teil

8.4.21 Kupfer-katalysierte *Click*-Chemie: Ligation von 5-Hexinol an Azido-funktionalisiertes Alginat **73**



Azido-funktionalisiertes Alginat **33** (3 mg, 0.011 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit 5-Hexinol (1.2 μL , 0.011 mmol, 1.0 Äq) in einer entgasten Mischung aus $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (250 μL) und *tert*-Butanol (250 μL) bis zur Homogenität gelöst. In die Mischung wurde eine 1M wässrige Natriumascorbat-Lösung (0.22 μL , 1.1 μmol , 0.1 Äq) und eine 0.3M Lösung von Kupfersulfat-Pentahydrat (0.09 μL , 0.366 μmol , 0.03 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (100 μl) gegeben und diese Mischung 24 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (20 mL) gefällt, zentrifugiert und anschließend das Lösungsmittel dekantiert. Das erhaltene Polymer wurde in wenig $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, für 2 Tage gegen eine wässrige, basische EDTA-Lösung und abschließend gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert. Nach Lyophilisation wurde ein in Wasser schwer lösliches, blaues Polymer **73** (3.5 mg, 8.75 μmol , 79%) erhalten.

8.4.22 Kupfer-katalysierte *Click*-Chemie: Vernetzung von Azido-funktionalisiertem Alginat **33** mit Alkino-funktionalisiertem Alginat **36**

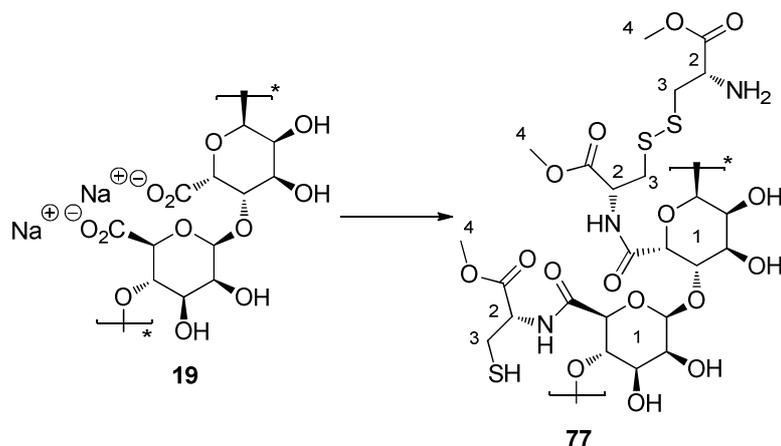


Experimenteller Teil

Azido-funktionalisiertes Alginat **33** (3 mg, 0.011 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit Alkino-funktionalisiertem Alginat **36** (2.5 mg, 0.011 mmol, 1.0 Äq) in einer entgasten Mischung aus $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (250 μL) und *tert*-Butanol (250 μL) bis zur Homogenität gelöst. In die Mischung wurde eine 1M wässrige Natriumascorbat-Lösung (0.22 μL , 1.1 μmol , 0.1 Äq) und eine 0.3M Kupfersulfat-Pentahydrat Lösung (0.09 μL , 0.366 μmol , 0.03 Äq) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (100 μL) gegeben und diese Mischung für 24 h gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde die hochviskose Lösung langsam in Ethanol (20 mL) getropft, das überstehende Lösungsmittel dekantiert und das sedimentierte Polymer in wenig $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst. Nach dreitägiger Dialyse gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ wurde das Polymer lyophilisiert. Es konnte ein in Wasser schwer lösliches, blaues Polymer **74** (4.5 mg, 9.26 μmol , 84%) erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 8.33 (m, 1H, H-3), 4.95-3.60 (m, 14H, H-1) ppm.

8.4.23 Funktionalisierung von Alginat mit Cystine und anschließender Disulfidspaltung zum Thiol **77**



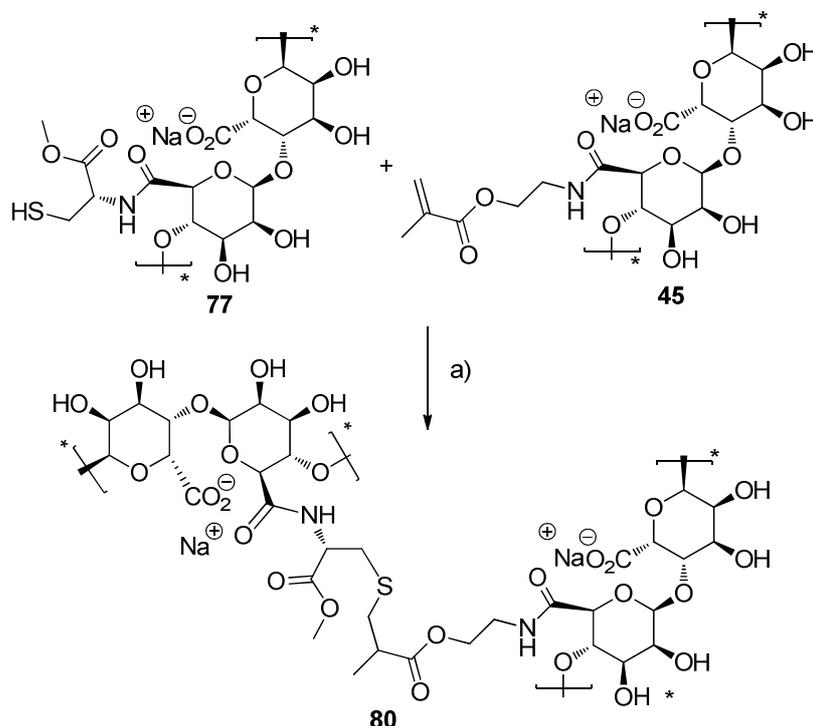
Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in MES-Pufferlösung (10 mL: 0.5 mM 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Hydrat und 5 mM Natriumchlorid) bis zur Homogenität gelöst. Dazu wurden 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (78.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (146.5 mg, 0.76 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. L-Cystine-dimethylester-dihydrochlorid **75** (344.6 mg, 1.01 mmol, 2.0 Äq) wurde zugegeben und die Mischung weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 2M Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7 gebracht und Dithiothreitol (466.0 mg, 6.12 mmol, 12.0 Äq) zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde der pH-Wert der Lösung abermals mit 2M Natriumhydroxid-Lösung auf einen Wert von 9 erhöht. Die basische Lösung wurde wiederum für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde der pH-Wert der Reaktionslösung mit 1M

Experimenteller Teil

Salzsäurelösung auf 5 gebracht. Die saure Reaktionslösung wurde abschließend für 3 Tage gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Thiol-funktionalisierte Alginat **77** (85.0 mg, 0.30 mmol, 60%) wurde als farbloses, watteartiges Polymer erhalten.

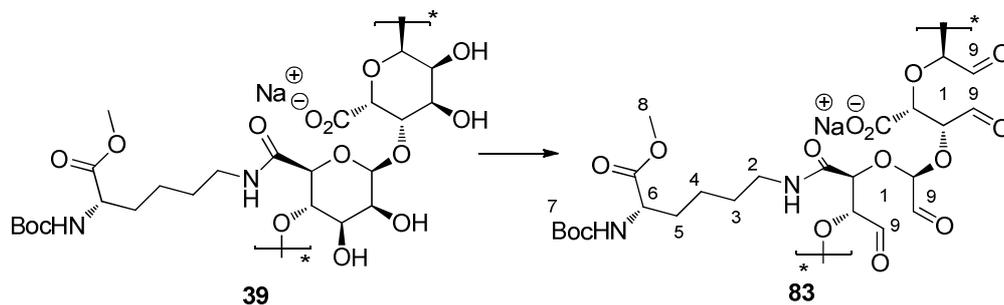
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 4.13 (s, 1H, H-2), 4.95-3.50 (m, 7H, H-1), 3.41 (m, 1H, H-3), 3.38 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 3H, H-4), 3.17 (m, 1H, H-3) ppm.

8.4.24 Hydrogele aus methacrylierten- **45** und thiol-funktionalisierten **77** Alginaten



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen wurden methacryl- **45** und thio-funktionalisiertes Alginat **77** (je 3 mg) in wässrigem Medium (100 μL) unter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Als wässrige Medien wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und isotonische Kochsalzlösung verwendet. Beide Polymerlösungen wurden unter Rühren miteinander vermischt. Entsprechend der Modifizierungsgrade der Thiol- **77** und der Methacryl-Komponente **45** variierte die Dauer der Gelierung zwischen zwei bis zehn Minuten. Zur Ausbildung von stabilen Gelen **80** waren hohe Derivatisierungsgrade (>50%) nötig.

8.4.25 Herstellung von Amid-gebundenem *N*-Boc-Lysinmethylester Aldehydo-Alginat **83**

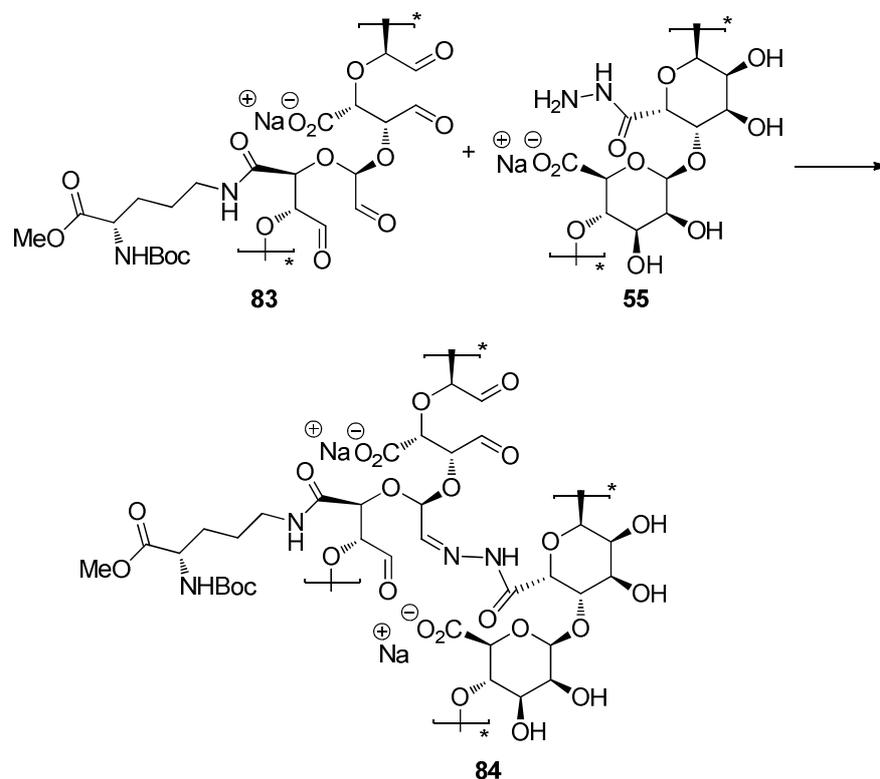


Lysin dekoriertes Alginat **39** (20.0 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) bis zur Homogenität gelöst. Dazu wurde unter Lichtausschluss Natriumperodat (20 mg, 0.10 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und 24 h gerührt. Die Lösung wurde abschließend für 3 Tage gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das oxidierte, Lysin dekorierte Alginat **83** (15.0 mg, 0.036 mmol, 73%) konnte in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 5.29-5.15 (m, 2H, H-9), 4.95-3.60 (m, 3H, H-1), 3.48-3.37 (m, 5H, H-2, H-6, H-5), 3.19-3.13 (m, 3H, H-8), 1.42 (s, 9H, H-7), 1.20-1.18 (m, 2H, H-4) ppm; **Elementar-Analyse**: gef. C: 30.9%, H:4.9%, N: 2.5%, ber. C: 49.8%, H: 6.7%, N: 6.5%.

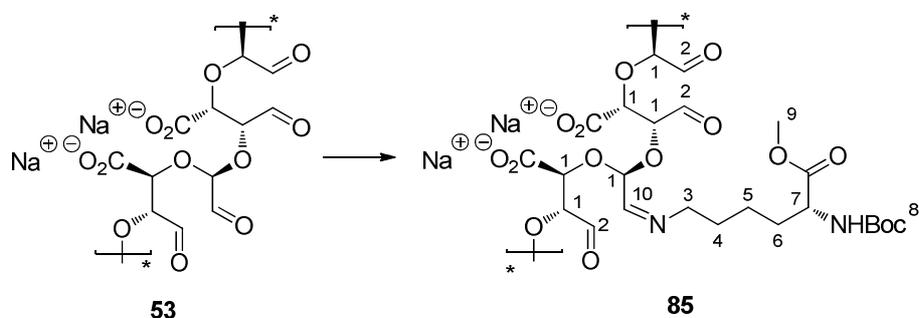
Experimenteller Teil

8.4.26 Hydrogele aus Amid-gebundenem *N*-Boc-Lysinmethylester Aldehydo-Alginat **83** und Hydrazido-Alginat **55**



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen wurde Lysin-modifiziertes Aldehydo-Alginat **83** (2 mg) und Hydrazido-Alginat **55** (2 mg) in wässrigem Medium (100 μ L) unter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Als wässriges Medium wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verwendet. Beide Polymerlösungen wurden anschließend miteinander vermischt. Entsprechend des Oxidationsgrades der Aldehydo-Komponente **83** und des Deratisierungsgrades der Hydrazido-Komponente **55** variierte die Dauer der Gelierung zwischen einer und zehn Minuten.

8.4.27 Herstellung von Imin-gebundenem *N*-Boc-Lysinmethylester Aldehydo-Alginat **85**



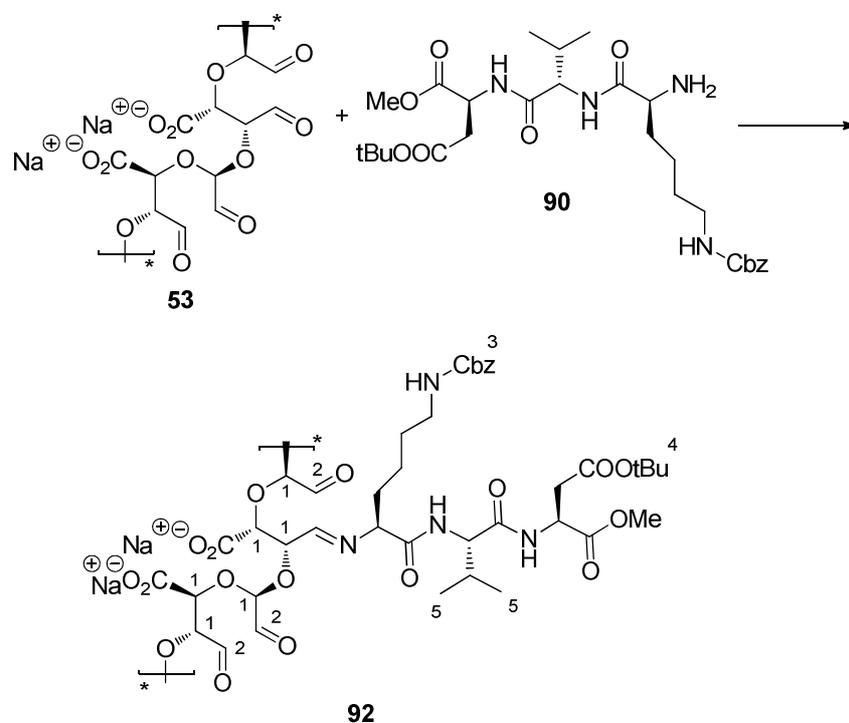
Aldehydo-Alginat **53** (100.0 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äq) wurde in wässriger Phosphatpufferlösung pH = 7.2 (5 mL) bis zur Homogenität gelöst. Zu dieser Lösung wurde *N*-Boc-L-Lysinmethylester-Hydrochlorid (150.5 mg, 0.61 mmol, 1.2 Äq) gegeben

Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 9.71$ (t, $^3J = 1.13$ Hz, 1H, H-3), 9.30 (s, 1H, H-13), 4.98 (t, $^3J = 5.52$ Hz, 1H, H-6), 3.89 (m, 2H, H-11), 3.02 (t, $^3J = 7.46$ Hz, 4H, H-7), 2.58 (dq, $^3J = 7.33$ Hz, $^3J = 1.31$ Hz, 2H, H-2), 2.41 (dq, $^3J = 7.47$ Hz, $^3J = 0.7$ Hz, 2H, H-14), 1.71 (m, 6H, H-8, H-9, H-10) 1.61-1.56 (m, 2H, H-5), 1.44 (s, 18H, H-12), 1.08 (t, $^3J = 7.37$ Hz, 3H, H-1), 1.08 (t, $^3J = 5.64$ Hz, 3H, H-15), 0.92 (t, $^3J = 7.47$ Hz, 3H, H-4) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, D_2O): $\delta = 199.8$ (t, C-3), 179.8 (q, C-18), 161.8 (C-13), 157.6 (q, C-17). 92.3 (t, C-6), 80.9 (q, C-16), 55.7 (t, C-11), 39.2 (s, C-2), 31.3 (s, C-7, C-14), 30.7 (s, C-5), 27.7 (s, C-8, C-10), 26.3 (p, C-12), 22.3 (s, C-9), 22.1 (s, C-9), 11.8 (p, C-4, C-15), 8.1 (p, C-1) ppm.

8.4.30 Herstellung von Imin-gebundenem α -Amino-Asp-Val-Lys Aldehydo-Alginat

92

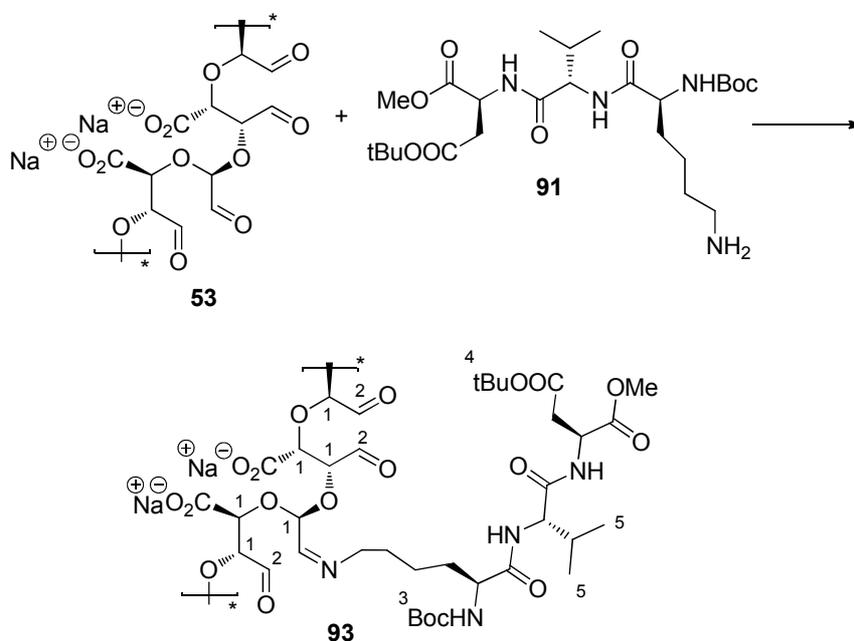


Aldehydo-Alginat **53** (3.0 mg, 0.015 mmol, 1.0 Äq) wurde in wässriger Phosphatpufferlösung pH = 7.2 (5 mL) bis zur Homogenität gelöst. Zu der Lösung wurde das α -Amino-Tripeptid **90** (6 mg, 0.013 mmol, 1.2 Äq), gelöst in Dimethylformamid (3 mL), gegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Für die Reduktion des Imins **92** wurde Natriumcyanoborhydrid (1.1 mg, 0.015 mmol, 1.4 Äq) eingesetzt und die Reaktion für weitere 14 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das α -Amino-tripeptid dekorierte Aldehydo-Alginat **92** (3.0 mg, 0.005 mmol, 32%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

Experimenteller Teil

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 7.48-7.42 (m, 5H, H-3), 5.23-5.11 (m, 3H, H-2), 4.95-3.60 (m, 6H, H-1), 1.42 (s, 9H, H-4), 1.03-0.96 (m, 6H, H-5) ppm.

8.4.31 Herstellung von Imin-gebundenem ϵ -Amino-Asp-Val-Lys Aldehydo-Alginat **93**

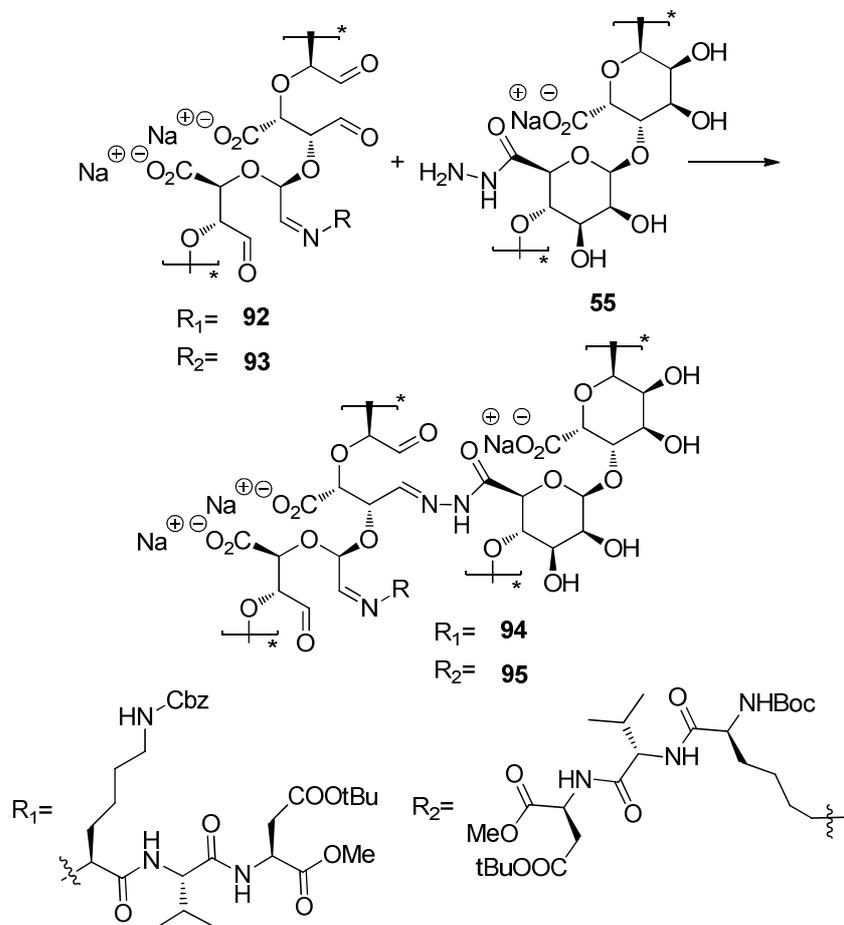


Aldehydo-Alginat **53** (23.4 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq) wurde in wässriger Phosphatpufferlösung pH = 7.2 (5 mL) bis zur Homogenität gelöst. Zu der Lösung wurde das ϵ -Amino-Tripeptid **91** (19 mg, 0.035 mmol, 0.3 Äq), gelöst in Dimethylformamid (5 mL), gegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Für die Reduktion des Imins **93** wurde Natriumcyanoborhydrid (2.7 mg, 0.043 mmol, 0.4 Äq) eingesetzt und die Reaktion für weitere 14 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das ϵ -Amino-tripeptid dekorierte Aldehydo-Alginat **93** (20.0 mg, 0.033 mmol, 31%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 5.25-5.03 (m, 3H, H-2), 4.95-3.60 (m, 6H, H-1), 1.44 (s, 9H, H-4), 1.42 (s, 9H, H-3), 1.03-0.96 (m, 6H, H-5) ppm.

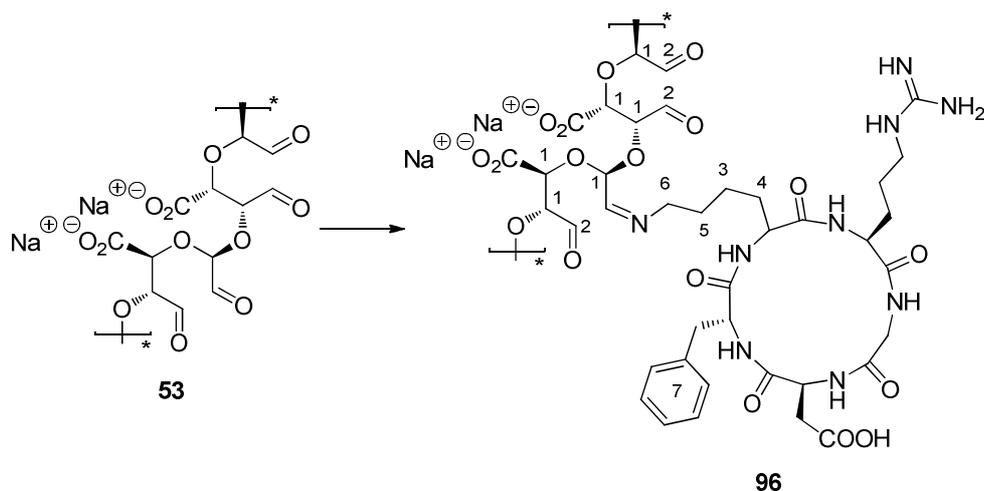
Experimenteller Teil

8.4.32 Hydrogele aus α - oder ϵ -Amino- Asp-Val-Lys Aldehydo-Alginat **91** bzw. **92** und Hydrazido-Alginat **55**



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen wurden die α - oder ϵ -Amino-Tripeptid modifizierten Aldehydo-Alginate **92** oder **93** (2 mg) und das Hydrazido-Alginat **55** (2 mg) in H₂O_{dest} (100 μ L) unter leichter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Beide Polymerlösungen wurden anschließend miteinander vermischt. Entsprechend des Oxidationsgrades der Aldehydo-Komponente **92** bzw. **93** und des Derivatisierungsgrades der Hydrazido-Komponente **55** variierte die Dauer der Gelierung zwischen einer und zehn Minuten.

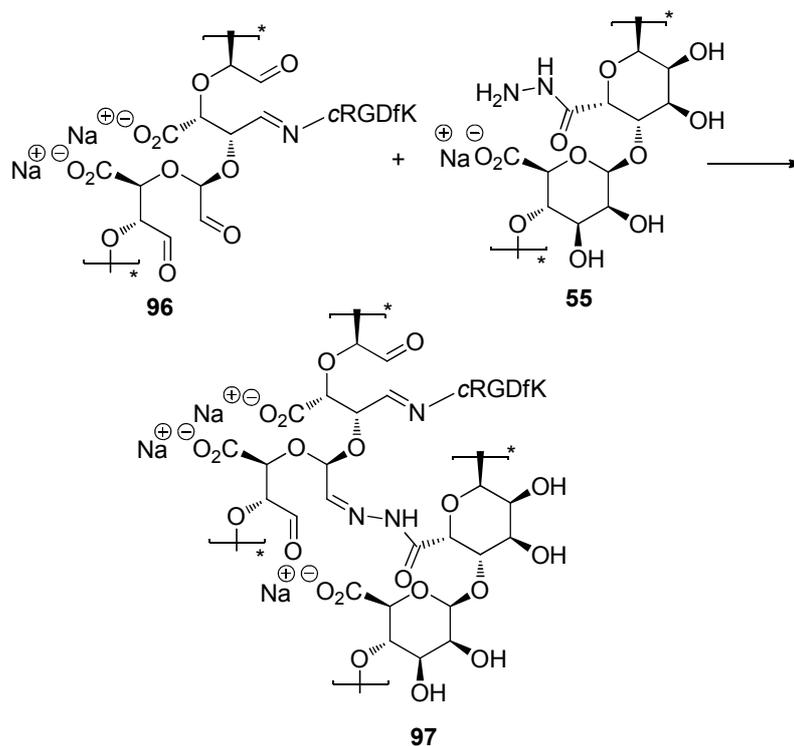
8.4.33 Herstellung von Imin-gebundenem Amino-cRGDfK Aldehydo-Alginat **96**



Aldehydo-Alginat **53** (5.4 mg, 27.3 μmol , 1.0 Äq) wurde in wässriger Phosphatpufferlösung pH = 7.2 (5 mL) bis zur Homogenität gelöst. Zu dieser Lösung wurde das cyclische RGDfK-Pentapeptid **81** (5.0 mg, 8.3 μmol , 0.3 Äq) gegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das RGD-dekorierte Aldehydo-Alginat **96** (5.0 mg, 0.033 mmol, 31%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

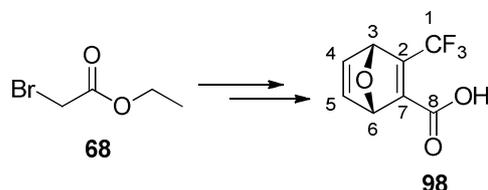
¹H-NMR (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 7.41-7.25 (m, 5H, H-7), 5.47 (m, 1H, H-2), 5.19-4.98 (m, 2H, H-2), 4.95-3.60 (m, 3H, H-1), 1.36-1.31 (m, 2H, H-3), 1.24-1.68 (m, 2H, H-3), 1.12-1.05 (m, 2H, H-3) ppm.

8.4.34 Hydrogele aus Imin-gebundenem cRGD-Aldehydo-Alginat **96** und Hydrazido-Alginat **55**



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen wurde das RGD-modifizierte Aldehydo-Alginat **96** (2 mg) und das Hydrazido-Alginat **55** (2 mg) in wässrigem Medium (100 μ L) unter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Als Medium wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verwendet. Beide Polymerlösungen wurden anschließend miteinander vermischt. Entsprechend des Oxidationsgrades der Aldehydo-Komponente **96** und des Derivatisierungsgrades der Hydrazido-Komponente **55** variierte die Dauer der Gelierung **97** zwischen einer und zehn Minuten.

8.4.35 Synthese des Oxanorbordien-Systems **98**



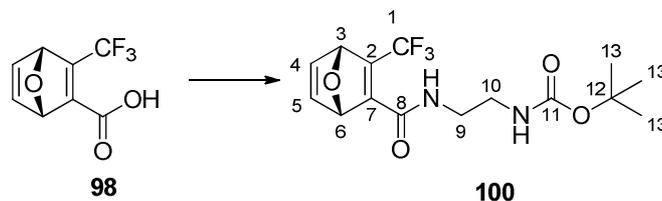
Ausgehend von Ethyl-2-Bromoacetat **68** wurde Oxanorbordien **98** in fünf Stufen entsprechend der Vorschrift nach Su *et al.*⁷² hergestellt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.24$ ppm): $\delta = 7.30$ (dd, $^3J_{4,5} = 5.22$ Hz, $^3J_{4,3} = 1.79$ Hz, 1H, H-4), 7.20 (dd, $^3J_{5,4} = 5.24$ Hz, $^3J_{5,6} = 1.78$ Hz, 1H, H-5), 5.72 (m, 1H, H-3), 5.68 (m, 1H, H-6) ppm.

Die Daten stimmten mit denen in der Literatur beschriebenen überein.⁷¹

Experimenteller Teil

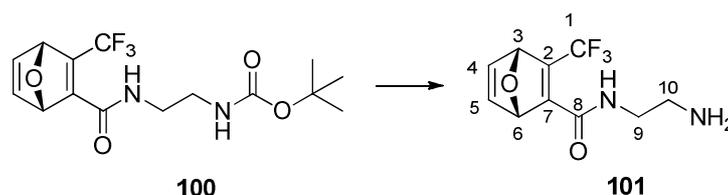
8.4.36 Synthese von *tert*-butyl {2-[(1*S*,4*R*)-3-(trifluoromethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene-2-carboxamido]ethyl}carbamat **100**



Oxanorbornadien **98** (100 mg, 480.7 μmol , 1.0 Äq) und *N*-Boc-Ethylendiamin-Hydrochlorid **99** (76.9 mg, 75.8 μL , 480.7 μmol , 1.0 Äq) wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in Dichlormethan (2.0 mL) gelöst. 4-Dimethylaminopyridin (117.5 mg, 961.5 μmol , 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (101.1 mg, 528.8 μmol , 1.1 Äq) wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die Phasen getrennt und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) gereinigt. Das verlängerte Oxanorbornadien **100** wurde als farbloser Feststoff (102.3 mg, 293.9 μmol , 61%) erhalten.

Smp= 145°C; **R_F**= 0.52 (PE/EE: 1/1); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.37 (dd, ³J_{4,5} = 5.2 Hz, ³J_{4,3} = 1.8 Hz, 1H, H-4), 7.17 (dd, ³J_{5,4} = 5.2 Hz, ³J_{5,6} = 1.8 Hz, 1H, H-5), 6.66 (brs, 1H, NHCO), 5.66 (m, 1H, H-3), 5.64 (m, 1H, H-6), 4.86 (brs, 1H, NHBoc), 3.66-3.59 (m, 2H, H-9), 3.53-3.46 (m, 2H, H-10), 1.46 (s, 9H, H-13) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 162.7 (q, C-8), 157.0 (q, C-11), 154.2 (q, quart., ⁴J_{C,F} = 5.0 Hz, C-7), 143.9 (q, quart., ³J_{C,F} = 36.3 Hz, C-2), 143.8 (t, C-4), 142.2 (t, C-5), 122.4 (q, quart., ¹J_{C,F} = 268.4 Hz, C-1), 86.1 (t, C-6), 83.7 (t, quart., ⁴J_{C,F} = 2.3 Hz, C-3), 80.2 (q, C-12), 41.3 (s, C-9), 40.0 (s, C-10), 28.4 (p, C-13) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₅H₁₉F₃N₂NaO₄: 371.1208 [M+Na]⁺, gefunden: 371.1195 [M+Na]⁺.

8.4.37 Synthese von (1*S*,4*R*)-*N*-(2-aminoethyl)-3-(trifluoromethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene-2-carboxamid **101**



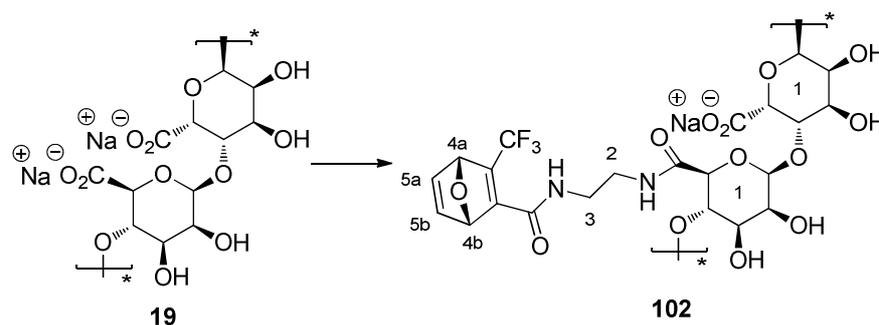
Das verlängerte Oxanorbornadien **100** (6.0 mg, 17.2 μmol , 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (1.0 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (60.0 μL) im Überschuss

Experimenteller Teil

zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Unter Zugabe von Toluol (6 mL) wurden sowohl die Lösungsmittel als auch überschüssige Trifluoressigsäure unter vermindertem Druck azeotrop entfernt. Das um Ethylendiamin verlängerte Oxanorbornadien **101** wurde als farbloser Feststoff (4.2 mg, 16.9 μmol , quant.) erhalten.

Smp = 155°C; **R_F** = 0.0 (PE/EE: 1/1); **¹H-NMR** (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ = 7.33 (dd, ³J_{4,5} = 5.3, ³J_{4,3} = 1.9 Hz, 1H, H-4), 7.25 (dd, ³J_{5,4} = 5.3, ³J_{5,6} = 1.9 Hz, 1H, H-5), 5.70 (m, 1H, H-3), 5.63 (m, 1H, H-6), 3.54 (m, 1H, H-10), 3.42 (m, 1H, H-10), 3.11 (dt, ³J_{9,10} = 6.32 Hz, ³J_{9,9} = 2.7 Hz, 2H, H-9) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ = 166.0 (q, C-8), 155.8 (q, quart., ⁴J_{C,F} = 5.05 Hz, C-7), 145.9 (q, quart., ³J_{C,F} = 36.9 Hz, C-2), 143.7 (t, C-5), 144.6 (t, C-4), 123.8 (q, quart., ¹J_{C,F} = 267.7 Hz, C-1), 87.1 (t, C-6), 84.6 (t, quart., ⁴J_{C,F} = 2.3 Hz, C-3), 40.5 (s, C-10), 38.2 (s, C-9) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₀H₁₂F₃N₂O₂: 249.0850 [M+H]⁺, gefunden: 249.0851 [M+H]⁺.

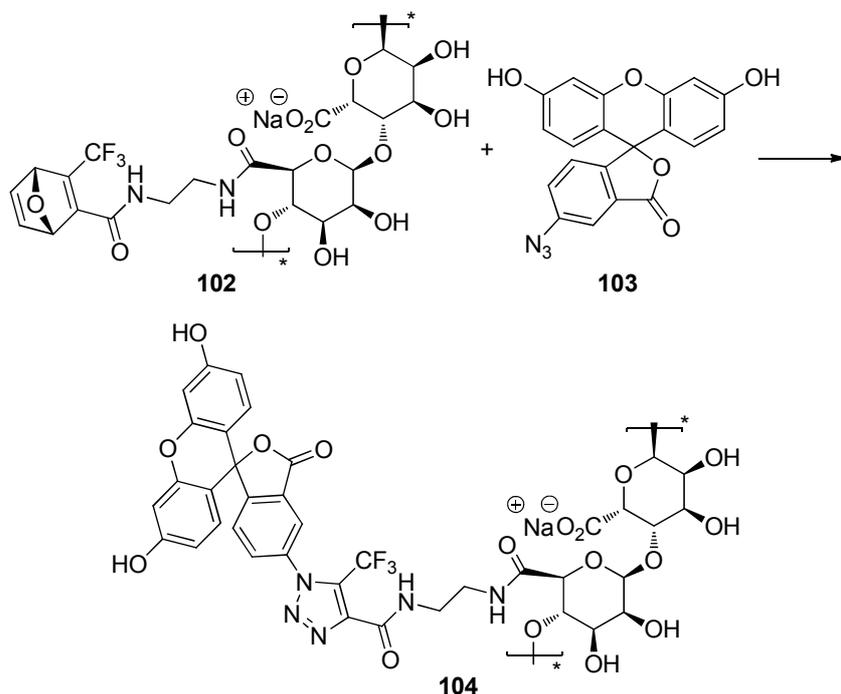
8.4.38 Funktionalisierung von Alginat mit dem Oxanorbornadien-System **102**



Natrium Alginat **19** (100.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in wässrigem Phosphatpuffer pH=7.2 (10 mL) bis zur Homogenität gelöst. Dazu wurden *N,N*-Diisopropylamin (166 μL , 1.01 mmol, 2.0 Äq), 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (78.0 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (146.1 mg, 0.76 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und die Mischung für 1 h gerührt. Das um Ethylendiamin verlängerte Oxanorbornadien **101** (151,7 mg, 0.61 mmol, 1.2 Äq) wurde zugegeben und für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (30 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Oxanorbornadien funktionalisierte Alginat **102** (115.0 mg, 0.28 mmol, 56%) wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

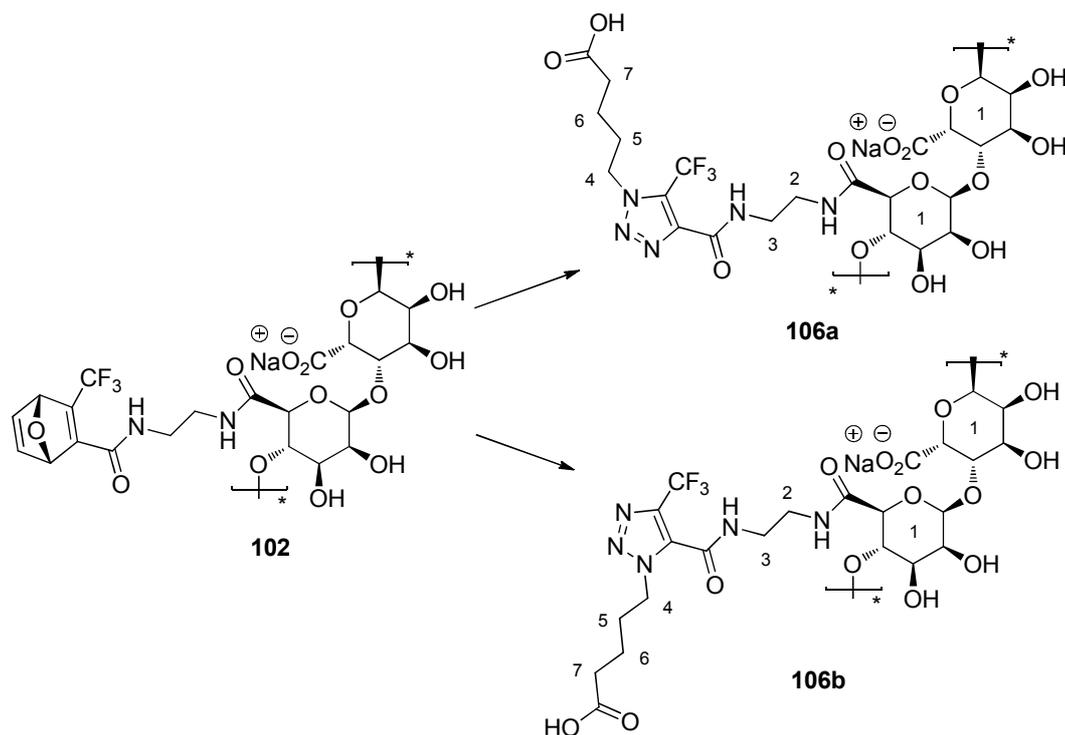
¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): δ = -62.5 ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 7.28-7.26 (m, 2H, H-5a, H-5b) 5.86 (s, 1H, H-4a), 5.73 (s, 1H, H-4b), 4.13-3.56 (m, 5H, H-1), 3.43-3.02 (m, 4H, H-2, H-3) ppm.

