

Funktionalisierung von Oberflächen und Hyaluronsäure-basierte Hydrogele für die Anwendung in der Regenerativen Medizin

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Lena Möller
geboren am 25.07.1984 in Rinteln

2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Dezember 2011 unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon in Form einer Masterarbeit, Diplomarbeit oder einer ähnlichen Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover den 14.12.2012

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. Mike Boysen

Tag der Promotion: 23.03.2012

Zusammenfassung

Lena Möller

Funktionalisierung von Oberflächen und Hyaluronsäure-basierte Hydrogele für die Anwendung in der Regenerativen Medizin

Schlagworte: Oxygenator-Hyaluronsäure-*tissue engineering*-*magnetic-drug-targeting*-Plasmachemie

Die geringe Menge an geeigneten Spenderorganen führt in der Regenerativen Medizin zu großen Problemen bei der Behandlung von Patienten, die eigenes Gewebe aufgrund einer Krankheit oder eines Unfalls verlieren. Aus diesem Grund stellt das interdisziplinäre Feld des *tissue engineering*, welches sich mit der Herstellung künstlichen Gewebes beschäftigt, eine bedeutende Alternative dar. Gleichmaßen müssen die Geräte weiterentwickelt werden, die zur Überbrückung des Zeitraums zwischen Explantation des kranken Organs und Transplantation des Spenderorgans oder des künstlich hergestellten Gewebes dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalisierung von Poly-4-methylpent-1-en (PMP), welches als Membran in Oxygenatoren eingesetzt wird, mit zyklischen RGD-Peptiden realisiert. Ziel war es dadurch eine biokompatible Oberfläche zu generieren, welche anschließend mit einer unter Flussbedingungen adhärennten Endothelzellen-Monolage besiedelt werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine Plasma-Vorbehandlung zu einer Steigerung der Hydrophilie des Materials führte, wodurch dieses für chemische Modifizierungen zugänglich wurde. Das Konzept wurde im Folgenden auf Metalloberflächen übertragen, die als Modelle für Herzschrittmachersysteme dienen. Durch eine Steigerung der Biokompatibilität sollte so das Einwachsen in umliegendes Geweben ermöglicht werden.

Zudem sollten neue, synthetische Zugänge zu Hydrogelen auf Basis von Hyaluronsäure und Gelatine entwickelt werden, die als Gerüstmaterialien für Zellkulturen dienen können, um auf diese Weise künstliches Gewebe zu erzeugen. Es wurden zwei Ansätze zur Vernetzung der Biopolymere zu Hydrogelen verfolgt. Zum einen wurde eine Methode zur radikalischen Verknüpfung von methacrylierten Polymeren, zum anderen eine Hydrazon-vermittelte Hydrogelierung untersucht.

Außerdem beschäftigt sich diese Arbeit mit der Entwicklung eines Systems zur magnetischen Direktion von Nanopartikeln, die, thermisch induziert durch eine retro-DIELS-ALDER Reaktion, einen Wirkstoff in zu behandelndes Tumorgewebe abgeben sollen. Die Synthese und die Spaltbarkeit eines derartigen Konstrukts durch Induktion konnte im Rahmen einer *proof-of-principle* Studie gezeigt werden.

Abstract

Lena Möller

Functionalization of surfaces and hyaluronic acid based hydrogels for applications in regenerative medicine

Keywords: Oxygenator-hyaluronic acid-*tissue engineering*-*magnetic-drug-targeting*-plasma chemistry

Due to a lack of organ donors, the treatment of patients who lose an organ or parts of it through an illness or accident is often challenging. Therefore, the interdisciplinary field of tissue engineering, which deals with the construction of artificial organs is attracting increasing interest. Additionally, devices have to be improved, which bridge the time period between explantation of the malfunctioning organ and transplantation of the donor or the artificial organ.

In this work, the functionalization of poly-4-methylpent-1-en (PMP), that serves as membrane in oxygenators, with cyclic RGD-peptides was developed. The objective was to achieve a stable adherence of endothelial cells under flow conditions, which were seeded on top of the material in order to generate a biocompatible surface. It could be shown that the hydrophilic properties of the surface could be increased by using plasma chemistry. In this way, chemical accessibility was achieved. This concept was transferred to metals, which serve as model for pacemakers. By increasing the biocompatibility of the material, the incorporation of the device in surrounding tissue should be facilitated.

In addition to that, the synthesis of hydrogels made of hyaluronic acid and gelatin was examined. These hydrogels can be used as scaffolds for the cultivation of cells to create artificial tissue. Two approaches were used to crosslink the polymeric strains. On the one hand, methacrylated hyaluronic acid and gelatin were ligated radically and on the other hand, hydrogels were formed via hydrazone bonds.

The last part of this thesis deals with the development of a system within the field of magnetic drug targeting. Therefore, nanoparticles which are functionalized with an active agent, should be guided magnetically to a tumorous body region where the drug should be released thermally. The synthesis and the cleavage properties of such a system were evaluated within a *proof-of-principle* study. To investigate the ligation of nanoparticle and drug, a thermoreversible DIELS-ALDER reaction was examined. The release from the particle was initialized by application of inductive heating.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	9
1.1 Regenerative Medizin.....	9
1.2 Medizinische Produkte	11
1.2.1 Oxygenatoren	11
1.2.2 Herzschrittmacher.....	12
1.3 (Bio)polymere als Gerüste zur Züchtung künstlicher Organe.....	12
1.3.1 Alginate.....	14
1.3.2 Hyaluronsäure	15
1.4 Die extrazelluläre Matrix und RGD-Peptide.....	17
1.5 Plasmachemie.....	21
1.6 Magnetische Wirkstofftransporter.....	23
2 Zielsetzung	29
3 Kovalente Funktionalisierung von Polymethylpenten mit RGD-Peptiden.....	31
3.1 Einleitung	31
3.2 Synthese des fluorierten Phenylazids und Nitreninsertion	34
3.3 XPS-Analysen	37
3.2.1 XPS-Analyse: unbehandeltes PMP	38
3.2.2 XPS-Analyse: Nitreninsertion.....	41
3.4 Plasma-Behandlung von PMP	43
3.4.1 Plasmamodifizierungen mit Druckluftplasma	45
3.4.2 XPS-Analyse: Formiergasplasma-Behandlung.....	47
3.5 XPS-Analyse: Nitreninsertion	52
3.6 Weitere Analysen: Nitreninsertion	55
3.7 Kupplung eines Linkers für Kupfer-katalysierte Ligation.....	57
3.8 Kupfer-katalysierte, 1,3-dipolare Zykoadditionen	60
3.9 RGD-Anbindung und biologische Evaluation	67
3.10 Kupfer-freie 1,3-dipolare Zykoaddition.....	72
3.11 Biologische Evaluation der Kupfer-freien Ligation.....	77
3.12 XPS-Analyse der Kupfer-freien Ligation.....	80
3.13 Weitere Derivatisierungen	84
3.13.1 Azid Derivate	84
3.13.2 PMP nach Ammoniakplasma-Behandlung	89

3.13.3 PMP nach Bromplasma-Behandlung	93
3.14 Überblick: Derivate von PMP	96
4 Funktionalisierung von Herzschrittmacher-Oberflächen mit RGD Peptiden....	98
4.1 Einleitung	98
4.2 Untersuchung der unbehandelten Oberfläche.....	99
4.3 Aktivierung der Titanoberfläche.....	101
4.4 Aminierung der Oberfläche	105
4.5 Kupplung des Oxanorbornadiens 61	108
4.6 Ligation von zyklischen RGD-Peptiden	110
5 Hydrogele aus Hyaluronsäure für das <i>tissue engineering</i>	112
5.1 Einleitung	112
5.2 Photovernetzbare Polymere	112
5.2.1 Methacrylierte Gelatine.....	113
5.2.2 Synthese und Charakterisierung methacrylierte Hyaluronsäure	118
5.2.3 Hydrogelierung methacrylierter Hyaluronsäure.....	119
5.3 <i>in situ</i> Vernetzbare Polymere	124
5.3.1 Synthese der Aldehydkomponente	125
5.3.2 Synthese der Hydrazidkomponente.....	129
5.3.3 Herstellung der Hydrogele	130
5.3.4 Charakterisierung der Hydrogele	131
5.3.5 Biologische Evaluation der Hydrogele	138
5.3.6 Alternative <i>in situ</i> Gelierungsstrategie	140
5.4 weitere Funktionalisierung von Hyaluronsäure.....	142
6 Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel	147
6.1 Einleitung	147
6.2 Synthese der Bausteine für die DIELS-ALDER Reaktion	149
6.3 Untersuchungen zur DIELS-ALDER-Reaktion.....	152
6.4 Untersuchungen zur retro-DIELS-ALDER-Reaktion.....	158
6.5 Reaktionen an Nanopartikeln	159
7 Zusammenfassung und Ausblick	163
7.1 Zusammenfassung.....	163
7.2 Ausblick.....	166
8 Experimenteller Teil	168
8.1 Allgemeine Hinweise	168

8.2 Synthesen	174
8.2.1 Synthesen literaturbekannter Substanzen	174
8.2.2 Synthesen neuer Verbindungen	181
9 Anhang	211

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
Alg	Alginat
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
Äq	Äquivalente
BE	Bindungsenergie
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
c	centi oder zylo
C	Konzentration
CM	Rattenkardiomyozyten
CIED	implantierbarer Herzschrittmacher (<i>Cardiovascular implantable electronic device</i>)
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
δ	chemische Verschiebung
DIC	Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	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	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EHS	ENGELBRETH-HOLM-SWARM
$E_{\text{kin.}}$	kinetische Energie
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
eV	Elektronenvolt

FG	Formiergas
g	Gramm
Gel	Gelatine
GV	Geschwindigkeit Verfahrtsch
h	Stunde (<i>hour</i>)
HMBC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMDSO	Hexamethyldisiloxan
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HR	hoch aufgelöst (<i>high resolution</i>)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HyA	Hyaluronsäure
Hz	Hertz
<i>J</i>	Kopplungskonstante
k	kilo
K	Kelvin
kA	keine Angabe
KW	Kontaktwinkel
IG	Ionisationsgas
IR	Infrarot
L	Liter
λ	Wellenlänge
m	milli oder Meter
M	molar
M	mega
μ	mikro
Me	Methyl
MIDAS	Metallionen abhängigen Adhäsionsdomäne (<i>metal ion-dependent adhesion site</i>)
MS	Massenspektrometrie
mw	Mikrowelle
m/z	Masse pro Ladung
N	nano
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

NIR	nahes Infrarot
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salz-Lösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCT	Puls-Pause-Verhältnis
PEG	Polyethylenglycol
PFFPA	Perfluorphenylazide
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMP	Poly-4-methylpent-1-en
ppm	<i>parts per million</i>
O	Hydroxyprolin (nicht proteinogene Aminosäure)
quant.	quantitativ
REM	Rasterelektronenmikroskop
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smp.	Schmelzpunkt
<i>tert.</i>	tertiär
TBABr	<i>tert.</i> -Butylammoniumbromid
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tf	Triflat (Trifluoromethansulfonat)
THF	Tertahydrofuran
TIPS	Tri- <i>iso</i> -propylsilyl
™	unregistrierte Warenmarke (<i>unregistered trade mark</i>)
TMS	Trimethylsilyl
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
t _R	Retentionszeit
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i> (Enzymmenge, die pro Minute ein µmol Substrat umsetzt)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vergl.	vergleiche
w/w	Gewichtsprozent
w/v	Volumenprozent

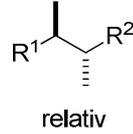
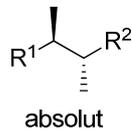
XPS	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (<i>X-ray Photoelectron spectroscopy</i>)
2PP	zwei-Photonen-Polymerisation
3D	dreidimensional
°C	Grad Celsius
%	Prozent
‰	Promille
®	registrierte Warenmarke (<i>registered trade mark</i>)

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 Stereochemie in Abbildungen und Schemata wird wie folgt dargestellt: Keile bezeichnen die absolute Stereochemie während Balken die relative Stereochemie darstellen.



1 Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Verliert ein Patient durch eine Krankheit oder einen Unfall eines seiner Organe, oder Teile davon, ist er auf ein geeignetes Spenderorgan angewiesen. Wegen des erheblichen Mangels an Spendern stehen diese jedoch nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung. Nach Angaben der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung und Eurotransplant befanden sich Ende des Jahres 2010 allein in Deutschland 7515 Menschen auf der Warteliste für eine Niere, 929 Patienten benötigten ein Spenderherz, 2087 Patienten eine Leber und 609 Patienten eine Lunge.¹ Demgegenüber steht nur eine unzureichende Menge an Organspendern (Transplantationen 2010: beispielsweise 2277 Nieren, 385 Herzen).

Sofern kein passendes Spenderorgan gefunden und transplantiert werden kann, wird der Patient lange mit alternativen Behandlungen wie Dialyse oder künstlicher Beatmung/Blutzirkulation mit Herzlungenmaschinen am Leben gehalten. Aus diesem Grund hat sich das Gebiet der Herstellung von künstlichen Geweben (*tissue engineering*) zu einem bedeutenden Zweig in der biomedizinischen Chemie entwickelt. Ziel ist es dabei, aus menschlichen (Stamm)zellen Organe zu züchten. Um ein dreidimensionales (3D) Gewebe zu erhalten, müssen die Zellen auf einem ebenfalls dreidimensionalen Gerüst (*scaffold*) kultiviert werden, welches den Zellen die nötige Stabilität für Proliferation, Migration und Vaskularisierung verleiht.²

Die Anforderungen an ein solches Material sind vielfältig. Das wichtigste Kriterium ist aber dessen Biokompatibilität.³ Diese muss entweder eine intrinsische Eigenschaft des Materials sein oder durch chemisch aufgebrachte Erkennungsfaktoren künstlich erzeugt werden.

Zudem muss ein Material für den Einsatz als Gerüst im Bereich des *tissue engineering*s vollständig chemisch definiert sein und darf nicht aus tierischen Quellen stammen, die eine Immunabwehr des menschlichen Körpers hervorrufen könnten.

¹ Jährliche Statistik Eurotransplant 2010; verfügbar über: <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=yearlystats> (Zugriff: 21.11.2011)

² Review: J. Lee, M. Cuddihy, N. Kotov, *Tissue Eng., Part B* **2008**, *14*, 61-86.

³ Reviews: a) O. Guillame-Gentil, O. Semenov, A. S. Roca, T. Groth, R. Zahn, J. Vörös, M. Zenobi-Wong, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 5443–5462, b) H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4353-4364.

Des Weiteren sollte das Material vom menschlichen Körper abbaubar sein.⁴ Dieser Degradationsprozess sollte jedoch erst eintreten, nachdem das künstliche Gewebe vollständig *in vivo* adaptiert ist. Die Abbauprodukte müssen, genauso wie das Material selber, untoxisch und renal oder intestinal ausscheidbar sein. Eine Anreicherung der Abbauprodukte in einem oder mehreren Organen wie der Leber oder der Niere könnten bei der Behandlung des Patienten zu Komplikationen führen und Folgeerkrankungen auslösen. Ein weiteres Kriterium für die Wahl eines geeigneten Gerüstmaterials ist seine Formbarkeit. Für ihre spezielle Applikation müssen *scaffolds* in verschiedenen Größen und Formen hergestellt werden können. Um Proliferation und Migration der Zellen im *scaffold* zu ermöglichen, ist die Einstellung einer geeigneten Porengröße nötig.⁵ Des Weiteren muss das Material mechanisch stabil sein und darf sich nicht durch menschliche Muskelaktivität beschädigen lassen.

Parallel müssen jedoch auch die Geräte weiterentwickelt und verbessert werden, die zur Überbrückung des Zeitraums zwischen Explantation des kranken Organs und Transplantation des Spenderorgans oder des künstlich hergestellten Gewebes dienen. So müssen die Oberflächen von Herzschrittmachern, Dialysmembranen und Oxygenatoren biokompatibel gestaltet werden, um Immunreaktionen des Körpers zu vermeiden.

Das *tissue engineering* erfordert eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Chemikern, Physikern, Biologen und Medizinern. Die Chemiker sind dabei für die Herstellung und Funktionalisierung der Materialien verantwortlich. Anschließend müssen Physiker die veränderten Eigenschaften des Materials wie beispielsweise die Flexibilität und die Deformationstoleranz untersuchen oder die Oberflächenzusammensetzung und -struktur eines biomedizinischen Geräts überprüfen. Schließlich muss eine zelluläre Besiedlung eines *scaffolds* durchgeführt werden, bevor es als funktionales Gewebe human implantiert werden kann. In Bezug auf die Funktionalisierung von Oberflächen biomedizinischer Produkte, muss deren Biokompatibilität untersucht werden. Letztlich ist es unerlässlich die durch *tissue engineering* gefertigten medizinischen Produkte in den klinischen Alltag zu integrieren und im Hinblick auf ihre praktische Funktionalität und biologische Verträglichkeit erneut zu überprüfen.

⁴ Review: G. D. Garret, S. J. Bryant, *Tissue Eng. Part B* **2008**, 14, 149-165.

⁵ F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.J. Gibson, *Biomaterials* **2005**, 26, 433-441.

1.2 Medizinische Produkte

1.2.1 Oxygenatoren

Lungenversagen ist eine lebensbedrohliche Diagnose und eine mechanische Beatmung kann die Lunge zusätzlich schädigen. Durch die physische Belastung während der Beatmung und dadurch freigesetzte Entzündungsfaktoren können zudem Schädigungen an anderen Organen ausgelöst werden, die bis zum Multiorganversagen führen können.⁶

Statt einer invasiven Beatmung des Patienten (Intubation) werden daher häufig Oxygenatoren eingesetzt, bei denen der Gasaustausch ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{O}_2$) extrakorporal durchgeführt wird.⁷ Diese Geräte beinhalten eine Hohlfasermembran, an deren Innenraum ein Sauerstoffüberdruck angelegt wird. Das Blut des Patienten fließt dagegen an der Außenseite der Hohlfasern entlang und der Gasaustausch findet an der Grenzfläche der Membran statt. Diese Membranen bestehen aus Poly-4-methylpent-1-en (PMP), einem polymeren Kohlenwasserstoff, welcher aufgrund seiner geringen Dichte von 0.833 g/cm^3 einen ungehinderten Gasfluss durch das Material erlaubt.⁸ Da PMP ein künstlich hergestelltes Polymer und stark hydrophob ist kann es nach einer Anwendungszeit von 11 ± 7 Tagen zu einer Blockierung der Membranen durch Blutkoagulate kommen, sodass das Gerät ersetzt werden muss.⁹ HESS *et al.* untersuchten eine Besiedlung von Heparin/Albumin beschichteten PMP-Membranen mit Endothelzellen in Bezug auf die Hämokompatibilität des Materials.¹⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die Blutplättchenadhäsion im Vergleich zu den unbesiedelten Membranen deutlich unterdrückt werden konnte. Die wasserlösliche Heparin/Albumin Beschichtung löste sich jedoch mit der Zeit vom Material, sodass auch die Besiedlung mit den Endothelzellen nicht dauerhaft stabil war.

⁶ a) J. L. Kaar, H. I. Oh, A. J. Russel, W. F. Federspiel, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3131-3139. b) J. D. Ricard, D. Dreyfuss, G. Saumon, *Eur. Respir. J. Suppl.* **2003**; *42*, 2s-9s.

⁷ Zum Beispiel iLA Lungenventilatoren der Firma NOVALUNG.

⁸ a) J. Brydson, in *Plastics Materials*, Butterworth-Heinemann. Oxford **1999**, 270, b) http://www.mitsuichemicals.com/tpx_phy.htm (Zugriff: 23.11.2011)

⁹ K. Lehle, A. Philipp, O. Gleich, A. Holzamer, T. Müller, T. Bein, C. Schmid, *ASAIO* **2008**, *54*, 612-617.

¹⁰ C. Hess, B. Wiegmann, A. N. Maurer, P. Fischer, L. Möller, U. Martin, A. Hilfiker, A. Haverich, S. Fischer, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 3043-3053.

1.2.2 Herzschrittmacher

Aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung in den Industrienationen hat in den vergangenen Jahrzehnten die Menge an implantierten Herzschrittmachern (*Cardiovascular implantable electronic device (CIED)*) stark zugenommen.¹¹ Damit einher geht jedoch auch eine Vielzahl von Infektionen, ausgelöst durch das Bakterium *Staphylococcus aureus*. Neben Beschwerden der Patienten, muss bei einer solchen Infektion das Gerät explantiert und eine medikamentöse Therapie mit Antibiotika durchgeführt werden.

1.3 (Bio)polymere als Gerüste zur Züchtung künstlicher Organe

In der Literatur werden verschiedene Polymere als Bausteine für die Herstellung von Gerüstmaterialien diskutiert, die im Bereich des *tissue engineerings* Anwendung finden.¹² Eine bedeutende Rolle spielen unter anderem die synthetisch hergestellten Polyester, beispielsweise Polymilchsäure **1** oder Poly- ϵ -Caprolacton **2** (Abbildung 1).¹³ Ersteres wird dabei hauptsächlich durch Ringöffnungspolymerisation aus Laktid, letzteres aus der Polymerisation von ϵ -Caprolacton gewonnen. Durch Esterasen vermittelte, hydrolytische Spaltung der Esterbindungen können diese Polymere *in vivo* abgebaut werden. Studien zur Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit der Polyester sind jedoch noch nicht abgeschlossen.¹⁴

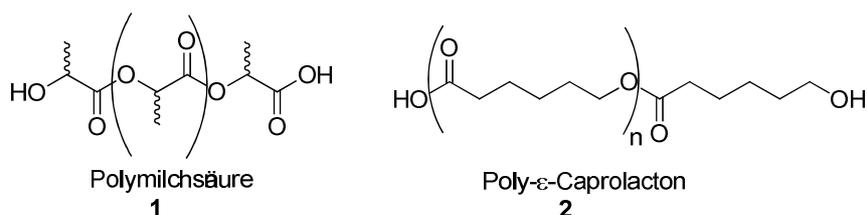


Abbildung 1: Polyester im Bereich des *tissue engineerings*.

¹¹ Reviews: a) M. R. Sohail, O. W. Sultan, S. S. Raza, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**, *8*, 831-839, b) P. Tornos, T. Gonzalez-Alujas, F. Thuny, G. Habib, *Curr. Prob. Cardiology* **2011**, *36*, 175-222, c) R. Margey, *J. Long Term Eff. Med. Implants* **2010**, *20*, 203-17.

¹² A. Lendlein, A. T. Neffe, B. F. Pierce, J. Vienken, *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*, 71-75.

¹³ Reviews: a) R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia, S. N. Upadhyay, *J. Macromol. Sci., Part C: Polym. Rev.* **2005**, *45*, 325-349, b) D. Garlotta, *J. Polym. Environ.* **2001**, *9*, 63-84, c) J. Ren, *Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications*, Tsinghua University Press, Beijing, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2010**.

¹⁴ M. Vert, *Biomacromol.* **2005**, *6*, 538-546.

Ein in der Praxis häufig verwendetes *scaffold* zur Kultivierung von Zellen ist das kommerziell erhältliche MatrigelTM.¹⁵ Dieses wird aus ENGELBRETH-HOLM-SWARM (EHS) Mäusetumorzellen gewonnen und besteht aus einer Mischung verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Laminin, Kollagen IV und Enactin (s. Kapitel 1.4). Bei 4 °C handelt es sich um eine viskose Flüssigkeit, die bei Erwärmung auf 37 °C zu einem festen Gel erstarrt. Daher können Zellen in dem flüssigen Material homogen verteilt und anschließend durch Erwärmung im Gel eingeschlossen werden.¹⁶ Da MatrigelTM jedoch aus Tumorzellen isoliert wird und Materialien tierischen Ursprungs zumeist eine Chargen-Varianz aufweisen, können auf MatrigelTM kultivierte Gewebe nicht human angewendet werden.

Auch Proteine, wie beispielsweise Gelatine, die aus degeneriertem Kollagen gewonnen wird, können im Bereich des *tissue engineerings* Anwendung finden. Vorteilhaft an Gelatine ist, dass sie ein natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix ist und daher Aminosäuresequenzen enthält, die zellulär erkannt werden. Verschiedene chemische Derivatisierungen zur Herstellung von Gelatine-basierten *scaffolds* wurden von VAN VLIERBERGHE *et al.* zusammengefasst.¹⁷ Probleme bei der Verwendung von Gelatine können jedoch auftreten, da es als tierisches Produkt potentiell immunogen ist und eine chargenabhängige Qualität aufweist.¹⁸

Eine wichtige Klasse von Biopolymeren natürlichen Ursprungs, die sich als Ausgangsmaterial für das *tissue engineering* eignen, sind die Polysaccharide, wie beispielsweise Alginat, Cellulose, Chitin beziehungsweise Chitosan, Hyaluronsäure und Polysialinsäure.¹⁹ Polysaccharide sind zumeist nicht-tierischen Ursprungs und enzymatisch (bio)abbaubar. Die Polymere sowie ihre Abbauprodukte sind untoxisch und können, im Falle von human vorkommenden Sacchariden, über verschiedene

¹⁵ a) D. J. Carey, M. S. Todd, C. M. Rafferty, *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 2254-2263 b) C. S. Hughes, L. M. Postovit, G. A. Lajoie, *J. Proteomics* **2010**, *10*, 1886-1890.

¹⁶ G. Kensah, I. Gruh, J. Viering, H. Schumann, J. Dahlmann, H. Meyer, D. Skvorc, A. Bär, P. Akhyari, A. Heisterkamp, A. Haverich, U. Martin, *Tissue Eng. Part C* **2011**, *17*, 463-473.

¹⁷ Review: S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, *Biomacromol.* **2011**, *12*, 1387-1408.

¹⁸ Reviews: a) K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869-1879, b) J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, 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.

¹⁹ a) M. Rinaudo, *Polym. Int.* **2008**, *57*, 397-430, b) 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, c) G. Dräger, A. Krause, L. Möller, S. Dumitriu, *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications, chapter 7: Carbohydrates*, Andreas Lendlein (Ed.), Wiley-VCH, **2011**.

Stoffwechselwege ausgeschieden werden. Ein weiterer Vorteil der Polysaccharide ist deren gute Wasserlöslichkeit. Durch chemische Vernetzung der Polymerstränge ist es zudem möglich, Konstrukte mit großen Molekülmassen herzustellen (Hydrogele). Diese Hydrogele sind wasserunlöslich, jedoch sehr hydrophil hochgradig wasserhaltig, sodass sich darauf kultivierte Zellen in einer wässrigen Umgebung befinden.

1.3.1 Alginat

Bei Alginat **3** handelt es sich um ein lineares Polymer aus β -D-Mannuronsäure- (M) und α -L-Guluronsäure Einheiten (G), die über 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind (Abbildung 2). Die verschiedenen Zuckerbausteine sind dabei in homophilen M beziehungsweise G-Regionen oder in gemischten MG-Regionen angeordnet, sodass Alginat als Block-Copolymer bezeichnet werden kann. Alginat kann entweder aus der marinen Braunalge isoliert oder bakteriell produziert werden und ist damit nicht-tierischen Ursprungs.²⁰

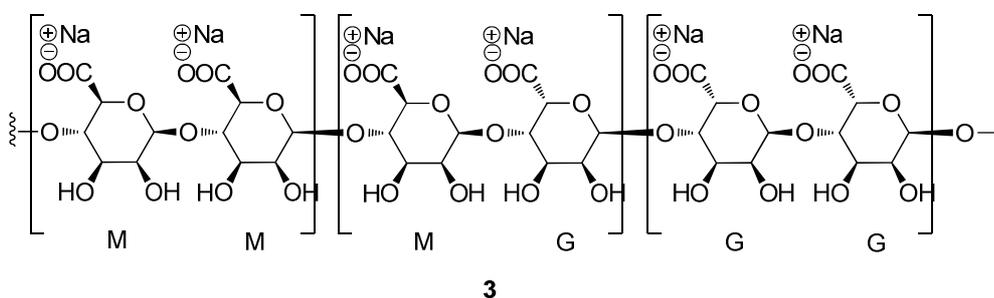


Abbildung 2: Chemische Struktur von Natrium-Alginat **3**.

Alginat bildet in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen, wie beispielsweise Calcium, Blei oder Kupfer, Hydrogele aus, indem je zwei Carboxylgruppen der α -L-Glukuronsäure-Einheiten von verschiedenen Polymersträngen an jedes Kation koordinieren.²¹ Zudem koordinieren weitere acht Sauerstoffatome von Alkoholen und Acetalen an das Kation, sodass eine sogenannte Eierkarton Struktur (*egg box*) entsteht (Abbildung 3, Koordination über fettgedruckte Sauerstoffatome).

²⁰ U. Remminghorst, B. H. A. Rehm, *Biotechnol. Lett* **2006**, 28, 1701-1712.

²¹ P. Sikorski, F. Mo, G. Skjåk-Bræk, B. T. Stokke, *Biomacromol.* **2007**, 8, 2098-2103.

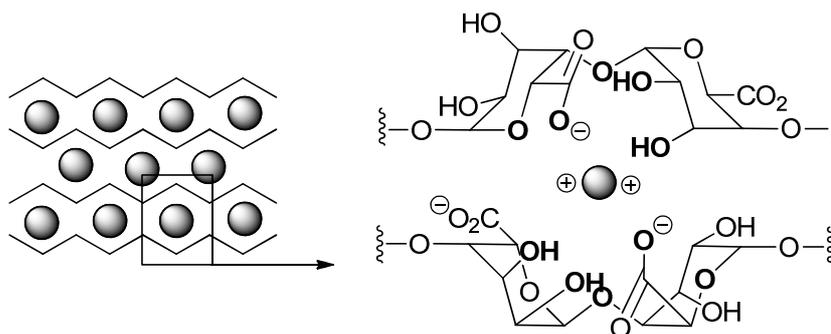


Abbildung 3: *egg box*-Modell der Gelierung von Alginate mit zweiwertigen Kationen nach SIKORSKI *et al.*²¹

Ein Problem bei der Verwendung dieser ionischen Gelierungsmethode im Bereich des *tissue engineering*s ist jedoch die Instabilität der Gele gegenüber Calcium-affinen Liganden (Phosphat, Zitrat, Laktat) oder gegenüber einwertigen Ionen (Na^+ oder K^+) sowie gegenüber zweiwertigen Ionen wie Mg^{2+} , die aufgrund ihrer geringen Größe nicht gleichzeitig an zwei Polymerstränge koordinieren können.²²

Aus diesem Grund wurden auch Strategien zur kovalenten Hydrogelierung von Alginate entwickelt. Beispielsweise wurde methacryliertes Alginate in Gegenwart von Knorpelzellen radikalisch vernetzt.²³ In einem weiteren Ansatz untersuchten LEE *et al.* die Vernetzung von Alginaten mit einem *Crosslinker*.²⁴ Zu diesem Zweck wurde die Diol-Einheit des Alginats unter C-C-Bindungspaltung zum entsprechenden Dialdehyd oxidiert und durch Zugabe von Adipinsäuredihydrazid hydrogeliert.

1.3.2 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure **4** (oder Hyaluronan) ist ein 1,4- beziehungsweise 1,3-verknüpftes Polymer bestehend aus *N*-Acetyl-D-glucosamin- und D-Glucuronsäure-Einheiten.²⁵ Abbildung 4 zeigt die Wasserstoffbrücken, die Hyaluronsäure in Dimethylsulfoxid ausbildet (rechts, gestrichelte Linien).²⁶ Indem sich Wassermoleküle in diese

²² Review: O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, *Trends Biotechnol.* **1990**, 8, 71-78.

²³ A. D. Rouillard, C. M. Berglund, J. Y. Lee, W. J. Polacheck, Y. Tsui, L. J. Bonassar, B. J. Kirby, *Tissue Eng.: Part C: Methods* **2011**, 17, 173-179.

²⁴ a) K. Y. Lee, K. H. Bouhadir, D. J. Mooney, *Macromol.* **2000**, 33, 97-101, b) K. Y. Lee, K. H. Bouhadira, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2004**, 25, 2461-2466.

²⁵ Review: a) L Lapčik Jr., L Lapčik, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2663-2684, b) I. Hargittai, M. Hargittai, *Struct. Chem.* **2008**, 19, 697-717.

²⁶ F. Heatley, E. Scott, *Biochem. J.* **1988**, 254, 489-493.

Wasserstoffbrücken platzieren, kann Hyaluronsäure große Mengen an Wasser speichern.

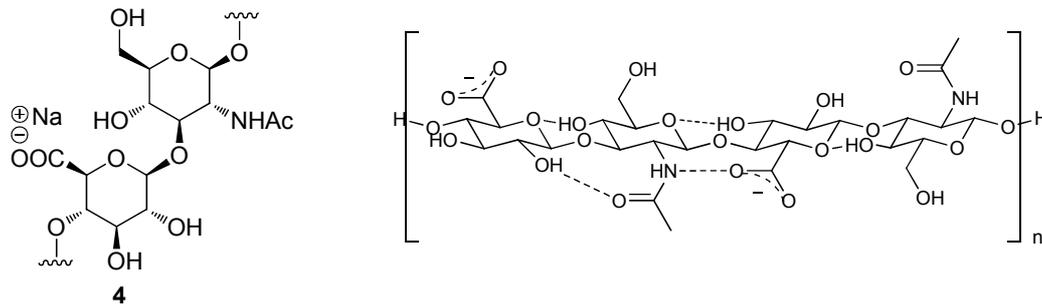


Abbildung 4: links: Chemische Struktur von Hyaluronsäure **4**, rechts: Wasserstoffbrückenbindungen von Hyaluronsäure in DMSO nach HEATLY *et al.*²⁶

Hyaluronsäure wird in Säugetieren von Hyaluronansynthetasen produziert und kommt hauptsächlich im Bindegewebe vor.²⁷ Für synthetische Anwendungen wird Hyaluronsäure bakteriell aus *Streptococcus equi* oder *Streptococcus zooepidemicus* gewonnen und ist damit, ebenso wie Alginat, nicht-tierischen Ursprungs.²⁸ Zudem kann Hyaluronsäure von Hyaluronidasen *in vivo* degradiert werden.²⁹ Die Hyaluronidasen sind in Bezug auf Abbaumechanismus und Arbeitsbedingungen eine sehr heterogene Klasse von Enzymen, die sich, abhängig von ihrer produzierenden Spezies, in drei Gruppen unterteilen lassen:³⁰ 1. aus Säugetieren, 2. aus Bakterien, 3. aus Blutegel.

Sofern Hyaluronsäure im Bereich *tissue engineerings* verwendet wird, muss der Abbau kontrolliert werden können, indem das Polymer chemisch verändert wird. Eine Möglichkeit dazu bietet die Veresterung der Säurefunktion, welche zu geänderten biologischen Eigenschaften des Polysaccharids führt.³¹

Zudem wurden verschiedene Ansätze zur Bildung von Hyaluronsäure-basierten Hydrogelen untersucht. So wurde beispielsweise von ŠOLTÉS *et al.* ein Konzept entwickelt, welches die Hydrogelierung von N-Acetylurea und β -Cyclodextrin

²⁷ Review: P. H. Weigel, V. C. Hascal, M. Tammi, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13997-14000.

²⁸ A. Shiedlin, R. Bigelow, W. Christopher, S. Arbabi, L. Yang, R. V. Maier, N. Wainwright, A. Childs, R. J. Miller, *Biomacromol.* **2004**, 5, 2122-2127.

²⁹ Review: R. Stern, M. J. Jedrzejewski, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 818-839.

³⁰ a) K. Meyer, M. M. Rapport, *Adv. Enzymol.* **1952**, 13, 199-236, b) Review: N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Šoltés, *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 1718-1745.

³¹ D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D. F. Williams, *Biomaterials* **1998**, 19, 2101-2127.

funktionalisierter Hyaluronsäure ermöglicht.³² Eine andere Hydrogelierungsstrategie basierend auf Thiol-funktionalisierter Hyaluronsäure wurde von PRESTWICH *et al.* beschrieben.³³ Durch Reduktion der Thioleinheiten zu den korrespondierenden Disulfiden oder durch Reaktion mit einem MICHAEL-Akzeptor als *Crosslinker*, kann das Polymer vernetzt werden. Eine weitere Variante der Hydrogelbildung ist die Kondensation von Aldehyden mit Hydraziden, die schon am Beispiel von Alginat besprochen wurde.³⁴

1.4 Die extrazelluläre Matrix und RGD-Peptide

Der interzelluläre Raum eines Gewebes wird als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet. Die Hauptbestandteile sind Proteoglycane, Kollagenfasern und Multiadhäsionsproteine, welche verschiedene Funktionen wie die Stabilisierung des Gewebes oder Steuerung von Zell-Zell sowie Zell-Matrix Interaktionen übernehmen.³⁵ Die Zusammensetzung der ECM und ihr prozentualer Anteil am Gewebe variiert von Organ zu Organ, abhängig von dessen Funktion im Körper.

Der Kontakt der Zellen mit ihrer Umgebung erfolgt über Zelladhäsionsproteine, die auf der Zellmembran lokalisiert sind.³⁵ Diese Zelladhäsionsproteine verfügen über drei Domänen. Die extrazelluläre Domäne steuert die Interaktion zur ECM oder zu anderen Zellen, indem spezifische Erkennungsfaktoren gebunden werden. Anschließend wird das dadurch ausgelöste Signal durch die transmembrane Domäne der Zelladhäsionsproteine ins Zellinnere zur intrazellulären (cytoplasmatischen) Domäne geleitet, wo verschiedene Kaskaden ausgelöst werden. Diese führen wiederum zu Prozessen in der Zelle, wie beispielsweise Wachstum, Vermehrung, Migration, Genexpression oder Zelltod.³⁶

³² a) L. Šoltés, R. Mendichi, G. Kogan, M. Mach, *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 468-472, b) L. Šoltés, R. Mendichi, *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*, 376-384, c) A. Charlot, A. Heyraud, P. Guenot, M. Rinaudo, R. Auzély-Velty, *Biomacromol.* **2006**, *7*, 907-913.

³³ a) X. Z. Shu, Y. Liu, F. S. Palumbo, Y. Luo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1339-1348, b) X. Z. Shu, Y. Liu, M. C. Roberts, G. D. Prestwich, *Biomacromol.* **2002**, *3*, 1304-1311, c) X. Z. Shu, Y. Liu, F. Palumbo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3825-3834, (d) X. Z. Shu, S. Ahmad, Y. Liu, G. D. Prestwich, *J. Biomed. Mat. Res. Part A* **2006**, *79*, 902-912.

³⁴ a) P. Bulpitt, D. Aeschlimann, *J. Biomed. Mat. Res.* **1999**, *47*, 152-169, b) X. Jia, G. Colombo, R. Padera, R. Langer, D. S. Kohane, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4797-4804.

³⁵ H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, J. Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin **2001**.

³⁶ *Reviews*: a) E. Zamir, B. Geiger, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3583-3590, b) D. A. Calderwood, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22607-22610.

Die Zelladhäsionsproteine werden in fünf Klassen eingeteilt: Cadherine, Immunoglobine, Selectine, Mucine und Integrine.³⁷ Im Rahmen dieser Arbeit werden hauptsächlich die Integrine beschrieben, welche sowohl für Zell-Zell als auch für Zell-Matrix Interaktion verantwortlich sind.³⁸ Es handelt sich dabei um Glycoproteine, die aus nicht-kovalent assoziierten α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind, wobei die α -Untereinheit deutlich schwerer ist als die β -Einheit. Insgesamt sind 24 $\alpha\beta$ -Heterodimere bekannt, die sich aus acht verschiedenen β -Einheiten und 18 verschiedenen α -Einheiten zusammensetzen (Abbildung 5). Unterteilt werden sie in vier Untergruppen, abhängig von ihren Erkennungsfaktoren (Liganden, farblich unterscheiden in Abbildung 5).

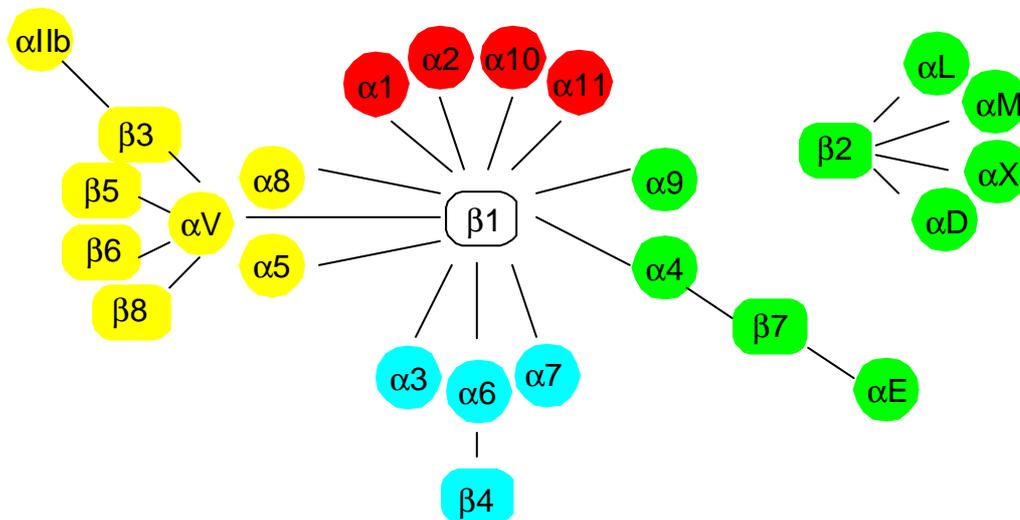


Abbildung 5: Die 24 $\alpha\beta$ -Heterodimere der Integrinfamilie nach HYES *et al.*:^{38a} eckig umrandet: β -Untereinheiten; rund umrandet: α -Untereinheiten; in vier Gruppen eingeteilt nach bindenden Liganden: rot: Kollagenrezeptoren ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$); grün: Leukozyt spezifische Rezeptoren ($\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha E\beta 7$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$, $\alpha D\beta 2$), blau: Laminin Rezeptoren ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$), gelb: RGD-Rezeptoren ($\alpha 8\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha 11\beta 3$).

Die vier verschiedenen Ligandenklassen, die von den Integrinen erkannt werden, sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Zell-Zell-Interaktionen werden beispielsweise von den Leukozyt-spezifischen Integrinen vermittelt (grün). Des Weiteren werden die Bestandteile der ECM Kollagen (rot), Lamin (blau) und Fibronectin (gelb) als Liganden von bestimmten Integrinen erkannt. Die Erkennungssequenzen sind dabei

³⁷ Review Immunobolin: K. Kuma, N Iwabe, T. Miyata, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 384-393, b) Review Cadherine: M. Takeichi, *Science* **1991**, 251, 1451-1455, c) Review Selektine: L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964-969, d) M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 45-60.

³⁸ a) Review: R. O. Hynes, *Cell* **2002**, 110, 673-687, b) M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311-340, c) M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, *Cell. Tiss. Res.* **2010**, 339, 269-280.

zumeist relativ kurz. Die erkannte Proteindomäne in Fibronectin weist beispielsweise eine drei Aminosäuren lange Einheit auf (RGD, Abbildung 6).³⁹ Zwar kommt diese Aminosäuresequenz auch in Kollagen oder Laminin vor, jedoch ist sie in der nativen Form der Proteine für die RGD-Rezeptor-haltigen Integrine (gelb) zumeist sterisch nicht zugänglich.⁴⁰ In Kollagen dient dagegen die Aminosäuresequenz GFOGER als Erkennungseinheit (O = Hydroxyprolin).⁴¹

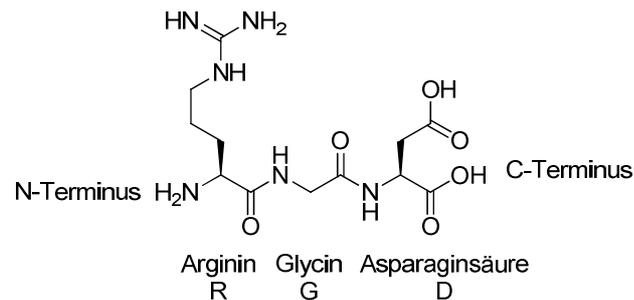


Abbildung 6: RGD-Erkennungseinheit.

Die α -Einheit der Integrine besteht aus einer transmembranen und einer großen extrazellulären Domäne, welche wiederum einen Abstandshalter (*spacer*) sowie eine β -Propeller genannte Einheit besitzt. In neun der insgesamt 18 bekannten α -Einheiten (αL , αM , αX , αD , αE , α1 , α2 , α10 , α11) befindet sich, lokalisiert am β -Propeller, eine αI -Domäne welche etwa 200 Aminosäuren lang und für die Bindung des jeweiligen Liganden (Kollagen oder Leukozyt) verantwortlich ist. LEE *et al.* fanden dabei heraus, dass die Bindung durch Koordination der Metallionen anhängigen Adhäsionsdomäne der Integrine (MIDAS) an bivalente Metallionen (Mg^{2+}) verläuft.⁴² Bei den Integrinen, welche keine α -Einheit mit einer αI Domäne tragen, verläuft die Bindung des Liganden über eine entsprechende βI -Einheit.⁴³ Die Koordination eines

³⁹ M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, 309, 30-33.

⁴⁰ G. E. Davis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 182, 1025-1031.

⁴¹ a) C. Graham Knight, L. F. Morton, D. J. Onley, A. R. Peachey, A. J. Messent, P. A. Smethurst, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale, M. J. Barnes, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 33287-33294, b) W. Zhang, J. Kapyla, J. S. Puranen, C. G. Knight, C. F. Tiger, O. T. Pentikainen, M. S. Johnson, R. W. Farndale, J. Heino, D. Gullberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7270-7277.

⁴² J. O. Lee, L. A. Bankston, M. A. Arnaout, R. C. Liddington, *Structure* **1995**, 3, 1333-1340.

⁴³ a) J. O. Lee, P. Rieu, M. Amin Arnaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, 80, 631-638, b) J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. Amin Arnaout, *Science* **2001**, 294, 339-345.

Liganden an ein Zelladhäsionsprotein wurde von XIONG *et al.* am Beispiel des Integrins $\alpha V\beta 3$ und einem RGD-Peptid untersucht.⁴⁴

Nachdem das RGD-Peptid an die extrazelluläre Domäne des Integrins gebunden hat, läuft im Zellinneren eine Signalkaskade ab, die zur Adhäsion der Zelle führt (*outside-in-signaling*).³⁶ Es findet jedoch auch eine Integrin-vermittelte Signaltransduktion vom Inneren der Zelle nach außen statt, um die Bindungsaffinität der Integrine zu regulieren (*inside-out-signaling*).⁴⁵

Da RGD-Peptide die Adhäsion von Zellen auslösen können, wurden in den vergangenen Jahrzehnten viele Oberflächen mit diesen Erkennungsfaktoren funktionalisiert, um biomimetische Materialien zu erzeugen.⁴⁶ In gleichem Maße wurden jedoch auch die Vor- und Nachteile dieser kurzen, zumeist synthetisch hergestellten Peptide im Vergleich zu den natürlichen Proteinen als Ligand für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion kontrovers diskutiert.⁴⁷ Trotzdem wurden zahlreiche Ligationsstrategien entwickelt, die es ermöglichten natürliche oder künstliche Oberflächen mit RGD-Peptiden zu dekorieren, um bio-intelligente Substrate für den Einsatz in der regenerativen Medizin zu erhalten.^{3,46,48}

Obwohl auch die in Abbildung 6 gezeigte lineare, Aminosäuresequenz von verschiedenen Integrinen erkannt wird, wurden unter anderen von HAUBNER *et al.* verschiedene zyklische RGD-Pentapeptide des Typs c(RGDXX) hinsichtlich ihrer Affinität zu $\alpha V\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$ -Integrinen untersucht.⁴⁹ Es konnte gezeigt werden, dass eine aromatische Aminosäure an Position 4 (c(RGDXX)) aufgrund von hydrophober Interaktionen mit dem Integrin zu einer Steigerung der Affinität führte. Die Aminosäure an Position 5 spielt dagegen keine Rolle für die Struktur-Aktivitäts-Beziehung. Zudem konnte gezeigt werden, dass zyklische

⁴⁴ J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, 296, 151-155.

⁴⁵ S. Honda, H. Shirogami-Ikejima, S. Tadokoro, Y. Maeda, T. Kinoshita, Y. Tomiyama, T. Miyata, *Blood* **2009**, 113, 5304-5313.

⁴⁶ Review: Ulrich Hersel, Claudia Dahmen, Horst Kessler, *Biomaterials* **2003**, 24, 4385-4415.

⁴⁷ D. F. Williams, J. H. Collier, T. Segura, S. L. Bellis, T. H. Barker, A. Ratcliffe, *Biomaterials* **2003**, 32, 4195-4217.

⁴⁸ A) Reviews: P. Schaffner, M. M. Dard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 119-132, b) A. Meyer J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 2723-2747.

⁴⁹ a) R. Haubner, R. Gratiás, B. Diefenbach, S. L. Goodman, Al. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461-7472, b) S. Verrier, S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard, J. Amédée, *Biomaterials* **2002**, 23, 585-596.

RGD-Peptide mit einer D-Aminosäure in Position 4 konformativ besser in die Bindungstasche des Integrins passen als ihre *all-L* Analoga.

1.5 Plasmachemie

Um die für die biologische Interaktion maßgebliche Oberfläche eines Materials zu verändern, kann auf eine Plasmabehandlung zurückgegriffen werden. Plasma wird häufig als vierter Aggregatzustand der Materie bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen elektrisch neutralen Gasstrom, der aus gegensätzlich geladenen Teilchen besteht. Die Theorie der Plasmaerzeugung und die Beschreibung der molekularen Vorgänge im Plasma wurde bereits in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.^{50,51,52} Die Generierung von Plasmen beruht darauf, dass in jedem Gas ein gewisser Anteil der Teilchen ionisiert vorliegt. Diese werden anschließend durch Anlegen starker elektrischer Felder oder Einstrahlung thermischer Energie beschleunigt, sodass es zu Stößen zwischen Elektronen, Ionen und Neutralteilchen (im Grundzustand oder im angeregten Zustand) kommt, die wiederum geladene Spezies erzeugen.

Generell liegen im Plasma sowohl Elektronen als auch Schwerteilchen in Form von Atomen, Molekülen und Ionen vor. Die leichten und daher schnellen Elektronen erreichen dabei im Gegensatz zu den Schwerteilchen eine hohe Temperatur. Je nach von außen zugeführter Energie kann es nun sowohl zu elastischen als auch zu unelastischen Stößen zwischen beiden Spezies kommen. Bei elastischen Stößen wird ausschließlich kinetische Energie von den Elektronen auf die Schwerteilchen übertragen, sodass es zu Ionisationsprozessen kommen kann. Im Gegensatz dazu, findet bei unelastischen Stößen zusätzlich ein Wärmeaustausch statt, indem kinetische Energie in innere Energie umgewandelt wird.

Abhängig von der Art der Stoßprozesse, werden zwei Arten von Plasma unterschieden. Zum einen das heiße Plasma (*near-equilibrium-plasma*), zum anderen das kalte Plasma (*non-equilibrium-plasma*). Charakteristisch für heißes Plasma sind viele elastische Stöße, die dazu führen, dass sich die Temperatur von

⁵⁰ Review: C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmaison, P. Leprince, *Spectrochim. Acta, Part B* **2006**, 61, 2-30.

⁵¹ Review: F. S. Denes, Sorin Manolache, *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 815-885

⁵² Review: H. Conrads, M Schmidt, *Plasma Sources Sci. Technol.* **2000**, 9, 441-454.

Elektronen und Schwerteilchen stark annähert.⁵³ Zudem liegt die Ionisationsrate bei fast 100%. Im Gegensatz dazu weichen im kalten Plasma die Temperaturen von Elektronen und Schweratomen stark voneinander ab. Es finden vorwiegend unelastische Stöße statt, die eine Ionisationsrate von etwa 10^{-4} -10% verursachen.⁵¹

Ein Plasma kann sowohl bei Atmosphärendruck als auch in einer evakuierten Kammer erzeugt werden. Der Vorteil von Atmosphärendruck gegenüber Niederdruckplasma liegt dabei in der *in-line*-Fertigung bei industriellen Prozessen. So kann ein zu bearbeitendes Substrat direkt dem Plasmaprozess ausgesetzt und wieder entnommen werden, ohne Zeit und Energie in die Evakuierung der Reaktionskammer zu investieren.

Niederdruckplasmen sind den kalten Plasmen zuzuordnen. Mit steigendem Druck nimmt der Anteil an elastischen Stößen zu, der zu einer Erwärmung der Schwerteilchen führt, sodass sich das Plasma dem *near-equilibrium*-Zustand annähert.⁵⁰

Wird nun ein Substrat einem Plasmastrom ausgesetzt, kann es durch die angeregten oder geladenen Teilchen des Plasmas zu Reaktionen auf der Oberfläche kommen. Die auf der Oberfläche erzeugten Stoffklassen sind dabei anhängig von Substrat, Plasmabedingungen und von dem für die Plasmaherstellung verwendeten Gas (Ionisationsgas). DE GEYTER *et al.* untersuchten beispielsweise den Einfluss des Ionisationsgases bei der Behandlung der Oberfläche von Polymilchsäure mit einem kalten Plasma.⁵⁴ Es wurden Luft-, Stickstoff-, Argon- und Heliumplasmen generiert, die jeweils verschiedene Reaktionen auf der Oberfläche auslösten. Es konnte durch Kontaktwinkelmessungen gezeigt werden, dass bei allen verwendeten Gasen die Hydrophilie der Oberfläche zunahm. Nach Luftplasmabehandlung konnte mittels Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) ein deutlich gesteigener Sauerstoffanteil auf der Oberfläche beobachtet werden. Nach der Stickstoffplasmabehandlung konnte zudem die Bildung von funktionellen Gruppen nachgewiesen werden, die Stickstoff enthalten. Weitere Oxidations- oder Aminierungs-/Amidierungsprozesse, ausgelöst durch sauerstoff- beziehungsweise stickstoffhaltiges Plasma wurden von SIOW *et al.* zusammengefasst.⁵⁵

⁵³ a) R. W. Smith, D. Wei, D. Apelian, *Plasma Chem. Plasma Process.* **1989**, 9, 135S-165S, b) X. Chen, E. Pfender, *Plasma Chem. Plasma Process.* **1983**, 3, 351-366.

⁵⁴ N. De Geyter, R. Morent, T. Desmet, M. Trentesaux, L. Gengembre, P. Dubruel, C. Leys, E. Payen, *Surf. Coat. Technol.* **2010**, 204, 3272–3279.

⁵⁵ Review: K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser, *Plasma Processes Polym.* **2006**, 3, 392-418.

Außerdem wurde der Einfluss von Ammoniakplasma auf Polyethylen- sowie verschiedene Polyesterfilme eingehend untersucht.⁵⁶ Durch Behandlung des Kohlenwasserstoffs mit einem Ammoniakplasma in einer Wasserstoffumgebung konnten primäre Amine auf der Oberfläche generiert werden.

Neben den durch Plasmachemie erzeugten Substanzklassen auf verschiedenen Polymeren, wurde auch die Morphologie der behandelten Oberflächen untersucht. MORENT *et al.* beobachteten durch Rasterkraftmikroskopie (AFM) die Oberflächenstruktur von Polypropylenfilmen vor und nach einer Stickstoffplasmabehandlung.⁵⁷ Es konnte gezeigt werden, dass eine zuvor glatte Oberfläche nach der Plasmabehandlung deutliche Inhomogenitäten im Nanometer-Bereich aufwies. Dies war, den Autoren zu Folge, auf einen Ätzungsprozess zurückzuführen, der besonders amorphe Regionen des Polymers stark angriff.

Zudem wurde die zelluläre Besiedlung von Plasma-behandelten Oberflächen untersucht. WANG *et al.* berichteten dabei von einer gesteigerten Proliferation von Hunde-Knochenmarkszellen auf Poly(3-hydroxybutyrat-co-hydroxyvalerat) (PVBV) nach Sauerstoff oder Stickstoffplasmabehandlung.⁵⁸ Weitere Anwendungen von Plasmachemie in der Medizin, wie zum Beispiel die Sterilisation von Geräten oder lebendem Gewebe wurden von FRIDMAN *et al.* zusammengefasst.⁵⁹

1.6 Magnetische Wirkstofftransporter

Ein großes Problem in der medikamentösen Behandlung von Krankheiten sind Nebenwirkungen, die durch Wechselwirkungen des Wirkstoffs mit gesundem Gewebe hervorgerufen werden. Dies spielt besonders bei der Krebstherapie eine entscheidende Rolle, bei der hochwirksame Substanzen mit inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀-Werte) im nanomolaren Bereich eingesetzt werden.

Beispiele für solche hochwirksamen Antitumorwirkstoffe sind die erstmals von den Forschern der TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD beschriebenen, mikrobiell

⁵⁶ a) K. Narushima, M. Fukuoka, H. Kawai, N. Inagaki, Y. Isono, M. R. Islam, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, *46*, 7855-7857, b) K. Narushima, N. Yamashita, M. Fukuoka, N. Inagaki, Y. Isono, M. R. Islam, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, *46*, 4238-4245.

⁵⁷ R. Morent, N. De Geyter, L. Gengembre, C. Leys, E. Payen, S. Van Vlierberghe, E. Schacht, *Eur. J. Appl. Phys.* **2008**, *43*, 289-294.

⁵⁸ Y. Wang, L. Lu, Y. Zheng, X. Chen, *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *76a*, 589-595.

⁵⁹ Review: G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, A. Fridman, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 503-533.

produzierten Ansamitocine **5a-5e** aus *Actinosynnema pretiosum* (Abbildung 7).⁶⁰ Diese weisen ein 19-gliedriges Macrolactam-Grundgerüst auf und zeigen eine hohe strukturelle Verwandtschaft mit den aus Pflanzen isolierten Maytansinoiden.⁶¹ Sie unterscheiden sich voneinander durch die verschiedenen Ester-Seitenketten an C3.

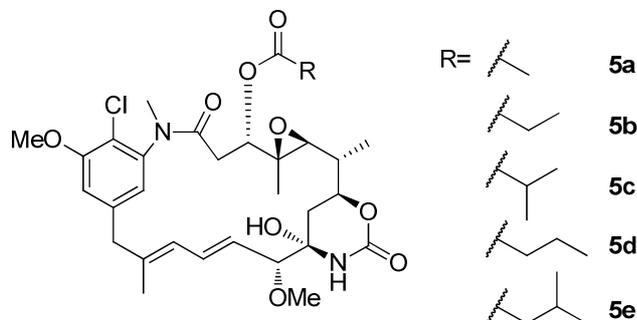


Abbildung 7: Struktur der Ansamitocine **5a-5e**.

Ansamitocine zeigen schon im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-7} $\mu\text{g/mL}$ eine pharmakologische Wirkung gegen Leukämie Zelllinien sowie gegen solide Tumore bei Menschen.⁶² Die Wirkstoffe inhibieren die Verdrillung der Tubulin Proteine zu Mikrotubuli, sodass der Spindelapparat während der Mitose nicht ausgebildet werden kann und so eine Zellteilung verhindert wird.⁶³ Trotz ihrer hohen antimitotischen Aktivität scheiterten klinische Studien zum therapeutisch Einsatz von Ansamitocinen als Antitumorwirkstoffe in Phase II aufgrund von gastrointestinalen Nebenwirkungen sowie der Neurotoxizität des Wirkstoffes.⁶⁴ Aus diesem Grund wurden Derivate des Naturstoffes sowohl auf totalsynthetischem wie auch auf mutasynthetischem Weg synthetisiert, um die Aktivität des Wirkstoffes zu modulieren.⁶⁵ Außerdem sollte mit diesen nicht natürlichen Derivaten die Struktur-Aktivitäts-Beziehung (*structure-activity-relationship*, SAR) der Ansamitocine untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass Substituenten und Substitutionsmuster am Aromaten nicht essentiell für die Wirksamkeit des Antitumorwirkstoffes sind, sodass besonders an diesen Positionen

⁶⁰ a) E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino, M. Yoneda, *Nature* **1977**, 270, 721-722; b) M. Asai, E. Mizuta, M. Izawa, K. Haibara, T. Kishi, *Tetrahedron* **1979**, 35, 1079-1085.

⁶¹ Review: J. M. Cassady, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1-26.

⁶² F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1057-1060.

⁶³ S. Remillard, L. I. Rebhun, G. A. Howie, Sm. M. Kupchan, *Science* **1975**, 189, 1002-1005.

⁶⁴ a) J. T. Thigpen, C. E. Ehrlich, W. T. Creasman, S. Curry, J. A. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 273-275; b) J. T. Thigpen, C. E. Ehrlich, J. Conroy, J. A. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 427-430; c) M. J. Ravry, G. A. Omura, R. Birch, *Am. J. Clin. Oncol.* **1985**, 8, 148-150.

⁶⁵ A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch., *C. R. Chimie* **2008**, 11, 1523-143.

derivatisiert und funktionalisiert werden kann.⁶¹ Es wurden beispielsweise Disulfid-verbundene Ansamitocin-Folsäure Konjugate synthetisiert, die aufgrund der tumoraffinen Eigenschaften der Folsäure bevorzugt von Krebszellen aufgenommen werden sollten, sodass eine lokal adressierte Wirkstoffverabreichung erreicht wurde.⁶⁶ Nach Internalisierung des Konjugats konnte letztlich der Wirkstoff durch Disulfidspaltung unter den reduzierenden, intrazellulären Bedingungen freigesetzt werden.

Ein alternativer Zugang zu tumoradressierten Wirkstoff-*Carrier* Konjugaten, stellt die Ligation von pharmakologisch aktiven Substanzen an magnetische Nanopartikel dar. Hierbei können die Nanopartikel, nach Injektion in den Blutstrom, durch ein externes Magnetfeld an ihrem Bestimmungsort konzentriert werden (Abbildung 8). Der Wirkstoff kann von dem Nanopartikel anschließend entweder diffusionskontrolliert, enzymatisch oder durch veränderte physiologische Bedingungen an seinem Bestimmungsort freigesetzt werden.⁶⁷

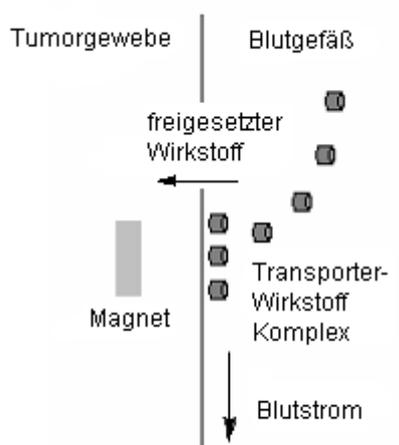


Abbildung 8: Illustration des magnetischen Wirkstofftransports nach Pankhurst *et al.*⁶⁷

Die Rahmenbedingungen für ein solches Konstrukt wurden bereits 1978 von SENYEI *et al.* wie folgt definiert:⁶⁸

1. Der Durchmesser der Nanopartikel sollte weniger als 1.4 μm betragen, damit diese auch Kapillargefäße ungehindert passieren können.

⁶⁶ J. A. Reddy, E Westrick, H. K. R. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzel, I. Vlahov, R. V.J. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**; 67, 6376-6382.

⁶⁷ Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R167-R181.

⁶⁸ A. Senyei, K. Widder, G. Czerlinski, *J. Appl. Phys.* **1978**, 49, 3578-3583.

2. Die Partikel sollten adäquate magnetische Eigenschaften besitzen, um auch unter physiologischen Bedingungen magnetisch dirigiert werden zu können.
3. Die Partikel sollten mit einer Vielzahl chemischer Wirkstoffe funktionalisiert werden können.
4. Eine kontrollierte Ablösung des Wirkstoffs von seinem Trägermaterial sollte ausschließlich an seinem Bestimmungsort stattfinden und von außen steuerbar sein.
5. Die Oberfläche der Partikel sollte eine gute Bioverträglichkeit zeigen um keine Trägermaterial-induzierten Nebenwirkungen auszulösen.
6. Sowohl Trägermaterial als auch Wirkstoff sollten biologisch ausgeschieden werden können, wobei die Abbauprodukte eine hohe Biokompatibilität aufweisen sollten.

Derartige Substanz-*Carrier* Konstrukte wurden unter anderem von CHEN *et al.* beschrieben, die Eisenpartikel mit Doxorubicin **6** beschichteten und in poröse Kieselgelhüllen eingekapselten (Abbildung 9).⁶⁹ Diese Konstrukte erfüllten jedoch nicht den Anspruch einer induzierten Ablösung des Substrats, da der *release* lediglich diffusionskontrolliert erfolgte.