8.4.39 Metall-freie *Click*-Chemie am Polymer: Ligation von Azido-Fluorescein **103** mit Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginate **102**



Oxanorbonadien-funktionalisiertes Alginate **102** (10.0 mg, 0.025 mmol, 1.0 Äq) wurde in H₂O_{dest.} (3 mL) gelöst, Azido-Fluorescein **103** (9.3 mg, 0.025 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 d unter Lichtausschluss bei 40°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (5 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das mit Fluorescein ligierte Alginate **104** wurde in Form eines gelben, in Wasser schwer löslichen Polymers isoliert.

8.4.40 Metall-freie *Click*-Chemie am Polymer: Ligation von Azidopentansäure **105** mit Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginat **102**



Oxanorbornadien-funktionalisiertes Alginat **102** (10.0 mg, 0.025 mmol, 1.0 Äq) wurde in H₂O_{dest.} (3 mL) gelöst, Azidopentansäure **105** (3.5 mg, 0.026 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 d unter Lichtausschluss bei 40°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (5 mL) gefällt, gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das mit Azidopentansäure ligierte Alginat **106a/106b** wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

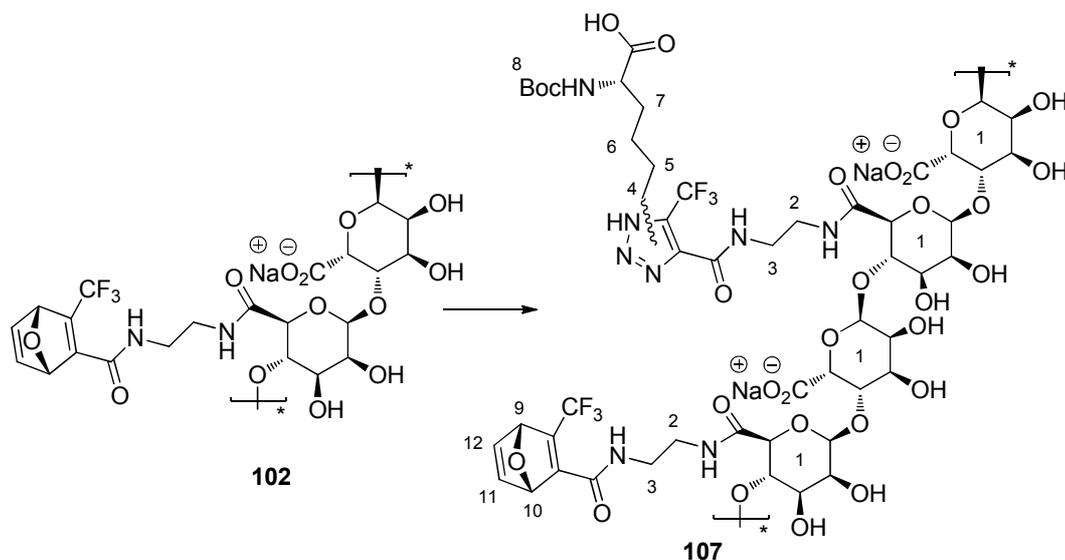
cis-Regioisomer des 1,2,3-Triazols **106a**:

¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = -56.3$ ppm; ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 4.69-4.63$ (m, 2H, H-4), 4.17–3.69 (m, 7H, H-1), 3.48-3.43 (m, 2H, H-3), 3.06-3.04 (m, 2H, H-2), 2.31-2.22 (m, 2H, H-7), 1.92-1.79 (m, 2H, H-5), 1.57-1.43 (m, 2H, H-6) ppm.

trans-Regioisomer des 1,2,3-Triazols **106b**:

¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = -59.3$ ppm; ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 4.57-4.52$ (m, 2H, H-4), 4.17–3.69 (m, 7H, H-1), 3.57-3.53 (m, 2H, H-3), 3.15-3.08 (m, 2H, H-2), 2.31-2.22 (m, 2H, H-7), 1.92-1.79 (m, 2H, H-5), 1.57-1.43 (m, 2H, H-6) ppm.

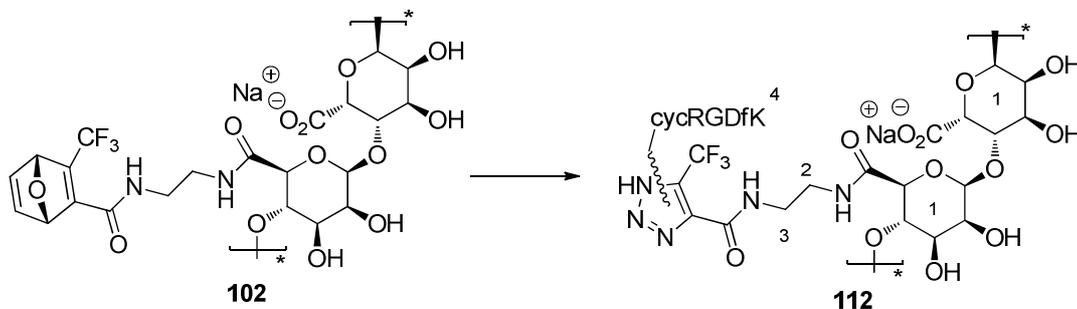
8.4.41 Metall-freie *Click*-Chemie am Polymer: Ligation von Azido-Boc-Lysin **107** mit Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginate **102**



Oxanorbonadien-funktionalisiertes Alginate **102** (10.0 mg, 0.022 mmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) gelöst, Azido-Boc-Lysin **107** (6.0 mg, 0.022 mmol, 0.5 Äq) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1 d unter Lichtausschluss bei 40°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde langsam in Ethanol (5 mL) gefällt, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das *N*-Boc-Lysinmethylester funktionalisierte Alginate **108** wurde in Form eines farblosen, watteartigen Polymers erhalten.

^{19}F -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = -56.1, -56.8, -59.1, -62.3$ ppm; ^1H -NMR (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 7.40\text{-}7.35$ (m, 2H, H-11, H-12), 5.85 (s, 1H, H-9), 5.74 (s, 1H, H-10), 4.68-4.63 (m, 2H, H-4_{Triazol-cis}), 4.56-4.52 (m, 2H, H-4_{Triazol-trans}) 4.17-3.66 (m, 10H, H-1), 3.63-3.19 (m, 8H, H-3, H-2), 3.17-3.10 (m, 2H, H-7), 1.95-1.93 (m, 2H, H-5), 1.65-1.62 (m, 2H, H-6), 1.40 (s, 9H, H-8) ppm.

8.4.42 Metall-freie *Click*-Chemie am Polymer: Ligation von Azido-cRGDfK **81** mit Oxanorbornadien-funktionalisiertem Alginate **102**



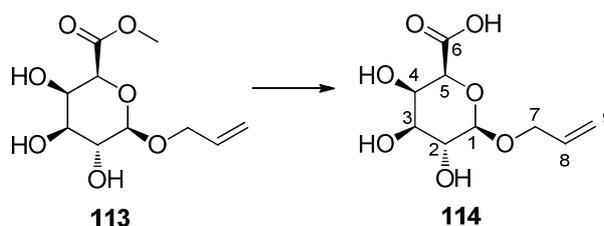
Oxanorbonadien-funktionalisiertes Alginate **102** (10.0 mg, 24.63 μmol , 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) gelöst, Azido-cRGDfK **81** (6.2 mg, 9.85 μmol , 0.4 Äq) hinzugegeben und

Experimenteller Teil

die Reaktionslösung für 4 d unter Lichtausschluss bei 40°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung in Ethanol (5 mL) gefällt. Das erhaltene farblose Polymer **112** wurde erschöpfend gegen H₂O_{dest.} dialysiert und abschließend lyophilisiert.

¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = -56.3, -56.8, -57.5, -62.3$ ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 7.42-7.23$ (m, 2H, H-4_{Phe}), 4.13–3.56 (m, 7H, H-1), 3.20 (s, 2H, H-3), 3.10 (s, 2H, H-2) 1.61–0.88 (m, 6H, H-4_{Arg}) ppm.

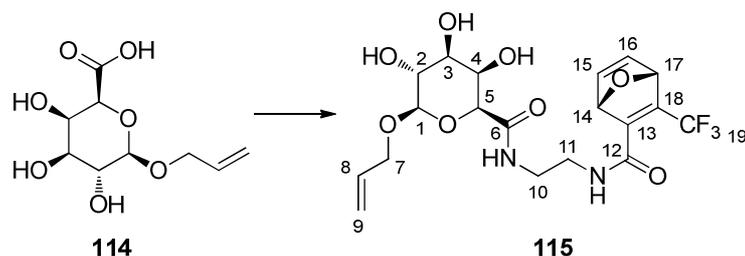
8.4.43 Synthese von Allyloxy- β -D-galacturonsäure **114**



Methyl (allyl- β -D-galactopyranosid)uronat¹⁴⁷ **113** (100.0 mg, 0.40 mmol, 1.0 Äq) wurde in H₂O_{dest.} (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von 1M LiOH_{aq} (2 mL, 2.02 mmol, 5.0 Äq) wurde auf Basizität der Lösung geprüft und diese für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde diese mittels 1M HCl_{aq} Lösung neutralisiert. Die wässrige Lösung wurde abschließend lyophilisiert. Es wurde eine farblose, kristalline Mischung aus Lithiumchlorid und Allyl- β -D-galacturonsäure **114** (120 mg) erhalten.

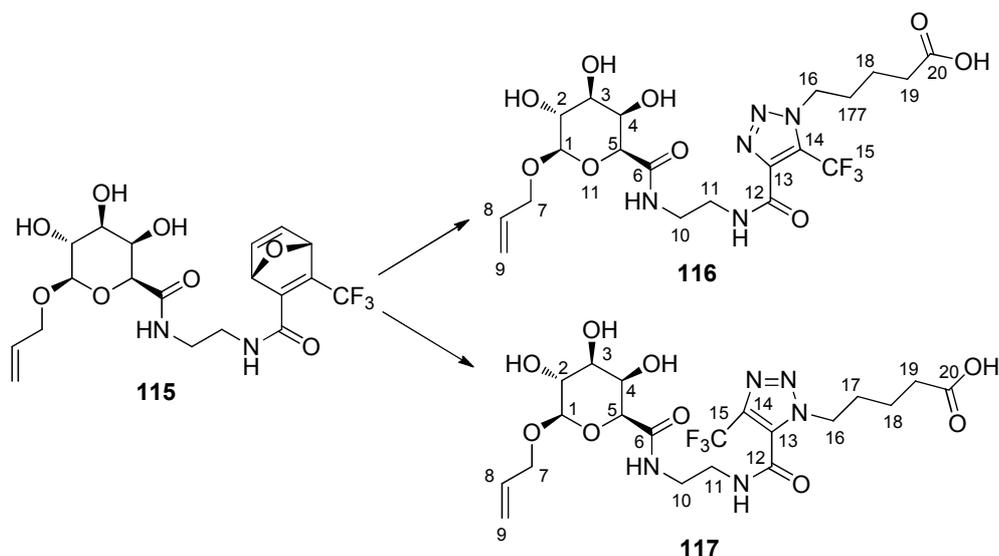
¹H-NMR (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 6.04-5.94$ (m, 1H, H-8), 5.38 (dd, $^3J_{9,8(E)} = 17.24$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.54$ Hz, 1H, H-9), 5.27 (dd, $^3J_{9,8(Z)} = 9.89$ Hz, $^2J_{9,9} = 0.68$ Hz, 1H, H-9), 4.46-4.41 (m, 1H, H-7), 4.43 (d, $^3J_{1,2(aa)} = 7.85$ Hz, 1H, H-1), 4.24-4.19 (m, 1H, H-7), 4.22 (dd, $^3J_{4,5(ea)} = 0.68$ Hz, $^3J_{4,3(ea)} = 4.10$ Hz, 1H, H-4), 4.12 (d, $^3J_{5,4(ae)} = 1.37$ Hz, 1H, H-5), 3.68 (dd, $^3J_{3,2(aa)} = 9.90$ Hz, $^3J_{3,4(ae)} = 3.41$ Hz, 1H, H-3), 3.53 (dd, $^3J_{2,3(aa)} = 9.90$ Hz, $^3J_{2,1(aa)} = 7.85$ Hz, 1H, H-2) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): $\delta = 174.4$ (q, C-6), 133.5 (t, C-8), 118.8 (d, C-9), 101.2 (t, C-1), 75.2 (t, C-5), 72.9 (t, C-3), 70.4 (d, C-7), 70.3 (t, C-2), 70.0 (t, C-4) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₉H₁₃O₇: 233.0661 [M-H]⁻, gefunden 233.0658 [M-H]⁻.

8.4.44 Synthese der mit Oxanorbornadien-funktionalisierten Allyl- β -D-galacturonsäure **115**



Allyl- β -D-galacturonsäure **114** (50 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) gelöst, *N,N*-Disopropylethylamin (70 mL, 0.42 mmol, 2.0 Äq) und *o*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (97 mg, 0.25 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und diese Mischung bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Anschließend wurde das um Ethylendiamin verlängerte Oxanorbornadien **101** (53 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und die Mischung für weitere 12 h gerührt. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde lyophilisiert und mittels präparativer HPLC fraktioniert gereingt, (C18-P_[A]) (H_2O : MeOH 95:5 \rightarrow 90:10 {5 min}, 90:10 \rightarrow 60:40 {55 min}, 60:40 \rightarrow 30:70 {30 min}, 30:70 \rightarrow 0:100 {10 min}, 15 mL/min). Das mit Oxanorbornadien funktionalisierte Galactopyranosid **115** (9.8 mg, 21.12 μmol , 10%) wurde bei einer Retentionszeit von $t_{\text{R}} = 68\text{--}72$ Min. in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

^{19}F -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta = -63.9, -64.0$ ppm; **^1H -NMR** (400 MHz, D_2O , $\text{H}_2\text{O} = 4.79$ ppm): $\delta = 7.37\text{--}7.32$ (m, 2H, H-15, H-16), 6.03-5.92 (m, 1H, H-8), 5.85-5.84 (m, 1H, H-17), 5.72-5.71 (m, 1H, H-14), 5.40-5.27 (m, 2H, H-9), 4.47 (d, $^3J_{1,2(\text{aa})} = 7.35$ Hz, 1H, H-1), 4.44-4.36 (m, 1H, H-7), 4.23-4.15 (m, 1H, H-7), 4.21 (d, $^3J_{5,4(\text{ae})} = 1.35$ Hz, 1H, H-5), 3.72-3.68 (m, 1H, H-3), 3.60-3.58 (m, 1H, H-2), 3.56-3.52 (m, 2H, H-11) 3.47-3.32 (m, 2H, H-10) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, D_2O): $\delta = 170.9$ (q, C-6), 170.6 (q, C-12), 142.9 (q, C-13), 142.9 (t, C-16), 142.8 (t, C-15), 142.7 (q, C-18), 133.1 (t, C-8), 118.8 (d, C-9), 101.3 (t, C-1), 85.5 (t, C-14), 83.0 (t, C-17), 74.5 (t, C-5), 72.4 (t, C-2), 70.5 (d, C-7), 70.1 (t, C-3), 69.0 (t, C-4), 38.5 (d, C-11), 38.2 (d, C-10) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8$: 465.1485 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden 465.1463 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8.4.45 Metall-freie *Click*-Chemie am Monosaccharid: Ligation von Azidopentansäure **105** mit dem Oxanorbornadien-funktionalisierten Galactopyranosid **115**


Das mit Oxanorbordien-funktionalisierte Galactopyranosid **115** (5 mg, 0.011 mmol, 1.0 Äq) und Azidopentansäure **105** (2.5 μ L, 0.016 mmol, 1.5 Äq) wurden in Methanol (1 mL) gelöst und die Lösung für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Lyophilisation wurde die Mischung mittels semipräparativer HPLC fraktioniert. (C18-P_[A]) (H₂O: MeOH 90:10 {80 min}, 50:50 {20 min}, 0:100 {10 min}). Das *cis*-5-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol **116** wurde bei einer Retentionszeit von $t_R = 51.17$ Min. und das *trans*-4-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol **117** bei einer Retentionszeit von $t_R = 55.65$ Min. jeweils in Form eines farblosen Feststoffes gesammelt.

cis-Regioisomer **116**: 5-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol

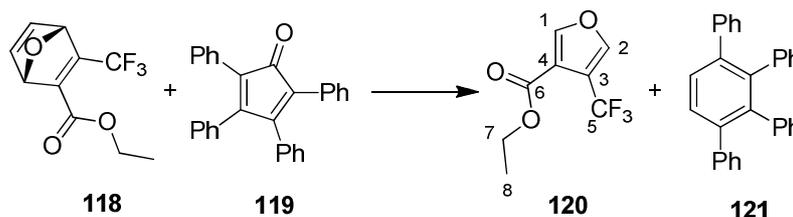
¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = -56.3$ ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 5.90$ -5.82 (m, 1H, H-8), 5.22 (dd, $^3J_{9,8(E)} = 17.30$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.41$ Hz, 1H, H-9), 5.16 (dd, $^3J_{9,8(Z)} = 10.51$ Hz, $^2J_{9,9} = 0.73$ Hz, 1H, H-9), 4.60 (t, $^3J_{16,17} = 7.15$ Hz, 2H, H-16), 4.41 (d, $^3J_{1,2(aa)} = 7.95$ Hz, 1H, H-1), 4.28-4.24 (m, 1H, H-7), 4.15 (dd, $^3J_{4,3(ea)} = 3.55$ Hz, $^3J_{4,5(ea)} = 0.98$ Hz, 1H, H-4), 4.13 (d, $^3J_{5,4(ae)} = 1.10$ Hz, 1H, H-5), 4.11-4.07 (m, 1H, H-7), 3.64 (dd, $^3J_{3,2(aa)} = 9.84$ Hz, $^3J_{3,4(ae)} = 3.36$ Hz, 1H, H-3), 3.60-3.56 (m, 2H, H-10), 3.54 (dd, $^3J_{2,3(aa)} = 9.66$ Hz, $^3J_{2,1(aa)} = 8.07$ Hz, 1H, H-2), 3.40-3.35 (m, 2H, H-11), 2.24 (t, $^3J_{19,18} = 7.40$ Hz, 2H, H-19), 1.90 (q, $^3J_{17,16,18} = 8.07$ Hz, 2H, H-17), 1.54 (q, $^3J_{18,17,19} = 7.58$ Hz, 2H, H-18) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): $\delta = 180.9$ (q, C-20), 170.5 (q, C-6), 160.9 (q, C-12), 141.4 (q, C-13), 133.0 (t, C-8), 126.9 (q, quart., $^2J_{C,F} = 42.8$ Hz, C-14), 118.9 (q, quart., $^1J_{C,F} = 269.6$ Hz, C-15), 118.8 (d, C-9), 101.3 (t, C-1), 74.6 (t, C-5), 72.3 (t, C-3), 70.5 (d, C-7), 70.1 (t, C-2), 68.9 (t, C-4), 51.3 (d, C-16), 38.4 (d, C-10), 38.3 (d, C-11), 35.1 (d, C-19), 28.7 (d, C-17), 22.1 (d, C-18) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₀H₂₈F₃N₅O₉: 540.1917 [M+H]⁺, gefunden 540.1913 [M+H]⁺.

Experimenteller Teil

trans-Regioisomer **117**: 4-Trifluoromethyl-1,2,3-triazol

¹⁹F-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = -59.3$ ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): $\delta = 5.93$ -5.86 (m, 1H, H-8), 5.25 (dd, $^3J_{9,8(E)} = 17.24$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.47$ Hz, 1H, H-9), 5.19 (dd, $^3J_{9,8(Z)} = 10.51$ Hz, $^2J_{9,9} = 1.10$ Hz, 1H, H-9), 4.49 (t, $^3J_{16,17} = 6.91$ Hz, 2H, H-16), 4.45 (d, $^3J_{1,2(aa)} = 7.95$ Hz, 1H, H-1), 4.36-4.32 (m, 1H, H-7), 4.17-4.12 (m, 1H, H-7), 4.15 (dd, $^3J_{4,3(ea)} = 3.55$ Hz, $^3J_{4,5(ea)} = 0.98$ Hz, 1H, H-4), 4.13 (d, $^3J_{5,4(ae)} = 1.01$ Hz, 1H, H-5), 3.66 (dd, $^3J_{3,2(aa)} = 10.90$ Hz, $^3J_{3,4(ae)} = 3.12$ Hz, 1H, H-3), 3.60-3.55 (m, 2H, H-11), 3.49 (dd, $^3J_{2,3(aa)} = 9.84$ Hz, $^3J_{2,1(aa)} = 8.01$ Hz, 1H, H-2), 3.39-3.33 m, (2H, H-10), 2.18 (t, $^3J_{19,18} = 7.40$ Hz, 2H, H-19), 1.85 (q, $^3J_{17,16,18} = 7.17$ Hz, 2H, H-17), 1.45 (q, $^3J_{18,17,19} = 7.76$ Hz, 2H, H-18) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): $\delta = 181.4$ (q, C-20), 170.5 (q, C-6), 158.9 (q, C-12), 135.2 (q, quart., $^2J_{C,F} = 39.4$ Hz, C-14), 133.0 (t, C-8), 131.7 (q, C-13), 119.7 (q, quart., $^1J_{C,F} = 268.6$ Hz, C-15), 118.6 (d, C-9), 101.3 (t, C-1), 74.5 (t, C-5), 72.3 (t, C-3), 70.5 (d, C-7), 70.1 (t, C-2), 69.1 (t, C-4), 49.9 (d, C-16), 38.8 (d, C-11), 38.3 (d, C-10), 35.7 (d, C-19), 28.7 (d, C-17), 22.1 (d, C-18) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₀H₂₈F₃N₅O₉: 540.1917 [M+H]⁺, gefunden 540.1913 [M+H]⁺.

8.4.46 Synthese von 3-(Trifluoromethyl)-4-ethoxycarbonylfuran **120**

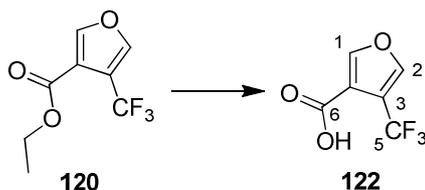


Oxanorbornadienylester **118** (200.0 mg, 0.84 mmol, 1.0 Äq) wurde mit Tetraphenylcyclopentadienon **119** (322.7 mg, 0.84 mmol, 1.0 Äq) in Toluol (3 mL) gelöst. Die violette Lösung wurde für 90 Min. bei 150°C und 300 Watt in der Mikrowelle gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand bei 0.3 mbar und 180°C fraktioniert destilliert. Das Ethylester-Derivat des Furans **120** (93.0 mg, 0.45 mmol, 53%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_F: 0.2 (PE/EE 20:1); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): $\delta = 8.04$ (s, 1H, H-1), 7.77 (s, 1H, H-2), 5.73 (s, 1H, H-4), 4.30 (q, $^3J = 7.17$ Hz, 2H, H-7), 1.32 (t, $^3J = 7.17$ Hz, 3H, H-8) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 160.9$ (C-6), 150.4 (C-1), 144.9 (q, $^3J_{C,F} = 6.52$ Hz, C-2), 125.4 (q, $^3J_{C,F} = 5.7$ Hz, C-4), 121.6 (q, $^1J_{C,F} = 267.3$ Hz, C-5), 117.2 (q, $^2J_{C,F} = 38.4$ Hz, C-3), 61.2 (C-7), 14.0 (C-8) ppm; **MS (EI)** *m/z* ber. C₈H₇F₃O₃: 208.035 [M], gef. 207.9 [M], 180 [M-C₂H₄], 163 [M-OC₂H₃]; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₈H₇F₃O₃: 209.0347 [M+H]⁺, gefunden 209.0345 [M+H]⁺.

Die Werte stimmen mit den in der Arbeit von Nezis *et al.* beschriebenen Daten überein.¹⁵⁸

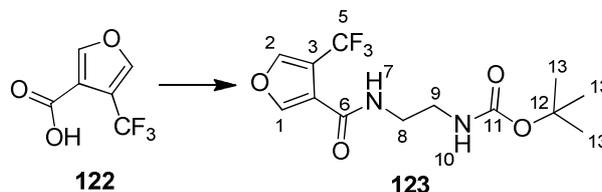
8.4.47 Synthese von 3-(Trifluoromethyl)-4-carboxyfuran **122**



3-(Trifluoromethyl)-4-ethoxycarbonylfuran **120** (30.0 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF (500 μ L) gelöst, 1M LiOH_{aq} (200 μ L) zugegeben und die Lösung 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde H₂O_{dest.} (2 mL) zugegeben und die Mischung dreimal mit Essigsäureethylester (3 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1M HCl_{aq} auf pH= 2.0 eingestellt und wiederum dreimal mit Diethylether (3 mL) extrahiert. Die vereinten etherischen Phasen wurden vereint, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 3-(Trifluoromethyl)-4-carboxyfuran **122** (11.8.0 mg, 65.6 μ mol, 47%) wurde in Form von farblosen Nadeln gewonnen.

Smp= 118°C; **R_F**= 0.0 (PE/EE 20:1); **¹⁹F-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = -58.7 ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 8.18 (1H, s, H-1), 7.84 (1H, s, H-2) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 77.16 ppm) δ = 166.1 (C-6), 151.9 (C-1), 145.3 (q, ³J_{C,F} = 6.46 Hz, C-2), 125.9 (s, C-4), 121.4 (q, ¹J_{C,F} = 267.3 Hz, C-5), 117.3 (q, ²J_{C,F} = 38.8 Hz, C-3) ppm; **MS (EI)** *m/z* berechnet für C₆H₃F₃O₃: 180.004 [M], gefunden 180.1 [M], 163 [M-OH]; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₆H₃F₃O₃: 178.9956 [M-H]⁻, gefunden 178.9953 [M-H]⁻.

8.4.48 Synthese von tert-Butyl- $\{2$ -[4-(trifluoromethyl)furan-3-carboxamido]ethyl $\}$ carbammat **123**



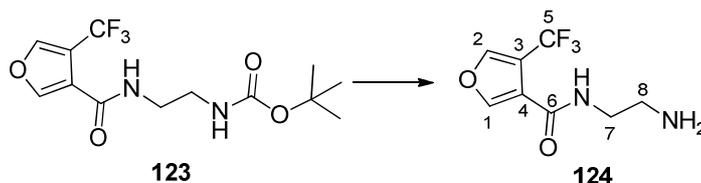
3-(Trifluoromethyl)-4-carboxyfuran **122** (15.0 mg, 83.3 μ mol, 1.0 Äq) und *N*-Boc-ethylendiamin **99** (15 mL, 93.7 μ mol, 1.2 Äq) wurden in Dimethylformamid (2 mL) gelöst. Anschließend wurden *N,N*-Disopropylethylamin (30 mL, 181.6 μ mol, 2.2 Äq) und (7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (85 mg, 163.0 μ mol, 2.0 Äq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in Essigsäureethylester (5 mL) gelöst, mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand

Experimenteller Teil

säulenchromatographisch (Essigsäureethylester) gereinigt. Das erhaltene Rohprodukt wurde abschließend in Chloroform umkristallisiert. *tert*-Butyl{2-[4-(trifluoromethyl)furan-3-carboxamido]ethyl}carbammat **123** (22.5 mg, 69.9 μ mol, 84%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten.

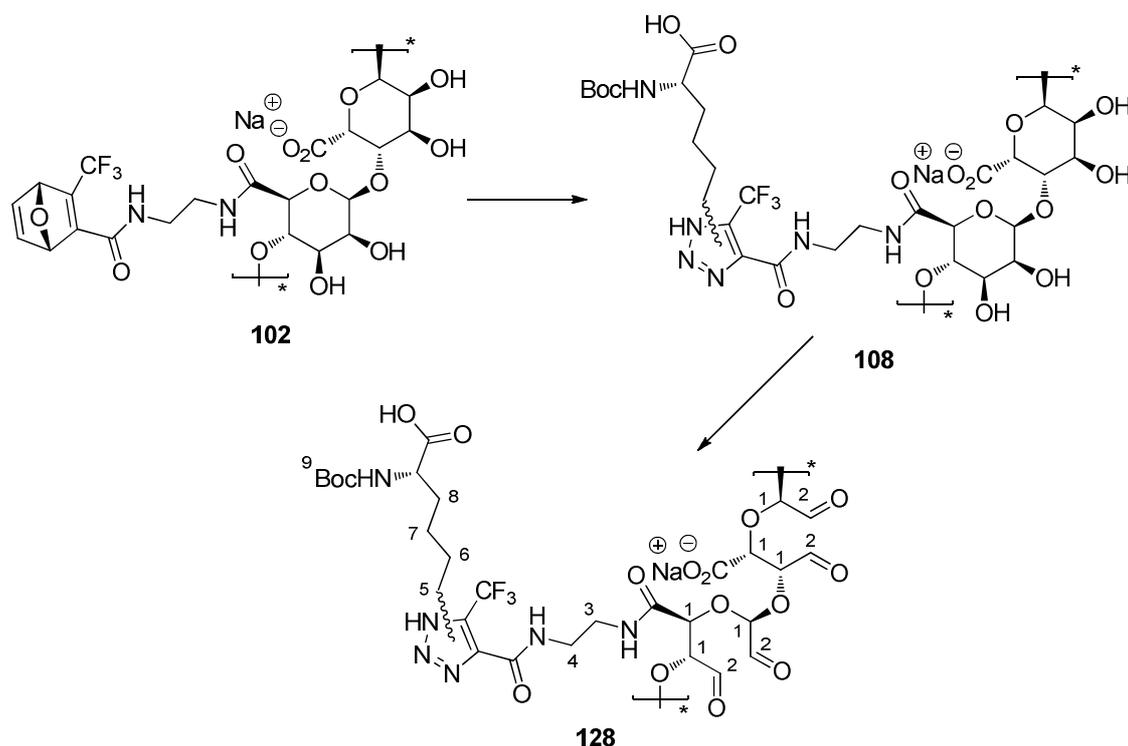
Smp= 130°C; **R_F**= 0.8 (EE); **¹⁹F-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ = -57.9 ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.24 ppm): δ = 7.93 (s, 1H, H-1), 7.78 (s, 1H, H-2), 6.88 (bs, 1H, H-10), 4.99 (bs, 1H, H-7) 3.51 (q, 2H, ³J = 5.48 Hz, H-9), 3.35 (q, 2H, ³J = 5.48 Hz, H-8), 1.41 (s, 9H, H-13) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 77.0 ppm): δ = 160.8 (s, C-6), 157.3 (s, C-11), 146.7 (s, C-1), 144.5 (q, ³J_{C,F} = 6.46 Hz, C-2), 123.2 (q, ¹J_{C,F} = 267.3 Hz, C-5), 120.1 (s, C-4), 115.9 (q, ²J_{C,F} = 34.8 Hz, C-3), 79.9 (s, C-12), 41.3 (s, C-8), 39.9 (s, C-9), 28.3 (s, C-13) ppm; **HRMS (ESI)**: *m/z* berechnet für C₁₃H₁₇N₂O₄F₃Na: 345.1038 [M+Na]⁺, gefunden 345.1039 [M+Na]⁺.

8.4.49 Synthese von *N*-(2-Aminoethyl)-4-(trifluoromethyl)furan-3-carboxamid **124**



tert-Butyl{2-[4-(trifluoromethyl)furan-3-carboxamido]ethyl}carbammat **123** (5 mg, 15.5 μ mol, 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (2 mL) gelöst, Trifluoroessigsäure (12 μ L, 155.3 μ mol, 10 Äq) zugegeben und die Mischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter Zugabe von Toluol (3 mL) wurden sowohl die Lösungsmittel als auch überschüssige Trifluoroessigsäure unter vermindertem Druck azeotrop entfernt. *N*-(2-Aminoethyl)-4-(trifluoromethyl)furan-3-carboxamid **124** (2.2 mg, 9.9 μ mol, 64%) wurde in Form eines farblosen Feststoffes gewonnen.

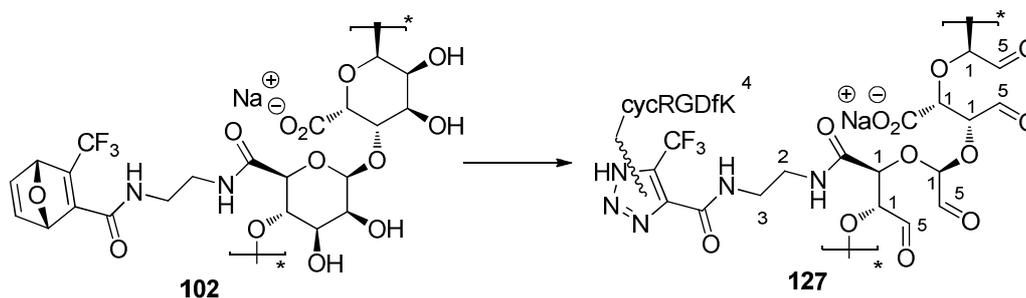
Smp= 65°C; **R_F**= 0.0 (EE); **¹⁹F-NMR** (500 MHz, D₂O): δ = -59.1 ppm; **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 8.11 - 8.10 (m, 1H, H-1), 8.08-8.07 (m, 1H, H-2), 3.64 (t, 2H, ³J = 6.02 Hz, H-7), 3.35 (t, 2H, ³J = 6.02 Hz, H-8) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O): δ = 164.3 (C-6), 146.7 (C-1), 145.7 (q, ³J_{C,F} = 6.32 Hz, C-2), 121.8 (q, ¹J_{C,F} = 266.3 Hz, C-5), 118.2 (C-4), 115.5 (q, ²J_{C,F} = 43.6 Hz, C-3), 38.9 (C-8), 36.9 (C-7) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₈H₉F₃N₂O₂: 233.0692 [M+H]⁺, gefunden 223.0694 [M+H]⁺.

8.4.50 Metall-freie *Click-Chemie* am Polymer: Synthese von Triazol-gebundenem Azido-Boc-Lysin Aldehydo-Alginat **128**


Oxanorbonadien-funktionalisiertes Alginat **102** (14.0 mg, 0.035 mmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) bis zur Homogenität gelöst, Azido-Boc-lysine **107** (9.4 mg, 0.035 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 d unter Lichtausschluss bei 40°C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung für 4 d intensiv gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das als farbloses Polymer erhaltene Azido-Boc-Lysin dekorierte Alginat **108** (10 mg, 0.017 mmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (3 mL) bis zur Homogenität gelöst, Natriumperodat (5.4 mg, 0.025 mmol, 1.5 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 24 h unter Lichtausschluss gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die gesamte Lösung für 3 d erschöpfend gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das Azido-Boc-Lysin dekorierte Aldehydo-Alginat **128** (6 mg) wurde als farbloses Polymer erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 5.15 (bs, 4H, H-2), 4.69-4.63 (m, 2H, H-5_{Triazol-cis}), 4.57-4.52 (m, 2H, H-5_{Triazol-trans}), 4.13-3.53 (m, 6H, H-1), 3.63-3.19 (m, 4H, H-3, H-2), 3.19-3.13 (m, 2H, H-8), 1.64-1.61 (m, 2H, H-7), 1.40 (s, 9H, H-9), 1.20-1.14 (m, 2H, H-6) ppm.

8.4.51 Metall-freie Ligation *Click-Chemie* am Polymer: Synthese von Triazolgebundenem cRGD Aldehydo-Alginat **127**

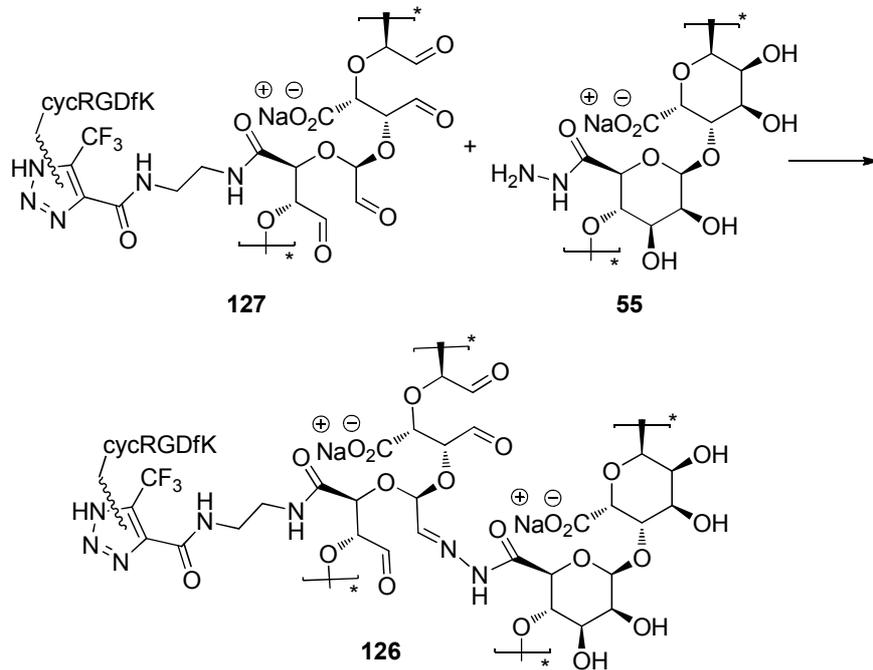


Oxanorbornadien-funktionalisiertes Alginat **102** (20 mg, 49.0 nmol, 1.0 Äq) wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (2 mL) bis zur Homogenität gelöst und Azido-cRGDFK **82** (3.10 mg, 4.9 nmol, 0.1 Äq) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss für 3 d gerührt, anschließend Natriumperodat (15 mg, 0.07 mmol, 1.5 Äq), gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (5 mL) zugetropft und für weitere 24 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die gesamte Lösung für 4 d erschöpfend gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ dialysiert und abschließend lyophilisiert. Das RGD-dekorierte Aldehydo-Alginat **127** (18 mg) wurde als farbloses Polymer erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , H_2O = 4.79 ppm): δ = 7.35-7.23 (m, 5H, H-4_{Phe}), 5.10 (br.s, 1H, H-5), 4.13-3.56 (m, 6H, H-1), 3.43 (s, 2H, H-3), 3.29 (s, 2H, H-2) 1.61-0.88 (6H, m, H-4_{Arg}) ppm.

Experimenteller Teil

8.4.52 Hydrogele aus cRGD-modifiziertem Aldehydo-Alginat **127** und Hydrazido-Alginat **55**



Zur Herstellung von wässrigen Hydrogelen **126** wurde das Triazol-gebundene RGD-modifizierte Aldehydo-Alginat **127** (2 mg) und Hydrazido-Alginat **55** (2 mg) in wässrigem Medium (100 μL) unter Erwärmung und starkem Schütteln bis zur Homogenität gelöst. Als Medium wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verwendet. Beide Polymerlösungen wurden anschließend miteinander vermischt. Entsprechend des Oxidationsgrades der Aldehydo-Komponente **127** und des Deritisierungsgrades der Hydrazido-Komponente **55** variierte die Dauer der Gelierung zwischen einer und zehn Minuten.

Berechnung der Belegung der RGD dekorierten Aldehydo Alginat **53**:

Stammlösung Azido-RGDfK **82**: 3 mg RGD in 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

20 mg Oxanorbordien funktionalisiertes Alginat = 0.0468 mmol (1.0 Äq.)

Verhältnis 1:100 = 0.468 μmol (0.01 Äq) \rightarrow 0.295 mg Azido-RGDfK **82**

\rightarrow 194.6 μL aus der Stammlösung

Verhältnis 1:1.000 = 0.0468 μmol (0.001 Äq) \rightarrow 0.0295 mg Azido-RGDfK **82**

\rightarrow 19.46 μL aus der Stammlösung

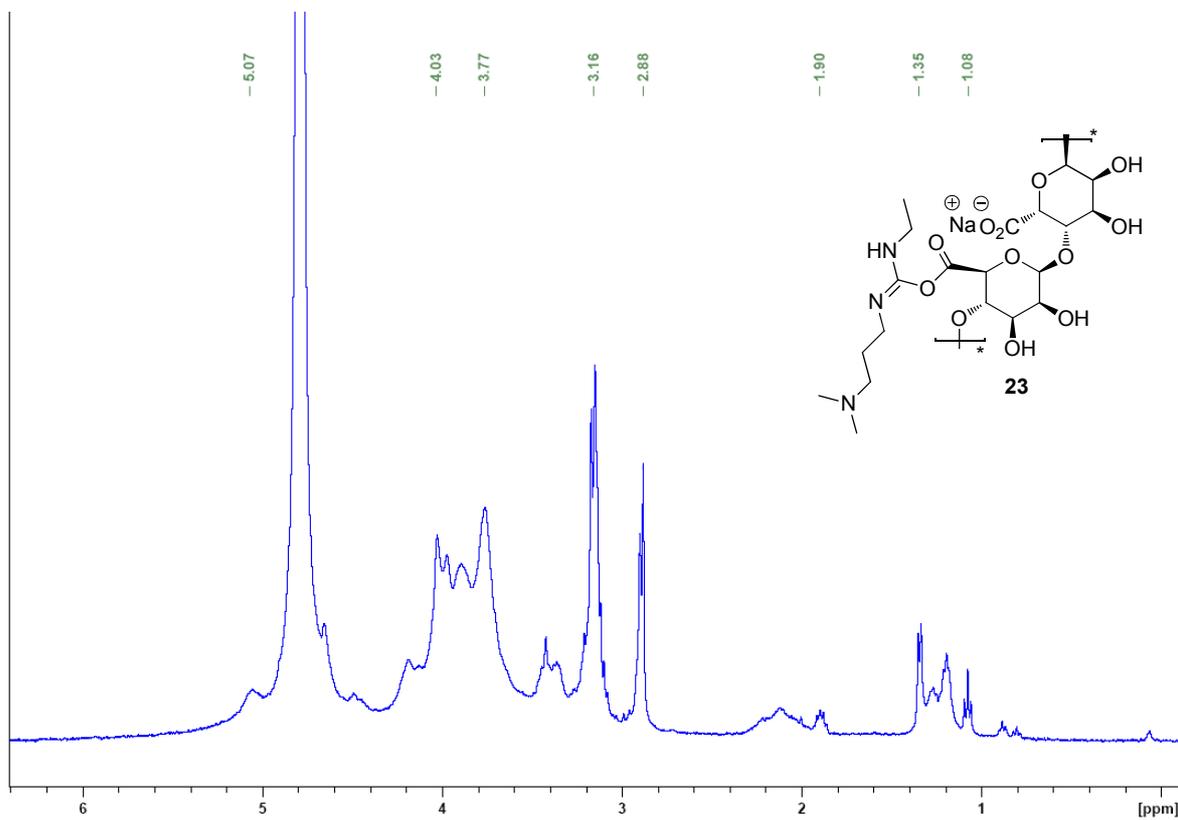
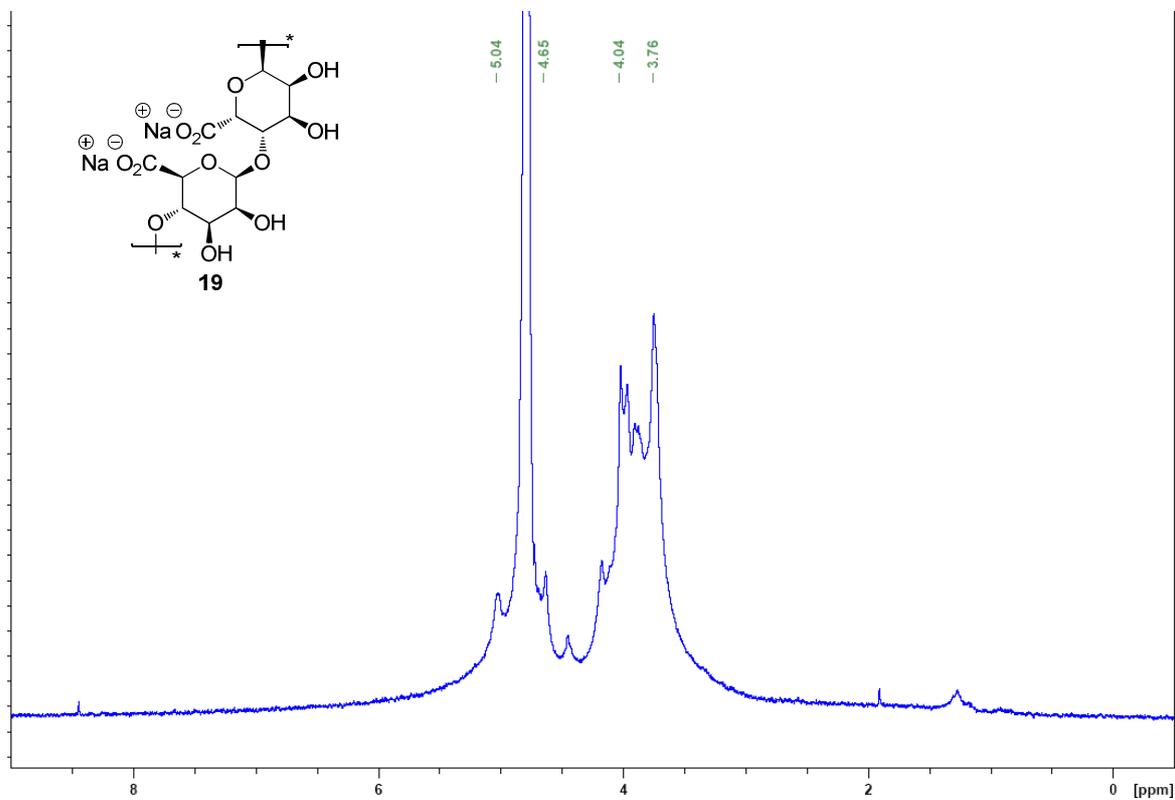
Verhältnis 1:10.000 = 4.684 nmol (0.0001 Äq) \rightarrow 2.95 μg Azido-RGDfK **82**

\rightarrow 1.946 μL aus der Stammlösung

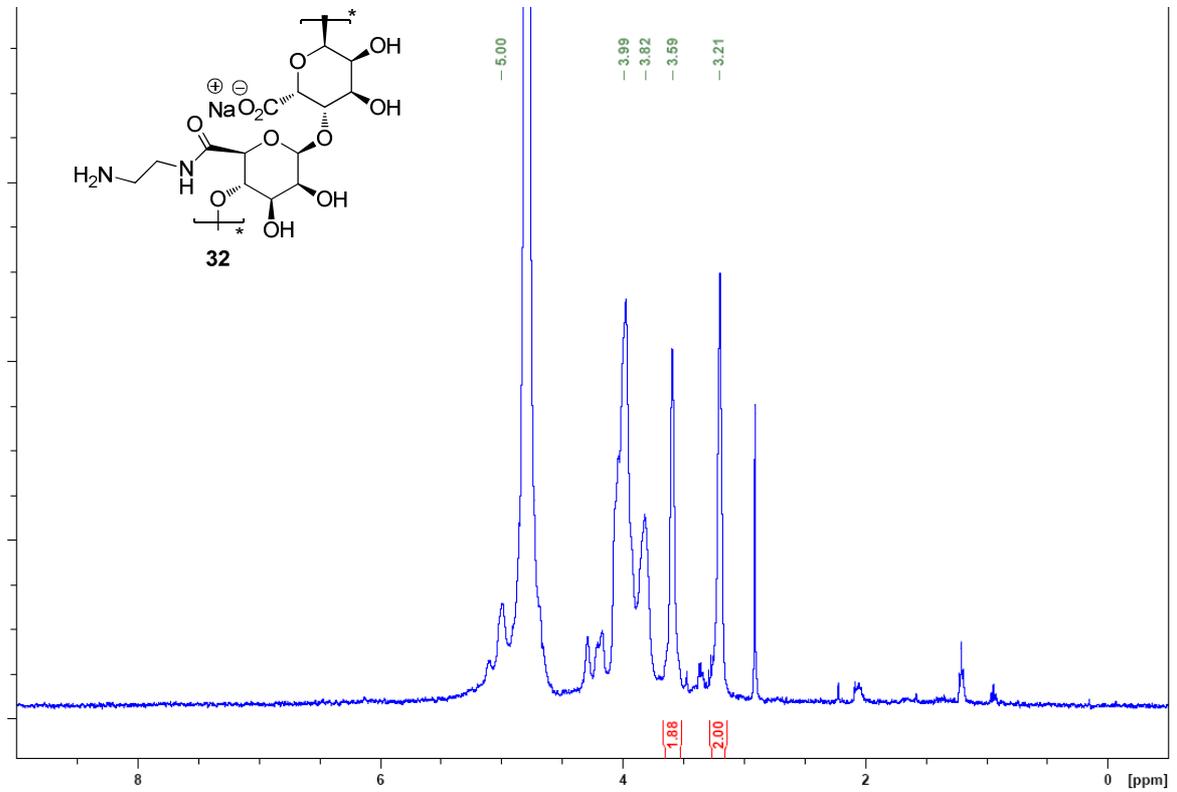
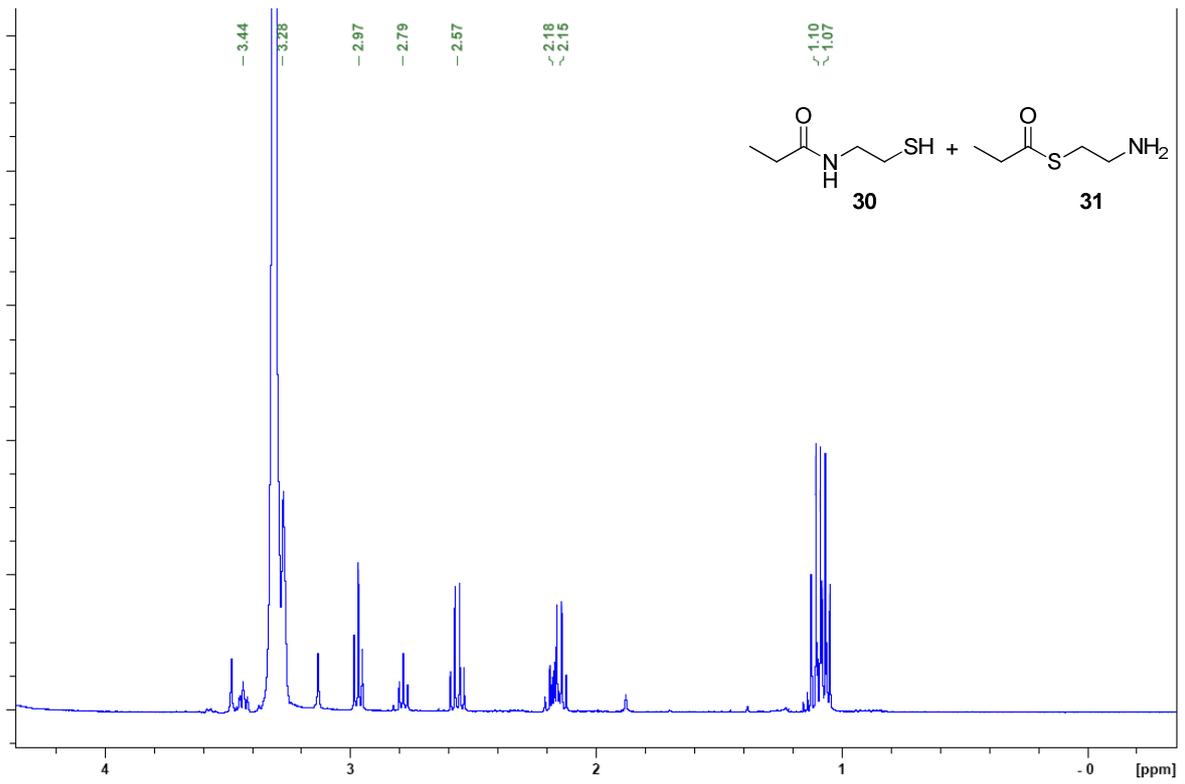
Verhältnis 1:100.000 = 0.468 nmol (0.00001 Äq) \rightarrow 0.295 μg Azido-RGDfK **82**

\rightarrow 0.195 μL aus der Stammlösung

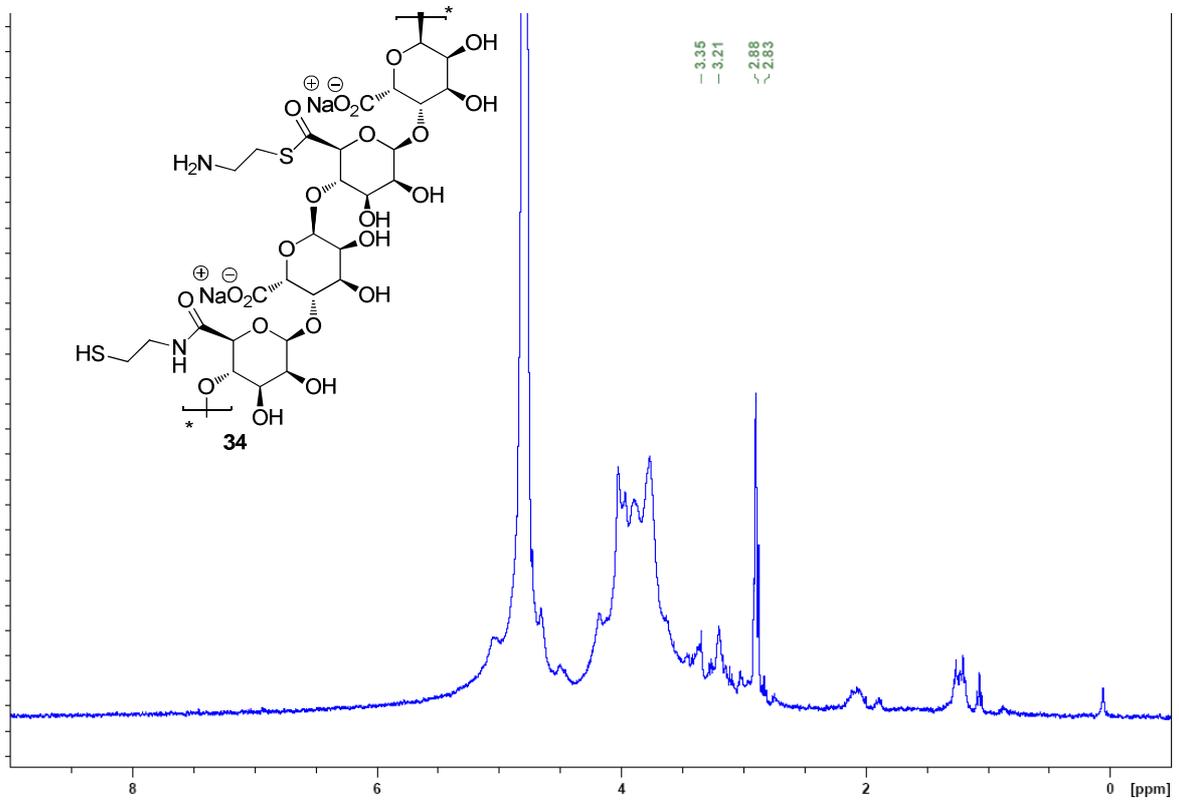
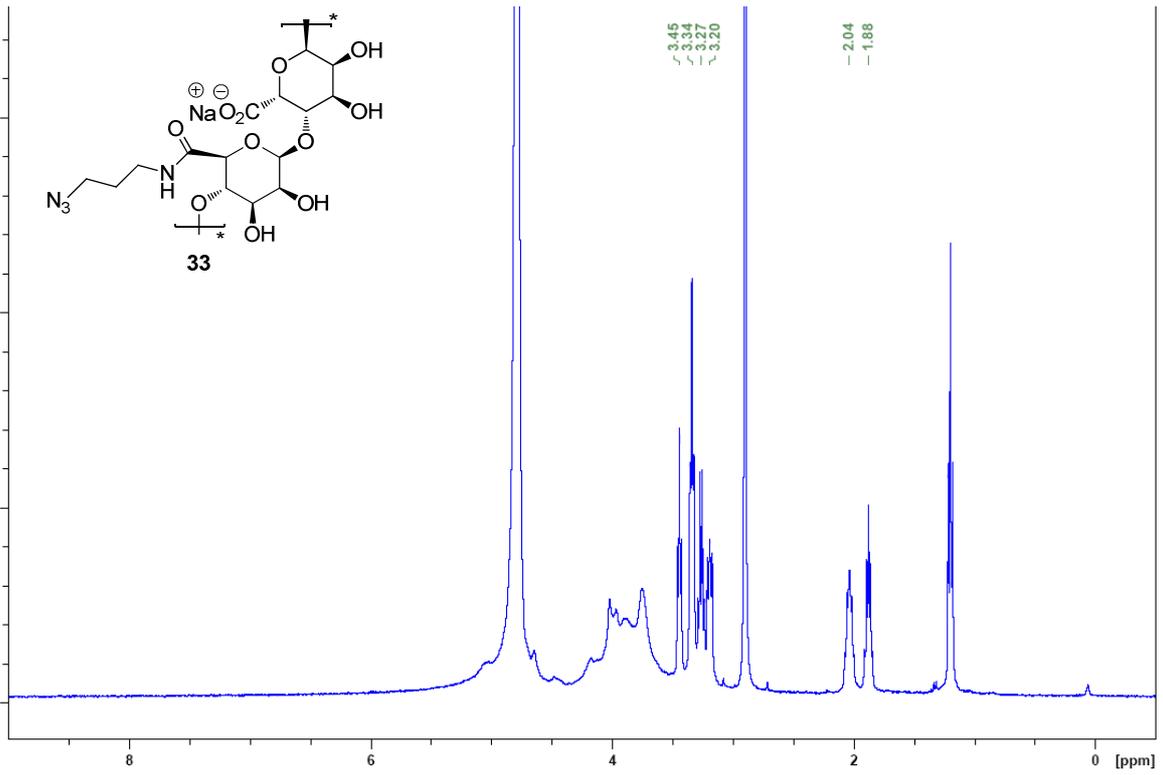
9. Anhang

9.1 ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR Spektren der Verbindungen **19** bis **128**

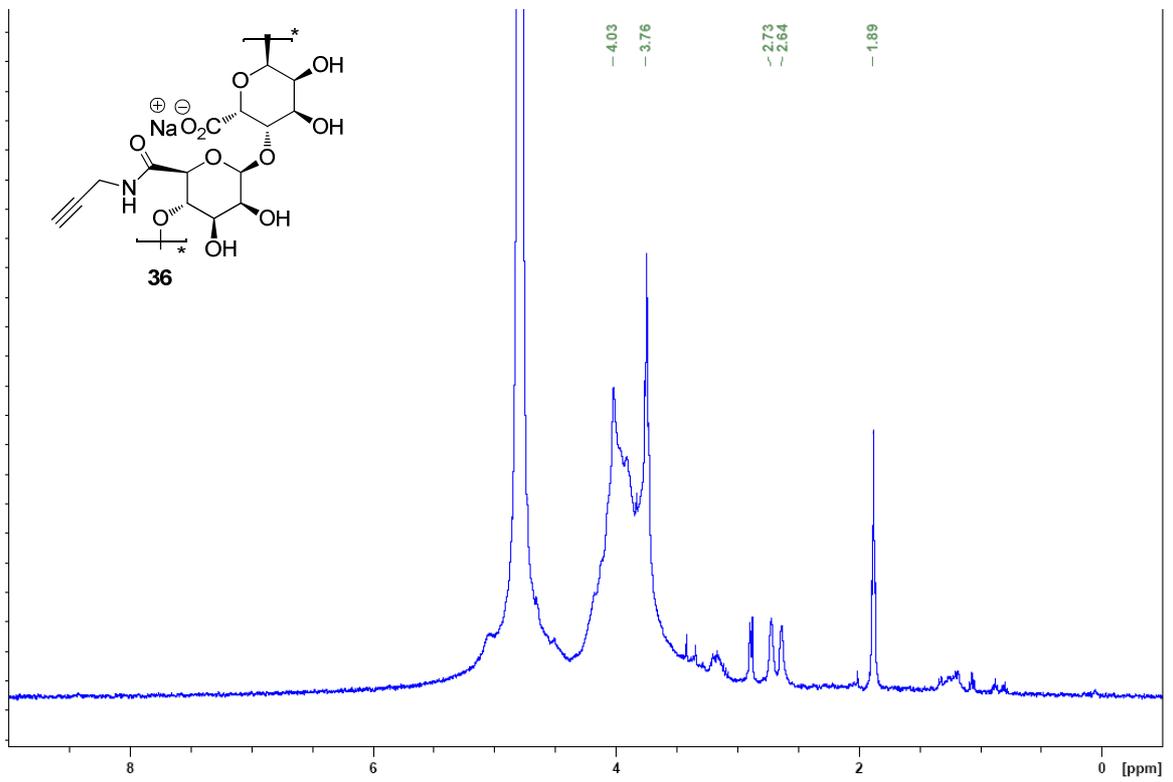
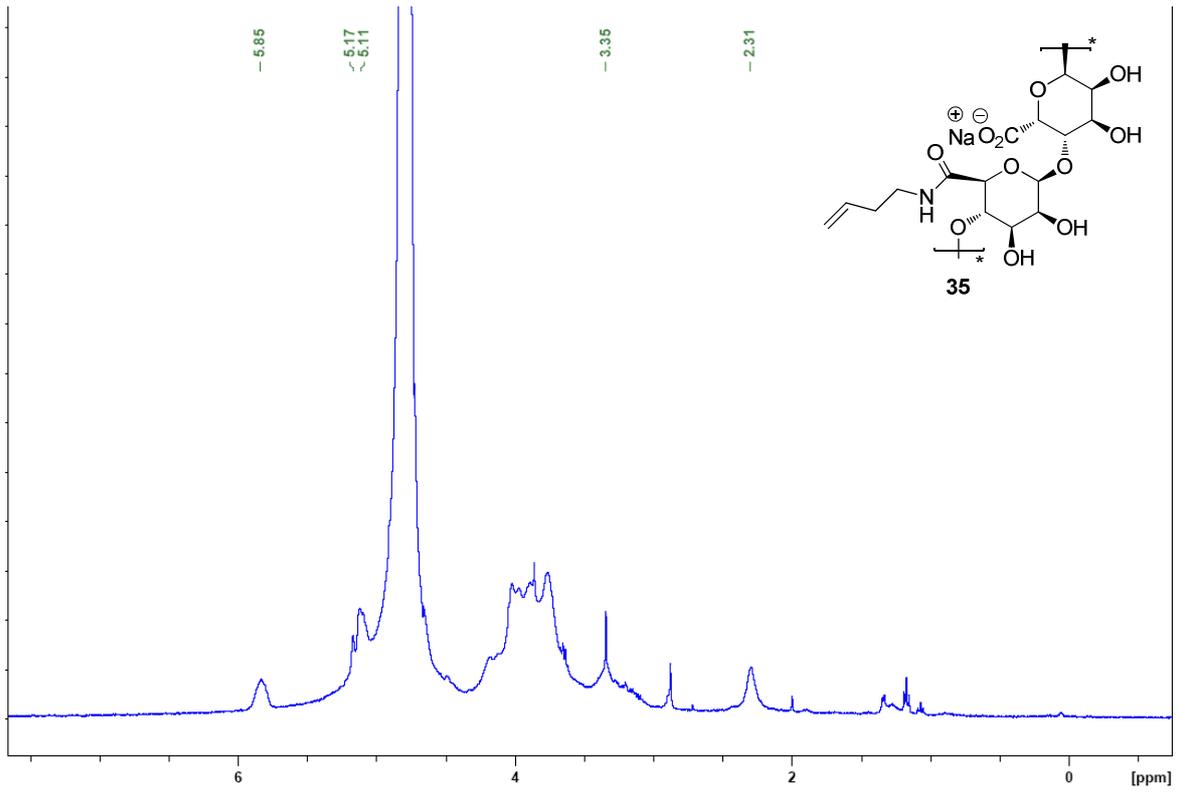
Anhang



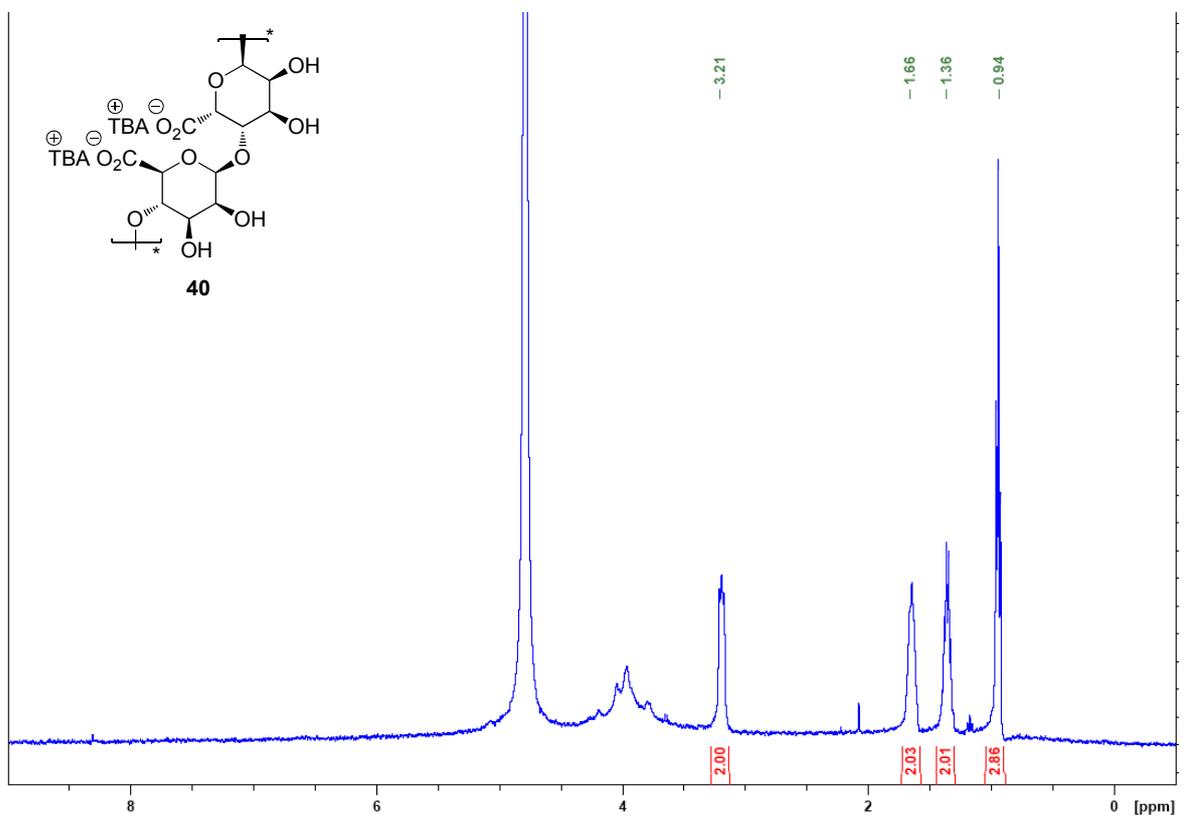
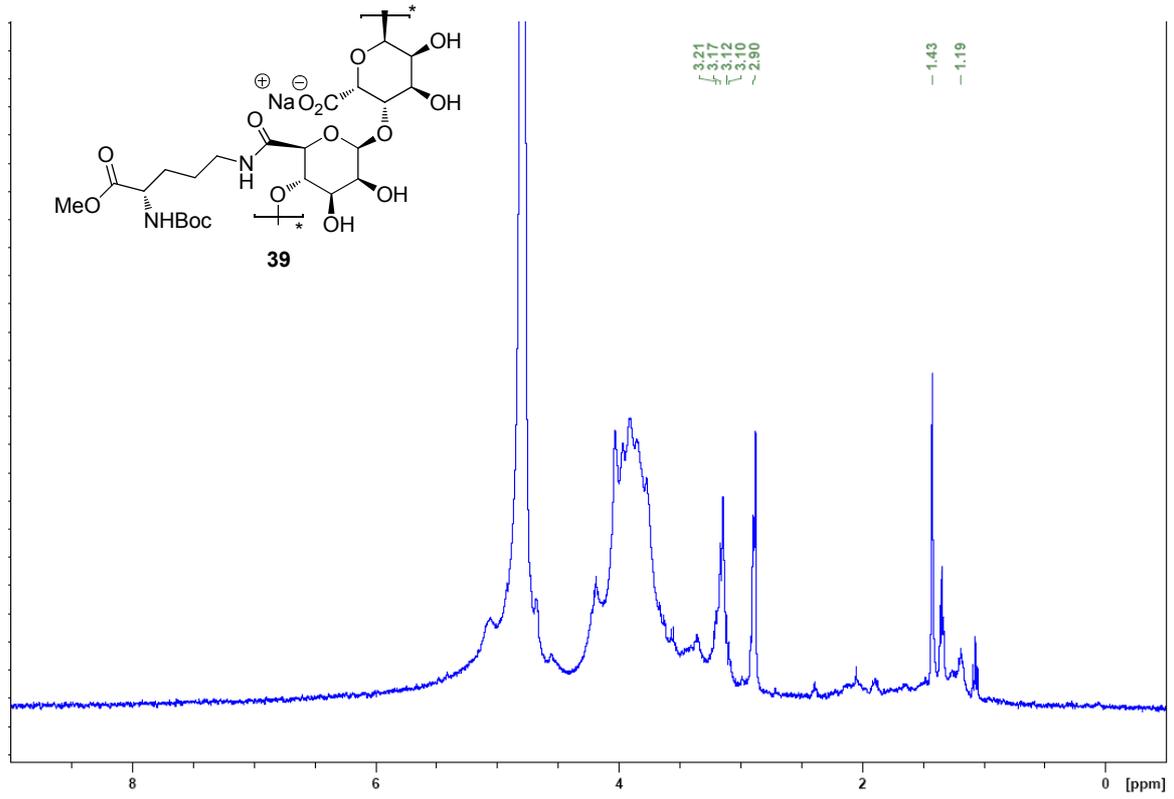
Anhang



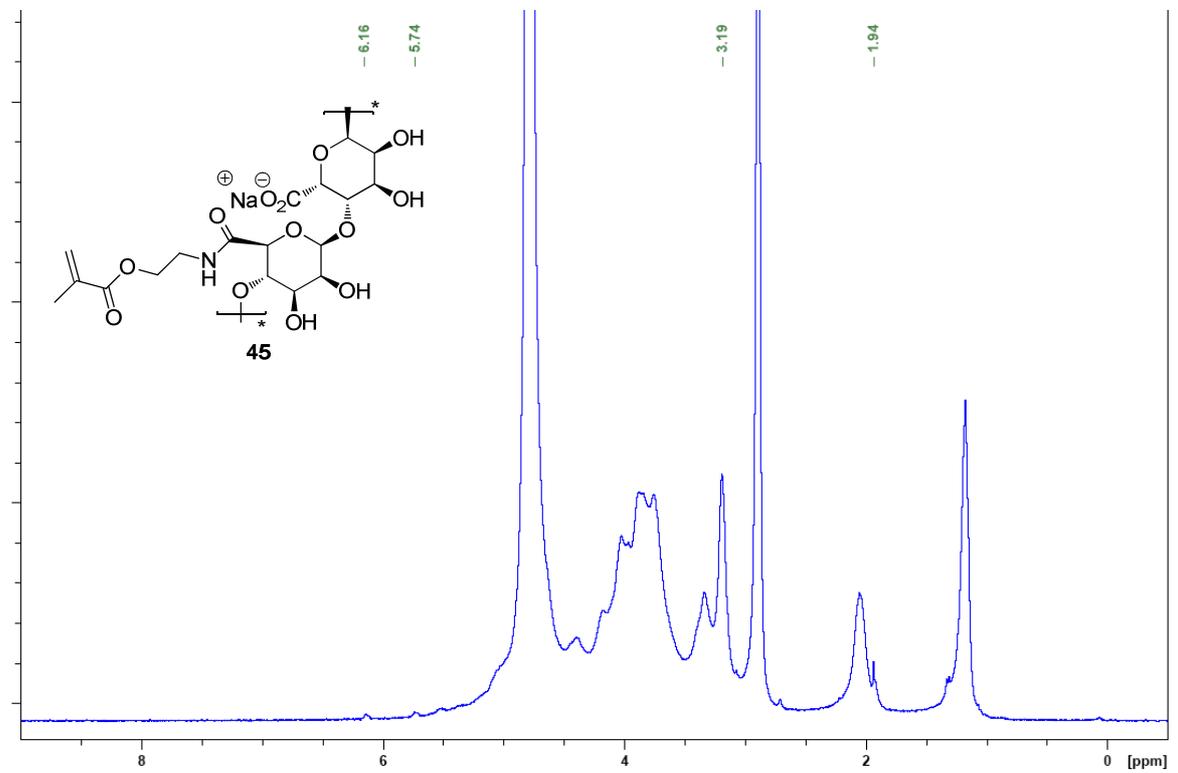
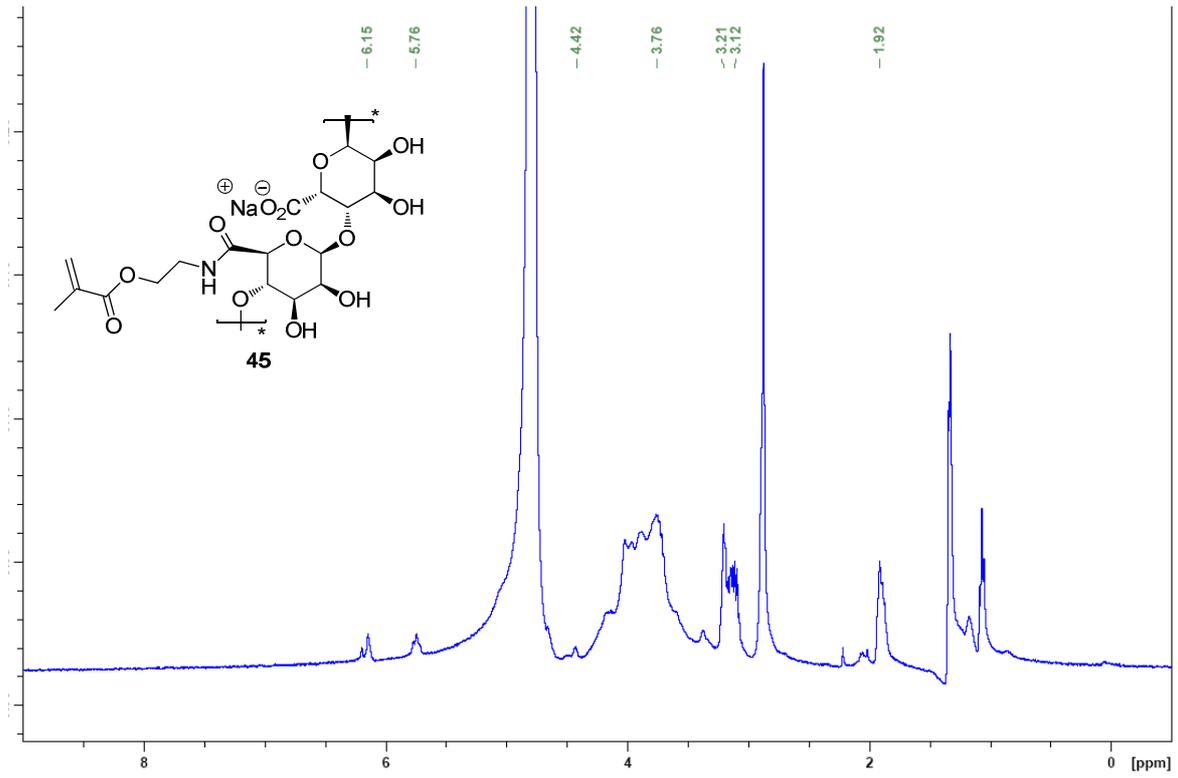
Anhang