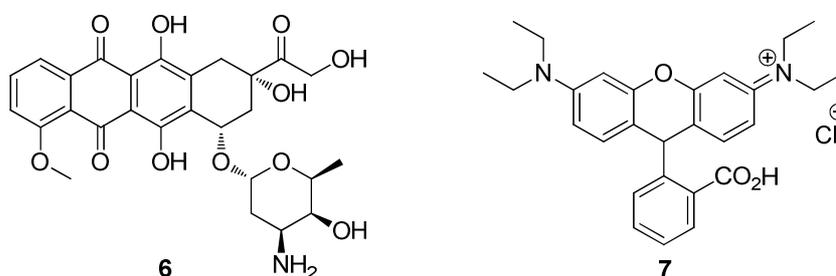


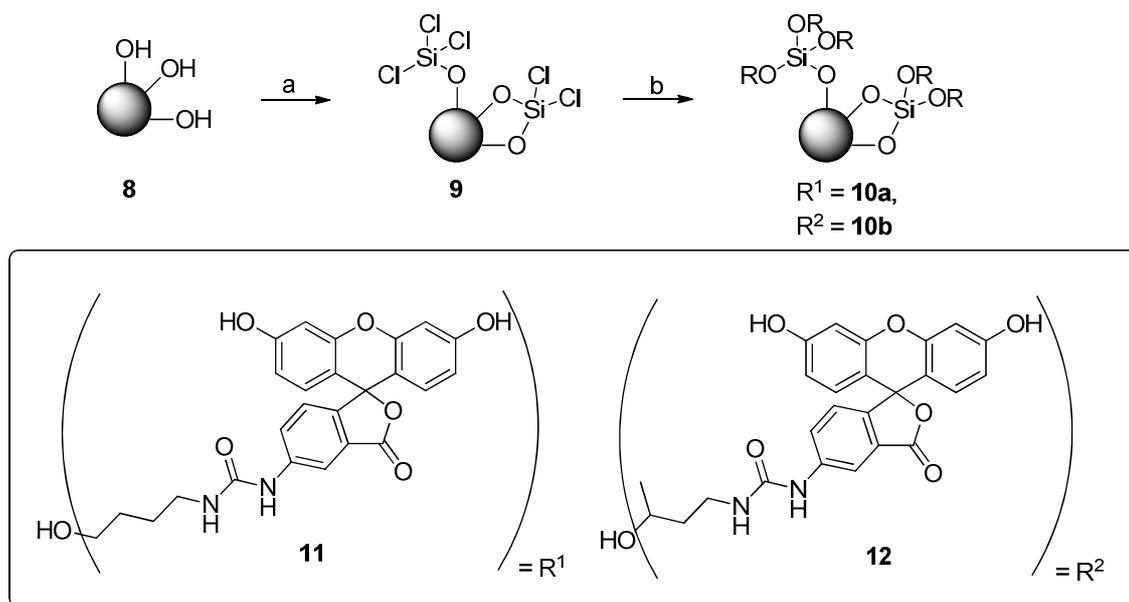
Abbildung 9: Strukturen von links: Doxorubicin **6**, rechts: Rhodamin B **7**.

Ein Ansatz der Arbeitsgruppe BINNEWIES beruht auf der Anbindung von Wirkstoffen an Magnetit-Partikel über Silyletherbindungen (Schema 1).⁷⁰ Die Partikel konnten nach erfolgter magnetischer Direktion durch Hydrolyse den Wirkstoff freisetzen. S. SANDVOSS konnte anhand der Fluoresceine **11** und **12** als Modellsubstanzen zeigen, dass der Wirkstoff zeitlich verzögert und in Anhängigkeit von der Salzkonzentration sowie der Temperatur der Umgebung abgespalten

⁶⁹ F. H. Chen, L. M. Zhang, Q. T. Chen, Y. Zhang, Z. J. Zhang, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8633-8635.

⁷⁰ T. Giesenberg, S. Hein, M. Binnewies, G. Kickelbick, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5816-5819.

wurde.⁷¹ Zudem hatte der sterische Anspruch der Modellsubstanz einen Effekt auf die Konjugationsdauer von Partikel und Wirkstoff (Schema 1).



Schema 1: Funktionalisierung von Magnetit-Partikeln mit den Fluoresceinen **11** und **12** als Modelle von magnetisch dirigierbaren Wirkstofftransportern. a) SiCl_4 , b) **11** oder **12**.

THOMAS *et al.* stellten im Gegensatz dazu mesoporöse Eisenoxid-Nanopartikel mit Kieselgelbeschichtung her, die unter thermischer Energiezufuhr, induziert durch ein oszillierendes magnetisches Feld, einen vorher eingeschlossenen Wirkstoff freisetzen.⁷² Als Modellsubstanzen dafür wurde ebenfalls Doxorubicin **6** sowie Rhodamin B **7** gewählt (Abbildung 9), welche sich bei einer induzierten Temperatur von 83 °C nach 27 Minuten vollständig ablösten.

Als Nebeneffekt bei einer Temperatur-gesteuerten Ablösung von Wirkstoffen kann zudem Erwärmung des umgebenden Gewebes auf 42-43 °C auftreten (Hyperthermie). Dieser Effekt kann bei der Behandlung von Tumoren vorteilhaft sein. GILCHRIST *et al.* beschrieben erstmalig den Hyperthermie-Effekt zur Behandlung von Tumoren.⁷³ Seitdem wurden verschiedene Techniken entwickelt, die zumeist auf

⁷¹ S. Sandvoss, Dissertation, Leibniz Universität Hannover **2010**; Fluoresceine wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, vergleiche Experimenteller Teil und I. Dubey, G. Prativel, B. Meunier, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 627-632.

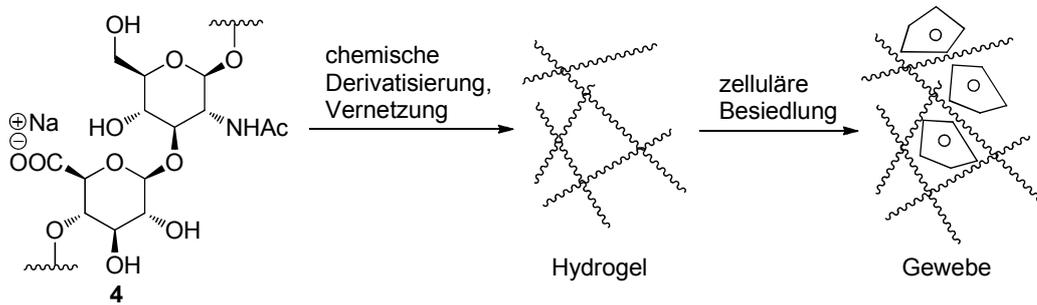
⁷² C. R. Thomas, D. P. Ferris, J. H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, F. Stoddart, J. S. Shon, J. Cheon, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10623-10725.

⁷³ R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, C. B. Taylor, *Ann. Surg.* **1957**, *146*, 596-606.

Variation des magnetischen Materials oder der Methode zur Erhitzung selbiger beruhen.⁷⁴

⁷⁴ Review: P. Moroz, S. K. Jones, B. N. Gray, *J. Surg. Oncol.* **2001**, 77, 259–69.

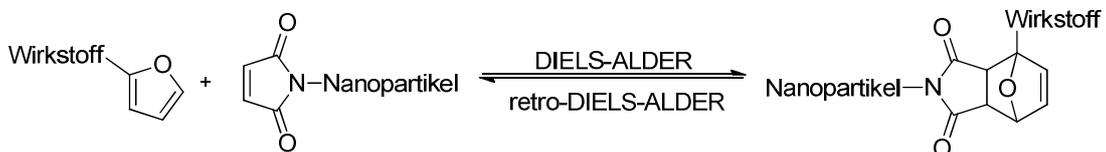
Polymere und der Hydrogelierungsprozess als auch die Abbaubarkeit der Gele sollen dabei untersucht werden.



Schema 2: Funktionalisierung der Hyaluronsäure **4** für Anwendungen im Bereich des *tissue engineering*s.

Im dritten Teil soll ein magnetisches Wirkstofftransporter-System (*drug release*) basierend auf MagSilica[®]-Nanopartikeln entwickelt werden. Konzeptionell soll ein Wirkstoff über einen thermolabilen Linker an die Partikel gebunden werden und nach Injektion in den Patienten magnetisch in dem zu behandelnden Gewebe lokalisiert werden. Durch induktives Heizen der Partikel soll anschließend der Wirkstoff freigesetzt werden. Diese thermoreversible Sequenz soll dabei eine DIELS-ALDER beziehungsweise retro-DIELS-ALDER Reaktion zwischen einem elektronenreichen Furan und einem elektronenarmen Maleimid darstellen (Schema 3).

Im Rahmen einer *proof-of-principle* Studie wird die Synthese der beiden Bausteine, die Anbindung an die Nanopartikel und die thermisch induzierte DIELS-ALDER beziehungsweise retro-DIELS-ALDER-Reaktion an der festen Phase untersucht.



Schema 3: DIELS-ALDER und retro-DIELS ALDER -Reaktion zwischen Furan und Maleimid zur Konjugation von Nanopartikel und Wirkstoff im Rahmen eines *drug release* Systems.

3 Kovalente Funktionalisierung von Polymethylpenten mit RGD-Peptiden

3.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Polymethylpenten-Folien (PMP), welche in Membranen von externen Lungenventilatoren Verwendung finden, mit zyklischen RGD-Peptiden (Arg-Gly-Asp) funktionalisiert werden, um eine Besiedelung mit Endothelzellen zu ermöglichen. Die RGD-Peptide fungieren als Erkennungssequenz für die in der Zellmembran lokalisierten Integrine (Kapitel 1.4). Dabei induziert das Ringsystem eine Konformation der biologisch aktiven Aminosäuren RGD, die die Zellbindung im Vergleich mit linearen RGD-Peptiden erleichtert. Durch die Bewachsung mit Lungenendothelzellen sollte ein hämokompatibles Material entstehen, das bei den mit der Lungenmaschine behandelten Patienten zu einer geringeren Immunantwort führen soll als die derzeit verwendeten PMP-Membranen. Auf diese Weise kann Blockierung der Membranen durch Blutkoagulate verhindert werden und so die Belastung für den Patienten sinken sowie die Lebensdauer des Geräts deutlich erhöht werden.⁹ Letzteres führt wiederum zu einer Reduktion der Behandlungskosten.

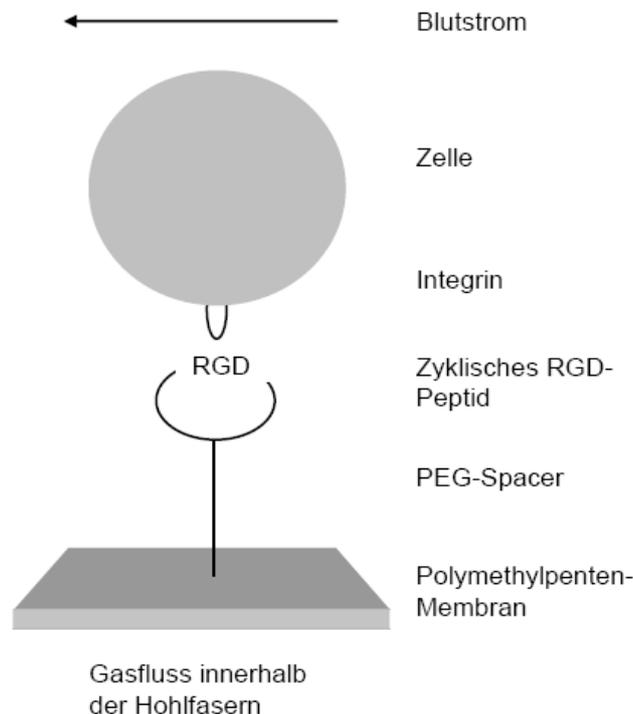
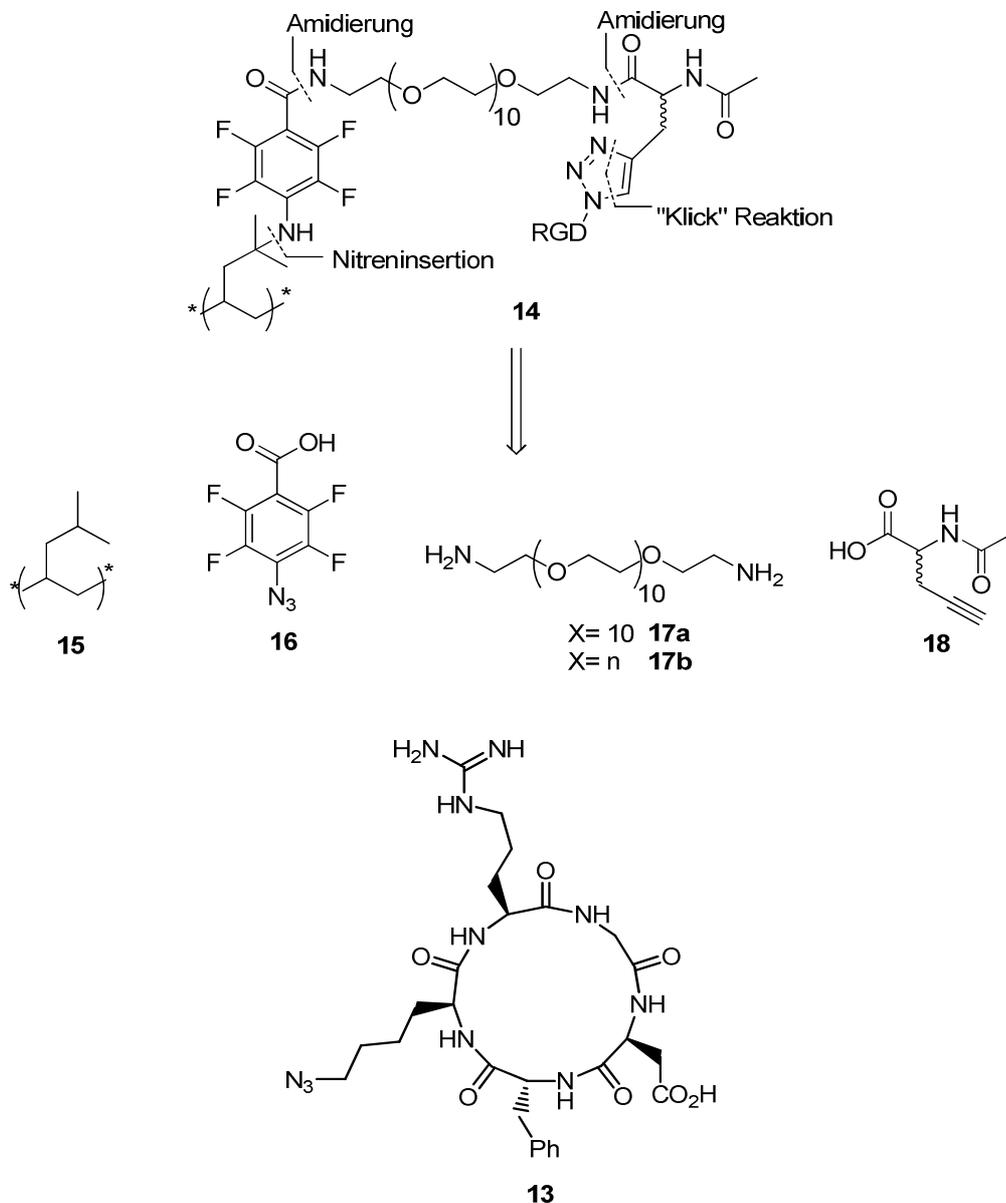


Abbildung 11: Genereller Aufbau zur Oberflächenfunktionalisierung vom PMP mit RGD-Peptiden und anschließender Bewachsung mit Endothelzellen.

Das Konzept zur Funktionalisierung der polymeren PMP-Membran ist in Abbildung 11 dargestellt. Dabei sollte zunächst ein *spacer* an die Oberfläche der Hohlfaser gebunden werden und dieser anschließend mit dem in Schema 4 gezeigten RGD-Peptid funktionalisiert werden. Die gekoppelte, biologisch aktive RGD-Sequenz sollte wiederum von auf der Membran kultivierten Endothelzellen erkannt werden, sodass diese auf dem Material adhären können. In der Anwendung der so modifizierten Membran in Oxygenatoren würde es nun zu keinem Kontakt zwischen Blut und Membran mehr kommen. Abstoßungsreaktionen sowie Ablagerungen auf den Hohlfasermatten könnten verhindert werden.



Schema 4: Retrosynthese der Dekoration von Polymethylpenten mit RGD-Peptiden.

Die Retrosynthese der funktionalisierten PMP-Membran ist in Schema 4 gezeigt. Hierzu sollte zunächst der fluorierte Azidaromat **16** synthetisiert und mit Polyethylenglycoldiamin **17** über eine Amidbindung gekuppelt werden.⁷⁵ Anschließend sollte der aus **16** und **17** bestehende Baustein durch eine Nitreninsertion an die PMP-Folie **15** gebunden werden. Das Nitren sollte wiederum durch Bestrahlung mit UV-Licht aus dem fluorierten Phenylazid generiert werden. Azid **16** wurde verwendet, da durch den sehr elektronenarmen Aromaten eine Ringerweiterungsreaktion zum Heptazyklus vermieden werden kann.⁷⁵ Die Nitreninsertion als Ligationsmethode zwischen Linker und Polymer wurde gewählt, da es sich bei dem für die Oxygeneratoren verwendeten Membranen um unfunktionalisierte Kohlenwasserstoffgerüste handelt. Der Zugang zu synthetischen Derivaten eines solchen Polymers ist daher stark eingeschränkt. Erschwerend kommt hinzu, dass kaum olefinische Restfunktionalität, die durch nicht vollständige Polymerisation im Polymer enthalten sein könnte, mittels Infrarot (IR)-Spektroskopie nachzuweisen war. Die Nitreninsertion schien harsch genug zur Funktionalisierung eines Kohlenwasserstoffs, wobei am Polymer selber kein Schaden zu erwarten war. Ein solches Problem würde zum Beispiel bei Reaktionen auftreten, die Temperaturen über 100 °C erfordern, da PMP nur eine geringe Temperaturtoleranz aufweist.

Durch die Hydrophilie des über die Nitreninsertion gebundenen Polyethylenglycol-*spacers* sollte sichergestellt werden, dass der Linker nicht in das hydrophobe Polymermaterial einsinken kann und somit sterisch unzugänglich für weitere Derivatisierungen wird. Außerdem sollte der *spacer* einen Abstand zwischen Polymer und RGD-Peptid generieren, und dieses somit gut zugänglich für die Integrine der Lungenzellen halten.

Die folgenden Reaktionen zur Kupplung des RGD-Peptides sollten direkt am Polymer durchgeführt werden.⁷⁶ Im Gegensatz zu einer Synthese in Lösung entfallen so aufwendige Aufarbeitungen und Reinigungen der Produkte. Das freie Amin des Polyethylenglycol-*spacers* sollte mit 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** zum Amid umgesetzt werden. Die Alkinfunktionalität dieser Aminosäure sollte im Folgenden als Bindungspartner für das azidfunktionalisierte, zyklische RGD-Peptid **13** dienen. Die

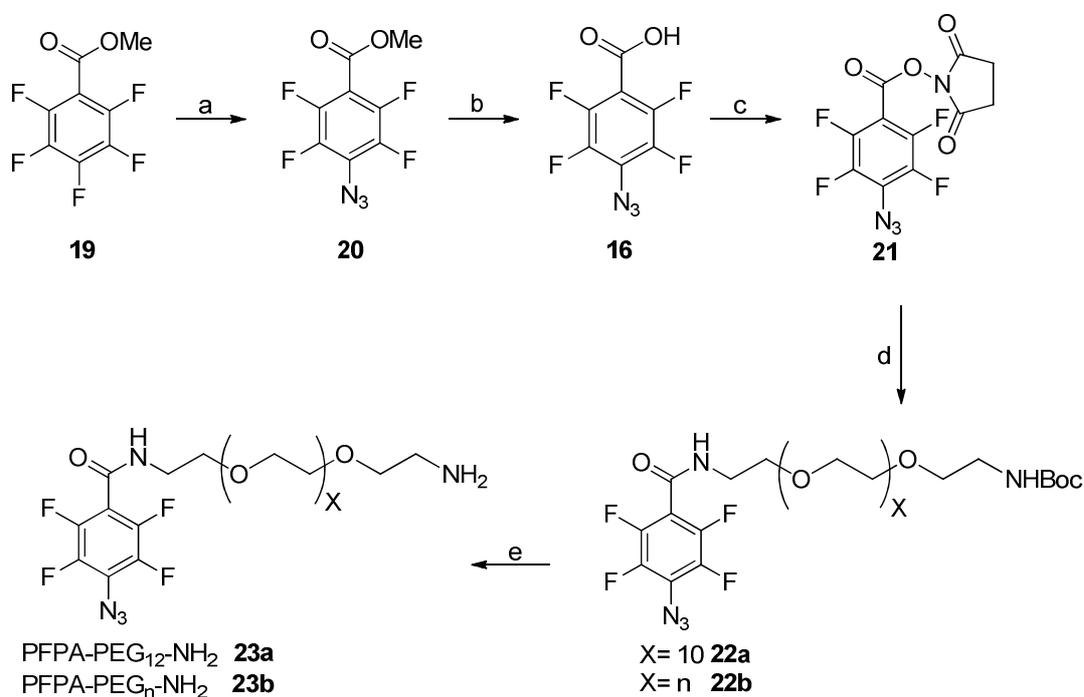
⁷⁵ a) J. F. W. Keana und S. X. Cai *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640-3647 b) M. Yan *React. Funct. Polym.* **2000**, *45*, 137-144.

⁷⁶ C[RGDfK(N₃)] wurde von J. Paleček bereitgestellt und nach J. Paleček, G. Dräger, A. Kirschning, *Synthesis* **2011**, *4*, 653-661 synthetisiert.

Kupplung zwischen beiden Komponenten sollte durch eine 1,3-dipolare Zykoaddition erfolgen.

3.2 Synthese des fluorierten Phenylazids und Nitreninsertion

Das fluorierte Phenylazid PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**, welches im Folgenden als Linker für die Anbindung von RGD-Peptiden an Kohlenwasserstoffpolymere dienen sollte, wurde entsprechend der Synthese von YAN *et al.* aus Pentafluorbenzoesäuremethylester **19** hergestellt (Schema 5).⁷⁵ Dazu wurde dieser zunächst mit Natriumazid zum 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorbenzoesäuremethylester **20** umgesetzt und anschließend durch Zugabe von Natronlauge hydrolysiert.



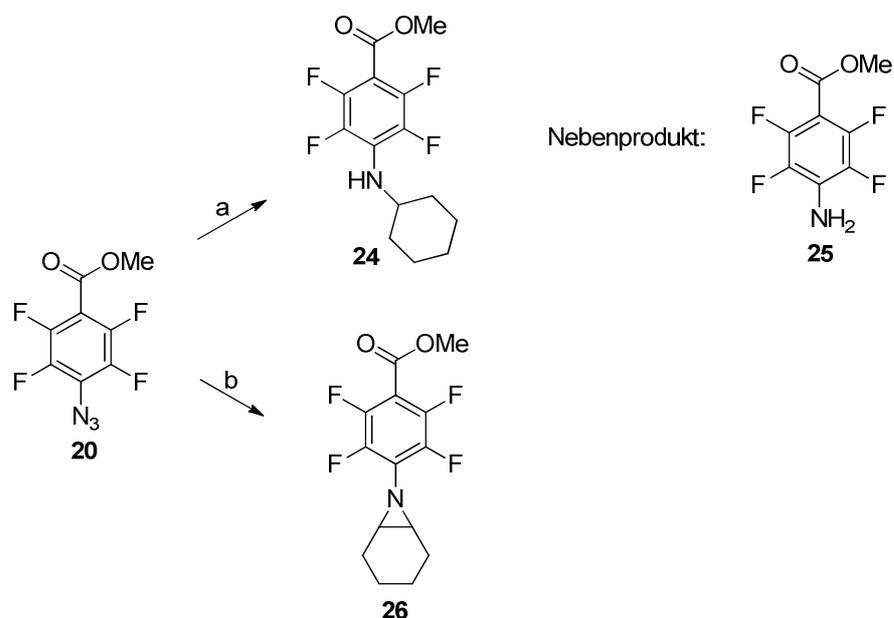
Schema 5: Synthese von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** bzw. PFPA-PEG_n-NH₂ **23b**. a) NaN₃, Aceton/H₂O, Δ, 8 h, 85%, b) NaOH, MeOH/H₂O, RT, 25 h, 96%, c) NHS, DCC, CH₂Cl₂, RT, 25 h, 89%, d) NH₂-PEG₁₂-NHBoc, CHCl₃, RT, 12 h, 92%, e) 10 % HCl, EE, RT, 1 h, quant.

Nach Reaktion mit Dicyclocarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) wurde Aktivester **21** in einer Ausbeute von 89% erhalten. Anschließend wurde einfach Boc-geschütztes Polyethylenglycol₁₂amin nach Vorschrift von KEANA *et al.* an Aktivester **21** gekuppelt.⁷⁵ Alternativ wurde auch ein Polyethylenglycolamin mit einem Molekulargewicht um 3000 Da verwendet, um den Einfluss der Linkerlänge auf die Oberflächenchemie sowie auf die biologische Aktivität der finalen, RGD-funktionalisierten Konstrukte zu studieren. Zuletzt wurde von beiden

verwendeten Linkern **22a** und **22b** mit 10%iger Salzsäure die Boc-Schutzgruppe entfernt, wobei das AminoPEGylierte Fluorophenylazid PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** beziehungsweise PFPA-PEG_n-NH₂ **23b** freigesetzt wurden.

Zur Untersuchung der Nitreninsertion wurden zunächst Modellreaktionen durchgeführt, die sowohl die Generierung des reaktiven Nitrens als auch die Insertion in eine CH-Bindung nachweisen sollten. Zu diesem Zweck wurde 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorbenzoesäuremethylester **20**, welches als Zwischenprodukt in der Synthese zu PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** auftritt, mit Cyclohexan umgesetzt. Auf diese Weise sollte sowohl die Effektivität der Nitreninsertion wie auch die optimale Reaktionsführung untersucht werden.

Wie bereits von KEANA *et al.* beschrieben, konnte Insertionsprodukt **24** in einer Ausbeute von 41% isoliert werden (Schema 6).⁷⁵ Für die Reaktion wurde dabei der Reaktand Cyclohexan als Lösungsmittel verwendet und eine Niederdruck-Quecksilberlampe als Lichtquelle eingesetzt. Bei der Bestrahlung wurde neben dem Insertionsprodukt auch das dem Azid entsprechende Amin **25** gebildet. KEANA *et al.* berichteten zusätzlich von einer Dimerisierung der Aromaten über eine Diazobrücke. Diese Substanz konnte jedoch unter den in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

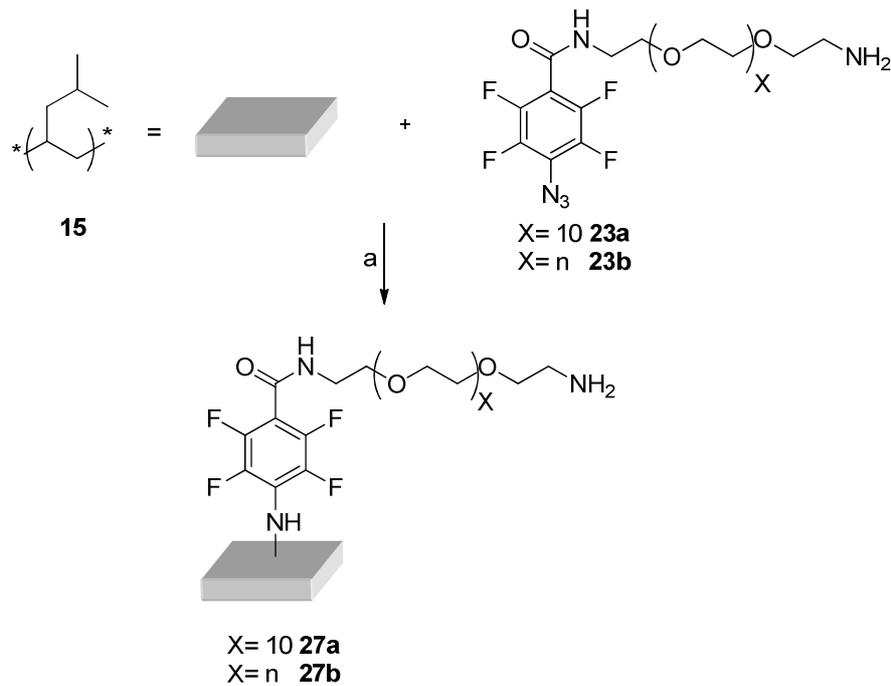


Schema 6: Modellreaktion zwischen 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoessäuremethylester **20** und Cyclohexan beziehungsweise Cyclohexen zum Nachweis von Nitreninsertionen/addition fluorierter Phenylazide. a) Cyclohexan, UV, 5 h, 41%, b) Cyclohexen, UV, 3 h, 47%.

Des Weiteren wurde eine Modellreaktion zwischen 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorbenzoesäuremethylester **20** und Cyclohexen durchgeführt, um die Auswirkungen einer Behandlung mit einem reaktiven Azid auf ungesättigte Systeme zu studieren (Schema 6). Dies könnte, für den Anteil an olefinischer Restfunktionalität, die durch nicht vollständige Polymerisation im PMP-Polymer vorhanden sein könnte, von Relevanz sein. Da jedoch mittels IR-Spektroskopie keine solche Restfunktionalität nachgewiesen werden konnte, spielte das Ergebnis dieser Modellstudie verglichen mit der Insertion am gesättigten System eine untergeordnete Rolle.

Im Gegensatz zu der in Schema 6 gezeigten Insertion des Azids wurde bei dem ungesättigten System ausschließlich die Nitrenaddition statt einer Nitreninsertion beobachtet. Additionsprodukt **26** wurde dabei in einer Ausbeute von 47% erhalten (Schema 6).

Anschließend wurden die aus den Modellreaktionen gewonnenen Erkenntnisse auf die Funktionalisierung von PMP **15** übertragen. Zu diesem Zweck wurden die PMP-Folien, wie in Schema 7 dargestellt, einer Nitreninsertion unterzogen. Dazu wurden sie in einer methanolischen Lösung von **23a** oder **23b** mit einer Konzentration von 10 mg/mL über Nacht inkubiert und anschließend getrocknet. Durch Bestrahlung mit einer Quecksilber-Lampe im ultravioletten Bereich (UV) wurde aus Azid **23a** beziehungsweise **23b** das entsprechende Nitren generiert, welches *in situ* in die CH-Bindung des Polymers **15** insertierte. Während dieser Reaktion befanden sich die PMP-Folien in einem evakuierten Quarzglasröhrchen, sodass der während der Reaktion gebildete Stickstoff ständig entfernt wurde. Unter Normaldruck war im Gegensatz dazu keine Reaktion zu beobachten.



Schema 7: Insertion von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** bzw. PFPA-PEG_n-NH₂ **23b** in PMP **15**. a) hv, RT, 3 h.

3.3 XPS-Analysen

Da die klassischen Analysemethoden der organischen Chemie (NMR, Masse, etc.) bei polymeren Materialien nicht einsetzbar sind, wurden die modifizierten Oberflächen mittels Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) untersucht. Dabei wird die zu analysierende Probe mit Röntgenstrahlen beschossen, sodass es zu Ionisationsprozessen der inneren Elektronen der auf der Oberfläche befindlichen Elementen kommt. Die kinetische Energie der Elektronen wird anschließend in einem konzentrischen Halbkugelanalysator detektiert und so die Bindungsenergien der Elektronen in ihrem jeweiligen Orbital berechnet. Anhand dieser Werte kann die elementare Zusammensetzung der Oberfläche bestimmt werden. Da die kinetische Energie der emittierten Elektronen nicht nur von ihren Ursprungselementen abhängt, sondern auch von der funktionellen Gruppe in der sich letztere befinden, kann nach XPS-Analyse auch eine Aussage über die Art der Substanzklassen auf der Oberfläche getätigt werden.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die kinetischen Energien der Elektronen aus den C1s, O1s und N1s Orbitalen bei verschiedenen Bindungsarten. Diese wurden am Beispiel von Plasma-behandelten Polypropylenoberflächen gemessen.⁷⁷ XPS

⁷⁷ S. Guimond, I. Radu, G. Czeremuskin, D. J. Carlsson, M. R. Wertheimer, *Plasmas Polym.* **2002**, 7, 71-88.

liefert zudem über die Integration der einzelnen Peaks das genaue Mengenverhältnis der Elemente zueinander.

Tabelle 1: Kinetische ($E_{kin.}$)- und Bindungsenergien (BE) von Elektronen aus C1s, O1s und N1s Orbitalen bei verschiedenen Substanzklassen (MgK α -Strahlung).

	BE [eV]	$E_{kin.}$ [eV]	Substanzklasse
C1s	285.0	968	C-H, C-C
	285.9	967.1	C-N, C-O
	286.7	966.3	C \equiv N
	287.6	965.4	N-C=O, C=O
	288.9	964.1	N-CO-N, O-C-O
O1s	531.5	721.5	N-C=O,
	532.7	720.3	C-O, C=O
N1s	399.2	853.8	C-N
	400.5	852.5	N-C=O, C=N, C \equiv N

Um eine chemische Veränderung der Oberfläche nachzuweisen, musste zunächst die unbehandelte PMP-Membran **15** untersucht werden. Im Folgenden konnten so Rückschlüsse auf die entstandenen Substanzklassen auf der Oberfläche durch Interpretation der Verschiebung der Signale relativ zur unbehandelten Oberfläche gezogen werden. Die Zuordnung erfolgt über den Vergleich mit Literaturdaten (Tabelle 1). Die Integration der Peaks ermöglicht zudem eine Quantifizierung von gebundenen Elementen und Stoffklassen. Dabei wurde das Kohlenstoffsignal als interner Standard verwendet.

3.2.1 XPS-Analyse: unbehandeltes PMP

Zunächst wurde unbehandeltes PMP mittels XPS untersucht, um die späteren, chemischen Veränderungen auf der Oberfläche durch Vergleich mit den Messwerten der unbehandelten Oberfläche nachzuweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass auf reinem PMP ausschließlich Kohlenstoff (C1s, um $E_{kin.}$ = 970 eV, BE 284 eV) und Sauerstoff (O1s, um $E_{kin.}$ = 720 eV, BE 534 eV) nachzuweisen waren (Abbildung 12). Der besonders hohe Kohlenstoffgehalt der Oberfläche ist darauf zurückzuführen, dass das Polymergrundgerüst ein Kohlenwasserstoff darstellt. Wasserstoff ist aufgrund seiner geringen Masse nicht durch XPS detektierbar.

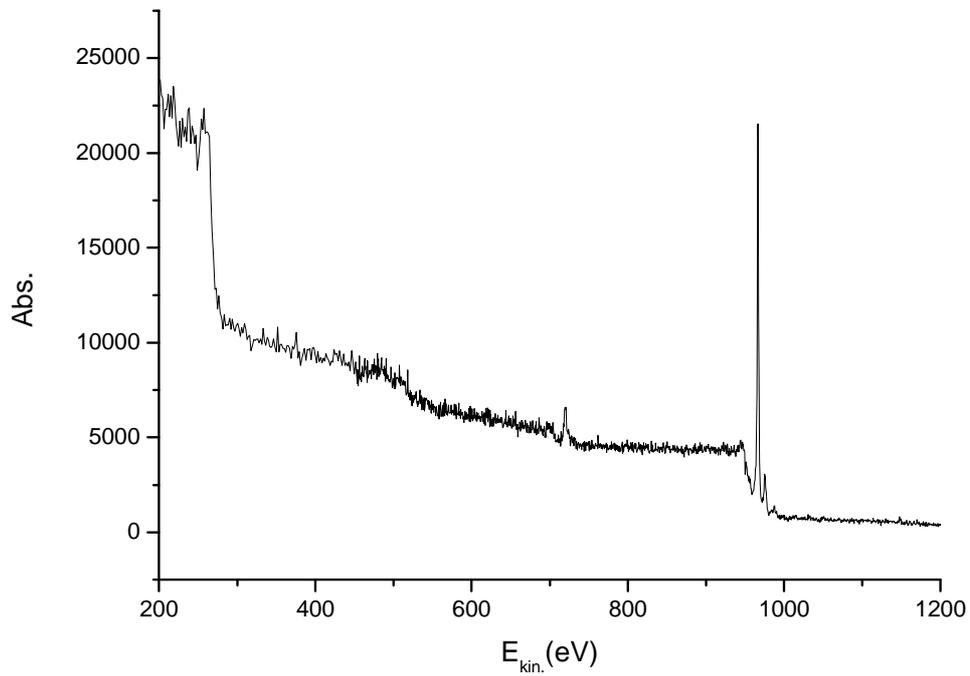


Abbildung 12: Gesamt XP-Spektrum von unbehandeltem PMP; Pass-Energie: 100 eV.

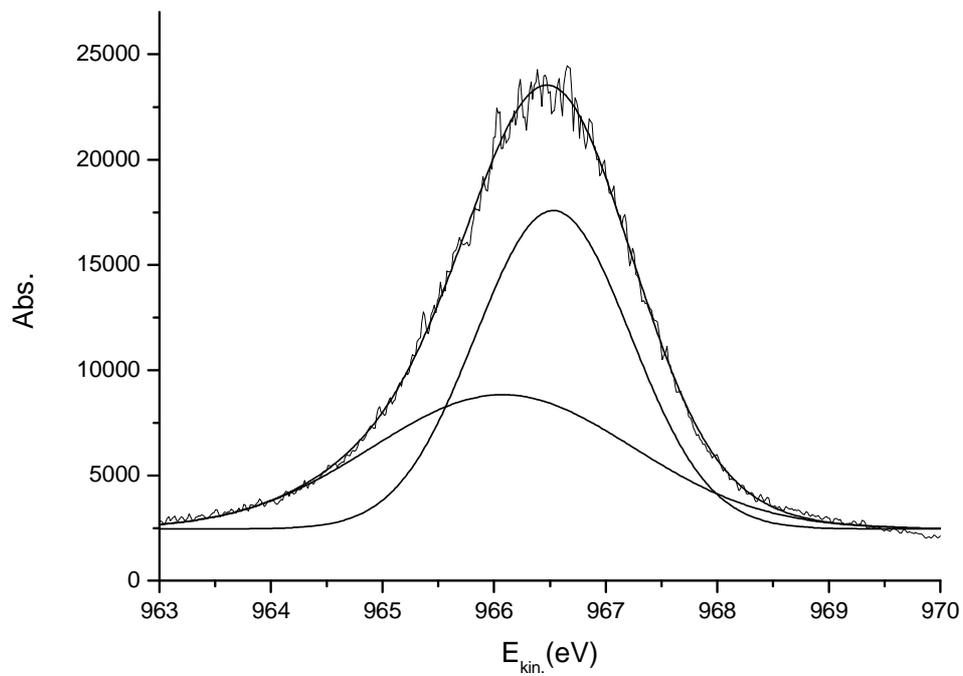


Abbildung 13: Hocharauflösung des Kohlenstoffpeaks von unbehandeltem PMP; Pass-Energie: 100 eV.

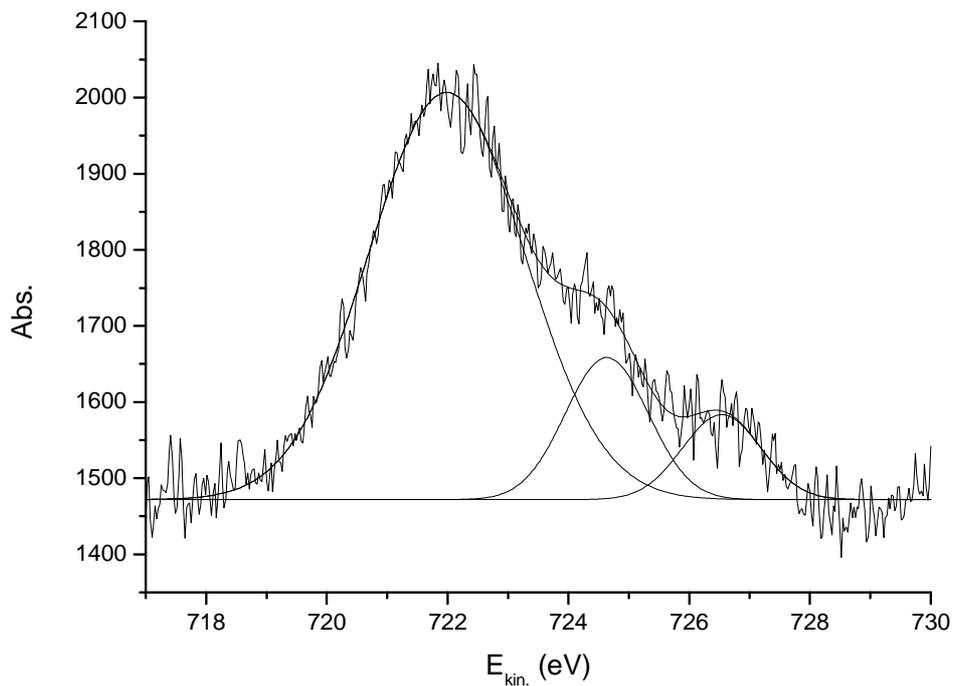


Abbildung 14: Hochoflösung des Sauerstoffpeaks von unbehandeltem PMP; Pass-Energie: 50 eV.

Der Sauerstoffgehalt der unbehandelten Oberfläche ist dagegen nicht durch die chemische Struktur des Polymers zu begründen. Allerdings wurde von MORENT *et al.* beschrieben, dass auch Folien aus Polypropylen einen geringen Sauerstoffanteil aufweisen.⁷⁸ Dieser resultierte nach Angaben des Herstellers aus einer Corona Vorbehandlung des Polymers, die in geringem Maße zu einer Oxidation der Oberfläche führte. Die Integration von Kohlenstoff- und Sauerstoffpeak ergab für PMP ein Verhältnis der Elemente von 18:1.

Abbildung 13 zeigt eine Hochoflösung des Kohlenstoffpeaks bei einer Pass-Energie von 100 eV. Es sind sowohl der geglättete Kurvenverlauf als auch die für die Rohdaten optimierten Gausskurven dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Rohdaten gut durch zwei überlappende Gausskurven interpretieren lassen. Dieses legt die Vermutung nahe, dass neben dem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffgrundgerüst, welches ausschließlich C-H und C-C Bindungen aufweist, noch mindestens eine weitere Bindungsart des Kohlenstoffs auf der Oberfläche

⁷⁸ R. Morent, N. De Geyter, L. Gengembre, C. Leys, E. Payen, S. Van Vlierberghe, E. Schacht, *Eur. J. Appl. Phys.* **2008**, 43, 289-294.

vorliegt. Die Maxima der beiden Gausskurven liegen bei $E_{\text{kin.}} = 967 \text{ eV}$ (BE 286 eV) für die C-H bzw. C-C Bindungen sowie bei $E_{\text{kin.}} = 966 \text{ eV}$ (BE 287 eV). Ein Vergleich mit den Literaturdaten aus Tabelle 1 ergibt, dass es sich bei letzteren um C-O Einfachbindungen wie zum Beispiel von Alkoholen oder Ethern handeln könnte. Carbonylgruppen zeigen im Vergleich zu C-O Einfachbindungen Absorptionen bei geringeren kinetischen Energien, ihre Existenz kann jedoch aufgrund der nur geringen Energiedifferenz nicht ausgeschlossen werden. C-N Bindungen treten dagegen nicht auf, da sonst auch ein korrelierender Stickstoffpeak auf der Oberfläche zu beobachten wäre.

Eine detaillierte Untersuchung des Sauerstoffpeaks konnte ebenfalls durchgeführt werden. Die Kurve ließ sich durch drei überlagernde Gausskurven beschreiben, die Maxima bei $E_{\text{kin.}} = 722 \text{ eV}$ (BE 531 eV), $E_{\text{kin.}} = 725 \text{ eV}$ (BE 528 eV) und $E_{\text{kin.}} = 727 \text{ eV}$ (BE 526 eV) aufwiesen (Abbildung 14). Ein Vergleich mit den Literaturwerten ergab, dass dieses Spektrum um etwa 1-2 eV zu geringeren kinetischen Energien verschoben ist. Dies ist damit zu begründen, dass das Polymer PMP ein Nichtleiter ist, das XP-Spektrometer jedoch auf leitende Proben wie Metalle kalibriert wurde.⁷⁹ Da jedoch ausschließlich Kohlenstoff und Sauerstoff auf der Oberfläche nachzuweisen waren, ist der Sauerstoff vermutlich in C-O oder C=O Gruppen gebunden.

3.2.2 XPS-Analyse: Nitreninsertion

Nachdem die unbehandelte Oberfläche XP-spektroskopisch analysiert worden war (Kapitel 3.2.1), wurde die Nitreninsertion von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** in PMP analog zu Schema 7 durchgeführt. Die Analyse erfolgte erneut über XP-Spektroskopie. Es konnte gezeigt werden, dass auf der Oberfläche kein Linker insertiert wurde, da weder Fluor noch Stickstoff nachzuweisen waren (Abbildung 15). Lediglich die schon auf der unbehandelten Oberfläche beobachteten C1s und O1s Peaks wurden detektiert. Zudem wurden zwei nicht zuzuordnende Peaks bei $E_{\text{kin.}} = 1097 \text{ eV}$ (BE 156 eV) und $E_{\text{kin.}} = 1149 \text{ eV}$ (BE 104 eV) detektiert, die auf eine leicht kontaminierte Oberfläche hindeuten.

⁷⁹ F. Leisenberger, R. Duschek, R. Czupata, F. P. Netzer a, G. Beamson, J. A. D. Matthew, *Appl. Surf. Sci.* **1997**, *108*, 273-281.

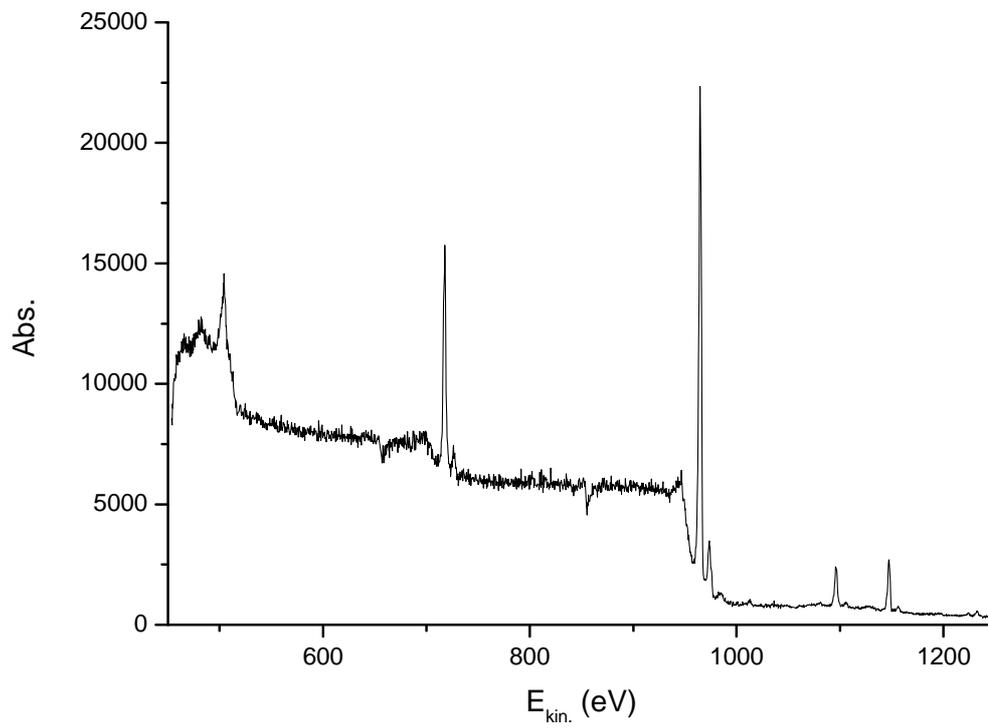


Abbildung 15: XP-Gesamtspektrum von PMP ohne Plasma-Behandlung, nach Linkerinsertion; Pass-Energie: 150 eV.

3.4 Plasma-Behandlung von PMP

Da eine Linkerinsertion von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** in das unbehandelte PMP-Polymer (analog zu Schema 7) nicht eindeutig nachzuweisen war, wurde eine Fehleranalyse der Insertionsreaktion durchgeführt. Bei der Inkubation des Polymers mit der Linker-Lösung wurde beobachtet, dass die Membran nur schlecht von der methanolischen Lösung benetzt werden konnte. Vielmehr schwamm das Polymer auf dem polaren Lösungsmittel ohne in dieses einzutauchen. Diese Beobachtung wurde durch die Messung des Kontaktwinkels (107°) bestätigt, welcher in Korrelation mit der chemischen Struktur ein stark hydrophobes Polymer nachwies. Der Polyethylenglycol-*spacer* hat dagegen eine hydrophile Struktur, sodass sich vermuten lässt, dass eine Abstoßung zwischen Polymer und *spacer* vorliegt, die eine Insertionsreaktion erschweren oder verhindern könnte.

Aus diesem Grund wurden Möglichkeiten evaluiert die Hydrophilie der Oberfläche des Polymers zu erhöhen. Als geeignete Methode erschien dabei die Plasmachemie, da durch die Behandlung von Polymeren mit einem Plasmastrahl oxidative Prozesse ausgelöst werden können (s. Kapitel 1.5). Abhängig von den verwendeten Bedingungen und dem zu behandelnden Material können so unter anderem C-O und C-N- Bindungen erzeugt werden, die zu einer stärkeren Polarität des Materials führen.

Im Hinblick auf eine spätere industrielle Anwendung, schien dabei der Einsatz von atmosphärischem Plasma besonders vielversprechend, da ein zeit- und kostenintensives Evakuieren der Plasmakammer entfällt und die Plasma-vorbehandlung direkt im „Rolle-zu-Rolle“-Verfahren durchgeführt werden kann. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Geräten der Firma *Plasmatreat*, Steinhagen (Deutschland) gearbeitet, welche sich auf die Herstellung von Atmosphärendruck-Plasmaanlagen spezialisiert hat.⁸⁰

Dazu gehörten ein Generator FG 5001, ein Transformator HTR12 L133 und ein Verfahrtschiff PT 60. Der Aufbau entspricht dem serieller Prozesse, wird in einem Patent von FÖRNSEL *et al.* beschrieben und ist in Abbildung 16 gezeigt.⁸¹

⁸⁰ <http://www.plasmatreat.de> (Zugriff am 04.12.11)

⁸¹ P. Förnsel, C. Buske, U. Hartmann, A. Baalman, G. Ellinghorst, K. D. Vissing, US-Patent-Nr. 6,800,366 B1, 2004.



Abbildung 16: Plasmaanlage für Atmosphärendruckplasma mit verschiedenen Düsen; 1: Temperaturregulator Verdampfungseinheit *Precursor*; 2: Temperaturregulator Trägergas; 3: Pumpe; 4: Gasdurchflussmesser für Gase, für die die Verdampfungseinheit nicht beständig ist; 5: Gasdurchflussmesser Trägergas; 6: Gasdurchflussmesser Ionisationsgas; 7: Vorratsgefäß für *Precursor*; 8: Ionisationsgaseinlass; 9: Trägergaseinlass; 10: Transformator; 11: Verfahrtsch; 12: kleine Düse 23073 mit Aufsatz 23074; 13: rotierende Düse RD 1004 mit Aufsatz 10157; 14: Stellrad zur Regulation des Substrat-Plasmadüse-Abstands; 15: Stellrad für horizontale Justierung der Plasmadüse; 16: Substrathalter.

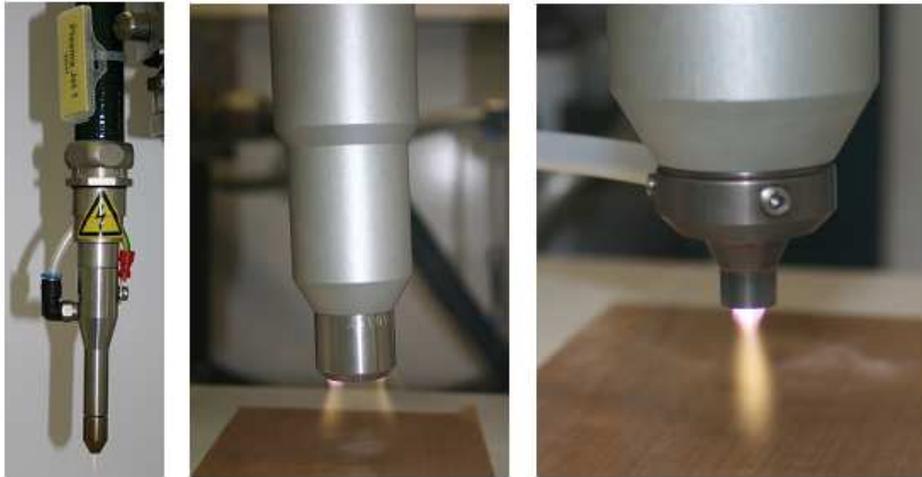


Abbildung 17: Verschiedene Düsen zur Generierung von Atmosphärendruckplasma; links: kleine, statische Düse für Ionisationsgasströme von etwa 500 L/h; Mitte: Rotationsdüse für Ionisationsgasströme von etwa 3000 L/h für großflächige Plasma-Behandlungen; rechts: statische Düse für Ionisationsgasströme von etwa 3000 L/h mit *Precursor*-Zustrom.

Die Plasmadüse wurde abhängig von der Art des erzeugten Plasmas gewählt. Dabei wurde für niedrige Ionisationsgasströme die Düse 23073 mit dem Aufsatz 23074 verwendet (Abbildung 17links). Für intensive Plasmaströme mit einer hohen Ionisationsgasmenge wurde die Düse RD1004 genutzt. Dabei wurde für große zu behandelnde Flächen eine rotierende Plasmadüse (Typennummer: 10157) eingesetzt (Abbildung 17Mitte) und, sofern ein *Precursor* dem Plasma zugesetzt werden sollte, eine statische Düse (Typennummer: 19328) (Abbildung 17rechts). In diesem Fall wurde der *Precursor* aus einer Verdampfeinheit direkt in die Düse geleitet. Die Verdampfeinheit bestand wiederum aus einer Pumpe, die den betreffenden *Precursor* aus einem Vorratsbehälter in das Gerät einleitete, und einer beheizbaren Kammer, in der der *Precursor* auf bis zu 250 °C erhitzt werden konnte. Durch ein zugeleitetes und vorgewärmtes Trägergas konnte der *Precursor* nun in die Düse transportiert werden.

3.4.1 Plasmamodifizierungen mit Druckluftplasma

Um die Oberfläche von PMP mittels Plasmachemie zu modifizieren, musste zunächst ein geeignetes Prozessfenster ermittelt werden, das einen möglichst hohen Funktionalisierungsgrad des Polymers erlaubt ohne die Oberfläche zu deformieren. Die Plasmamodifizierung darf keine thermischen Verformungen hervorrufen, da sonst die Gasdurchlässigkeit verringert werden könnte, die für die Anwendung des Polymers in Lungenmaschinen obligatorisch ist. Die Erzeugung von Löchern würde

zudem dazu führen, dass sich Blut- und Gasstrom in der künstlichen Lunge mischen, sodass die Funktion des Geräts erheblich gestört würde. Trotzdem muss die Plasmamodifizierung zu einer erheblichen Steigerung der Hydrophilie des Polymers führen, um dieses für weitere, chemische Funktionalisierungen zugänglich zu machen.

Genauere Untersuchungen sollten es ermöglichen, die Plasmaintensität mit der hervorgerufenen Funktionalisierung und der als Begleiterscheinung aufgetretenen Deformation der PMP-Folien in Zusammenhang zu bringen. Darum wurde PMP zunächst verschiedenen Plasmabedingungen ausgesetzt und anschließend mittels Kontaktwinkelmessungen untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bedingungen für die Plasma-behandlung von PMP mit Formiergas. Ionisationsgasstrom = 3000 L/h, PCT = 100 für A-F und 50% für G und H. GV = Geschwindigkeit Verfahrtsch; KW = Kontaktwinkel; kA = keine Messung möglich wegen starker Deformation.

	Frequenz [kHz]	Spannung [V]	Abstand [mm]	GV [m/min]	Wieder- holung	Deformation	KW [°]
A	21	270	4	5	3	sehr schwer	kA
B	21	270	9	5	3	schwer	38.2
C	21	270	9	5	1	mittel	50.9
D	23	300	9	5	1	schwer	40.3
E	23	250	9	5	1	schwer	42.3
F	19	300	9	5	1	keine	62.0
G	23	300	9	5	1	keine	63.0
H	23	300	9	20	1	keine	60.0

Variiert wurden die Parameter: Intensität des Plasmas (Frequenz, Spannung und Puls-Pause-Verhältnis [PCT]), Abstand zwischen Plasmadüse und PMP, Geschwindigkeit des Verfahrtsch, mit dem das Polymer unter dem Plasmastrahl bewegt wurde, und Häufigkeit der Plasma-Behandlung pro Stelle. Die Art des Ionisationsgases (Druckluft) sowie dessen Durchflussmenge wurden dagegen konstant gehalten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Verringerung des Kontaktwinkels auch immer zu einer starken Deformation des Polymers führte. Während bei einer Senkung des Kontaktwinkels von 107° für unbehandelt es PMP auf bis zu 60° keine Deformation auftrat, führte eine intensivere Plasma-Behandlung zu mittlerer bis starker Deformation (KW unter 50°). Einen besonders großen Einfluss auf

Kontaktwinkel und Deformation zeigte die Anzahl der Wiederholungen der Plasma-Behandlung. Ein Vergleich zwischen Eintrag B und C, wo außer der Anzahl der Wiederholungen alle Parameter konstant gehalten wurden, zeigt, dass eine wiederholte Behandlung die Deformation intensivieren und den Kontaktwinkel senken konnte. Daher wurde, sofern nicht anders angegeben, bei allen weiteren Experimenten eine einmalige Behandlung durchgeführt.

Außerdem hat der Abstand zwischen Düse und Polymer einen großen Einfluss auf die Intensität der Behandlung (vergl. Eintrag A und B). Dies ist besonders darauf zurückzuführen, dass die Temperatur des Plasmastrahls mit größerer Entfernung zur Düse abnimmt, da Stöße mit der umgebenden Luft einen Energieaustausch ermöglichen und das Plasma abkühlen. So sinken mit steigender Entfernung sowohl Deformationsrate als auch Kontaktwinkel.

Auch die technischen Parameter der Plasmaherstellung spielen eine große Rolle. Es gilt: Je höher Spannung und Frequenz und je größer der Wert des Puls-Pause-Verhältnisses, desto härter das Plasma und desto größer die Deformation und die Veränderung des Kontaktwinkels.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den Parametern nach Eintrag F, G und H ein optimales Prozessfenster gefunden wurde, welches für die Hydrophilisierung von PMP geeignet war.

3.4.2 XPS-Analyse: Formiergasplasma-Behandlung

Neben den in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Luftplasma-modifizierten Oberflächen wurde PMP außerdem mit Formiergasplasma behandelt, um einen Effekt des Ionisationsgases auf die Oberflächenchemie zu untersuchen. Dabei wurden die in Tabelle 3 angegebenen Bedingungen verwendet. Eine Analyse erfolgte zunächst durch Messung der Kontaktwinkel. Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächen durch Behandlung mit Formiergasplasma deutlich an Hydrophilie gewannen. Der Kontaktwinkel wurde von 107° auf bis zu 21° gesenkt. Allerdings führte die Plasma-Behandlung auch mit Formiergasplasma zum Teil zu starker Deformation der Oberfläche. Da das Polymer jedoch für eine spätere Anwendung in einer künstlichen Lunge intakt bleiben sollte, wurde im Folgenden ein mildes Plasma für die Funktionalisierung von PMP verwendet.

Tabelle 3: Bedingungen für die Plasma-Behandlung von PMP mit Formiergas. PCT = 100, Ionisationsgasstrom = 3000 L/h. GV = Geschwindigkeit Verfahrtsch; KW = Kontaktwinkel; kA = keine Messung möglich wegen starker Deformation.

	Frequenz [Hz]	Spannung [V]	Abstand [mm]	GV. [m/min]	Wieder- holung	Deformation	KW [°]
A	23	300	8	10	1	leicht	21.4
B	23	270	8	10	1	leicht	44
C	23	270	8	10	4	schwer	kA
D	19	300	8	10	1	keine	46.1
E	19	300	5	10	1	leicht	42.9
F	19	300	5	5	1	schwer	kA
G	23	270	5	10	1	mittel	54.8

Zur genaueren Charakterisierung der Oberfläche, wurde eine nach Tabelle 3, Eintrag D Plasma-behandelte Oberfläche mittels XPS untersucht (Abbildung 18). Diese Plasmabedingungen führten zu keiner nennenswerten Deformation der Oberfläche, wobei der Kontaktwinkel auf 46.1° gemessen werden konnte. Im Vergleich zu Luftplasma lassen sich folglich mit Formiergasplasma deformationsfreie, hydrophilere Oberflächen erzeugen.

Für die nach Tabelle 3D behandelten Oberflächen ergab sich ein im Verhältnis zum Kohlenstoff gesteigener Sauerstoffwert, verglichen mit der unbehandelten Oberfläche. Das Verhältnis der Integrale von Kohlenstoff- zu Sauerstoffpeak betrug nach der Behandlung etwa 5:1. Des Weiteren ließ sich Stickstoff mit einem Anteil von 55:1 nachweisen.

Im Folgenden wurden die drei Signale von Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff erneut hinsichtlich ihrer Feinaufspaltung untersucht. Dazu wurden geringere Pass-Energien gewählt als bei dem Übersichtsspektrum, die zu einer geringeren Intensität der Signale bei gesteigener Linienschärfe führten.

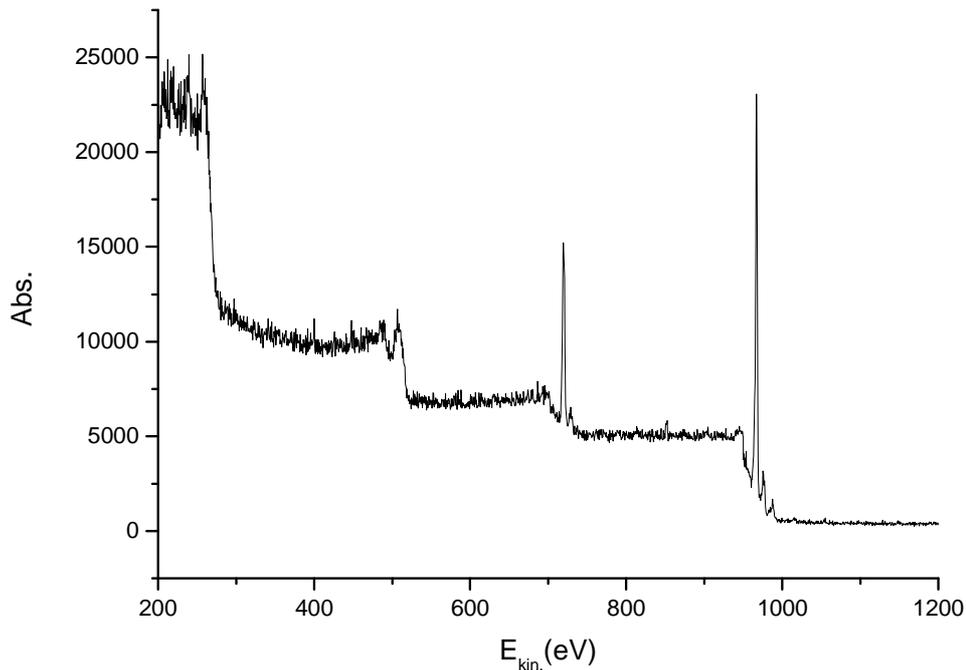


Abbildung 18: XP-Gesamtspektrum von PMP nach Formiergasplasma-Behandlung; Pass-Energie: 100 eV.