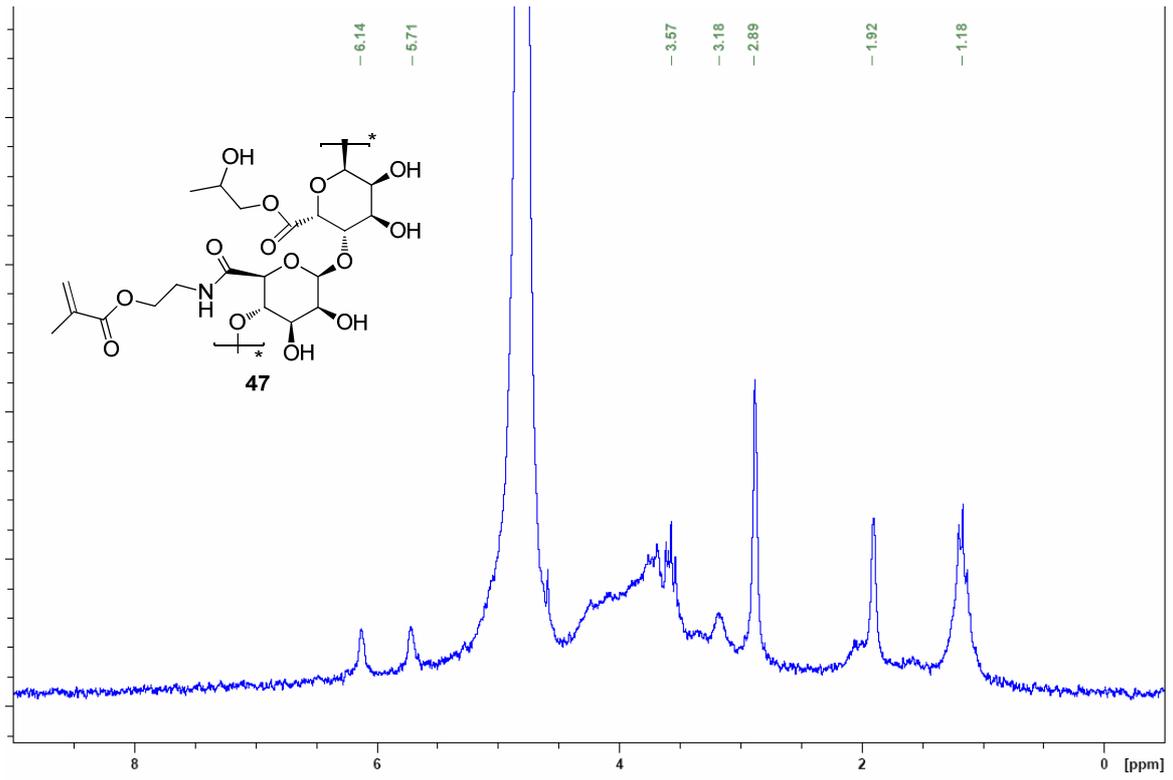
Anhang



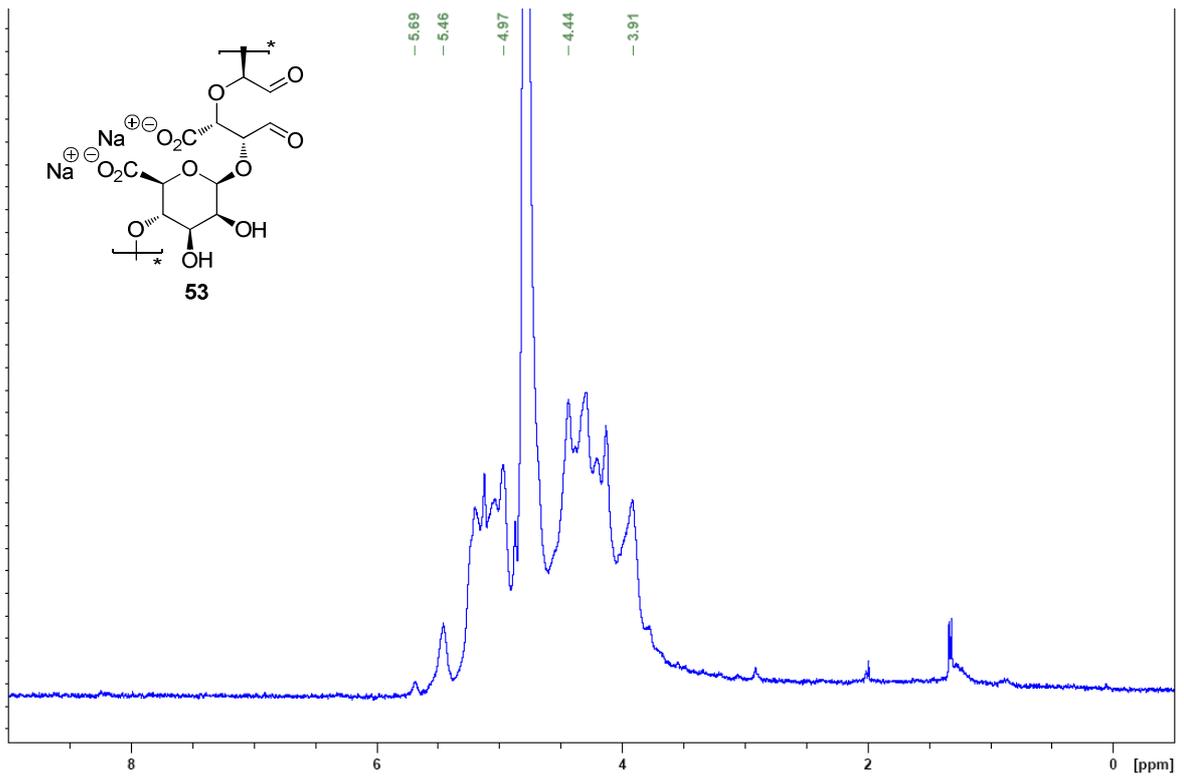
Anhang



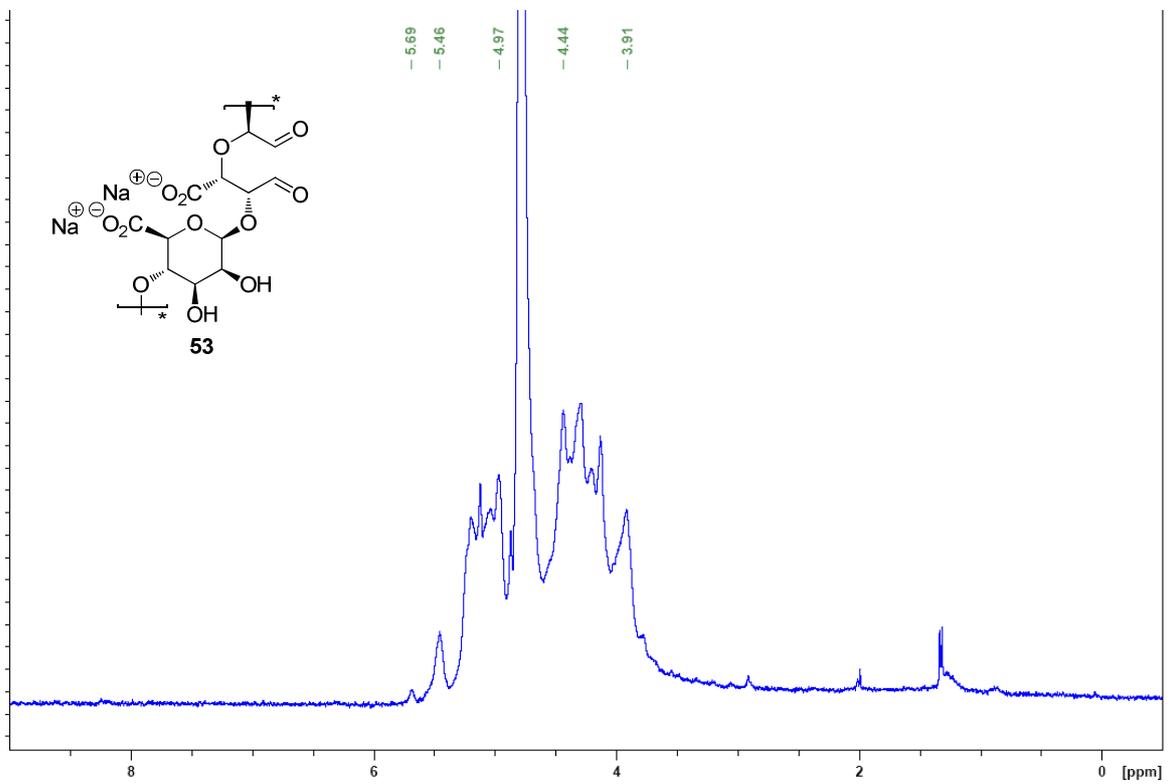
Anhang



Anhang

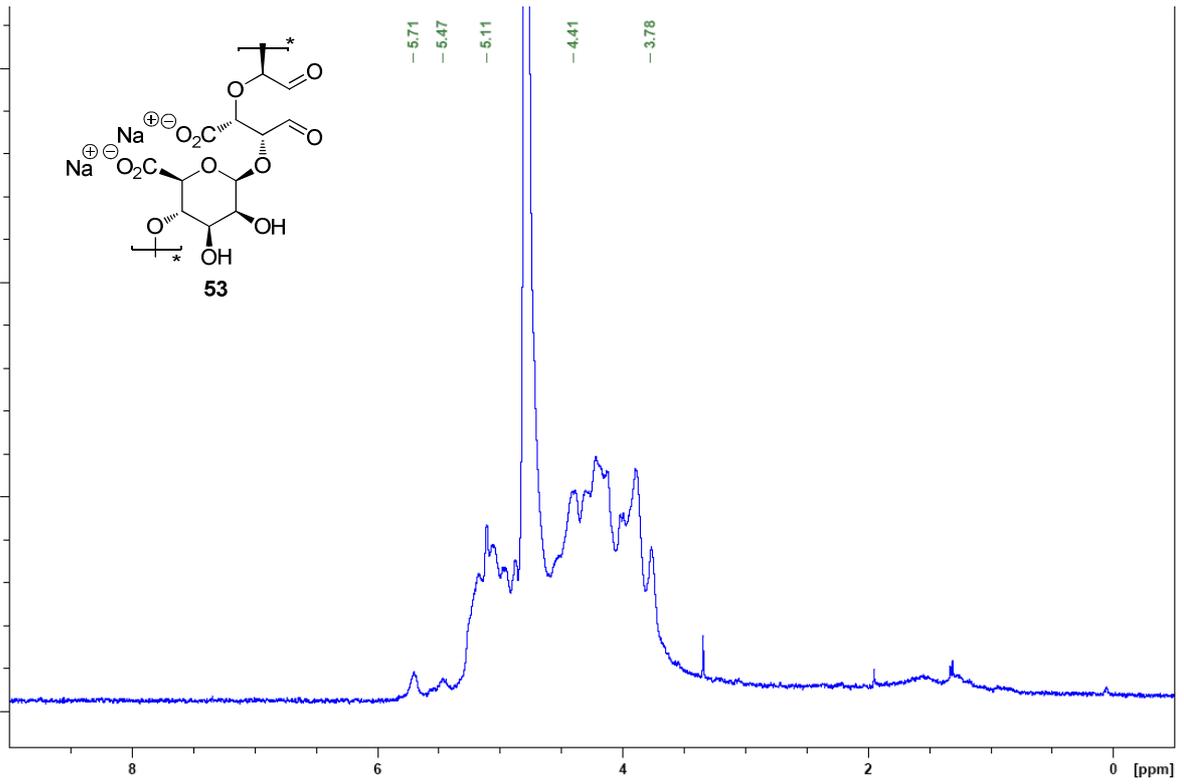


1.0 Äq. NaIO_4

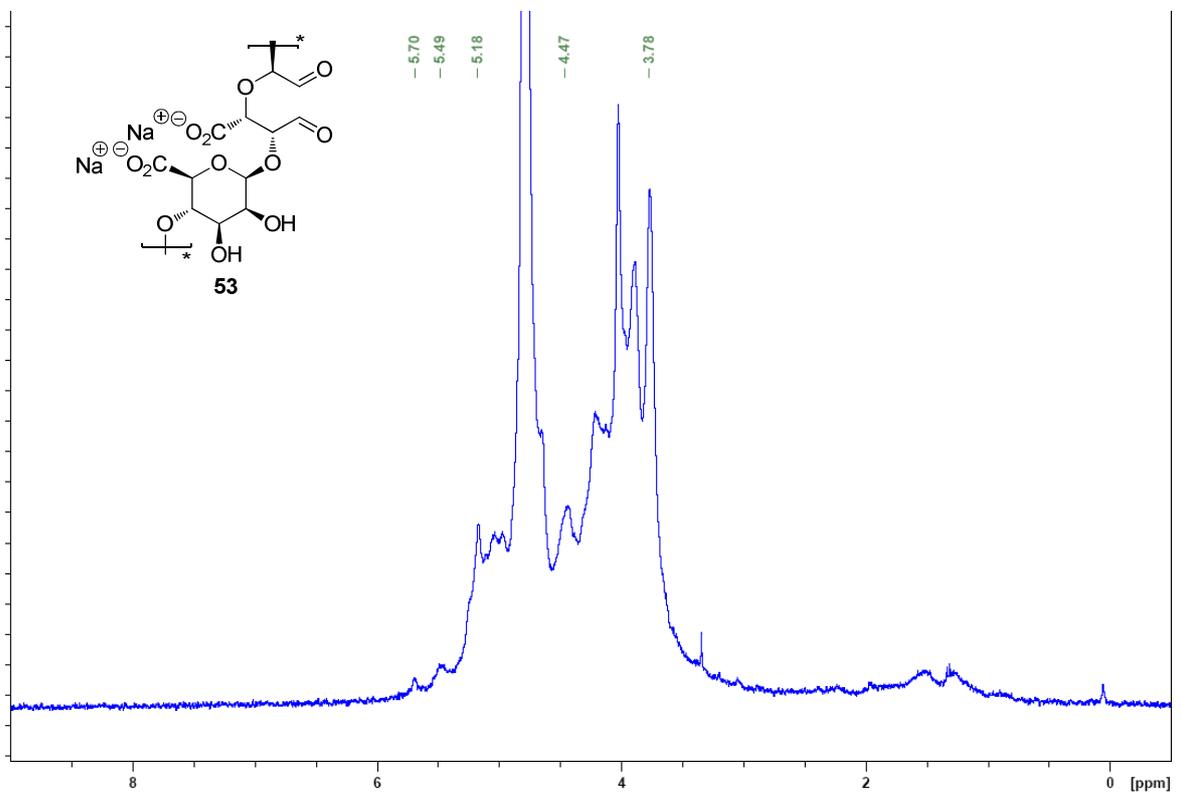


0.75 Äq. NaIO_4

Anhang

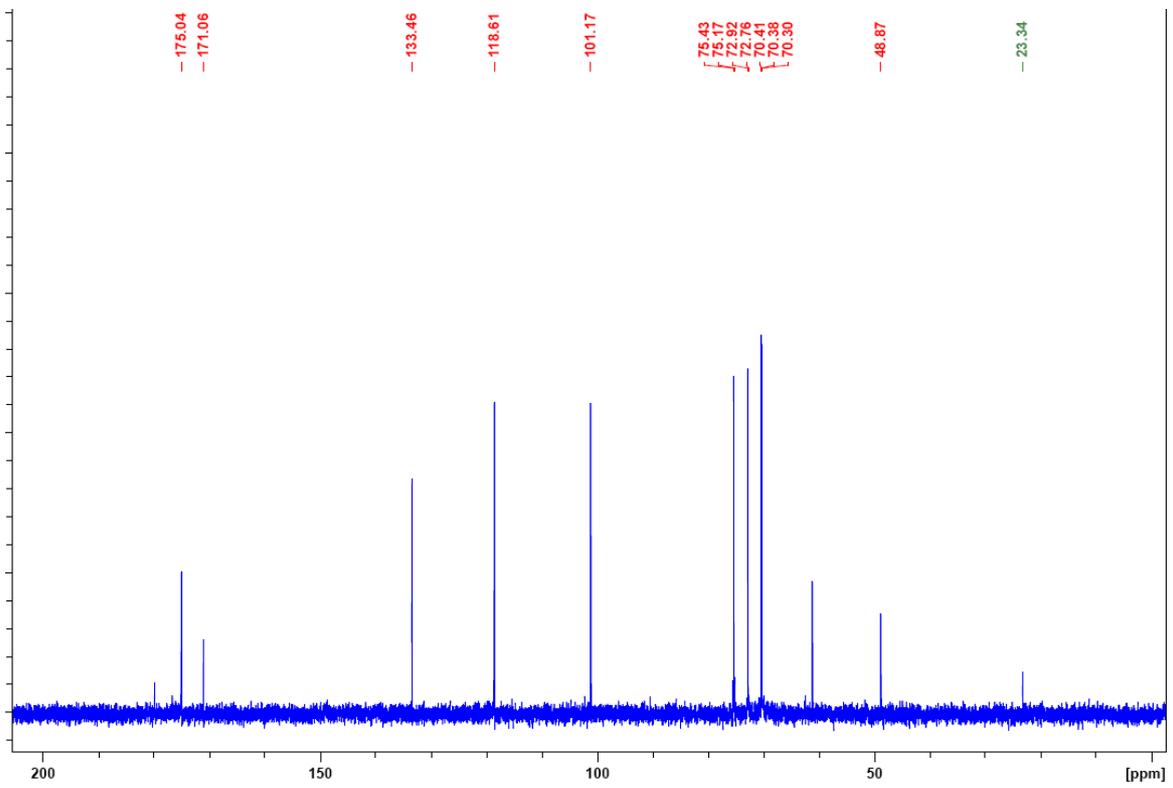
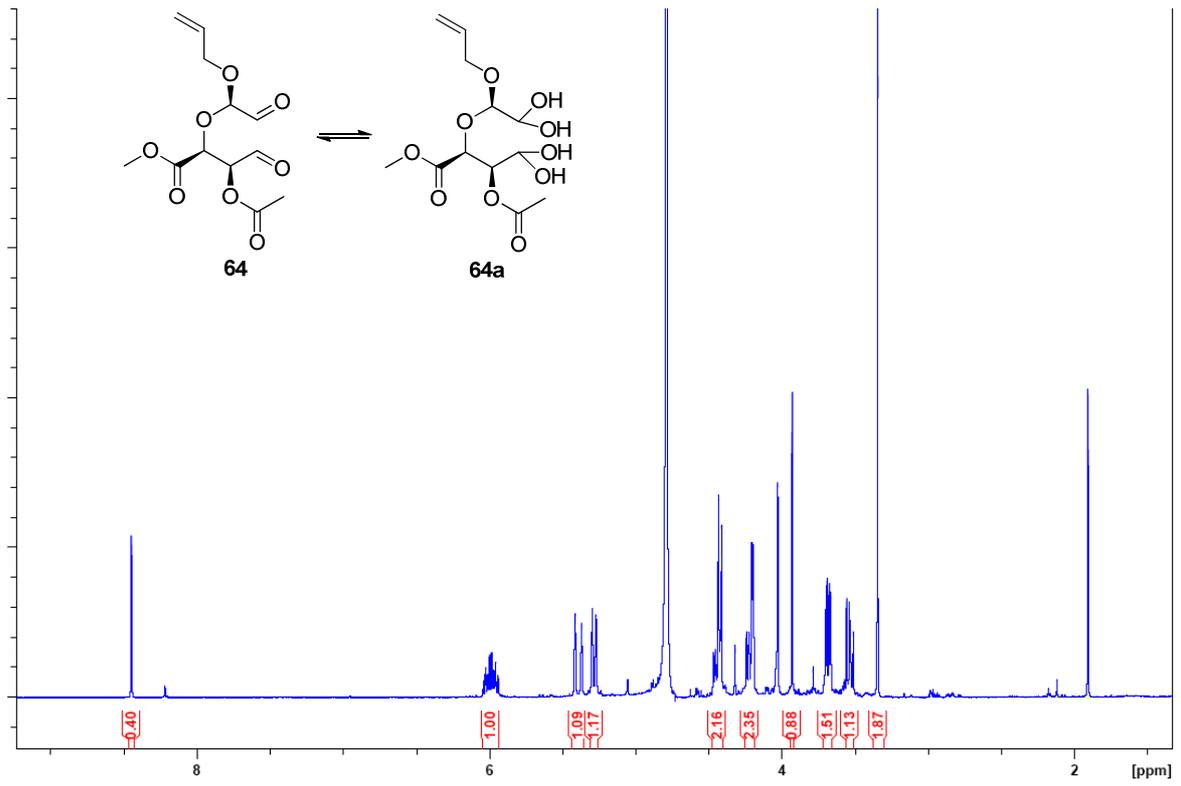


0.5 Äq. NaIO₄

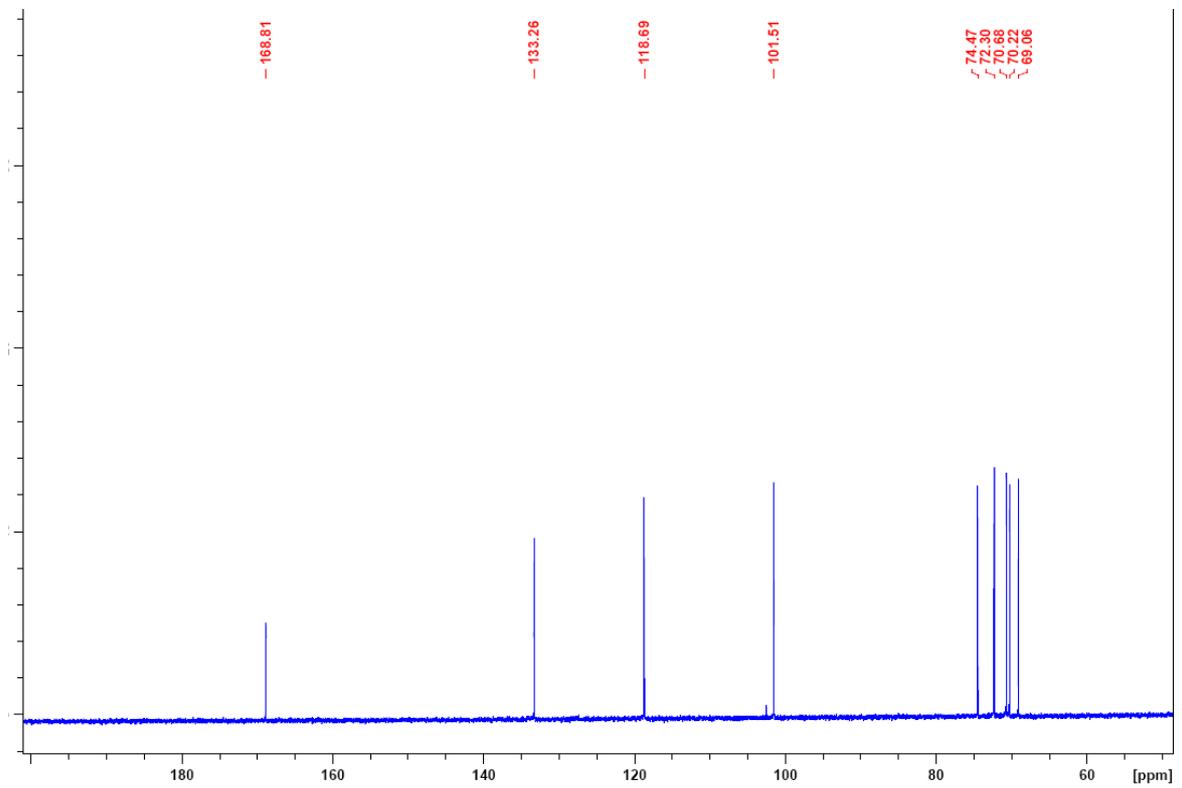
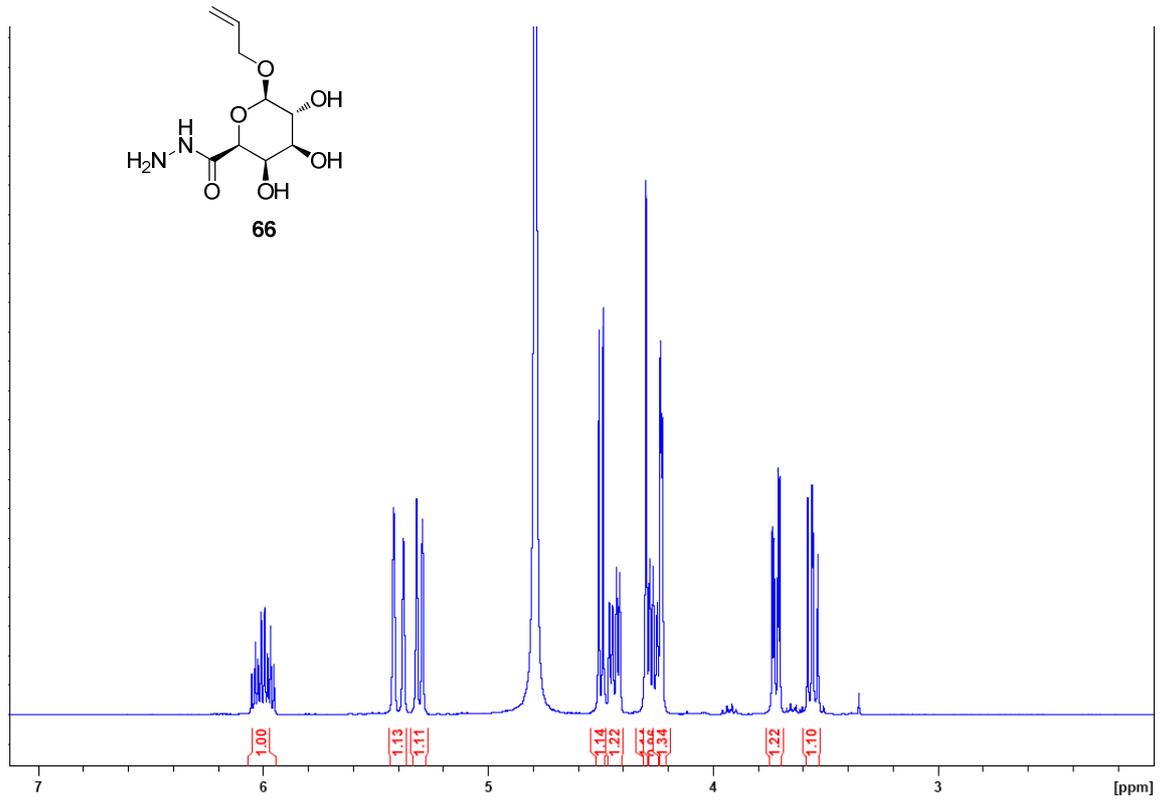


0.25 Äq. NaIO₄

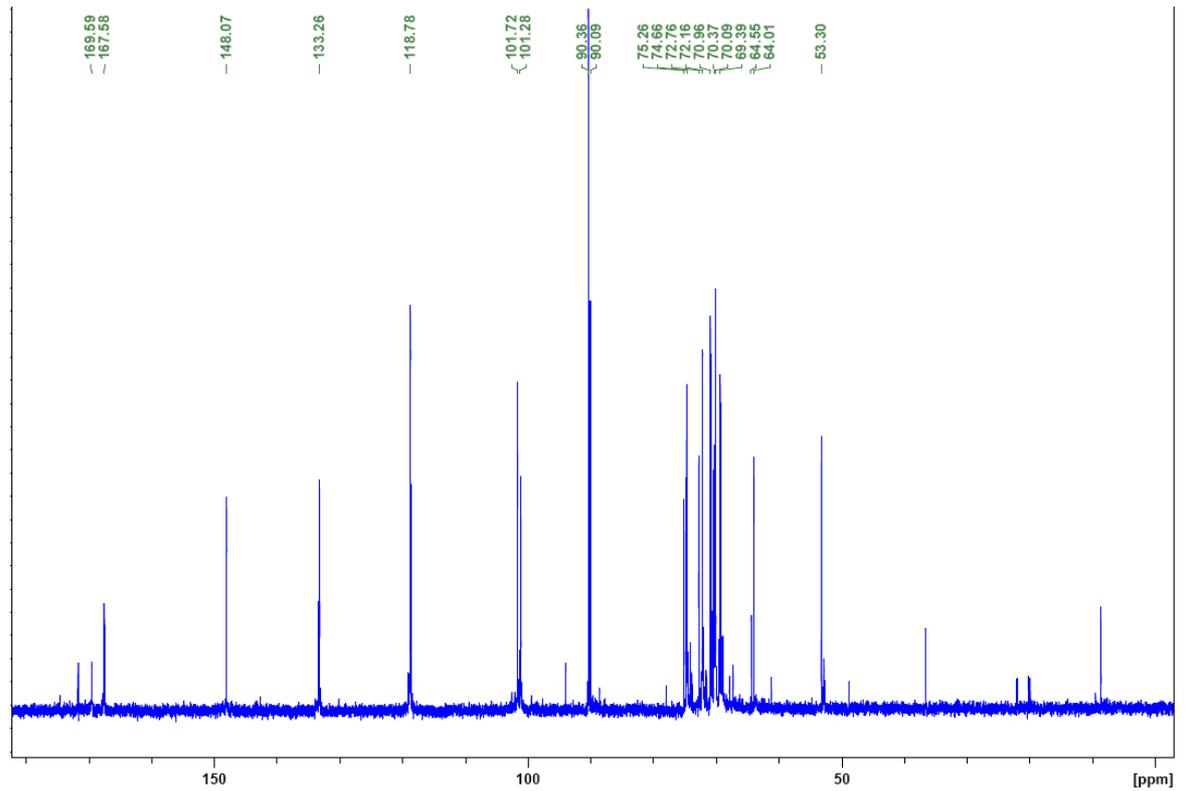
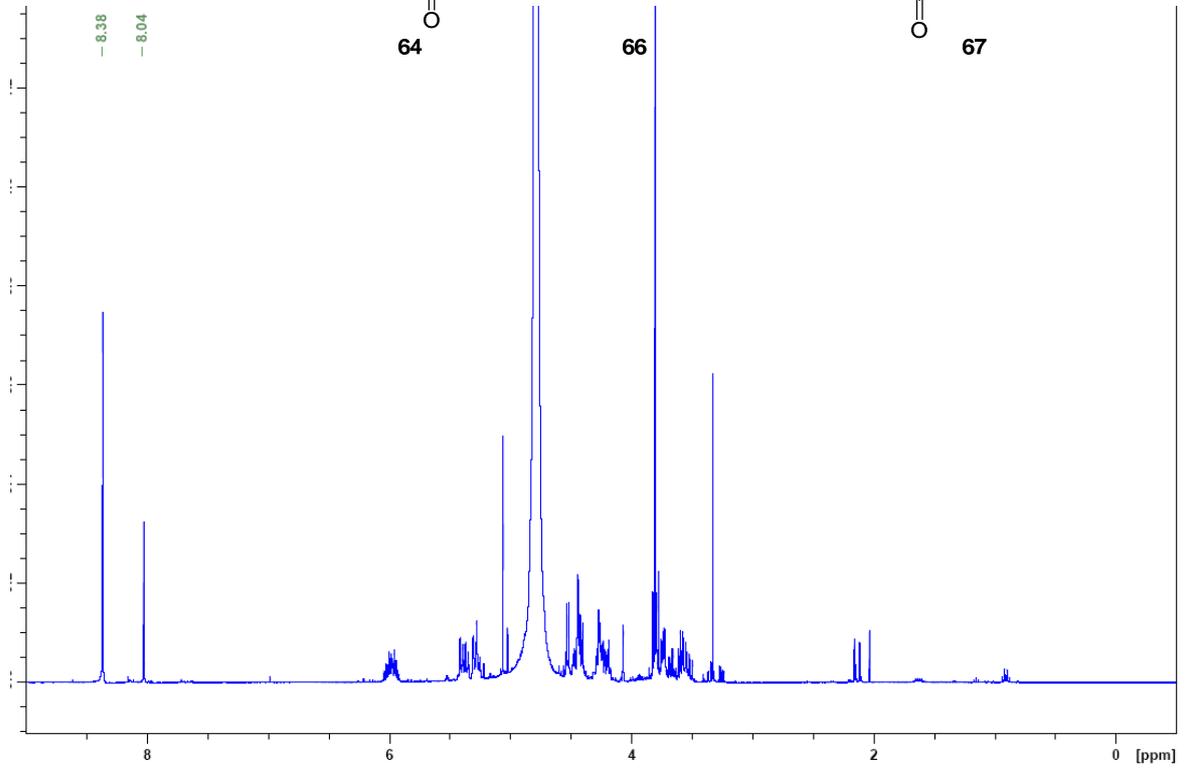
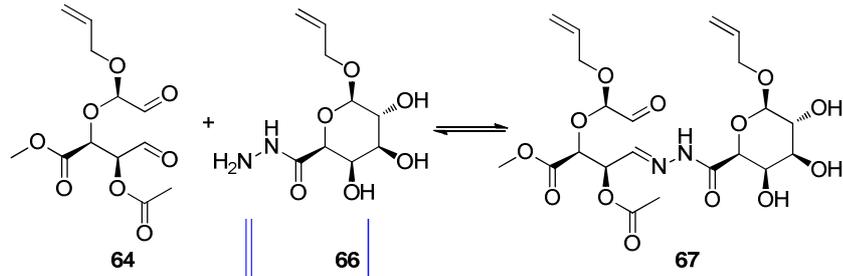
Anhang



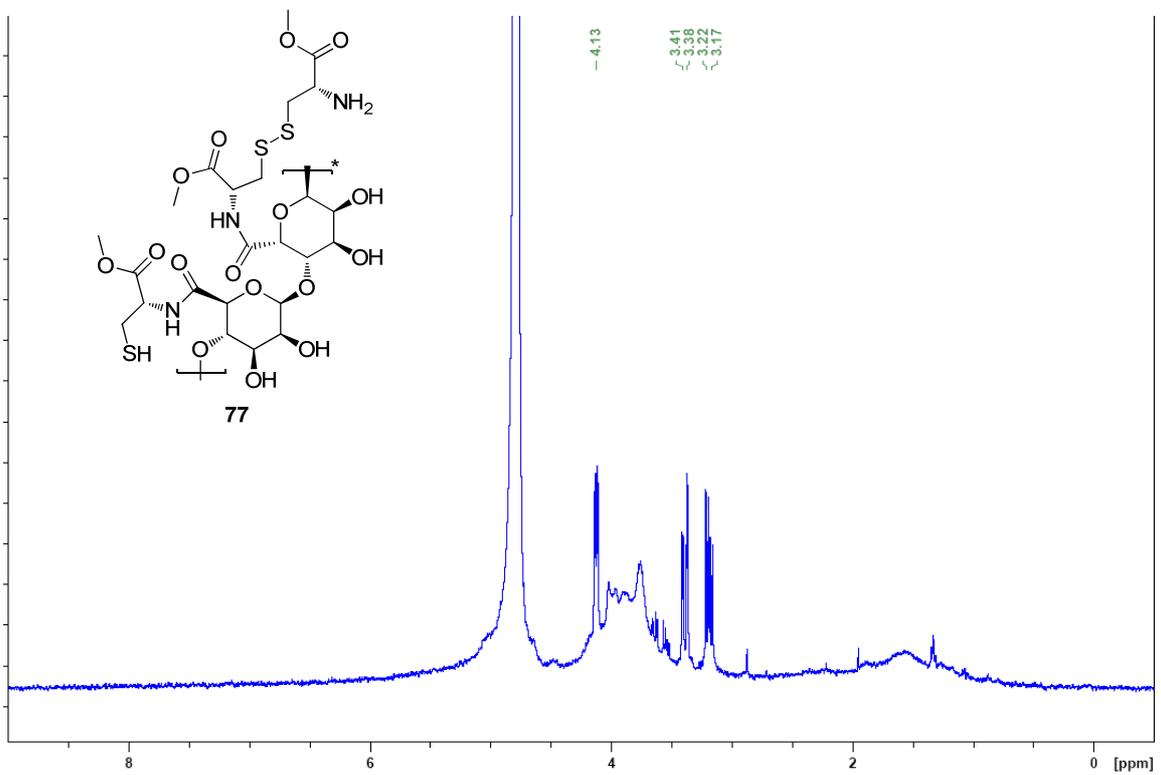
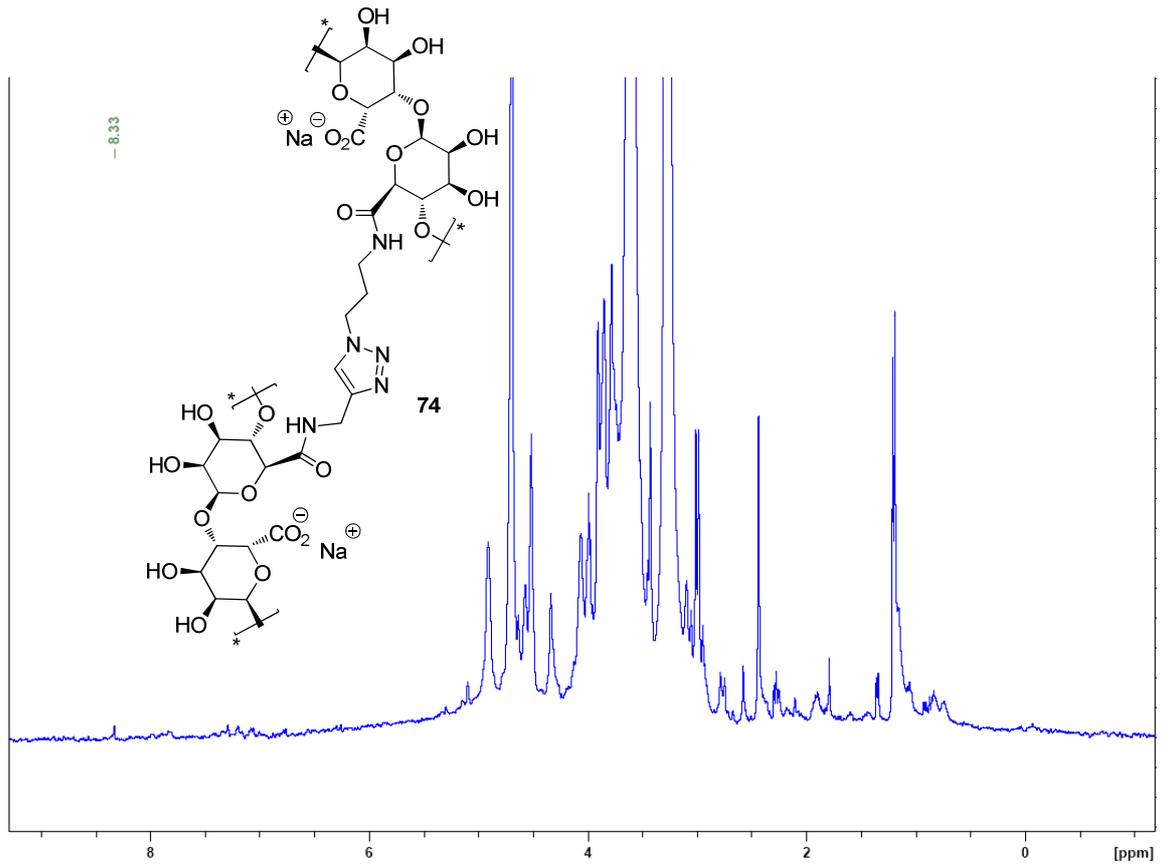
Anhang



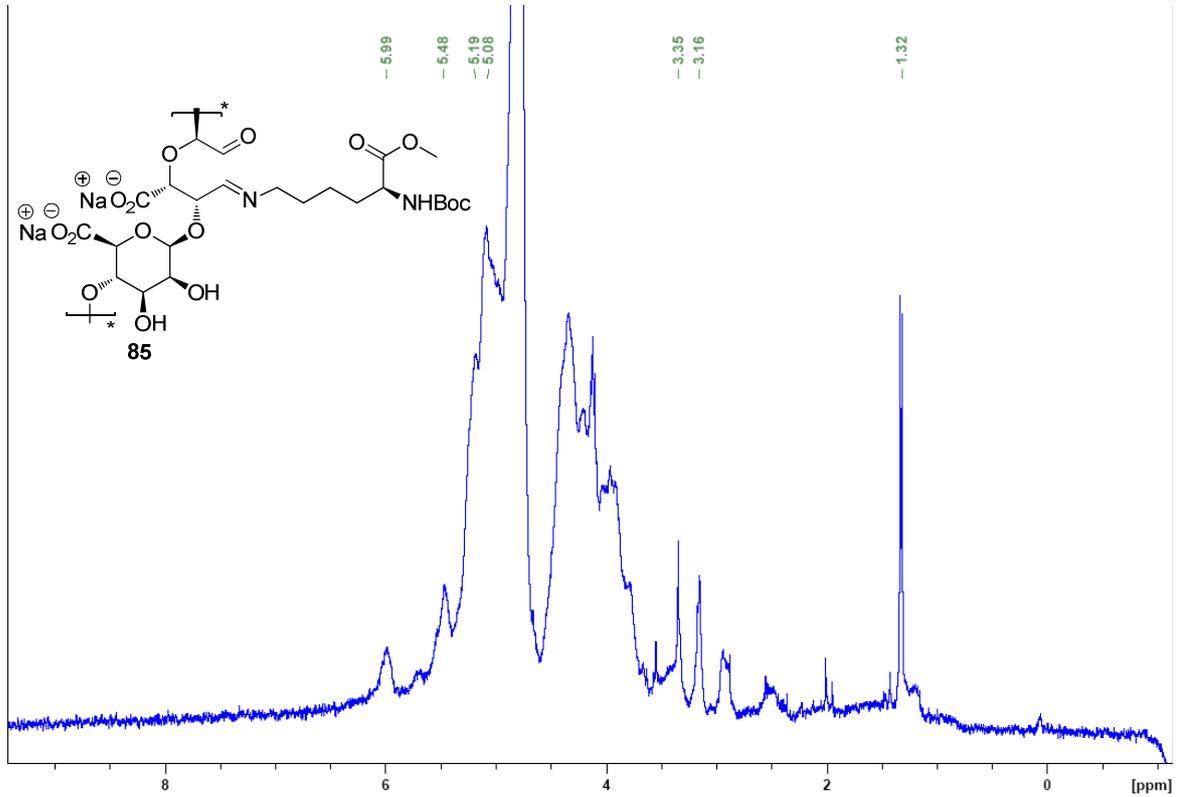
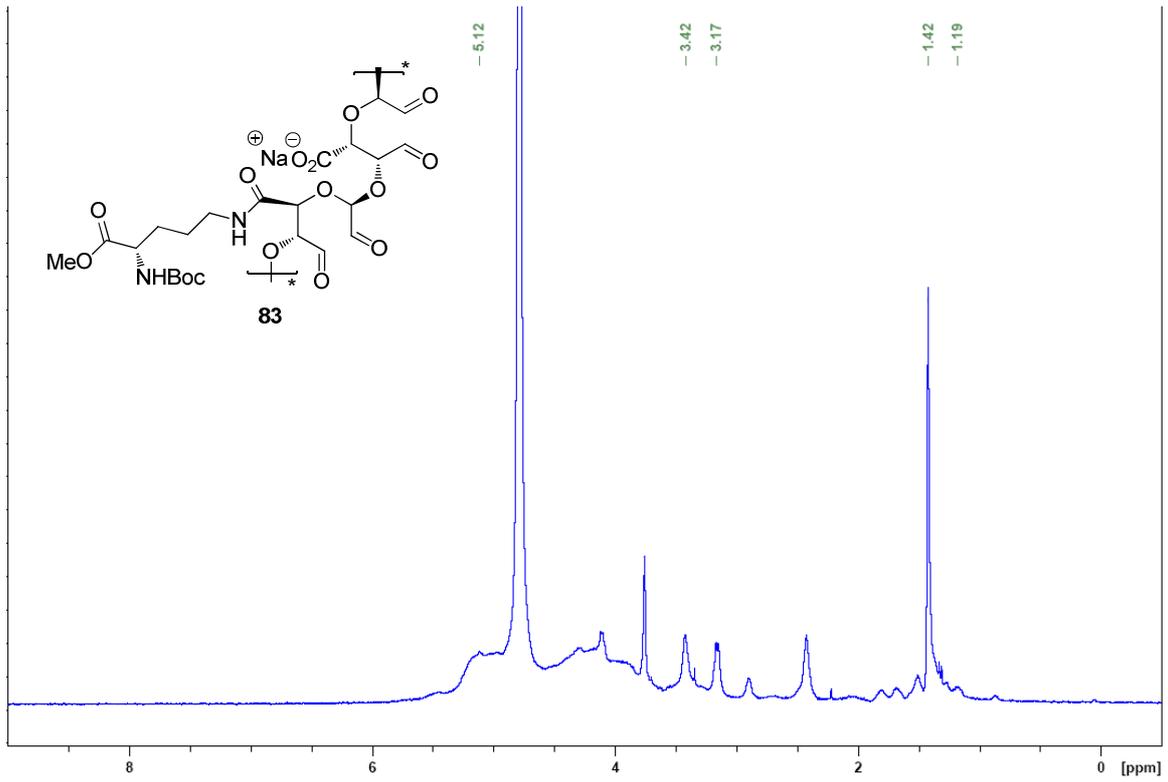
Anhang



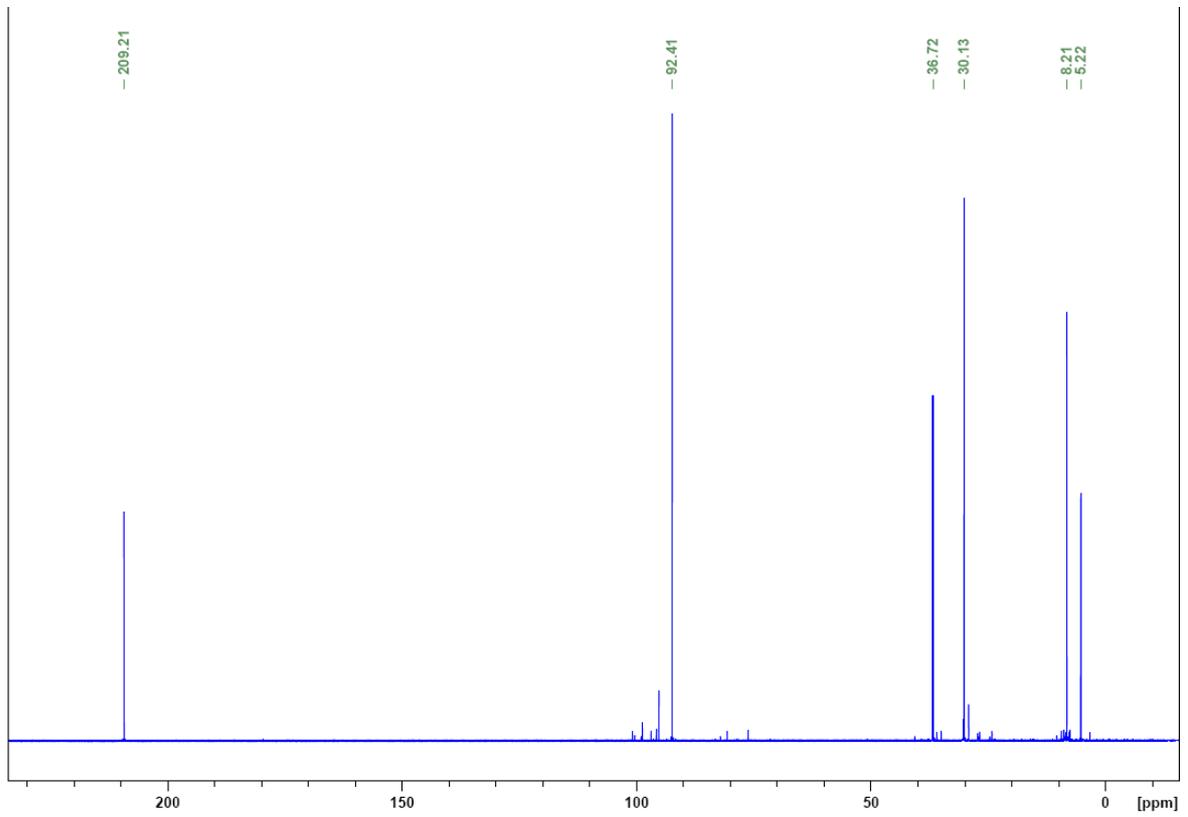
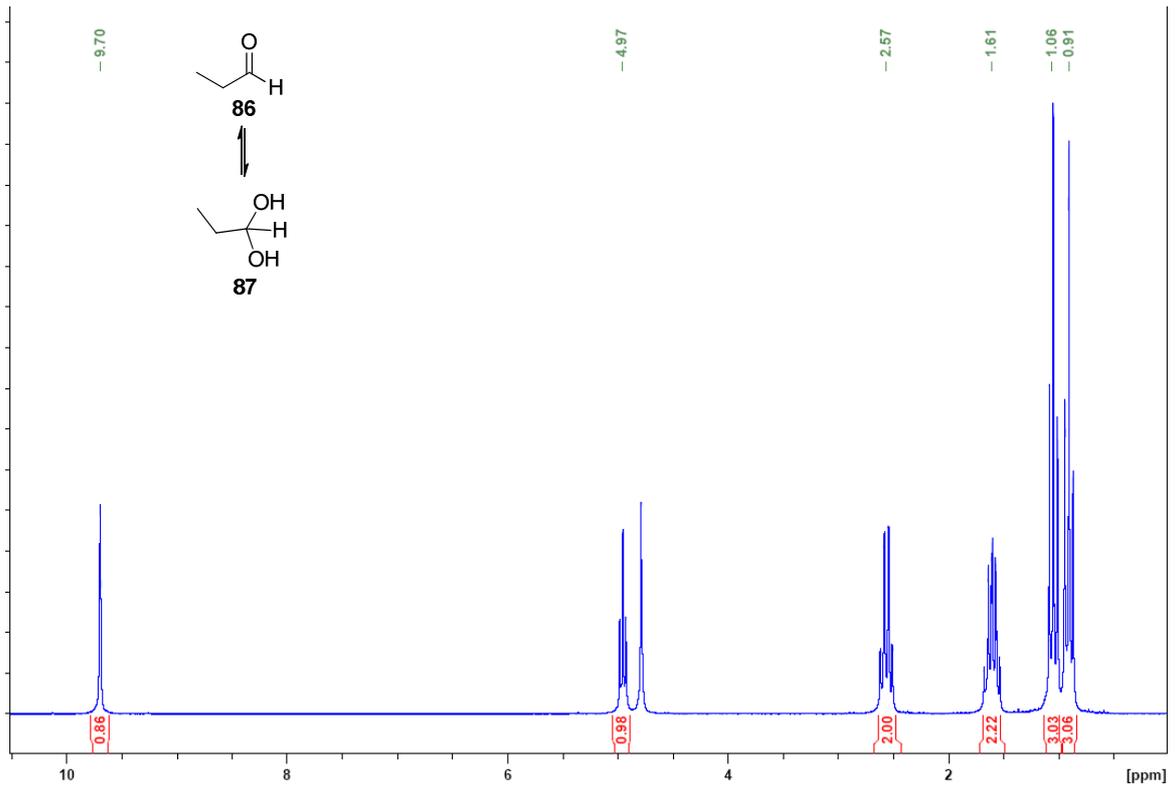
Anhang



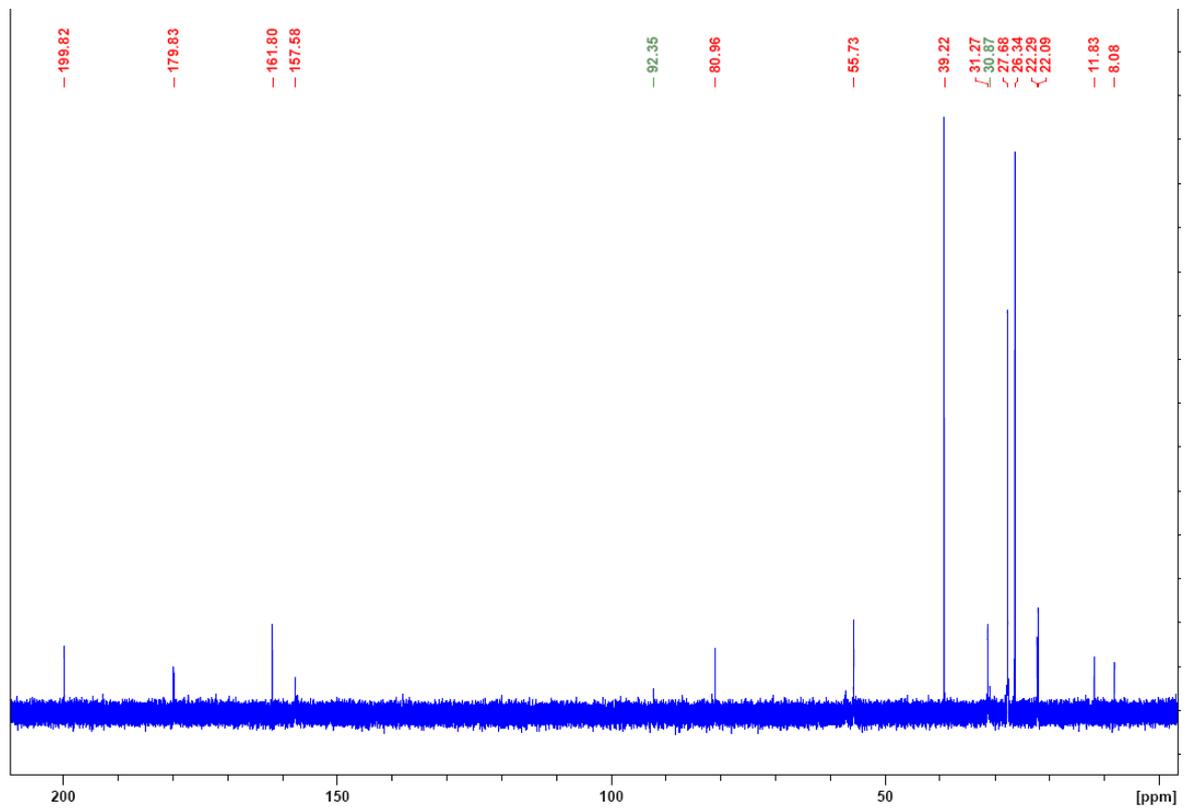
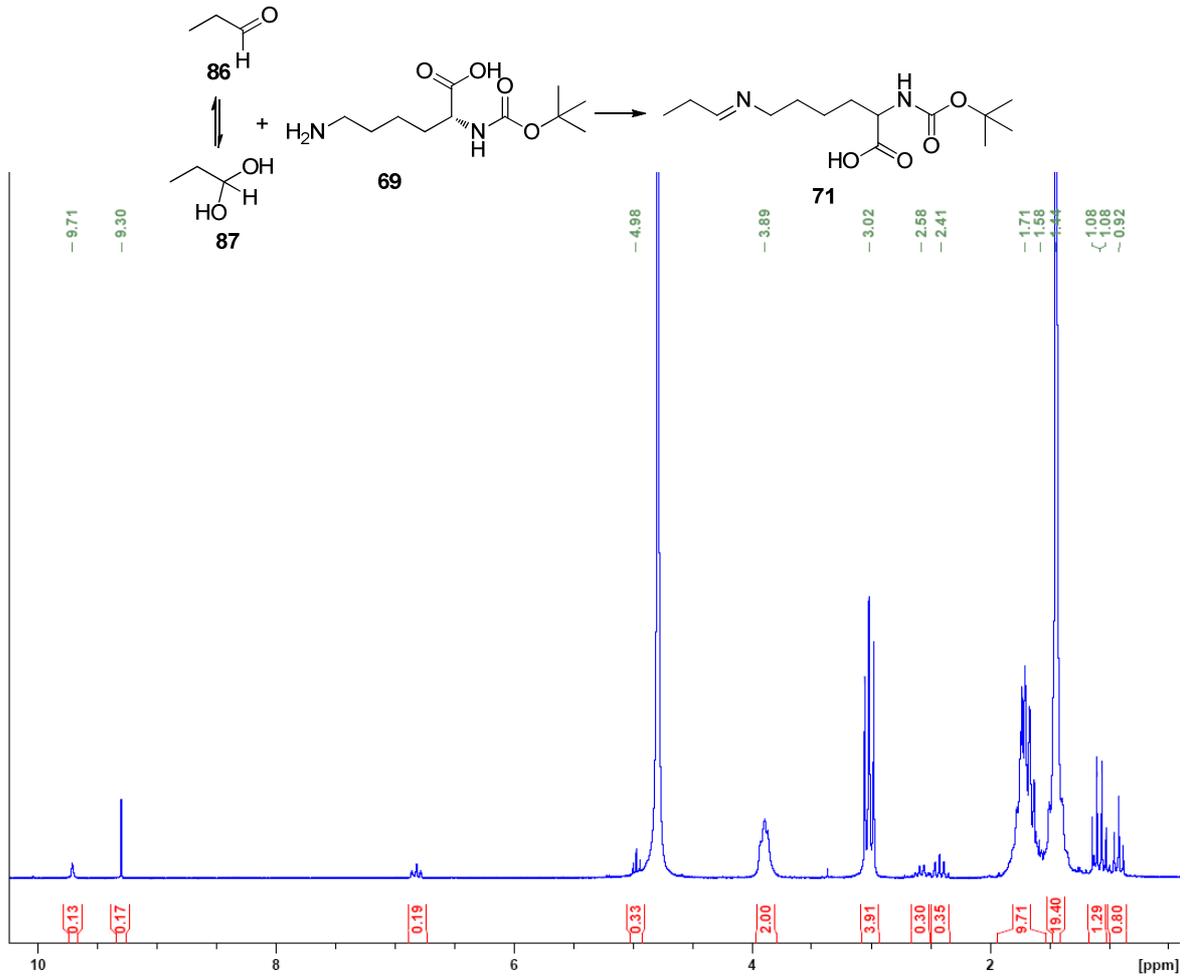
Anhang



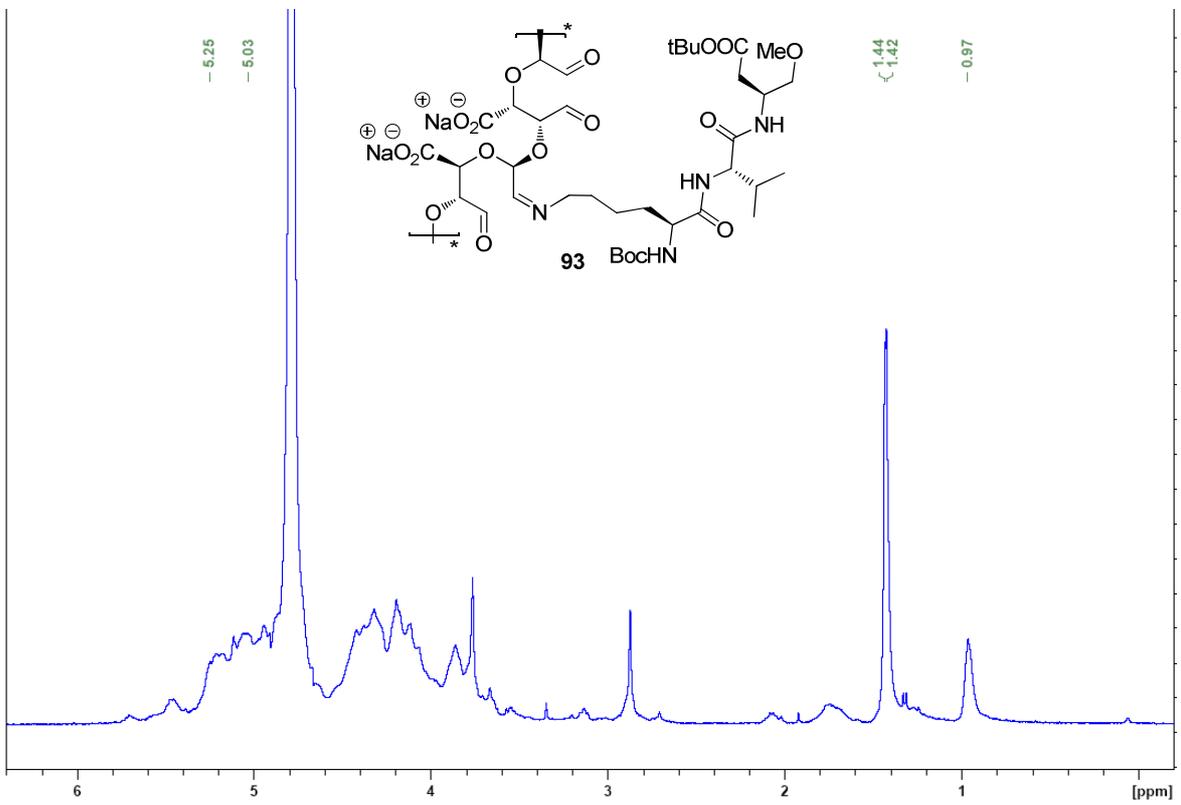
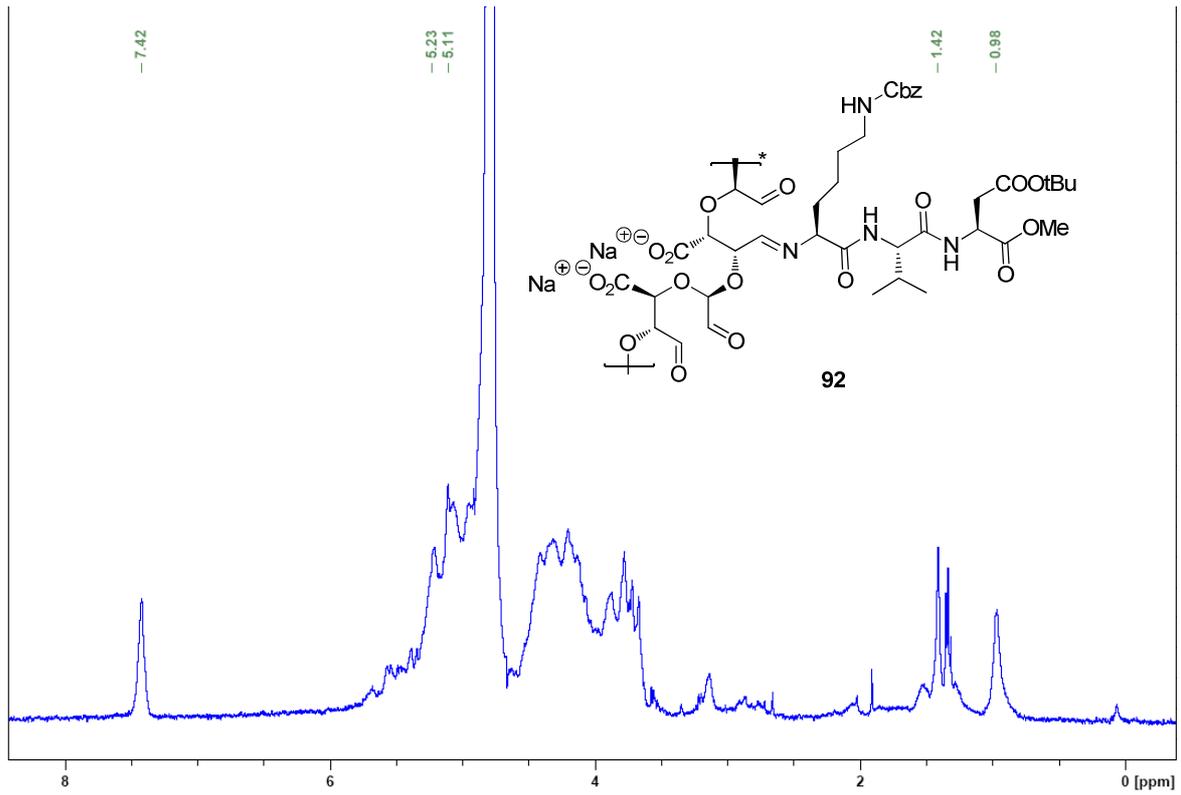
Anhang



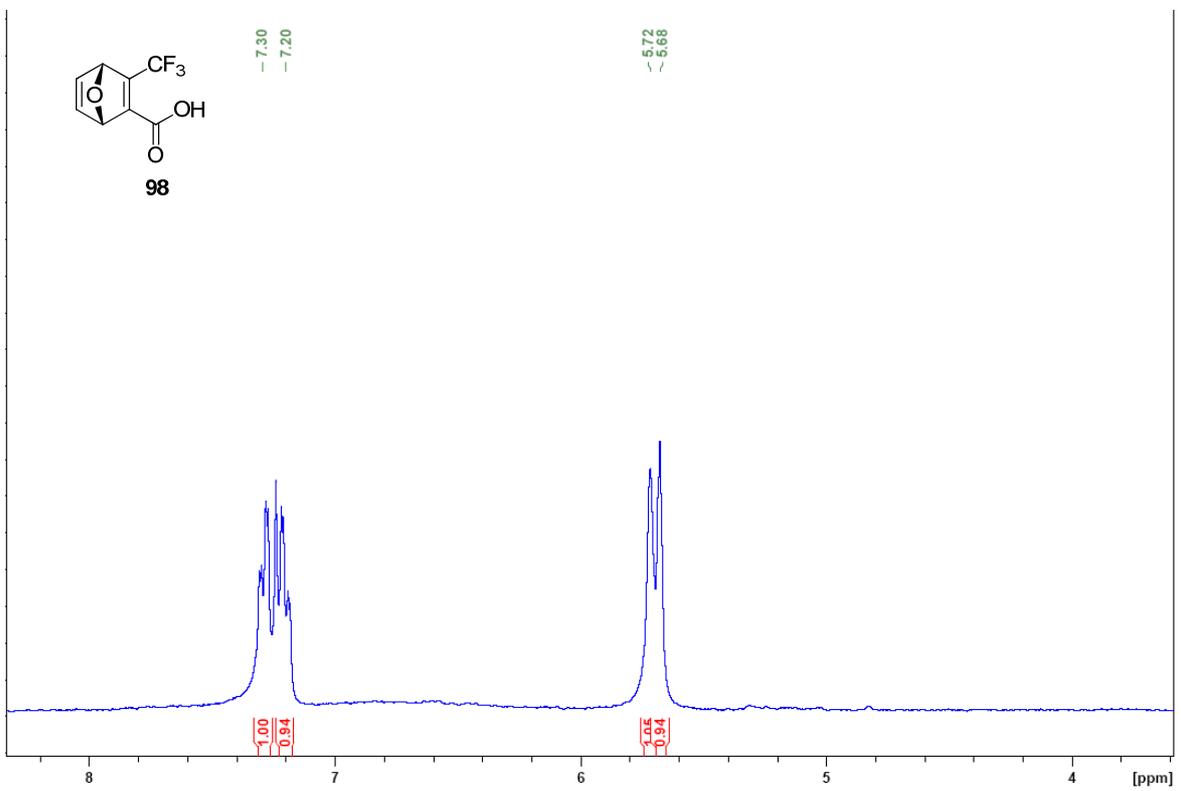
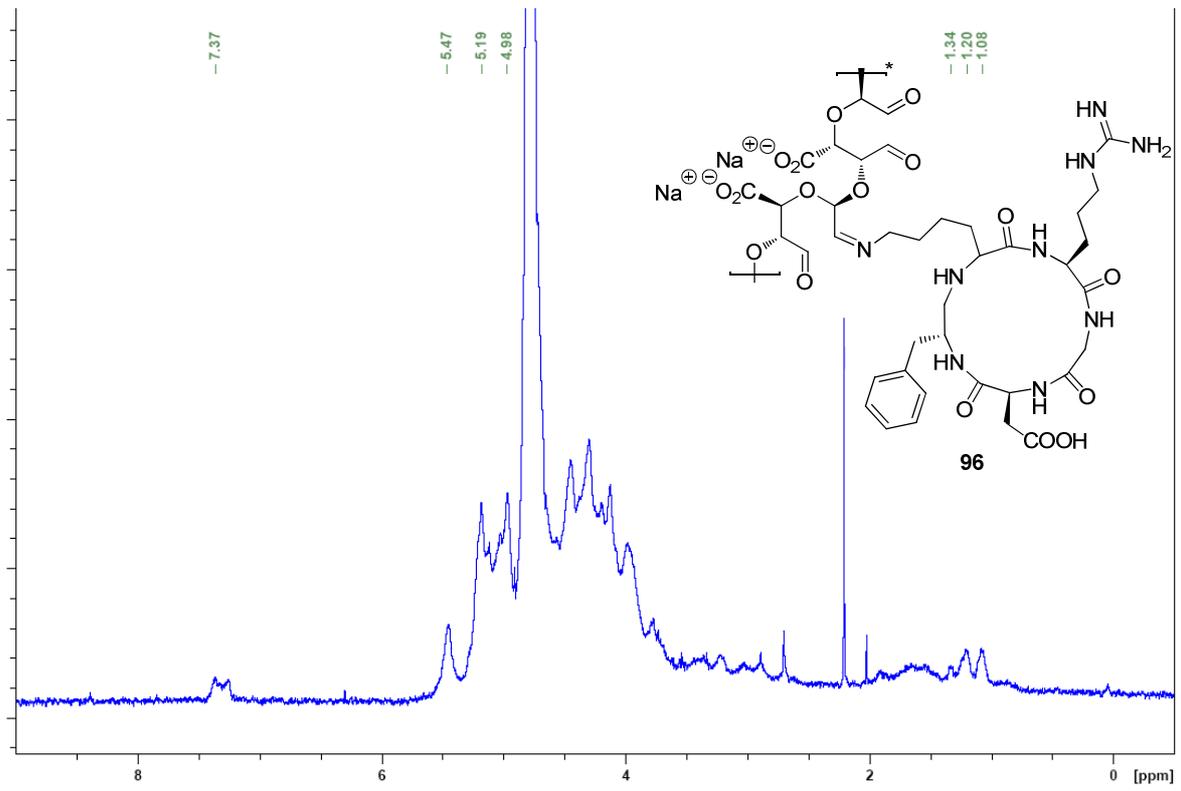
Anhang



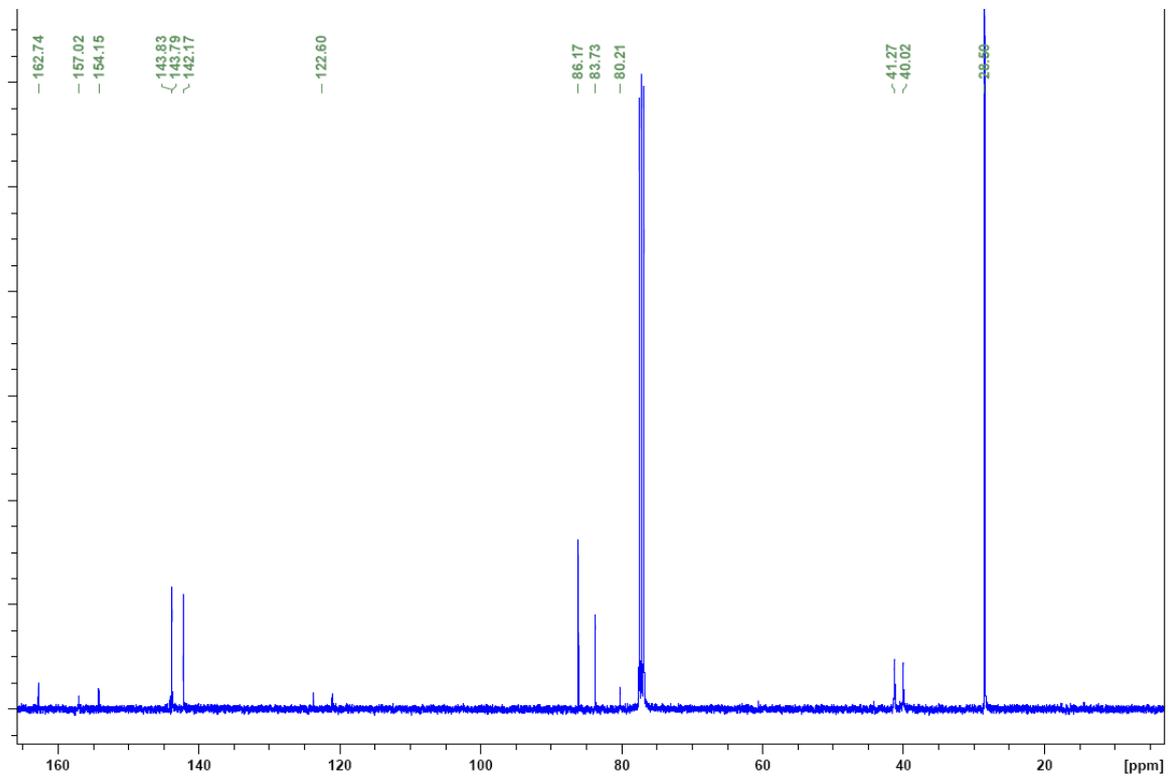
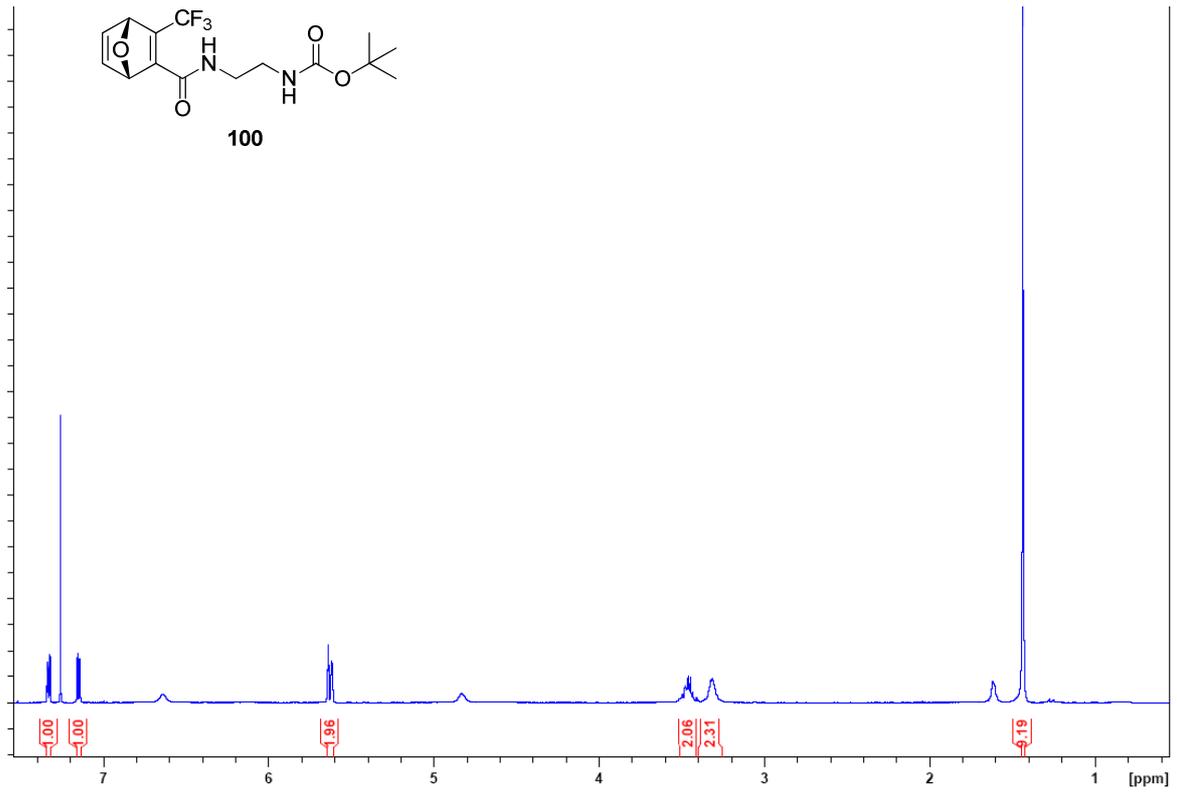
Anhang



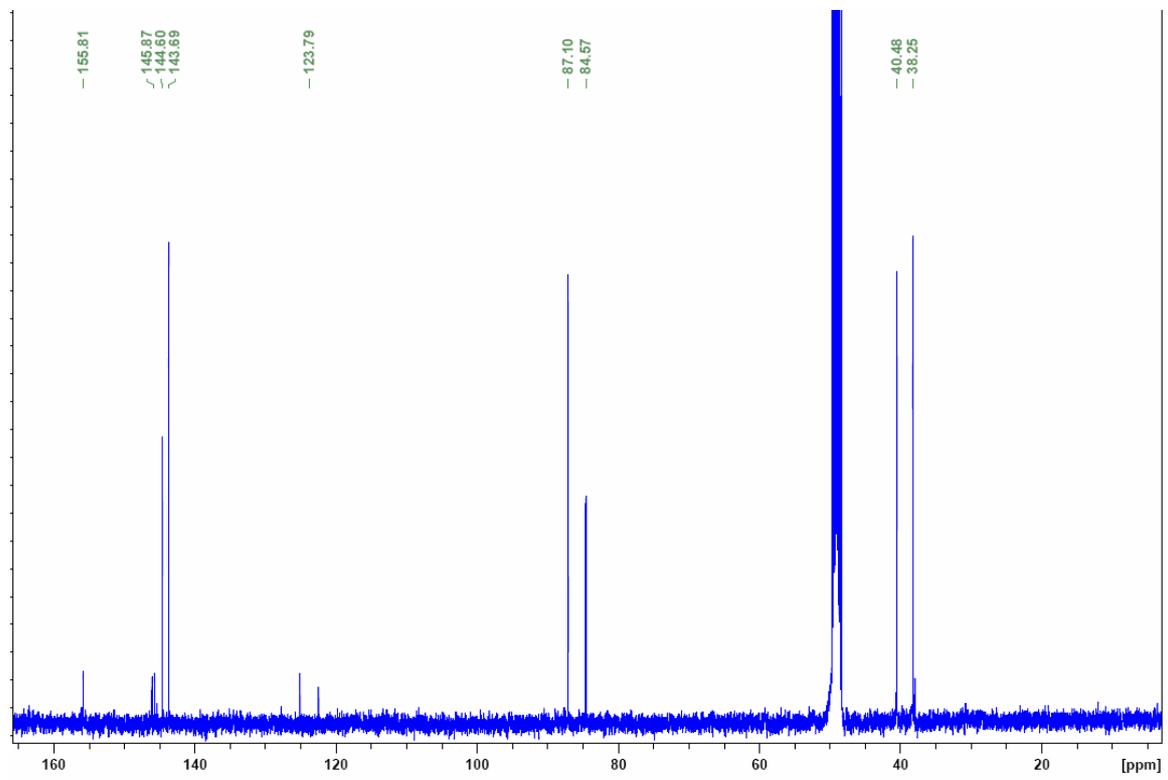
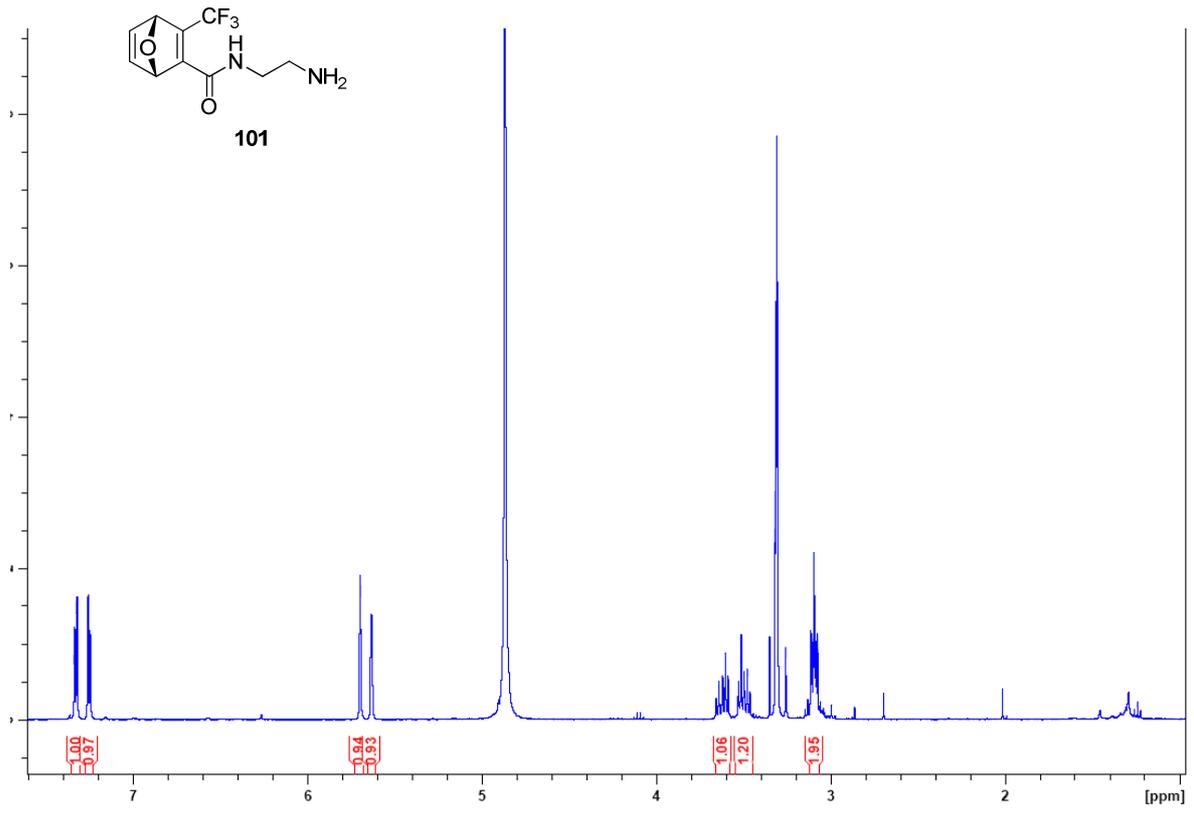
Anhang