Das Kohlenstoffspektrum zeigt eine veränderte Feinstruktur verglichen mit der von unbehandeltem PMP (Abbildung 19). Es trat eine Verschiebung in Richtung geringerer kinetischer Energien auf, sodass neben den in Kapitel 3.1 beschriebenen Banden noch eine weitere Bande bei $E_{\text{kin.}} = 964 \text{ eV}$ (BE 289 eV) zu beobachten war. Diese lässt sich mit dem Auftreten von Kohlenstoff-Stickstoff Bindungen begründen. Es könnten also sowohl C-N Einfachbindungen als auch C=N Doppelbindung oder C≡N Dreifachbindungen entstanden sein (vergl. Tabelle 1). Des Weiteren wäre eine plasmavermittelte Reaktion, die zu N-C-N Bindungen führt, denkbar, da diese Stoffklasse ebenfalls Signale bei geringeren kinetischen Energien hervorrufen würde.

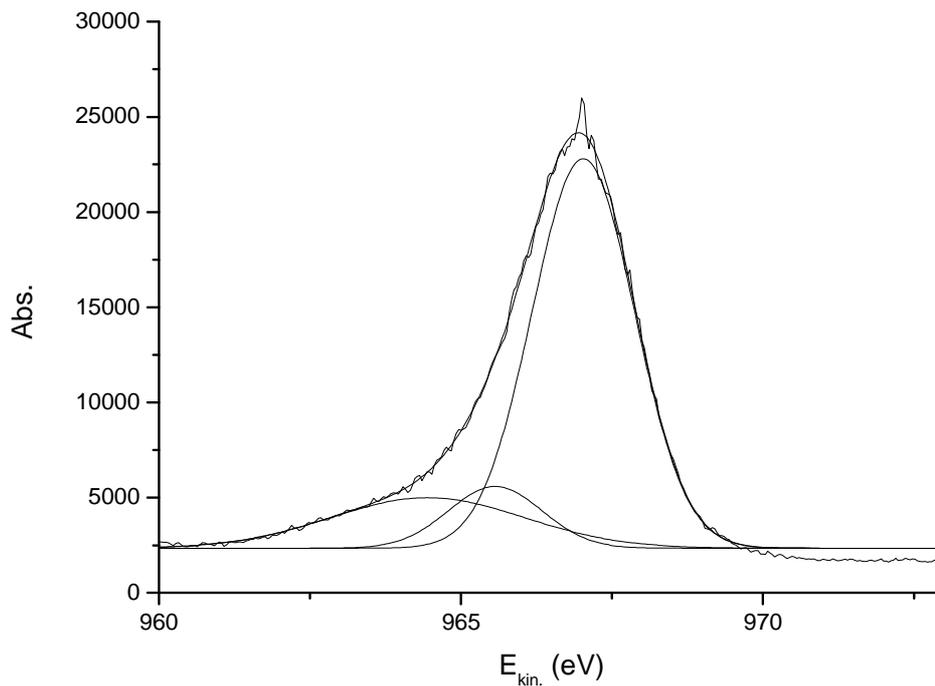


Abbildung 19: Hochoflösung des Kohlenstoffpeaks von PMP nach Formiergasplasma-Behandlung; Pass-Energie: 100 eV.

Eine genauere Zuordnung erfolgte im Weiteren über die Hochoflösung des Stickstoffpeaks (Abbildung 20). Dieser lässt sich durch eine Gausskurve beschreiben, die eine maximale Absorption bei $E_{\text{kin.}} = 852 \text{ eV}$ (BE 401 eV) zeigt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der C1s Elektronen deutete diese kinetische Energie der N1s Elektronen ebenfalls auf die Stoffgruppen N-C=O, C=N und C≡N hin. Das Vorhandensein von primären Aminen sowie C-NO₂, C=NOH und C-ONO₂ konnte ausgeschlossen werden, da dann weitere Peaks bei $E_{\text{kin.}} = 854 \text{ eV}$ (BE 399 eV) beziehungsweise $E_{\text{kin.}} = 847\text{-}845 \text{ eV}$ (BE 406-408 eV) zu erwarten gewesen wären.⁷⁸

Auch wurde die Feinstruktur des Sauerstoffpeaks untersucht (Abbildung 21). Nach der Plasma-Behandlung konnte ein im Vergleich mit den unbehandelten Folien stark verändertes Sauerstoffspektrum gemessen werden. Während vor der Behandlung drei verschiedene Bindungsarten am Sauerstoff detektiert werden konnten, lässt sich nach der Plasma-Behandlung das XP-Spektrum als nahezu perfekte Gausskurve mit einem Maximum bei $E_{\text{kin.}} = 720 \text{ eV}$ (BE 533 eV) beschreiben. Dies entspricht einer Verschiebung zu höheren kinetischen Energien

und legt die Vermutung nahe, dass die diversen Substanzklassen, die zuvor auf der Oberfläche vorhanden waren, durch die Plasma-Behandlung weiter oxidiert wurden.

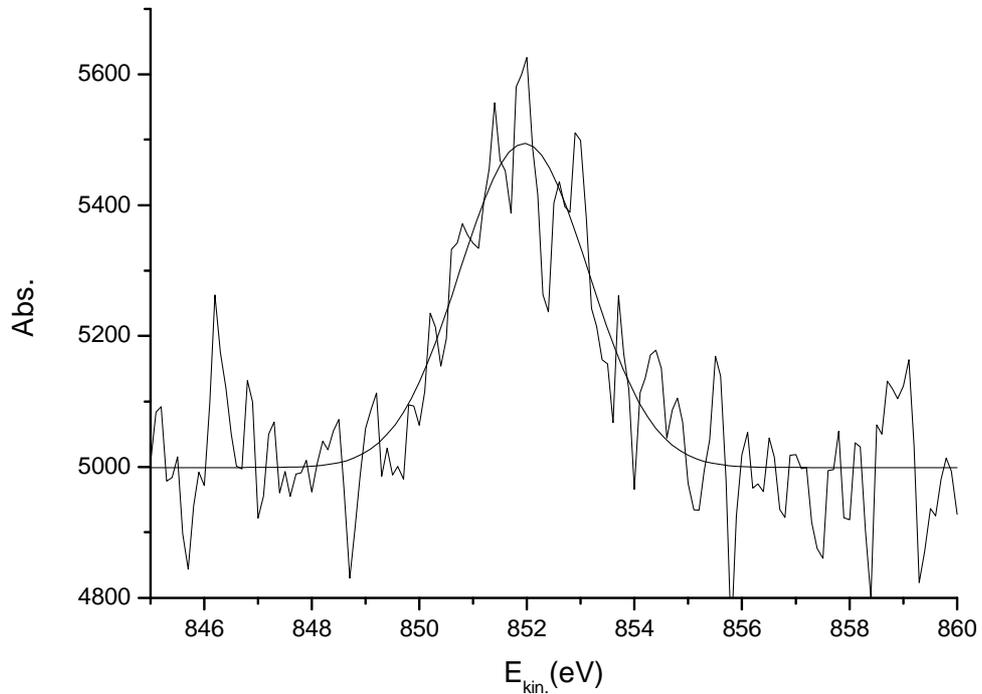


Abbildung 20: Hochauflösung des Stickstoffpeaks von PMP nach Formiergasplasma-Behandlung; Pass-Energie: 100 eV.

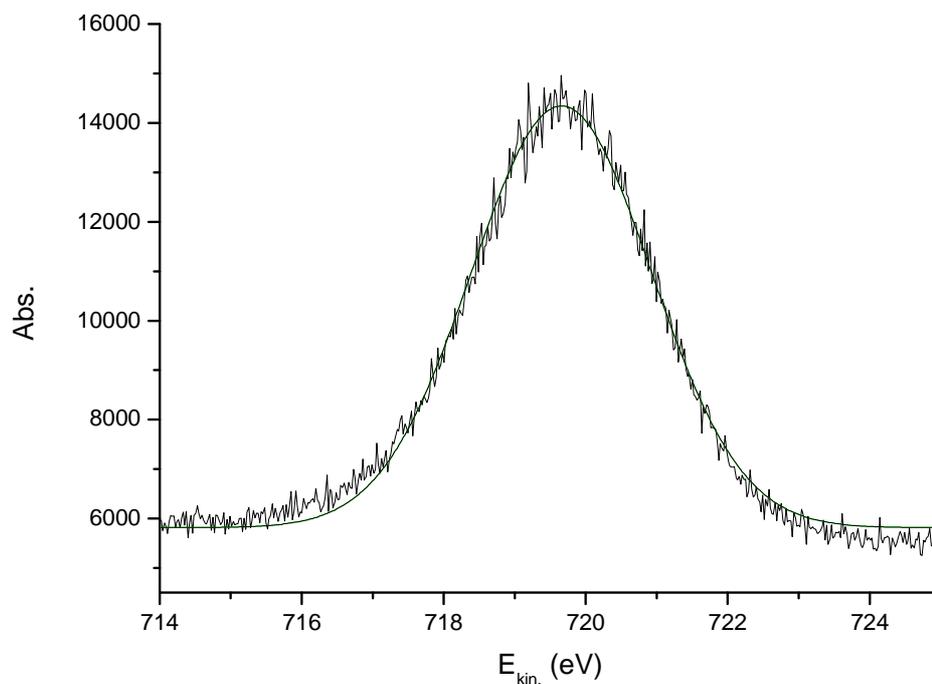


Abbildung 21: Hochauflösung des Sauerstoffpeaks im XP-Spektrum von PMP mit Formiergasplasma-Behandlung; Pass-Energie 100 eV.

3.5 XPS-Analyse: Nitreninsertion

Nachdem mit der Formiergasplasma-Behandlung nach Tabelle 3D eine optimale Methode zur Steigerung der Hydrophilie der PMP-Oberflächen gefunden war, konnten nun Experimente zur Nitreninsertion in C-H Bindungen der Oberfläche durchgeführt werden. Dazu wurden die in Kapitel 3.2 diskutierten Bedingungen verwendet (Schema 7).

Anschließend wurde der Erfolg der Nitreninsertion erneut mittels XP-Spektroskopie untersucht. Ein Übersichtsspektrum einer derart behandelten PMP-Membran ist in Abbildung 22 gezeigt.

Besonders charakteristisch für die erfolgte Reaktion war das Auftreten der F1s-Bande, die eindeutig dem Tetrafluoroaromaten des Linkers zuzuordnen war, da nach der Plasma-Behandlung kein Fluor auf der Oberfläche nachzuweisen war.^{82,83} Eine Hochauflösung dieses Peaks zeigte dabei den Verlauf, der sich durch eine Gauss Glockenkurve mit einem Maximum bei $E_{\text{kin.}} = 562 \text{ eV}$ (BE 691 eV) beschreiben lässt (Abbildung 23). Da ausschließlich arylisches Fluor auf der Polymeroberfläche gebunden war, traten keine Nebenmaxima auf. Eine Integration ergab ein Fluor zu Kohlenstoff Verhältnis von 1:61. Unter Vernachlässigung der Tatsache, dass der Linker das Polymergrundgerüst überdeckt und unter Berücksichtigung der zusätzlichen Kohlenstoffatome des Linkers ergibt sich dadurch eine Derivatisierung von etwa jeder fünften Monomereinheit des PMPs.

⁸² J. F. Moulder, W. F. Strickle, P. E. Sobol, K. Bomben, J. Chastain (editor) *Handbook of photoelectron spectroscopy* 2nd Edn; Perkin-Elmer Corporation (Physical Electronics), Minnesota **1992**.

⁸³ A. M. Ferraria, J. Dias Lopes da Silva, A. M. Botelho do Rego, *Polymer J.* **2003**, *44*, 7241-7249.

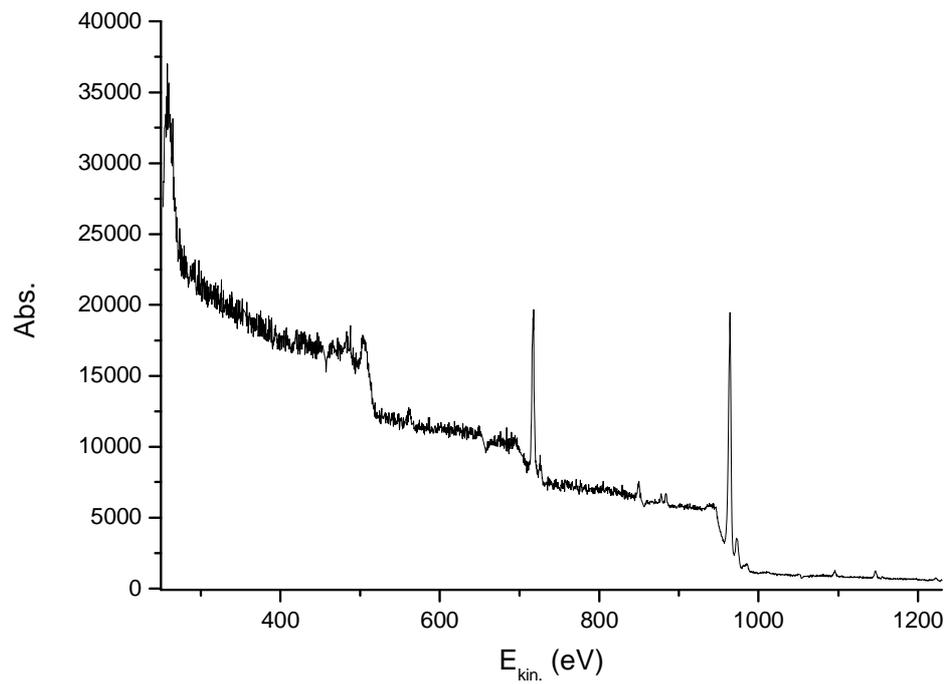


Abbildung 22: XP-Gesamtspektrum von PMP nach Formiergasplasma-Behandlung und Linkerinsertion; Pass-Energie: 100 eV.

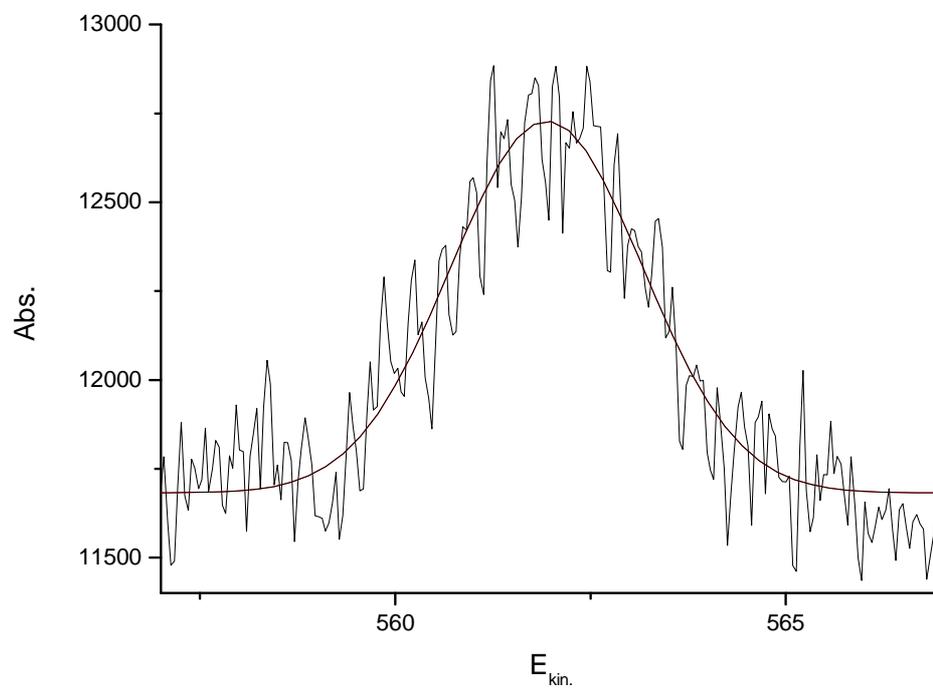


Abbildung 23: XPS-Hochauflösung des Fluorpeaks nach Formiergasplasma-Behandlung und Linkerinsertion; Pass-Energie: 150 eV.

Ein weiterer Hinweis auf eine erfolgte Nitreninsertion ist der im Vergleich zu der nur Plasma-behandelten Oberfläche gestiegene Stickstoffanteil. Das Kohlenstoff zu Stickstoff-Verhältnis stieg von 55:1 auf 35:1. Dieser zusätzliche Stickstoff ist wiederum durch den im insertierten Linker vorhandenen Stickstoff zu begründen. Eine Feinausspaltung des Stickstoffpeaks war nicht zu beobachten (Abbildung 24).

Abbildung 25 zeigt die XPS-Hochauflösung des Kohlenstoffpeaks nach der Linkerinsertion. Der Kurvenverlauf zeigt zwei Maxima bei $E_{\text{kin.}} = 970 \text{ eV}$ (BE 283 eV) und $E_{\text{kin.}} = 969 \text{ eV}$ (BE 284 eV). Die Verschiebung der kinetischen Energie im Vergleich zu den bisher beschriebenen Spektren resultiert dabei aus der deutlich gesenkten Pass-Energie und der ungenauen Kalibrierung des Spektrometers. Es kann jedoch beobachtet werden, dass der Peak, der bei niedrigerer kinetischer Energie auftaucht, nach der Nitreninsertion deutlich an Intensität zunahm. Dieser lässt sich sowohl C-O Einfach- als auch Doppelbindungen zuzuordnen und ist damit aufgrund der Carbonylgruppen im Linker ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Nitreninsertion.

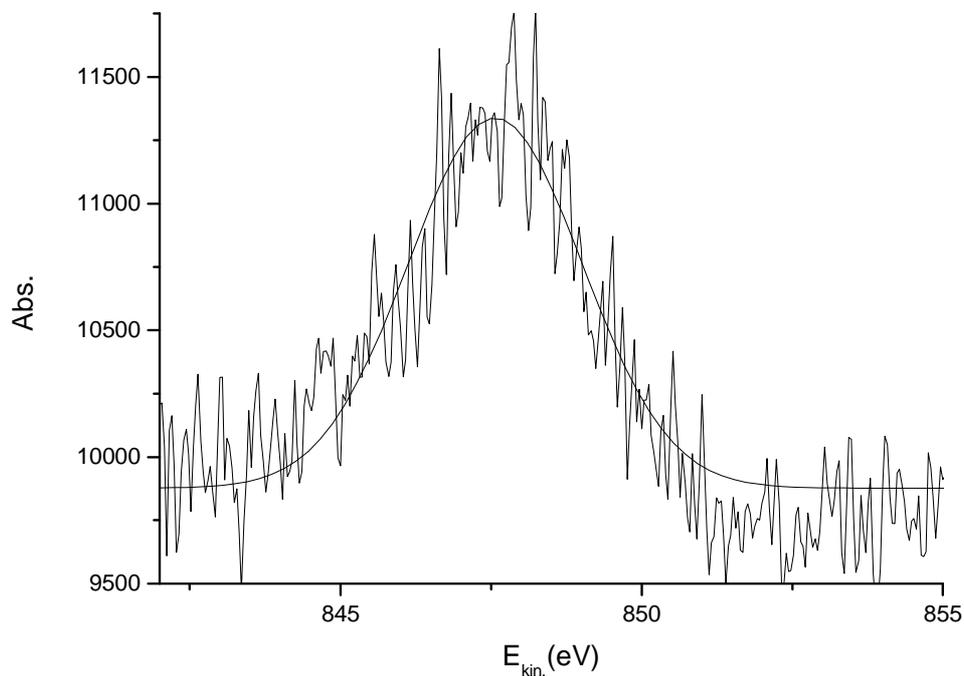


Abbildung 24: XPS-Hochauflösung des Stickstoffpeaks nach Formiergasplasma-Behandlung und Linkerinsertion; Pass-Energie: 190 eV.

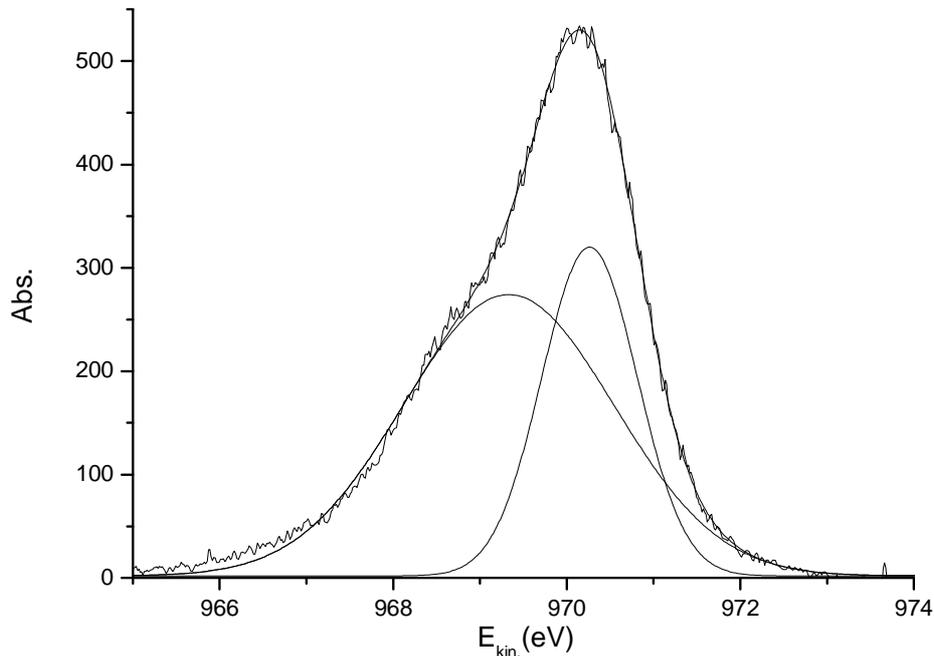


Abbildung 25: XPS-Hochauflösung des Kohlenstoffpeaks nach Formiergasplasma-Behandlung und Linkerinsertion; Pass-Energie: 20 eV.

3.6 Weitere Analysen: Nitreninsertion

In Kapitel 3.5 wurde bereits mittels XP-Spektroskopie gezeigt, dass nach erfolgter Plasma-Behandlung eine Funktionalisierung der PMP-Membranen durch Nitreninsertion durchgeführt werden konnte. Trotzdem sollten weitere Analysemethoden die chemische Funktionalisierung der Membran belegen. Zu diesem Zweck wurden IR- und UV-Studien sowie eine Untersuchung mittels Elementaranalyse durchgeführt.

Nachweis durch IR-Messung:

Die Nitreninsertion des Linkers PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** wurde durch IR-spektroskopische Messungen nachgewiesen. Abbildung 26 zeigt das IR-Spektrum der in Linker getauchten PMP-Folien vor der Bestrahlung mit UV-Licht (blau) und danach (rot). In dem Spektrum der nicht belichteten Folien ist deutlich die Azidbande des Linkers bei 2125 nm zu erkennen. Diese ist nach der Reaktion nicht mehr zu beobachten, sodass daraus geschlossen werden kann, dass das Azid während der UV-Reaktion vollständig zum Nitren abreagiert hat. Die Carbonylbande des Linkers

bei 1682 nm ist jedoch in beiden Spektren zu beobachten. Dies weist den Linker auf der Oberfläche nach.

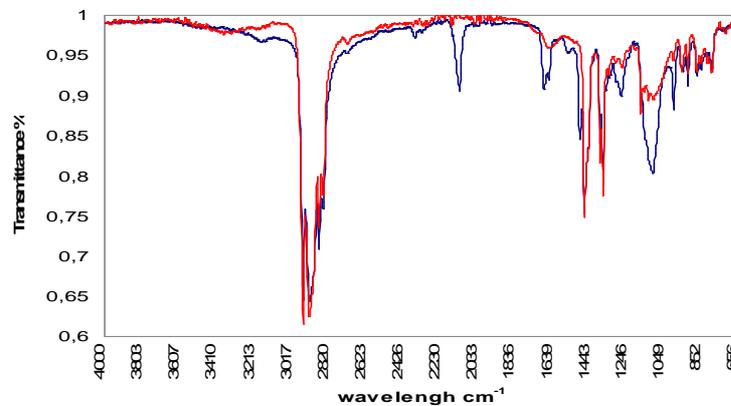


Abbildung 26: IR-Spektrum von: blau: PMP nach Inkubation in PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** vor der UV-Bestrahlung; rot: PMP nach Bestrahlung mit UV-Licht.

Nachweis durch Beobachtung der UV-Absorption des Linkers:

Durch Insertion von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** in die PMP-Membran wurde ein fluoriertes Phenylring auf deren Oberfläche aufgebracht. Dieser zeigt Absorption auf einer UV-Platte mit Sperrfilter bei 512 nm (Abbildung 27links). Eine ebenso wie Insertionsprodukt **27a** behandelte PMP-Folie, die jedoch nicht mit UV-Licht bestrahlt wurde, zeigt dagegen keine Absorption (Abbildung 27rechts).

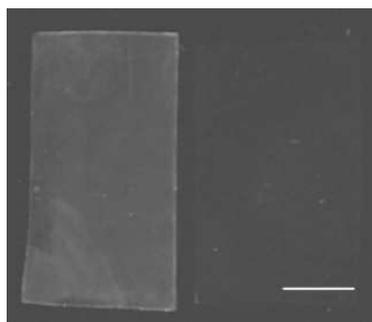


Abbildung 27: Links: PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **27a**; rechts: PMP, das in PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** quellen gelassen und gespült, jedoch nicht belichtet wurde (Maßstab = 1 cm)

Nachweis durch Elementaranalyse:

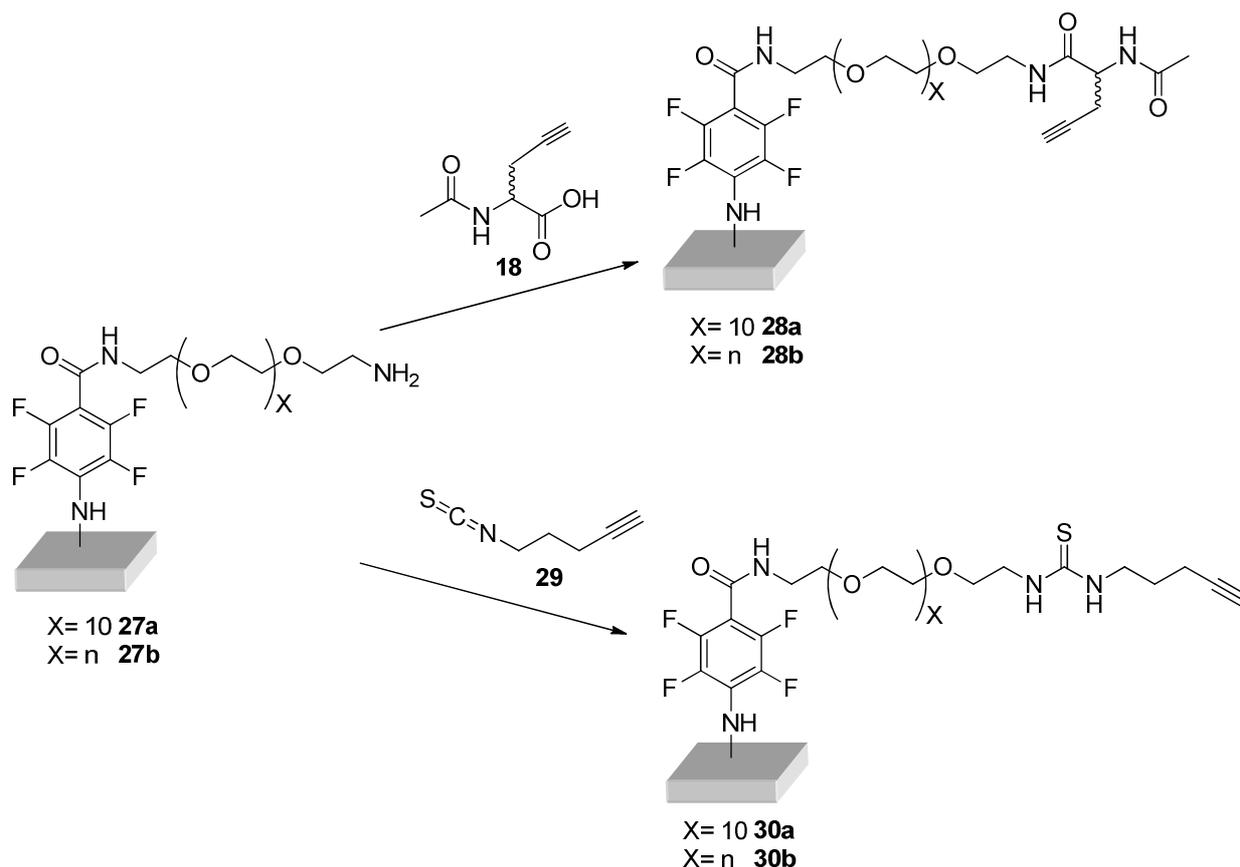
Im Gegensatz zu Linker **23a** enthält das Polymer PMP keinen Stickstoff. Dies konnte durch Elementaranalyse nachgewiesen werden. Nach der Nitreninsertion von **23a** in PMP wurde dagegen ein Stickstoffanteil von bis zu 0.028% gemessen. Daraus folgt, dass etwa jede 1800ste monomere Einheit des PMPs derivatisiert wurde. Die Belegungsdichte auf der Oberfläche lässt sich jedoch durch diese Methode nicht quantifizieren, da die gesamte PMP-Membran, und nicht nur die funktionalisierte Schicht, bei der Elementaranalyse untersucht wurde.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysemethoden (Kapitel 3.5 und Kapitel 3.6) die Funktionalisierung der PMP-Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Zusammengenommen ergab sich ein qualitativer Nachweis der Nitreninsertion. Eine Quantifizierung konnte dagegen aufgrund der polymeren Struktur des Substrats nur in Ansätzen erfolgen.

3.7 Kupplung eines Linkers für Kupfer-katalysierte Ligation

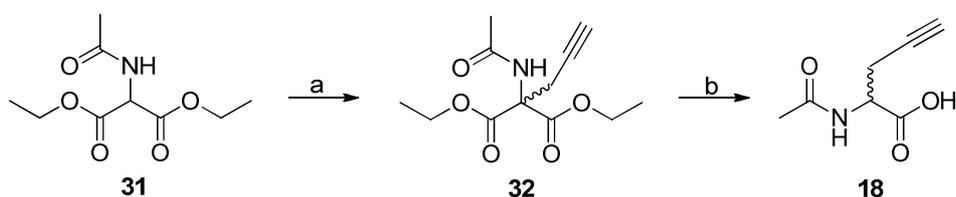
Wie in Kapitel 3.3 beschrieben und in Kapitel 3.5 und 3.6 nachgewiesen, wurden PMP-Folien durch Nitreninsertion mit PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** beziehungsweise PFPA-PEG_n-NH₂ **23b** beschichtet. Um im letzten Schritt das biologisch aktive, zyklische RGD-Peptid auf die Oberfläche aufzubringen zu können, musste zunächst ein Linker gekoppelt werden. Dieser sollte das Verbindungsglied zwischen PEG-*spacer* und RGD-Peptid darstellen. Da die Anbindung des Azid-funktionalisierten RGD-Peptids durch eine 1,3-dipolare Zyклоaddition erfolgen sollte, musste der verbindende Linker eine Alkin-Funktionalität tragen (vergl. Schema 4).

Als mögliche Linker wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Verbindungen untersucht. Zum einen sollte der Carboxylterminus von 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** unter klassischen Peptidkupplungsbedingungen an das freie Amin des PEG-*spacers* gekoppelt werden (Schema 8). Zum anderen sollte 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** an das Polymer gebunden werden, indem das freie Amin des PEG-*spacers* nukleophil das Isothiocyanat des Linkers angreift.



Scheme 8: Kupplung von PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **27a** bzw. PMP-PFPA-PEG_n-NH₂ **27b** mit 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** bzw. 5-Isothiocyanato-1-pentin **29**.

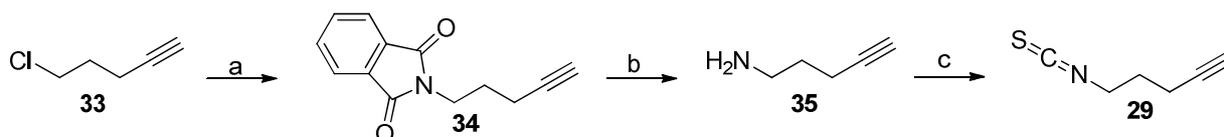
2-Acetylamino-4-pentylsäure **18** wurde nach einer Vorschrift von BREA *et al.* aus Diethylacetamidomaleat **31** (Schema 9) hergestellt.⁸⁴ Dabei wurde mit KO^tBu Diethylacetamidomaleat zunächst in α -Position deprotoniert und anschließend mit Propargylbromid zu dem Zwischenprodukt **32** umgesetzt. Zuletzt wurde unter basischen Bedingungen hydrolysiert und sauer decarboxyliert, sodass 1-Acetylamino-4-pentylsäure **18** in einer Ausbeute von 48% erhalten wurde.



Scheme 9: Synthese von 2-Acetylamino-4-pentylsäure **18** nach BREA *et al.*⁸⁴ a) 1) KO^tBu, Dioxan, 60 °C, 2,5 h, 2) Propargylbromid, Rückfluss, 48 h, 42%, 1) 10% NaOH, Rückfluss, 5 h, 2) 6 M HCl, Rückfluss, 5 h, 48%

⁸⁴ R. J. Brea, M. P. López-Deber, L. Castedo und J. R. Granja, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7870-7873.

5-Isothiocyanato-1-pentin **29** wurde nach einer Vorschrift von L'ABBÉ *et al.* synthetisiert (Schema 10).⁸⁵ Dafür wurde zunächst 5-Chloro-1-pentin **33** in das korrespondierende Phthalimid in einer Ausbeute von 92% überführt. Anschließend wurde in einer GABRIEL-Reaktion 4-Pentinamin **35** freigesetzt. Die geringe Ausbeute von 34% ist dabei auf die hohe Flüchtigkeit des Produkts zurückzuführen. Isothiocyanat **29** konnte im Folgenden in einer Ausbeute von 83% durch Zusatz von Thiophosgen erhalten werden.

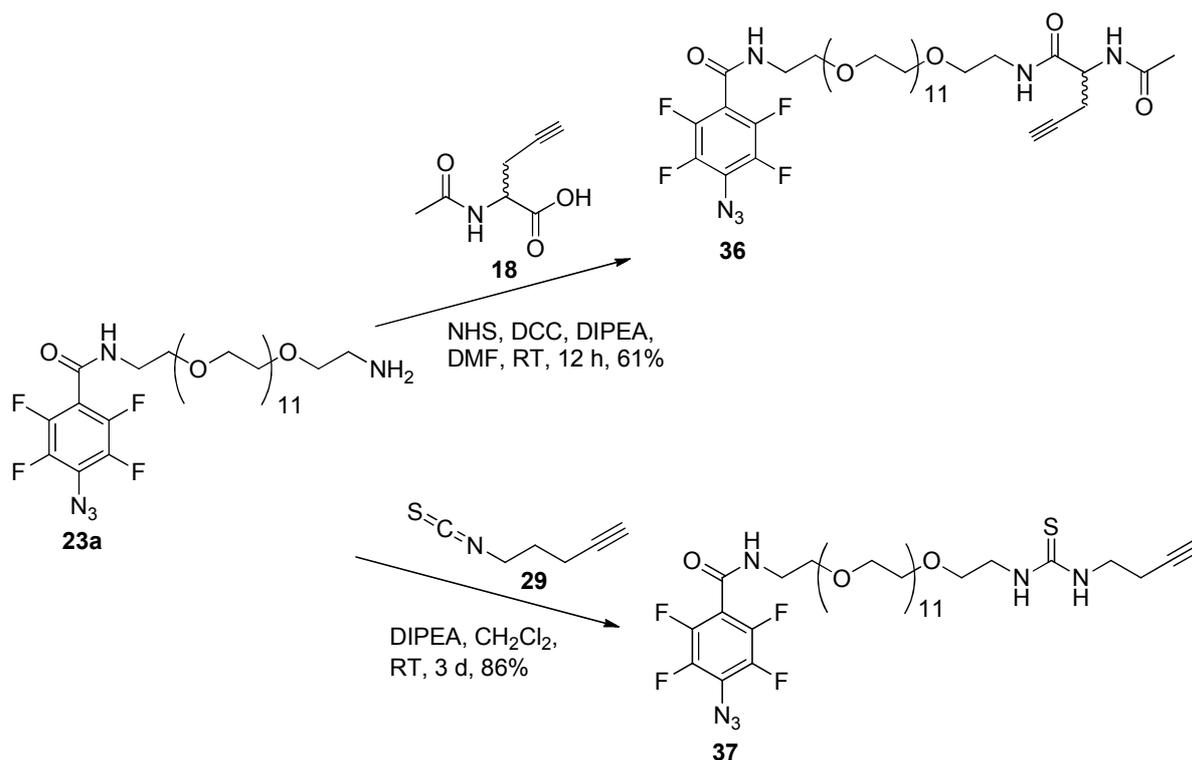


Schema 10: Synthese von 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** nach L'ABBÉ *et al.*⁸⁵ a) Kaliumphthalimid, KI, DMF, 100 °C, 6 h, 92%, b) NH_2NH_2 , EtOH, RT, 12 h, 34%, c) CSCl_2 , NEt_3 , RT, 12 h, 83%.

Um die in Schema 8 dargestellte Kupplung zwischen PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **27a** oder PFPA-PEG_n-NH₂ **27b** und den Bausteinen 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** beziehungsweise 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** zu untersuchen, wurden zunächst Modellreaktionen mit PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** durchgeführt (Schema 11). Da bei dieser Reaktion kein polymeres Substrat verwendet wurde, konnte der Erfolg der Reaktion mit klassischen Analysemethoden wie NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** und 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** in einer Ausbeute von 61% unter Zugabe der klassischen Peptidkupplungsreagenzien *N*-Hydroxysuccinimid, Dicyclocarbodiimid (DCC) und HÜNIG-Base (DIPEA) kuppeln ließen. Der Thioharnstoff **37** konnte aus PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** und 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** in einer Ausbeute von 86% erhalten werden.

Nachdem die Kupplung der Bausteine an den Polyethylenglycollinker in moderaten bis guten Ausbeuten durchgeführt werden konnte, wurden die Ergebnisse der Modellreaktion auf das Polymer übertragen. Die in Schema 8 gezeigten Reaktionen wurden unter den in Schema 11 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

⁸⁵ G. L'abbé, S. Leurs, I. Sannen, W. Dehaen, *Tetrahedron* **1993**, 49, 4439-4446.

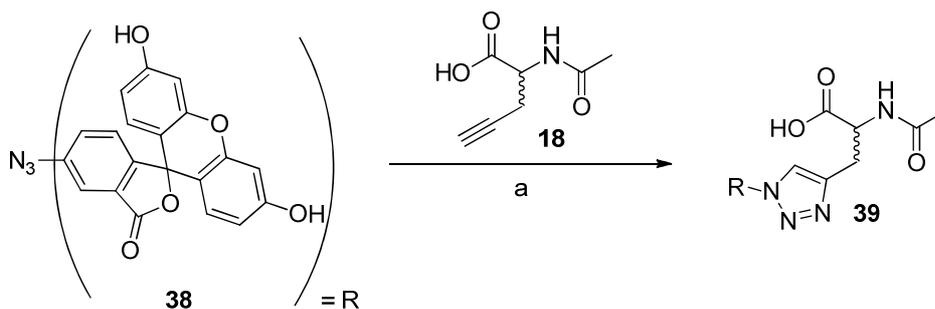


Schema 11: Modellreaktionen zur Kupplung von PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **27a** bzw. PMP-PFPA-PEG_n-NH₂ **27b** mit 2-Acetylamino-pent-4-ylsäure **18** bzw. 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** anhand von Linker PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** mit den jeweiligen Bausteinen.

3.8 Kupfer-katalysierte, 1,3-dipolare Zykoadditionen

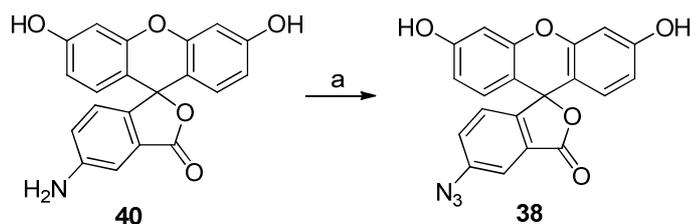
In den Kapiteln 3.1-3.7 wurden die Plasma-Behandlung, die Nitreninsertion sowie die Funktionalisierung von PMP mit verschiedenen, alkinhaltigen Linkern gezeigt. Im nächsten Schritt sollte das zyklische, Azid-funktionalisierte RGD-Peptid, c[RGDfK(N₃)] **13**, mittels „Klick“-Chemie an die Oberfläche gekuppelt werden. Da das RGD-Peptid jedoch chemisch nicht auf der Oberfläche nachzuweisen ist, wurde stattdessen die Modellsubstanz Azidofluorescein **38** verwendet, welche durch UV-Spektroskopie eindeutig nachzuweisen sein sollte.

Zunächst wurde erneut eine Modellreaktion durchgeführt, um die Reaktionsbedingungen für die nachfolgende Reaktion am Polymer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde eine Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Zykoaddition zwischen Azidofluorescein **38** und 2-Acetylamino-4-pentylsäure **18** durchgeführt (Schema 12). Triazol **39** wurde dabei in einer Ausbeute von 72% erhalten.



Schema 12: 1,3-Dipolare Zykladdition zwischen Azidofluorescein **38** und 2-Acetylamino-4-pentylsäure **18**. a) **18**, CuI, DIPEA, MeOH, RT, 24 h, 72%.

Azidofluorescein **38** wurde in einer Ausbeute von 58% nach einer Vorschrift von ROTMAN *et al.* dargestellt (Schema 13).⁸⁶ Dazu wurde 5-Aminofluorescein **40** mit Amylnitrit unter sauren Bedingungen in sein Diazoniumsalz überführt, welches durch Natriumazidzugabe zu Azidofluorescein **38** reagierte.



Schema 13: Synthese von Azidofluorescein **38**. a) i) Amylnitrit, H_2SO_4 , DMF/ H_2O , 0 °C, 30 min, ii) NaN_3 , 0 °C, 45 min, 58%.

Da im Folgenden Fluorescein auf die PMP Oberfläche aufgebracht und mittels UV-Absorption qualitativ nachgewiesen beziehungsweise quantifiziert werden sollte, wurde Azidofluorescein **38** in einer Konzentration von 10 μM in Methanol im Bereich der UV-Absorption des Fluoresceins zwischen 400 und 600 nm vermessen (Abbildung 28; durchgezogene Linie). Absorptionsmaxima von **38** waren bei 457 und 481 nm zu beobachten. Das Auftreten von zwei Maxima ist damit zu erklären, dass Fluorescein als Gleichgewicht zweier, isomerer Formen vorliegt. Zum einen liegt es in einer laktonisierten Form **38a** (Maximum bei 481 nm) zum anderen als offenkettiges, anionisches Isomer **38b** (Maximum bei 457 nm) vor (Schema 14).⁸⁷

Das „Klick“-Produkt **39** (Schema 12) zeigte dagegen eine maximale Absorption bei 498 nm (Abbildung 28; gestrichelte Linie). Dies ist damit zu begründen, dass

⁸⁶ A. Rotman, J. Heldman, *Biochemistry*, **1981**, 20, 5995-5999.

⁸⁷ V. Zanker, W. Peter, *Chem. Ber.* **1958**, 9, 572-80.

Kupfer aus der „Klick“-Reaktion an das π -System des Fluoresceins koordinierte und so eine Bandenverschiebung um 17 nm zu längeren Wellenlängen verursachte. Nach Zugabe von EDTA zeigte Zykoadditionsprodukt **39** die gleichen Maxima in der UV-Absorption wie zuvor Azidofluorescein **38** (Abbildung 28; gepunktete Linie). EDTA fungierte dabei als stärkerer Komplexbildner für das Kupfer im Vergleich zum Fluorescein, sodass der Chromophor frei vorlag.

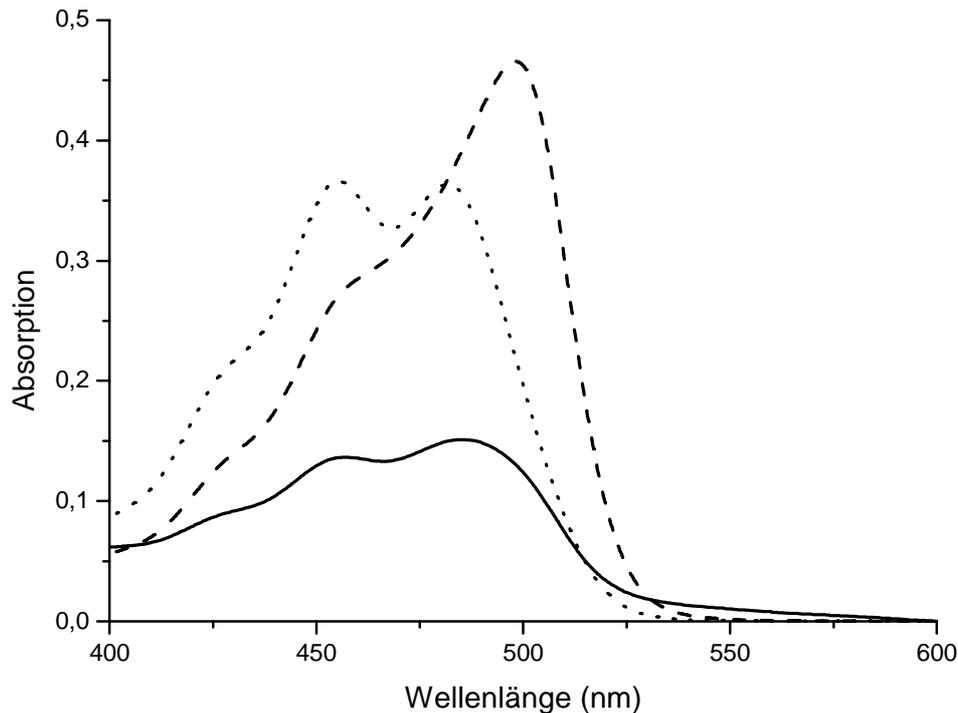
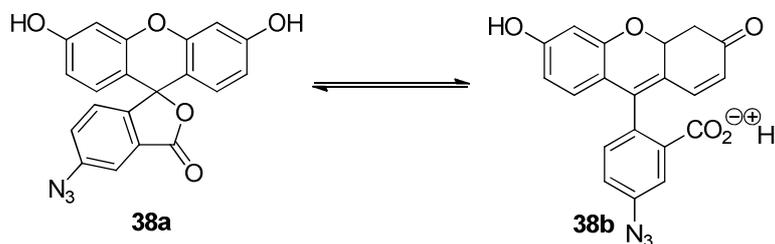
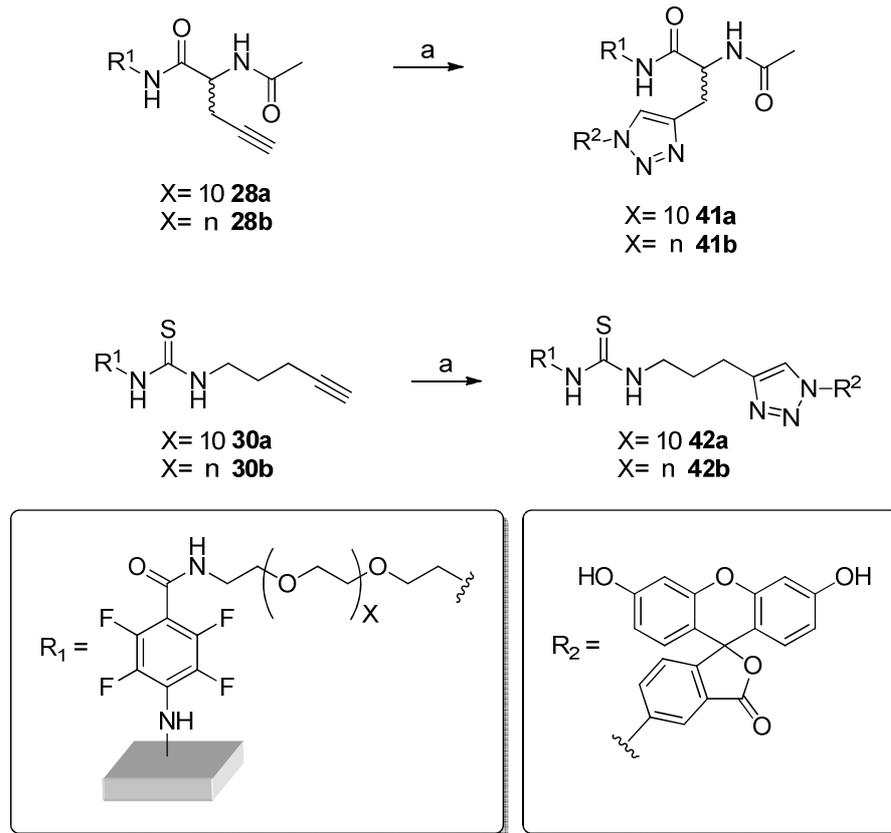


Abbildung 28: Durchgezogene Linie: Absorption von Azidofluorescein **38** ($c = 10 \text{ mM}$ in Methanol); gestrichelte Linie: „Klick“-Produkt **39** mit Spuren von Kupfer; gepunktete Linie: Zykoadditionsprodukt **39** nach EDTA-Zugabe.



Schema 14: Isomere Formen des Azidofluoresceins **38**.

Anschließend wurde die in Schema 12 gezeigte 1,3-dipolare Zykoaddition auf das Polymer übertragen. Dazu wurden insgesamt vier verschiedenen funktionalisierte Polymere eingesetzt, die sich entweder in der Länge der Polyethylenglycollinkers oder in der Art des gekuppelten Alkinbausteins unterschieden (Schema 15). Bei allen Reaktionen wurde dabei Kupferiodid als Katalysator eingesetzt.



Schema 15: 1,3-dipolare Zykladdition zwischen Azidofluorescein **38** und den Polymer-gebundenen Alkinen **28a**, **28b**, **30a** und **30b**. a) R^2-N_3 **38**, CuI , $DIPEA$, $MeOH$, RT , 24 h.

Im nächsten Schritt wurde exemplarisch das Polymer-gebundene Zykladditionsprodukt **41a** UV-spektrometrisch untersucht (Abbildung 29; gestrichelte Linie). Um den Erfolg der Plasmachemie erneut zu überprüfen, wurden zunächst PMP-Membranen verwendet, die nicht durch Plasma-Behandlung sondern ausschließlich durch Nitreninsertion, Linkerkupplung und Fluoresceinanbindung funktionalisiert wurden. Der Kurvenverlauf der Absorption von Azidofluorescein **38** wird zum Vergleich durch die gestrichelte Linie in Abbildung 29 dargestellt. Nach Behandlung der PMP-Membran auf oben beschriebene Weise konnte kein Fluorescein auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Eine Funktionalisierung fand folglich nicht oder nur in sehr geringem Maße statt.

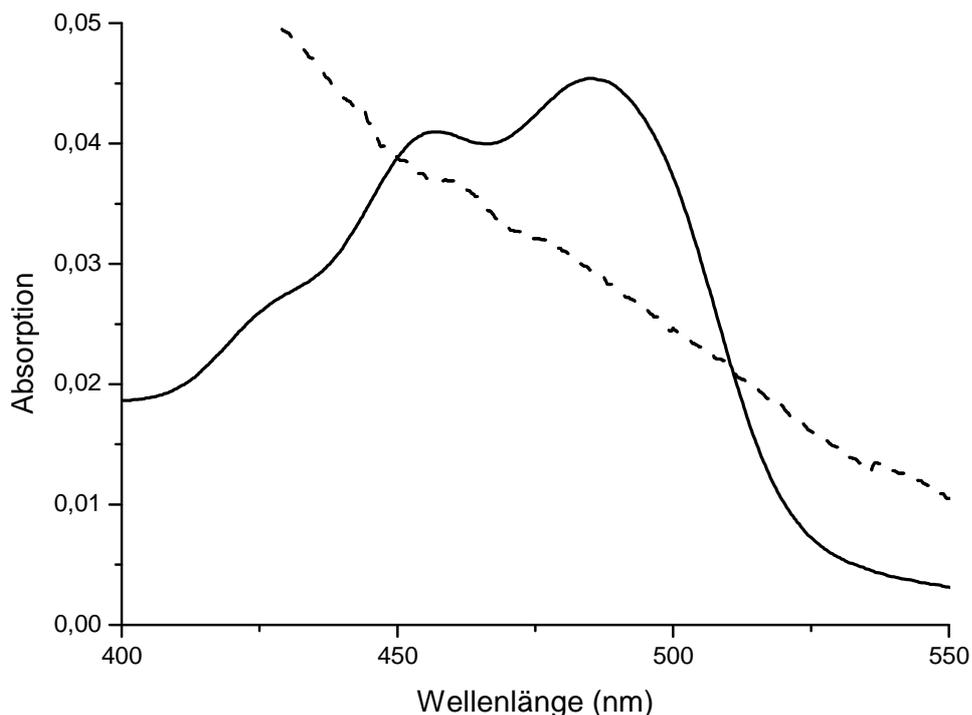


Abbildung 29: durchgezogene Linie: Absorption von Azidofluorescein **38**; gestrichelte Linie: Zykladditionsprodukt **41a**.

Daraufhin wurde die unbehandelte PMP-Folie als Ausgangsmaterial für die chemische Funktionalisierung durch eine mit Formiergasplasma-behandelte PMP-Folie ersetzt. Die Behandlung der PMP-Oberfläche mit Formiergas hatte eine Steigerung der Hydrophilie zur Folge, die eine chemische Funktionalisierung in polaren, organischen Lösungsmitteln erlaubte (vergl. Kapitel 3.4).

Anschließend wurde mit den Folien ebenso verfahren wie bereits beschrieben (Schema 15). Die UV-Absorption im Bereich von 400 bis 600 nm der verschiedenen behandelten PMP-Derivate wird in Abbildung 30 gezeigt. Bei den mit Formiergas vorbehandelten Folien war deutlich die Kupplung des Fluoresceins an die PMP-Oberfläche nachweisbar (PMP-Derivat **41a** und **41b**, Abbildung 30; durchgezogene und gestrichelte Linie). Der Unterschied in der Absorption der beiden Derivate mit verschiedenen Linkerlängen liegt dabei jedoch im Bereich der Messgenauigkeit.

Im Vergleich zu **41a** und **41b** zeigte PMP Derivat **28a** vor der „Klick“-Reaktion mit Fluorescein keine Absorption (Punkt-Strich Linie). Dadurch konnte gezeigt werden, dass das bei den PMP-Derivaten **41a** und **41b** beobachtete Absorptionsmaximum tatsächlich dem gebundenen Fluorescein zuzuordnen ist und nicht auf frühere Modifizierungen zurückzuführen ist.

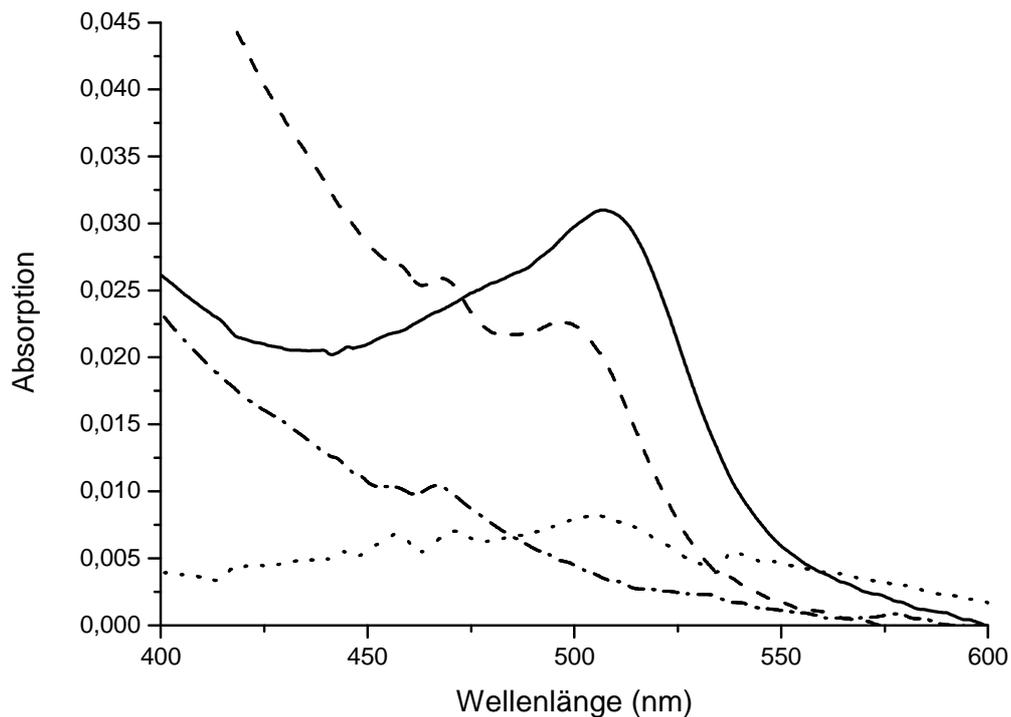


Abbildung 30: UV-Absorptionen der PMP-Derivate **41a** und **41b**, hergestellt aus Plasma-vorbehandelten PMP-Folien; gestrichelte Linie: Zyклоadditionsprodukt **41a**; durchgezogene Linie: Zyклоadditionsprodukt **41b**; gepunktete Linie: Negativprobe des „Klick“-Versuches; Punkt-Strich Linie: PMP-Derivat **28a** vor „Klick“-Reaktion.

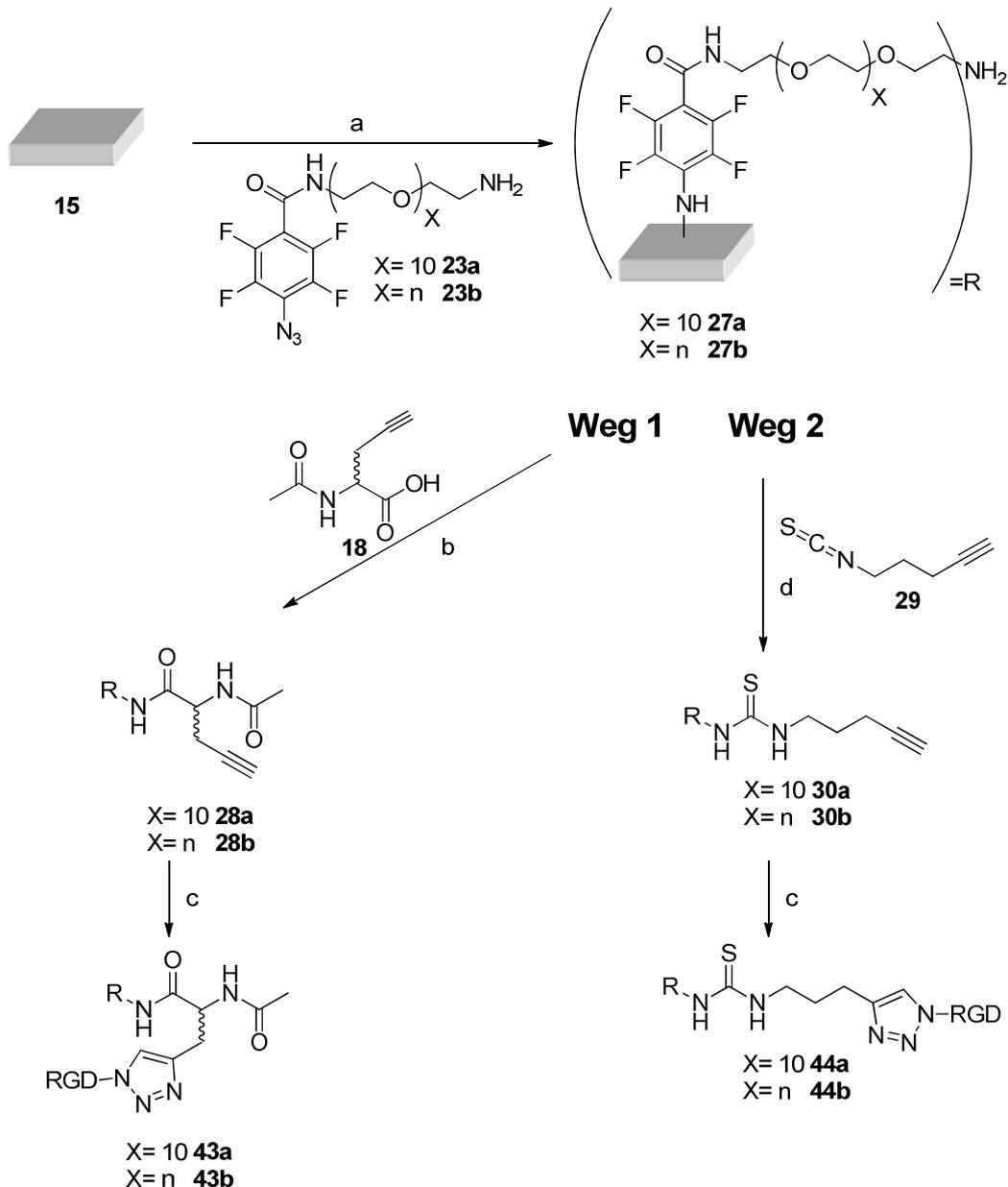
Des Weiteren wurde ein Blindversuch durchgeführt (Abbildung 30; gepunktete Linie). Hierzu wurde eine Plasma-vorbehandelte Folie in eine Lösung von Fluorescein in Methanol getaucht, um die Menge an physisorbiertem Fluorescein auf der Oberfläche zu bestimmen. Aufgrund der fehlenden Alkinfunktionalität konnte jedoch keine „Klick“-Reaktion erfolgen. Nachdem die Oberfläche analog zu den bisher diskutierten Oberflächen gespült worden war, konnte kein Maximum im Absorptionsbereich des Fluoresceins beobachtet werden. Durch diesen Blindversuch konnte gezeigt werden, dass kein Fluorescein adhäsiv an der PMP-Membran anhaftete und die bei **41a** und **41b** gezeigte Absorption bei 490 nm auf eine kovalente Anbindung des Fluoresceins zurückzuführen war.

Ein Vergleich zwischen den Absorptionsspektren von **41a** und **41b** mit dem der Modell-„Klick“-Reaktion aus Abbildung 28 zeigte jedoch erneut eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (490 nm). Dies legte die Vermutung nahe, dass das auf der Oberfläche gebundene Fluorescein erneut einen Komplex mit Kupfer ausbildete. Um das anhaftende Kupfer zu entfernen wurde die Oberfläche von Zyклоadditionsprodukt **41a** intensiv mit wässriger EDTA-Lösung

gespült. Es konnte jedoch keine Bandenverschiebung in Richtung geringerer Wellenlängen beobachtet werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Kupfer sehr fest an die Oberfläche koordinierte oder sterisch abgeschirmt wurde.

3.9 RGD-Anbindung und biologische Evaluation

In den Kapiteln 3.2 bis 3.8 wurde bereits ausführlich die Funktionalisierung der PMP-Membranen beschrieben und diskutiert. Schema 16 zeigt eine Übersicht über die bisher durchgeführte Oberflächenchemie zu dem PMP-Derivaten **28a**, **28b**, **30a** und **30b**, sowie die Kupplung des RGD-Peptides c[RGDfK(N₃)] **13** durch eine Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Zykloaddition.



Schema 16: Übersicht der Funktionalisierung der PMP-Membran mit RGD. a) 1) Formiergasplasma-behandlung 2) *dip coating* mit **23a** oder **23b** in MeOH, 3) UV, RT, 3 h, 0.02 mbar, b) NHS, DCC, DIPEA, DMF, RT, 12 h, c) CuI, H₂O, c[RGDfK(N₃)] **13** RT, 3 d, d) DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 3 d.

Nach einer Formiergasplasma-Vorbehandlung erfolgte die Nitreninsertion von Linker **23a** oder **23b**. Im nächsten Schritt wurden zwei verschiedene Bausteine **18** oder **29** aufgebracht, deren Alkinfunktionalität in einer Kupfer-katalysierten, 1,3-dipolaren Zykladdition mit zyklischem RGD Peptid weiter umgesetzt werden sollten. Diese Reaktion wurde bereits mit Azidfluorescein **38** als Modellsubstanz durchgeführt (Kapitel 3.8) und nun auf c[RGDfK(N₃)] **13** übertragen (Schema 16).

Die PMP-Derivate **43a**, **43b**, **44a** und **44b** wurden im Folgenden durch Besiedlung mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnurblut untersucht.⁸⁸ Die Isolierung und Aufbereitung erfolgte wie von HESS *et al.* zuvor beschrieben.¹⁰ Anschließend wurden die Zellen auf etwa 6 cm² große Stücke der PMP-Membran in einer Dichte von 3.5x10⁴ Zellen/cm² aufgebracht und nach zwei Tagen mit Calcein-Acetomethylester gefärbt. Die Adhärenz und das Wachstum der Zellen wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Als Negativkontrolle wurden unbeschichtete PMP-Folien verwendet, auf denen keinerlei Zellwachstum zu beobachten war (nicht gezeigt). Als Standard wurden Zellen auf Heparin/Albumin getränkten Oberflächen kultiviert, welche derzeit industriell eingesetzt werden (Abbildung 31a).

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der biologischen Evaluation der PMP-Folien hergestellt nach Weg 1 (Schema 16). In Abbildung 31b ist der Zellbewuchs nach der Formiergasplasma-Behandlung zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an adhärenierten Zellen etwa der der Heparin/Albumin-Beschichtung entsprach. Dies ist vermutlich auf eine gestiegene Hydrophilie verglichen mit der unbehandelten Membran zurückzuführen.⁸⁹ Jedoch können lediglich Plasma-behandelte Folien nicht in Oxygenatoren angewendet werden, da die Oberfläche mit der Zeit altert und die Hydrophilie abnimmt. Dieser *aging effect* ist hauptsächlich auf einen Entropie-getriebenen Prozess zurückzuführen, bei dem die durch die Plasma-Behandlung erzeugten, polaren Gruppen in das Material einsinken.⁸⁹ Das Abnehmen der Hydrophilie ließ sich durch wiederholte Messung des Kontaktwinkels nach Plasma-Behandlung visualisieren (Tabelle 4). Es konnte beobachtet werden, dass der Kontaktwinkel zunächst durch die Plasma-Behandlung von 107° auf 46.1° sank (vergl. Kapitel 3.4.2), dann aber innerhalb von zwei Monaten wieder auf 74.7°

⁸⁸ Die biologischen Examinationen der PMP Folien wurde von Dr. rer. physiol C. Hess durchgeführt, Medizinische Hochschule Hannover; Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

⁸⁹ K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H.J. Griesser, *Plasma Proc. Polym.* **2006**, 3, 392-418.

anstieg. Alternde Oberflächen können jedoch in der Medizintechnik nicht angewendet werden, da eine gleichbleibende Qualität des Produkts nicht garantiert werden kann.

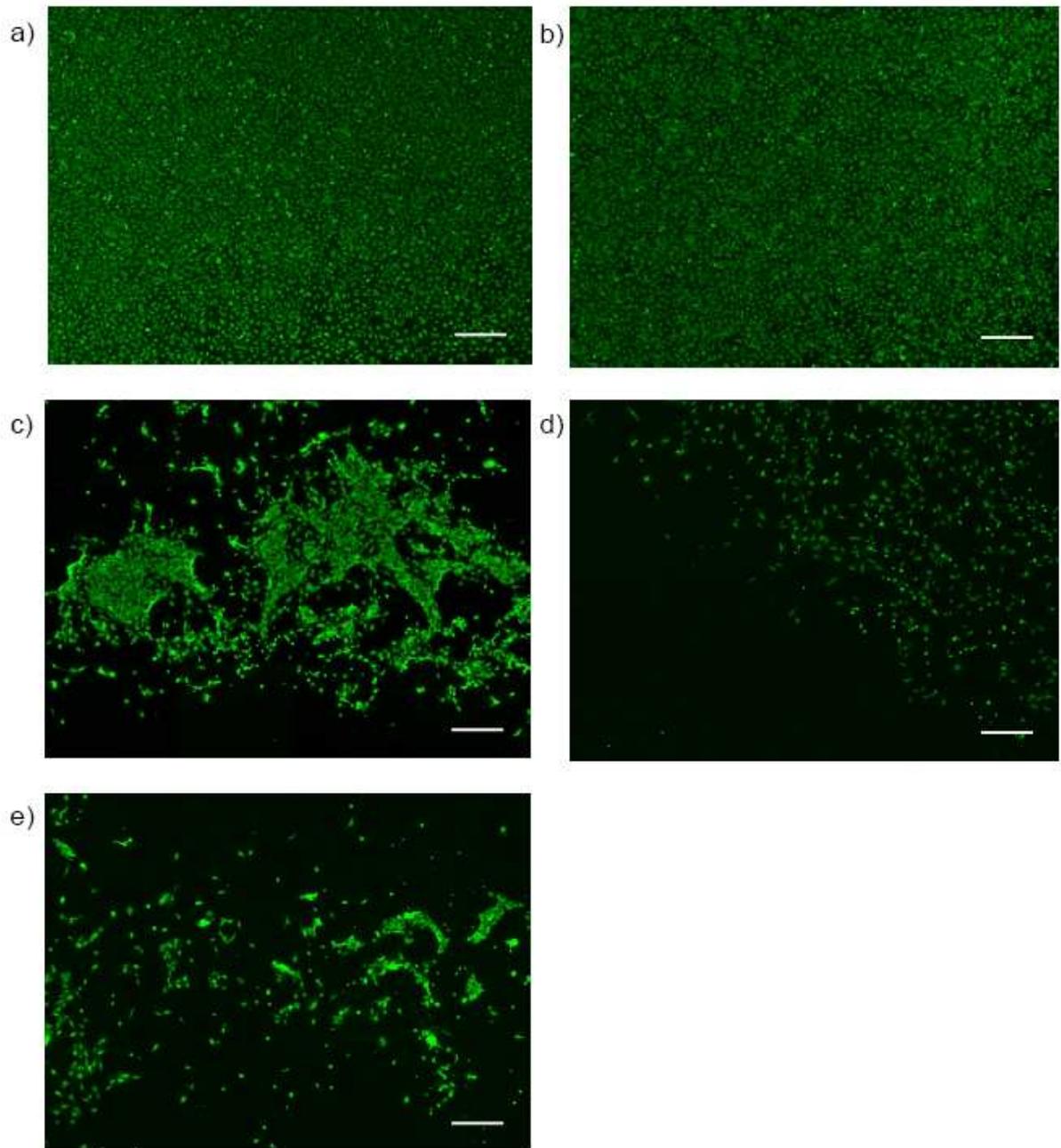


Abbildung 31: Bewuchs von PMP-Derivaten hergestellt nach Weg 1 (Schema 16) mit Endothelzellen (Maßstab entspricht 500 µm): a) Kontrolle; PMP mit Heparin/Albumin-Beschichtung; b) PMP nach Formiergasplasma-Behandlung; c) PMP nach Formiergasplasma-Behandlung und PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion; d) PMP nach Formiergasplasma-Behandlung, PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion und Kupplung von Baustein **18**; e) PMP nach Formiergasplasma-Behandlung, PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion, Kupplung von Baustein **18** und RGD-Anbindung.⁸⁸

Tabelle 4: Kontaktwinkel von PMP vor und nach Formiergasplasma-Behandlung.

PMP-Derivat	Kontaktwinkel	Streuung
PMP ohne Formiergasplasma-Behandlung	107°	1.15
1 Tag nach Formiergasplasma-Behandlung	46.1	6.5°
1 Woche nach Formiergasplasma-Behandlung	69.4°	5.2°
2 Monate nach Formiergasplasma-Behandlung	74.7°	1.7

Nachdem die Formiergasplasma-behandelte Oberfläche einen dichten Bewuchs mit Endothelzellen aufwies, wurden auch die PMP Derivate **27a**, **28a** und **43a** biologisch evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Insertion von PFFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** die Menge an adhärennten Zellen deutlich reduziert wurde (Abbildung 31c). Ein weiterer Rückgang zeigte sich nach Anbindung des alkinhaltigen Bausteins (Abbildung 31d).

Zudem wurde der Einfluss des durch die „Klick“-Reaktion angebrachten RGD-Peptids untersucht (Abbildung 31e). Es konnte jedoch nur eine geringe Zunahme des Zellbewuchses beobachtet werden. Die Menge der adhärennten Zellen zeigte sich als nahezu konstant verglichen mit der RGD-freien PMP-Folie **28a**.

Außerdem wurden die anderen RGD-haltigen PMP-Derivate, die nach Schema 16 Weg 1 und Weg 2 hergestellt wurden, biologisch untersucht (Abbildung 32). Diese Oberflächen unterschieden sich von den in Abbildung 31 gezeigten durch die Verwendung eines längeren Linkers beziehungsweise die Anbindung des anderen, alkinhaltigen Linker-Bausteins **29**. Die Zellen aus Abbildung 32 wurden jedoch nicht gefärbt, sondern ausschließlich mikroskopisch untersucht. Die Isolierung und Aussiedlung der Zellen erfolgte allerdings wie zuvor beschrieben.

Zum besseren Vergleich wurde PMP-Derivat **43a** noch einmal dargestellt (Abbildung 32a). Es ließ sich jedoch beobachten, dass die Wahl des verwendeten Bausteins (Abbildung 32 b) keinen Einfluss auf die Menge an adhärennten Endothelzellen hatte. Gleichermäßen verhielt es sich mit der Verwendung eines längeren PEG-Linkers, der den RGD-Peptiden mehr konformationelle Freiheit gewähren und somit eine Integrinbindung erleichtern sollte (Abbildung 32c). Die Kombination aus längerem PEG-Linker und Baustein **29** führte ebenfalls zu unbefriedigenden Ergebnissen (Abbildung 32d).

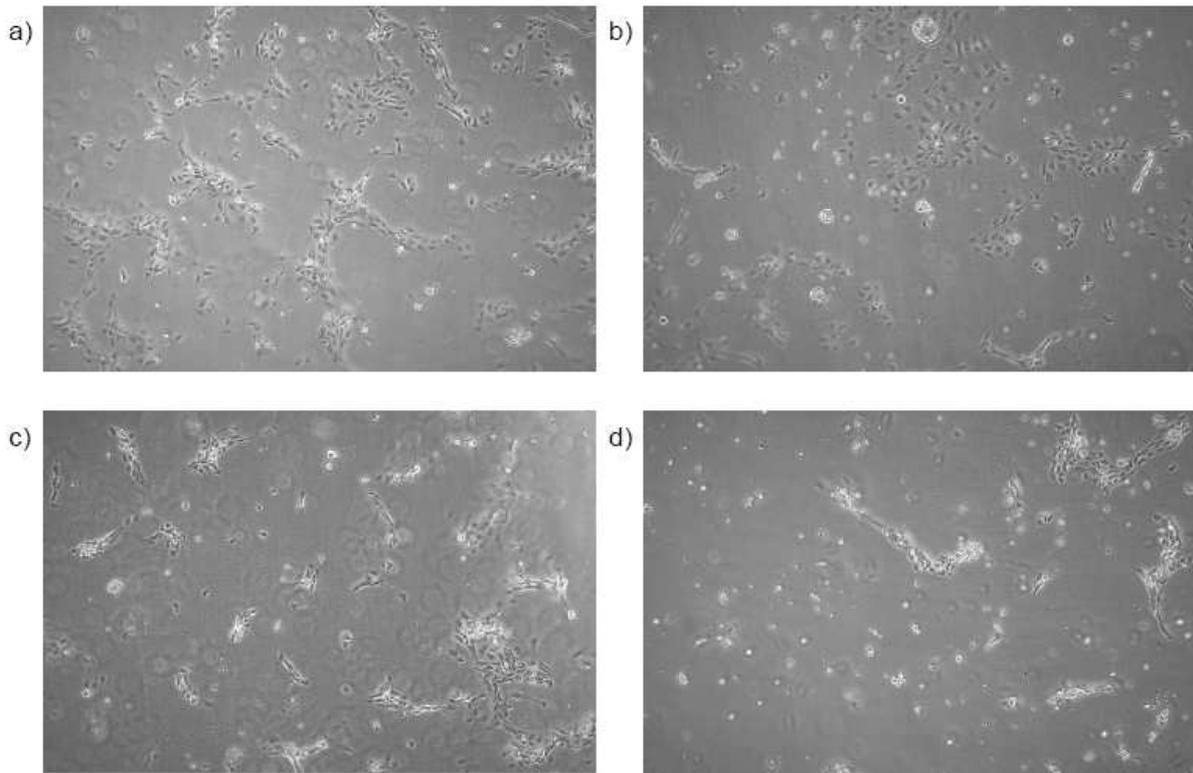


Abbildung 32: Bewuchs von PMP-Derivaten hergestellt nach Schema 16, Weg 1 bzw. 2 mit Endothelzellen; alle nach Formiergasplasma-Behandlung, PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion; a) und PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion, Anbindung von Baustein **18** und RGD; b) und PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**-Insertion, Anbindung von Baustein **29** und RGD; c) und PFPA-PEG_n-NH₂ **23b**-Insertion, Anbindung von Baustein **18** und RGD d) und PFPA-PEG_n-NH₂ **23b**-Insertion, Anbindung von Baustein **29** und RGD.⁸⁸

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anbindung von RGD-Peptiden über die in Schema 16 gezeigte Reaktionsfolge nicht zu der erhoffen Steigerung an adherierten Endothelzellen auf der PMP-Membranen führte.

3.10 Kupfer-freie 1,3-dipolare Zykladdition

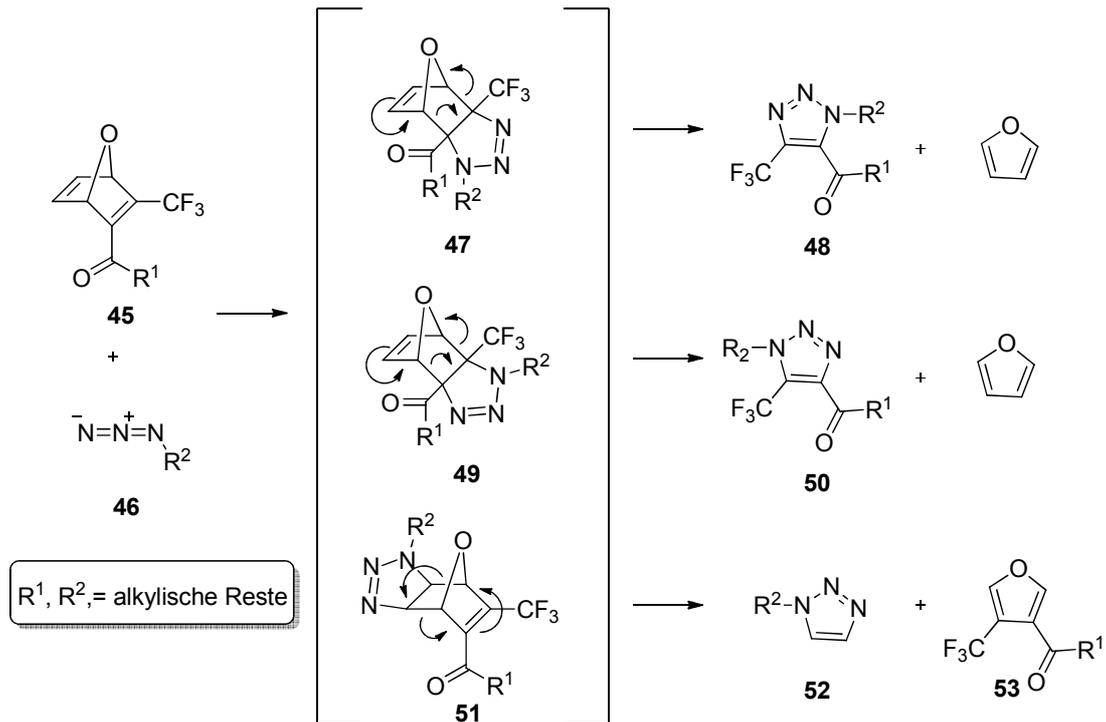
Da die in Kapitel 3.9 beschriebene, Kupfer-katalysierte Ligation von azid-funktionalisierten Substraten an PMP nur zu unbefriedigenden biologischen Ergebnissen führte, sollte alternativ eine Kupfer-freie Ligation untersucht werden. Indem auf das zelltoxisches Kupfer verzichtet wurde, sollte eine höhere Verträglichkeit der in der medizinisch verwendeten Polymere erreicht werden.⁹⁰ Dieses ist von besonderer Bedeutung, da sich das in der 1,3-dipolaren Zykladdition eingesetzte Kupfer nicht vollständig von der Oberfläche entfernen ließ (vergl. Abbildung 30). Daher wurde als Kupfer-freie Variante die von RUTJES *et al.* entwickelte Oxanorbornadien-Azid-Ligationsstrategie verwendet.⁹¹ Bei Oxanorbornadien **45** handelt es sich um ein besonders aktives Alkinderivat, das bei Azid-Zugabe ohne weitere Katalyse zum Triazol reagiert. Diese Ligation erfolgt über eine 1,3-Zykladdition/retro-DIELS-ALDER Kaskade (Schema 17). Die HUISGEN-Reaktion läuft dabei ohne weitere Energiezufuhr ab, da durch die hohe Ringspannung und die starke Elektronenarmut des 1,3-Dienophils dessen Energie des LUMOs stark herabgesetzt ist.

Der Mechanismus wurde von RUTJES *et al.* bereits eingehend untersucht und beschrieben.⁹¹ Es konnte beobachtet werden, dass nach Zusammenfügen von Oxanorbornadien **45** und Azid **46** zwei diastereomere Triazole **48** und **50** gebildet wurden. Daher wurden zwei Übergangszustände **47** und **49** postuliert, die sich in der Regiochemie der 1,3-dipolaren Zykladdition unterschieden. Triazol **50** wurde dabei etwa in einem Überschuss von 1.5:1 gebildet.

Zudem konnte eine Nebenreaktion zu Triazol **52** und dem substituierten Furan **53** beobachtet werden. In diesem Fall erfolgte der Angriff des Azids auf die elektronisch ungünstigere, aber sterisch weniger anspruchsvolle Doppelbindung des Oxanorbornadiensystems. Abhängig von der Sperrigkeit der Substituenten und dem verwendeten Lösungsmittel lag der Anteil dieser Nebenreaktion zwischen drei und 16%.

⁹⁰ a) Y. Ogra, *J. Health Sci.* **2011**, *57*, 385-396, b) C. J. Lin, H. C. Huang, Z. F. Jiang, *Brain Res. Bull.* **2010**, *82*, 235-242.

⁹¹ a) 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; b) S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pingen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1805-1815; c) B. H. M. Kuijpers, S. G. Groothuys, A. C. Soede, P. Laverman, O. C. Boerman, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1847-1854.

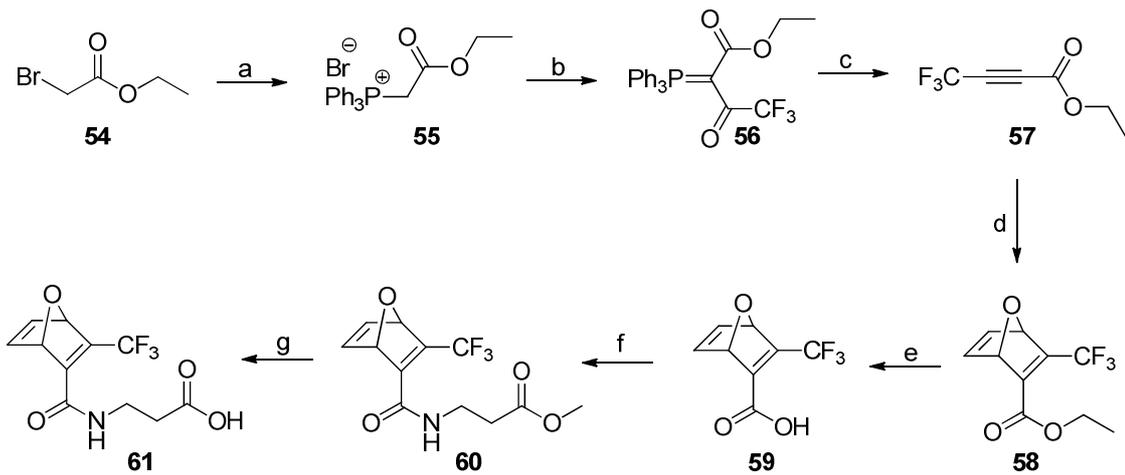


Schema 17: Mechanismus der Kupfer-freien Ligation nach RUTJES *et al.*⁹¹

Die Synthese des Oxanorbornadiensystems **61** für die Kupfer-freie „Klick“-Chemie beruht auf den Arbeiten von RUTJES *et al.* und wurde anschließend von SU *et al.* modifiziert (Schema 18).^{91,92,93} Dabei wurde zunächst Bromessigsäureethylester **54** in das entsprechende Triphenylphosphoniumsalz **55** überführt. Anschließend wurde **55** mit Trifluoressigsäure umgewandelt. Nach der Pyrolyse konnte Alkin **57** erhalten werden. Aufgrund dessen Instabilität, wurde sofort eine DIELS-ALDER Reaktion mit Furan durchgeführt. Nach Verseifung des Ethylesters **58** wurde Oxanorbornadien **59** erhalten. Die Säurefunktion sollte im Folgenden zur Anbindung eines Substrats wie zum Beispiel der PMP-Membran dienen. Da diese jedoch durch das Oxanorbornadiensystem sterisch abgeschirmt werden könnte, wurde die Säure durch Kupplung mit β -Alanin-Methylester verlängert. Nach erneuter Verseifung konnte so Oxanorbornadien **61** erhalten werden.

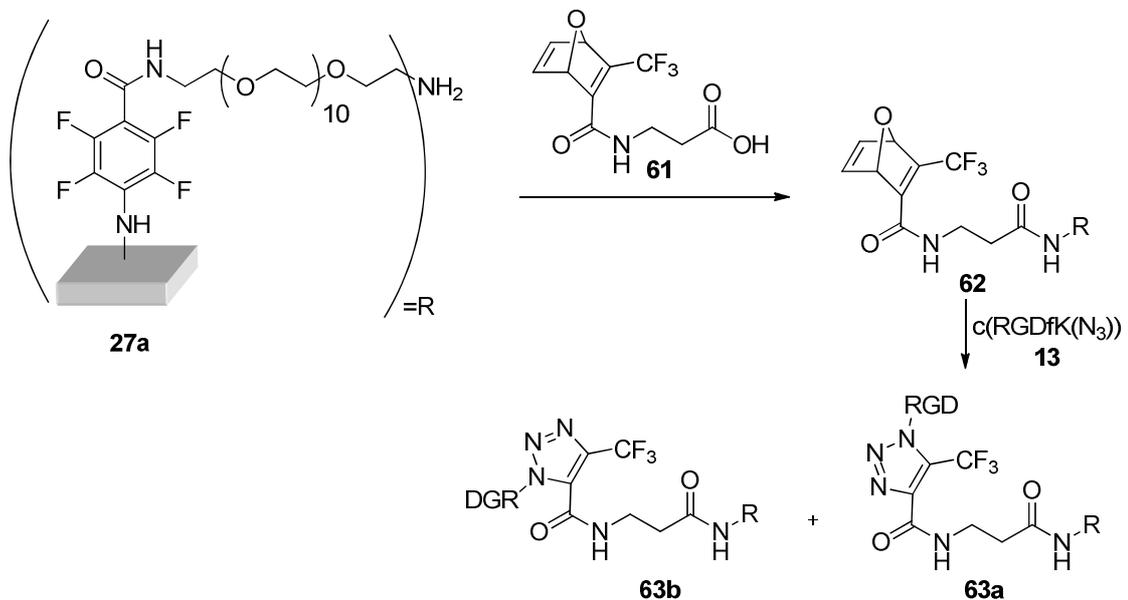
⁹² Y. Su, C. Kasper, A. Kirschning, G. Dräger, S. Berski, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 1028-1033.

⁹³ Die Oxanorbornadiene **59** und **61** wurden freundlicherweise bereitgestellt von A. KRAUSE und Dr. Y. SU.



Schema 18: Synthese von Oxanorbornadien **61**. a) PPh_3 , KI, Toluol, RT, 48 h, 99%, b) NEt_3 , Trifluoressigsäure, THF, 0 °C, 1.5 h, 99%, c) 180-230 °C, 83%, d) Furan, 60 °C (mw), 30 min, 78%, e) LiOH, THF/ H_2O , 0 °C, 30 min, 90%, f) β -Alanin Methylester, DMAP, EDC, CH_2Cl_2 , RT, 12 h, 38%, g) LiOH, THF/ H_2O , 0 °C, 2 h, 87%.

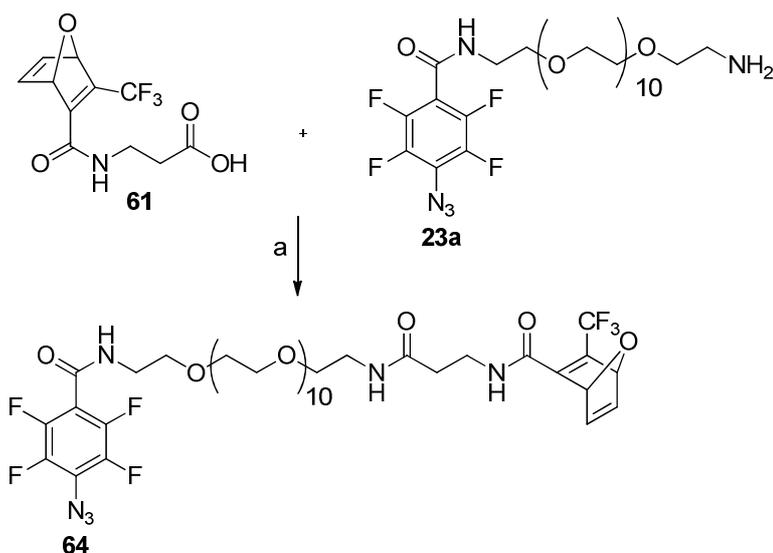
Oxanorbornadien **61** sollte analog zu dem in Kapitel 3.7 beschriebenen Baustein **18** durch Standard-Carbodiimid-Chemie an das PMP-Derivat **27a** gebunden werden (Schema 19). Die Synthese wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich diskutiert und in Schema 16 zusammengefasst.



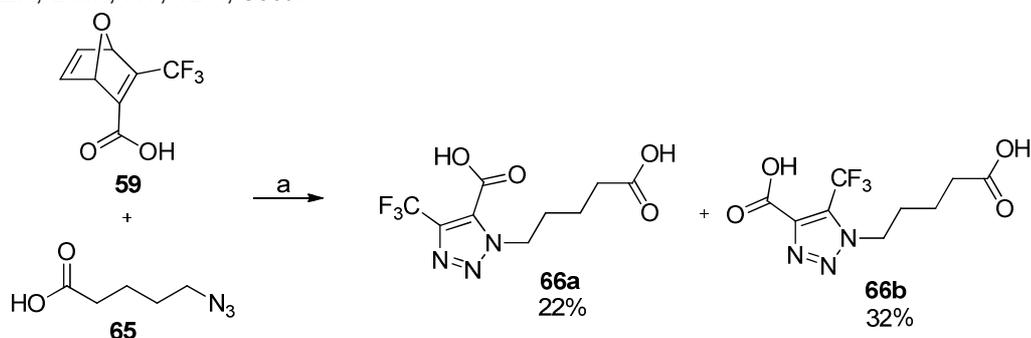
Schema 19: Funktionalisierung von PMP mit RGD-Peptiden über Kupfer-freie 1,3-dipolare Zykloaddition.

Da die Erfahrungen der Kupfer-katalysierten Route bereits gezeigt hatten, dass nur geringe Unterschiede zwischen den PEG-*spacern* mit verschiedenen Längen zu erwarten sind, wurde im Rahmen dieser Untersuchung ausschließlich PMP-Derivat **27a** mit dem kürzeren Linker zur weiteren Funktionalisierung verwendet. Zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen für die Carbodiimid-Chemie und der Kupfer-freien 1,3-dipolaren Zyклоaddition wurden erneut Modellreaktionen durchgeführt. Eine Reaktion von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** mit Oxanorbornadien **61** führte in einer Ausbeute von 60% zu Kupplungsprodukt **64** (Schema 20).

Die Kupfer-freie „Klick“-Chemie wurde am Beispiel von Oxanorbornadien **61** und 5-Azidopentansäure **65** durchgeführt (Schema 21). Es konnten beide Regioisomere **66a** und **66b** erhalten werden. Die Stereokontrolle der Reaktion spielt allerdings für die Reaktion am Polymer keine Rolle, da lediglich ein Ligation von RGD-Peptid und Polymer erzielt werden sollte.



Schema 20: Modellreaktion: Kupplung von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** mit Oxanorbornadien **61**. a) NHS, DCC, DIPEA, DMF, RT, 12 h, 60%.



Schema 21: Modellreaktion: Kupfer-freie Ligation von Oxanorbornadien **59** mit 5-Azidopentansäure **65**. a) MeOH, RT, 12 h.

Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen auf das Polymer übertragen (Schema 19). Dabei wurden zwei Änderungen vorgenommen. Zum einen wurde die Reaktionszeit auf je etwa drei Tage erhöht, da am Polymer eine sterische Abschirmung der reaktiven Zentren und eine eingeschränkte Dynamik der Substrate zu erwarten war. Außerdem wurde die 1,3-dipolare Zykladdition mit zyklischem RGD-Peptid **13** aufgrund der veränderten Polarität im Vergleich mit der Modellsubstanz 5-Azidopentansäure **65** in Wasser statt in Methanol durchgeführt.

Neben $c[\text{RGDfK}(\text{N}_3)]$ **13** wurde zudem in gleicher Weise Azidofluorescein **38** an das Polymer gebunden, um den Erfolg der Kupfer-freien „Klick“-Reaktion zu untersuchen. Die Absorption der Fluorescein-beschichteten Folien wurde, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, UV-spektroskopisch untersucht (Abbildung 33). Es konnte beobachtet werden, dass nach Kupfer-freier 1,3-dipolarer Zykladdition Fluorescein deutlich auf der Oberfläche nachzuweisen war (Abbildung 33, durchgezogene Linie). Vor der Reaktion konnte im Gegensatz dazu kein Absorptionsmaximum zwischen 400 und 600 nm detektiert werden (Abbildung 33, gepunktete Linie).

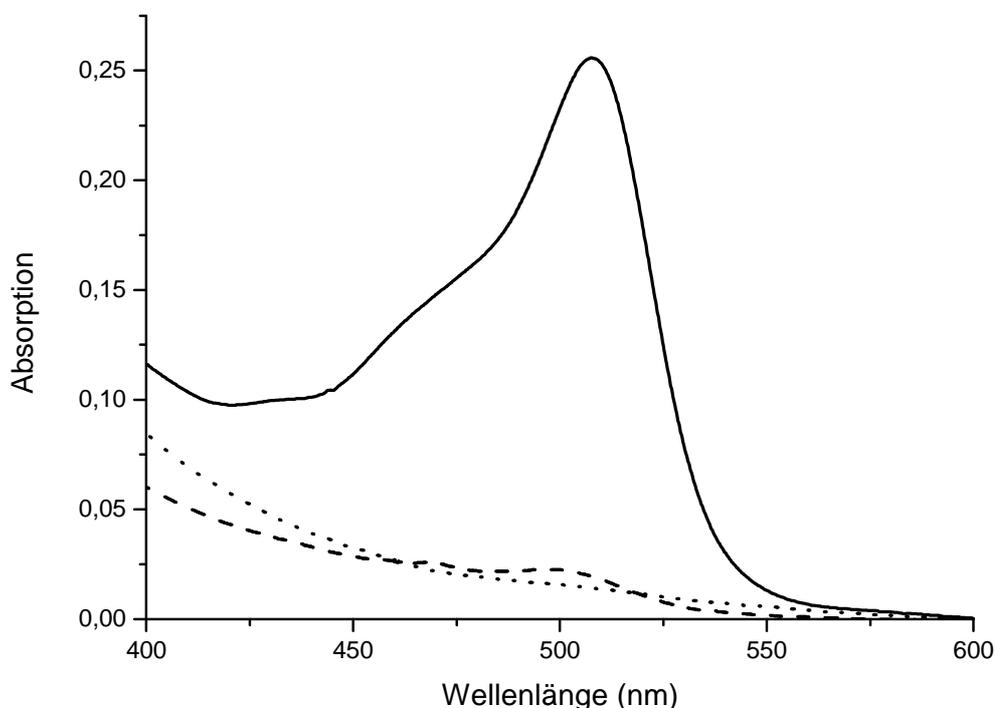


Abbildung 33: Durchgezogene Linie: Absorption von Zykladditionsprodukt **63** (Cu-frei); gestrichelte Linie: Absorption von Zykladditionsprodukt **43a** (Cu-katalysiert); gepunktete Linie: PMP-Derivat **62** vor „Klick“-Reaktion.

Ein Vergleich zwischen Kupfer-haltiger (Abbildung 33 bzw. Abbildung 30, gestrichelte Linie) und Kupfer-freier „Klick“-Chemie ergab nach Kupfer-freier Anbindung einen etwa 11fach höheren Wert. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die Kupfer-freie „Klick“-Chemie am Polymer effektiver ablaufen kann, weil das für die Azid-Alkin-Chemie benötigte Kupfer möglicherweise nicht homogen in der Reaktionslösung verteilt ist.

3.11 Biologische Evaluation der Kupfer-freien Ligation

Nachdem c[RGDfK(N₃)] **13** mittels Kupfer-freier „Klick“-Chemie nach Schema 19 auf die PMP Membran aufgebracht war, wurden auch diese Oberflächen biologisch evaluiert. Wie bereits in Kapitel 3.9 beschrieben, wurden zu diesem Zweck Endothelzellen auf der Oberfläche kultiviert.^{88,10}

Abbildung 34a zeigt dabei die Menge an Endothelzellen auf PMP-Derivat **62**.⁸⁸ Da dieses Polymer noch nicht mit RGD Peptiden funktionalisiert wurde, konnte auch kaum Zellbewuchs beobachtet werden. Nach der Kupfer-freien „Klick“-Chemie konnte dagegen ein signifikanter Anstieg der Menge an Endothelzellen beobachtet werden (Abbildung 34b). Es ließ sich ein homogener Bewuchs feststellen.

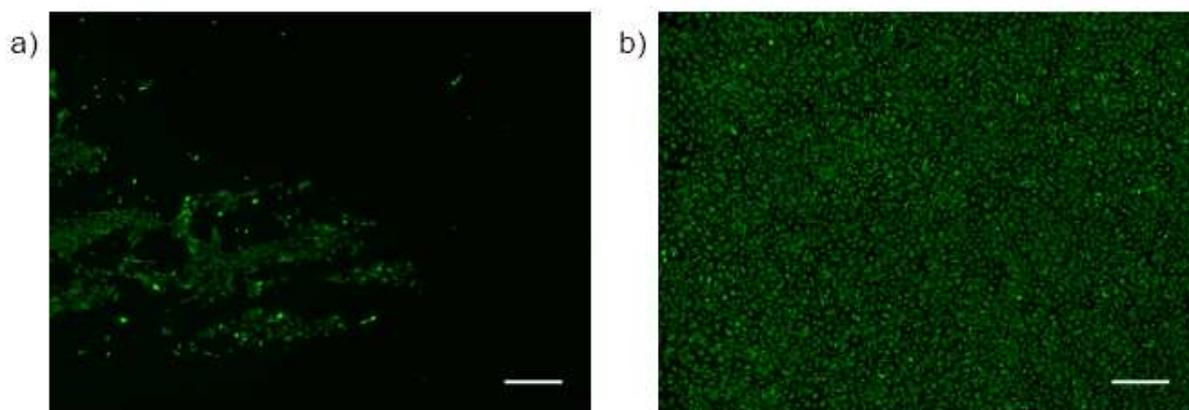


Abbildung 34: Bewuchs von PMP-Derivaten hergestellt nach Schema 19 mit Endothelzellen (Maßstab entspricht 500 µm) a) PMP-Derivat **62** mit Linker für Cu-freie 1,3-dipolare Zykladdition; b) PMP-Derivat **63** nach Cu-freier RGD Anbindung.⁸⁸

Vergleichend mit der Methode der Kupfer-katalysierten „Klick“-Chemie (Abbildung 31), zeichnete sich diese Synthesestrategie als deutlich effizienter aus. Dies lässt sich zum einen mit der zelltoxischen Wirkung des Kupfers begründen, die möglicherweise zur Apoptose der Endothelzellen führte. Zum anderen konnte auch

gezeigt werden, dass die Kupfer-freie 1,3-dipolare Zykoaddition am Polymer mit deutlich besseren Ausbeuten ablief (vergl. Abbildung 33).

Zur Quantifizierung der Zellen wurde die Intensität der Fluoreszenz bei 385 beziehungsweise 535 nm bestimmt.⁸⁸ Dabei diente die Heparin/Albumin beschichtete Oberfläche erneut als Referenz und wurde auf einen Wert von 100% gesetzt. Die Intensität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PMP-Folien wurde über acht Messungen gemittelt (Abbildung 35). Die Ergebnisse der Quantifizierung bestätigten erneut, dass die Kupfer-freie Ligation von RGD-Peptiden (Abbildung 35d) zur einer Steigerung des Zellwachses gegenüber Derivat 62 ohne RGD (Abbildung 35c) führte. Die Menge an adhärenierten Zellen entspricht etwa dem des derzeitigen, industriellen Standard der Heparin/Albumin-beschichteten PMP-Membranen (Abbildung 35a). Eine Untersuchung bezüglich einer verbesserten Stabilität des in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukts unter Flussbedingungen ist derzeit in Bearbeitung.

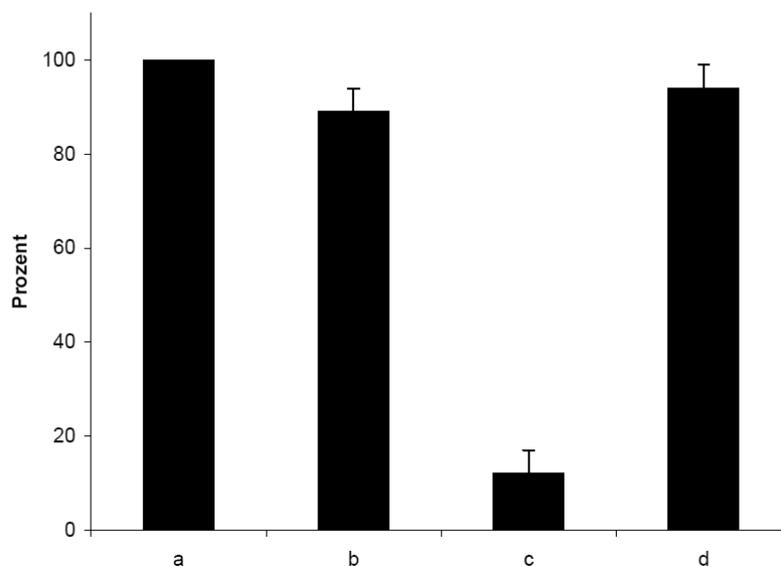


Abbildung 35: Quantifizierung der Endothelzellen auf verschiedenen PMP-Derivaten a) PMP mit Heparin/Albumin Beschichtung (auf 100% gesetzt); b) PMP nach Formiergasplasma-Behandlung; c) PMP-Derivat **27a** nach Linkerinsertion; d) PMP-Derivat **63** nach Cu-freier RGD Anbindung.⁸⁸

Anschließend wurde die Funktionalisierung der PMP-Folien mit RGD-Peptiden auf die PMP-Hohlfasermatten übertragen. Diese werden in den Oxygenatoren standardmäßig eingesetzt und entsprechen daher dem industriellen Standard. Die Herausforderung lag dabei in der homogenen, chemischen Beschichtung des dreidimensionalen Polymers. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch auf den Hohlfasermatten nach Funktionalisierung mit RGD-Peptiden eine homogene

Besiedlung mit Endothelzellen eintrat (Abbildung 36).⁹⁴ Bereits nach 24 Stunden war ein dichter Bewuchs zu beobachten, der auch nach 72 Stunden intakt war.

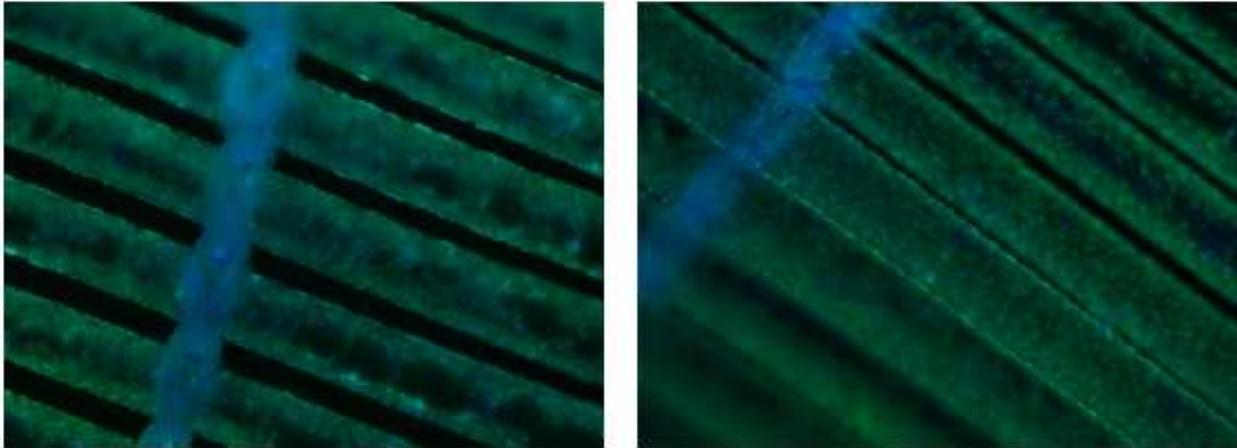


Abbildung 36: Bewuchs von PMP-Hohlfasern hergestellt nach Schema 19 mit Endothelzellen; links: PMP-Derivat **63** nach 24 Stunden, rechts: PMP-Derivat **63** nach 72 Stunden.⁹⁴

⁹⁴ Die biologischen Examinationen der PMP-Hohlfasermatten wurde von Dr. med B. Wiegmann durchgeführt, Medizinische Hochschule Hannover; Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

3.12 XPS-Analyse der Kupfer-freien Ligation

Nachdem die biologische Evaluation der PMP-Membranen, die über Kupfer-freie „Klick“-Chemie mit RGD Peptiden funktionalisiert wurden, zufriedenstellende Ergebnisse geliefert hatte (Abbildung 34b), wurde die Oberfläche erneut mit XP-Spektroskopie charakterisiert.

Sowohl die Formiergasplasma-Behandlung als auch die Nitreninsertion wurden bereits in den Kapiteln 3.4.2 und 3.5 diskutiert. PMP-Derivat **62**, nach Anbindung von Oxanorbornadien **61**, wurde zudem XP-spektroskopisch untersucht. Aus diesen Messungen konnten jedoch keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, da durch die Anbindung von Oxanorbornadien **61** keine neuen Elemente auf die Oberfläche gebracht wurden. Daher sind die Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt.

Ein XP-Übersichtsspektrum nach der 1,3-dipolaren Zykladdition mit RGD-Peptid **63** ist in Abbildung 37 gezeigt. Auf der Oberfläche waren erneut Kohlenstoff aus dem Polymerrückgrad sowie Sauerstoff, Stickstoff und Fluor aus den verschiedenen chemischen Derivatisierungen nachzuweisen (vergl. Abbildung 22; PMP nach Formiergasplasma-Behandlung und Linkerinsertion).

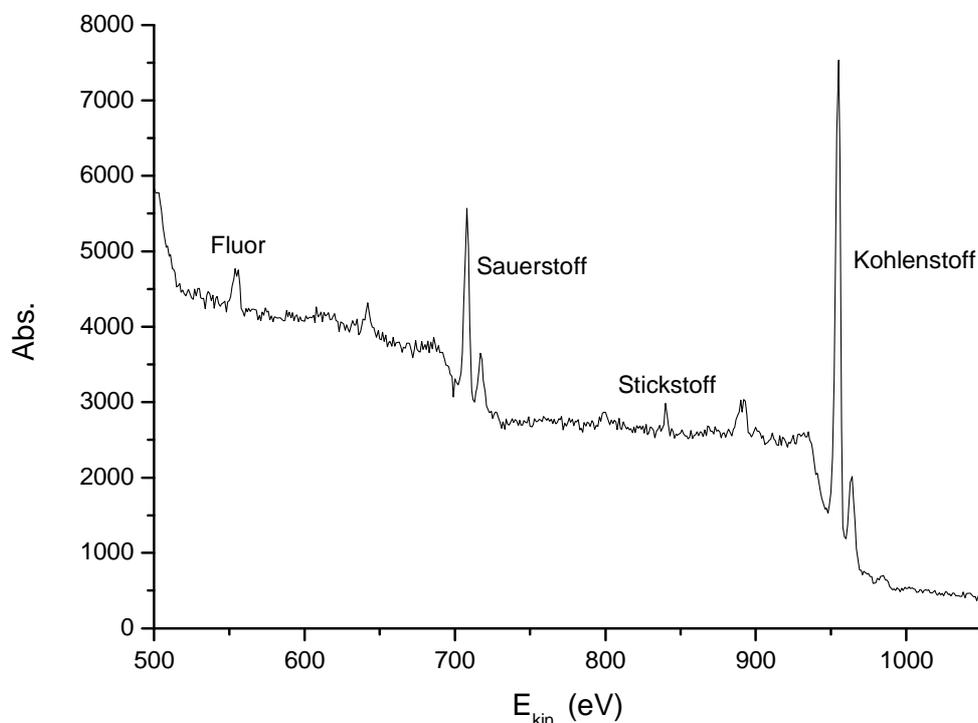


Abbildung 37: Gesamt XP-Spektrum von PMP-Derivat **63** nach Cu-freier „Klick“-Chemie analog zu Schema 19 ; Pass-Energie: 120 eV.

Aufgrund einer neuen Kalibrierung des Messgeräts nach den bis Kapitel 3.6 beschriebenen Untersuchungen, wurde bei der Analyse von PMP-Derivat **63** eine Verschiebung der Wellenlänge beobachtet. Diese Betrag 13.0 eV hin zu höheren kinetischen Energien, beziehungsweise zu tieferen Bindungsenergien. Dies ist vermutlich auf die Nichtleiter-Eigenschaften des PMPs zurückzuführen. Die Spektren werden unkorrigiert gezeigt, die angegebenen Energiewerte wurden dagegen korrigiert. Als Standard wurde dazu der C1s Kohlenstoffpeak auf $E_{\text{kin.}} = 968.6$ eV (BE 285 eV) kalibriert.

Eine Übersicht über die gemessenen kinetischen und Bindungsenergien wird in Tabelle 5 gezeigt. Ein Vergleich mit den Literaturwerten aus Tabelle 1 lieferte dabei die Zuordnung der verschiedenen Substanzklassen. Es wurden die C1s, O1s, N1s und F1s Elektronen untersucht. Die beiden Peaks bei $E_{\text{kin.}} = 641.4$ eV und 891.7 eV (BE 612.2 eV und 361.9 eV) wurden dabei nicht berücksichtigt, da sie keinem Element zuzuordnen waren. Dabei könnte es sich zum Beispiel um AUGER-Elektronen handeln. Möglicherweise handelt es sich jedoch auch um *ghost lines*, die von einer Verschmutzung der Röntgenquelle stammen oder um *shake-up lines* die entstehen sobald komplizierte elektronische Prozesse im Element ablaufen.⁸²

Tabelle 5: Maxima der kinetischen- und Bindungsenergien im XP-Spektrum von PMP-Derivat **63** nach Cu-freier „Klick“-Chemie bei Pass-Energie 120 und Vergleich mit Literaturwerten aus Tabelle 1.

	$E_{\text{kin.}}$ [eV]	BE [eV]	Substanzklasse
C1s	968.6	285.0	C-H, C-C
	967.3	286.3	C-N, C-O, C≡N
	964.5	289.1	N-CO-N, O-C-O, N-C=O, C=O
O1s	721.3	532.3	C-O, C=O
	719.4	534.2	C=O-O
N1s	863.7	399.9	C-N
	852.2	401.4	N-C=O, C=N, C≡N
F1s	569.3	684.3	k.A.
	566.7	686.9	CHF-CH ₂

Eine Hochauflösung des Fluorpeaks ist in Abbildung 38 gezeigt. Es konnte ein Peak mit zwei Maxima beobachtet werden, sodass darauf geschlossen werden kann, dass Fluor in zwei verschiedenen Bindungsarten auf der Oberfläche vorliegt. Dies entspricht der erwarteten Struktur der beschichteten Oberfläche. Zum einen ist arylisches Fluor an dem Tetrafluoraromaten des PEG-*spacers* zu finden. Zum anderen befindet sich eine CF₃-Gruppe an dem neu formierten Triazolring, der über die Kupfer-freie „Klick“-Chemie eingeführt wurde. Durch das Auftreten zweier Peaks unterscheidet sich das XP-Spektrum des Fluors somit deutlich von dem des PMP-Derivats **27a** nach der Linkerinsertion (Abbildung 23), bei dem nur ein symmetrischer Peak zu beobachten war. Dieser Peak mit zwei Maxima war bereits nach Linkeranbindung (PMP-Derivat **62**) deutlich erkennbar (nicht gezeigt).

Ein genauer Vergleich der kinetischen Energien der Fluorpeaks mit Literaturdaten konnte leider nicht erfolgen, da fluorhaltige, organische Proben selten mittels XP-Spektroskopie analysiert werden.⁹⁵ In eine Arbeit von FERRARIA *et al.* wurde lediglich für alkylich gebundenes Fluor eine BE von 686.9 eV angegeben.⁸³ Arylisches Fluor wurde nicht untersucht, F1s Elektronen in CF₃-Gruppen wurden nicht von anderen Fluorbindugsarten unterschieden.

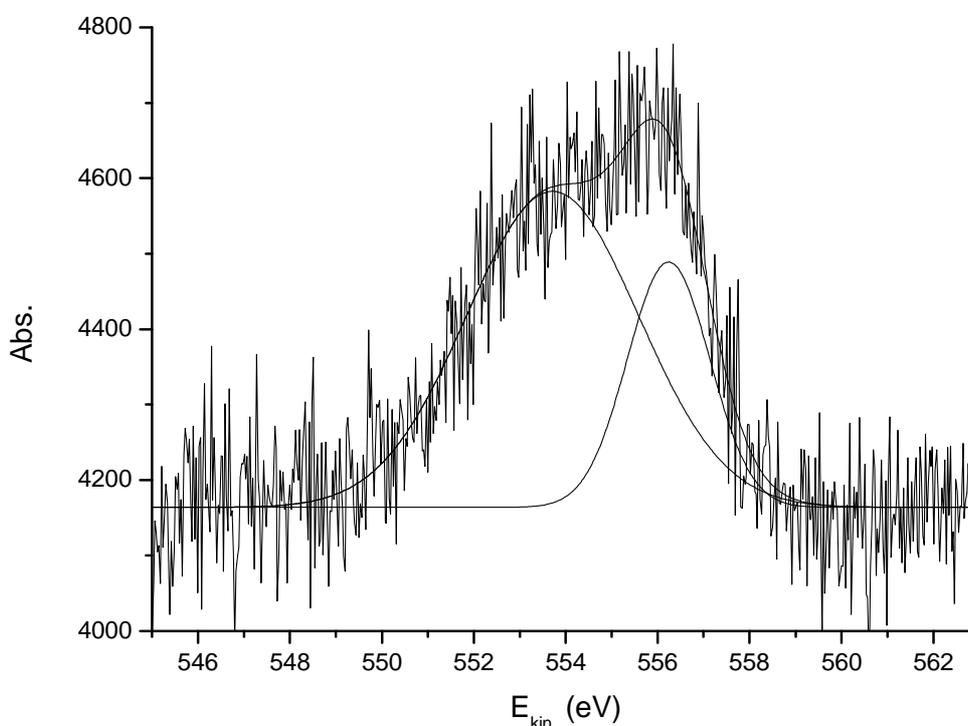


Abbildung 38: Hochauflösung des Fluorpeaks im XP-Spektrum von PMP-Derivat **63**; Pass-Energie: 120 eV.

⁹⁵ <http://srdata.nist.gov/xps/> (Zugriff: 25.11.2011).

Leider konnte der korrespondierende C1s-Peak der CF₃-Gruppe nicht in der Hochauflösung des Kohlenstoffpeaks beobachtet werden (Abbildung 39). Dieser wäre um BE 293.7 eV ($E_{\text{kin.}} = 960$ eV) zu erwarten gewesen. Da das Polymer PMP jedoch hauptsächlich aus sp³-hybridisiertem Kohlenstoff besteht, ist die Intensität des C1s-Peaks der CH₃-Gruppen im Vergleich zu nur einer CF₃-Gruppe pro Linkermolekül sehr groß. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der C1s Peak der CF₃-Gruppe im Grundrauschen untergeht. Da die Analyse der Hochauflösung von Sauerstoff- und Stickstoffpeak keine neuen Erkenntnisse lieferte, werden diese Spektren nicht gezeigt.

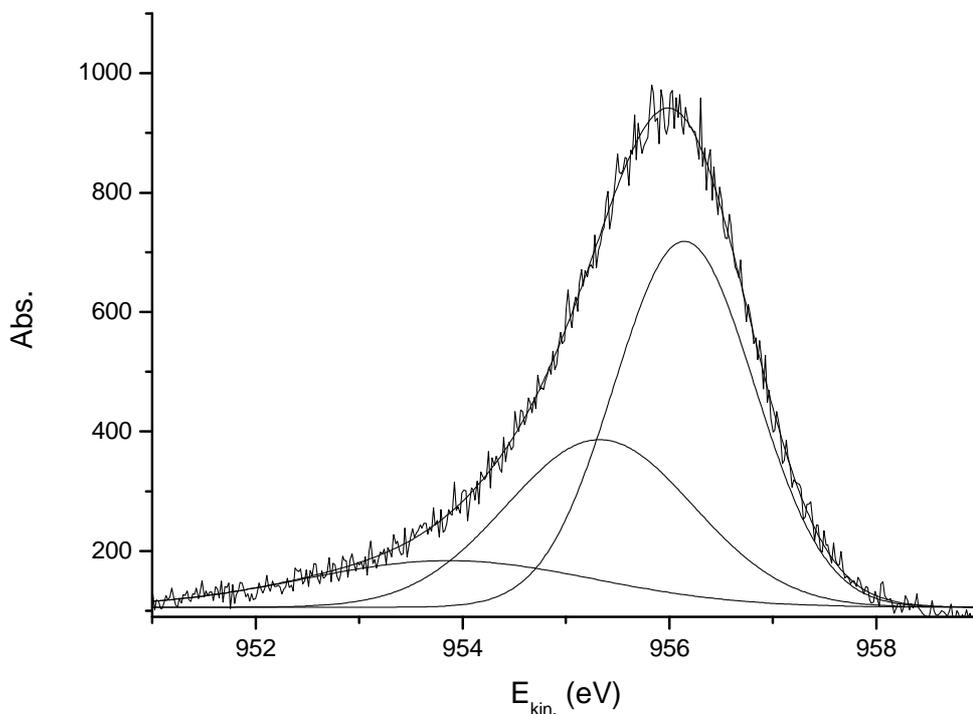


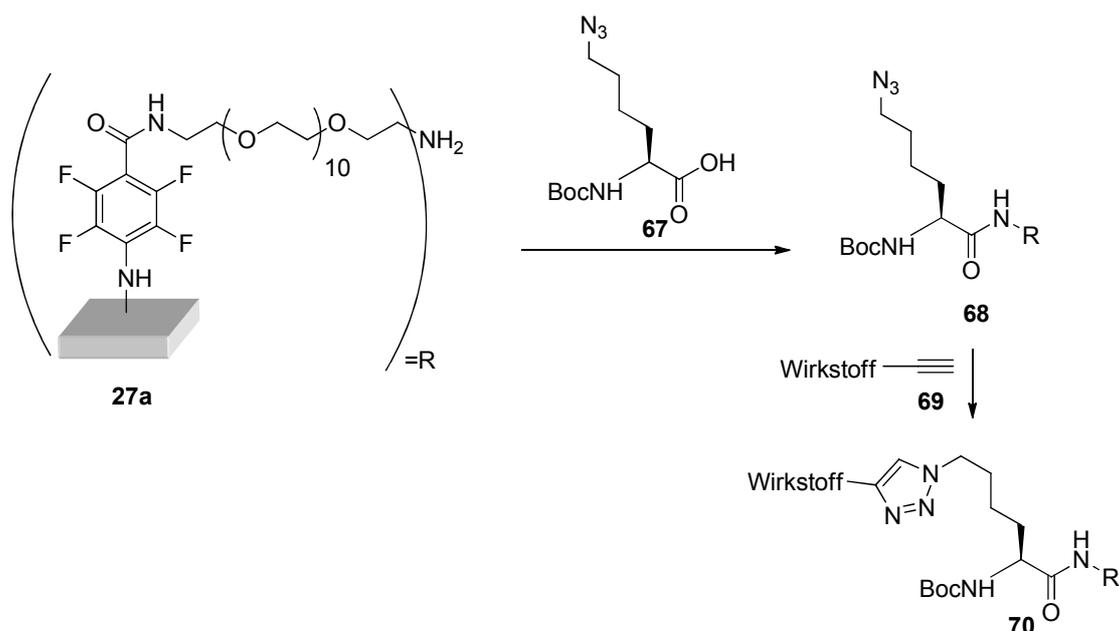
Abbildung 39: Hochauflösung des Kohlenstoffpeaks im XP-Spektrum von PMP-Derivat **63**; Pass-Energie: 30 eV.

3.13 Weitere Derivatisierungen

3.13.1 Azid Derivate

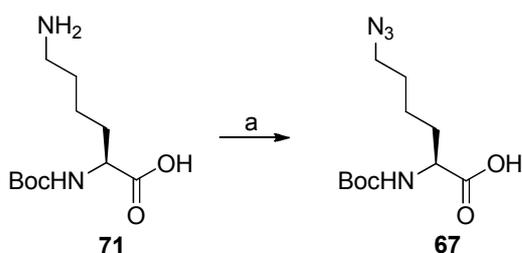
In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Kupplung eines Alkin-funktionalisierten Linkers an die PMP-Oberfläche diskutiert, welcher im Folgenden mit Azid-funktionalisierten, zyklischem RGD-Peptid durch „Klick“-Reaktion verbunden wurde. Neben diesen PMP-Derivaten sollten jedoch auch solche die mit einer Azidfunktionalität hergestellt werden. Derart modifizierte Oberflächen böten die Möglichkeit, Alkin-funktionalisierte Naturstoffe an die Oberfläche zu binden. Auf diese Weise könnte, wie bei dem Ansatz der Anbindung von RGD-Peptiden, die Biokompatibilität erhöht werden, um eine zelluläre Besiedlung zu ermöglichen. Andererseits könnten auch Wirkstoffe gebunden werden, die eine Biofilmbildung inhibieren oder Medikamente freisetzen, die die Behandlung mit dem Oxygenator unterstützen.

Nachdem bereits die erfolgreiche Beschichtung von PMP-Folien mit PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** gezeigt wurde (Kapitel 3.2 und 3.6), sollte PMP-Derivat **27a** mit NBoc-Lys(N₃)-OH **67** umgesetzt werden, um eine Azid-haltige Oberfläche zu generieren (Schema 22). Die Ligation des Wirkstoffs sollte erneut über Kupfer-katalysierte, 1,3-dipolare Zykoaddition durchgeführt werden.



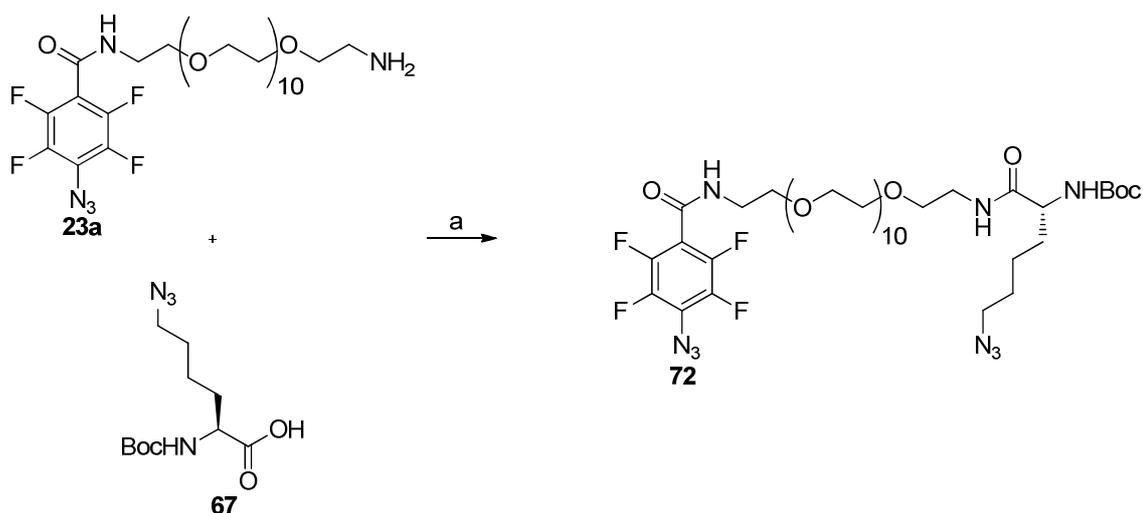
Schema 22: Herstellung von PMP-Derivaten mit Azid-Gruppen zur anschließenden Kupplung Alkin-funktionalisierten Wirkstoffen.

Die Synthese von NBoc-Lys(N₃)-OH **67** wurde nach einer Vorschrift von LINK *et al.* ausgehend von NBoc-Lys-OH **71** durchgeführt (Schema 23).⁹⁶ Dabei wurde zunächst Trifluormethansulfonsäureazid aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumazid hergestellt, welches ohne weitere Aufarbeitung mit NBoc-Lys-OH **71** unter Kupfersulfat-Katalyse in guten Ausbeuten Produkt **67** lieferte.



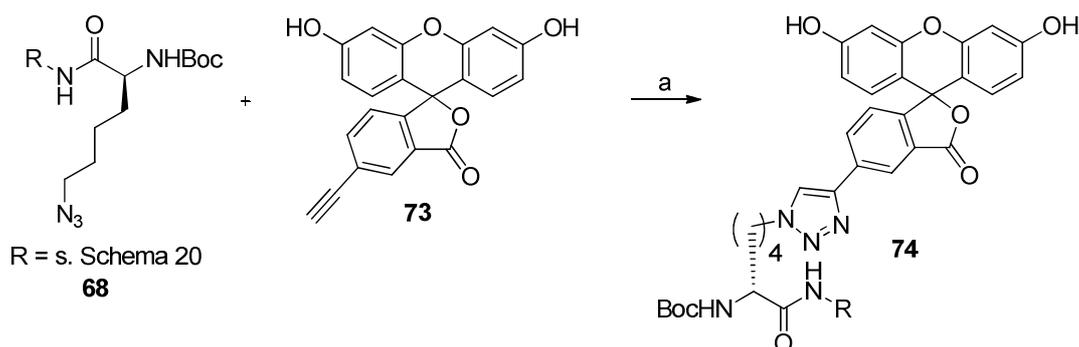
Schema 23: Synthese von NBoc-Lys(N₃)-OH **67**. a) K₂CO₃, CuSO₄, TfN₃, H₂O/MeOH/CH₂Cl₂, RT, 19 h, 92%.

Um die Kupplung zwischen PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **27a** und NBoc-Lys(N₃)-OH **67** zu untersuchen, wurde erneut eine Modellreaktion mit dem niedermolekularen Testsubstrat PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** durchgeführt. Mittels Carbodiimid-Chemie konnte Kupplungsprodukt **72** in einer Ausbeute von 58% erhalten werden.



Schema 24: Modellreaktionen zur Kupplung von PMP-PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** mit NBoc-Lys(N₃)-OH **67** anhand von Linker PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**. a) NHS, DCC, DIPEA, DMF, RT, 12 h, 58%.