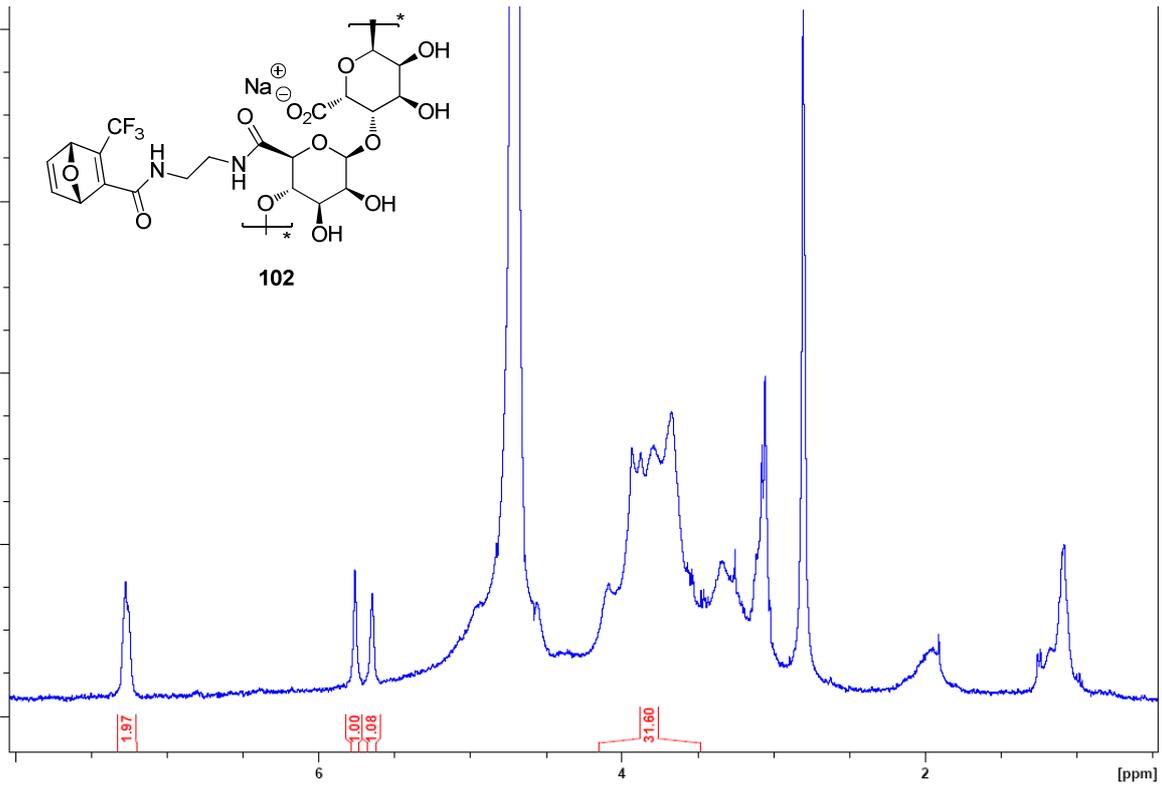
Anhang



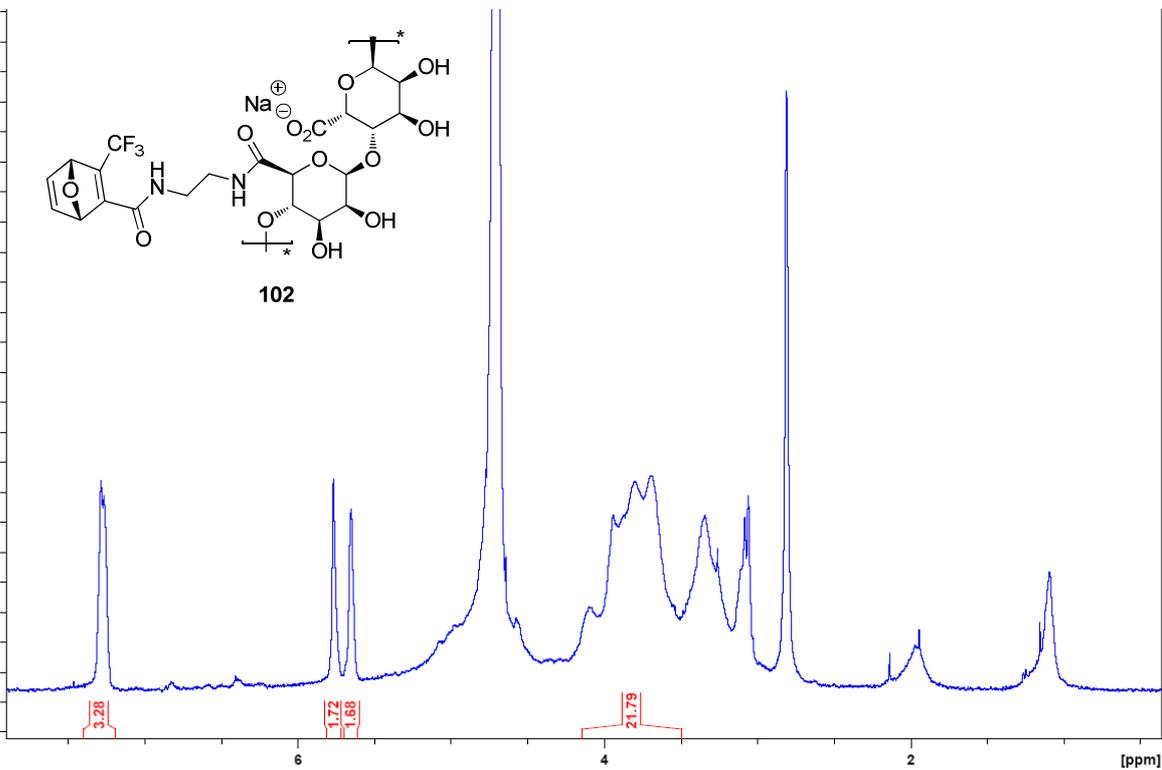
Anhang



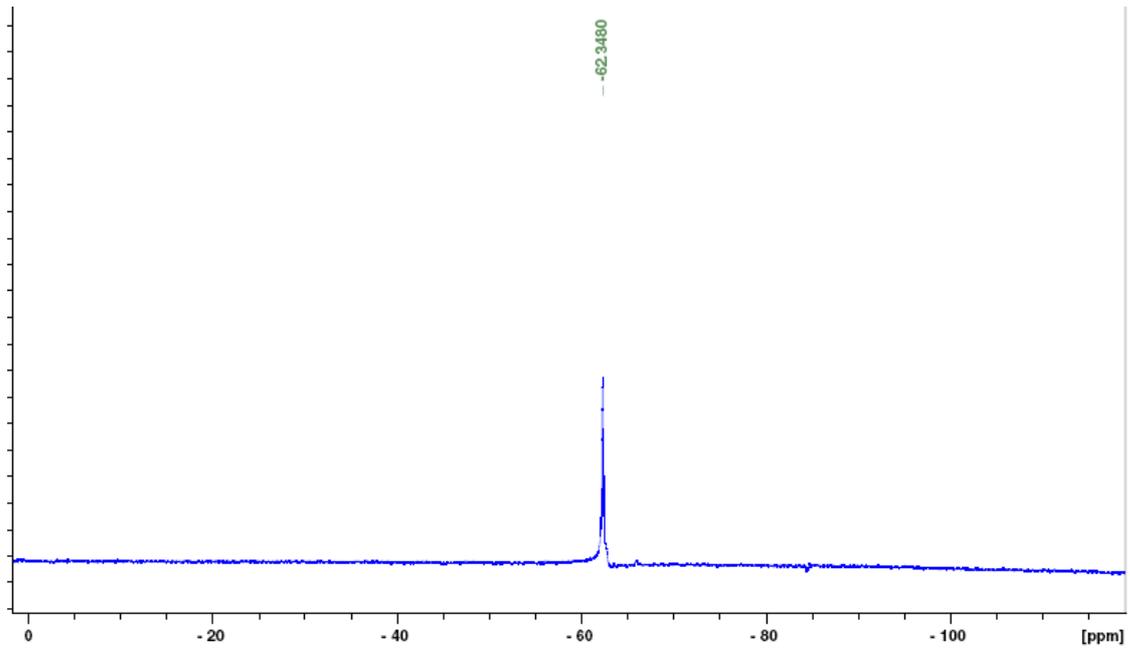
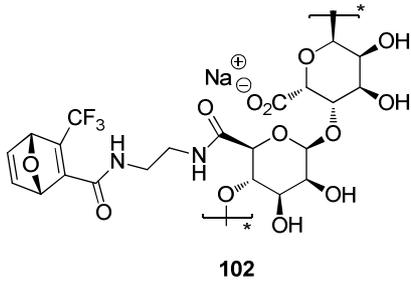
Anhang



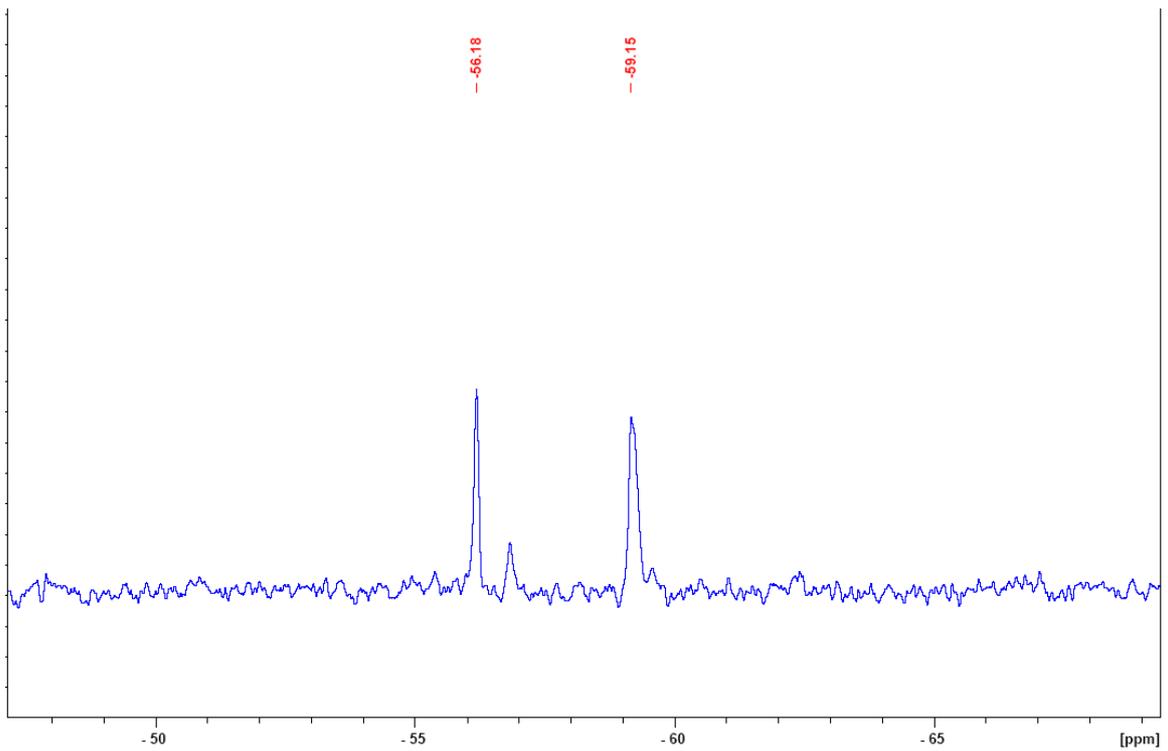
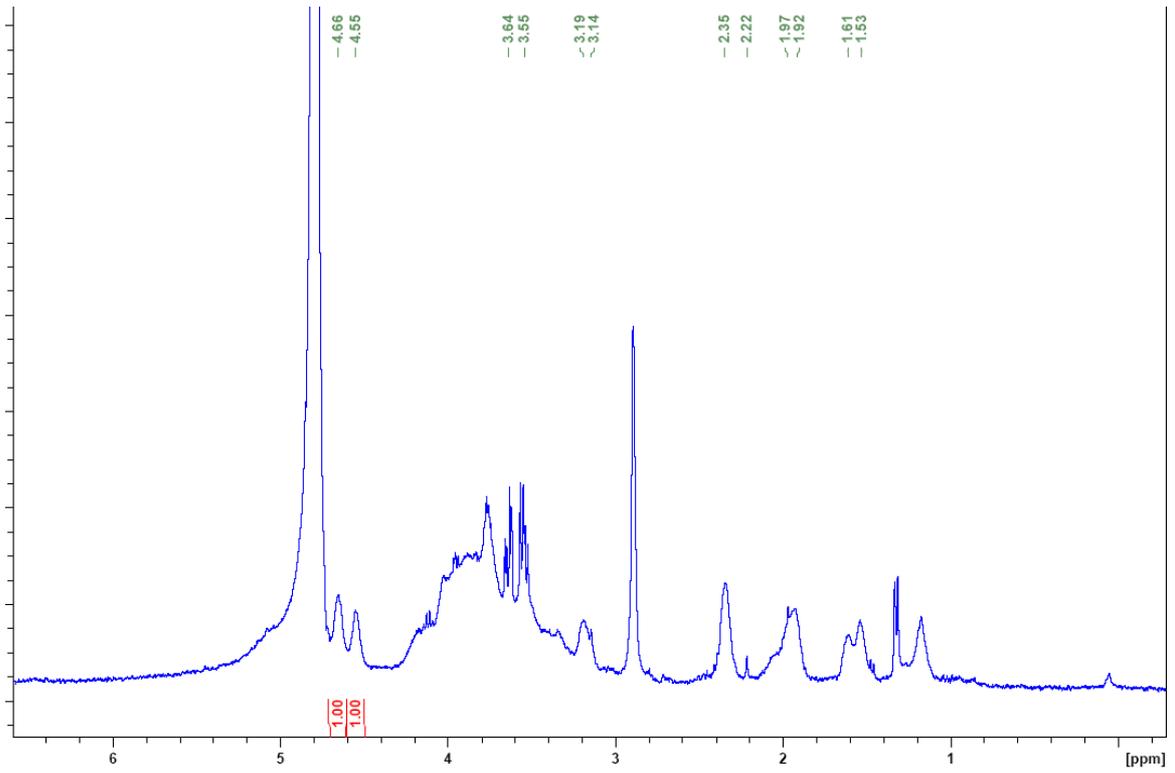
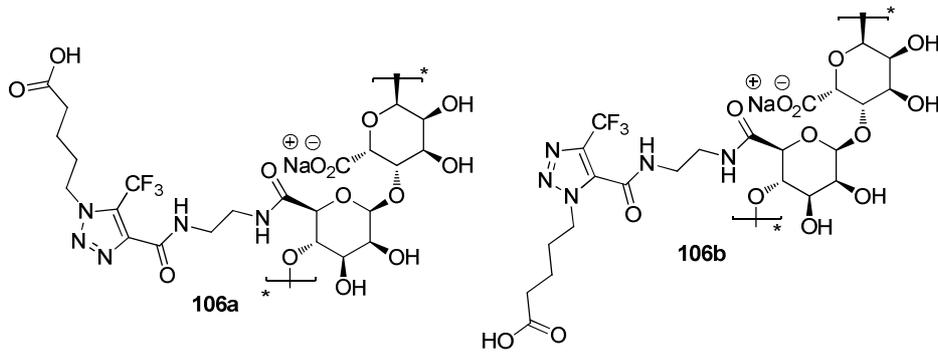
Derivatisationsgrad ca. 30%



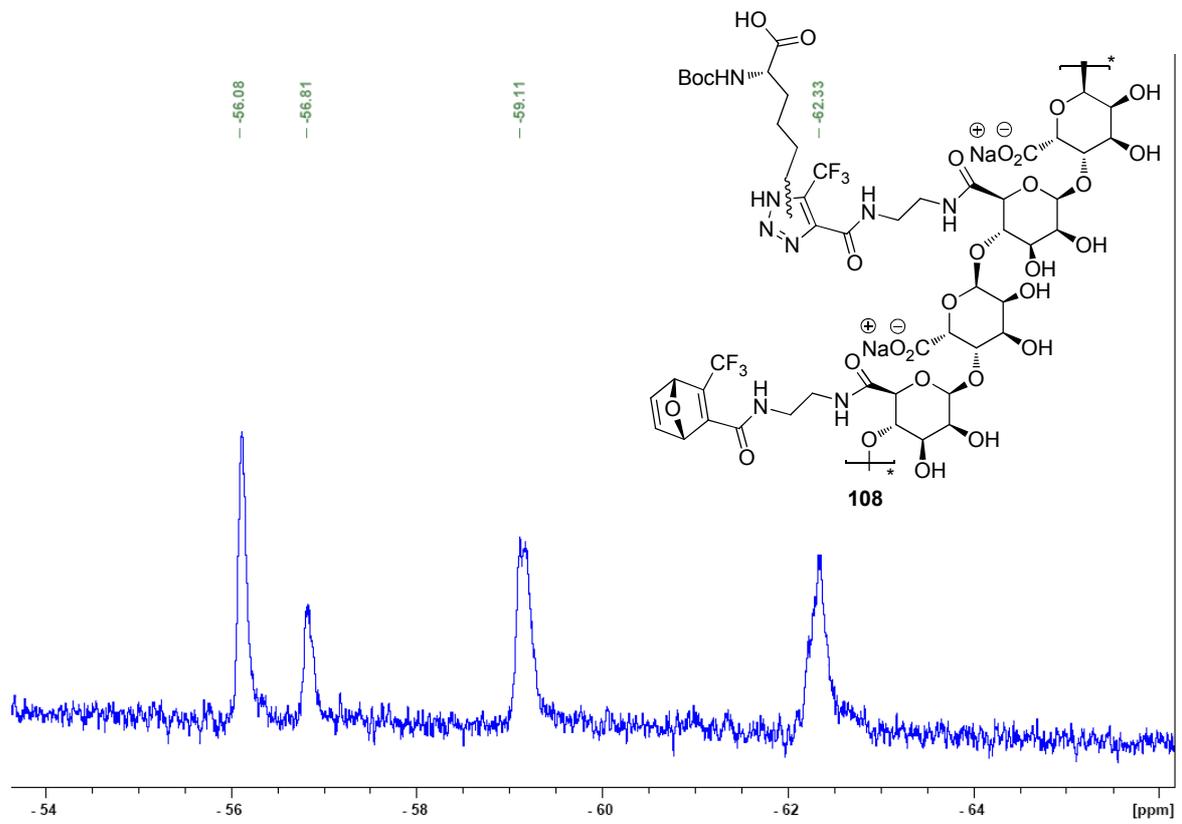
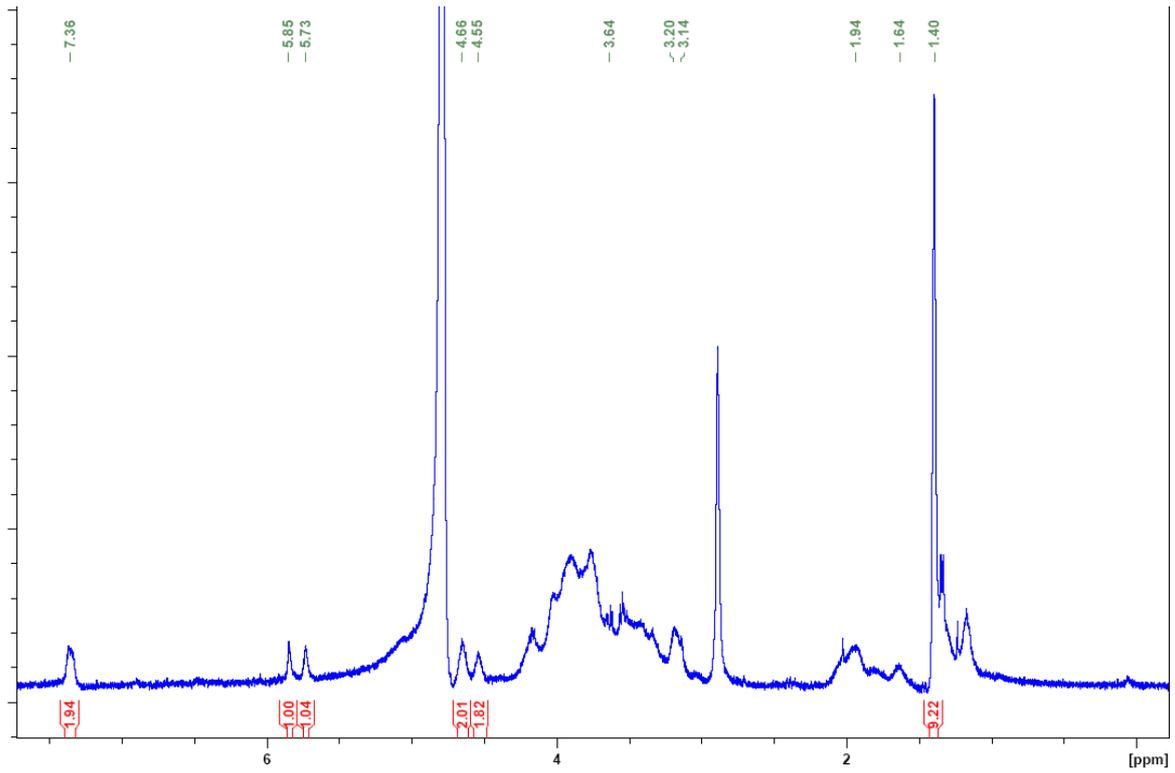
Derivatisationsgrad ca. 70%



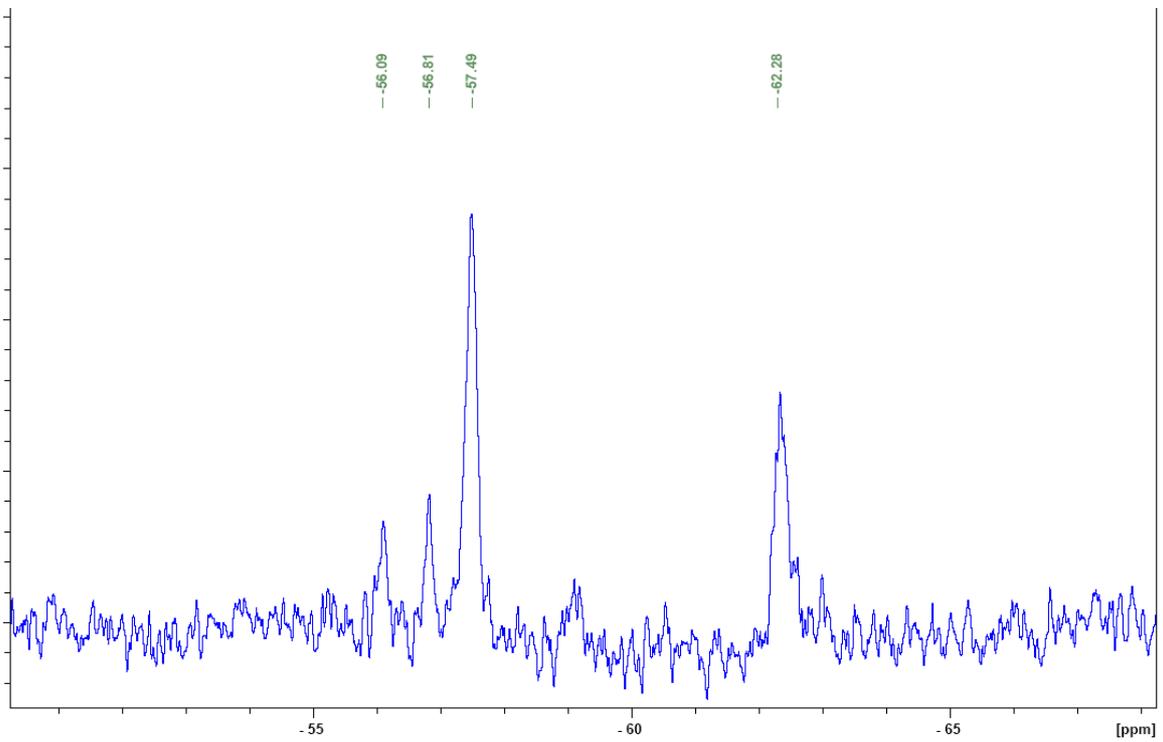
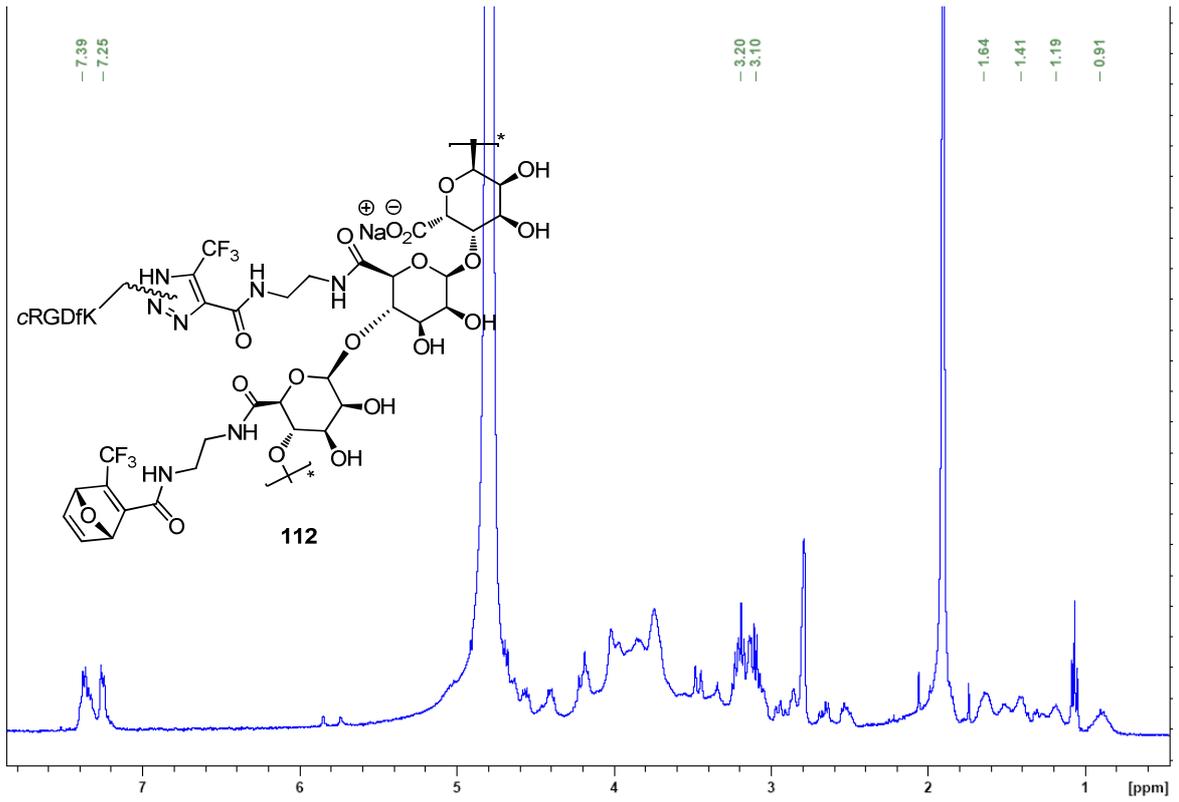
Anhang



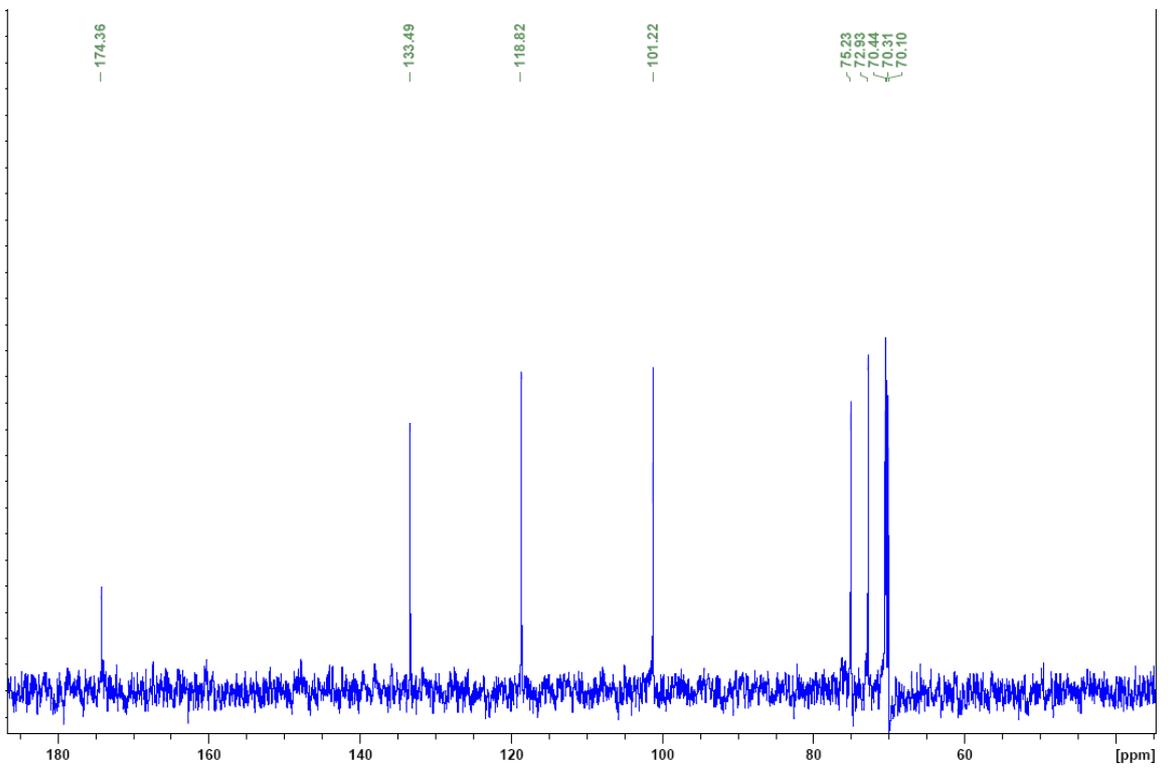
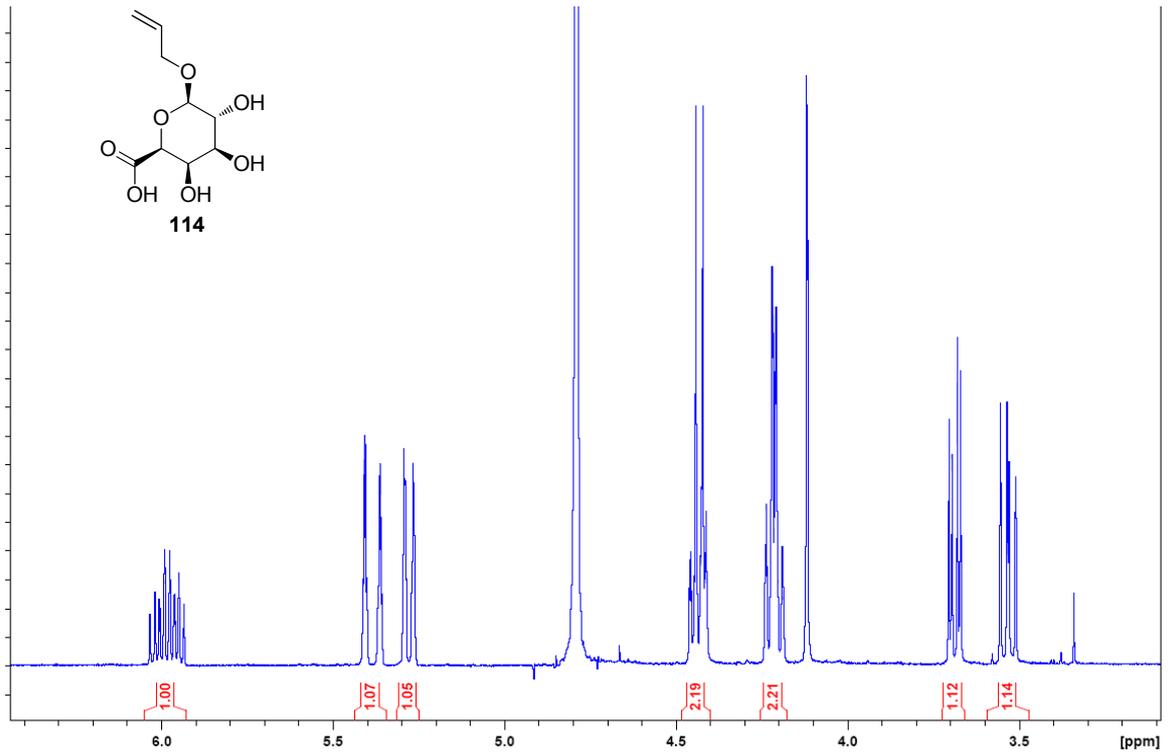
Anhang



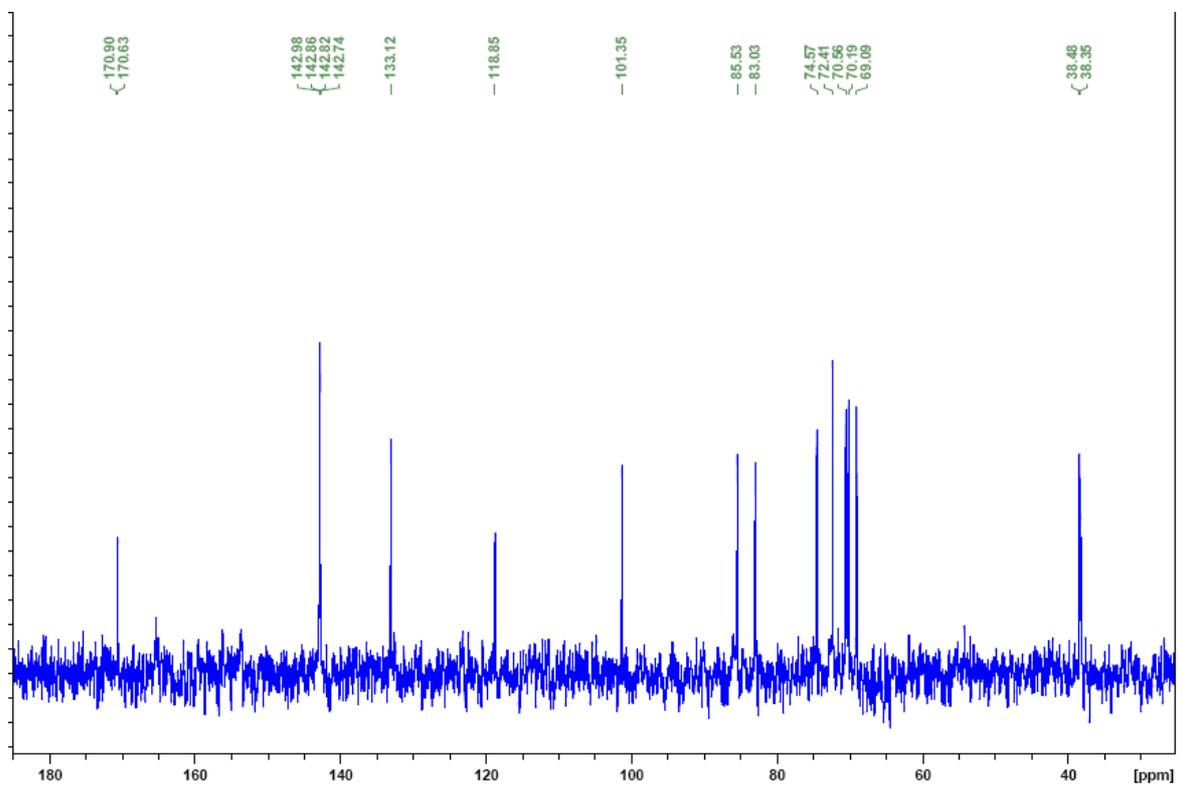
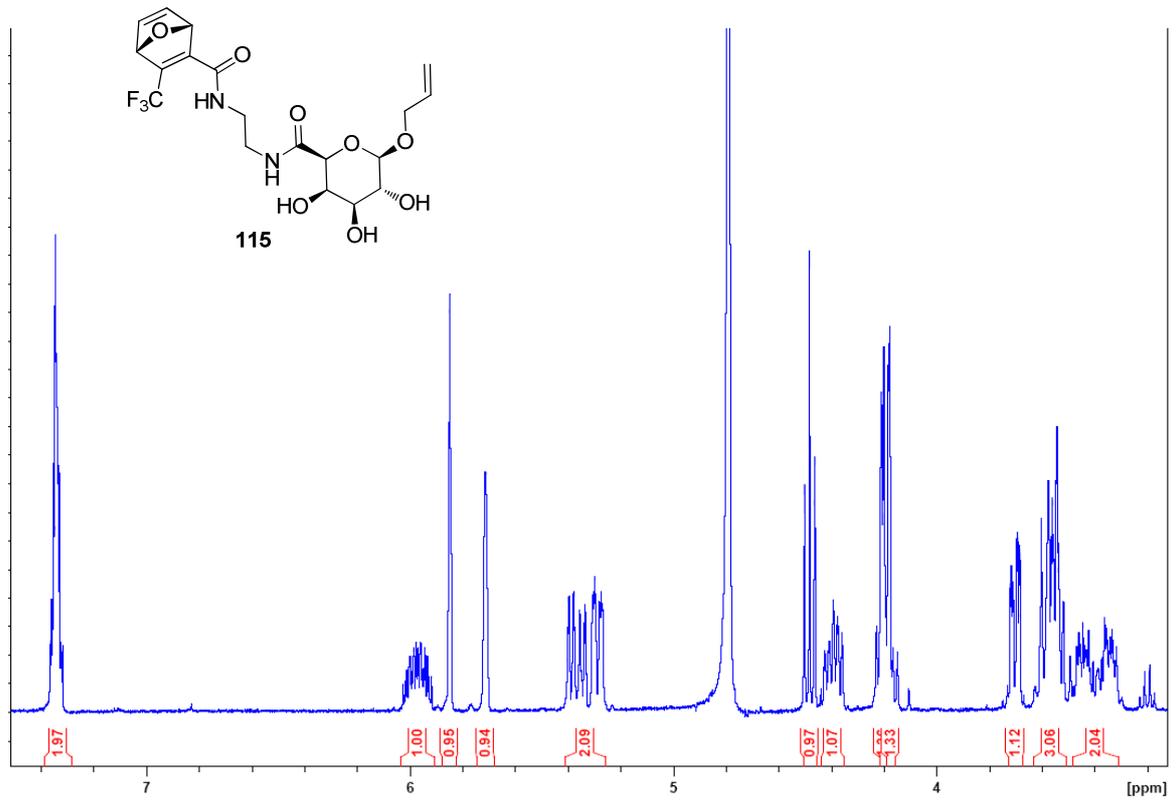
Anhang