Die Bedingungen der Modellreaktion aus Schema 24 wurden im Folgenden auf die Reaktion am Polymer übertragen (Schema 22). Der Erfolg der Kupplung sowie eine mögliche 1,3-dipolare Zykoaddition mit einem Alkin wurden durch eine Modellreaktion mit Ethinylfluorescein **73** untersucht (Schema 25). Es wurden dabei die gleichen Bedingungen gewählt, wie schon bei der Kupfer-katalysierten „Klick“-Reaktion zwischen Azidofluorescein **38** und dem polymergebundenem Alkin **28a** (Schema 15).

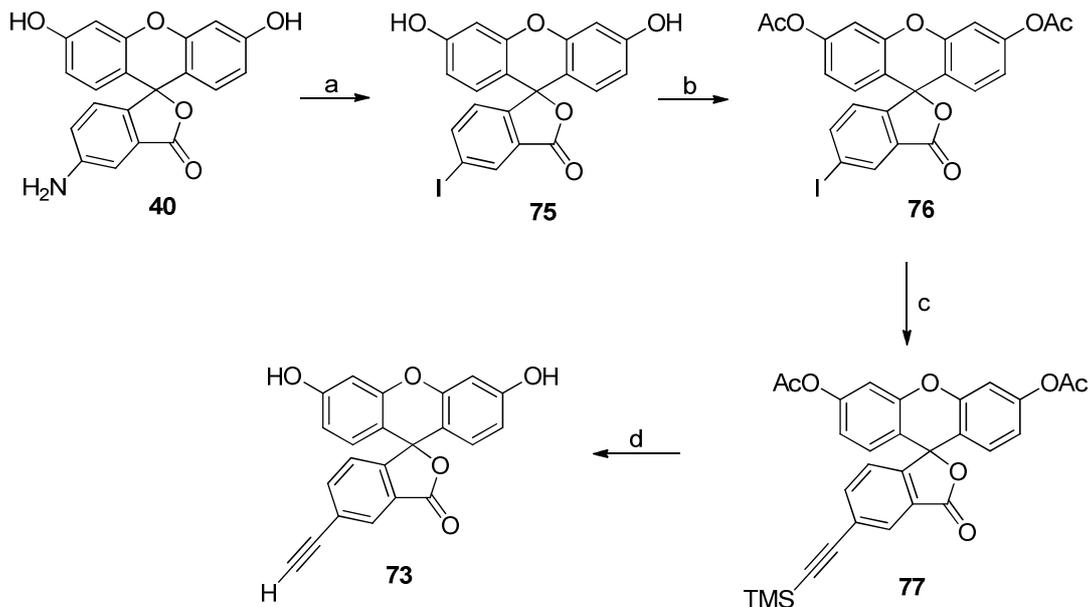


Schema 25: 1,3-dipolare Zykoaddition zwischen Ethinylfluorescein **73** und den polymergebundenen Azid **68**. a) CuI, DIPEA, MeOH, RT, 12 h.

Zur Synthese von Ethinylfluorescein **73** wurde zunächst 5-Aminofluorescein **40** nach einer Vorschrift von JIAO *et al.* durch Zugabe von Natriumnitrit und Kaliumiodid unter sauren Bedingungen zum Iodofluorescein **75** umgesetzt (Schema 26).⁹⁷ Anschließend wurden die Hydroxylgruppen des Iodofluoresceins **75** durch Zugabe von Essigsäureanhydrid geschützt und das entstehende Iodofluoresceindiacetat **76** in einer SONOGASHIRA-Kupplungsreaktion mit Trimethylsilylacetylen zu (Trimethylsilylethynyl)-fluoresceindiacetat **77** umgesetzt.⁹⁸ Dabei wurden Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium und Kupferiodid als Katalysatoren eingesetzt. Anschließend wurden sowohl die Acetylschutzgruppen als auch die TMS-Gruppe basisch entfernt, wodurch Ethinylfluorescein **73** freigesetzt wurde.

⁹⁷ G.-S. Jiao, J. W. Han, und Kevin Burgess, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8264-8267.

⁹⁸ L. H. Thoresen, G.-S. Jiao, W. C. Haaland, M. L. Metzker und K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4603-4610.



Schema 26: Synthese von Ethynylfluorescein **73**. a) 1) HCl, 0 °C, 15 min, 2) NaNO₂, 0 °C, 30 min, 3) KI, RT, 1 h, 56%, b) Ac₂O, DMAP, Pyridin, RT, 4 h, 89%, c) TMS-Acetylen, CuI, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, THF, 50 °C, 1 h, 33%, d) K₂CO₃, MeOH/THF, RT, 17 h, 99%.

Das mit Ethynylfluorescein **73** über 1,3-dipolare Zykoaddition funktionalisierte Polymer **74** wurde im Folgenden UV-spektroskopisch analysiert (Abbildung 40).⁹⁹ Während PMP-Derivat **68** kein Absorptionsmaximum zwischen 400 und 600 nm zeigte (gestrichelte Linie), konnte nach der „Klick“-Reaktion ein deutliches Signal bei etwa 500 nm (durchgezogene Linie) beobachtet werden. Dadurch konnte das Fluorescein-Derivat **73** und somit der Erfolg der in Schema 23 gezeigten Reaktion nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 28). Auch bei Zykoadditionsprodukt **74** wurde eine Komplexierung des an die Oberfläche gebundenen Fluoresceins mit Kupfer beobachtet, da eine Wellenlängenverschiebung im Vergleich zum unkomplexierten Fluoresceins festgestellt wurde.

Um zu zeigen, dass kein Fluorescein am PMP physisorbiert war, wurde erneut ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dazu wurde eine Formiergasplasma-behandelte PMP-Membran mit einer Fluoresceinlösung getränkt und in gleicher Weise gespült, wie PMP-Derivat **74**. Da jedoch kein Azid auf der Oberfläche gebunden war, konnte keine 1,3-dipolare Zykoaddition ablaufen. Auf einer derart behandelten Oberfläche konnte jedoch nur in Spuren Fluorescein nachgewiesen werden (gepunktete Linie). Daraus kann geschlossen werden, dass kein Fluorescein auf der Oberfläche physisorbiert wurde und die UV-Absorption von PMP-Derivat **74** bei 500 nm auf eine kovalente Bindung des Fluoresceins zurückzuführen ist.

⁹⁹ Ergebnisse entnommen aus T. Tautz, Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover 2009.

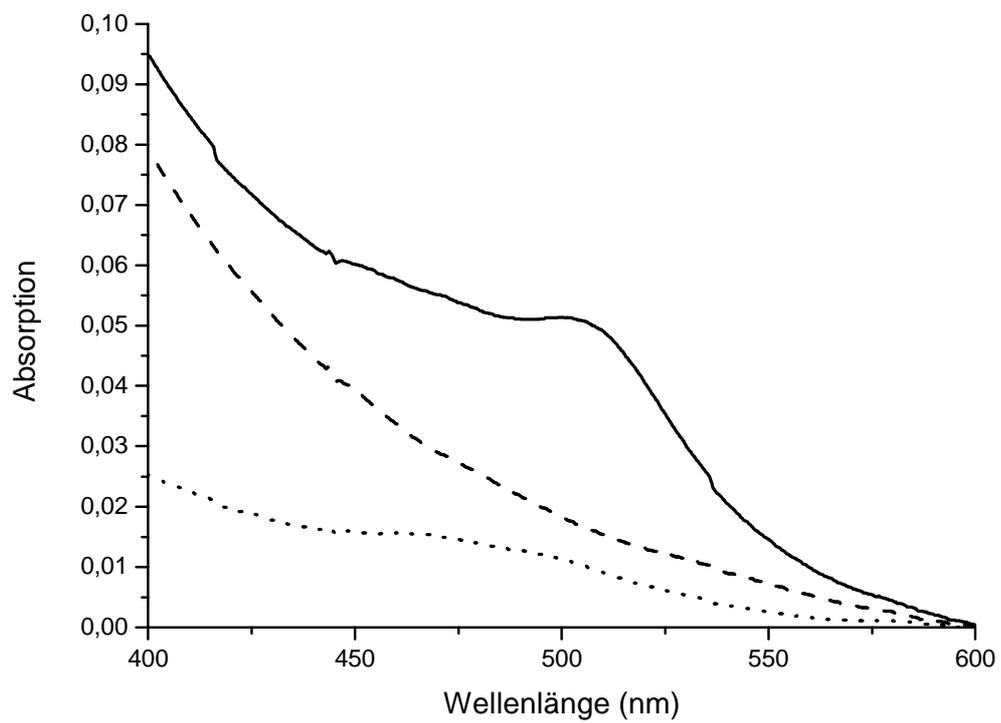


Abbildung 40: durchgezogene Linie: Zykloadditionsprodukt **74**; gestrichelte Linie: PMP-Derivat **68** vor „Klick“-Reaktion; gepunktete Linie: Negativprobe des „Klick“-Versuches.

3.13.2 PMP nach Ammoniakplasma-Behandlung

Neben den mit Formiergasplasma vorbehandelten Folien, welche anschließend für weitere chemische Modifizierungen der Oberfläche zur Funktionalisierung mit RGD-Peptiden eingesetzt wurden (vergl. Kapitel 3.4.2), wurden zudem weitere Ionisationsgase und Plasmabedingungen untersucht. Zum Beispiel sollte der Stickstoffgehalt auf der Oberfläche weiter gesteigert werden, um eine Oberfläche mit reaktiven Aminen zu generieren, die für chemische Reaktionen zugänglich ist. Auf diese Weise könnte, alternativ zur Nitreninsertion, die Oberfläche der PMP-Folien funktionalisiert werden.

Zur Aminierung der Oberfläche wurden die PMP-Folien mit einem Ammoniakplasma behandelt. Dieses wurde zunächst erzeugt, indem wässriger Ammoniak (26%) verkocht wurde und die entstehenden Gase mit einem Stickstoffträgerstrom als *Precursor* direkt in eine statische Plasmadüse (Abbildung 15 rechts) eingeleitet wurden. Als Ionisationsgas wurde Druckluft verwendet. Es wurden erneut verschiedene Plasmabedingungen variiert, um eine Modifikation bei möglichst geringer Deformation zu erhalten. Als optimal zeigten sich dabei die Parameter aus Tabelle 6.

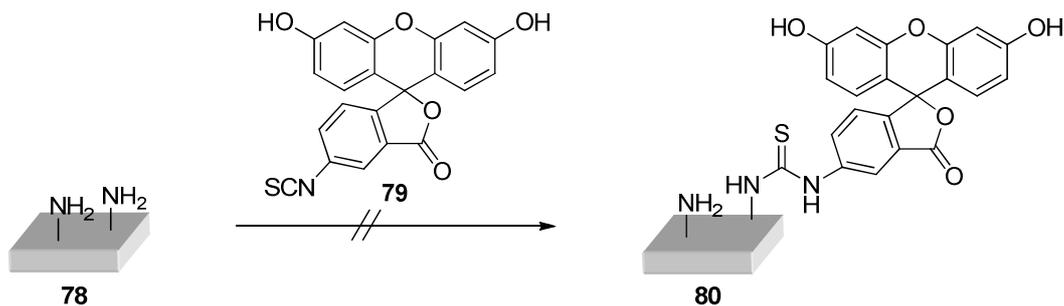
Tabelle 6: Parameter zur Aminierung der PMP-Oberfläche mit Ammoniakplasma.

Parameter	
Frequenz	19 Hz
Stromstärke	11.4 A
Spannung	260 V
Puls-Pause-Verhältnis	100
Abstand Oberfläche-Plasmadüse	12 mm
Geschwindigkeit Verfahrtsch	10 m/min
Ionisationsgasstrom	3000 L/h
Trägergasstrom	200 L/h

Mittels XPS-Analytik konnte nachgewiesen werden, dass durch diese Plasmatechnik ein Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnis von 24:1 auf der Oberfläche erzielt werden konnte. Dies ist eine deutliche Steigerung im Vergleich zu unbehandeltem und zu mit Formiergasplasma behandelten PMP-Folien ohne *Precursor* (vergl. Kapitel 3.4). Allerdings stieg auch der Sauerstoffanteil auf ein Kohlenstoff-Sauerstoff-Verhältnis von 1:3.5.

Die Kurvenverläufe der O1s und N1s Peaks entsprechen denen der Formiergasplasma-Behandlung und sind daher nicht gezeigt. Die maximale Absorption liegt ebenfalls bei $E_{\text{kin.}} = 720 \text{ eV}$ (BE 533 eV) für Sauerstoff und $E_{\text{kin.}} = 852 \text{ eV}$ (BE 401 eV) für Stickstoff.

Zur Untersuchung, ob freie Amine auf der Oberfläche für chemische Derivatisierungen zur Verfügung stehen, wurden die Plasma-behandelten PMP Folien mit Fluoresceinisothiocyanat überspült und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht (Schema 27). Leider konnte nach dieser Behandlung kein Fluorescein auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass keine reaktiven Amine auf der Oberfläche generiert wurden, die für weitere chemische Derivatisierung zugänglich waren. Eine mögliche Erklärung dafür geht aus einer Publikation von NARUSHIMA *et al.* hervor. Problematisch sei demzufolge die Anwesenheit von Luftsauerstoff, da dieser die entstehenden, primären Amine oxidieren könnte.¹⁰⁰



Schema 27: Reaktion von Ammoniakplasma-behandelten PMP-Folien mit Fluoresceinisothiocyanat 79.

Aus diesem Grund sollte der Wasseranteil im Plasma gesenkt werden, während der Ammoniakanteil erhöht werden sollte. Dazu wurde der Ammoniak nicht mehr als *Precursor* in den Druckluft-Plasmastrom eingeleitet, sondern als Prozessgas verwendet. Es wurde eine kleinere Düse verwendet als bei den zuvor beschriebenen Plasma-Behandlungen, um die Durchflussmenge von Ammoniak zu minimieren (Abbildung 17links). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich Ammoniak allein nur schlecht bis gar nicht als Ionisationsgas eignet, da sich kein stabiler Plasmastrahl ausbildete. Daher wurde Ammoniak mit Druckluft beziehungsweise mit

¹⁰⁰ K. Narushima, M. Fukuoka, H. Kawai, N. Inagaki, Y. Isono, M. R. Islam, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, 46, 7855-7857.

Stickstoff über ein T-Stück versetzt, bevor es in die Plasmadüse eingeleitet wurde. Die verwendeten Plasmabedingungen sind in Tabelle 7 angegeben und führten lediglich zu geringer oder keiner Deformation des Polymers.

Anschließend wurde eine Analyse der PMP-Oberflächen von Tabelle 7C, D und E mittels XP-Spektroskopie durchgeführt. Diese drei untersuchten Folien unterschieden sich dabei in der Menge an zugesetztem Ammoniak (C und D) oder in der Art des beigemischten Ionisationsgases (C und E). Es konnte jedoch auf allen drei Oberflächen kein Stickstoff nachgewiesen werden. Dieser wäre bei einer kinetischen Energie von etwa 850 eV zu erwarten gewesen.

Tabelle 7: Bedingungen der Ammoniakplasma-Behandlungen von PMP-Folien. A-F: Düse Abbildung 17 links, NH₃ als Ionisationsgas, Frequenz 21 Hz, Stromstärke: 8 A, Spannung: 180 V, Puls-Pause-Verhältnis: 10; G: Düse Abbildung 17 rechts, NH₃ als *Precursor*, Frequenz 23 Hz, Stromstärke: 11 A, Spannung: 250 V, Puls-Pause-Verhältnis: 100.

	NH ₃ Strom [L/h]	Luftstrom [L/h]	N ₂ Strom [L/h]	Abstand zur Düse [mm]	Geschw. [m/min]
A	157	263	-	10	20
B	157	263	-	8	10
C	157	263	-	10	10
D	263	263	-	10	10
E	157	-	263	10	10
F	377	-	-	10	10
G	377	3000	-	10	20

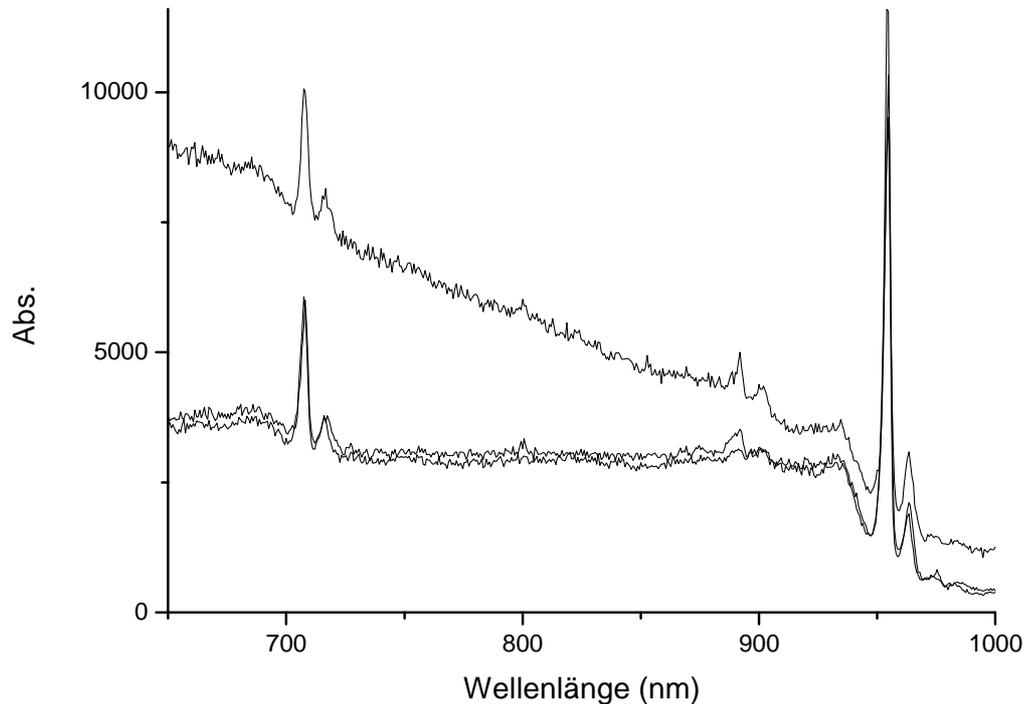


Abbildung 41: XP-Spektrum von Plasma-behandelten Oberflächen mit Ammoniak als Ionisationsgas; oben: Bedingungen: Tabelle 7C; mittig: Tabelle 7D; unten: Tabelle 7E; alle: Pass-Energie 120 eV.

Ein möglicher Grund für das Ausbleiben einer Aminierung/Amidierung der PMP-Oberfläche bei einer Behandlung mit Ammoniak-Plasma ist der zu geringe Anteil von Ammoniak im Plasma. Die kleine Plasmadüse (Abbildung 17 links) konnte nur mit Ionisationsgasströmen um 400 L/h betrieben werden. Diese Menge an Ammoniak reicht dabei eventuell nicht für eine chemische Reaktion auf der PMP-Oberfläche aus. Möglicherweise wird der Ammoniak unter Plasmabedingungen auch direkt zu Stickstoff oxidiert, welcher aufgrund zu milder Plasmabedingungen nicht weiter reagieren kann.

Trotzdem wurde die Reaktivität der Oberfläche erneut durch Kupplung mit Fluoresceinisothiocyanat untersucht (Schema 27). Leider konnte auch auf diese Weise keine primären Amine auf der Oberfläche nachgewiesen werden, welche für weitere chemische Derivatisierung zugänglich wären. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der XP-spektroskopischen Untersuchung.

3.13.3 PMP nach Bromplasma-Behandlung

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Plasmachemie auf PMP Oberflächen wurden PMP-Folien mit verschiedenen Plasmabedingungen behandelt. So wurden verschiedene *Precursor* in einen Plasmastrom eingeleitet, der mit Luft als Ionisationsgas erzeugt wurde.

Zum Beispiel wurde die Plasma-vermittelte Reaktion von PMP mit elementarem Brom durchgeführt. Eine bromierte Oberfläche böte die Möglichkeit einer chemischen Derivatisierung über nukleophile Substitutionen. Dazu wurde Brom im Wasserbad erwärmt und das entstehende Bromgas als *Precursor* in eine statische Düse geleitet. Die Bedingungen zu Erzeugung des Plasmas sind in Tabelle 8 dargestellt. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass sogar milde Plasmabedingungen (geringe Frequenz und Spannung bei großem Abstand zwischen Polymer und Plasmadüse) zu erheblichen Deformationen des Polymers führten. Lediglich Folien mit einer Plasma-Behandlung analog zu Eintrag A ließen die Messung eines Kontaktwinkels zu, der etwa 35° betrug. Die Hydrophilie der Folien stieg folglich verglichen zu dem unbehandelten PMP um mehr als 300%.

Tabelle 8: Bedingungen der Bromplasma-Behandlungen von PMP. PCT = 100, Ionisationsgasstrom = 3000 L/h. KW = Kontaktwinkel.

	Frequenz	Spannung	Abstand	Geschw.	Deformation
	[Hz]	[V]	[mm]	[m/min]	
A	19	300	9	10	mittel
B	19	270	12	10	mittel
C	19	260	12	10	mittel

Die durch Bromplasma modifizierten Folien wurden anschließend mittels XP-Spektroskopie im Hinblick auf ihren Gehalt an Brom analysiert (Abbildung 42). Der betreffende Ausschnitt des Spektrums ist in Abbildung 43 gezeigt. Es konnte ein Peak bei $E_{\text{kin.}} = 1181$ eV (BE 72 eV) beobachtet werden, der von Elektronen aus einem Br3d Orbital hervorgerufen werden könnte.^{82,101} Die für Brom charakteristische Dublett-Feinaufspaltung ist jedoch nicht erkennbar. Ein Peak bei $E_{\text{kin.}} = 1067$ eV (BE 186 eV) könnte auf Br3p Elektronen zurückzuführen sein, während der ebenfalls zu erwartende Peak bei $E_{\text{kin.}} = 1023$ eV (Br3s, BE 230 eV) nicht zu beobachten war. Die Intensität der Br3d und Br3p Peaks liegt allerdings im Grundrauschen, sodass

¹⁰¹ R. Basu, C. R. Kinser, J. D. Tovar, M. C. Hersam, *Chem. Phys.* **2006**, 326, 144-150.

höchstens von einem geringen Funktionalisierungsgrad ausgegangen werden kann. Dies ist vermutlich auf den zu geringen Bromgehalt im Plasma zurückzuführen. Da ein stärkerer Bromstrom jedoch zu noch stärkeren Deformationen der Oberfläche führen würde, wurde von weiteren Experimenten zur Bromplasma-Behandlung von PMP abgesehen.

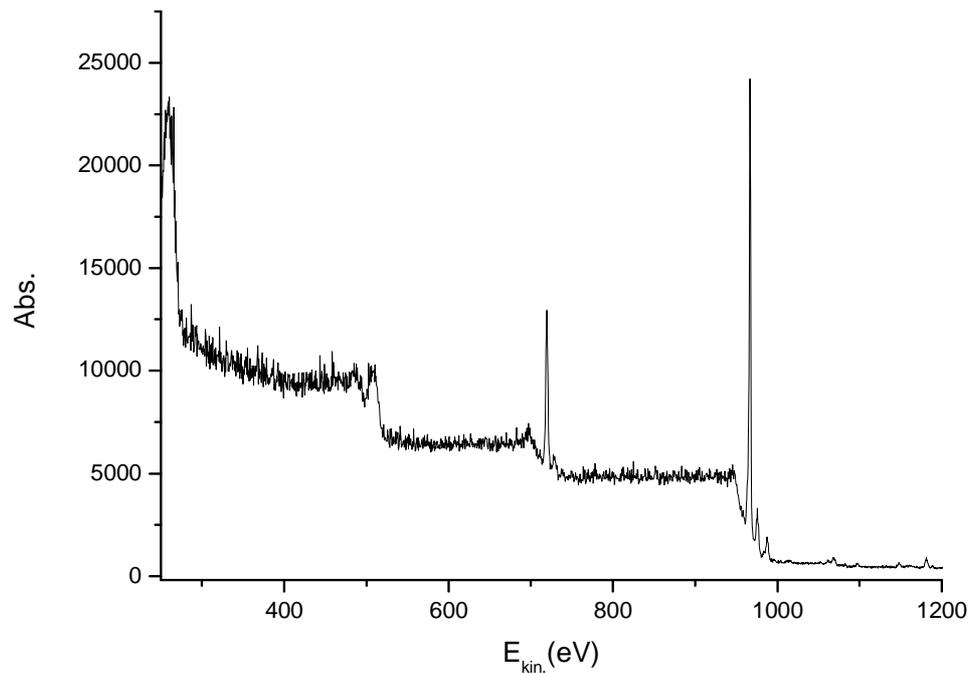


Abbildung 42: XP-Gesamtspektrum von PMP mit Bromplasma-Behandlung; Pass-Energie: 100 eV.

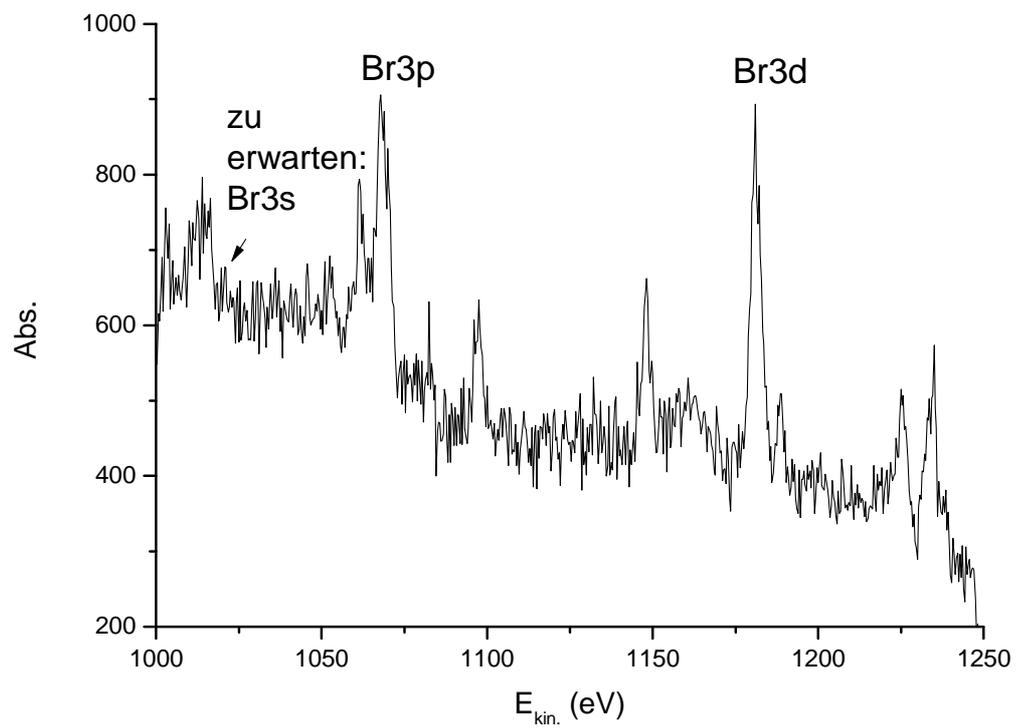
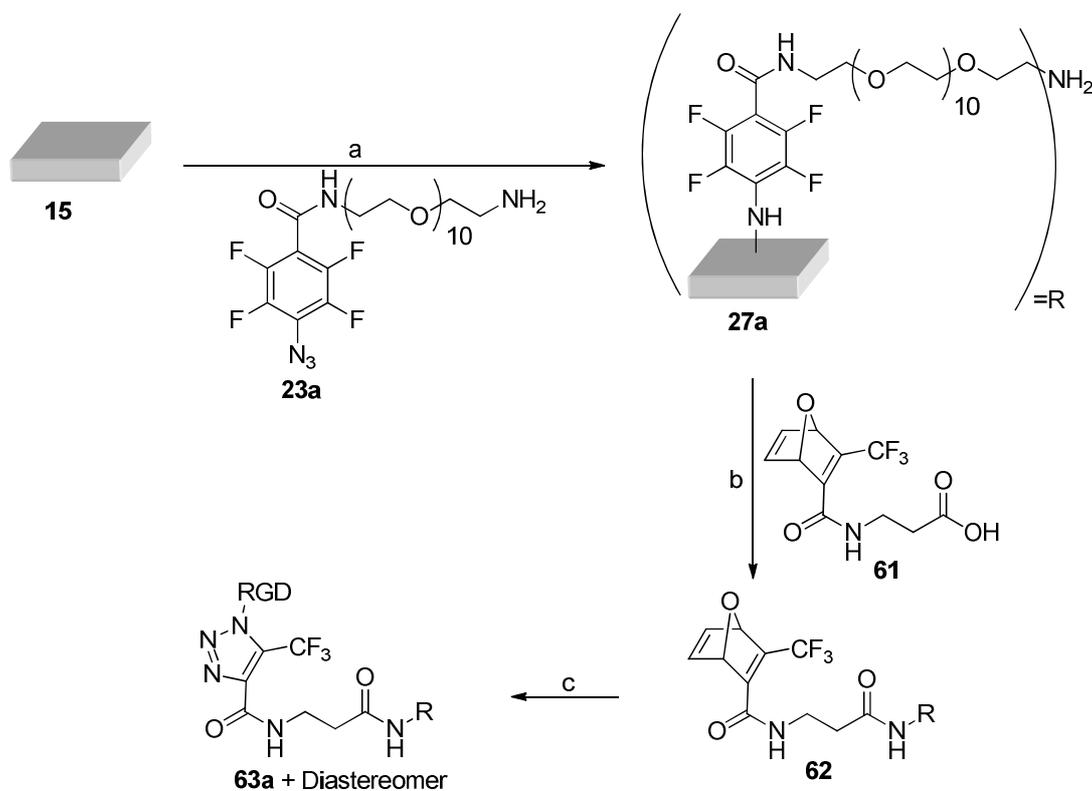


Abbildung 43: XPS-Hochauflösung von PMP nach Plasma-Behandlung mit Brom als *Precursor* im Bereich zwischen $E_{kin.} = 1000$ und 1250 eV; Pass-Energie: 100 eV.

3.14 Überblick: Derivate von PMP

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien zur Funktionalisierung von PMP-Membranen mit zyklischen RGD-Peptiden untersucht. Die erfolgreichste Methode ist in Schema 28 zusammengefasst. Dabei wurde zunächst durch atmosphärisches Formiergasplasma eine hydrophile Oberfläche generiert, welche anschließend einer Nitreninsertion mit PEG-Linker **23a** unterzogen wurde. Nach erfolgter Anbindung des Bausteins **61** über klassische Carbodiimid-Chemie, konnte das RGD-Peptid über Kupfer-freie „Klick“-Chemie an die Oberfläche gebunden werden.



Schema 28: Erfolgreichste Methode zur Funktionalisierung von PMP mit RGD-Peptiden. a) 1) Formiergasplasmabehandlung, 2) *dip coating* mit **23a** in MeOH, 3) UV (254 nm), RT, 3 h, 0.02 mbar, b) NHS, DCC, DIPEA, DMF, RT, 12 h, c) c[RGDfK(N₃)] **13**, H₂O, RT, 3 d.

Eine Übersicht über die Analytik ausgewählter PMP-Derivate ist in Tabelle 9 gezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion der Endothelzellen auf den nach Schema 28 behandelten PMP-Folien am stärksten war und erst auftrat nachdem RGD-Peptide gebunden waren (Eintrag 6). Die Strategien der Kupfer-katalysierten RGD-Anbindung führten dagegen nicht zum gewünschten Erfolg (Eintrag 8, 10). Genauso verhielt es sich mit einem längeren PEG-spacer (nicht gezeigt).

Zudem wurden verschiedene Plasma-Behandlungen durchgeführt und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Bedingungen zu gesteigerter Hydrophilie der Oberfläche im Vergleich zu unbehandeltem PMP (Eintrag 1) führten. Nach Behandlung mit Formiergasplasma und Ammoniak als *Precursor* im Luftplasma (Eintrag 3, 13) konnte mittels XPS Stickstoff auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Wurde Ammoniak dagegen als Ionisationsgas verwendet, konnte keine stickstoffhaltige Oberfläche generiert werden (Eintrag 12). Bromplasma erwies sich als sehr intensiv. Die Bromierung der Oberfläche konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Eintrag 14).

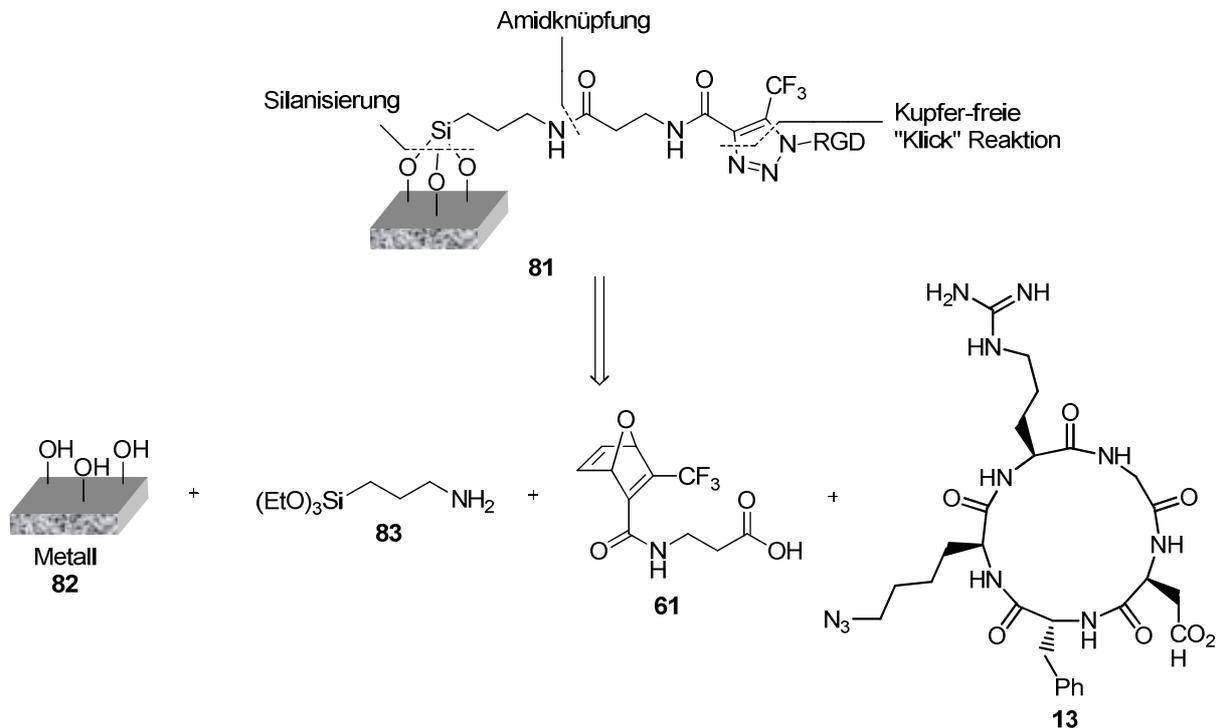
Tabelle 9: Zusammenfassung der Untersuchung verschiedener PMP-Derivate bezüglich Polarität, elementarer Zusammensetzung und biologischer Aktivität; KW = Kontaktwinkel, FG = Formiergas, BS = Baustein, IG = Ionisationsgas, kA = nicht untersucht.

	Modifikation	KW [°]	Elemente im XPS	Zellbewuchs
1	PMP unbehandelt	107	C, O	nein
2	PMP mit Heparin/Albumin	64.2	kA	ja
3	PMP+FG	46.1	C, O, N	ja
4	27a (PMP+FG+PEG)	74.4	C, O, N, F	nein
5	62 (PMP+FG+PEG+BS 61)	72.8	C, O, N, F	nein
6	63 (PMP+FG+Linker 61 +RGD)	77.7	C, O, N, F	ja
7	28a (PMP+FG+PEG+BS 18)	92.8	kA	nein
8	43a (PMP+FG+Linker 18 +RGD)	97.9	kA	wenig
9	30a (PMP+FG+PEG+BS 29)	90	kA	nein
10	44a (PMP+FG+Linker 29 +RGD)	79.7	kA	wenig
11	PMP mit Luftplasma	60	kA	kA
12	PMP mit NH ₃ Plasma (IG)	kA	C, O	kA
13	PMP mit NH ₃ Plasma (<i>Precursor</i>)	31.9	C, O, N	kA
14	PMP mit Bromplasma	34.8	C, O, Br(?)	kA

4 Funktionalisierung von Herzschrittmacher-Oberflächen mit RGD Peptiden

4.1 Einleitung

In Kapitel 3 konnte die chemische Funktionalisierung von PMP-Folien mit zyklischen RGD-Peptiden gezeigt und eine Steigerung der Biokompatibilität nachgewiesen werden. Diese Art der Bio-Funktionalisierung erlaubte es, Lungenendothelzellen auf dem künstlichen Material zu kultivieren. Auch bei Herzschrittmachern entstehen häufig Komplikationen, welche auf eine geringe Biokompatibilität des Metalloberfläche zurückzuführen sind. Oftmals resultieren Abstoßungsreaktionen und Infektionen *in vivo*, sodass auch die Oberflächen der Herzschrittmacher durch Anbindung von RGD-Peptiden funktionalisiert werden sollten.¹¹ Auf diese Weise sollte ein Einwachsen des Geräts in umgebendes Gewebe ermöglicht und Abwehrreaktionen wie Entzündungen oder Einkapselungen des Gerätes verhindert werden.



Schema 29: Retrosynthese der Dekoration von Metallen mit zyklischen RGD-Peptiden.

Die Retrosynthese einer solchen Funktionalisierung ist in Schema 29 dargestellt. Sie basiert auf den Erkenntnissen, die bei der Funktionalisierung von PMP gewonnen wurden. Zunächst sollte das Metall durch Generierung von Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche aktiviert werden. Anschließend sollte 3-Aminopropyltriethoxysilan **83** unter Abspaltung von Ethanol an die eingeführten Sauerstoffatome gebunden und Oxanorbornadien **61** durch Carbodiimid-Chemie gekuppelt werden. In einem letzten Schritt sollte das zyklische RGD-Peptid $c[\text{RGDfK}(\text{N}_3)]$ **13** durch Metall-freie 1,3-dipolare Zykloaddition ligiert werden. Die aufgeführten Schritte zur Funktionalisierung der Metalloberfläche werden in den folgenden Kapiteln eingehend diskutiert.

4.2 Untersuchung der unbehandelten Oberfläche

Herzschrittmacher-Gehäuse bestehen zumeist aus reinem Titan. Die Gehäuse, die standardmäßig implantiert werden, stellen jedoch einen erheblichen Kostenfaktor dar, sodass zunächst mit Titanplatten als Modell gearbeitet wurde. Diese wurden auf eine Größe von etwa 1x1 cm zugeschnitten und vor Gebrauch intensiv mit Methanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigt.

Um eine spätere Funktionalisierung der Oberflächen nachzuweisen, wurde zunächst die unbehandelte Metallplatte untersucht. Wie schon bei der Analyse der Oberfläche von PMP (Kapitel 3), wurde auch in diesem Projekt XP-Spektroskopie eingesetzt.

Abbildung 44 zeigt das XP-Spektrum der unbehandelten Metalloberfläche bei $E_{\text{kin.}} = 450\text{-}1000$ eV. Es konnte sowohl Sauerstoff ($E_{\text{kin.}} = 719.5$ eV, BE 534.1 eV) als auch Kohlenstoff ($E_{\text{kin.}} = 963.1$ eV, BE 290.5 eV) nachgewiesen werden. Zudem war ein Peak mit zwei Maxima bei $E_{\text{kin.}} = 878.7$ eV (BE 374.9 eV) und $E_{\text{kin.}} = 885.3$ eV (BE 368.3 eV) zu beobachten. Eine Hochauflösung dessen ist in Abbildung 45 gezeigt. Diese Signale lassen sich eindeutig Elektronen aus den $3d_{3/2}$ und $3d_{5/2}$ -Orbitalen von elementarem Silber zuordnen.⁸²

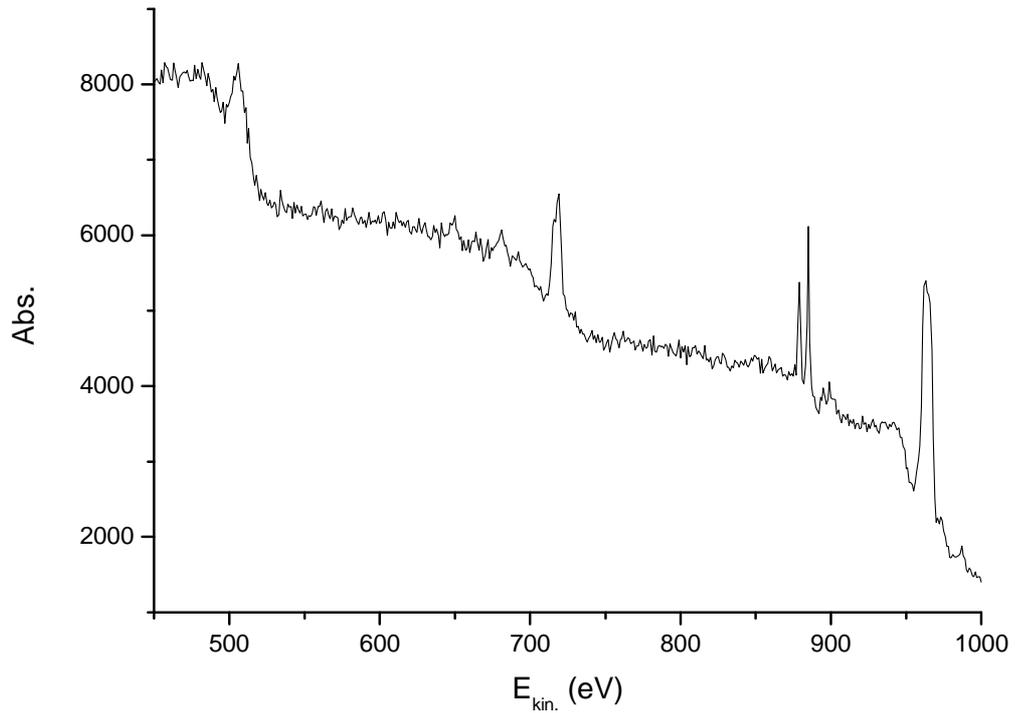


Abbildung 44: XP-Übersichtsspektrum der unbehandelten Metalloberfläche; Pass-Energie 120 eV.

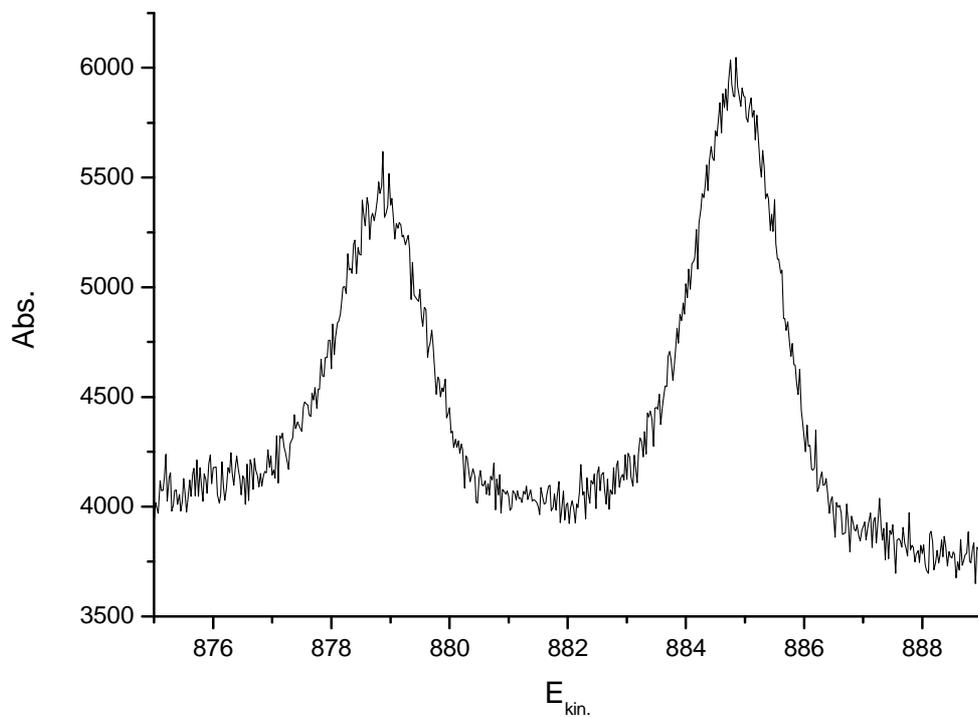


Abbildung 45: Hochauflösung des Silberpeaks der unbehandelten Metalloberfläche; Pass-Energie 120.

Zudem wurde die Region zwischen $E_{\text{kin.}} = 770 \text{ eV}$ und $E_{\text{kin.}} = 810 \text{ eV}$ genauer untersucht. Dort wäre ein Peak mit zwei Maxima zu erwarten gewesen, der von Elektronen aus den $2p_{1/2}$ und $2p_{3/2}$ -Orbitalen des Titans hervorgerufen wird (nicht gezeigt).¹⁰² Allerdings konnte auch nach langen Messzeiten in dieser Region kein Signal beobachtet werden.

Dies lässt darauf schließen, dass die als Modell verwendeten Metallplatten hauptsächlich aus Silber bestanden beziehungsweise die Oberfläche der Titanplatten versilbert wurde. Abschließende Untersuchungen werden derzeit durchgeführt. Trotzdem wurden Modellreaktionen mit diesen Metallplatten durchgeführt, da zunächst eine generelle Strategie zur Funktionalisierung von Metalloberflächen erarbeitet werden sollte, die anschließend auf verschiedene Metalle oder Legierungen anwendbar wäre. Zudem sollte nach vollständiger Dekorierung der Oberfläche mit Silanolgruppen (Kapitel 4.3) die Art des Metallkerns eine untergeordnete Rolle spielen, da ausschließlich die Oberfläche für die chemische Derivatisierung verwendet wird.

4.3 Aktivierung der Titanoberfläche

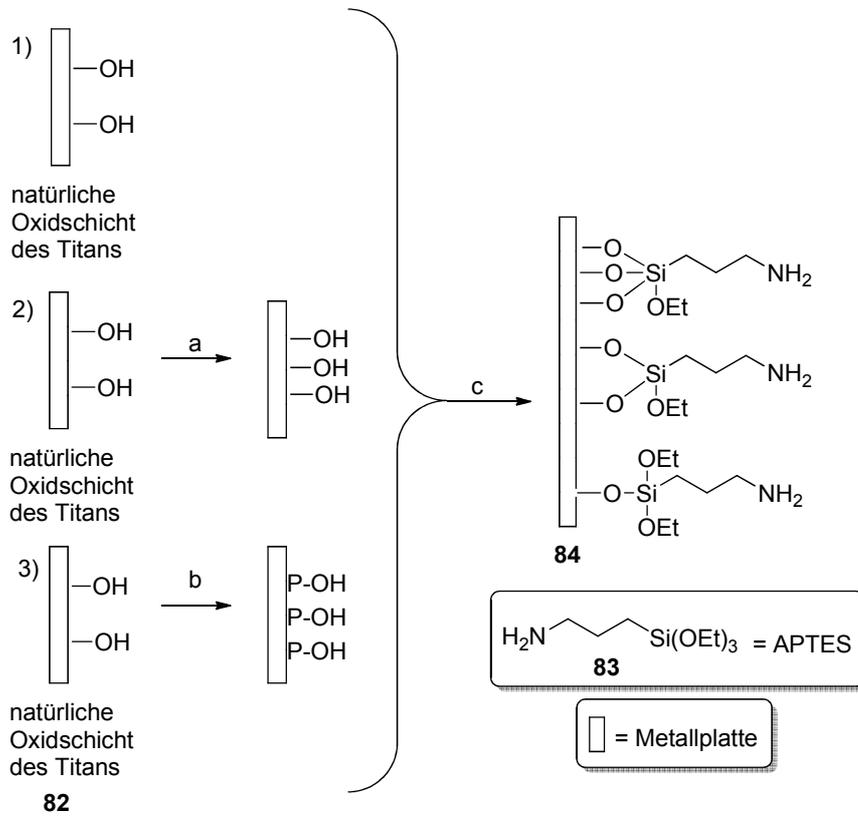
In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, um Titan oder Titanlegierungen für chemische Funktionalisierungen zugänglich zu machen. KIM *et al.* berichteten zum Beispiel, dass bereits die natürliche Oxidschicht des Titans für chemische Reaktionen genutzt werden kann (Schema 30).¹⁰³ Dem widersprachen sowohl PORTE-DURRIEUA *et al.* wie auch SCHWARTZA *et al.*, die die Notwendigkeit einer zusätzlichen Aktivierung der Titanoberfläche postulierten (Schema 30).¹⁰⁴ Zum einen böte sich die Möglichkeit einer Oxidation der Oberfläche mit einer Mischung aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid, zum anderen könne durch Erhitzen in Phosphorsäure eine $\text{Ti}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ -Schicht gebildet werden. Die zusätzlich generierten

¹⁰² M.C. Porté-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amédée, N. Barthe, M. Dard, C. Baquey, *Biomaterials* **2004**, 25, 4837–4846.

¹⁰³ S. E. Kim, S.H. Song, Y. P. Yun, B.J. Choi, I. K. Kwon, M. S. Bae, H. J. Moon, Y. D. Kwon, *Biomaterials* **2011**, 32, 366-373.

¹⁰⁴ a) M.C. Porte-Durrieua, F. Guillemota, S. Pallua, C. Labrugereb, B. Brouillaudc, R. Bareillea, J. Amedeeea, N. Barthe, M. Dardd, C. Baqueya, *Biomaterials* **2004**, 25, 4837–4846, b) J. Schwartz, M. J. Avaltronia, M. P. Danahya, B. M. Silvermana, E. L. Hansona, J. E. Schwarzbauerb, K. S. Midwoodb, E. S. Gawalta, *Mat. Sci. Eng. C* **2003**, 23, 395–400.

Oxo-Gruppen könnten im Folgenden zur Funktionalisierung der Oberfläche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan **83** (APTES) verwendet werden (Silanisierung).



Schema 30: Literaturbeschriebene Methoden zur Aktivierung von Titanoberflächen: 1) nach Quelle 103, 2) nach Quelle 104a, 3) nach Quelle 104b. a) H_2SO_4 , H_2O_2 , H_2O , b) H_3PO_4 , c) APTES **83**, - Ethanol.

Eine weitere Methode zur Aktivierung von Metalloberflächen ist die Abscheidung von Silikonen oder Silikaten.¹⁰⁵ Dies kann durch Zusatz von Hexamethyldisiloxan (HMDSO) zu einem Plasmastrom erreicht werden, mit dem die Oberfläche behandelt wird. Sofern (Luft-)Sauerstoff zugegen ist, können zudem Oxidationsprozesse stattfinden, die Silanolgruppen erzeugen. HMDSO eignet sich besonders für solche Prozesse, da es nicht toxisch ist und einen relativ niedrigen Dampfdruck von 98 mbar bei 310 K aufweist.¹⁰⁶ Die Substanz kann daher unter geringer Energiezufuhr verdampft und dem Plasma zugesetzt werden. Die chemischen Reaktionen, die unter Plasmabedingungen stattfinden, können jedoch schwer vorhergesagt und müssen für jedes Material und jeden Plasmaparameter neu analysiert werden.

¹⁰⁵ C. Vautrin-UI, F. Roux, C. Boisse-Laporte, J. L. Pastolc, A. Chaussea, *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 2318-2324, b) C. Vautrin-UI, C. Boisse-Laporte, N. Benissad, A. Chausse, P. Leprince, R. Messina, *Prog. Org. Coat.* **2000**, 38, 9-15.

¹⁰⁶ G.F. Leu, A. Brockhaus, J. Engemann, *Surf. Coat. Technol.* **2003**, 174-175, 928-932.

Da bereits die Oberfläche von PMP erfolgreich mittels Plasmachemie aktiviert werden konnte, wurde für die Aktivierung der Metalloberflächen ebenfalls HMDSO-Plasma gewählt. Der Aufbau der Plasmaanlage mit statischer Düse und *Precursor*-Zustrom wird in Kapitel 3.4 beschrieben. Es wurden die folgenden Parameter verwendet:

Tabelle 10: Parameter Plasma-Behandlung von Metalloberflächen.

Parameter	
Frequenz	23 Hz
Stromstärke	11.1 A
Spannung	250 V
Puls-Pause-Verhältnis	100
Abstand Oberfläche-Plasmadüse	7 mm
Geschwindigkeit Verfahrtsch	10 m/min
Ionisationsgasstrom	3000 L/h
Trägergasstrom	200 L/h
<i>Precursor</i> -Strom	1 mL/min

Da bei Metalloberflächen, im Gegensatz zum thermolabilen Polymer PMP, keine Deformationen auftreten können, wurden deutlich intensivere Plasmabedingungen gewählt. Als Ionisationsgas wurde Formiergas (N_2/H_2 90/10) verwendet, als Trägergas Stickstoff. Da erneut ein Atmosphärendruck-Plasma verwendet wurde, war während des ganzen Prozesses Luftsauerstoff zugegen, der oxidative Prozesse ermöglichen könnte. Zunächst wurde die Oberfläche ohne *Precursor* aktiviert, im Folgenden wurde dem Plasmastrom HMDSO zugesetzt. Dies war deutlich anhand der Farbe des Plasmastrahls zuerkennen, da sich dieser bei Zusatz von HMDSO von gelb-rot nach blau färbte. Anschließend wurde der Aktivierungs-Beschichtungsprozess in gleicher Weise wiederholt.

Im Folgenden wurde die Plasma-behandelte Metallplatte erneut qualitativ XP-spektroskopisch analysiert (Abbildung 46). Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Sauerstoff und Kohlenstoff nach der Plasmabehandlung deutlich angestiegen war. Zudem konnte die Anwesenheit von Silizium nachgewiesen werden (2p: $E_{kin.} = 1142.2$ eV, BE 111.4 eV; 2s: $E_{kin.} = 1091.4$ eV, BE 164.2 eV). Diese Werte weichen allerdings etwa um 7 eV von den Literaturwerten für SiO_2 und sogar um 12 eV von denen für elementares Silizium ab. Dies ist damit zu begründen, dass auf

dem leitenden Metall eine nicht-leitende Schicht aufgebracht wurde, die zu einer Verschiebung der kinetischen Energien führen kann. Diese war in gleichem Maß auch bei Sauerstoff und Stickstoff zu beobachten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die beiden Peaks aus Abbildung 47 trotz Verschiebung dem Element Silizium zuzuordnen sind. Zudem stimmt der Abstand zwischen beiden Peaks exakt mit den Literaturwerten überein (51 eV).

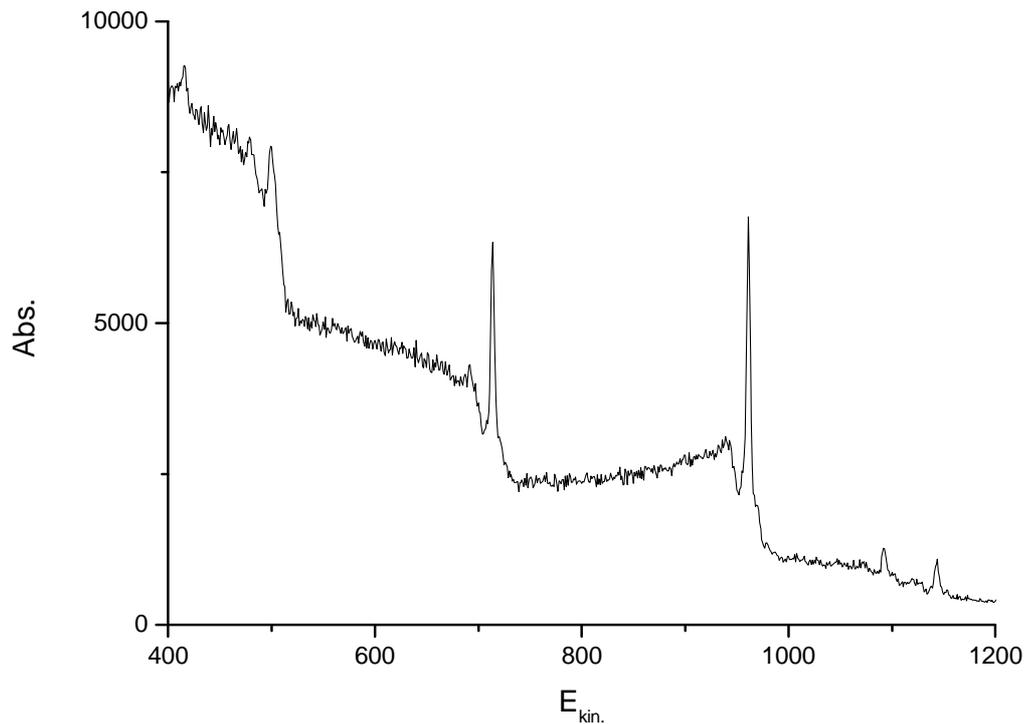


Abbildung 46: XP-Übersichtsspektrum der Metalloberfläche nach Plasmabehandlung mit HMDSO als *Precursor*, Pass-Energie 120 eV.

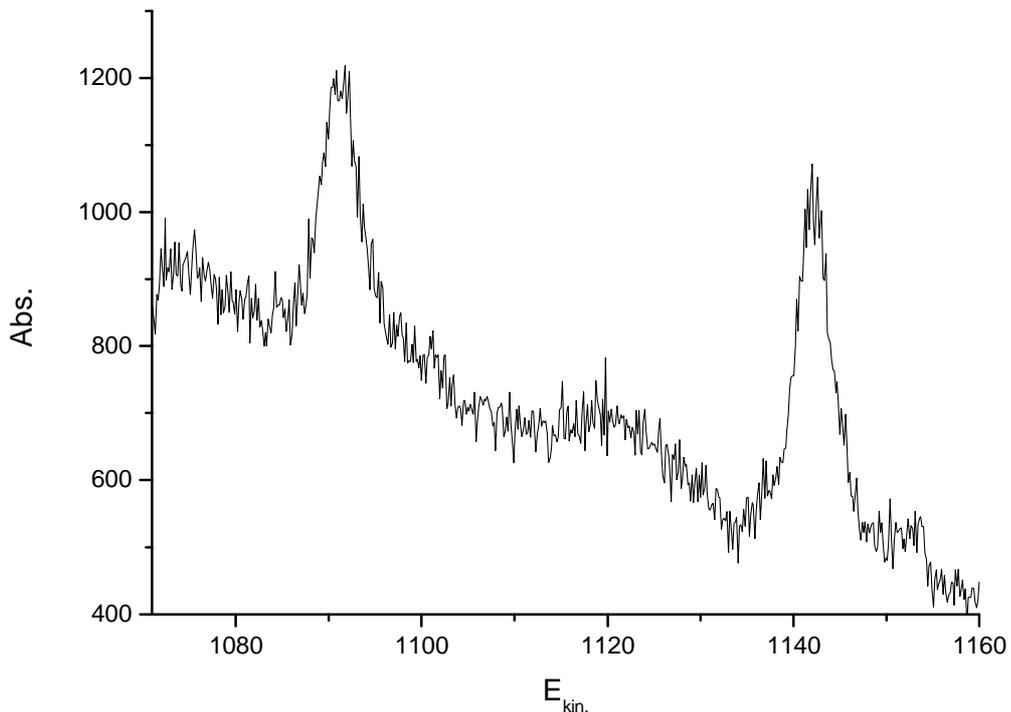


Abbildung 47: Hochauflösung des Siliziumpeaks der Metalloberfläche nach Plasmabehandlung mit HMDSO als *Precursor*, Pass-Energie 120.

Da vor der Plasmabehandlung kein Silizium auf der Oberfläche nachzuweisen war, kann darauf geschlossen werden, dass dieses aus der Reaktion der Metalloberfläche mit HMDSO stammt. Durch die Verschiebung der Peaks im Vergleich zu den Literaturwerten und durch einem Mangel an internem Standard, konnten keine Schlüsse auf die Bindungspartner und Hybridisierung des Siliziums gezogen werden.

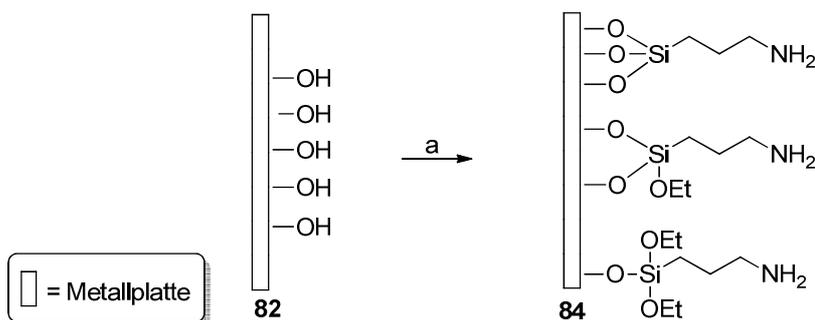
Der charakteristische Silberpeak mit zwei Maxima war hingegen nach der Plasmabehandlung nicht mehr zu beobachten (Abbildung 46). Die Oberfläche wurde folglich deckend mit einer Schicht aus Silizium, Sauerstoff und Kohlenstoff versehen.

4.4 Aminierung der Oberfläche

Durch XPS-Analyse konnten die chemischen Prozesse während der Plasmabehandlung mit HMDSO als *Precursor* nicht eindeutig bestimmt werden (Kapitel 4.3). Daher wurden die folgenden Derivatisierungen durchgeführt, ohne die reagierenden Substanzklassen zu kennen. Es wurde vermutet, dass die

Plasmabehandlung in Gegenwart von Luftsauerstoff zur Bildung einer Silikon/Silikatschicht führte, sodass terminale Silanolgruppen generiert wurden.

Diese sollten mit APTES **83** unter Ethanol-Abspaltung umgesetzt werden, sodass eine Amin-funktionalisierte Oberfläche **84** entstand (Schema 31). Dazu wurden die Plasma-behandelten Metallplatten ohne weitere Reinigung in einer Lösung von APTES **83** in Toluol gegeben und für zwölf Stunden unter Rückfluss erhitzt.¹⁰⁷ Dabei wurde die Reaktionsmischung nicht gerührt, da sich die Metallplatten sonst gegenseitig beschädigten.



Schema 31: Silanisierung der Plasma-behandelten Metalloberfläche mit APTES **83**. a) APTES **83**, Toluol, Rückfluss, 12 h, -Ethanol.

¹⁰⁷ M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2410-2420.

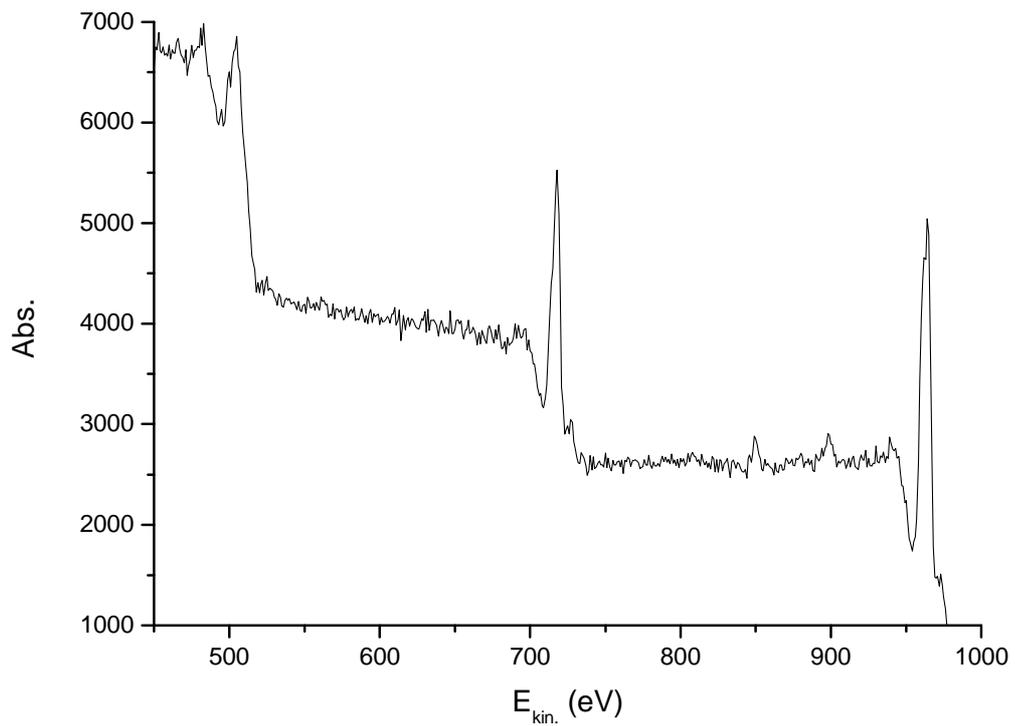


Abbildung 48: XP-Übersichtsspektrum der modifizierten Metalloberfläche **84**; Pass-Energie: 120 eV.