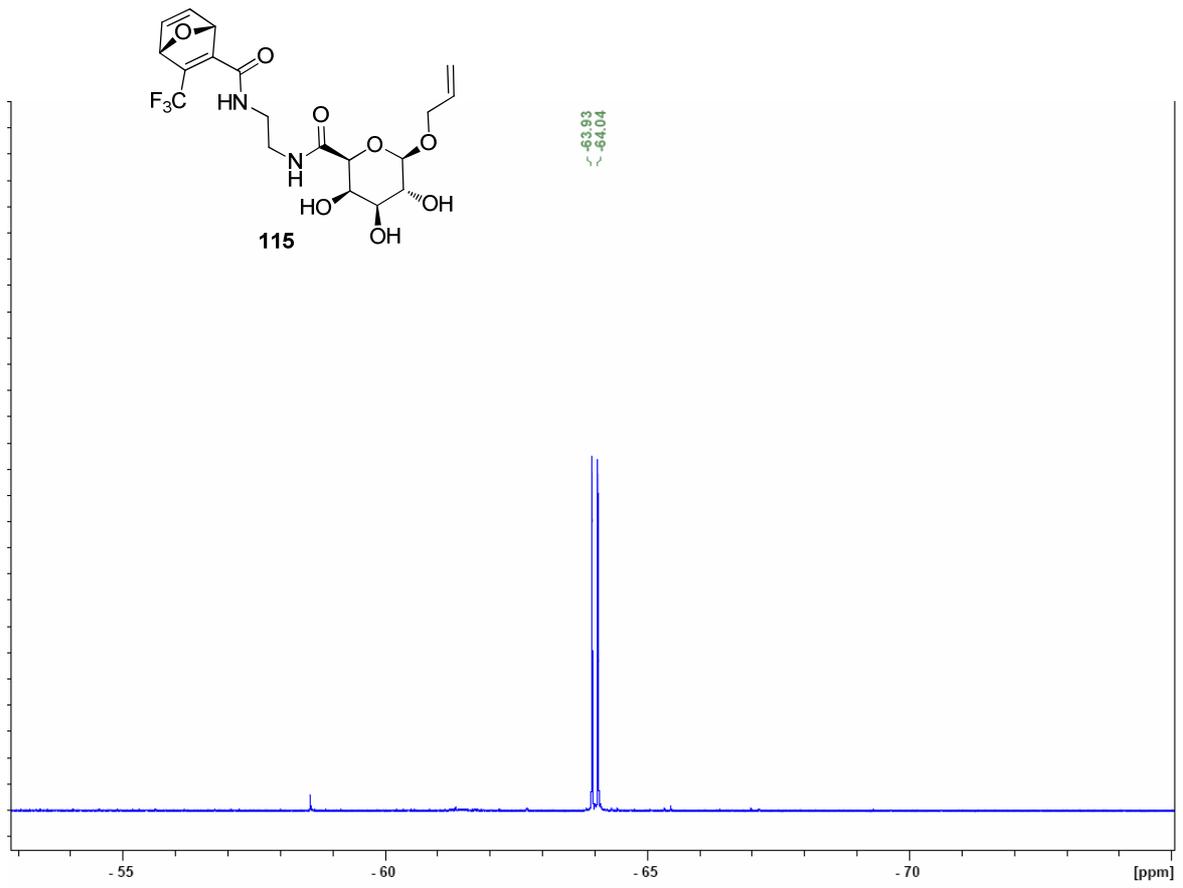
Anhang



Anhang

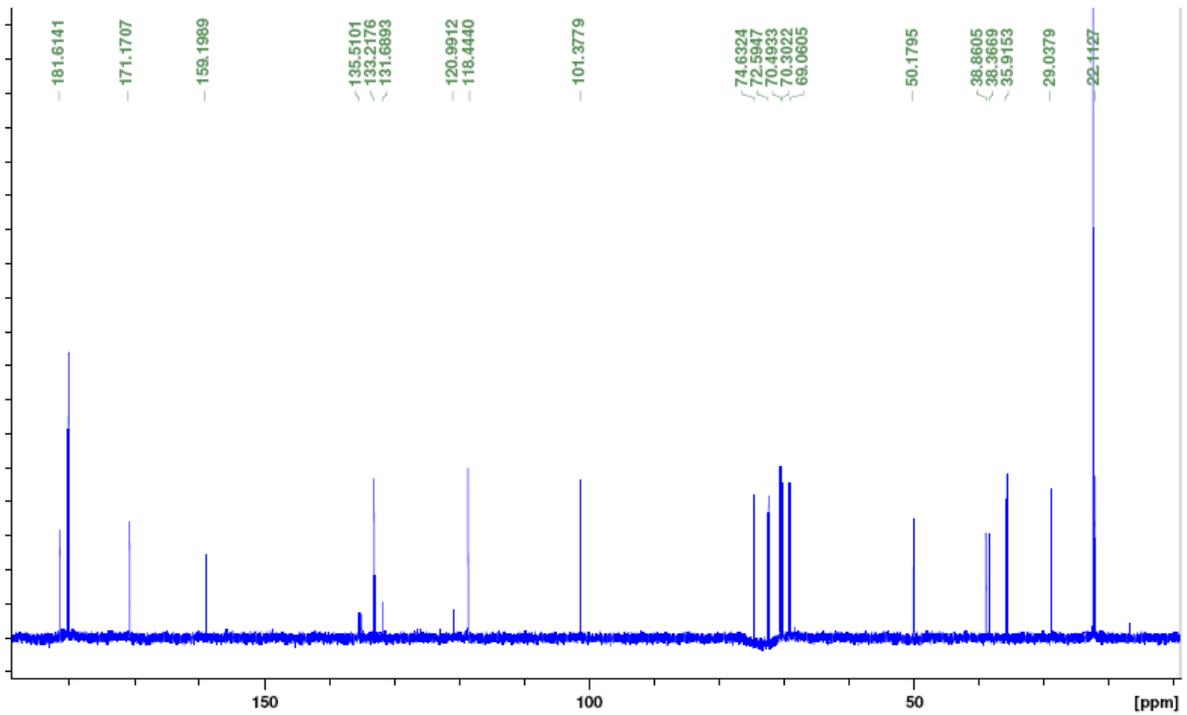
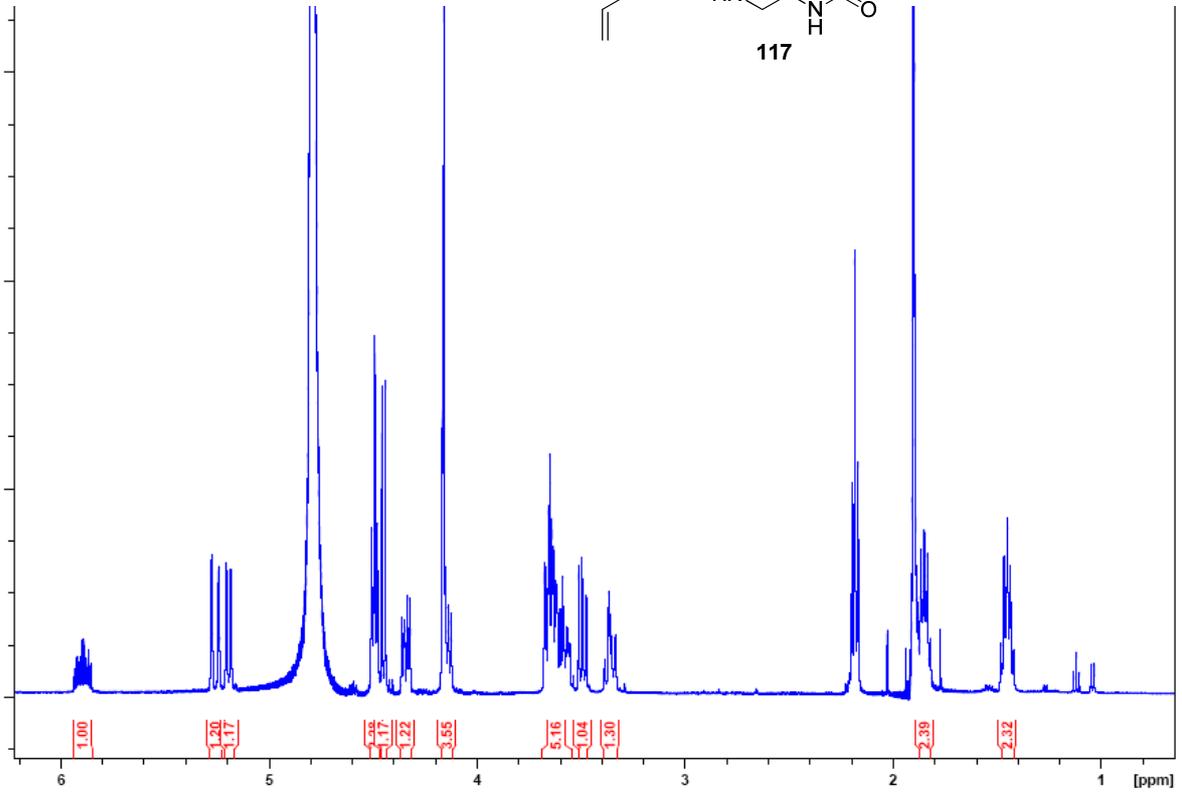
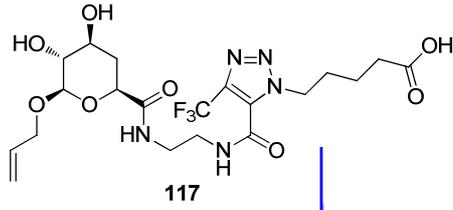


Anhang

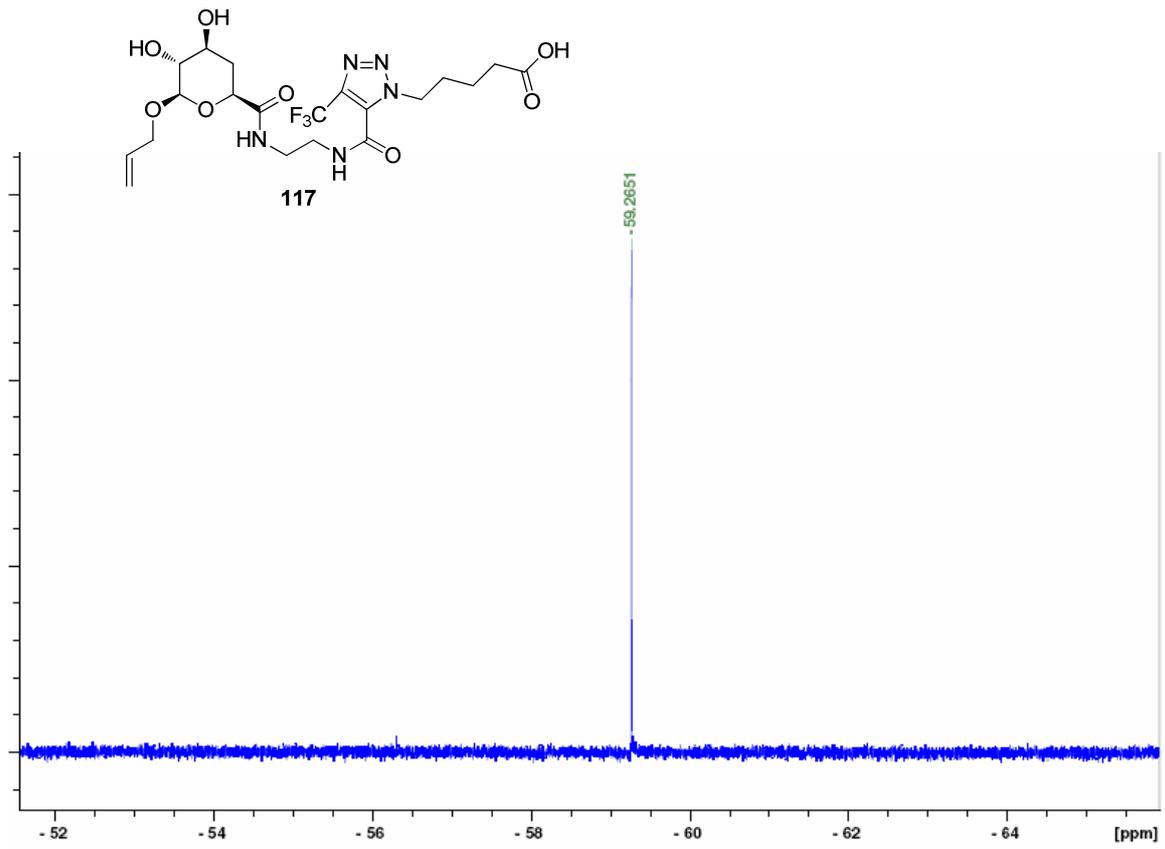


Anhang

^1H - und ^{13}C -NMR Spektren enthalten Ammonium-Acetat (Salz im Eluent der präparativen HPLC)

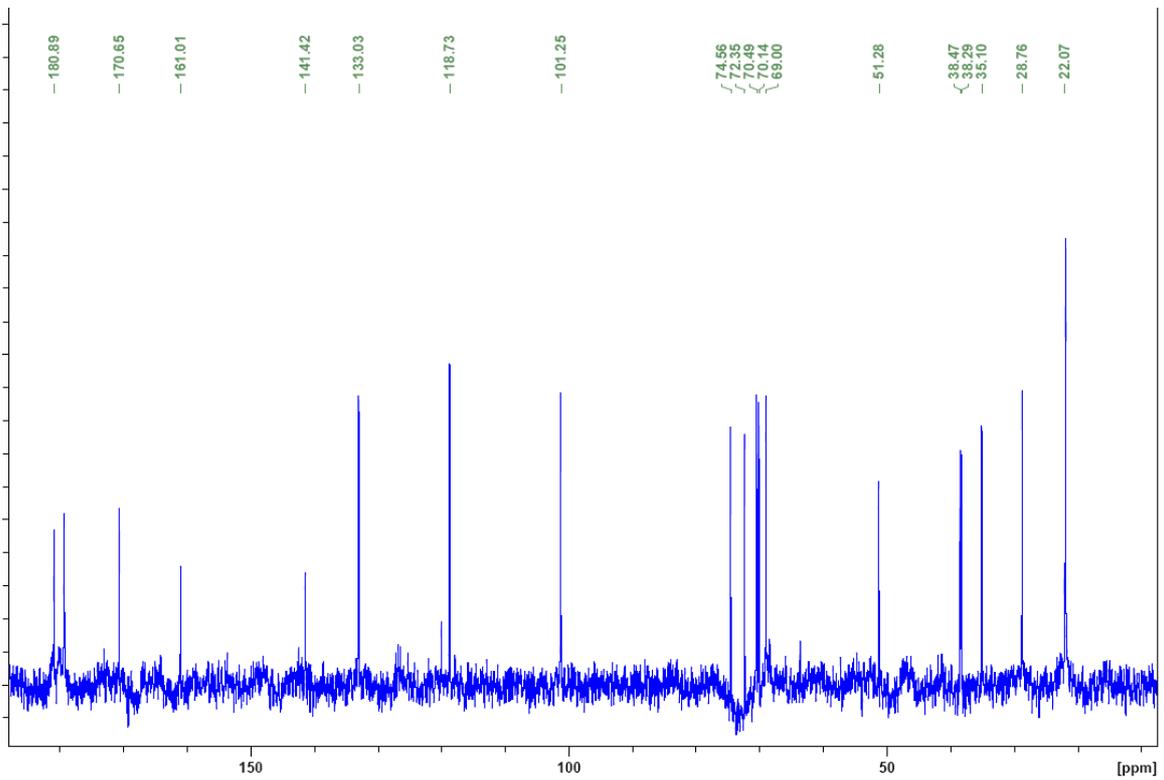
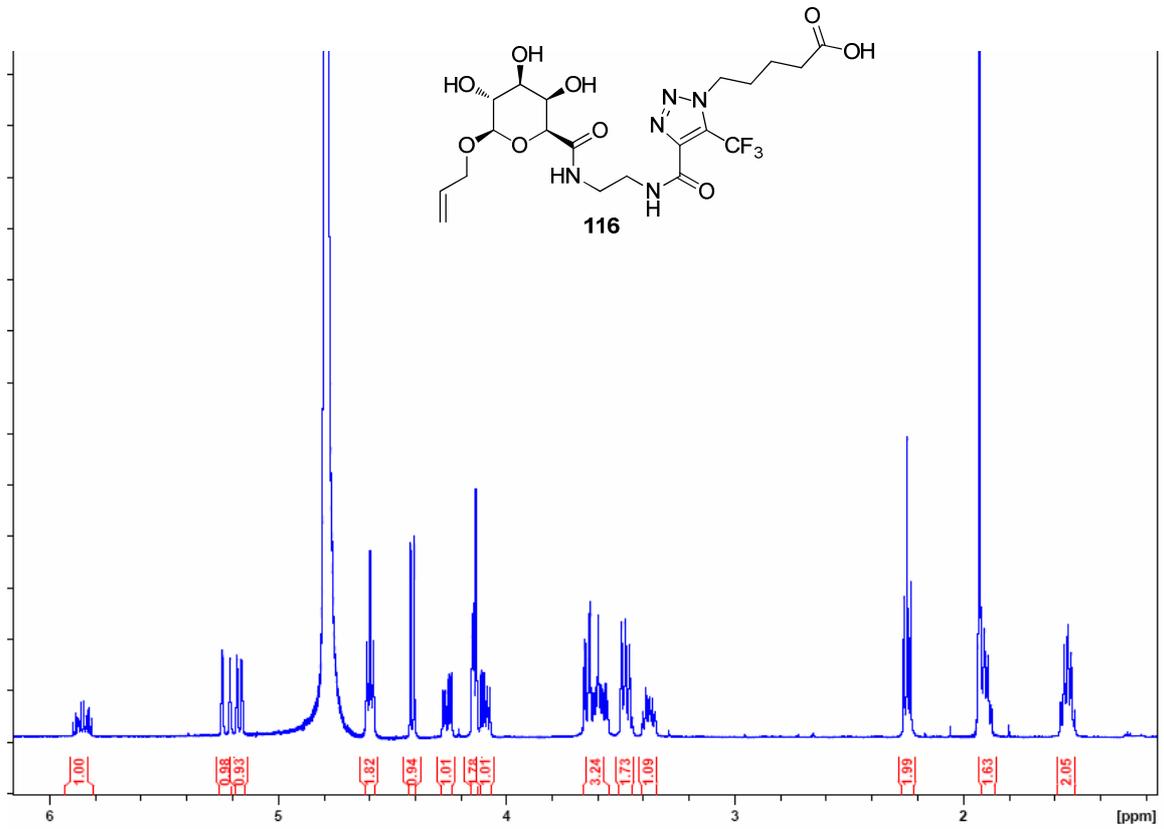


Anhang

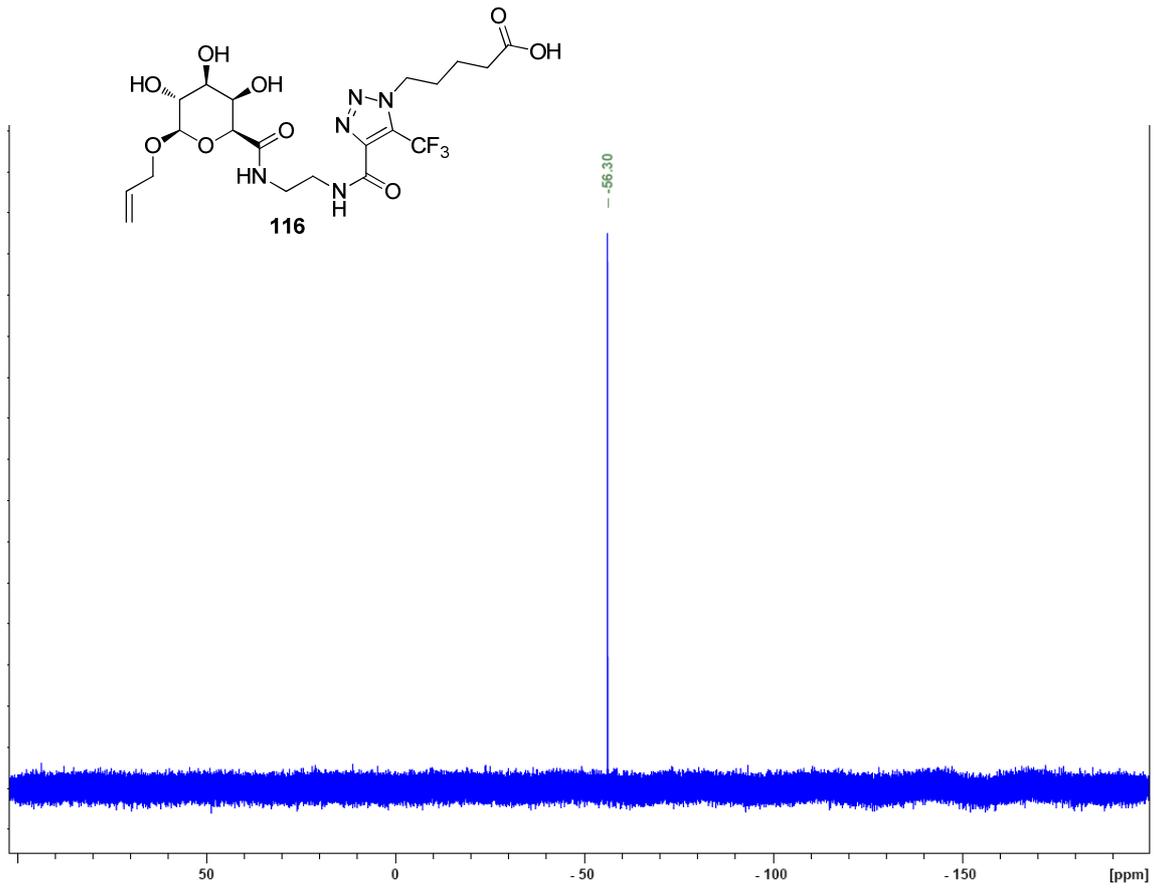


Anhang

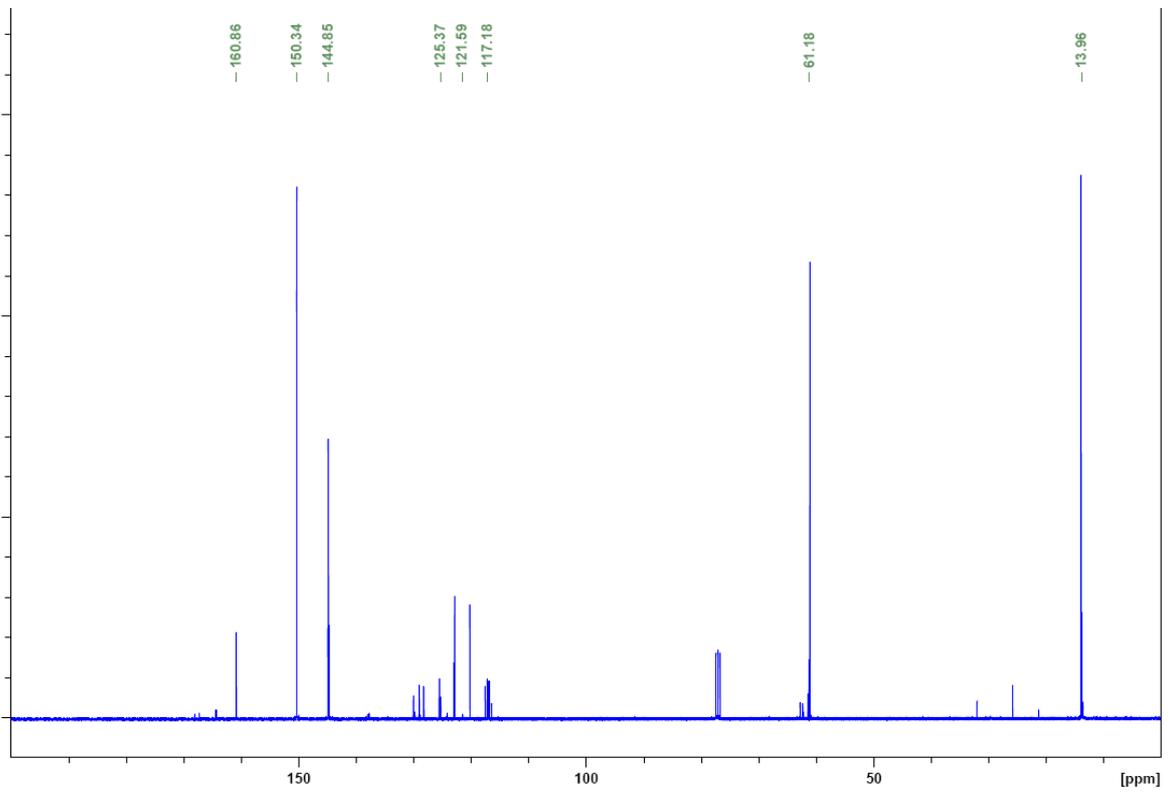
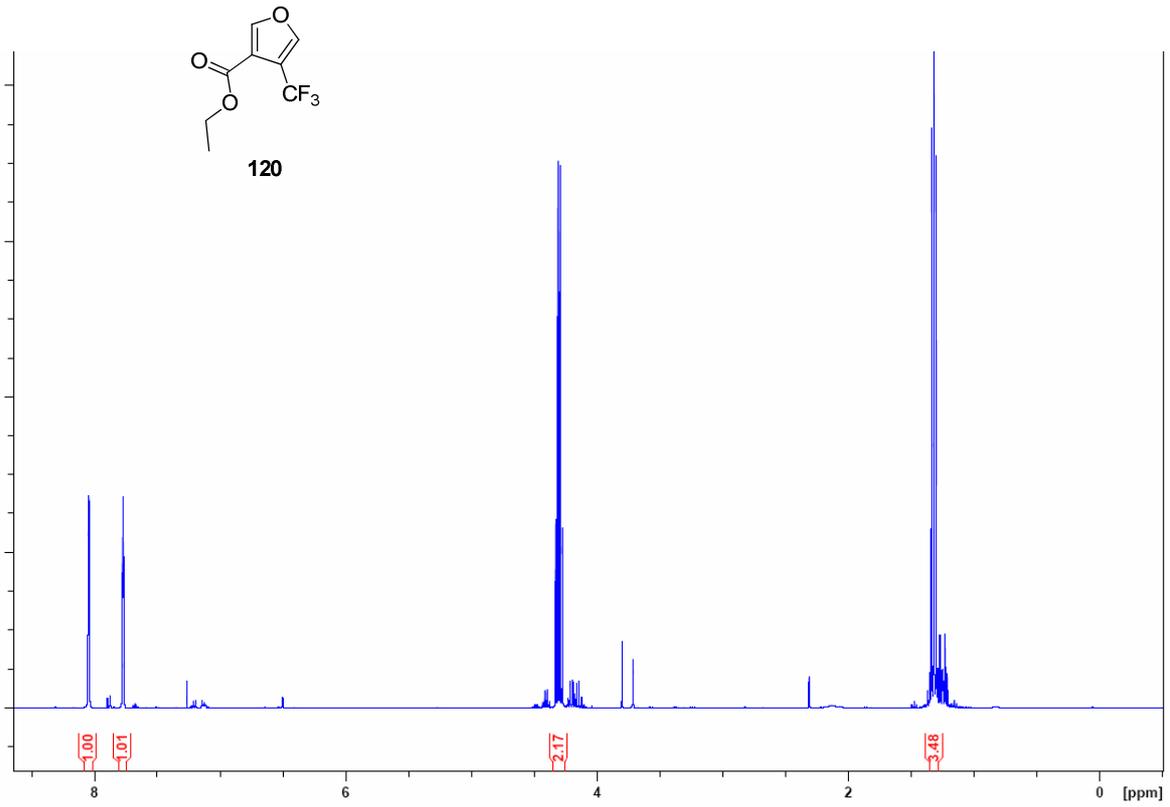
^1H - und ^{13}C -NMR Spektren enthalten Ammonium Acetat (Salz im Eluent der präparativen HPLC)



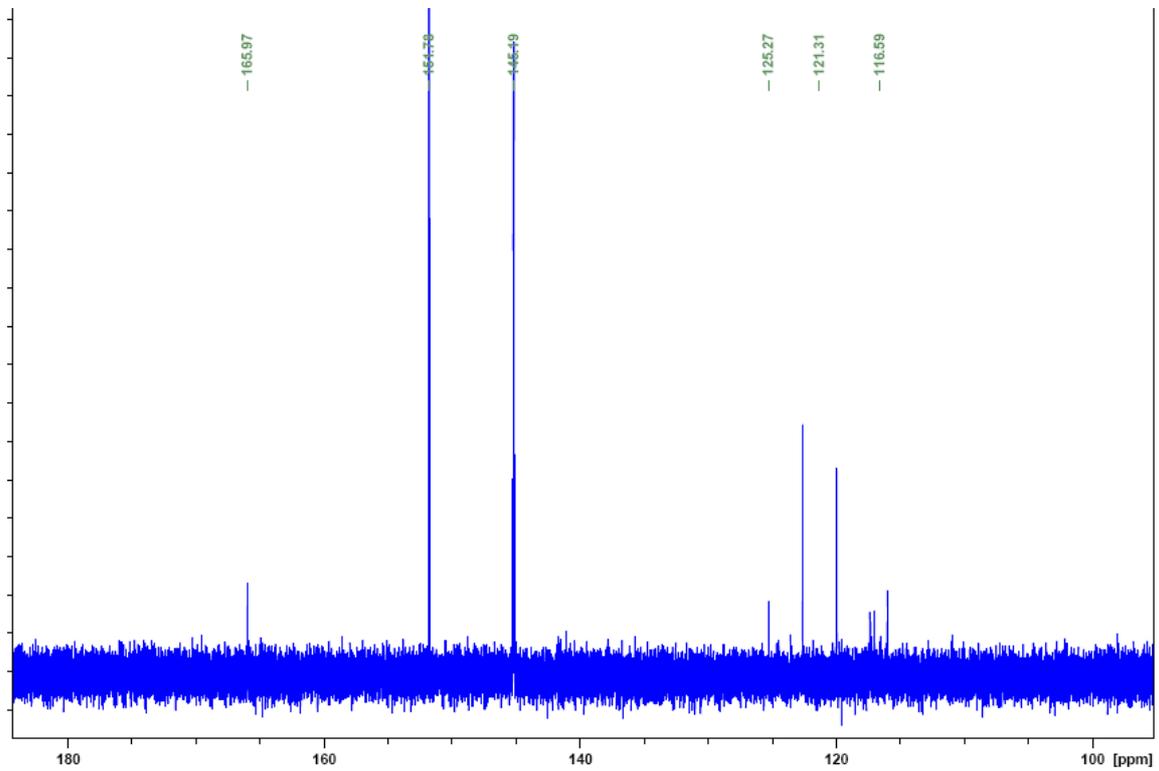
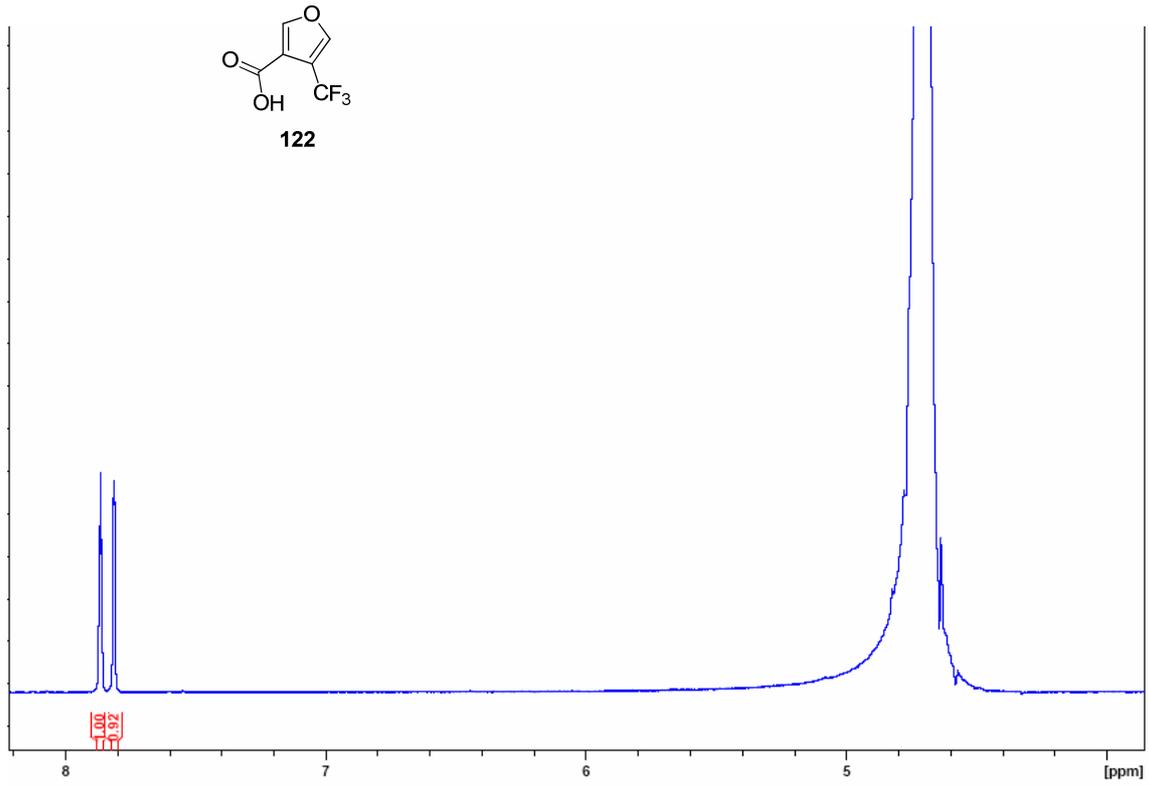
Anhang



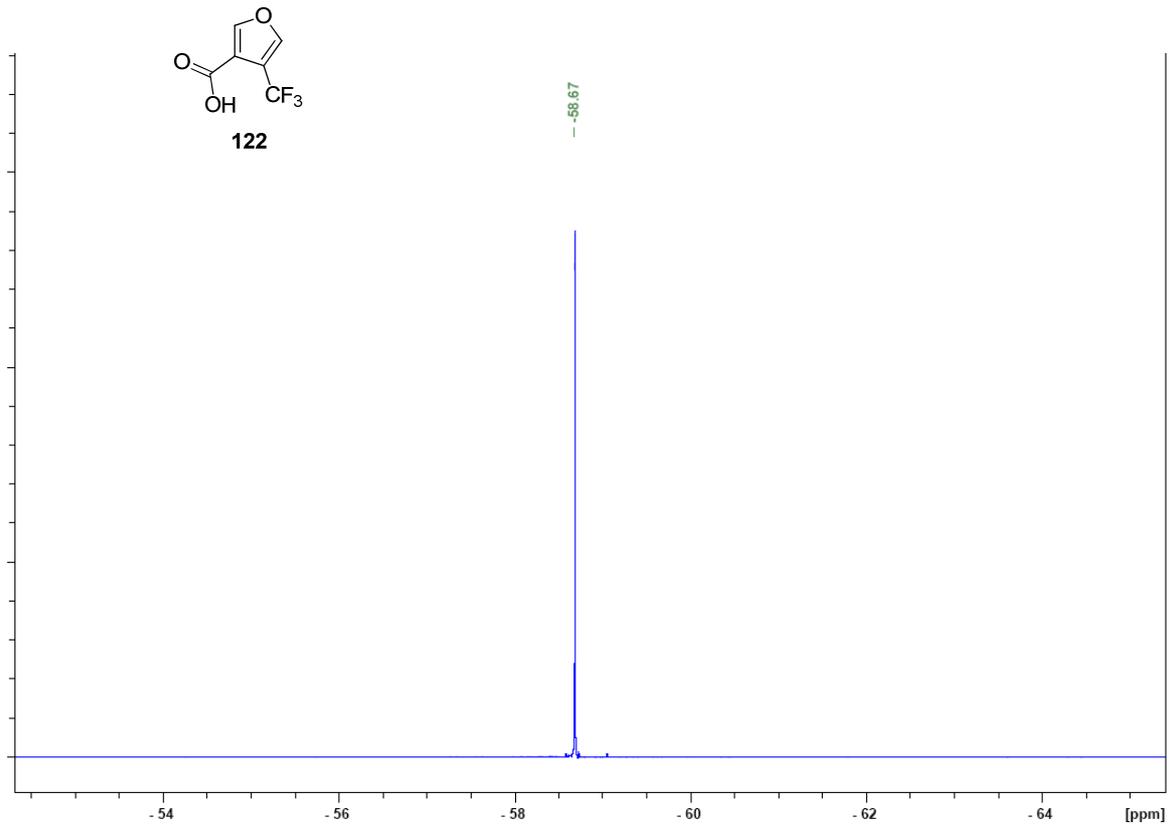
Anhang



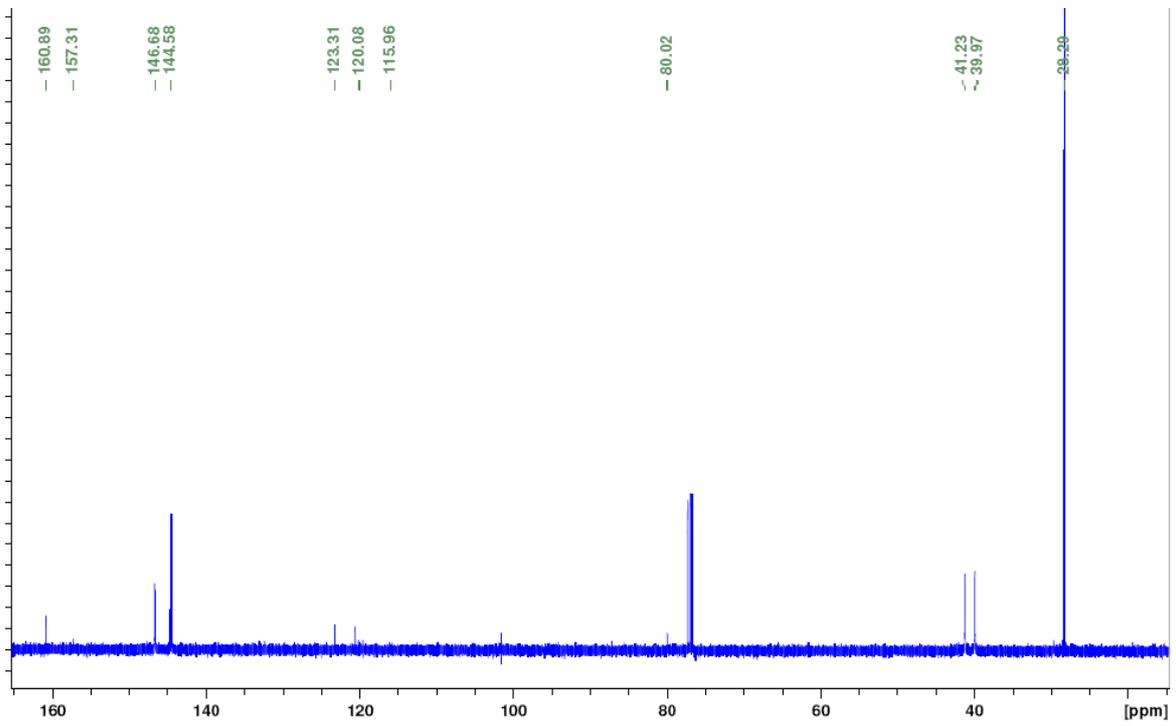
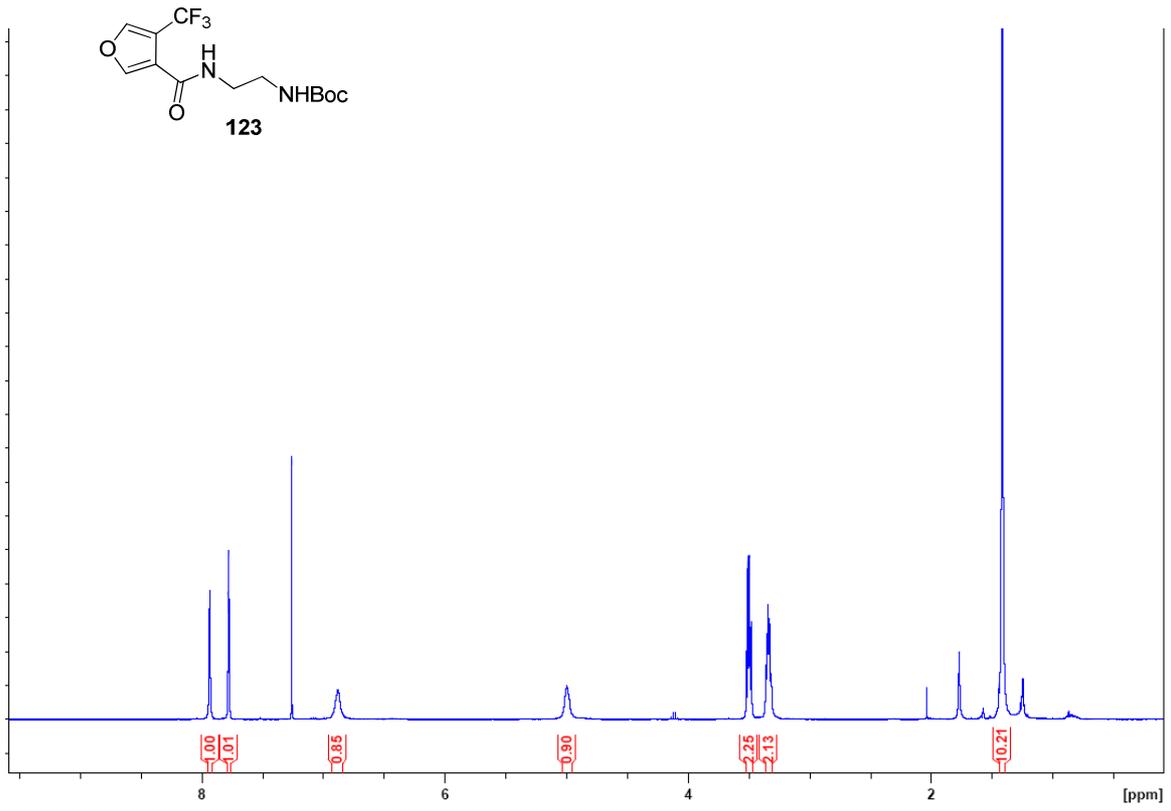
Anhang



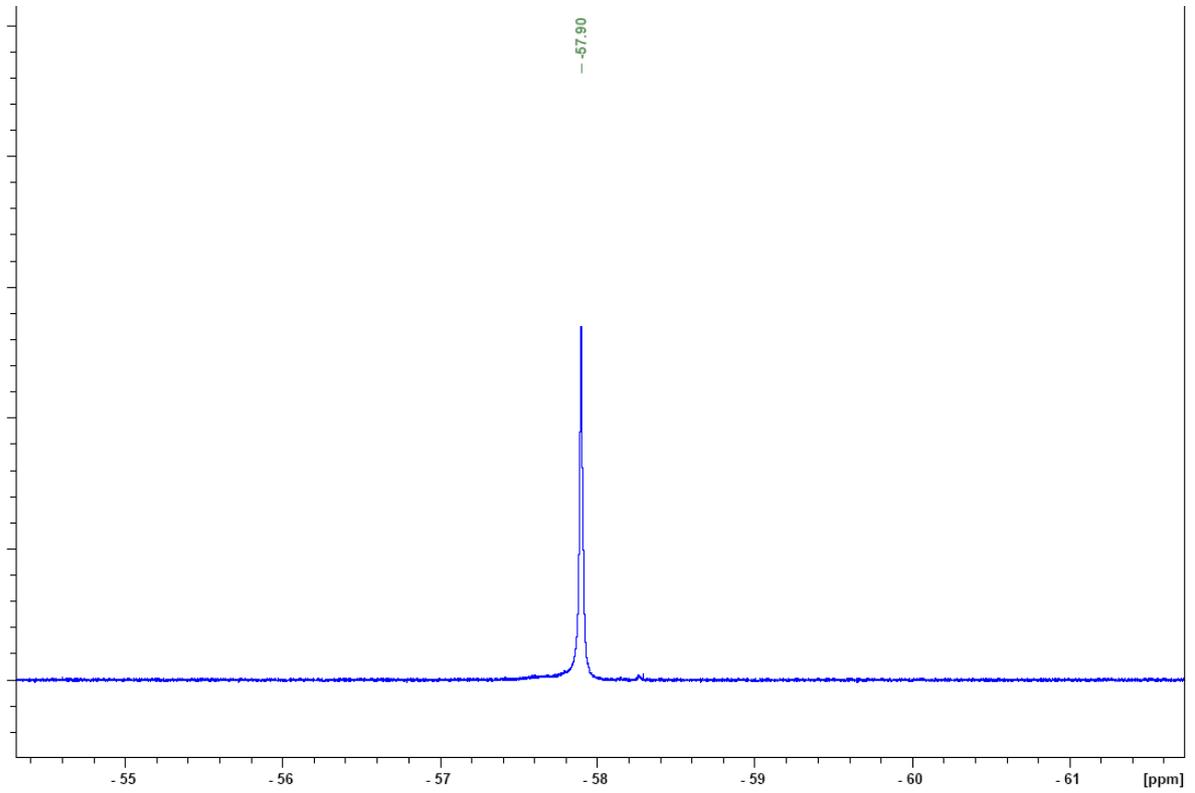
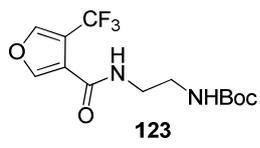
Anhang