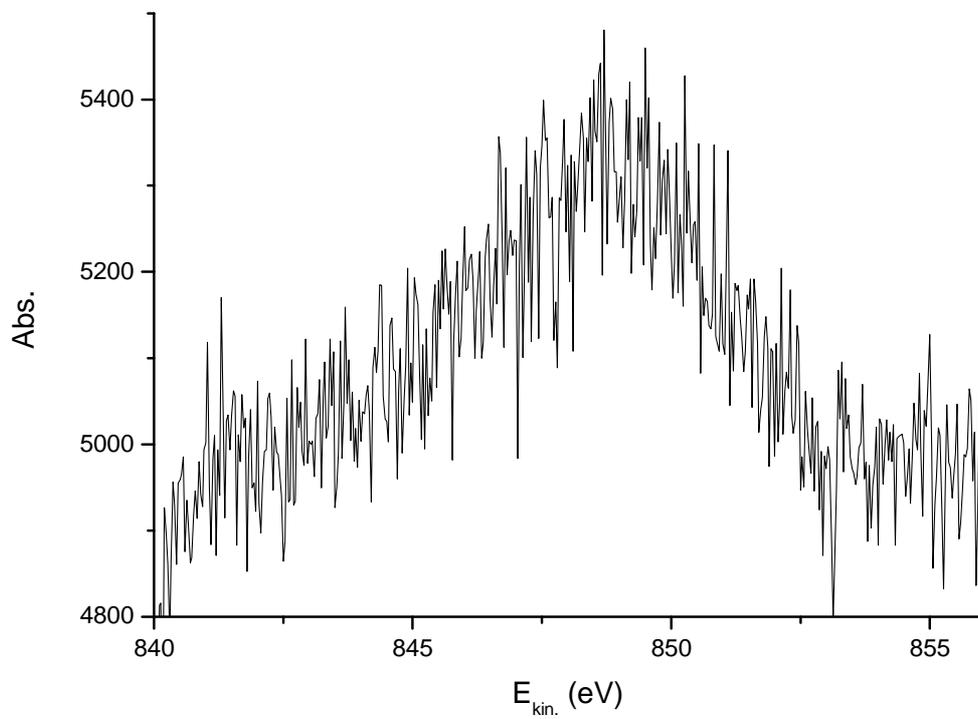


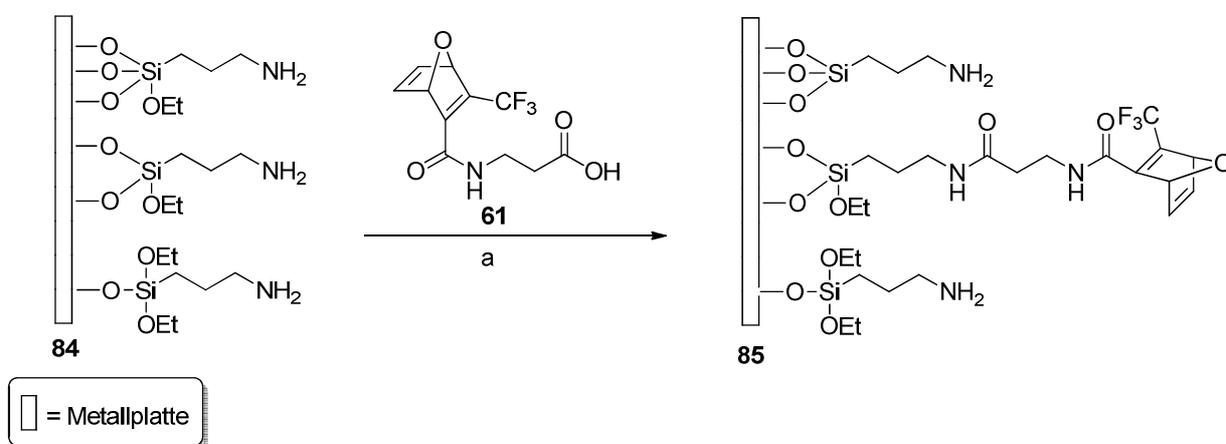
Abbildung 49: Hochauflösung des Stickstoffpeaks der modifizierten Metalloberfläche **84**; Pass-Energie: 190 eV.

Anschließend wurden die aminierten Metallplatten **84** mittels XP-Spektroskopie untersucht (Abbildung 48). Es konnte gezeigt werden, dass neben den Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff und Silizium, die schon nach der Plasmabehandlung zu beobachten waren, auch Stickstoff ($E_{\text{kin.}} = 848.8 \text{ eV}$, BE 104.8 eV) nachzuweisen war. Eine Hochauflösung dessen ist in Abbildung 49 gezeigt. Erneut waren sämtliche Peaks um etwa 6 eV zu geringeren, kinetischen Energien verschoben. Dies ist vermutlich auf die aufgebrauchte, isolierende Silikon/Silikatschicht zurückzuführen.

Da vor der Reaktion mit APTES **83** kein Stickstoff auf der Oberfläche detektierbar war (vergl. Abbildung 46), kann von einer erfolgreichen Aminierung (Silanisierung) der Metallplatte nach Schema 31 ausgegangen werden.

4.5 Kupplung des Oxanorbornadiens **61**

Nachdem die erfolgreiche Derivatisierung der Metalloberfläche, welche als Modell für Herzschrittmacher-Gehäuse dienen sollte, nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.4), sollte im Folgenden die Anbindung des Oxanorbornadiens **61** durchgeführt werden (Schema 32). Dazu wurden die klassischen Kupplungsreagenzien *N*-Hydrosuccinimid (NHS) und Dicyclocarbodiimid (DCC) sowie die Base Di-*iso*-proylethylamin (DIPEA) eingesetzt, welche bereits für die Anbindung des Oxanorbornadiens **61** an PMP verwendet wurden. Das Oxanorbornadiensystem **61** ermöglicht in einem nächsten Schritt eine Metall-freie Ligation von Aziden (Kapitel 4.6).



Schema 32: Reaktion der silanisierten Metalloberfläche **84** mit Oxanorbornadien **61**. a) NHS, DCC, DIPEA, DMF, RT, 7 d.

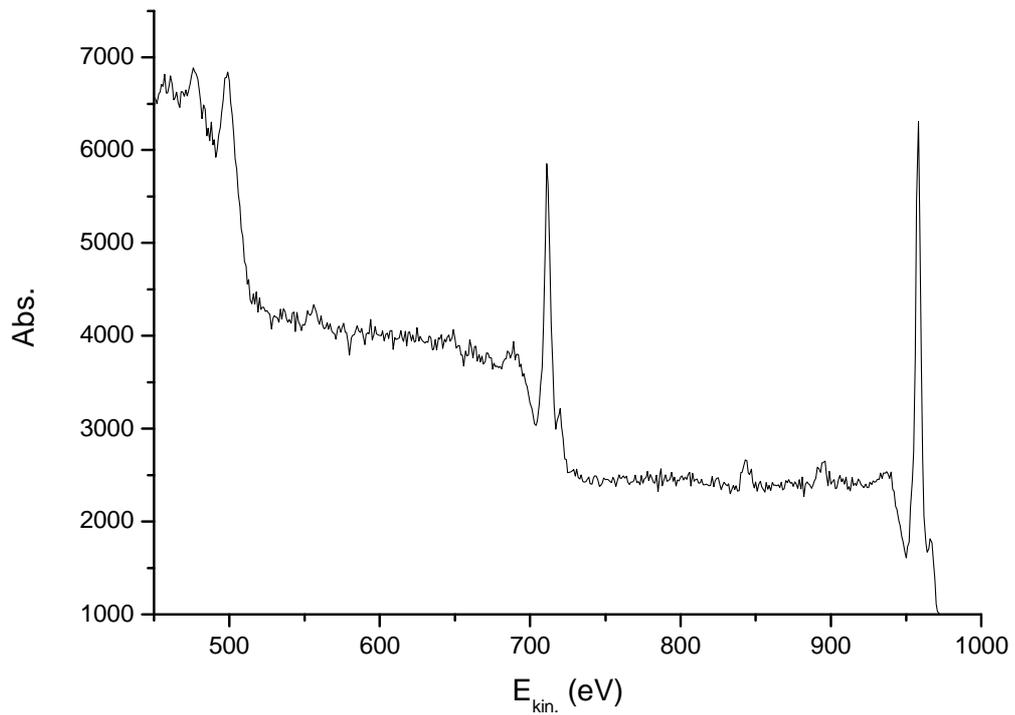


Abbildung 50: XP-Übersichtsspektrum der modifizierten Metalloberfläche **85**; Pass-Energie 120 eV.

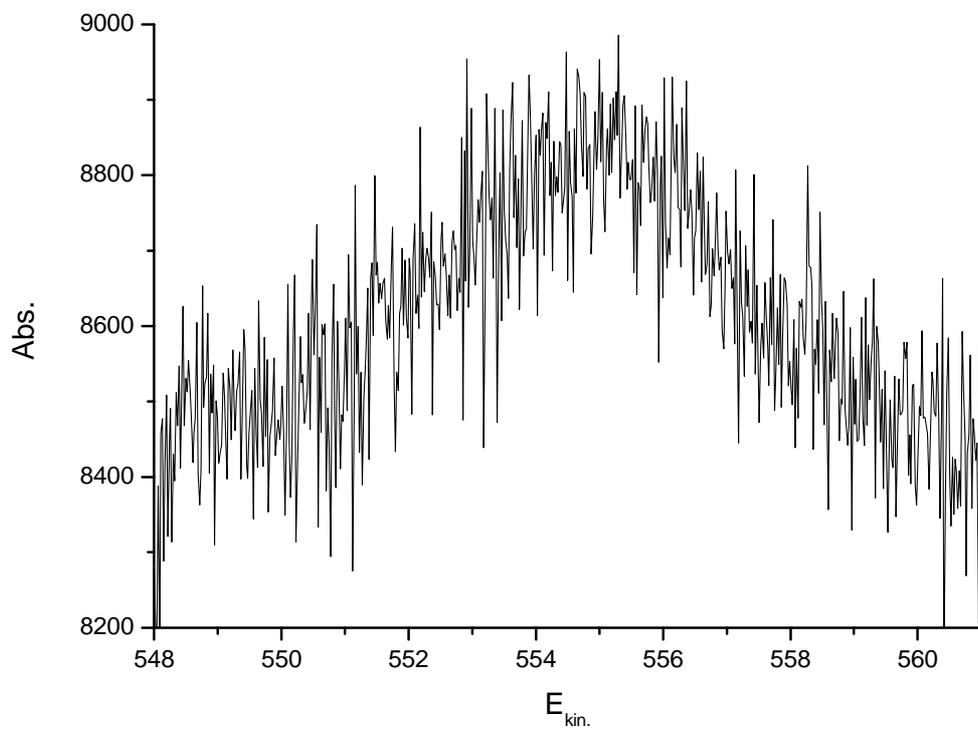


Abbildung 51: Hochauflösung des Fluorpeaks der modifizierten Metalloberfläche **85**; Pass-Energie 190.

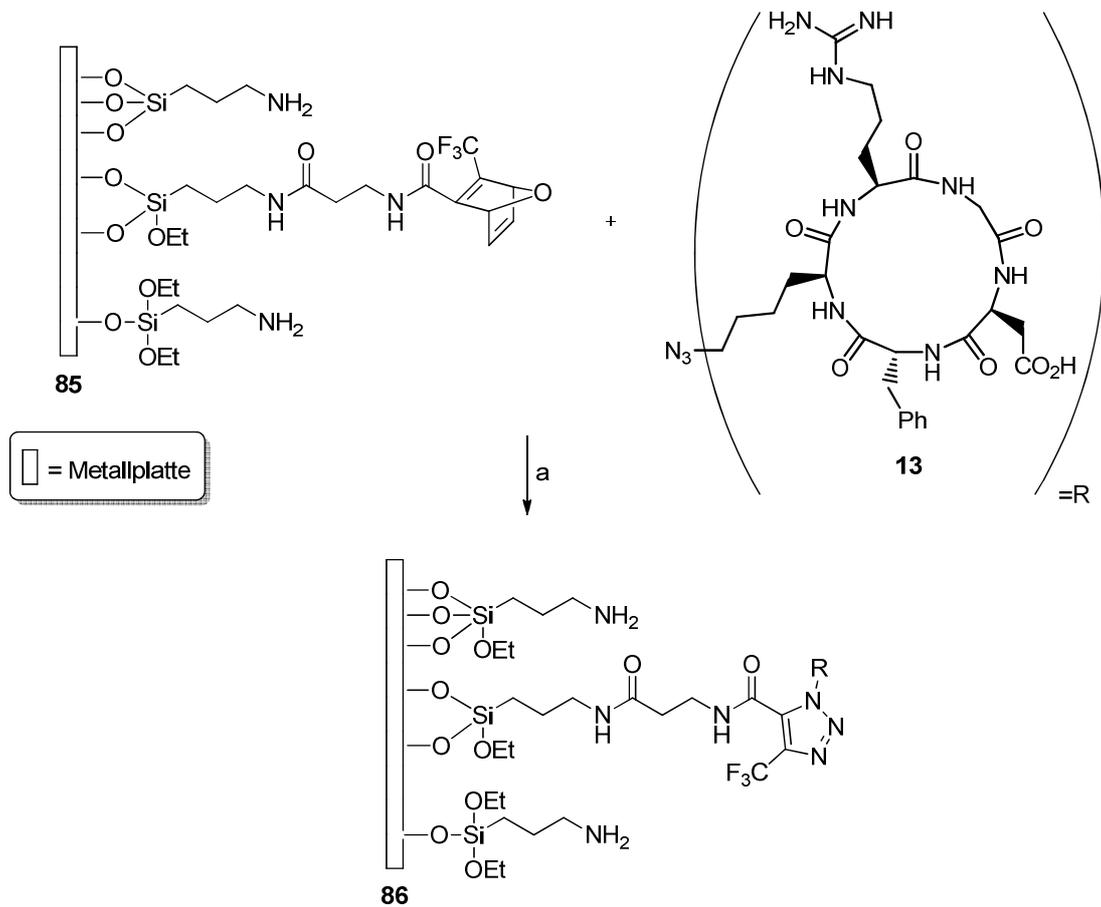
Ein Übersichtsspektrum der XP-spektroskopischen Untersuchungen von Metall-Derivat **85** ist in Abbildung 50 gezeigt. Erneut konnten Stickstoff, Sauerstoff und Silizium nachgewiesen werden (Si außerhalb des Messbereichs von Abbildung 50), die bereits nach der Reaktion mit APTES **83** (Kapitel 4.4) detektiert wurden. Zusätzlich konnte auch das in Oxanorbornadien **61** enthaltene Fluor ($E_{\text{kin.}} = 555.1 \text{ eV}$, BE 698.5 eV) beobachtet werden (Abbildung 51), sodass von einer erfolgreichen Funktionalisierung der Metalloberfläche mit diesem Baustein ausgegangen werden konnte.

4.6 Ligation von zyklischen RGD-Peptiden

Der letzte Schritt zur Steigerung der Biokompatibilität der Metalloberfläche in Hinblick auf deren Anwendung in Herzschrittmacher-Systemen, war die Kupplung von zyklischen RGD Peptiden an das Metall-Derivat **85** (Schema 33). Diese Kupplung sollte eine 1,3-dipolare Zykoaddition zwischen der Metall-gebundenen Oxanorbornadieneinheit und der Azidfunktionalität des RGD-Peptids **13** darstellen. Die Reaktionsbedingungen wurden bereits in Kapitel 3.11 am Beispiel von PMP eingehend erläutert. Das zyklische RGD-Peptid **13** mit der Aminosäuresequenz $c[\text{RGDfK}(\text{N}_3)]$ wurde in Wasser gelöst und die Metallplatten in dieser Lösung für eine Woche inkubiert. Nach gründlicher Reinigung mit Wasser erfolgte erneut eine XP-spektroskopische Analyse. Da durch das Peptid keine neuen Elemente auf der Oberfläche eingeführt wurden, lieferten diese Experimente keine stichhaltigen Nachweise für den Erfolg der Reaktion. Zudem führte die Analyse der Feinaufspaltung der einzelnen Peaks zu keinen neuen Erkenntnissen, da die aufgebrachte Nichtleiterschicht zu einer Verschiebung der Peaks führte. Die Verschiebung fand nicht nach jeder Modifizierung in gleichem Maße statt, sodass die Spektren untereinander nicht verglichen werden konnten.

Es konnte die Funktionalisierung der Metallplatten bis zu Derivat **85** nachgewiesen werden. Zudem konnte die erfolgreiche 1,3-dipolare Zykoaddition an einem Polymer bereits am Beispiel von PMP gezeigt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch in diesem Fall die Ligation des RGD-Peptids stattfand. Studien zur Biokompatibilität der mit RGD-funktionalisierten Metallplatten im Vergleich zu den unbeschichteten Oberflächen, sollten darüber hinaus die erfolgte

Funktionalisierung der Oberfläche zeigen.¹⁰⁸ Dazu sollten die Oberflächen mit Fibroblasten besiedelt und die Menge an adhärenierten Zellen gezählt werden. Dieses Ergebnis sollte einen entscheidenden Wert für die Steigerung der Biokompatibilität des funktionalisierten Materials darstellen. Die biologischen Untersuchungen waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.



Schema 33: Reaktion von Metalloberfläche **85** mit c[RDGfK(N₃)] **13**. a) H₂O, RT, 7 d, -Furan.

¹⁰⁸ Studien zur Biokompatibilität werden von Dr. med B. Wiegmann durchgeführt, Medizinische Hochschule Hannover; Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

5 Hydrogele aus Hyaluronsäure für das *tissue engineering*

5.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Biopolymere vernetzt werden, um als Gerüstmaterial für Zellen zu dienen, sodass künstliche Gewebe oder sogar Organe hergestellt werden können (*tissue engineering*). Als Biopolymere sollten dabei Gelatine und Hyaluronsäure verwendet werden, die jeweils wasserlöslich sind, aber durch chemische Derivatisierung und Vernetzung zu wasserunlöslichen und trotzdem benetzbaren Hydrogelen führen können.

Es wurden zwei Strategien zur Vernetzung von Hyaluronsäure und Gelatine untersucht, welche in den folgenden Abschnitten beschrieben werden. Der erste Ansatz beschäftigt sich mit einer Photovernetzungstechnik der Biomaterialien. Eine zelluläre Besiedlung erfolgt nach der vollständigen Ausbildung des Hydrogels. Die zweite Strategie beruht auf einer Einkapselung der Zellen während des Polymerisationsprozesses. Die chemische Funktionalisierung der Materialien sowie das Für und Wider der beiden Techniken werden im Folgenden genauer diskutiert.

Zudem sollte untersucht werden, inwieweit sich die Eigenschaften von Hydrogelen beeinflussen und vorhersagen lassen. Aus diesem Grund sollten Komposite (*Blends*) aus Hyaluronsäure und Gelatine hergestellt und untersucht werden. In der Dissertation von A. KRAUSE wurde zudem Alginate in gleicher Weise chemisch modifiziert wie die beiden genannten Biopolymere, sodass ein System mit mehr Variationsmöglichkeiten zur Verfügung stand.¹⁰⁹

5.2 Photovernetzbare Polymere

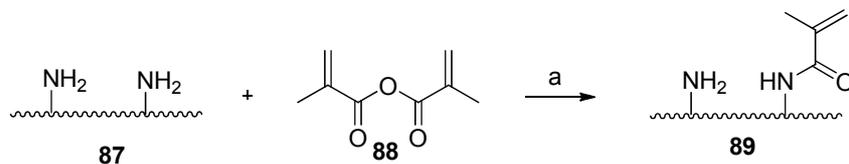
Als Photovernetzungsreaktion wurde die radikalische Vernetzung von Polymer-gebundenen Methacrylatgruppen gewählt. Dazu werden in der Regel Radikalstarter eingesetzt. Die Synthese und Charakterisierung der methacrylierten Polymere Gelatine und Hyaluronsäure werden in den folgenden Abschnitten eingehend diskutiert.

¹⁰⁹ A. Krause, Leibniz Universität Hannover, unveröffentlichte Ergebnisse.

5.2.1 Methacrylierte Gelatine

5.2.1.1 Synthese und Charakterisierung methacrylierter Gelatine

Gelatine-Methacrylat **89** wurde analog zu einer Vorschrift von DUBRIEL *et al.* als dem Protein Gelatine **87** und Methacrylanhydrid **88** synthetisiert (Schema 34).¹¹⁰ Die primären Amine des Lysins der Gelatine griffen letzteres nucleophil an, sodass das Polymer mit Methacrylatgruppen funktionalisiert wurde. Um die optimale Menge an Methacrylatgruppen für die Photovernetzung zu bestimmen, wurde Gelatine mit verschiedenen Belegungsgraden belegt, indem verschiedene Mengen an Methacrylanhydrid zugegeben wurden (Tabelle 11).



Schema 34: Schema der Reaktion zwischen den Lysineinheiten der Gelatine und Methacrylanhydrid.
a) Phosphatpuffer, pH = 7.5, 40 °C, 1 h.

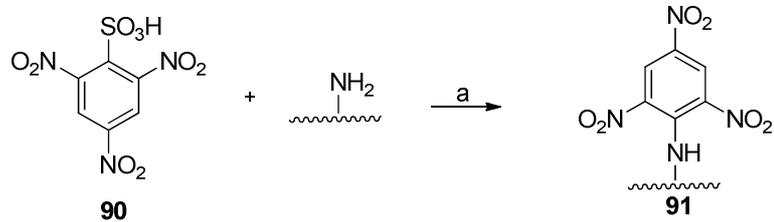
Die Analyse des Belegungsgrades von Gelatine-Derivat **89** wurde anhand des 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) Assays nach einer Vorschrift von SATAKE *et al.* durchgeführt.¹¹¹ Dabei wurde die Menge nicht umgesetzter primärer Amine der Gelatine bestimmt. Die nach der Reaktion mit dem Methacrylanhydrid entstanden sekundäre Amide zeigten dagegen keine Färbung mit TNBS. Sofern die Anzahl primärer Amine vor der Reaktion bekannt war (s.u.), kann die Menge an Methacrylatgruppen auf der Gelatine berechnet werden.

Der Mechanismus der Reaktion zwischen dem primären Amin des Lysins und TNBS ist in Schema 35 illustriert. Zur Durchführung der Reaktion wurde Gelatine-Derivat **89** in einer Konzentration von 1 mg/mL in Wasser gelöst, mit einer wässrigen 4%igen Lösung von Natriumhydrogencarbonat und anschließend mit einer 1 %igen wässrigen Lösung von TNBS **90**, zu jeweils gleichen Teilen, versetzt. Es wurde 2 h bei 40 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10%iger, wässriger Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung sowie 1 M Salzsäure abgebrochen. Durch

¹¹⁰ A. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, *Biomacromol.* **2007**, *8*, 331-337.

¹¹¹ a) K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi, T. Shinoda, *J. Biochem.* **1960**, *47*, 654-660, b) Habeeb, *Anal. Biochem.* **1966**, *14*, 328-336.

Messung der Absorption des entstandenen Chromophors **91** bei seiner maximalen Intensität von 335 nm, wurde der Derivatisierungsgrad der in Schema 34 gezeigten Reaktion bestimmt. Als Standard wurde eine Glycin-Kalibrationsreihe verwendet.



Schema 35: Mechanismus des TNBS-Assays. a) NaHCO_3 , RT, 2 h.

Tabelle 11: Anzahl primärer Amine der Gelatine vor und nach Reaktion mit verschiedenen Äquivalenten Methacrylanhydrid (MA, bezogen auf 0.347 mmol NH_2/g).

Äq MA	0	0.2	0.3	0.4	0.55	0.7	1	5
mmol NH_2/g	0.347	0.214	0.264	0.188	0.156	0.118	0.004	0

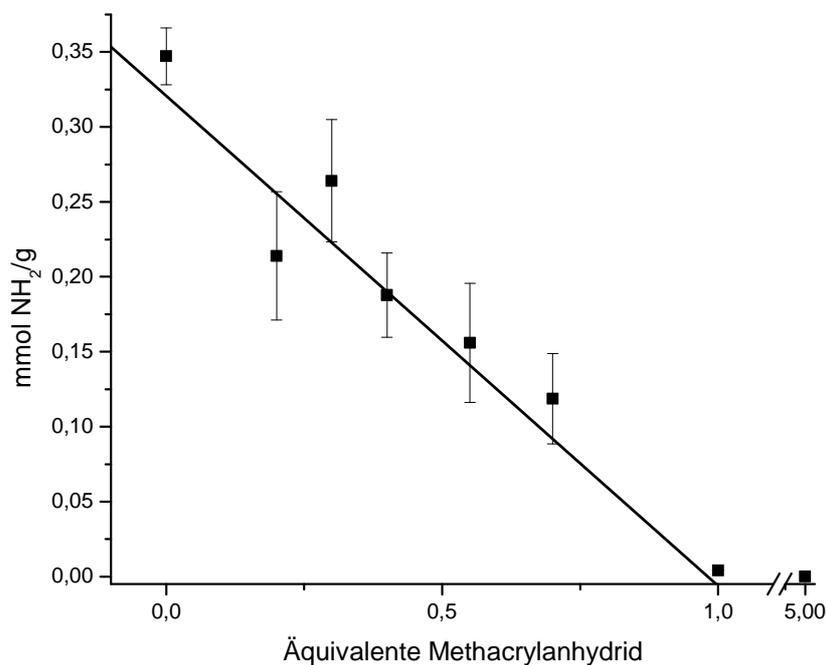


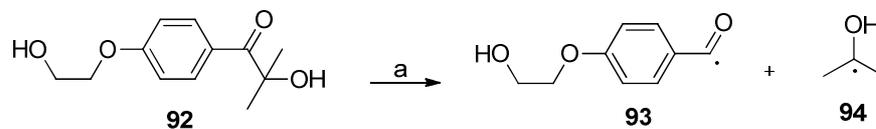
Abbildung 52: Anzahl primärer Amine der Gelatine vor und nach Reaktion mit verschiedenen Mengen Methacrylanhydrid.

Zunächst wurde die Menge an primären Aminen der unmodifizierten Gelatine bestimmt. Diese beträgt 0.347 mmol pro Gramm Gelatine. Nach erfolgter Reaktion mit Methacrylanhydrid wurde die Menge an primären Aminen erneut analysiert. Die Ergebnisse der Färbungen, in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Methacrylanhydrid, sind in Tabelle 11 aufgeführt und in Abbildung 52 graphisch dargestellt.

Die Auswertung des Assays zeigt, dass sich über die zugegebene Menge an Methacrylanhydrid die Belegung des Polymers steuern lässt. Die Messungen zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Werten. Nach Zugabe von einem Äquivalent Methacrylanhydrid zeigte der Assay geringe und nach fünf Äquivalenten keine Färbung. Dies lässt den Schluss zu, dass alle Lysineinheiten der Gelatine methacryliert wurden.

5.2.1.2 Hydrogellierung methacrylierter Gelatine

Nach erfolgter Funktionalisierung der Gelatine mit Methacrylgruppen, wurde diese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht vernetzt. Als Radikalstarter wurde Irgacure 2959 **92** verwendet, welcher nach Einstrahlung von UV-Licht homolytisch zerfällt (Schema 36). Dieser Radikalstarter eignet sich für die Herstellung von Hydrogelen, da er ebenso wie die beschriebenen Peptide und Saccharide wasserlöslich ist. Außerdem wurde er an verschiedenen Zelllinien auf seine Toxizität untersucht.¹¹² Irgacure 2959 **92** war für die meisten Zelllinien verträglich, die tolerierte Menge variierte jedoch von Zelltyp zu Zelltyp.



Schema 36: Struktur von Irgacure 2959 **92**. a) hv.

Der Prozess der Hydrogelbildung ist anhand der Fotostrecke in Abbildung 53 gezeigt. Das methacrylierte Polymer wurde in Wasser gelöst, in eine Hohlform (hier *CultureWell Silicone Gaskets*) gegeben und unter einer UV-Quecksilberlampe zum Hydrogel vernetzt. Die fertigen Hydrogele wurden gefriergetrocknet, sodass sie gelagert werden konnten. Für biologische Tests konnten sie in beliebigen

¹¹² C. G. Williamsa, A. N. Malika, T. K. Kima, P. N. Mansona, J. H. Elisseeffa, *Biomaterials* **2005**, 26, 1211-1218.

Kulturmedien rehydriert und besiedelt werden. Obwohl bereits photochemische Polymerisation von methacrylierten Polymeren in Gegenwart von embryonalen Mäusestammzellen durchgeführt wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit auf selbiges verzichtet, um mögliche Zellschädigungen zu verhindern.¹¹³

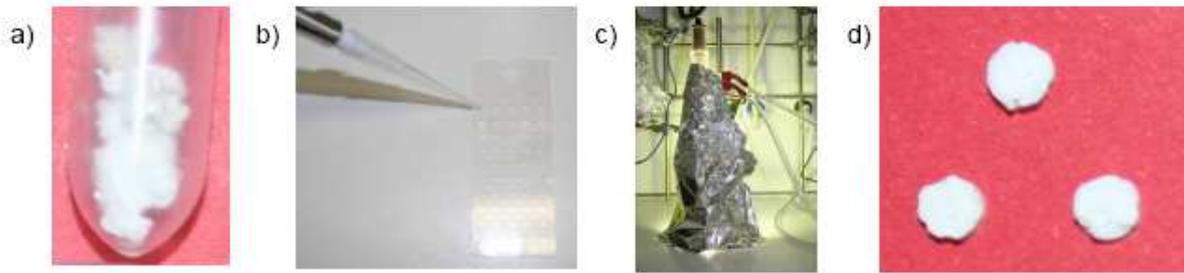


Abbildung 53: Prozess der photochemischen Hydrogelbildung; a) methacryliertes Polymer, gefriergetrocknet, b) Befüllung des Hohlkörpers mit Polymer-Lösung, c) Belichtung der Lösung mit einer UV-Quecksilberlampe d) Hydrogele, gefriergetrocknet.

5.2.1.3 Erhöhung des Belegungsgrades methacrylierter Gelatine

Von Hydrogelen, die aus hochfunktionalisierter Gelatine gewonnen werden, ist eine größere Festigkeit und Rigidität zu erwarten als von solchen, die aus Gelatine mit einer geringeren Menge an Methacrylatgruppen bestehen. Daher erschien es sinnvoll den Funktionalisierungsgrad weiter zu steigern. Die für die Methacrylatfunktionalisierung genutzten Lysineinheiten sind in der verwendeten Gelatine (Typ A) jedoch nur zu 2.9% enthalten.¹¹⁴ Daher sollten weitere Aminosäuren für die Derivatisierung mit Methacrylatgruppen verwendet werden. Besonders geeignet schienen dabei Asparaginsäure und Glutaminsäure, die zu 2.9% beziehungsweise 4.8% im Protein enthalten sind. Diese sollten durch Kupplung mit Ethylendiamin in die entsprechenden Amide **95** überführt werden und anschließend unter oben genannten Bedingungen mit Methacrylanhydrid zu Gelatine-Methacrylat **96** umgesetzt werden (Schema 37).

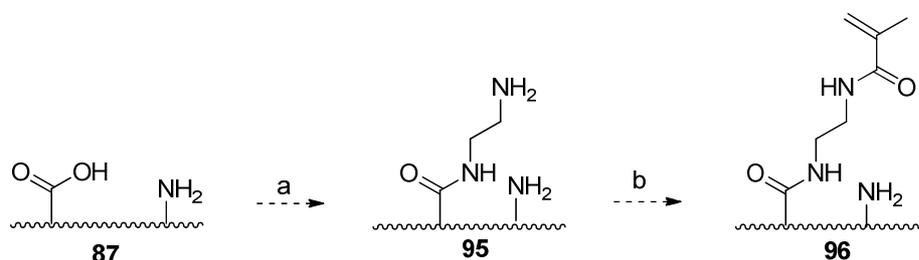
Die Funktionalisierung der sauren Aminosäuren der Gelatine mit Ethylendiamin wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert.¹¹⁵ Sowohl die literaturbekanntesten als auch weitere Kupplungsbedingungen wurden getestet (Tabelle

¹¹³ A. Khademhosseini, G. Eng, J. Yeh, J. Fukuda, J. Blumling, R. Langer, J. A. Burdick, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2006**, 79A, 522-532.

¹¹⁴ M. Regnitz, J. Falbe; RÖMPP, Thieme Stuttgart-New York, 9. Auflage **1995**.

¹¹⁵ a) T. Kushibiki, R. Tomoshige, K. Iwanaga, M. Kakemi, Y. Tabata, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2006**, 17, 645-658, b) N. Fukuyama, T. Onuma, S. Jujo, Y. Tamai, T. Suzuki, K. Myojin, Y. Tabata, Y. Ishihara, J. Takano, H. Moro, *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **2006**, 31, 49-52, c) X. Mo, H. Iwata, S. Matsuda, Y. Ikada, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2000**, 11, 341-351, d) C. M. Ofner, W. A. Bubnis, *Pharmaceutical Res.* **1996**, 13, 1821-1827.

11) und deren Erfolg mittels TNBS-Assay überprüft. Allerdings konnte bei keiner der durchgeführten Reaktionen ein Anstieg an primären Aminogruppen gegenüber einer Negativprobe, in der keine Kupplungsreagenzien zugesetzt wurden, beobachtet werden.



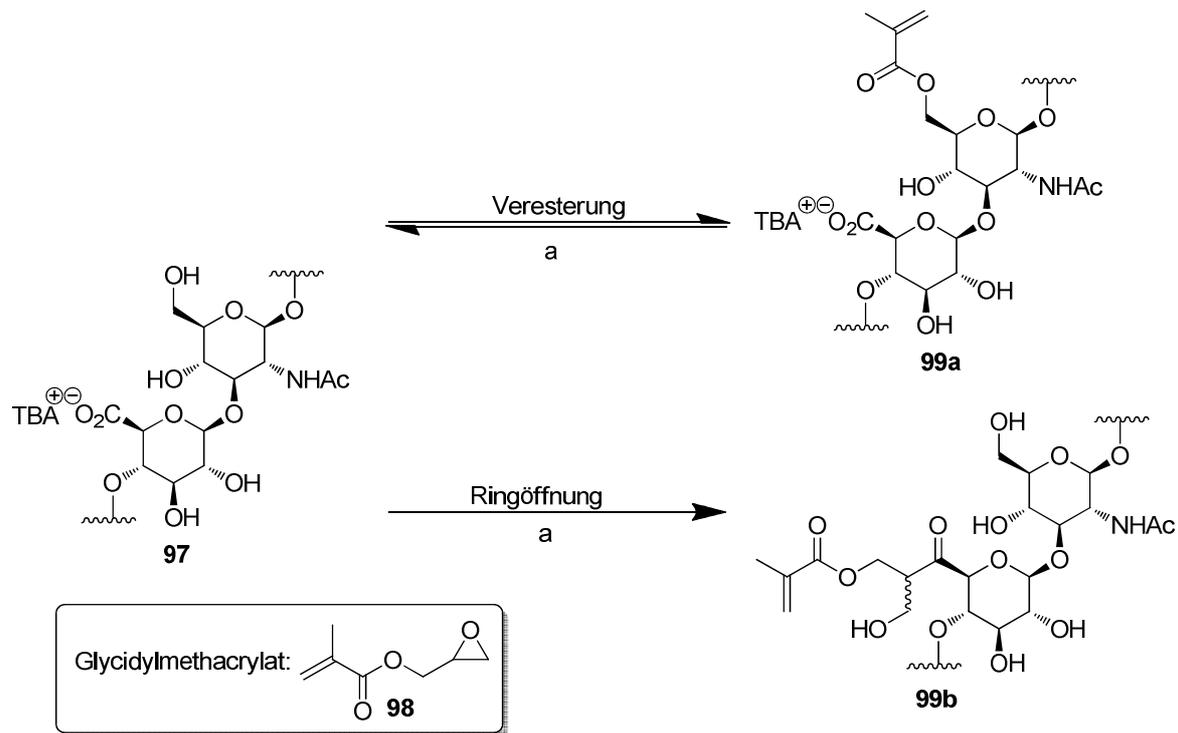
Schema 37: Synthesepanung für die Funktionalisierung von Asparagin- und Glutaminsäure der Gelatine mit Methacrylatgruppen. a) Ethylendiamin, Bedingungen Tabelle 11, b) Methacrylanhydrid, Phosphatpuffer, pH = 7.5, 40 °C, 1 h.

Tabelle 11: Bedingungen für die Funktionalisierung von Asparagin- und Glutaminsäure der Gelatine mit Ethylendiamin analog zu Schema 37. Bei keiner der Experimente konnte ein Erfolg nachgewiesen werden. DIC = Di-*iso*-propylcarbodiimid; DMAP = Dimethylaminopyridin; DIPEA = Di-*iso*-propylethylamin; ED = Ethylendiamin; DCC = Dicyclocarbodiimid; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid.

Nr.	Reagenzien	Lösungsmittel	Zeit, Temperatur
A	DIC, DMAP, ED	3% Na ₂ CO ₃	1.5 h, 50 °C
B	DIC, DMAP, DIPEA, ED	H ₂ O	2 d, 50 °C
C	DIC; DMAP; DIPEA; ED (tr.)	DMSO	4 d, RT
D	NHS, DCC, DIPEA, ED	DMSO	22 h, 50 °C
E	NHS, DMAP, ED	H ₂ O, pH =5	22 h, 37 °C
F	DCC, DMAP, DIPEA, ED (tr.)	DMSO	4 d, RT
G ^[115d]	EDC, ED	H ₂ O, pH =5	24 h, RT
H ^[115c]	EDC, ED	DMSO	24 h, 37 °C
I ^[115a]	EDC, ED	H ₂ O mit NaH ₂ PO ₄ ; mit HCl auf pH =5	22 h, 37 °C
J	EDC, ED (tr.)	ED	4 d, RT
K ^[115b]	EDC, ED	Phosphatpuffer pH = 7.4; mit HCl auf pH = 5	2 d, 37 °C

5.2.2 Synthese und Charakterisierung methacrylierte Hyaluronsäure

Da die Methacrylierung und Photovernetzung bereits an Gelatine erfolgreich durchgeführt werden konnte (Kapitel 5.2.1), sollte auch das Polysaccharid Hyaluronsäure in gleicher Weise derivatisiert und analysiert werden. Hyaluronsäure kommt ebenso wie Kollagen, die nicht denaturierte Form der Gelatine, im Menschen vor und kann durch das Enzym Hyaluronidase degradiert werden.



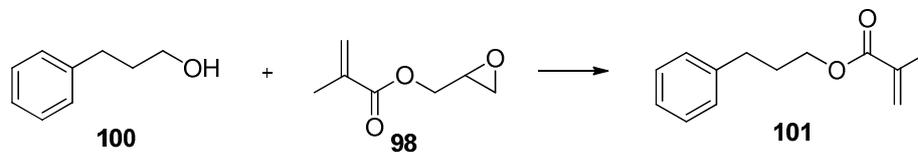
Schema 38: Umsetzung von Hyaluronsäure **97** mit Glycidylmethacrylat **98**. a) Glycidylmethacrylat **98**, Dimethylaminopyridin, DMSO, 55 °C, 6 d.

Die chemische Funktionalisierung der Hyaluronsäure mit Methacrylatgruppen wurde anhand einer Vorschrift vom OUDSHOORN *et al.* mit Glycidylmethacrylat **98** in Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt (Schema 38).¹¹⁶ Zur Erhöhung der Löslichkeit der unmodifizierten Hyaluronsäure in organischen Lösungsmitteln war zuvor dessen Überführung vom Natrium- in das *tert.*-Butylammoniumsalz (TBA-Salz) notwendig. Durch Koordination dieses großen, unpolaren Ions an das Saccharid wurde die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt und die in organischen Lösungsmitteln gesteigert.

Der Mechanismus der Methacrylierung von Hyaluronsäure wurde später von BENCHERIF *et al.* beschrieben. Dabei reagiert der primäre Alkohol mit dem Glycidylmethacrylat, wobei eine Veresterung stattfindet und Glycidylalkohol

¹¹⁶ M. H. M. Oudshoorn, R. Rissmann, J. A. Bouwstra, W. E. Hennink, *Polymer* **2007**, *48*, 1915-1920.

abgespalten wird.¹¹⁷ Außerdem reagiert die Säurefunktion der Hyaluronsäure mit Glycidylmethacrylat unter Öffnung des Epoxids. Dies konnte durch Modellreaktionen zwischen Monomethoxy-PEG und Monomethoxy-PEG-carboxymethyl belegt werden.¹¹⁷ Da die Veresterung im Gegensatz zu der Ringöffnung reversibel abläuft, kann nach langen Reaktionszeiten eine zunehmende Menge an Ringöffnungsprodukt beobachtet werden. Der primäre Alkohol kann das Epoxid nicht öffnen. Dies ergibt sich aus einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modellreaktion zwischen 3-Phenylpropan-1-ol **100** und Glycidylmethacrylat **98** (Schema 39). Dabei konnte ausschließlich das Veresterungsprodukt **101** in einer Ausbeute von 63% erhalten werden.



Schema 39: Modellreaktion von 3-Phenylpropan-1-ol **100** mit Glycidylmethacrylat **98**. a) DMAP, DMSO, 20 h, 50 °C, 63%.

5.2.3 Hydrogelierung methacrylierter Hyaluronsäure

Die methacrylierte Hyaluronsäure wurde analog zu dem für Gelatine beschriebenen Verfahren vernetzt (Kapitel 5.2.1.2). Dabei wurde die methacrylierte Hyaluronsäure wässrig gelöst und durch Zugabe des Radikalstarters Irgacure 2959 **92** und durch Einstrahlung von UV-Licht hydrogeliert.

Neben den reinen Gelatine und Hyaluronsäure Hydrogelen wurden auch Blends beider Materialien hergestellt. Des Weiteren wurden Blends mit methacryliertem Alginat erzeugt. Insgesamt wurden die folgenden Hydrogelzusammensetzungen hergestellt und untersucht: Gelatine (pur), Hyaluronsäure (pur), Alginat (pur), Gelatine/Hyaluronsäure (1/1), Gelatine/Alginat (1/1) und Hyaluronsäure/Alginat (1/1).

Die rheologischen Eigenschaften der Gele aus den jeweiligen Polymeren sowie deren Blends werden ebenfalls in der Dissertation von A. KRAUSE beschrieben.¹⁰⁹ Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass jedes Material spezifische physikalische Eigenschaften besitzt. Durch Herstellung von Kompositen ließen sich gezielt Eigenschaften der Hydrogele entsprechend eines Baukastenprinzips

¹¹⁷ S. A. Bencherif, A. Srinivasan, F. Horkay, J. O. Hollinger, K. Matyjaszewski, N. R. Washburn, *Biomaterials* **2008**, 29, 1739-1749.

einstellen. Die Gelatine ist das weichste Material. Trotzdem traten erst bei starker, mechanischer Belastung Veränderungen in der Struktur der Gelatine-Hydrogele auf. Hyaluronsäure zeigte im Gegensatz dazu eine höhere Rigidität, jedoch weniger Toleranz gegenüber mechanischer Belastung. Alginate ist das Rigideste unter den beschriebenen Materialien und hat eine im Vergleich zu Gelatine erhöhte Toleranz gegenüber mechanischem Stress.

Anschließend wurden die verschiedenen Hydrogele biologisch examiniert.¹¹⁸ Dabei wurden die in Nährmedium aufgequollenen Hydrogele mit einer Kardiomyozyten-angereicherten Rattenherz-Zellpopulation (CM) besiedelt. Nach siebentägiger Kultivierung wurde deren Kontraktion unter dem Mikroskop beobachtet. Außerdem wurde die Adhärenz der Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen und das Einwachsen der Zellen durch Kryoschnitte nachgewiesen (Abbildung 54). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Herzmuskelzellen auf allen Hydrogelmaterialien vital blieben, jedoch nur adhärent wurden, wenn Gelatine zugegen war. Dass die Kardiomyozyten auf den Sacchariden nicht adhärent wurden, ist vermutlich auf deren Mangel an zellspezifischen Bindungsstellen zurückzuführen.

Tabelle 12: Biologische Untersuchung von neonatalen Rattenkardiomyozyten (CM) auf den Hydrogelen aus Hyaluronsäure, Gelatine und Alginate sowie deren Blends.

	Gel	HyA	Alg	HyA-Gel	Alg-Gel	Alg-HyA
CM Überleben und Kontraktion	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
CM-induzierte scaffold Kontraktion	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
CM Adhärenz	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
CM Einwachsung	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

¹¹⁸ Biologische Untersuchungen wurden J. Dahmann in der Arbeitsgruppe von Dr. I. Grub durchgeführt, Medizinische Hochschule Hannover; Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.

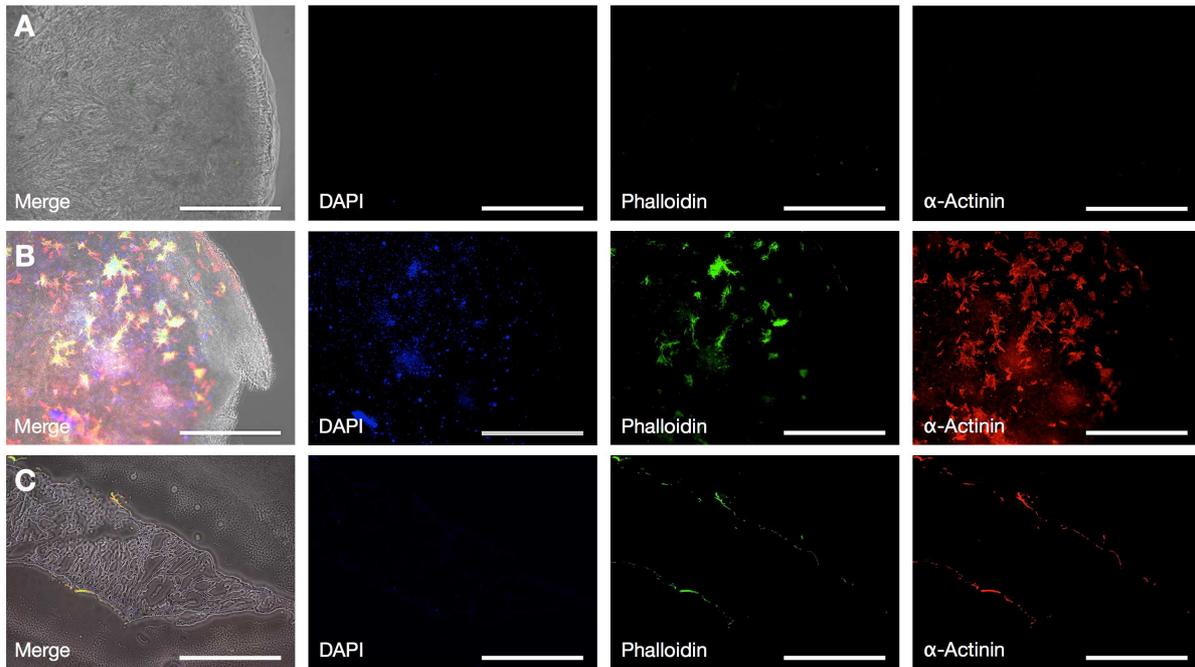


Abbildung 54: Immunofluoreszenz Färbung der Rattenkardiomyozyten nach sieben Tagen auf den Hydrogelen; Zellkerne (blau), Intrazytoplasmatisches F-Actin (grün) und Kardiomyozyten Marker sarkomerisches α -Actinin (rot) A: Alginat/Hyaluronsäure (1/1), B: Gelatine/Hyaluronsäure (1/1), C: Kryoschnitt von B; Maßstab = 1 mm.¹¹⁸

Der Kryoschnitt der Gelatine/Hyaluronsäure Hydrogele zeigte deutlich, dass die Zellen nicht in die Materialien einwachsen konnten (Abbildung 54C). Darum wurde im Folgenden die Größe der Poren innerhalb der Hydrogele durch rasterelektronkraftmikroskopische (REM) Studien bestimmt. Abbildung 55 zeigt REM-Aufnahmen der radikalisch polymerisierten, gefriergetrockneten Hydrogele, bestehend aus Hyaluronsäure/Alginat (1/1). Die REM-Bilder von Gelatine Hydrogelen sind in Abbildung 56 dargestellt.¹¹⁹ Vergleichend kann festgestellt werden, dass deren Poren deutlich homogener verteilt vorliegen als in dem Komposit aus Hyaluronsäure und Alginat. Allerdings besitzen die Poren nur eine maximale Größe von 5 μm und ermöglichen somit keine Migration von Zellen in das Gel. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die Poren innerhalb des Gels untereinander nicht verbunden waren, sodass die Zellen nicht weiter einwandern konnten. Die Poren des Komposits haben Größen von 8 bis 30 μm , wobei diese zum Teil auf den Lyophilisationsprozess zurückzuführen sind. Es sind jedoch auch gänzlich porenfreie Regionen zu beobachten.

¹¹⁹ REM-Aufnahmen wurden von T. Chakradeo in der Arbeitsgruppe von Prof. B. Glasmacher durchgeführt, Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 36, 30167 Hannover.

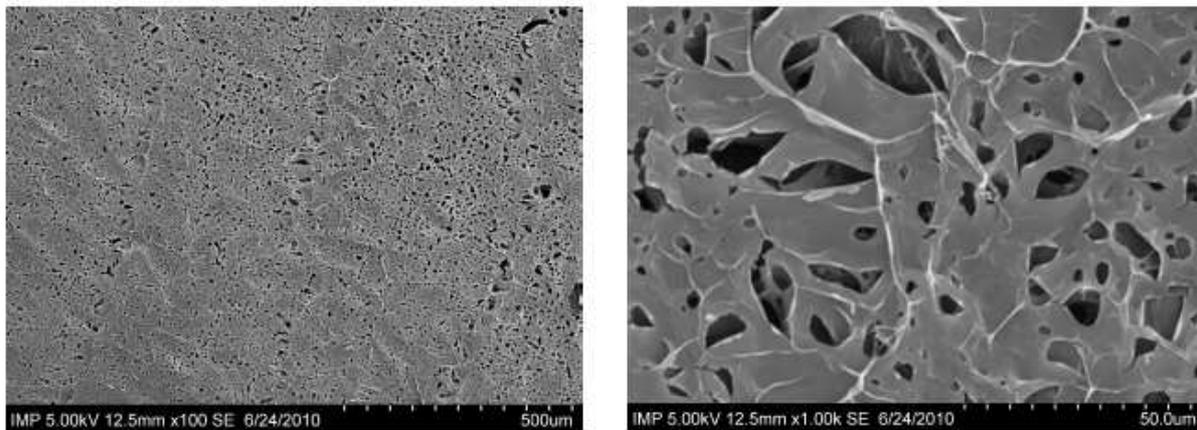


Abbildung 55: REM-Aufnahmen von radikalisch polymerisierten Hyaluronsäure/Alginate (1/1) Hydrogelen.¹¹⁹

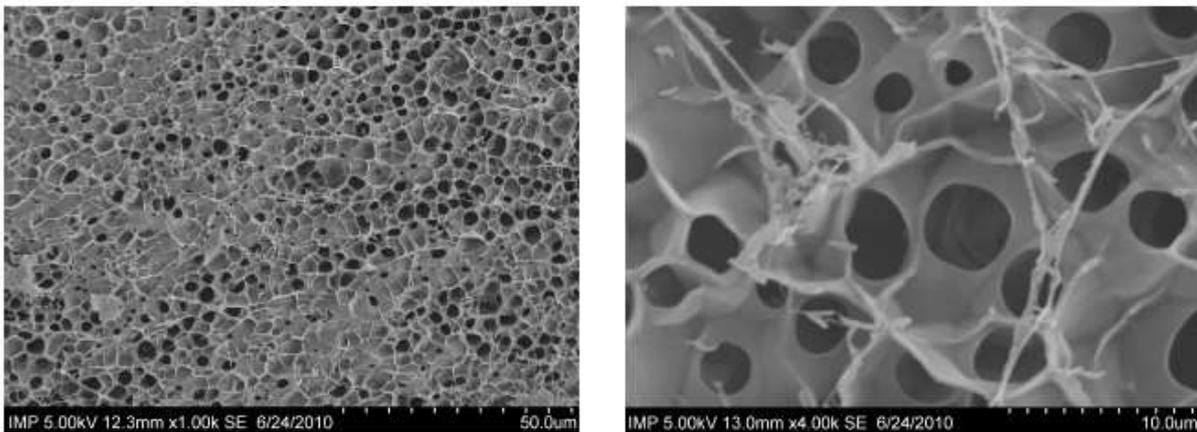


Abbildung 56: REM-Aufnahmen von radikalisch polymerisierten Hydrogelen aus Gelatine.¹¹⁹

Die optimale Porengröße für ein homogenes Einwachsen der Zellen ist stark abhängig vom Zelltyp und von der Zusammensetzung und Morphologie des verwendeten Polymers.¹²⁰ Für Fibroblasten, die zu etwa 10-20% in der verwendeten Kardiomyozyten-angereicherten Rattenherz-Zellpopulation enthalten waren, wird eine tolerierte Größenverteilung von 38-150 µm angegeben.¹²¹ Da die Porengröße in den photovernetzten Materialien jedoch deutlich unterhalb dessen lag, wurden Experimente hinsichtlich einer gezielten Porenbildung durchgeführt.

¹²⁰ F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.J. Gibson, *Biomaterials* **2005**, 26, 433-441.

¹²¹ a) J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Mueller, L. G. Griffith, *Tissue Eng* **2001**, 7, 557-72 b) A. K. Salem, R. Stevens, R. G. Pearson, M. C. Davies, S. J. Tendler, C. J. Roberts, P. M. Williams, K. M. Shakesheff. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 61, 212-7.

Eine Möglichkeit bietet die gezielte Mikrostrukturierung der Gele mit Laserpulsen.¹²² Dazu wurden die methacrylierten Polymere zusammen mit dem Radikalstarter Irgacure 2959 **92** in Wasser gelöst und in eine Form, wie zum Beispiel den in Abbildung 53 gezeigten *Culture Well Silicone Gaskets*, gegeben. Anschließend wurde eine Vernetzung der Polymerstränge ausgelöst, indem durch die Laser-induzierte Energiezufuhr Radikale gebildet wurden. Diese Technik wird als zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) bezeichnet.¹²³ Der Laser emittiert langwelliges Licht im infraroten Bereich (NIR, 800 nm), welches so stark gebündelt wird, dass im Fokus des Lasers ein Multiphotonenprozess stattfindet, der eine Polymerisation auslösen kann. Um diesen zu ermöglichen, wird für die Strukturierung ein Femtosekundenlaser verwendet. Durch eine computergesteuerte Strahlführung, konnte das Material in einer beliebigen Form polymerisiert werden. Die überschüssigen, nicht polymerisierten Polymerstränge wurden aus dem Netzwerk herausgewaschen und die strukturierten Hydrogele mit Poren induzierter Größe wurden lyophilisiert. REM-Aufnahmen der auf diese Weise strukturierten Gelatine sind in Abbildung 57 gezeigt. Die Strukturierung verschiedener Hydrogel Blends mittels 2PP sowie die biologischen Untersuchungen zum Zelleinwuchs in derart strukturierte Materialien wird derzeit untersucht.

¹²² Laserstrukturierungen wurden von Dr. A. Ovsianikov in der Arbeitsgruppe von Prof. Boris Chichkov nach A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, L. Möller, G. Dräger, B. Chichkov, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 851-858 durchgeführt, Laser Zentrum Hannover e.V., Hollerithallee 8, 30419 Hannover.

¹²³ a) S. Maruo, O. Nakamura, S. Kawata, *OPT Lett* **1997**, *22*, 132-134, b) M. Deubel, G. Von Freymann, M. Wegener, S. Pereira, K. Busch, C. Soukoulis, *Nature Materials* **2004**, *3*, 444-447.

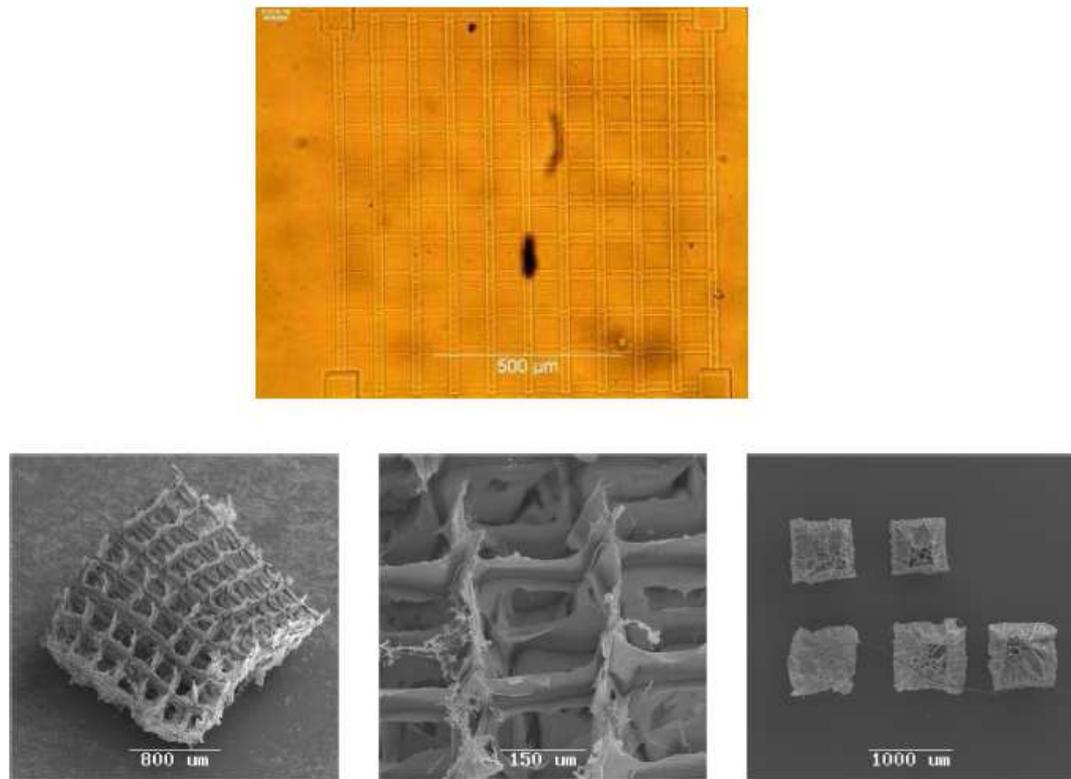
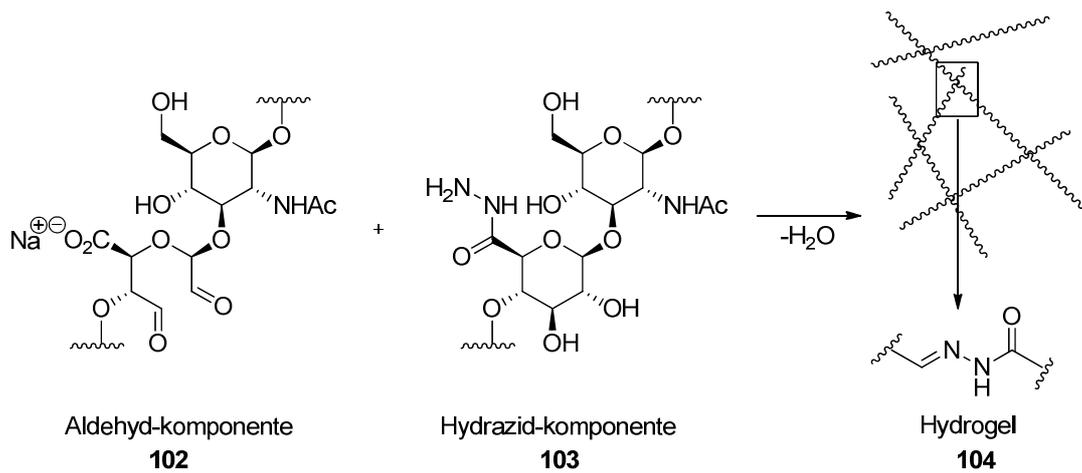


Abbildung 57: Mittels 2PP-Lasertechnik strukturierte Hydrogele aus methacrylierter Gelatine.¹²²

5.3 *in situ* Vernetzbare Polymere

In Kapitel 5.2 wurde die zelluläre Besiedlung von vorstrukturierten Gerüstmaterialien untersucht. Eine homogene Bewachung der Hyaluronsäure-Hydrogele und deren Blends mit neonatalen Rattenherzmuskelzellen, welche für die Ausbildung eines dreidimensionalen Gewebes notwendig ist, konnte jedoch nicht erreicht werden. Daher wurden auf Basis von Hyaluronsäure und Alginat *in situ* herstellbare Hydrogele entwickelt.¹⁰⁹ Ein solches System ermöglicht die homogene Einbettung von Zellen bereits während des Vernetzungsprozesses.

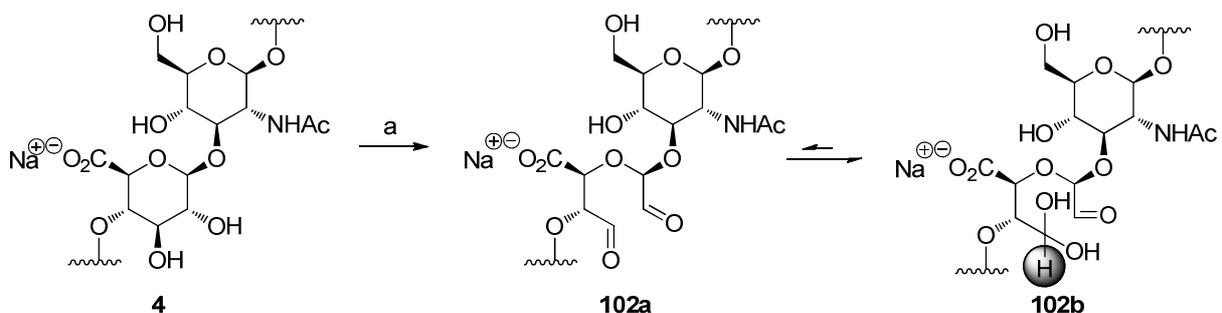
Zu diesem Zweck wurden beide Saccharide in ihre Aldehyd bzw. Hydrazid-Derivate überführt. Die Ausbildung von Hydrogelen sollte spontan nach Zusammengeben beider Komponenten über Hydrazonbindungen erfolgen (Schema 40). Die Synthese und Analyse der beiden Hyaluronsäurederivate wird in den Abschnitten 5.3.1 und 5.3.2 eingehend diskutiert.



Schema 40: *In situ* Hydrogelierung basierend auf Hydrazonbindungen aus Aldehyd- und Hydrazid-modifizierter Hyaluronsäure.

5.3.1 Synthese der Aldehydkomponente

Die Darstellung der Aldehyd-modifizierten Hyaluronsäure, welche zur Ausbildung eines, wie in Kapitel 5.3 beschriebenen, spontan vernetzenden Hydrogels verwendet wird, ist in Schema 41 dargestellt. Sie verläuft unter Natriumperiodat induzierter Spaltung der C-C Bindung der Dihydroxyfunktion der D-Glucuronsäure-Einheit. Die Synthese wurde ähnlich einer Vorschrift von JIA *et al.* durchgeführt.¹²⁴



Schema 41: Synthese von Hyaluronsäure-Aldehyd **102**. a) NaIO₄, H₂O, RT, 12h.

Der Derivatisierungsgrad von **102** ist von der eingesetzten Menge an Natriumperiodat abhängig und wurde anhand von ¹H-NMR-spektroskopischen Daten ermittelt. Die Protonen der Aldehydgruppen sind jedoch nicht detektierbar, da die Aldehyde als Aldehyd-Hydrate vorliegen. Die Protonen am geminalen Diol zeigen zwischen

¹²⁴ a) X. Jia, G. Colombo, R. Padera, R. Langer, D. S. Kohane, *Biomaterials* **2004**, 25, 4797–4804, b) X. Jia, J. A. Burdick, J. Kobler, R. J. Clifton, J. J. Rosowski, S. M. Zeitels, R. Langer, *Macromol.* **2004**, 37, 3239-3248.