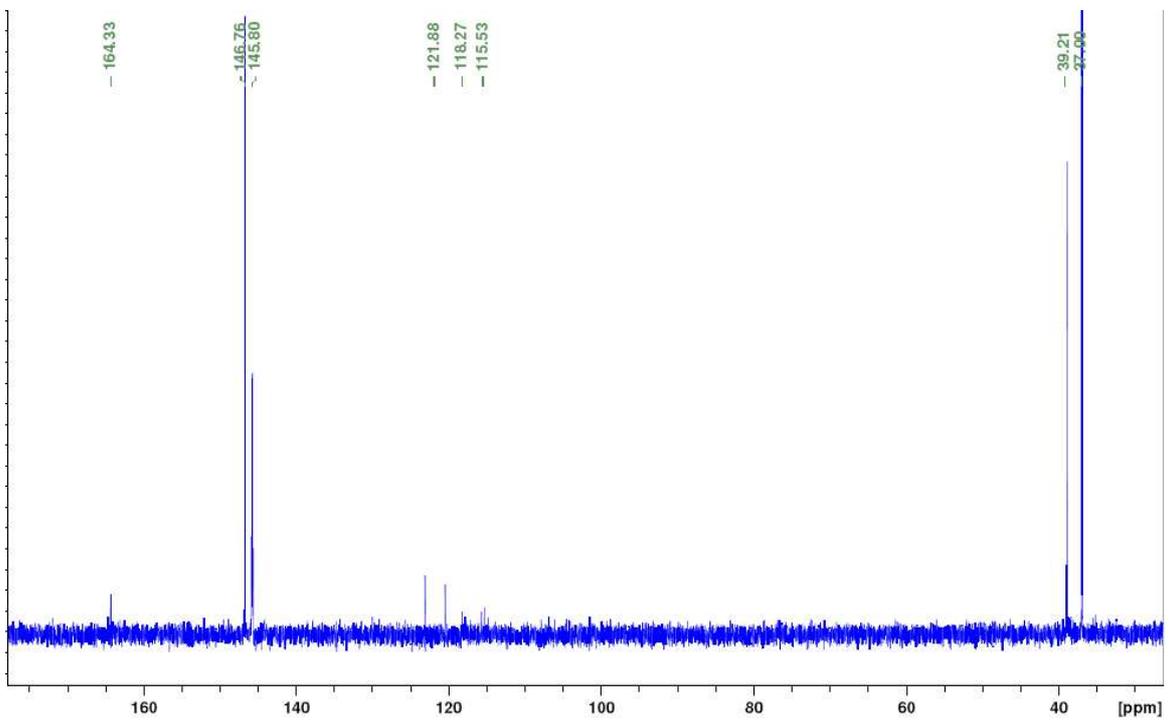
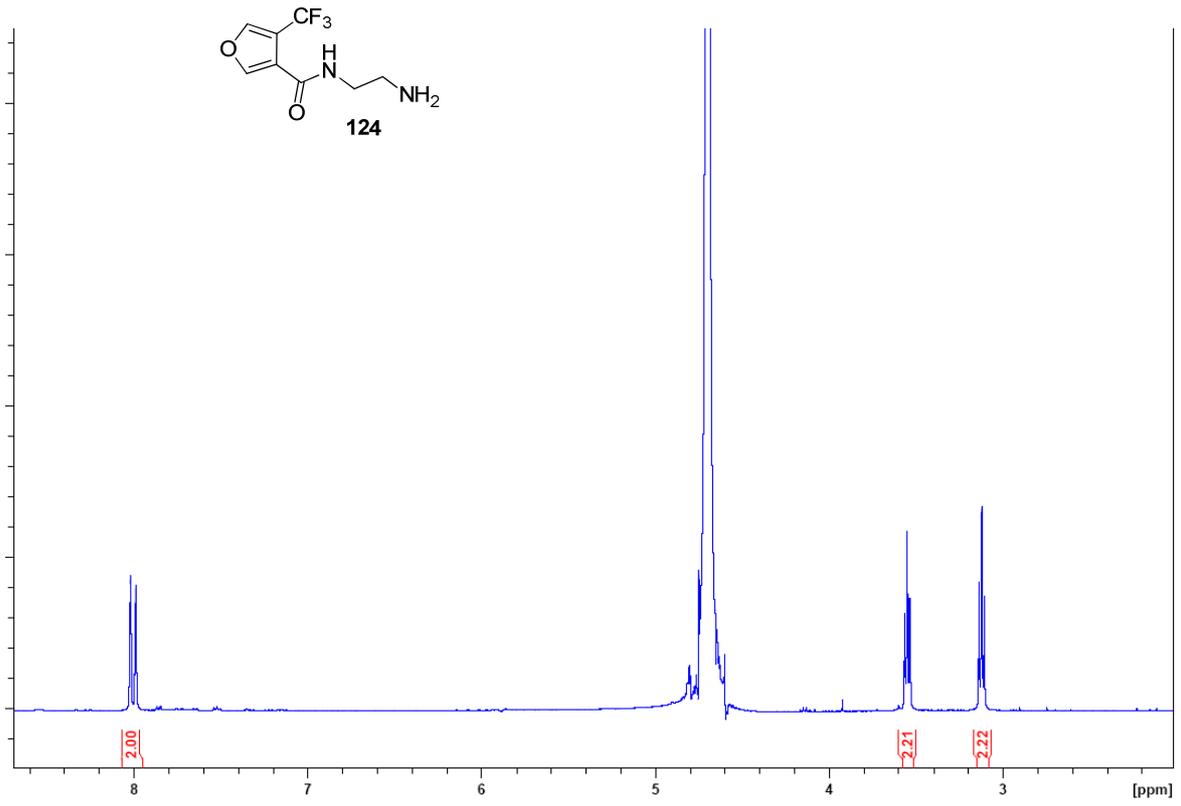
Anhang



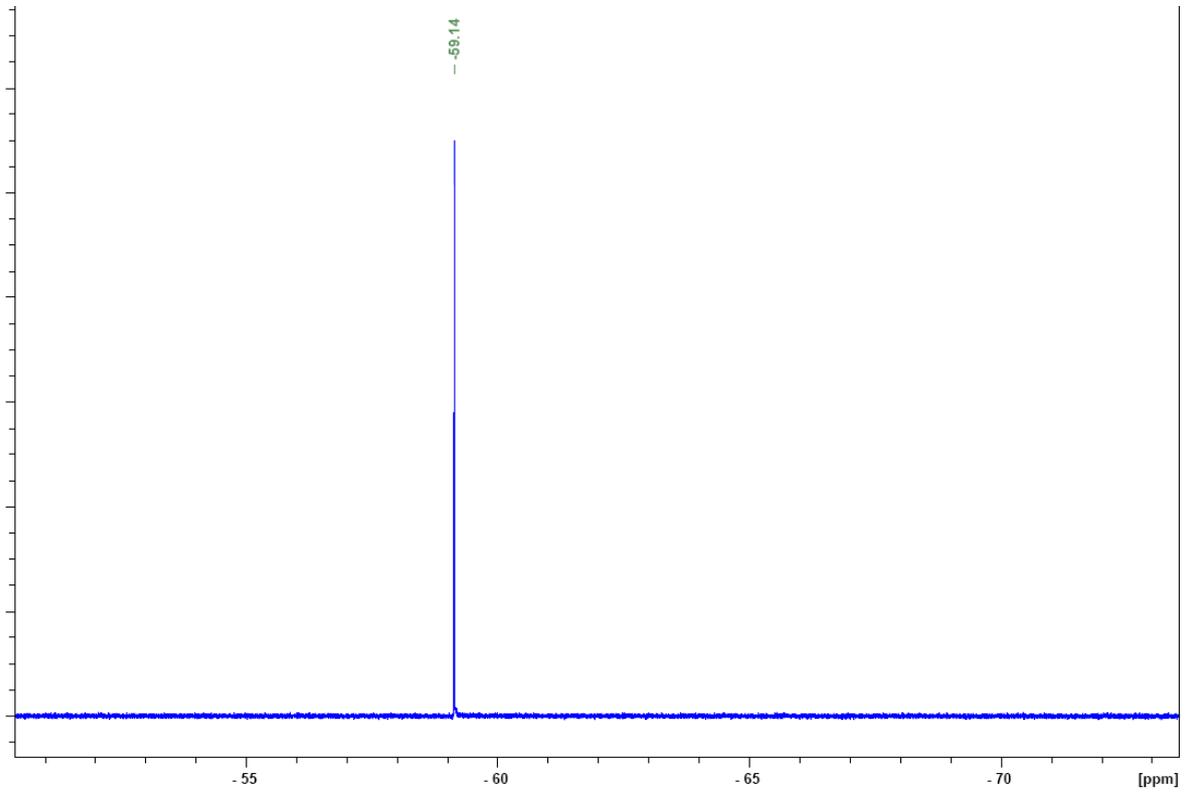
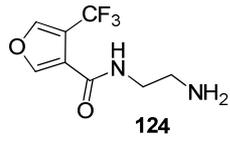
Anhang



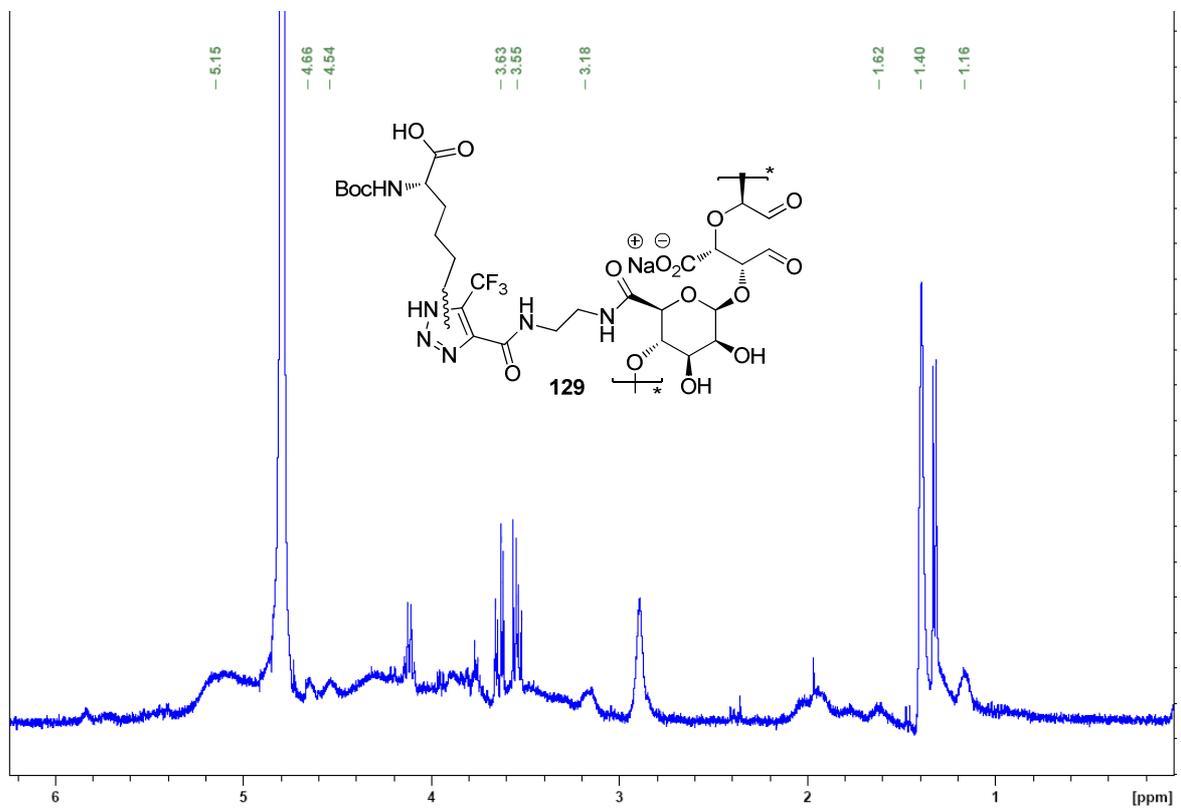
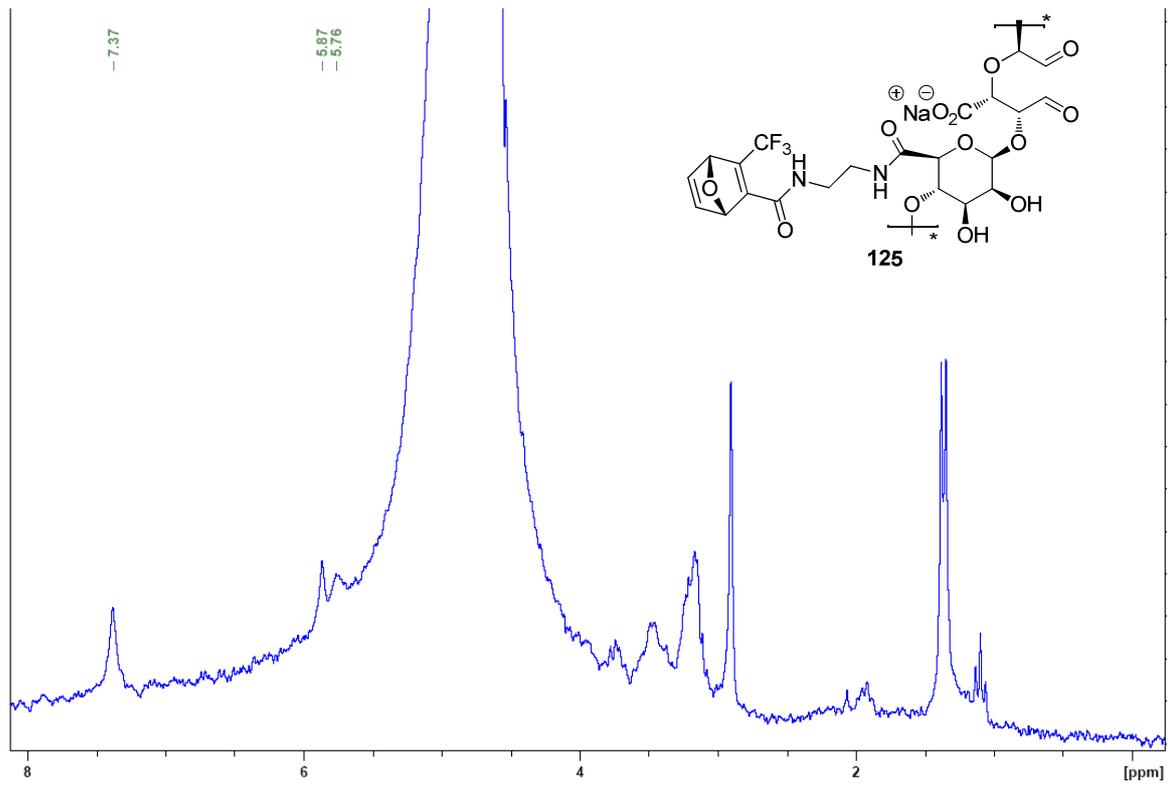
Anhang



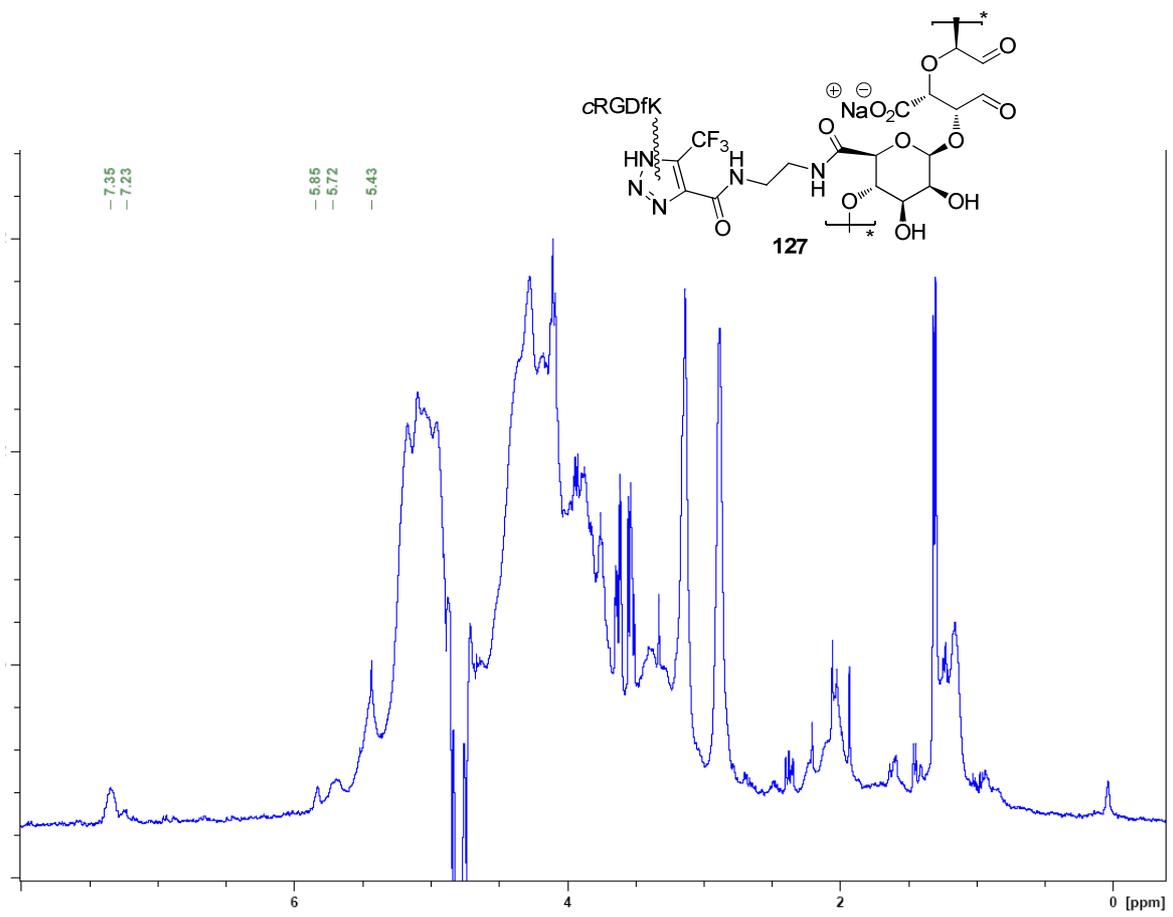
Anhang



Anhang

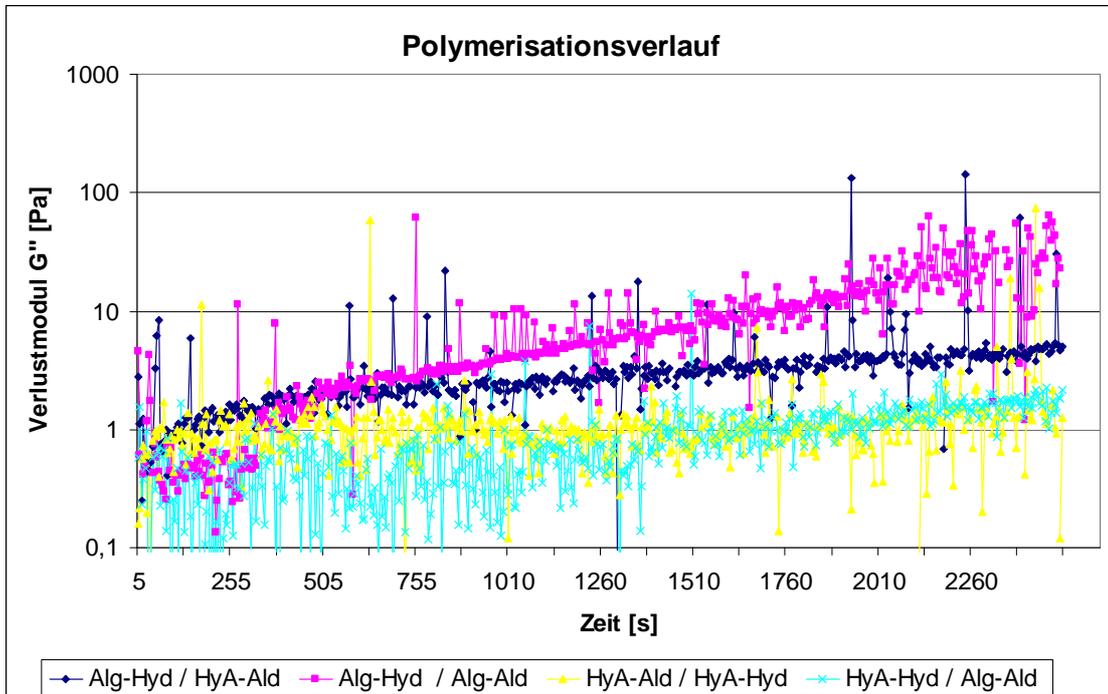
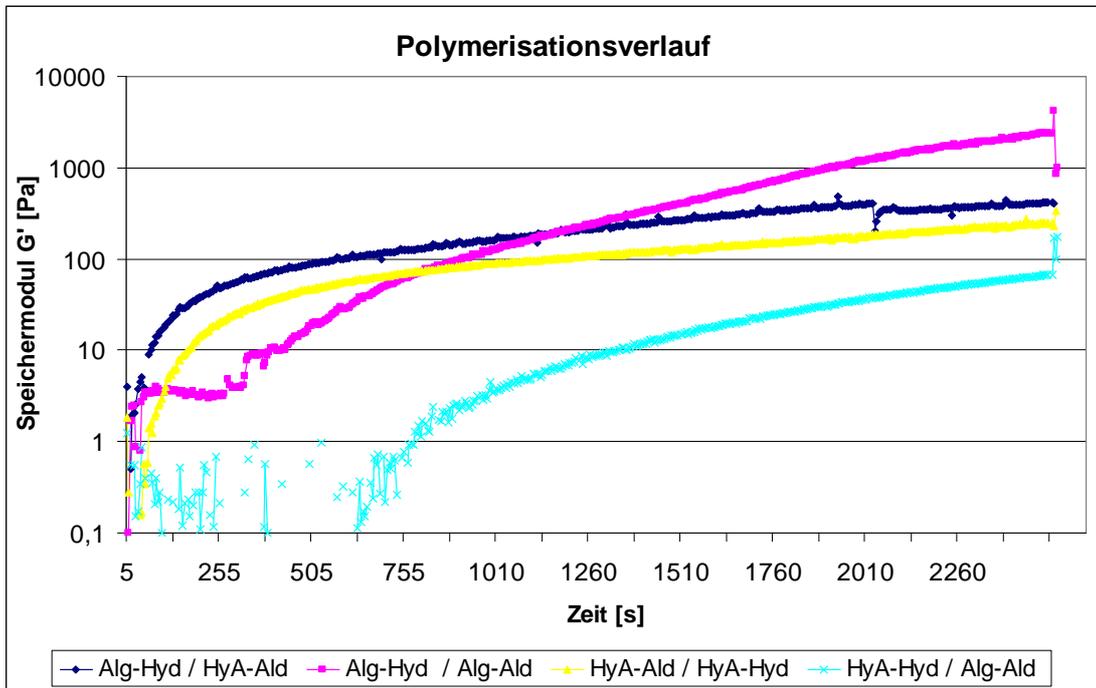


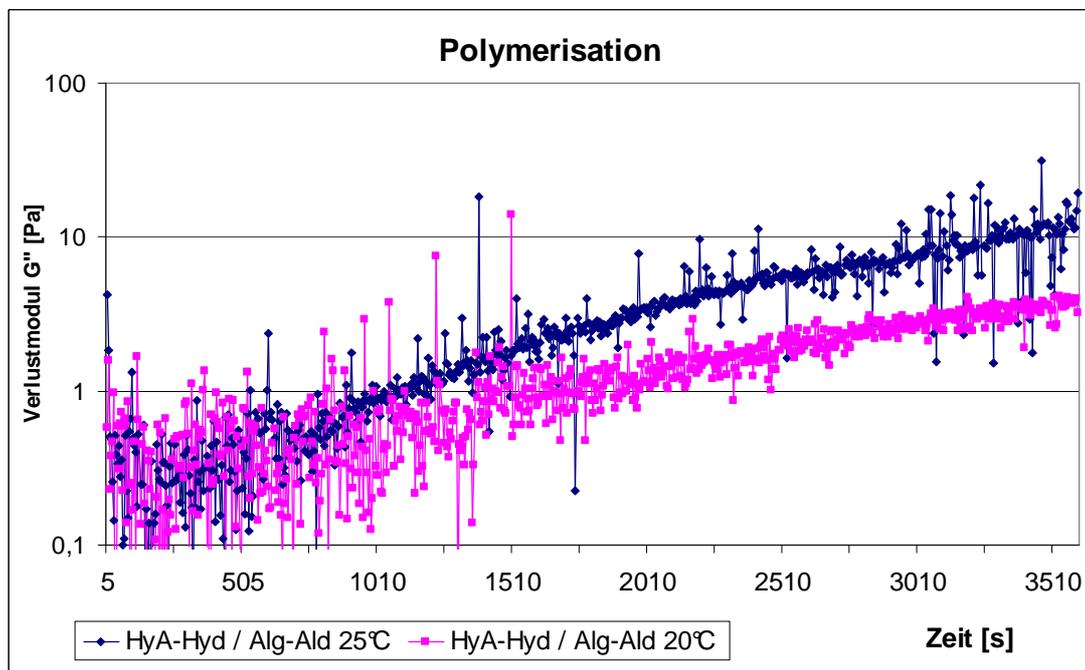
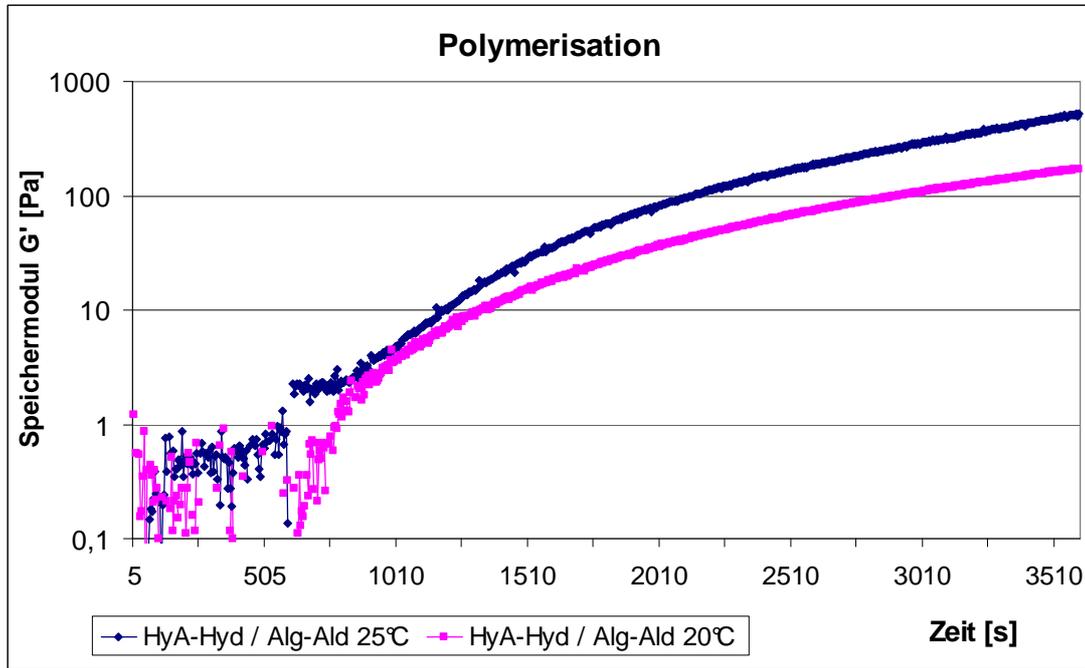
Anhang



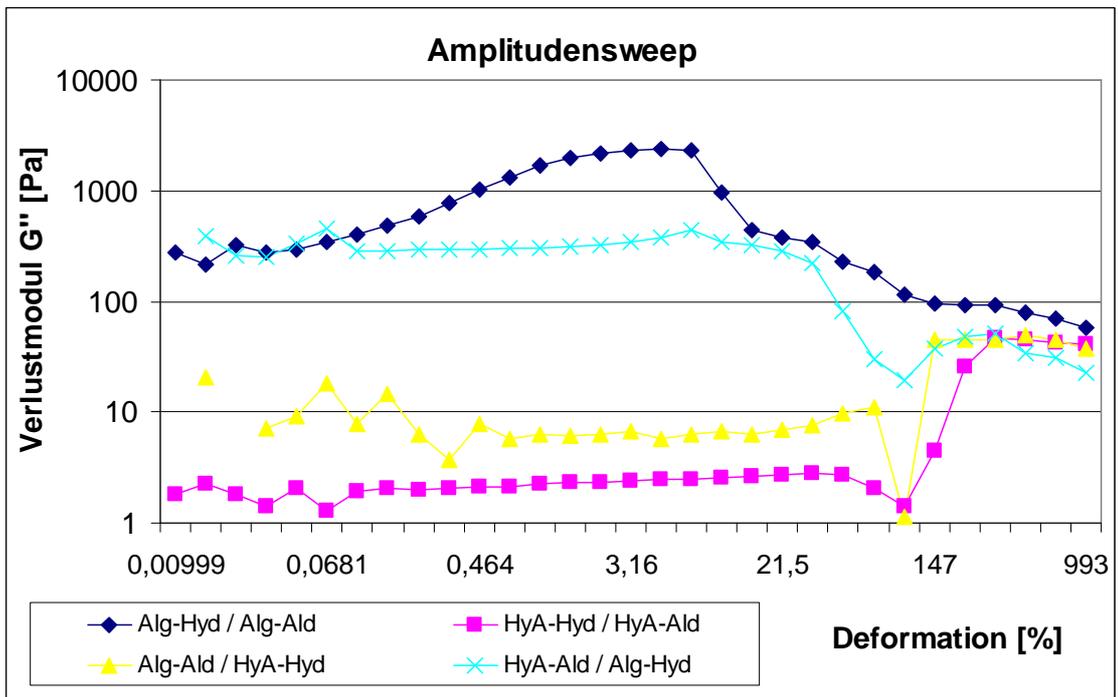
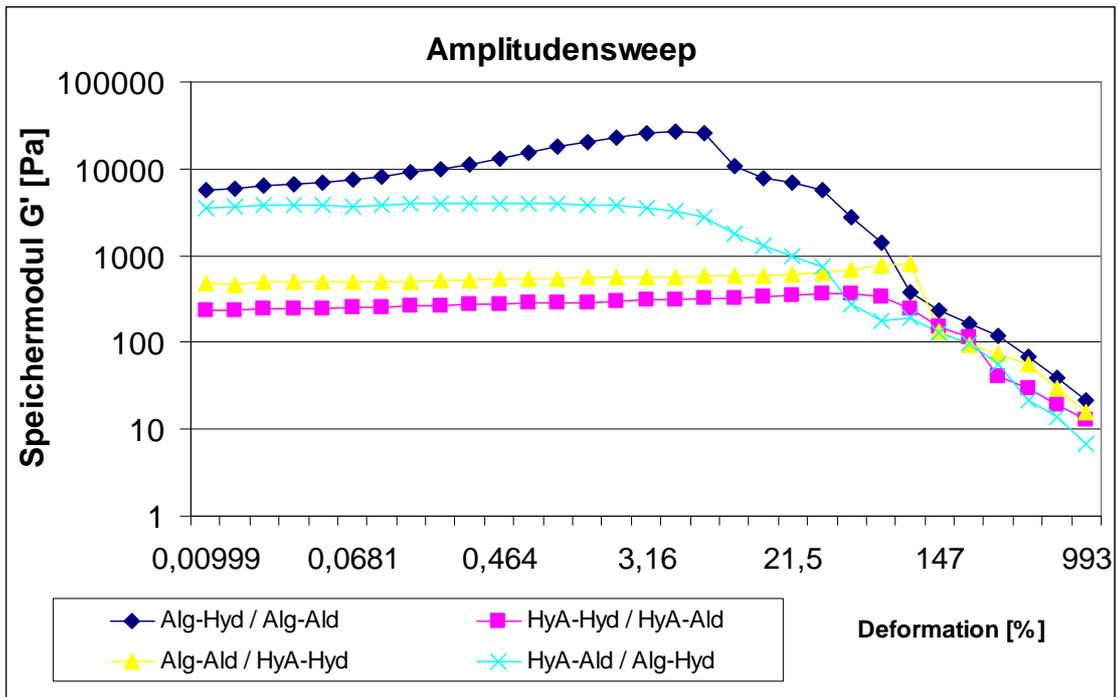
9.2 Rheologische Messungen

9.2.1 Polymerisationsverlauf *in situ* gelierender Hydrogele



9.2.2 Polymerisationsverlauf *in situ* gelierender Hydrogele abhängig der Temperatur

9.2.3 Amplitudensweep *in situ* gelierender Hydrogele



Danksagung

Mein erster Dank gilt meinen beiden Doktorvätern Prof. Dr. Andreas Kirschning und Dr. Gerald Dräger. Bei beiden möchte ich mich für die vielseitige, fordernde und einzigartige Aufgabenstellung und die persönliche Betreuung bedanken, auch für die Freiheiten in der Bearbeitung des Themas, dem freundschaftlichen Umgang und das stete Vertrauen. Bei Prof. Dr. Kirschning möchte ich mich insbesondere für seine persönlichen Ratschläge und die vorbildliche Mitarbeiterführung bedanken. Gerald danke ich für sein täglich offenes Ohr, die unglaubliche Hilfsbereitschaft und die persönliche Kollegialität.

Prof. Dr. Mike K. Boysen danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Sascha Ceylan, Dr. Jens Wegner, Dr. Lena Möller, Nadine Bluhm, Dr. Thomas Schmidt, Jan Hartwig und Julia Dahlmann möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Daneben möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der spektroskopischen und massenanalytischen Abteilung bedanken, Dr. Jörg Fohrer, Dr. Edgar Hofer, Dagmar Körtje, Monika Rettstadt und Rainer Nöthel, denn ohne ihr Engagement würde das Institut nicht funktionieren.

Den Damen aus den Sekretariaten sei hier ebenfalls herzlich für die Abwicklung aller möglichen Aufgaben und den einzigartigen, hilfsbereiten Umgang gedankt.

Außerordentlich möchte ich Lena danken, mit der ich fast jeden Tag meiner drei Jahre in Hannover verbrachte. Ohne dich wäre diese Arbeit sicherlich nicht so erfolgreich und der Alltag nicht so fröhlich geworden. Auch meinen ehemaligen Laborkollegen Dr. Jirka Palicek und Dr. Yi Su sei gedankt. Darüber hinaus danke ich allen Kollegen des Forschungsclusters REBIRTH, Markus, Möwes, Ivonne Bartsch, Ina Gruh, Goerge Kensah und besonders Julia Dahlmann, ohne euch wären die Ergebnisse der letzten drei Jahren nicht zustande gekommen.

Dank gilt insbesondere dem gesamten Arbeitskreis Kirschning, für intensive Kaffeepausen, eine tolle Arbeitsatmosphäre und vielerlei Gruppenaktivitäten. Besonders möchte ich hier die vorbildlichen Kollegen Dr. Sascha Ceylan und Dr. Jens Wegner nennen. Auch Andreas Kipke, Dr. Thomas Schmidt, Dr. Simone Eichner, Dr. Moni Vogt, Anja Heutling, Dr. Jenny Barbier und Gerrit Jürjens danke ich persönlich. Daneben möchte ich den Arbeitskreisen Kalesse und Boysen danken, hier sei das besonders freundliche Verhältnis zu Dr. Andreas Rentsch, Dr. Tobias Brodmann und Dr. Tobias Minuth zu nennen und die unvergessliche Konferenz in Maratea.

Ohne meine Familie und Freunde im Hintergrund wäre selbstverständlich diese Arbeit nicht zustande gekommen. Sie haben mich immer unterstützt und mir Rückhalt gegeben. Danke dafür!!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Partnerin Nadine Bluhm bedanken. Vielen Dank für alles in unserer bisherigen gemeinsamen Zeit!

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Andreas Peter Krause
Geburtsdatum: 30.07.1983
Geburtsort: Salzgitter-Bad
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Promotionsstudium

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
05/2009 – 08/2012 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Kirschning,
Thema: „Synthese und funktionelle Dekoration bioaktiver
Polymer-Materialien“ –REBIRTH Cluster of Excellence-

Studium

Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
03/2009 Diplom-Chemiker „mit Auszeichnung“
07/2008 – 03/2009 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Mazik
Thema: „Biphenyl-, Diphenylmethan- und Phenyl-Derivative
als Bausteine für artifizielle Rezeptorverbindungen“
10/2003 – 03/2009 Grund- und Hauptstudium „Diplom Chemie“

Zivildienst

07/2002 – 04/2003 Zivildienst im *Städtischem Klinikum Salzgitter-Bad*

Schulbildung

09/1995 - 06/2002 *Abitur, Gymnasium am Eikel, Salzgitter-Bad*

Stipendien und Auszeichnungen

10/2010 Auszeichnung: outstanding working group “grade A”
-REBIRTH Cluster of Excellence- *Leibniz Universität Hannover*
02/2010 Auszeichnung „Bestes Chemie Diplom 2009“
*Förderverein des Institutes für Organische Chemie der
Technischen Universität Braunschweig*
2008 – 2009 Stipendien für erbrachte Studienleistungen im Fach Chemie
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Zusatzqualifikationen

- 2010 – 2011 Führungskräfteentwicklungsprogramm „Promotion plus⁺ qualifiziert“, *Graduiertenakademie Universität Hannover*
- 2009 – 2011 Gasthörer -REBIRTH PhD Programm Regenerative Science-
Medizinische Hochschule Hannover –MHH-

Publikationen

A. Krause, A. Kirschning, G. Dräger, „*Bioorthogonal Metal-free Click-Ligation of cRGD-Pentapeptide to Alginate*“, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5547-5533.

L. Möller, A. Krause, I. Bartsch, A. Kirschning, F. Witte, G. Dräger, „*Preparation and in vivo Imaging of Lucifer Yellow Tagged Hydrogels*“, *Macromol. Symp.* **2011**, *309/310*, 222-228.

L. Möller, A. Krause, J. Dahmann, I. Gruh, A. Kirschning, G. Dräger, „*Preparation and Evaluation of Hydrogel-Composites from Methacrylated Hyaluronic acid, Alginate, and Gelatin for Tissue Engineering*“, *Int. J. of Art. Org.* **2011**, *34*, 93-102.

G. Dräger, A. Krause, L. Möller, S. Dumitriu, *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications, Kapitel 7: Carbohydrates*, Andreas Lendlein (Ed.), Wiley-VCH, **2011**.

A. Voss, N. Nemati, H. Poghosyan, H.-U. Endress, A. Krause, C. Vogel, „*Efficient Synthesis of Methyl(allyl 4-O-acyl-2,3-di-O-benzyl-β-D-galactopyranosid)uronates from D-Galacturonic acid*“, *Carbohydrate Chemistry: Proven Synthetic Methods, Volume 1*, Paul Kovac (Ed.), CRC Press, **2011**.

Wissenschaftliche Vorträge

„*Metall-free Click-Chemistry as Bioorthogonal Ligation Tool*“, NTH Bottum-Up Symposium, Warberg, **2011**.

„*Funktionalisierte Biomaterialien für die Anwendung in der Regenerativen Therapie*“, 19. Nachwuchswissenschaftler-Symposium Bioorganische Chemie, Göttingen, **2010**.

Ausgewählte Posterpräsentationen

„*In situ formed hydrogels based on alginate and hyaluronic acid: Extracellular Matrices for Myocardial Tissue Engineering*“, *Bayer PhD Student Course*, Köln, **2011**;
EUPOC 2011 - Europolymer Conference, Gargnano, Italien, **2011**.