4.4 ppm und 5.0 ppm $^1\text{H-NMR}$ -Signale (Schema 41: Markierung, Abbildung 58). Zur Bestimmung des Derivatisierungsgrades wurden diese Protonen im Verhältnis zu den Protonen der Acetylgruppe des *N*-Acetyl-D-Glucoseamins betrachtet. Deren Integral wurde dabei auf einen Wert von 3 kalibriert. Der Gehalt an Aldehydfunktionen im Polymer in Abhängigkeit von der eingesetzten Natriumperiodatmenge wird in Tabelle 13 dargestellt.

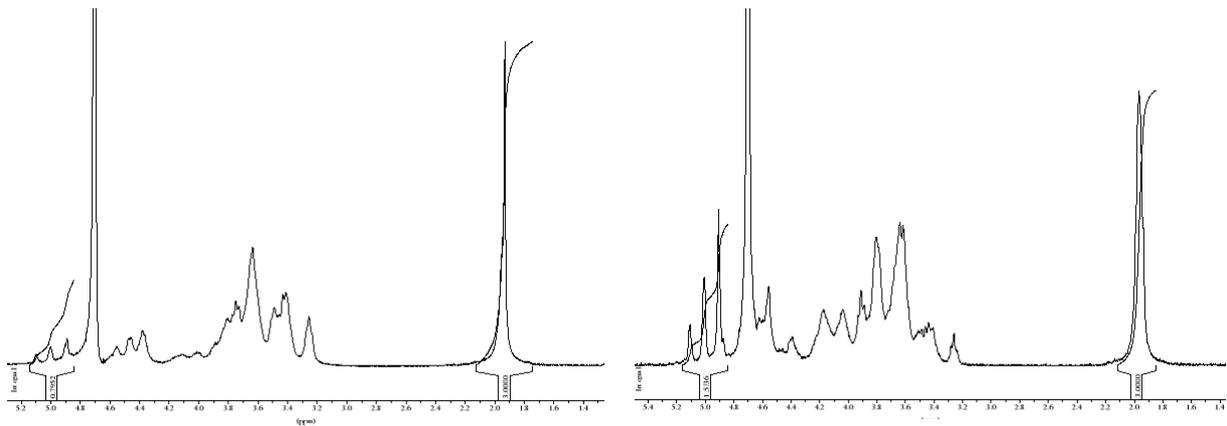


Abbildung 58: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Aldehyd-modifizierten Hyaluronsäure **102** in D_2O ; links: nach Zugabe von zwei Äquivalenten Natriumperiodat; rechts: nach Zugabe von vier Äquivalenten Natriumperiodat.

Tabelle 13: Derivatisierungsgrad von Hyaluronsäure-Aldehyd **102** in Abhängigkeit von der Menge an zugesetztem Natriumperiodat. 100 % Derivatisierung bedeutet, dass jede Dimereinheit (jeder zweite Zucker) zwei Aldehyde trägt.

Äq NaIO_4	Derivatisierungsgrad (NMR)	Derivatisierungsgrad (Purpald)
0.5	33 %	33±4 %
2	40 %	43±9 %
4	81 %	58±8 %
6	84 %	65±9 %
8	100 %	70±5 %
10	100 %	n. d.
12	Nicht bestimmbar	71±7 %

(Überlagerung mit H_2O)

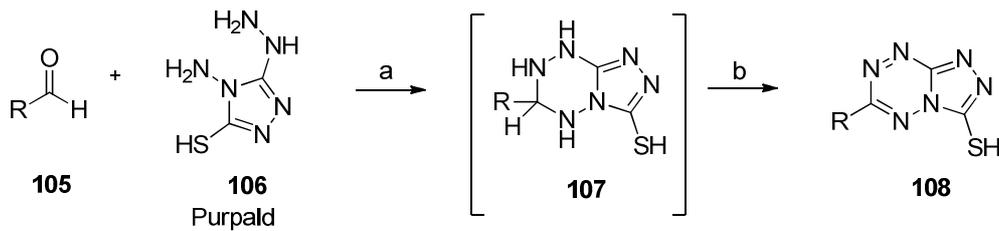
Zur Überprüfung der durch NMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse, wurde der Gehalt an Aldehyden zusätzlich durch ein colorimetrisches Analyseverfahren bestimmt. Zunächst wurde eine indirekte Quantifizierung verwendet, bei der das Aldehyd-modifizierte Polymer **102** zunächst mit einem Überschuss an *tert.*-Butylcarbazat umgesetzt wurde. Anschließend wurde die überschüssige Menge an Carbazat mittels TNBS-Assays bestimmt. Dies führte jedoch zu widersprüchlichen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen (Beschreibung des TNBS-Assays: Kapitel 5.2.1.1).

Deshalb wurde ein Purpald-Assay zur Quantifizierung der Aldehydgruppen von **102** verwendet. Die Durchführung erfolgte wie von COURNOYER *et al.* beschrieben.¹²⁵ Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Schema 42 dargestellt. Polymer und Purpald **106** wurden jeweils in einer Konzentration von 0.5 bzw. 10 mg/mL in 1 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen zu gleichen Teilen zusammengegeben und für 30 min bei Raumtemperatur in einem geöffneten Reaktionsgefäß inkubiert. Letzteres war entscheidend für den Reaktionsverlauf, da die in Schema 42 gezeigte Oxidation nur in Anwesenheit von Sauerstoff ablief. Nach erfolgter Reaktion war eine violette Färbung der Lösung zu beobachten. Die Absorptionen der verschiedenen Proben wurde anschließend bei 550 nm detektiert. Die Bestimmung des Derivatisierungsgrads erfolgte durch Erstellen einer Eichgerade, bei der Propanal als Aldehyd-Komponente in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurde. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Aldehyde der Hyaluronsäure sind in Tabelle 13 vergleichend mit den Ergebnissen der ¹H-NMR-basierten Quantifizierung dargestellt.

Die von HELDT *et al.* publizierte Variante des Purpald-Assays, wobei statt einer basischen Umgebung, ein Phosphat-Citrat-Puffer (0.075 M, pH = 6) als Reaktionsmedium verwendet wurde, ist für die Quantifizierung der Aldehydbelegung von Hyaluronsäure ungeeignet.¹²⁶ Gleiches gilt für deren vorgeschlagenen Zusatz von Natriumborhydrid nach erfolgter Reaktion.

¹²⁵ a) J. J. Cournoyer, T. Kshirsagar, P. P. Fantauzzi, G. M. Figliozzi, T. Makdessian, B. Yan *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 120-124, b) G. Avigad, *Anal. Biochem.* **1983**, *134*, 499-504.

¹²⁶ J.-M. Heldt, N. Fischer-Durand, M. Salmain, A. Vessières, G. Jaouen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *32*, 5429-5433.



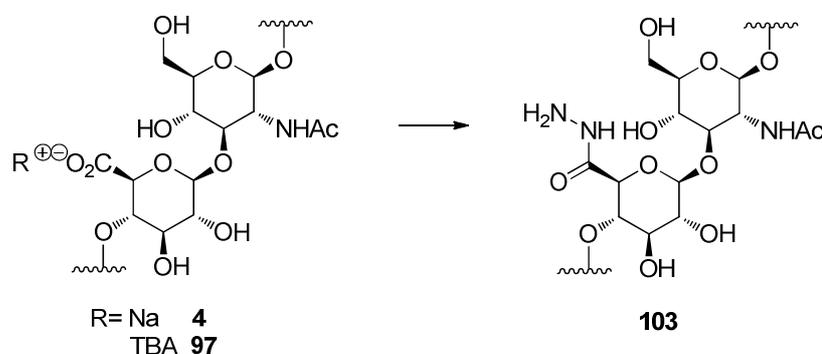
Schema 42: Mechanismus der Reaktion von Aldehyden mit Purpald. a) NaOH, RT, 30 min, b) Oxidation mit Luftsauerstoff.

Die Ergebnisse beider Methoden stimmen, besonders bei geringen Oxidationsgraden, gut überein. Mit zunehmender Modifizierung weichen die Werte jedoch stärker voneinander ab. Dabei liegen die Ergebnisse des Purpald-Assays bis zu 30 % unter denen der NMR-Quantifizierung. Mit der photometrischen Methode konnte kein Wert über 70% bestimmt werden. Dies ist vermutlich auf sterische Effekte zurückzuführen, da pro Zuckereinheit zwei der sperrigen Heterozyklen (Schema 42) gebunden werden müssten, um einen korrekten Belegungsgrad wiederzuspiegeln. Je höher also die Anzahl an Aldehyd-Funktionalitäten, desto mehr sterische Hinderung der Reaktion tritt auch durch benachbarte Zuckereinheiten ein, sodass davon nicht alle mit Purpald abreagieren können. Daher beruhen die im Folgenden angegebenen Belegungsgrade auf der $^1\text{H-NMR}$ -Quantifizierung.

Tabelle 13 zeigt, dass der Belegungsgrad der Aldehyd-modifizierten Hyaluronsäure **102** linear mit der eingesetzten Menge an Natriumperodat korreliert. Dabei muss das Oxidationsmittel im Überschuss eingesetzt werden. Erst ab acht Äquivalenten lässt sich eine vollständige Oxidation beobachten. Jede Aldehydbelegung lässt sich auf diese Weise reproduzierbar herstellen.

5.3.2 Synthese der Hydrazidkomponente

Die Hyaluronsäure-Hydrazid-Komponente **103**, die zur Darstellung der *in situ* herstellbaren Hydrogele verwendet wurde, war durch Kupplung von Hydrazin an die Säurefunktion des Polymers zugänglich (Schema 43).



Schema 43: Synthese von Hydrazid-modifizierter Hyaluronsäure **103**. a) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Bedingungen Tabelle 14.

Tabelle 14 zeigt die verschiedenen Reaktionsbedingungen zur Darstellung der Hydrazid-modifizierten Hyaluronsäure **103**. Die eingeführte Hydrazidfunktionalität weist, in D_2O gemessen, keine Signale im $^1\text{H-NMR}$ auf, da sowohl die Protonen des primären als auch die des sekundären Amins gegen Deuteriumionen austauschen. Gleiches gilt auch für die Protonen der umgesetzten Carbonsäureeinheiten. Es wurde stattdessen der in Kapitel 5.2.1.1 beschriebene TNBS-Assay analog zu der Vorschrift von SATAKE *et al.* durchgeführt.¹¹¹

Tabelle 14: Bedingungen der in Schema 43 gezeigten Reaktion zur Bildung von Hyaluronsäure-Hydrazid **103**; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, HOBT = Hydroxybenzotriazol, DIPEA = Di-*iso*-propylethylamin.

Nr.	Reagenzien	Bedingungen	Belegungsgrad
A	HyA·Na 4 , HOBT, EDC, DIPEA	H_2O , 1 d, RT	11±1%
B	HyA·Na 4 , HOBT, EDC, DIPEA	H_2O , 1 d, 50 °C	11±3%
C	HyA·TBA 97 , HOBT, EDC, DIPEA	DMSO, 1 d, 50 °C	41±2%

Bei der Synthese von Hyaluronsäure-Hydrazid **103** in wässrigem Milieu konnte kein ausreichender Derivatisierungsgrad der Hyaluronsäure erzielt werden (Tabelle 14A und B). Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 50 °C wurden lediglich 11% der *N*-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten modifiziert. Bei Vermischung des Hyaluronsäure-Hydrazids **103** aus Eintrag A und B mit Aldehyd-modifizierter

Hyaluronsäure (Tabelle 14) konnten keine stabilen Hydrogele erhalten werden. Wurde die Reaktion dagegen unter gleichen Bedingungen mit dem TBA-Salz der Hyaluronsäure **97** in DMSO durchgeführt (Tabelle 14C), konnten 52% der Monomereinheiten in das Hydrazidderivat überführt werden. Als Kupplungsreagenzien für alle Reaktionen wurden 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und Hydroxybenzotriazol (HOBt) gewählt (Tabelle 14). Das nach Tabelle 14C hergestellte Hyaluronsäure-Hydrazid **103** bildete mit Hyaluronsäure-Aldehyd stabile Hydrogele aus (Kapitel 5.3.3).

5.3.3 Herstellung der Hydrogele

Die chemische Verknüpfung der *in situ* gelierenden Hydrogele aus Aldehyd-modifizierter und Hydrazid-modifizierter Hyaluronsäure wurde bereits in Schema 40 dargestellt. Dazu wurden die beiden Saccharid-Komponenten separat in wässrigem Medium gelöst. Die Vernetzung erfolgte spontan nach deren Vermengung. In gleicher Weise konnten auch Composite aus Hyaluronsäure und Alginat sowie Hydrogele aus reinem Alginat hergestellt werden.¹⁰⁹

Die Reaktion konnte in verschiedenen Formkörpern durchgeführt werden, sodass Hydrogele in beliebigen Größen und Formen erhalten wurden. Der Prozess erforderte keine harschen Bedingungen wie Wärme oder UV-Licht, sondern verlief spontan nach Mischung von Aldehyd-Komponente und Hydrazid-Komponente bei Raumtemperatur und Normaldruck. Daher kann die Polymerisation prinzipiell auch in Gegenwart von Zellen durchgeführt werden (vergleiche Kapitel 5.3.5). Statt in Wasser konnten die Polymere vor der Hydrogelierung auch in für Zellen geeigneten Medien gelöst werden. Es wurden zum Beispiel isotonische Kochsalz-Lösung oder *DULBECCO's Modified EAGLE's Medium* (DMEM) getestet.



Abbildung 59: Links oben: Hyaluronsäure-Aldehyd **102**, gefriergetrocknet, links unten: Hyaluronsäure-Aldehyd **102**, gelöst in Wasser, rechts oben: Alginat-Hydrazid **103**, gefriergetrocknet, rechts unten: Alginat-Hydrazid **103**, gelöst in Wasser, mittig: polymerisierte Hydrogele.

Die Dauer der Gelierung variierte je nach Derivatisierungsgrad der einzelnen Polymerkomponenten und dem gewählten Medium. Am schnellsten wurden Hydrogele aus Polymeren mit hohen Belegungsgraden in reinem Wasser gebildet. Die Verwendung von Nährmedien verzögerte die Reaktion, oder inhibierte sie vollständig, wie im Falle von gering derivatisierten Komponenten. Durch die Wahl der eingesetzten Komponenten wird eine anwendungsspezifische Modulierung der Gelierungsgeschwindigkeit ermöglicht. Sollen die Polymere per Spritze injiziert werden, um Hydrogele *in vivo* zu generieren, ist ein verzögerter Gelierungsprozess nötig, da sonst eine Gelierung vor der Injektion stattfinden könnte. Im Falle einer zu langsamen Hydrogelbildung würden wiederum die einzelnen Komponenten im Blutstrom abtransportiert werden, bevor eine Gelierung stattfinden kann. Bei einer *in vitro* durchgeführten Hydrogelierung in Gegenwart von Zellen ist hingegen eine schnelle Polymerisation erforderlich, da sonst die beigegebenen Zellen auf den Boden des Gefäßes absinken würden, statt homogen im Hydrogel verteilt vorzuliegen. Daher sind die Polymerisationseigenschaften des Materials auf die medizinische Anwendung individuell abzustimmen.

5.3.4 Charakterisierung der Hydrogele

5.3.4.1 Abbau der Hydrogele *in vitro*

Da die *in situ* gebildeten Hydrogele als Grundgerüst für Zellen, wie beispielsweise Kardiomyozyten, eingesetzt werden sollen, müssen die Materialien im Körper idealerweise abbaubar sein, sobald sich ein Zellgewebe ausgebildet hat. Aus diesem Grund wurde Hyaluronsäure als Basismaterial gewählt. Dieses Polysaccharid kommt im menschlichen Körper vor, besonders in Gelenken und Weichgeweben wie beispielsweise dem Auge, und kann demnach *in vivo* abgebaut werden.^{29,30} Da ein verfrühter Abbau, bevor sich das zu heilende Gewebe regeneriert hat, jedoch verhindert werden soll, wurde die Hyaluronsäure mit Alginat als Copolymer versetzt. Alginat kann im Gegensatz zu der Hyaluronsäure nicht human degradiert werden.

Zur Überprüfung der Abbaugeschwindigkeit der *in situ* polymerisierten Hyaluronsäure-Alginat Hydrogele, wurden diese mit boviner Hyaluronidase (Type IV-S, 2140 U/mg) inkubiert. Die Herstellung der Hydrogele wurde in Kapitel 5.3.3 erläutert. Es wurden entweder Hydrogele aus reiner Hyaluronsäure (Hyaluronsäure-Aldehyd: Oxidationsgrad 100%, Hyaluronsäure-Hydrazid: Derivatisierungsgrad 52%) oder ein Komposit aus Hyaluronsäure-Aldehyd **102** und Alginat-Hydrazid **103**

(Derivatisierungsgrad 30%)¹²⁷ zu jeweils gleichen Teilen verwendet. Zunächst wurden die optimalen Aktivitätsbedingungen für das Enzym untersucht. Dazu wurden die Hydrogele in ein Hyaluronidase enthaltendes Medium gegeben und der Überstand mit den enthaltenen Abbauprodukten durch PAGE und dem in der Literatur beschriebenen Carbazol-Assay untersucht.¹²⁸ Das Carbazol reagiert dabei über einen nicht bekannten Mechanismus mit den abgebauten Zuckern und die dabei entstehende Verbindung zeigt intensive Purpurfärbung mit einer maximalen Absorption bei 550 nm. Die Absorption wurde spektroskopisch bestimmt und die Mengen an degradiertem Zucker untereinander verglichen.

Um den Abbau der Hydrogele durch das Enzym Hyaluronidase eingehender zu untersuchen, wurde sowohl die Wahl eines geeigneten Puffersystems als auch der Temperatur und der Konzentration des Enzyms analysiert (Tabelle 15). Zudem wurde der Abbau unter Dialysebedingungen durchgeführt. Dazu wurden Hydrogel und Hyaluronidase in einen Dialyseschlauch gegeben und gegen das entsprechende Medium dialysiert. Auf diese Weise konnten die möglichen Abbauprodukte ständig aus dem System entfernt werden, sodass eine mögliche Produkthemmung minimiert wurde. Eine Negativkontrolle ohne Hyaluronidase wurde bei jedem Experiment als Kontrolle durchgeführt.

¹²⁷ Der Derivatisierungsgrad bezieht sich auf die Menge an umgesetzten Carbonsäuren. Da im Alginat jede Monomereinheit eine Carbonsäure trug, in der Hyaluronsäure aber nur jede zweite Monomereinheit, waren im Alginat mehr Hydrazidfunktionalitäten pro Gramm enthalten als bei der Hyaluronsäure, auch wenn der Derivatisierungsgrad niedriger war.

¹²⁸ a) T. Bitter, H. M. Muir, *Anal. Biochem* **1962**, *4*, 330-334, b) M. Cesaretti, E. Luppi, F. Maccari, N. Volpi, *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 59-61.

Tabelle 15: Bedingungen zum Abbau von *in situ* gelierten Hydrogelen; jeweils durchgeführt mit reinen Hyaluronsäure-Hydrogelen und Hyaluronsäure-Alginat Kompositen.

Nr.	Enzymmenge	Temperatur	Puffer
A	5000 U/mL	37 °C	Citrat-Phosphat, pH = 5
B	5000 U/mL	37 °C	Citrat-Phosphat, pH = 6.3
C	5000 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
D	5000 U/mL	4 °C	PBS, pH = 7.5
E	5000 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
F	5000 U/mL	50 °C	PBS, pH = 7.5
G	1 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
H	10 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
I	100 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
J	1000 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5
K	10000 U/mL	37 °C	PBS, pH = 7.5

Die in Tabelle 15 angegebenen Bedingungen entsprechen zumeist in der Literatur beschriebenen Protokollen. Das vom Hersteller angegebene pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen pH = 4.5 bis 6.¹²⁹ Außerdem wurde ein Citrat-Phosphat-Puffer bei pH = 6.3 und ein PBS-Puffer bei pH = 7.4 für den enzymatischen Abbau verwendet. Diese beiden Puffersysteme wurden bereits für den Abbau von vergleichbaren Hyaluronsäure-Hydrogelen verwendet.¹³⁰ HAHNA *et al.* berichteten beispielsweise, dass ein mit einem Hydrazid-Crosslinker vernetztes Hydrogel nach drei Stunden durch Hyaluronidase (1 U/mL in PBS Puffer) vollständig degradiert wurde. BULLPITT *et al.* untersuchten ein Hydrazid-funktionalisiertes Hydrogel mit Aktivester-Crosslinker. Nach 48 Stunden war dieses durch 250 U/mL Hyaluronidase in Citrat-Phosphat-Puffer pH = 6.3 abgebaut.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass unter keiner der untersuchten Bedingungen ein Abbau der in dieser Arbeit beschriebenen Hydrogele nachzuweisen war. Weder mit dem Carbazol-Assay noch mittels Elektrophorese konnte ein Abbau gezeigt werden. Besondere Schwierigkeiten in der Analyse bereitete die Hyaluronidase selber, welche mit biologischen, hoch- und niedermolekularen

¹²⁹ http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h3884pis.Par.0001.File.tmp/h3884pis.pdf (02.11.11).

¹³⁰ a) P. Bulpitt, D. Aeschlimann, *J. Biomed. Mat. Res.* **1999**, *47*, 152-169, b) S. K. Hahna, J. K. Park, T. Tomimatsu, T. Shimoboji, *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *40*, 374-380.

Substanzen verunreinigt war. Diese führten sowohl zu Färbungen im Carbazol-Assay als auch zu Banden in der Elektrophorese, die nicht von denen der möglicherweise abgebauten Hyaluronsäure zu unterscheiden waren.

5.3.4.2 Abbau der Hydrogele *in vivo*

Nachdem der Hyaluronidase vermittelte Abbau der Hyaluronsäure-Alginat Hydrogele zunächst umfangreich *in vitro* studiert wurde (Kapitel 5.3.4.1), sollten die erhaltenen Ergebnisse mit den realen, physiologischen *in vivo* Bedingungen verglichen werden. Zu diesem Zweck sollten die vernetzten Materialien in eine Maus subkutan implantiert werden. Um den Abbau des Implantats über die Zeit verfolgen zu können ohne die Maus wiederholt operieren zu müssen, sollte ein fluoreszierender Farbstoff kovalent an das Hydrogel gebunden werden. Wenn die Maus nun mit einem Fluoreszenz Bildgebungssystem (Maestro™) untersucht würde, könnte der Abbau der Hydrogele verfolgt und der Weg der Abbauprodukte im Körper identifiziert werden. Des Weiteren könnte auf diese Weise die Exkretion der Polymerfragmente analysiert und ihre Anreicherung in Organen wie der Leber oder der Niere überprüft werden.

Neben dem Abbau könnte durch die Implantation auch die Biokompatibilität des Hydrogels *in vivo* genauer untersucht werden. Eine Analyse der Immunreaktionen des tierischen Körpers könnte zudem während des Versuchs durch tägliche adpektorische Kontrolle des Bereichs um das Implantat durchgeführt werden. Im Anschluss an den Versuch könnte eine histologische Beurteilung der Haut erfolgen.

Der verwendete Farbstoff muss mehreren Kriterien genügen. Er muss einerseits wasserlöslich sein, um eine Kupplung an das Polymer zu ermöglichen und eine Löslichkeit der Abbauprodukte nicht zu verhindern. Dieses würde zu Koagulation der Fragmente führen, die ohne Farbstoff nicht eintreten würde. Das Farbstoff-Polymer-Modellsystem wäre dadurch mit den nicht markierten Hydrogelen nicht mehr vergleichbar. Außerdem muss der Farbstoff eine funktionelle Gruppe tragen, die sich einfach an das Polymer anbinden lässt. Weiterhin soll der Farbstoff Licht im Messbereich des Photometers emittieren und sich nicht mit dem Spektralbereich des Gewebes der Maus überlagern. Außerdem soll der Farbstoff nicht toxisch sein, um vom Hydrogel hervorgerufene Immunreaktionen nicht zu beeinflussen.

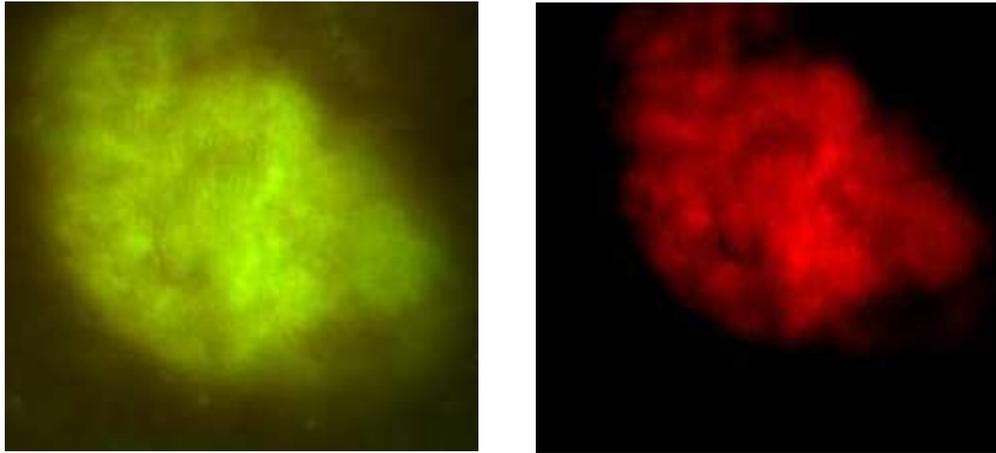
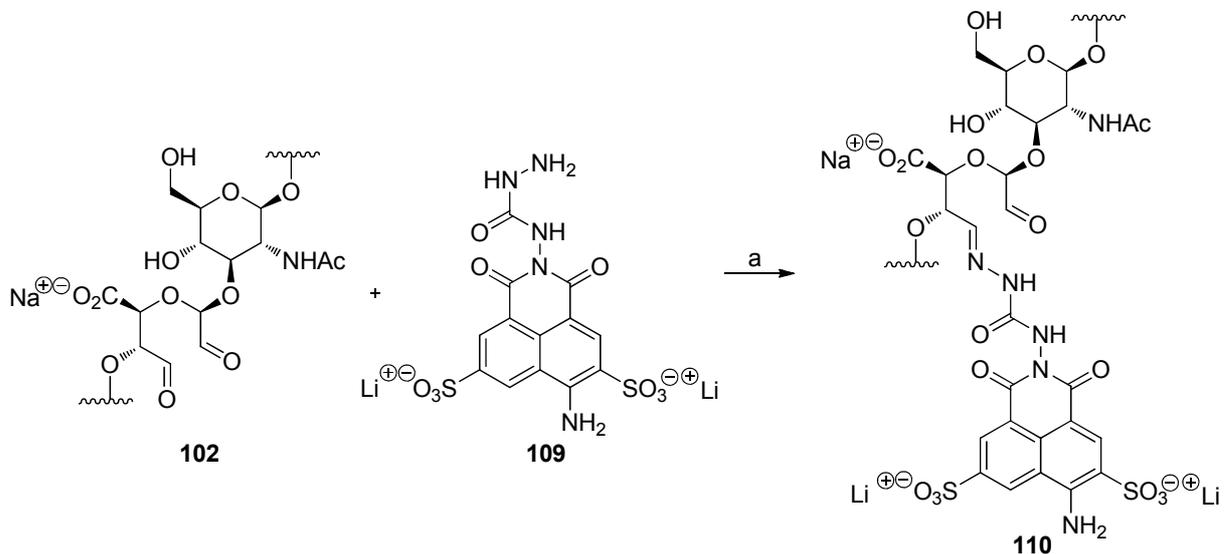


Abbildung 60: Emission eines mit Lucifer Gelb funktionalisierten Hydrogels aus Hyaluronsäure-Aldehyd **102**/Alginat-Hydrazid **103** 1/1 (w/w) subkutan in euthanasierter Maus, links: visualisiert in grün, rechts: visualisiert in rot (verschiedene Ausschnitte gezeigt).¹³¹



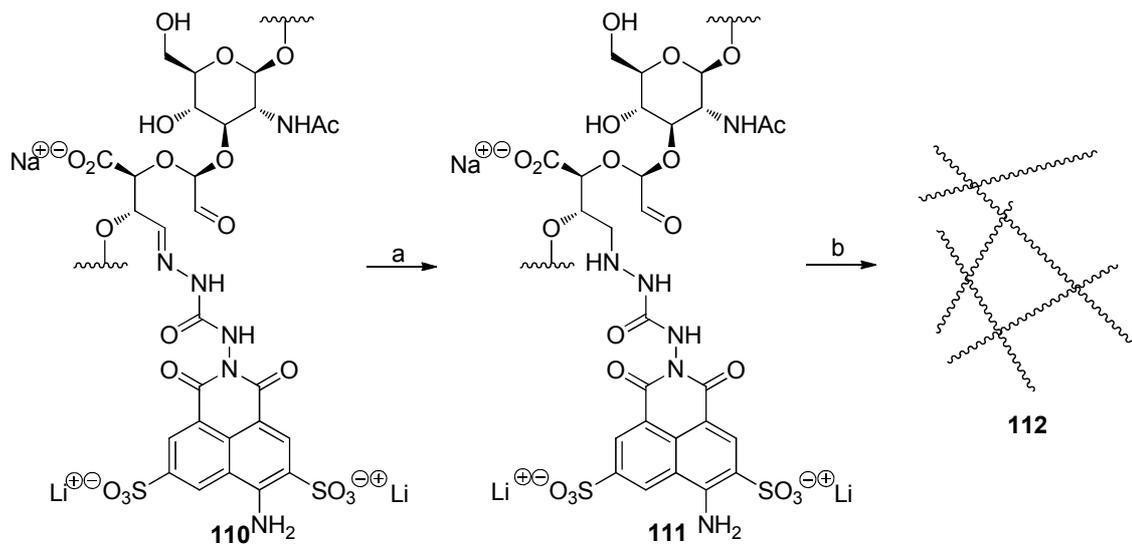
Schema 44: Derivatisierung des Hyaluronsäure-Aldehydes **102** mit Lucifer Gelb **109**. a) Phosphatpuffer, pH = 6.5, 50 °C, 5 h.

Den meisten dieser Ansprüche genügt Lucifer Gelb **109**. Es ist wasserlöslich, nicht toxisch und hat eine maximale Anregung bei 428 sowie 280 nm. Damit ist Lucifer Gelb gut vom Gewebe der Maus unterscheidbar. Abbildung 60 zeigt deutlich die Emission des polymergebundenen Farbstoffs bei 528 nm.¹³¹ Ein *in situ* geliertes Hydrogel aus 1/1 (w/w) Hyaluronsäure-Aldehyd **102** (Oxidationsgrad: 100%) und Alginat-Hydrazid (Derivatisierungsgrad: 30%) mit kovalent gebundenem Lucifer Gelb wurde dabei subkutan in eine euthanasierte Maus appliziert.

¹³¹ Die Untersuchungen wurden von Dr. I. Bartsch, in der Arbeitsgruppe von Dr. F. Witte durchgeführt, CrossBIT, Verbundzentrum für Biokompatibilität und Implantatimmunologie in der Medizintechnik, Feodor-Lynen-Straße 31, 30625 Hannover.

Die chemische Funktionalisierung des Hydrogels mit Lucifer Gelb **109** beruht, analog zu der *in situ* Polymerisation der beiden Polymerkomponenten, auf einer Aldehyd-Hydrazid-Bindungsknüpfung. Die Synthese von Hyaluronsäure-Aldehyd **102** wurde in Kapitel 5.3.1 eingehend behandelt. Schema 44 zeigt die Kondensation zwischen Polymer und Farbstoff unter Bildung einer Hydrazon-Bindung. Da dieser Bindungstyp hydrolyseempfindlich ist, wurde zunächst die Stabilität des Lucifer Gelb-Hydrogel Addukts untersucht.

Eine Hydrolyse der Lucifer Gelb-Hydrogel Bindung wäre für die Untersuchung des Hydrogelabbaus hinderlich, da bei Beobachtung des Lucifer Gelbs *in vivo* nicht zwischen Polymerdegradation und einfachem Auswaschen des Farbstoffs unterschieden werden könnte. Aus diesem Grund sollte die Hydrolyse der Farbstoffbindung unterdrückt werden. Eine Möglichkeit bietet die Reduktion der hydrazonanalogen Bindung mit Natriumcyanoborhydrid. Dies ist in Schema 45 gezeigt.



Schema 45: Reduktion der hydrazonanalogen Bindung im Hyaluronsäure-Lucifer Gelb-Addukt mit Natriumcyanoborhydrid zu Hyaluronsäure-Derivat **11** und Hydrogelierung. a) NaCNBH_3 , 4 °C, 12 h, b) Alginate-Hydrazid, RT, 10 min; Bedingungen s. Tabelle 16.

Um zu untersuchen, auf welche Weise sich stabile, Lucifer Gelb-funktionalisierte Hydrogele **112** bilden ließen, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht (Schema 44, Schema 45). Diese sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Für alle Reaktionen wurden die Polymere Hyaluronsäure-Aldehyd **102** mit einem Oxidationsgrad von 100% und Alginate-Hydrazid **103** mit einem Derivatisierungsgrad von 30% verwendet.

Tabelle 16: Bedingungen zu Synthese von Hydrogel **112**.

	Reaktion mit LG	Reduktion	Polymerisation	Ergebnis
A	5 h, 50 °C	keine	vor Dialyse	nicht geeignet
B	5 h, 50 °C	1 Äq NaCNBH ₃	vor Dialyse	nicht geeignet
C	5 h, 50 °C	keine	nach Dialyse	geeignet
D	5 h, 50 °C	1 Äq NaCNBH ₃	nach Dialyse	geeignet
E	5 h, 50 °C	10 Äq NaCNBH ₃	nach Dialyse	nicht geeignet
F	72 h, 50 °C	1 Äq NaCNBH ₃	nach Dialyse	nicht geeignet

Die fluoreszenzmarkierten Polymere wurden entweder vor (Tabelle 16A und B) oder nach der Dialyse (Tabelle 16C-F) geliert und das Dialysewasser UV-spektrometrisch hinsichtlich seines Gehalts an Lucifer Gelb **109** untersucht. Eine Dialyse nach der Hydrogelierung führte zu nicht-fluoreszenzstabilen Hydrogelen, da nicht umgesetztes Lucifer Gelb **109** bei der Dialyse nur schwer aus dem dichten Hydrogelnetzwerk herausdiffundieren konnte. Daher konnte auch nach langer Dialyse noch der Austritt von Lucifer Gelb **109** beobachtet werden. Außerdem führte eine lange Dialyse des Hydrogels zu mechanischer Belastung und damit zur Deformation des Hydrogels. Eine Reaktion zwischen Hyaluronsäure-Aldehyd **102** und Lucifer Gelb **109** mit anschließender Dialyse und darauffolgender Vernetzung schien daher sinnvoller.

Zudem wurden Hydrogele mit reduzierten (Tabelle 16D) oder nicht-reduzierten (Tabelle 16C) Lucifer Gelb-Polymer-Bindungen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid essentiell für die Bildung stabiler Addukte war, da aus nicht-reduzierten Hydrogelen noch nach langen Reaktionszeiten Lucifer-Gelb **109** diffundierte.

Außerdem wurden zwei Versuche durchgeführt, bei denen zum einen die Menge an Natriumcyanoborhydrid um den Faktor zehn erhöht (Tabelle 16E) und zum anderen die Reaktionszeit zwischen Lucifer Gelb **109** und Hyaluronsäure-Aldehyd **102** verlängert wurde (Tabelle 16F). Unter beiden Reaktionsbedingungen zersetzte sich jedoch das Polymer und konnte nicht für die Hydrogelierung verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zur Ausbildung eines hydrolysestabilen, Lucifer Gelb-funktionalisierten Hydrogels folgende Reaktionssequenz am besten eignete: Hyaluronsäure-Aldehyd **102** wurde mit dem Farbstoff **109** umgesetzt, anschließend mit Natriumcyanoborhydrid reduziert und vor

der Hydrogelbildung dialysiert (Tabelle 16D). Sowohl Dialyse nach der Hydrogelierung als auch Erhöhung der Farbstoff-Polymer-Reaktionszeit oder Erhöhung der Menge an Reduktionsmittel führten entweder zu Farbstofffreisetzung aus dem Hydrogelen oder zur Degradation des Polymers.

Anschließend wurden erste *in vivo* Studien mit den den Lucifer Gelb modifizieren Hydrogelen in haarlosen Mäusen durchgeführt.¹³¹ Es konnte gezeigt werden, dass das Hydrogelkomposit aus Lucifer Gelb-Hyaluronsäure-Aldehyd **111** und Alginat-Hydrazid (hergestellt nach Tabelle 16D) zu keinen Immunreaktionen der Maus führten. Dies konnte durch histologische Untersuchungen an den explantierten Gelen nachgewiesen werden. Zudem wurde der Abbau der Gele durch wiederholte Messung der Fluoreszenz-Intensität über die Lebensdauer der Maus gemessen. Es konnte eine stetige Abnahme der Fluoreszenz bis unter 5% des Ausgangswerts beobachtet werden, obwohl das Hydrogel auch nach Explantation noch in großen Teilen vorhanden war. Dies ist möglicherweise auf die Fluoreszenzbleiche des Farbstoffs zurückzuführen. Allerdings könnte auch die Polymer-Lucifer Gelb-Bindung *in vivo* degradiert werden. Dies wird derzeit untersucht.

5.3.5 Biologische Evaluation der Hydrogele

Um die Hydrogele auf ihre Eignung im Bereich des *tissue engineering*s zu untersuchen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in das *in situ* gelierende Material eingebettet.¹¹⁸ Dazu wurden diese zunächst zu einer Lösung von Alginat-Hydrazid (Derivatisierungsgrad 30%) in DMEM gegeben. Anschließend wurde durch Zugabe von Hyaluronsäure-Aldehyd (Oxidationsgrad 100%) hydrogeliert. Die auf diese Weise homogen im Hydrogel verteilten Zellen wurden nach sechstägiger Kultivierung mit einem *Life-Dead-Assay* untersucht (Abbildung 61). Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zellen die Polymerisationsbedingungen überlebten (grün markierte Zellen). Die Färbung der lebenden Zellen erfolgte hierbei mit einem Calcein-Acetoxy-methylester, welcher ein Emissionsmaximum bei 515 nm (grün) aufweist und von lebenden Zellen aktiv durch die Zellmembran transportiert wird. Tote Zellen werden dagegen durch Ethidiumhomodimer rot gefärbt, welches die DNA in toten Zellen markiert. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen diesen Farbstoff dagegen nicht auf.

Allerdings konnte keine Adhäsion beziehungsweise Vernetzung der Zellen untereinander beobachtet werden. Dies lässt sich unter anderem auf den Mangel an

zellspezifischen Bindungsstellen zurückführen (vgl. Kapitel 5.2.3). Hinzu kommt, dass im Falle von Alginat kein enzymatischer Abbau oder eine Umstrukturierung (*remodeling*) des Hydrogels durch die Zellen zu erwarten ist, da tierische Zellen keine Enzyme zum Abbau von Alginat besitzen. Aus diesem Grund wurde zu den *in situ* gelierten Hydrogelen Kollagen zugesetzt, welches zu einer Adhäsion der Zellen führte.¹¹⁸

Eine Alternative zu kollagenhaltigen Hydrogelen sollte die Funktionalisierung der Polymere mit RGD-Peptiden darstellen. Die Experimente diesbezüglich werden in Kapitel 5.4 beschrieben.

In den *in situ* gelierten Hydrogelen waren nur wenige Poren geeigneter Größe vorhanden, die ein Einwachsen der Zellen ermöglichen. Abbildung 62 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Hyaluronsäure-Alginat-Komposits aus Hyaluronsäure-Aldehyd **102** (Oxidationsgrad: 100%) und Alginat-Hydrazid **103** (Derivatisierungsgrad: 30%).¹¹⁹ Dieses Hydrogel wies lediglich Poren in einer Größe unter 30 μm auf, die außerdem größtenteils durch den Gefriertrocknungsprozess hervorgerufen wurden.

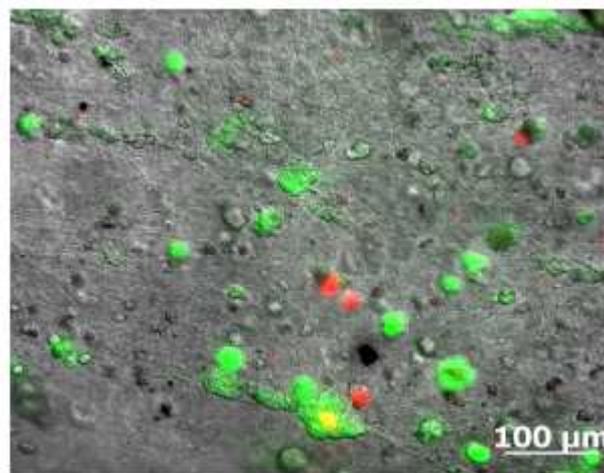


Abbildung 61: *Life-Dead-Assay* von Kardiomyozyten, die in ein *in situ* gelierendes Hydrogel eingebettet wurden.¹¹⁸

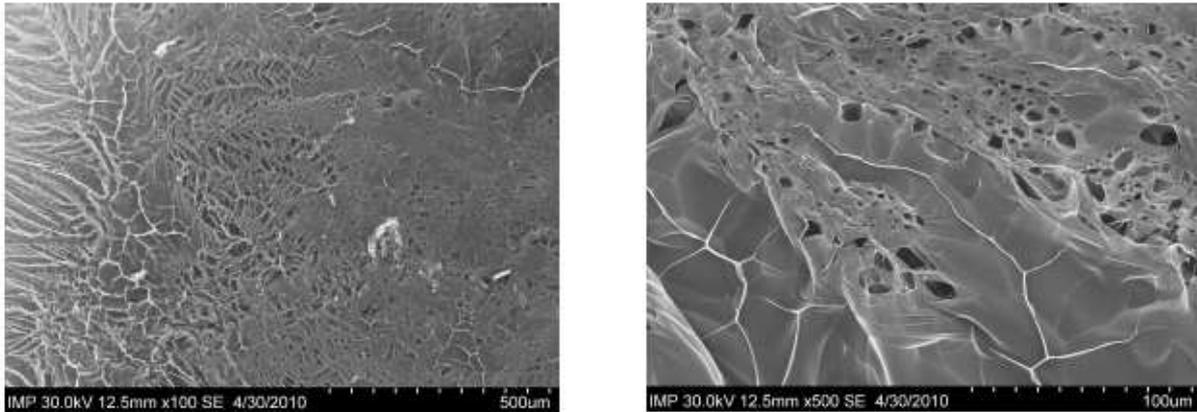


Abbildung 62: REM-Aufnahmen von *in situ* polymerisierten Hyaluronsäure/Alginat (1/1) Hydrogelen.¹¹⁹

5.3.6 Alternative *in situ* Gelierungsstrategie

Neben der Hydrazon-vermittelten Hydrogelierung von Hyaluronsäure und Alginat sollte zudem eine Hydrogelierung über einen Crosslinker untersucht werden. Eine andere chemische Vernetzung könnte ebenfalls zu Hydrogelen mit veränderten physikalischen oder biologischen Eigenschaften führen, die das in den bisherigen Kapiteln beschriebene, modulare System erweitern könnte.

OSSIPOV *et al.* berichteten von Hydrogelkompositen aus Hyaluronsäure und Poly(vinyl alkohol) (PVA), die über eine Thiazolidin-bindung verbrückt wurden.¹³² Dabei gingen Hyaluronsäure-Aldehyd und ein mit Cystein funktionalisiertes PVA-Derivat eine spontan ablaufende Kondensationreaktion ein. Es entstanden zunächst stabile Gele, die sich jedoch nach sieben Tagen langsam zersetzten. Diese Beobachtung korrelierte mit der von WATHIER *et al.*, die Hydrogele aus dendrimeren Peptiden und Aldehyd-funktionalisierten Polyethylenglycolen untersuchten.¹³³ Deren Modellreaktionen zeigten dabei, dass die Thiazolidinbildung reversibel verlief. Dieser Umstand ließe sich jedoch für die Anwendung der Hydrogele als Gerüstmaterial für Herzmuskelzellen nutzen. Ein kontinuierlich degradierendes Hydrogel könnte den Einwuchs von Zellen in das zunehmend poröser werdende Material ermöglichen.

Da die Synthese von Hyaluronsäure-Aldehyd **102** bereits eingehend studiert wurde (Kapitel 5.3.1), sollte dieses Polymerderivat als Ausgangspunkt für eine neue Vernetzungsstrategie verwendet werden. Die Hydrogelbildung sollte über einen

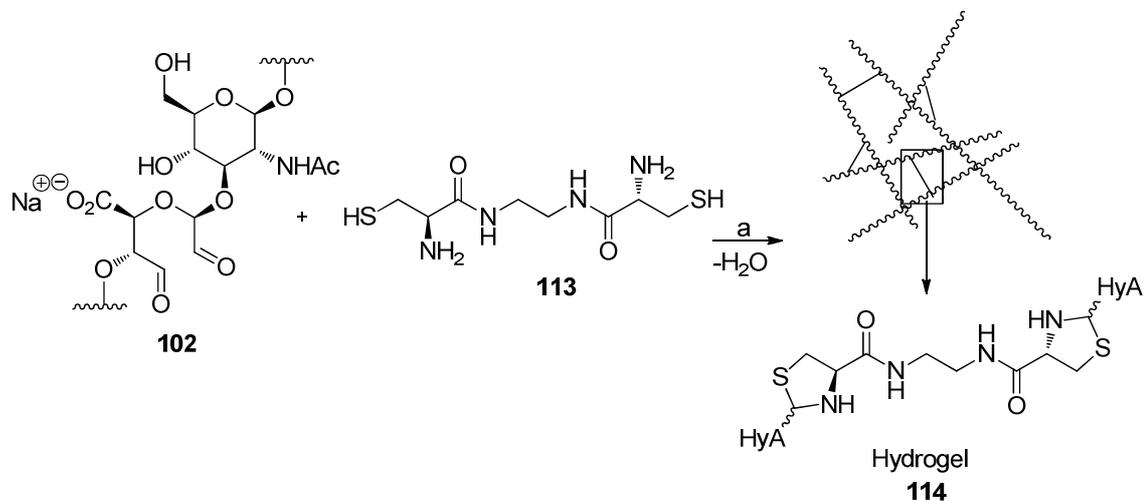
¹³² D. A. Ossipov, S. Piskounova, J. Hilborn, *Macromol.* **2008**, *41*, 3971-3982.

¹³³ M. Wathier, C. Starck Johnson, T. Kim, M. W. Grinstaff, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 873-876.

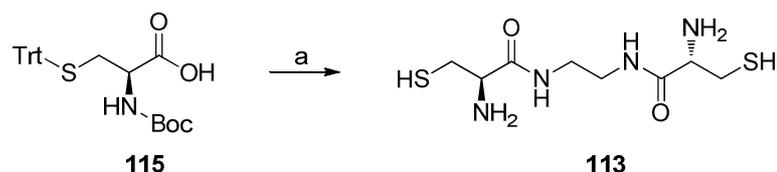
cysteinhaltigen *Crosslinker* erfolgen (Schema 46). Die Synthese dessen wurde analog zu der von ZIACO *et al.* durchgeführt und ist in Schema 47 gezeigt.¹³⁴ *Crosslinker 113* enthält zwei Cysteine, die jeweils mit einer Aldehydgruppe von Hyaluronsäure-Derivat **102** eine Kondensationsreaktion zum entsprechenden Thiazolidin eingehen könnten. Auf diese Weise könnte ein engmaschiges Hydrogel entstehen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich weder bei Verwendung äquimolarer Mengen von Hyaluronsäure und *Crosslinker* noch bei einem zweifachen Überschuss an Polymer stabile Gele bildeten. Vielmehr formten sich trübe Konglomerate, die aus der Lösung ausfielen.

Eine Verbesserung des Systems könnte in folgenden Arbeiten durch Dendrimerisierung des *Crosslinkers* erzielt werden. Auf diese Weise könnten mehr Polymerstränge mit einem *Crosslinker* verbunden werden. Zudem könnte die Verwendung von Ester-Aldehyden zu einer Erhöhung der Stabilität führen, da eine irreversible *N,O*-Acetylwanderung nach erfolgter Thiazolidinbildung die Zersetzung des Hydrogels verhindert.¹³³



Schema 46: Hydrogelbildung aus Hyaluronsäure-Aldehyd **102** und *Crosslinker 113*. a) RT, 10 min.



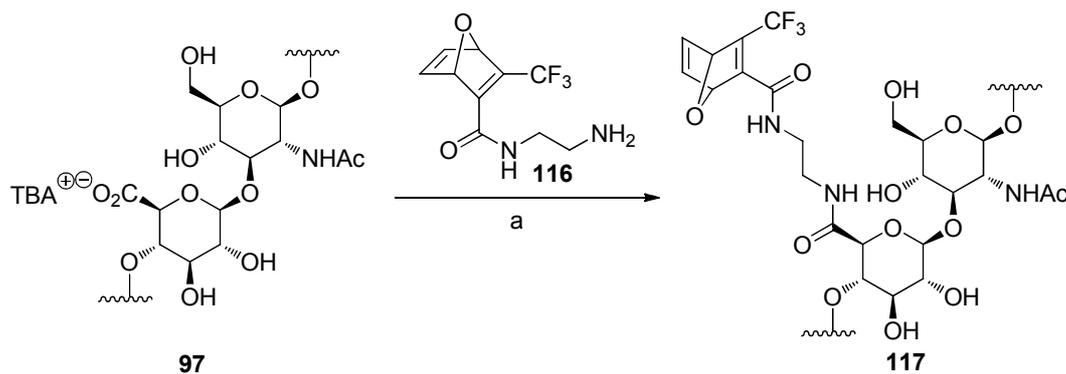
Schema 47: Synthese des *Crosslinkers 113*. a) 1. Ethylendiamin, EDC, HOBT, DIPEA, CH₂Cl₂, 12 h, RT, 59% 2) TFA, TIPSCI, CH₂Cl₂, 30 min, RT, 63%.

¹³⁴ B. Ziaco, S. Pensato, L. D. D'Andrea, E. Benedetti, A. Romanelli, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1955-1958.

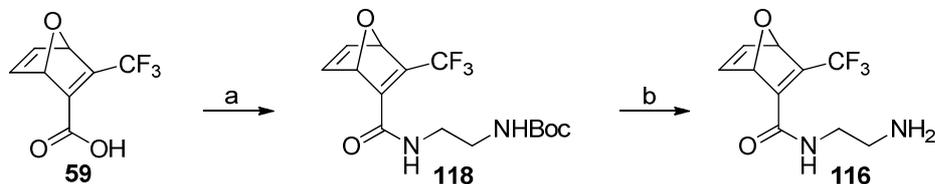
5.4 weitere Funktionalisierung von Hyaluronsäure

In Kapitel 5.3.5 konnte gezeigt werden, dass auf Hyaluronsäure und Alginat Hydrogelen keine Adhäsion von Kardiomyozyten erfolgte. Dies war auf den Mangel an Erkennungseinheiten im Polymer zurückzuführen. Eine Adhäsion der Zellen ist jedoch entscheidend für deren Funktion. Nur adhärenente Zelle können sich vernetzen und ein elektronisch gekoppeltes Muskelnetzwerk ausbilden. Aus den Untersuchungen zur Steigerung der Biokompatibilität von PMP war jedoch bereits die integrinvermittelte Wirkung von RGD-Peptiden auf Endothelzellen bekannt. Daher sollte im folgenden RGD an Hyaluronsäure gebunden werden.

Dazu wurden zunächst Experimente zur Kupplung zwischen Hyaluronsäure und Oxanorbornadienbaustein **116** durch Carbodiimid-Chemie durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.11 untersucht, eignet sich das Oxanorbornadiensystem zur Kupfer-freien Ligation von zyklischen RGD-Peptiden an Polymere. Die Synthese des Bausteins **59** ist in Schema 18 gezeigt, dessen Verlängerung zu Amin **116** in Schema 49.



Schema 48: Kupplung von Hyaluronsäure mit Oxanorbornadien **116**. a) Reaktionsbedingungen s. Tabelle 17.



Schema 49: Synthese des verlängerten Oxanorbornadienbausteins **117**. a) DMAP, EDC, CH_2Cl_2 , RT, 12 h, 61%, b) Trifluoressigsäure, CH_2Cl_2 , RT, 1 h, quant..

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen für die Kupplung von Hyaluronsäure mit Oxanorbornadien **116** (Schema 48); Kupplungsreagenzien: 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochlorid (EDC), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT), Di-*iso*-propylethylamin (DIPEA).

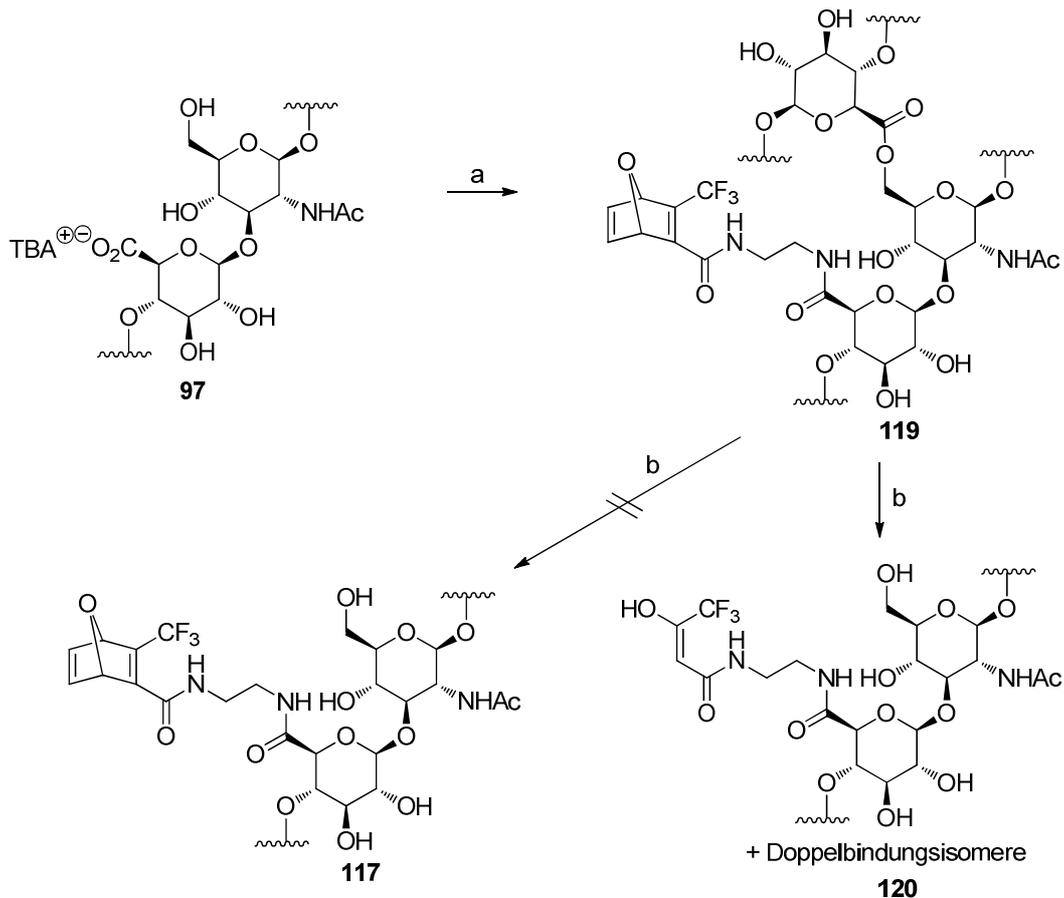
	Äq Baustein 116	Reaktionszeit	Temperatur	Resultat
A	5	3d	50 °C	bis 50% DG
B	5	1d	RT	bis 65% DG
C	2	8d	40 °C	wasserunlöslich
D	2	2d	RT	wasserunlöslich
E	1	2d	RT	wasserunlöslich
F*	1	2d	RT	wasserunlöslich

*Aufarbeitung: Fällern aus Ethanol

Ausgewählte Reaktionsbedingungen zur Kupplung von Hyaluronsäure mit Oxanorbornadien **116** sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Experimente zur Synthese von Hyaluronsäure Hydrazid **103** hatten bereits gezeigt, dass die Carbodiimid-Chemie an Hyaluronsäure in DMSO zu hohen Derivatisierungsgraden führte (Kapitel 5.3.2). Daher wurde erneut mit dem TBA-Salz der Hyaluronsäure unter wasserfreien Bedingungen mit 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochlorid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) als Kupplungsreagenzien gearbeitet (andere Reaktionsbedingungen nicht gezeigt). Allerdings bildeten sich unter allen Reaktionsbedingungen völlig oder nahezu wasserunlösliche Polymere. Diese konnten NMR-spektroskopisch zum Teil nicht analysiert werden (Tabelle 17C-F). Die besten Ergebnisse konnten durch Zugabe von fünf Äquivalenten des Oxanorbornadienbausteins **116** erhalten werden. Es wurden wechselnde Belegungsgrade von bis zu 65% beobachtet (Tabelle 17E und F). Da die Reaktion jedoch nur schwer reproduzierbar war, zum Teil wieder zu wasserunlöslichen Polymeren führte und zudem ein hoher Überschuss des Oxanorbornadienbausteins **116** nötig war, wurde nach Möglichkeiten zur Analyse der Polymere gesucht, die nach Tabelle 17 C-F hergestellt wurden.

Die Wasserunlöslichkeit dieser Polymere beruhte zum einen auf der Unpolarität des Bausteins, zum anderen war auch die Ausbildung von Estern zwischen dem primären Alkohol und der Carbonsäure der Hyaluronsäure möglich, sobald das Polymer mit Kupplungsreagenzien versetzt wurde (Schema 50). Auf diese Weise kam es zur Verknüpfung der Polymerstränge untereinander, sodass wasserunlösliche Netzwerke entstanden. Da Ester im Gegensatz zu den mit dem Oxanorbornadien **116** ausgebildeten Amiden nicht hydrolysestabil sind, wurden

Versuche zur Verseifung selbiger durchgeführt. Nach Zugabe von Natriumhydroxid oder Lithiumhydroxid wurden, wie erwartet, wasserlösliche Polymere erhalten. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Oxanorbornadieneinheit unter basischen Bedingungen nicht stabil war. Nach Addition von Wasser an die elektronenarme Doppelbindung, wurde Furan irreversibel abgespalten, sodass Hyaluronsäure-Derivat **120** gebildet wurde. Dieser Prozess lief bereits nach kurzen Reaktionszeiten von unter 30 Minuten vollständig ab.



Schema 50: Vernetzung der Hyaluronsäure über Veresterungen nach Zugabe von Kupplungsreagenzien und Versuche der Verseifung. a) Bedingungen Tabelle 17, b) NaOH oder LiOH, 30 min, RT.

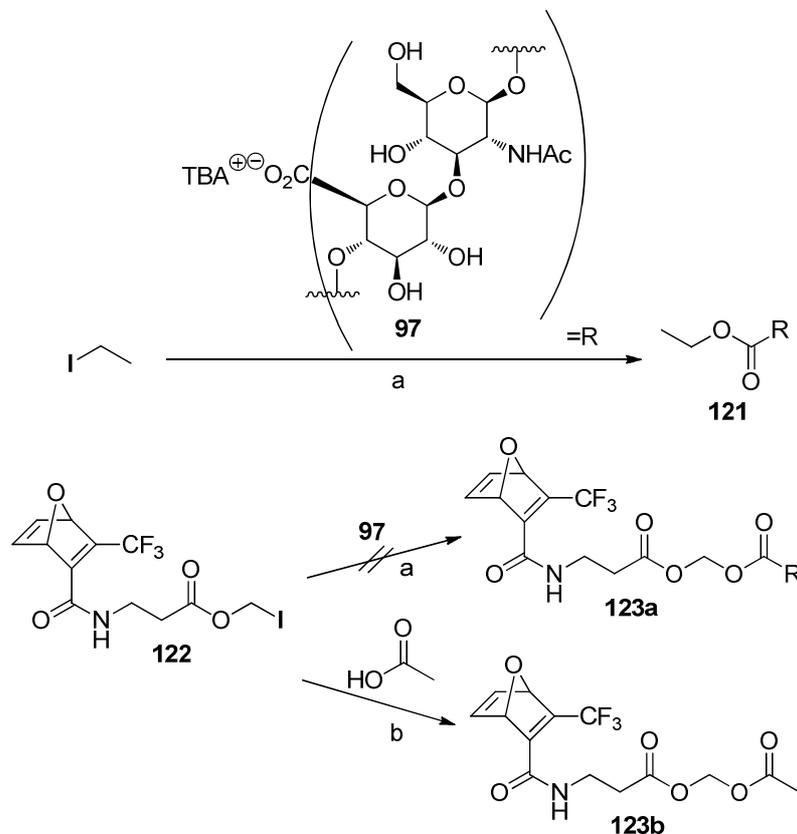
Zudem wurde die Reaktion der Carbonsäure der Hyaluronsäure mit einem Iodid untersucht. Dies wurde bereits am Beispiel von Polysilalinsäure erfolgreich durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit auf Hyaluronsäure übertragen.¹³⁵ Nach Umsatz mit Ethyleniodid konnte der Ethylester der Hyaluronsäure mit einem Derivatisierungsgrad von nahezu 100% erhalten werden (Schema 51). Daher wurde das Iodid des Oxanorbornadienbausteins ausgehend von Säure **61** hergestellt

¹³⁵ S. Berski, Dissertation, Leibniz Universität Hannover 2008.

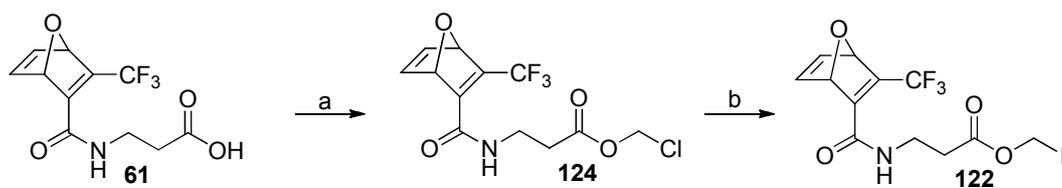
(Schema 52). Allerdings konnte unter den gleichen Bedingungen wie mit Ethyleniodid bei der Kupplung mit Baustein **122** kein Umsatz beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ließ sich Baustein **122** mit Essigsäure in 72% zu Modellschubstanz **123b** umsetzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit Hyaluronsäure nicht mit einem Oxanorbornadienbaustein funktionalisiert werden konnte, um damit die Kupfer-freie Ligation von RGD an das Polymer zu untersuchen.

Allerdings konnten Arbeiten von A. KRAUSE zeigen, dass Alginate mit RGD-Peptiden funktionalisiert werden konnte.¹⁰⁹ Alginate hat im Gegensatz zu Hyaluronsäure keine primären Alkohole. Daher kann bei der Anbindung von Oxanorbornadien **61** keine Veresterung stattfinden, die zu wasserunlöslichen Polymeren führt. Als Komposit von RGD-funktionalisiertem Alginate-Aldehyd mit Hyaluronsäure-Hydrazid **103** (Derivatisierungsgrad: 30%) konnten auf diese Weise biokompatible Hydrogele erzeugt werden, die die Adhäsion von Kardiomyozyten ermöglichen.



Schema 51: Reaktion von Hyaluronsäure **97** mit Iodiden. a) DMF/DMSO, RT, 12 h, b) DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 22 h, 72%.



Schema 52: Synthese von Baustein **122**. a) NaHCO₃, N(Bu)₄⁺HSO₄⁻, SO₃ClCH₂Cl, CH₂Cl₂, H₂O, RT, 12 h, 89%, b) NaI, CH₃CN, RT, 20 h, 76%

6 Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel

6.1 Einleitung

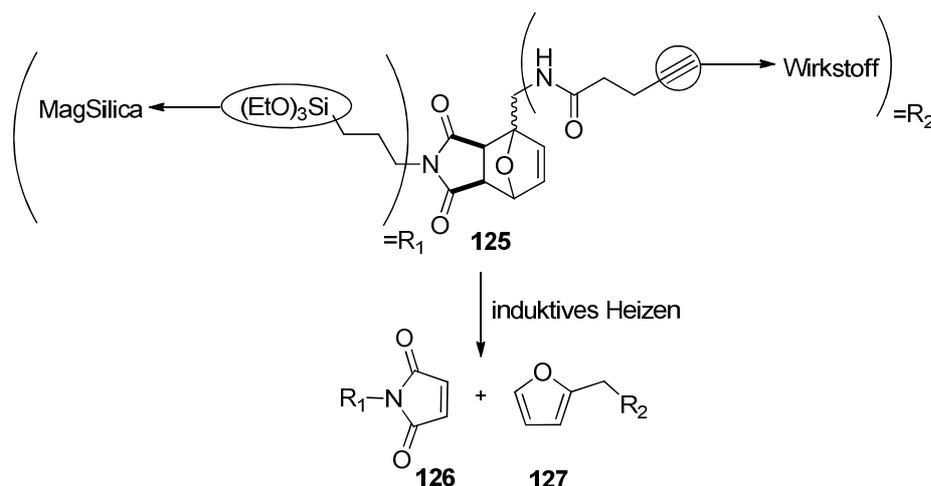
Im Rahmen eines Einsatzes zur magnetisch gesteuerten Verabreichung von Wirkstoffen (*magnetic-drug-targeting*) sollte das anti-tumoraktive Ansamycin an MAGSILICA[®]-Nanopartikel gebunden werden (s. Kapitel 1.6).¹³⁶ Anschließend sollten diese einem Patienten verabreicht, magnetisch an ihren Bestimmungsort gelenkt und dort lokalisiert werden. Die thermisch initiierte Abspaltung des Wirkstoffs sollte im Folgenden dessen Internalisierung in die Tumorzelle ermöglichen.

Das Konzept eines Transporter-Wirkstoff Konstrukts wird in Schema 53 dargestellt. Über eine DIELS-ALDER Reaktion eines Maleimids mit einem Furan sollte ein zyklisches System (Linker) synthetisiert werden, welches zum einen an den magnetischen Transporter MAGSILICA[®] zum anderen an den Wirkstoff gebunden werden sollte. Die Kupplung mit dem Nanopartikel sollte über eine Umetherung des Ethoxysilans des Linkers mit den Silanolgruppen auf der Oberfläche, unter Abspaltung von Ethanol, erfolgen. Die Funktionalisierung mit dem Wirkstoff sollte über eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung, wie zum Beispiel eine SONOGASHIRA Reaktion, zwischen dem Alkin des Linkers und einem Brom-Derivat des Wirkstoffs durchgeführt werden.

Die Freisetzung des Wirkstoffs sollte über induktives Heizen der Partikel geschehen. Die Erwärmung der Partikel sollte zu einer retro-DIELS-ALDER Reaktion führen, wobei die Maleimid-Funktionalität am Nanopartikel verbliebe und der mit dem Furan funktionalisierte Wirkstoff in die Umgebung abgegeben würde (Schema 53).

Die Synthese des DIELS-ALDER Addukts aus Schema 53 wird in den folgenden Kapiteln diskutiert. Des Weiteren wird die Anbringung an die MAGSILICA[®]-Nanopartikel beschrieben, sowie die thermisch induzierte Abspaltung des Dien Bausteins durch eine retro-DIELS-ALDER Reaktion.

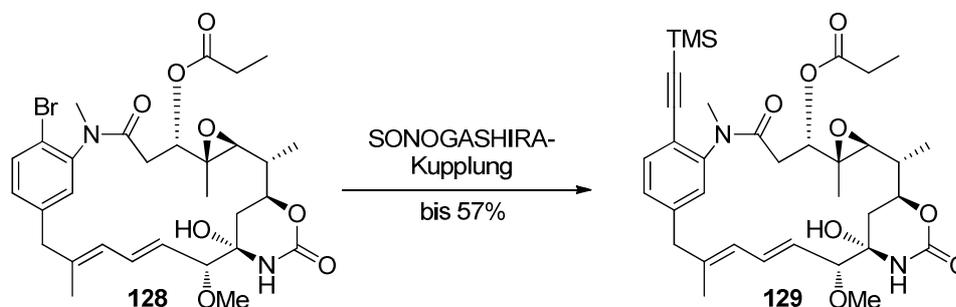
¹³⁶ Weitere Informationen zu MAGSILICA[®]: a) J. Wegner, Dissertation, Leibniz Universität Hannover **2011**, b) S. Ceylan, Dissertation Leibniz Universität Hannover **2011**, c) H. Gottfried, C. Janzen, P. Roth, B. Trangeser, G. Zimmermann, *Superparamagnetic Oxidic Particles, processes for their production and their use*, U. S. Patent 2003/0059603 A1, **2003**.



Schema 53: Konzept zur Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Wirkstoffen.

Die Kupplung des Wirkstoffs an den Dien Baustein, die Abspaltung des Wirkstoff-Dien Konjugats **127** sowie die Untersuchung der biologische Aktivität sind dagegen noch nicht abgeschlossen und werden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter besprochen. Grundlegende Arbeiten von S. MAYER zeigten jedoch bereits eine erfolgreiche Konjugation des mutasynthetisch erzeugten Ansamitocinbromids **128** mit einem Alkin unter SONOGASHIRA-Reaktionsbedingungen (Schema 54).¹³⁷ Zudem konnten Struktur-Aktivitäts Untersuchungen (*structure-activity-relationship*, SAR) zeigen, dass am aromatischen System durchgeführte, chemische Veränderungen des Wirkstoffs zu keinem, beziehungsweise nur zu einem geringen Antitumor-Aktivitätsverlust führten.¹³⁸

Die Abspaltung des Wirkstoff-Dien-Konjugats vom Nanopartikel sollte außerdem analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Modellstudien durchführbar sein, da durch die Konjugation des Wirkstoffs keine Veränderung an den für die DIELS-ALDER bzw. retro-DIELS-ALDER Reaktion beteiligten Stoffgruppen notwendig ist.



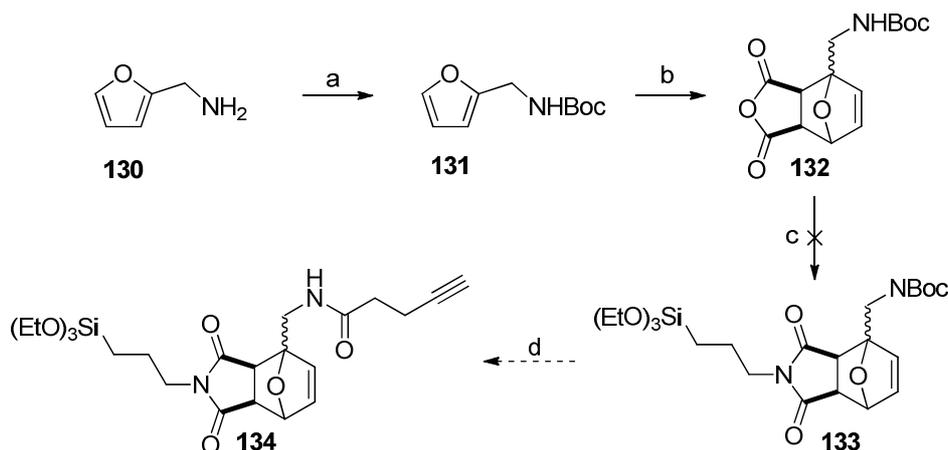
Schema 54: SONOGASHIRA-Kupplung an 19-Brom-20-desmethoxy-ansamytocin **128**.

¹³⁷ S. Mayer, Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover **2009**.

¹³⁸ J. M. Cassady, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1-26.

6.2 Synthese der Bausteine für die DIELS-ALDER Reaktion

In einer ersten Synthesesequenz wurde Furfurylamin **130** nach Vorschrift von TASLER *et al.* mit einer Boc-Gruppe geschützt (Schema 55).¹³⁹ Dieses erfolgte durch Zugabe von Di-*t*-butyldicarbonat, wobei ein quantitativer Umsatz beobachtet wurde. Anschließend wurde eine DIELS-ALDER Reaktion mit Maleinsäureanhydrid **135** durchgeführt, wobei der Tetrazyklus **132** in einer Ausbeute von 52% erhalten werden konnte. Die anschließende Kupplung von 3-Aminopropyltriethoxysilan **83**, welches im Folgenden für die Anbindung des Nanopartikels genutzt werden sollte, konnte jedoch nicht mit Erfolg durchgeführt werden. Es wurden dabei zwei verschiedene Protokolle (Schema 55A und B) verwendet, die für die Synthese ähnlicher Substanzen entwickelt wurden.¹⁴⁰ Anschließend sollte die Boc-Schutzgruppe entfernt und das freie Amin über Carbodiimid-Chemie mit 4-Pentinsäure **139** gekuppelt werden, um Konstrukt **134** zu erhalten.



Schema 55: Erste Synthesestrategie zum Aufbau eines thermisch spaltbaren Linkers **134**. a) Boc_2O , THF, RT, 18 h, quant., b) Maleinsäureanhydrid, EE, 60 °C, 4 h, 52%, c) 3-Aminopropyltriethoxysilan **83**, Variante A: Na_2CO_3 , MeOH, 56 °C, 4 d, Variante B: *i*-PrOH, Rückfluss, 2 h, d) 4-Pentinsäure **139**, Carbodiimid-Chemie.

Da allerdings bereits die Herstellung des Maleimids **133** zu Problemen führte, wurde die Strategie dahingehend geändert, dass die DIELS-ALDER Reaktion erst am Ende der Synthese stattfinden sollte (Schema 56).

Maleimid **136** sollte aus Maleinsäureanhydrid **135** und 3-Aminopropyltriethoxysilan **83** hergestellt werden (Schema 56). Da die Reaktionsbedingungen von ZIBINSKY *et al.* erneut kein Produkt lieferten, wurde

¹³⁹ S. Tasler, J. Mies, M. Lang, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 2286-2300.

¹⁴⁰ A. Gandini, A. J. D. Silvestre, D. Coelho, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, 48, 2053-2056, M. Zibinsky, T. Stewart, G. K. Surya Prakash, M. A. Kuznetsov, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3635-3642.

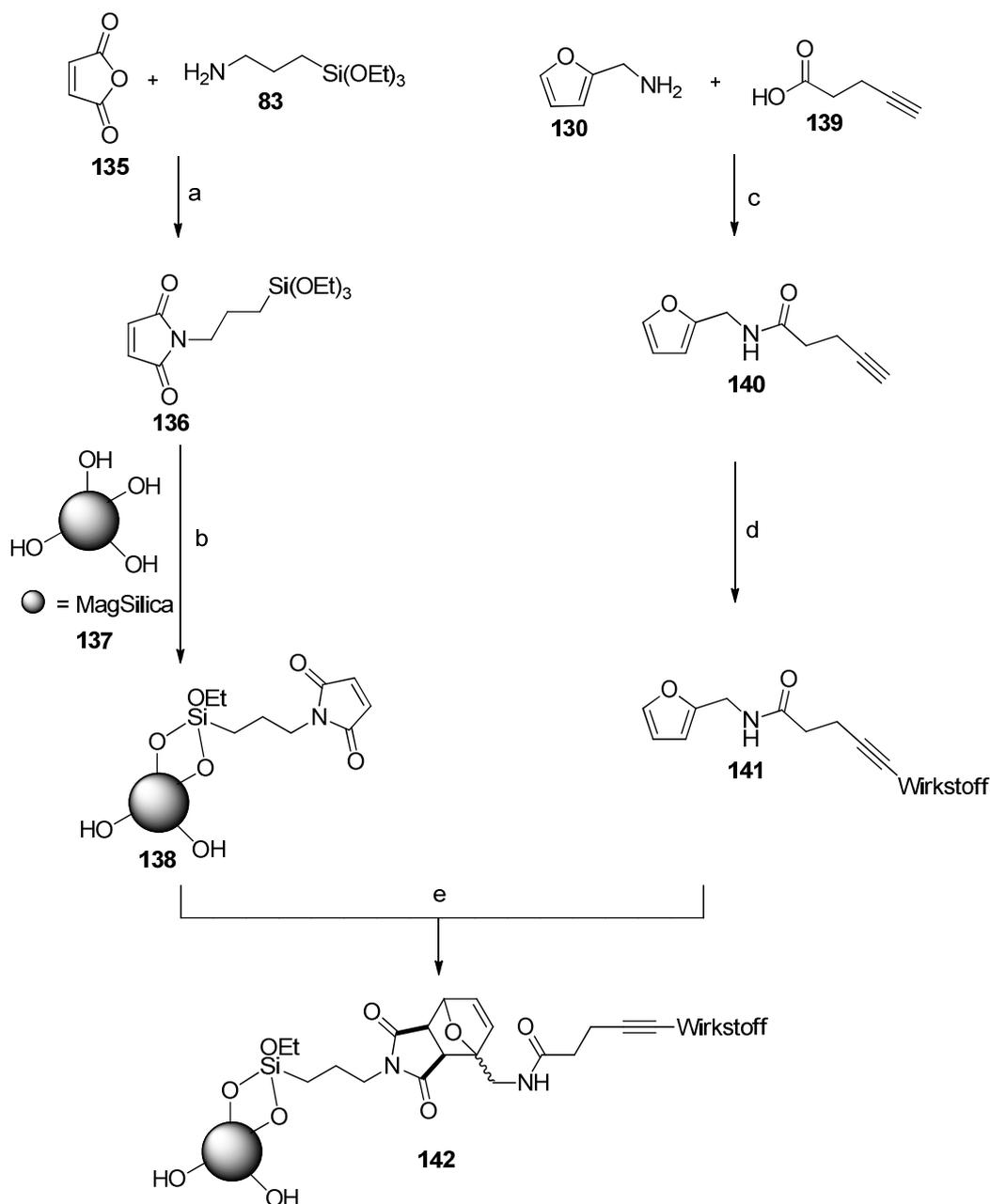
Maleimid **136** nach einer Vorschrift von LIM *et al.* synthetisiert.¹⁴¹ Allerdings konnte das Produkt nicht, wie beschrieben, destillativ isoliert werden. Bei der angegebenen Temperatur von 112 °C bei 300 mTorr polymerisierte die Ethoxysilaneinheit von Maleimid **136**, sodass sich ein unlöslicher Feststoff bildete (vergl. Schema 57). Stattdessen konnte das Produkt durch Säulenchromatographie isoliert werden. Da die Ethoxysilaneinheit jedoch auch mit dem Kieselgel reagierte, konnte es lediglich in einer Ausbeute von 15% erhalten werden.

Die Polymerisation der Ethoxysilaneinheit über die Zeit konnte auch durch ¹H-NMR-Analyse verfolgt werden (Abbildung 63). Alle Signale, außer die der Doppelbindung, verdoppelten und verbreiterten sich mit der Zeit. Dies war vermutlich auf die Silyletherbildung zurückzuführen, wobei Ethanol abgespalten wurde (Schema 57). Dieser Effekt war auch visuell zu beobachten. Aus einer Lösung von Maleimid **136** in Chloroform fiel binnen drei Stunden das polymerisierte Produkt aus. Bei 0 °C war dieser Effekt deutlich verlangsamt. Dennoch wurde auch bei dieser Temperatur das zunächst dünnflüssige Öl viskoser bis schließlich ein in organischen Lösungsmitteln unlöslicher Feststoff gebildet wurde. Daher wurde Maleimid **136** immer frisch hergestellt und direkt weiter umgesetzt.

Da sich die Ethoxysilaneinheit von Maleimid **136** sehr labil gegenüber Autopolymerisation zeigte und zudem die Reinigung von Substanzen mit dieser Stoffgruppe problematisch war, sollte es direkt in der nächsten Reaktion mit den Nanopartikeln umgesetzt werden (Schema 56). Für diese Reaktion werden in der Literatur verschiedene Reaktionstemperaturen zwischen Raumtemperatur und 120 °C angegeben.¹⁴² Die Reaktion läuft, wie am Beispiel der Reaktion mit dem Kieselgel während der säulenchromatographischen Reinigung von Maleimid **136** beobachtet wurde, bereits bei Raumtemperatur ab. Trotzdem musste zur Reaktionsbeschleunigung auf 65 °C erwärmt werden.

¹⁴¹ H. I. Lim, P. M. Oliver, J. Marzillier, D- V. Vezenov, *Anal Bioanal Chem* **2010**, 397, 1861-1872.

¹⁴² a) A. Schätz, M. Hager, O. Reiser, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 2109–2115, b) M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 2410-2420, c) S. Steinhaus, Y. Stark, S. Bruns, Y. Haile, T. Scheper, C. Grothe, P. Behrens, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **2010** 21, 1371-1378.



Schema 56: Synthese der funktionalisierten Nanopartikel **142**. a) 1. Toluol, RT, 2 h, 2. ZnCl_2 , RT, 30 min 3. HMDS, Rückfluss, 2 h, 15%, b) Acetonitril, 65 °C, 66 h, c) DIC, NHS, DIPEA, CH_2Cl_2 , RT, 12 h, 68%, d) Br-Wirkstoff, SONOGASHIRA-Bedingungen, e) DIELS-ALDER Reaktion.

Für den zweiten Molekülabschnitt wurde aus Furfurylamin **130** und 4-Pentinsäure **139** mittels Carbodiimid-Chemie Furan **140** synthetisiert (Schema 56). Dieses könnte wiederum durch eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung mit einem Wirkstoff funktionalisiert werden. Zuletzt sollte der Wirkstoff über die DIELS ALDER Reaktion am Nanopartikel angebracht werden. Da die Konjugation zwischen Furan und dem für diese Studie eingesetzten Wirkstoff Ansamytocin bisher noch nicht abschließend untersucht werden konnte, wurde zunächst die DIELS-ALDER Reaktion

mit Modellsubstanzen genauer betrachtet.¹⁴³ Die DIELS-ALDER Reaktion am Nanopartikel wird in Kapitel 6.5 diskutiert.

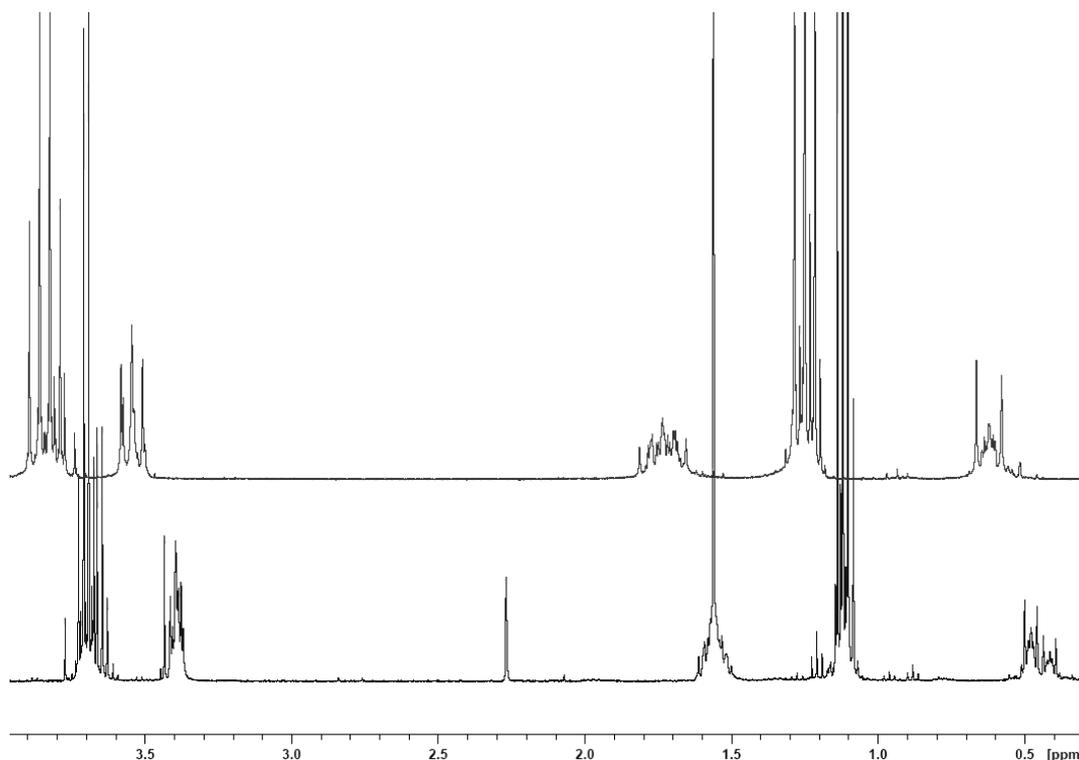
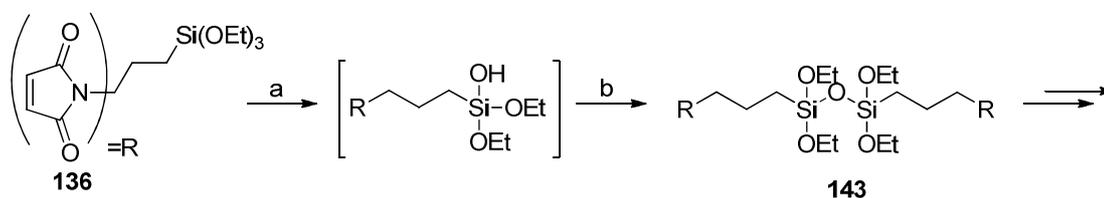


Abbildung 63: ¹H-NMR-Spektren von Maleimid **136** in CDCl₃, oben: direkt nach der Reaktion; unten: nach neun Monaten.



Schema 57: Postulierter Mechanismus zur Polymerisation von Maleimid **136**. a) H₂O, -EtOH, b) Maleimid **136**.

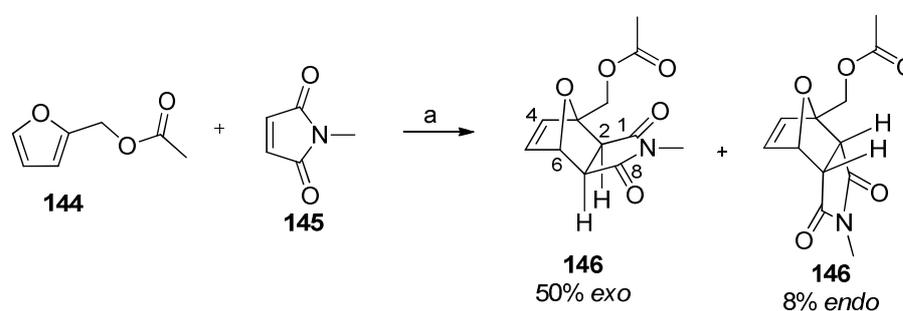
6.3 Untersuchungen zur DIELS-ALDER-Reaktion

Zur DIELS-ALDER Reaktion zwischen Maleimiden und Furanen gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen, die sich zumeist mit der Polymerisation verschiedener, mit diesen Stoffgruppen funktionalisierten Substanzen beschäftigen.¹⁴⁴ Im Rahmen dieser Arbeit sollte allerdings zunächst die Kupplung mit Hilfe von kleinen Molekülen

¹⁴³ O. Mancuso, Leibniz Universität Hannover, unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁴⁴ A. Gandini, D. Coelho, M. Gomes, B. Reis, A. Silvestre, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 8656-8664, b) A. Gandini, A. J. D. Silvestre, D. Coelho, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1713-1719, c) Q. Tian, Y. C. Yuan, M. Z. Rong, M. Q. Zhangb, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 1289-1296, d) A. Sanyal, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1417-1425, e) N. Teramoto, Y. Arai, M. Shibata, *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 78-84.

untersucht werden. Dazu wurden die Modellkomponenten Furfurylacetat **144** und *N*-Methylmaleimid **145** für drei Tage in Tetrachlorethan auf 65 °C erwärmt. Diese Reaktion wurde bereits von GANDINI *et al.* studiert, wobei allerdings die beiden Diastereomere *exo*-**146a** und *endo*-**146b** nicht getrennt wurden.¹⁴⁵ Zudem wurden keine ¹³C-NMR-Analysen durchgeführt, die eine Zuordnung der in dieser Arbeit untersuchten Reaktionen erleichtern würden. Daher wurde die Modellreaktion in dieser Arbeit wiederholt und die Diastereomere wurden getrennt. Es ergab sich ein *exo:endo*-Verhältnis von 6.25:1 bei einer Gesamtausbeute von 58%. Die Reaktion verlief jedoch nicht vollständig, da auch nach drei Tagen noch beide Edukte detektierbar waren.



Schema 58: Modell einer DIELS-ALDER Reaktion zwischen Furan **144** und Maleimid **145**. a) Tetrachlorethan, 65 °C, 3 d.

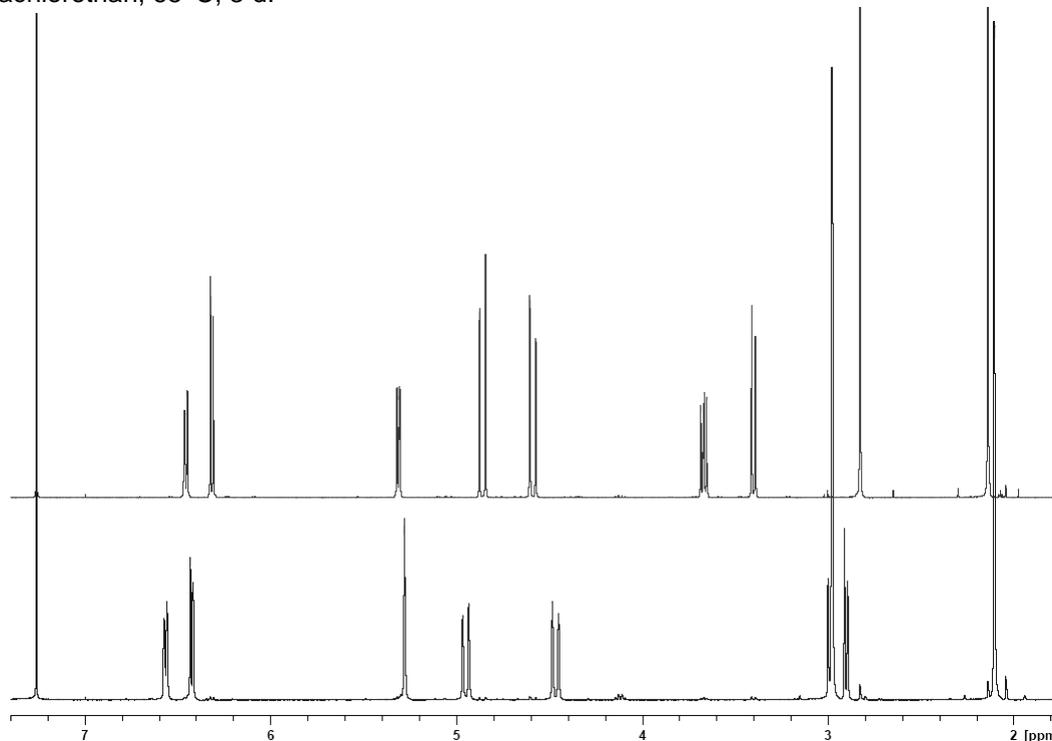


Abbildung 64: oben: ¹H-NMR-Spektrum von *endo*-**146**, unten: ¹H-NMR-Spektrum von *exo*-**146**.

¹⁴⁵ A. Gandini, D. Coelho, A. J. D. Silvestre, *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 4029-4036.

Die $^1\text{H-NMR}$ Spektren von *exo-146* und *endo-146* sind in Abbildung 64 gezeigt. Die Zuordnung erfolgte über die Kopplungskonstante der Protonen 6-H und 7-H (Schema 58). Im Falle einer *endo*-Anordnung stehen diese Protonen trans zueinander und zeigen eine Kopplung von $J = 5.5$ Hz. Sofern jedoch das *exo*-Addukt vorliegt, stehen diese beiden Protonen gauche zueinander, sodass keine Kopplung beobachtet werden kann. Die Daten stimmen mit denen von GANDINI *et al.* überein, bis auf die Zuordnung der Protonen 2-H und 7-H, die in der Publikation *vice versa* angegeben wurden.¹⁴⁵

Nachdem die DIELS-ALDER-Reaktion anhand von Modellsubstanzen untersucht worden war, wurden in gleicher Weise die Reaktion zwischen Maleimid **136** und Furan **140** durchgeführt. Diese sollte wieder zunächst in Lösung durchgeführt werden, bevor die Reaktion auf die Nanopartikel übertragen wurde. In diesem Rahmen wurde die Reaktion in Tetrachlorethan- d_2 direkt im NMR-Spektrometer bei 65 °C durchgeführt und es wurde stündlich ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen, um den Fortschritt der Reaktion zu untersuchen.

Tabelle 18: Integrale der $^1\text{H-NMR}$ -Signale der durch die DIELS-ALDER Reaktion entstandenen Produkte *endo-147* und *exo-147* an Beispiel von Proton h-H (Zuordnung: Abbildung 66). Integral von Proton 1-H des Furans **140** bei jeder Messung auf eins kalibriert.

Stunden	<i>endo</i>	<i>exo</i>	Stunden	<i>endo</i>	<i>exo</i>
0	0	0	12	0.18	0.52
1	0.05	0.05	13	0.18	0.55
2	0.09	0.10	14	0.17	0.58
3	0.12	0.15	15	0.17	0.63
4	0.14	0.20	16	0.17	0.66
5	0.16	0.24	17	0.17	0.69
6	0.17	0.28	18	0.16	0.73
7	0.18	0.32	19	0.16	0.75
8	0.17	0.36	20	0.16	0.79
9	0.18	0.41	21	0.16	0.81
10	0.18	0.45	22	0.16	0.83
11	0.18	0.48	23	0.15	0.86

Tabelle 18 zeigt die Zunahme des *endo* und des *exo* Produktes mit der Zeit. Der Verlauf wurde am Beispiel des Protons am neu gebildeten Brückenkopf bestimmt (Abbildung 66, Proton h-H). Dabei wurde Proton 1-H auf ein Integral von eins kalibriert. Dieses ist dem Proton im Furanring von Edukt **140** zuzuordnen. Folglich gilt: Sofern das Integral von Proton h-H eine Intensität von 1 aufweist, liegen Edukt und Produkt in äquimolaren Mengen vor.

Während zu Beginn der Reaktion nur die Edukte **136** und **140** im ^1H -NMR-Spektrum zu beobachten waren, wurde mit der Zeit zunehmend Produkt **147** gebildet. Dieser Anstieg verlief linear. Dies ist aus der Integration der Protonen von Edukt **140** und den Produkten *endo*-**147** und *exo*-**147** zu beobachten (Tabelle 18). Zur Veranschaulichung wurden in Abbildung 65 die Spektren der Protonen übereinandergelegt, anhand derer die Integration zur Erstellung von Tabelle 18 durchgeführt wurde. Diese Darstellung zeigt deutlich die Abnahme der Intensität von Furan **140** und die Zunahme der diastereomeren Produkte *endo*-**147** und *exo*-**147** mit zunehmender Reaktionszeit.

Es konnte festgestellt werden, dass auch nach langen Reaktionszeiten von über 23 Stunden die Edukte und Produkte im Gleichgewicht, in einem Verhältnis von 1:0.86 auf Seiten der Edukte, vorlagen.

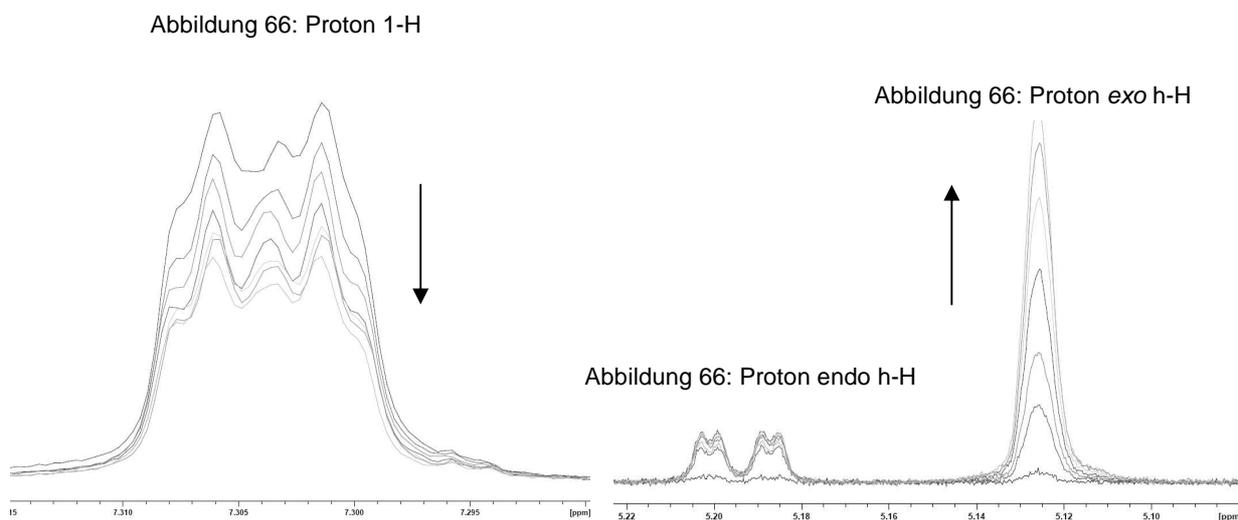


Abbildung 65: Verlauf der Reaktion zwischen Maleimid **136** und Furan **140**; Analyse mittels ^1H -NMR-Spektroskopie in Tetrachlorethan- d_2 , Messungen nach 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 Stunden, links: Abnahme des Signals von Furan **140** (Abbildung 66, Proton 1-H); rechts: Zunahme der Signale von *endo*-**147** und *exo*-**147** (Abbildung 66, Proton h-H).

Bei der Reaktion von Maleimid **136** und Furan **140** wurde das *exo*-Produkt **147** im Überschuss (5.7:1) gebildet. Dies ist vergleichbar mit dem Verhältnis von *endo*-**146** zu *exo*-**146** aus der Modellreaktion (Schema 58: isoliert: 6.25:1). Tabelle 18 zeigt zudem deutlich, dass zunächst das *endo*- und das *exo*-Produkt gleichzeitig gebildet wurden, wobei der Anstieg der Menge an *exo*-Produkt deutlich steiler war. Nach etwa sieben Stunden fand kein weiterer Anstieg an *endo*-Produkt statt, während die Menge an *exo*-Produkt weiter zunahm. Nach etwa 13 Stunden fand sogar eine leichte Abnahme der Menge an *endo*-Produkt statt (von 0.18 auf 0.15).

Anschließend wurde die Probenkammer des NMR-Spektrometers um weitere 7 °C auf 72 °C erwärmt um die Lage des Gleichgewichts bei höheren Temperaturen zu studieren. Direkt nach Erwärmung stieg das Verhältnis der Protonen 1: *endo*-h: *exo*-H auf 1: 0.48: 1.60 (Tabelle 19). Das Gleichgewicht von Edukten und Produkten lag folglich bei dieser Temperatur auf der Seite der Produkte.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Reaktionsmischung bestehend aus Furan **140**, Maleimid **136** und den durch die DIELS-ALDER Reaktion gebildeten Produkten **147** und **147** ist in Abbildung 66 gezeigt und vollständig zugeordnet. Die verschiedenen Substanzen sind farblich hervorgehoben und die Signale dementsprechend markiert. Ein ¹³C-NMR-Spektrum wurde in gleicher Weise ausgewertet (s. Anhang). Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion sehr sauber verlief und ausschließlich die erwarteten DIELS-ALDER Produkte *exo*-**147** und *endo*-**147** gebildet wurden.

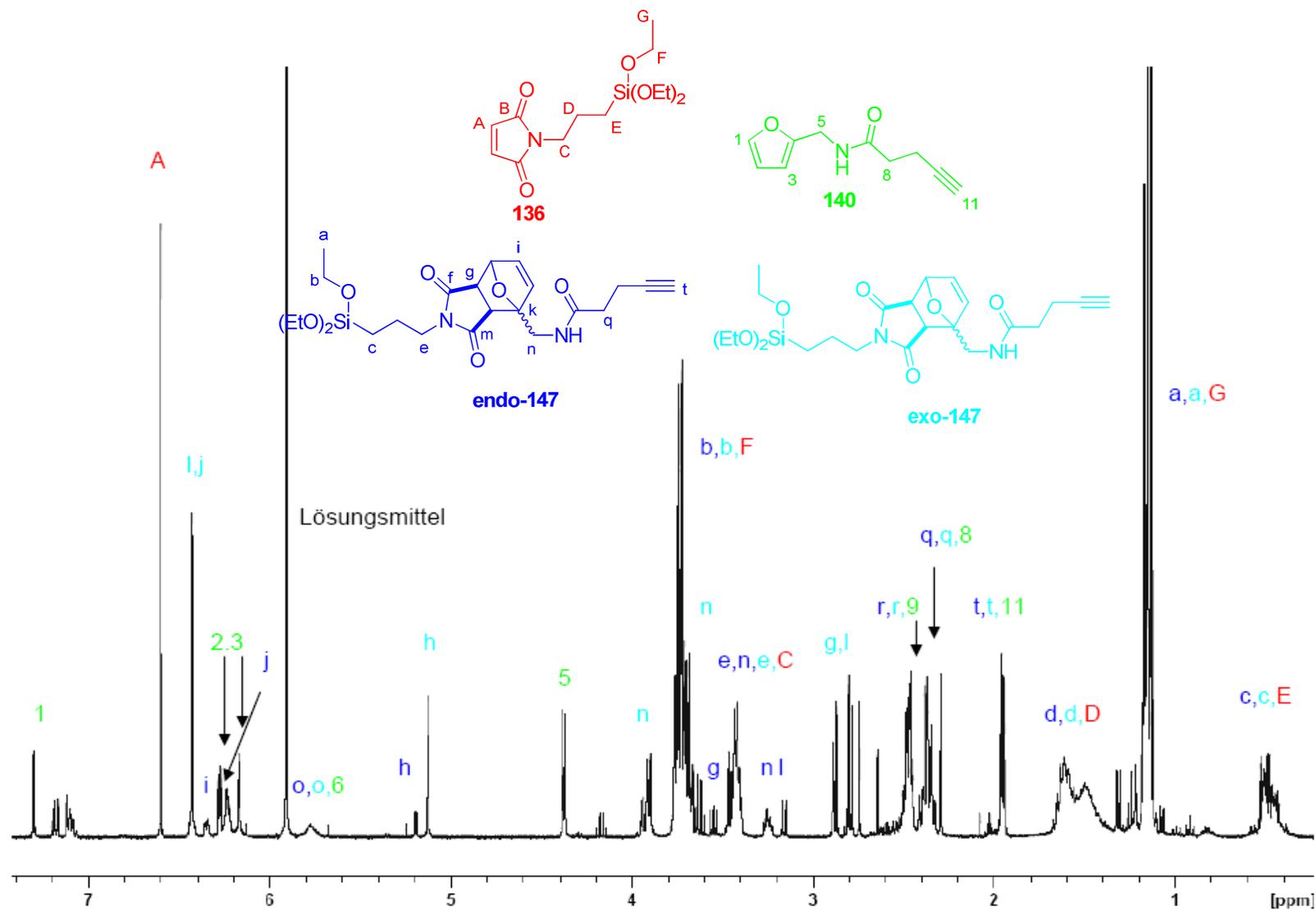


Abbildung 66: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Tetrachlorethan- d_2 der Reaktion zwischen Maleimid **136** und Furan **140** bei 72 °C (Tabelle 19B).

6.4 Untersuchungen zur retro-DIELS-ALDER-Reaktion

Nachdem die Reaktion zur Bildung des DIELS-ALDER Addukts untersucht war (Kapitel 6.3), wurde im Folgenden die Rückreaktion $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch verfolgt. Dazu wurde die Probenkammer des NMR-Spektrometers auf $110\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und in gleicher Weise verfahren wie bei der Hinreaktion.

Tabelle 19 zeigt einen Überblick über die im NMR-Spektrometer verwendete Temperatursequenz. Während bei $72\text{ }^\circ\text{C}$ noch ein Integral von 0.48 beziehungsweise 1.60 für das *endo*- beziehungsweise *exo*-Produkt gemessen wurde (Tabelle 19B), nahm der Anteil der DIELS-ALDER Produkte in der Reaktionsmischung bei weiterer Erwärmung drastisch ab. Bereits als die Temperatur von $110\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht war (nach etwa 10 minütigem Erwärmen), konnte kein *endo*-Produkt mehr detektiert werden (Tabelle 19C). Der Anteil an *exo*-Produkt sank ebenfalls auf unter 50% des anfänglichen Wertes. Im Folgenden wurde alle 30 Minuten ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass nach dem zunächst steilen Abfall die Menge an DIELS-ALDER Produkt nur langsam weiter sank. Nach etwa 1.5 Stunden (Tabelle 19E) war das Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten eingestellt. Es lag bei einem Mengenverhältnis von Furan **140**:*exo*-Produkt von 1:0.19.

Tabelle 19: Integrale der $^1\text{H-NMR}$ Signale von *endo*-**147** und *exo*-**147**. Diese wurden durch die DIELS-ALDER Reaktion gebildet und durch die retro-DIELS-ALDER Reaktion dezimiert. Dargestellt am Beispiel von Proton h-H. (Zuordnung: Abbildung 66) Integral von Proton 1-H des Furans **140** jeweils auf eins kalibriert.

	<i>endo</i>	<i>exo</i>	Temperatur	Bemerkungen
A	0.15	0.86	$65\text{ }^\circ\text{C}$	Entspricht Tabelle 18, 23 h
B	0.48	1.60	$72\text{ }^\circ\text{C}$	Sofort nach Erreichen der Temperatur
C	0	0.69	$110\text{ }^\circ\text{C}$	Sofort nach Erreichen der Temperatur
D	0	0.48	$110\text{ }^\circ\text{C}$	30 min nach Erreichen der Temperatur
E	0	0.21	$110\text{ }^\circ\text{C}$	1 h nach Erreichen der Temperatur
F	0	0.19	$110\text{ }^\circ\text{C}$	1.5 h nach Erreichen der Temperatur
G	0	0.13	$120\text{ }^\circ\text{C}$	Sofort nach Erreichen der Temperatur
H	0	0.12	$120\text{ }^\circ\text{C}$	30 min nach Erreichen der Temperatur
I	0.03	0.12	$65\text{ }^\circ\text{C}$	Sofort nach Erreichen der Temperatur
J	0.06	0.16	$65\text{ }^\circ\text{C}$	30 min nach Erreichen der Temperatur
K	0.08	0.18	$65\text{ }^\circ\text{C}$	1 h nach Erreichen der Temperatur
L	0.10	0.21	$65\text{ }^\circ\text{C}$	1.5 h nach Erreichen der Temperatur

Anschließend wurde auf 120 °C erwärmt, um die Lage des Gleichgewichts zwischen Edukten und Produkten weiter zu studieren (Tabelle 19G, H). Bei dieser Temperatur ging die Menge an DIELS-ALDER Addukt jedoch nur leicht zurück.

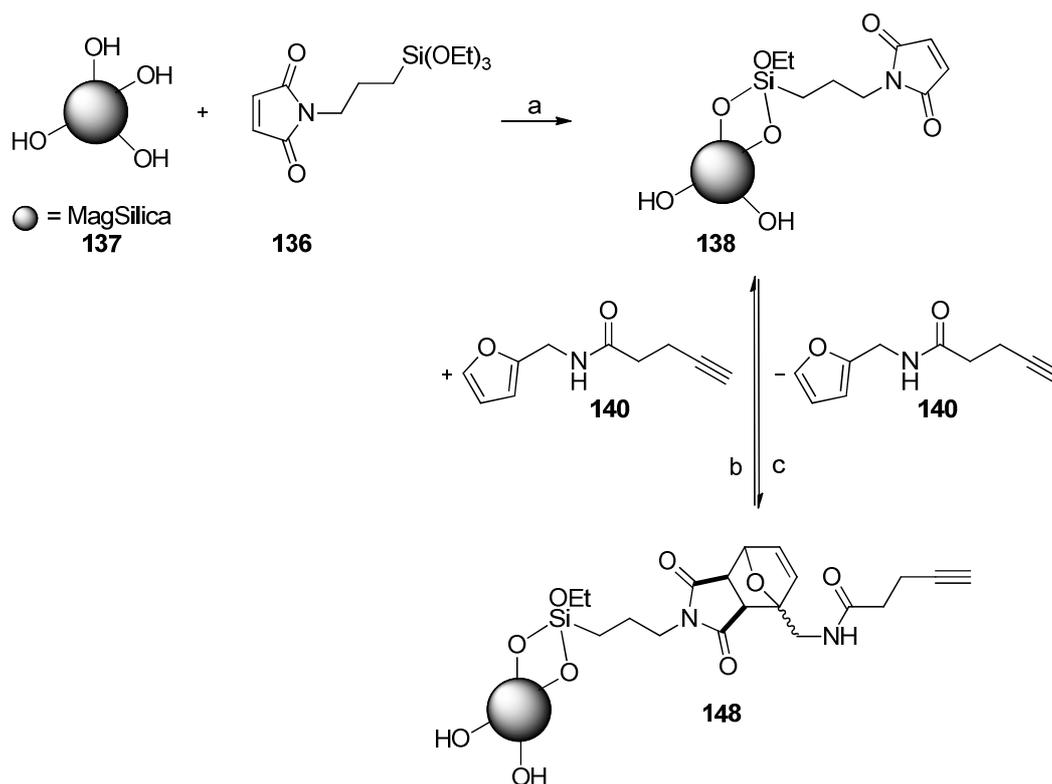
Zum Abschluss der NMR-Experimente sollte untersucht werden, ob sich die DIELS-ALDER/retro-DIELS-ALDER Reaktionssequenz wiederholen lässt. Zu diesem Zweck wurde das NMR-Spektrometer erneut auf 65 °C temperiert (Tabelle 19I-L). Es konnte gezeigt werden, dass sich erneut das DIELS-ALDER Produkt bildete.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reaktion zwischen Maleimid **136** und Furan **140** eine Gleichgewichtsreaktion ist, wobei die Lage des Gleichgewichts durch die Reaktionstemperatur eingestellt werden kann. Bei 72 °C lag mehr Produkt als Edukt vor und bei weiterer Erwärmung auf 110 °C fand die Rückreaktion statt, sodass der Schwerpunkt des Gleichgewichts auf Seiten der Edukte lag. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die DIELS-ALDER Reaktion zwischen **136** und **140** mit über 23 Stunden deutlich langsamer verläuft als die Rückreaktion (unter 30 Minuten). Dies ist von besonderer Bedeutung für eine Anwendung im Rahmen von magnetischen Wirkstofftransportern, da ein langes, induktives Heizen auch gesundes Gewebe im Patienten schädigen könnte. Abschließend konnte gezeigt werden dass sich der Prozess von Hin- und Rückreaktion problemlos wiederholen lässt, ohne dass eine Zersetzung der Substrate einsetzte.

6.5 Reaktionen an Nanopartikeln

In Kapitel 6.1 wurde bereits das Konzept zur Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Wirkstoffen über einen thermolabilen Linker beschrieben. Derartige Konstrukte sollten im Bereich des *magnetic drug targeting* eine kontrollierte Freisetzung von Medikamenten ermöglichen. Der thermolabile Linker sollte wiederum aus einem DIELS-ALDER Addukt bestehen, welches bei höheren Temperaturen von etwa 110 °C eine retro-DIELS-ALDER Reaktion eingeht. Diese Reaktionen wurden in Kapitel 6.3 und 6.34 eingehend diskutiert.

Im Folgenden sollte die DIELS-ALDER Reaktion, welche bereits an Modellsubstanzen studiert wurde, auf die MAGSILICA[®]-Nanopartikel übertragen werden. Deren Oberfläche weist hauptsächlich Silanolgruppen auf, die mit den Ethoxysilangruppen von Maleimid **136** unter Ethanol-Abspaltung zu MAGSILICA[®]-Derivat **148** reagieren können. Die Anbindung erfolgte innerhalb von 66 Stunden bei 65 °C (vergl. Kapitel 6.1).



Schema 59: Konjugation von Maleimid **136** an MAGSILICA[®]-Nanopartikel und anschließende DIELS-ALDER beziehungsweise retro-DIELS-ALDER Reaktion. a) Acetonitril, 65 °C, 66 h, b) Tetrachlorethan, 2 d, 72 °C, c) Tetrachlorethan, 45 min, 110 °C.

Der nächste Schritt zur Funktionalisierung der Nanopartikel war die Festphasen-gebundene DIELS-ALDER Reaktion mit einem Furan. Da die Konjugation eines Wirkstoffs an die Alkinfunktionalität des Furans bisher noch nicht erfolgreich realisiert werden konnte, wurde zunächst eine DIELS-ALDER Reaktion mit Furan **140** durchgeführt.¹⁴³ Um einen möglichst großen Anteil an DIELS-ALDER Produkt zu erhalten, wurde eine Temperatur von 72 °C für die Konjugation gewählt (vergl. Kapitel 6.3). Da die Reaktion an den Nanopartikeln aufgrund von eingeschränkter Mobilität des Substrats möglicherweise langsamer abläuft als bei den untersuchten Modellsubstanzen, wurde eine verlängerte Reaktionszeit von drei Tagen gewählt. Das MAGSILICA[®] wurde anschließend gründlich gespült bis mittels GC-MS kein Furan mehr im Überstand nachzuweisen war (Tabelle 20A). Dazu wurden die Nanopartikel magnetisch fixiert und wiederholt mit Lösungsmittel versetzt.

Da eine Untersuchung der beschichteten Partikel über IR- oder Elementaranalyse nicht möglich war, wurde direkt eine retro-DIELS-ALDER Reaktion durchgeführt. Dazu wurde MAGSILICA[®]-Derivat **148** in Tetrachlorethan suspendiert und für 45 Minuten auf 110 °C erhitzt. Bei einer erfolgreichen DIELS-ALDER/retro-DIELS-ALDER Reaktionssequenz müsste im Überstand das freigesetzte Furan **140**

detektierbar sein. Daher wurde der Überstand entnommen, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch GC-MS untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Zur Durchführung der retro-DIELS-ALDER Reaktion wurden verschiedene Heizmethoden gewählt. Zunächst wurde die Reaktionsmischung konventionell im Ölbad erwärmt (Tabelle 20B). Im Überstand war durch GC-MS eindeutig das abgespaltene Furan **140** nachzuweisen, da dieses einen charakteristischen Peak bei einer Retentionszeit von 9.1 Minuten mit einer korrespondierenden Masse von $m/z = 177$ besitzt. Das Ergebnis wurde durch hochaufgelöste Massenspektrometrie bestätigt. Um die Wiederverwendbarkeit der Partikel zu prüfen, wurden diese erneut, wie oben beschrieben, be- und entladen (Tabelle 20C).

Anschließend wurden Versuche zur Spaltung des DIELS-ALDER Konstrukts durch induktives Heizen durchgeführt. Diese Experimente sind von entscheidender Bedeutung für die humane Anwendung der Nanopartikel als Wirkstofftransporter, da eine externe Erhitzung der Nanopartikel im menschlichen Körper nicht durchgeführt werden kann. Stattdessen sollte der Kern der MAGSILICA[®]-Partikel induktiv erwärmt werden und die Freisetzung des Wirkstoffs ermöglichen ohne dabei umgebendes Gewebe zu schädigen. Der Effekt des gezielten Erhitzens von Tumorgewebe (Hyperthermie) wurde von GILCHRIST *et al* beschrieben.⁷³

Zunächst wurde der benötigte Energieeintrag ermittelt. Dieser lässt sich bei den verwendeten Systemen über die Pulsweitenmodulationen am Generator regulieren (Tabelle 20D-F).¹⁴⁶ Es konnte jedoch erst bei einem maximal einstellbaren Energieeintrag eine Abspaltung von Furan **140** beobachtet werden (Tabelle 20F). Ebenso wie beim konventionellen Heizen, konnten auch beim induktiven Heizen die Partikel mindestens zwei Mal wiederverwendet werden (Tabelle 20G, H).

¹⁴⁶ Nähere Informationen zum Versuchsaufbau beim induktiven Heizen sind dem Experimentellen Teil dieser Arbeit (Kapitel 7) sowie den Arbeiten J. Wegner und S. Ceylan zu entnehmen.^{136a,136b}

Tabelle 20: Bedingungen der retro-DIELS-ALDER Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikeln und Analyse mittels GC-MS.

	Heizmethode	GC-MS
A	Keine (Gespülte Partikel vor Reaktion)	Kein Furan
B	Ölbad 110 °C, 1. Mal, nach Reaktion	Furan
C	Ölbad 110 °C, 2. Mal, nach Reaktion	Furan
D	Induktiv 400 ‰, nach Reaktion	Kein Furan
E	Induktiv 500 ‰, nach Reaktion	Kein Furan
F	Induktiv 600 ‰, 1. Mal, nach Reaktion	Furan
G	Induktiv 600 ‰, 2. Mal, nach Reaktion	Furan
H	Induktiv 600 ‰, 3. Mal, nach Reaktion	Furan

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die kovalente Funktionalisierung von PMP-Membranen mit zyklischen RGD-Peptiden zur Generierung von hämokompatiblen Oberflächen für den Einsatz in Oxygenatoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hydrophilisierung der PMP-Oberfläche mit Formiergasplasma unabdingbar für die chemische Derivatisierung des Polymers war. Anschließend konnte in drei Schritten, (Nitreninsertion, Amidbindung und metallfreie, 1,3-dipolare Zykloaddition) das RGD-Peptid an die Oberfläche ligiert werden (Abbildung 67). Die Vorteile dieser Ligationsstrategie gegenüber einer Kupfer-katalysierten „Klick“-Reaktion konnten gezeigt werden. Alle Reaktionen am Polymer wurden unter anderem mittels Modellreaktionen und XPS-Messungen verfolgt. Die biologische Evaluation der RGD-funktionalisierten PMP-Folien und Hohlfasermatten zeigte einen, verglichen mit dem unbehandelten Material, stärkeren Bewuchs mit darauf ausgesiedelten Endothelzellen.⁸⁸

Zudem konnte der Einfluss verschiedener Plasmabedingungen auf die PMP-Oberfläche untersucht werden.

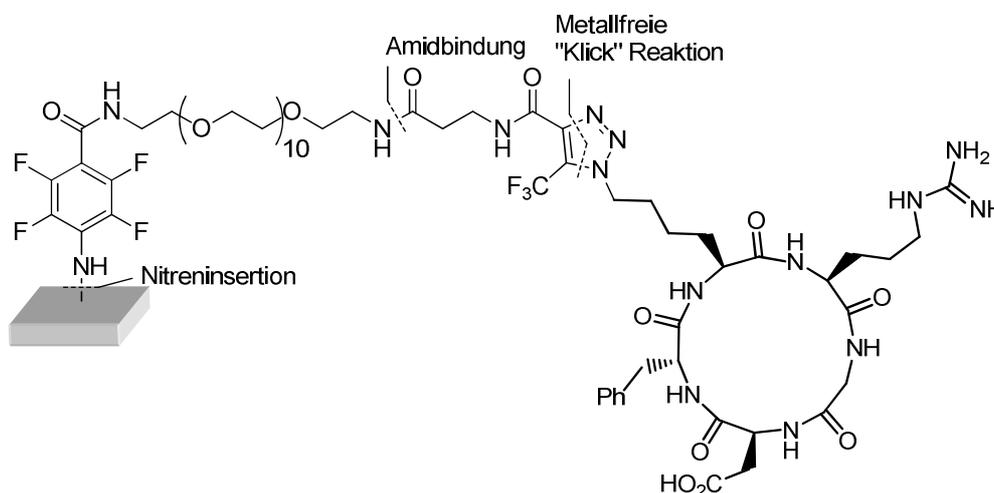


Abbildung 67: Struktur der mit c[RGDFk(N₃)] funktionalisierten PMP-Membran.

Um zu zeigen, dass es sich bei der anhand von PMP entwickelten Ligationsstrategie um ein vielfältig anwendbares Verfahren zur Funktionalisierung von Oberflächen handelt, wurde die Synthese auf Metalloberflächen übertragen. Diese dienten dabei als Modell für das Metallgehäuse eines Herzschrittmachers.

Durch XPS-Studien konnte die Funktionalisierung der Metalloberfläche nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Biopolymere Gelatine und Hyaluronsäure zu Hydrogelen vernetzt werden, die anschließend als Gerüstmaterialien im Bereich des *tissue engineering*s Anwendung finden sollten. Es konnten zwei Vernetzungsstrategien entwickelt und untersucht werden. Zum einen wurden die Polymere mit Methacrylat-Gruppen funktionalisiert, die nach Bestrahlung mit UV-Licht oder induziert durch einen Femtosekundenlaser zu Hydrogelen gelierten (Abbildung 68).¹²² In einem zweiten Ansatz wurde die Hyaluronsäure zum Dialdehyd oxidiert beziehungsweise zum Hydrazid umgesetzt, wobei beide Komponenten miteinander *in situ* Gele ausbildeten. Durch Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten auf den Hydrogelen konnte die Bioverträglichkeit beider Gelypen gezeigt werden.¹¹⁸ In Gegenwart von Gelatine konnte zudem eine Adhäsion der Zellen auf dem *scaffold* nachgewiesen werden.

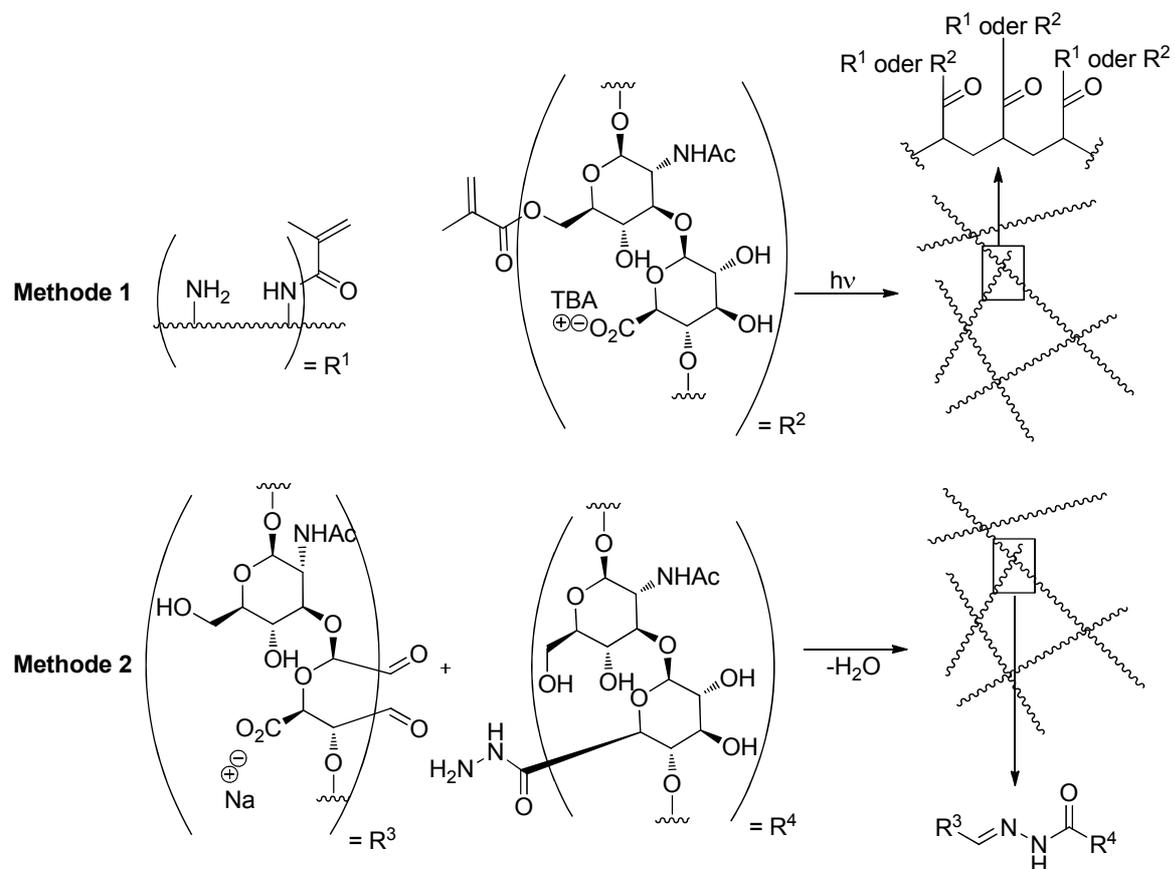


Abbildung 68: Strategien zur Vernetzung von Hyaluronsäure und Gelatine zu Hydrogelen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde ein Konzept zur magnetisch gesteuerten Verabreichung von Wirkstoffen erarbeitet. Dabei sollte der magnetische Transporter

MAGSILICA[®] über einen thermolabilen Linker mit einem Wirkstoff funktionalisiert werden, welcher durch induktives Heizen der internalisierten Partikel freigesetzt werden sollte (Abbildung 69). Zu diesem Zweck wurde die temperaturabhängige DIELS-ALDER Reaktion zwischen einem Furan und einem Maleimid anhand von Modellreaktionen detailliert untersucht.

Es konnte die erfolgreiche Ligation von MAGSILICA[®] mit einem Maleimid gezeigt werden. An dieses Konjugat konnte über eine DIELS-ALDER Reaktion ein Furan (zunächst ohne Wirkstoff) gebunden und über eine retro-DIELS-ALDER Reaktion wieder freigesetzt werden. Letzteres gelang sowohl durch konventionelles als auch durch induktives Heizen bei Temperaturen um 120°C innerhalb von wenigen Minuten.

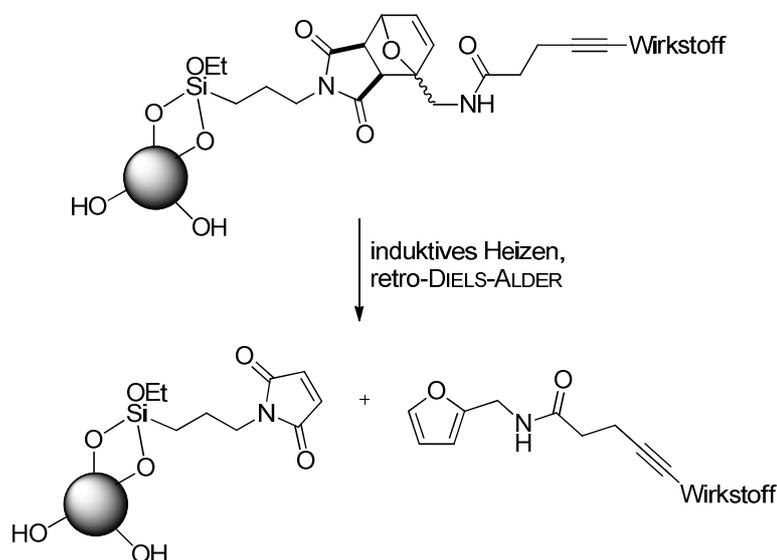


Abbildung 69: Konzept zur magnetisch gesteuerten und thermisch induzierten Freisetzung von Wirkstoffen.

7.2 Ausblick

In Bezug auf die Funktionalisierung der PMP Oberflächen sollte die Stabilität des Zellbewuchses auf PMP-Folien und Hohlfasermatten unter Blutfluss-Bedingungen untersucht werden. Dazu sollten die RGD-funktionalisierten Polymere in einem Bioreaktor mit Endothelzellen besiedelt werden und die Menge an adhärenierten Zellen über einen Zeitraum von mehreren Wochen bestimmt werden. Auf diese Weise sollte das in dieser Arbeit entwickelte System mit den derzeit industriell verwendeten Membranen verglichen werden. Zudem sollte die Gasdurchlässigkeit der chemisch veränderten und besiedelten Membranen untersucht werden.

Sofern die chemische und biologische Optimierung der PMP-Membranen *in vivo* abschließend untersucht wurde, sollte das System in den klinischen Alltag übertragen werden. Alternativ könnten weitere Erkennungsfaktoren auf die Oberfläche aufgebracht werden, um den zellulären Bewuchs im Vergleich zu den RGD-funktionalisierten Polymeren zu vergleichen. Eine Anbindung von Wirkstoffen wie beispielsweise Antikoagulantien oder Antibiotika über die in dieser Arbeit beschriebene Ligationsstrategie wäre ebenfalls möglich, sodass die Membranen eine zusätzliche, medizinische Funktion erhielten.

Die Funktionalisierung von Metalloberflächen mit RGD-Peptiden konnte exemplarisch in dieser Arbeit gezeigt werden und sollten im nächsten Schritt auf das Titangehäuse von Herzschrittmachern übertragen werden. Biologische Studien sollten die Biokompatibilität im Vergleich mit den unbehandelten Oberflächen untersuchen.

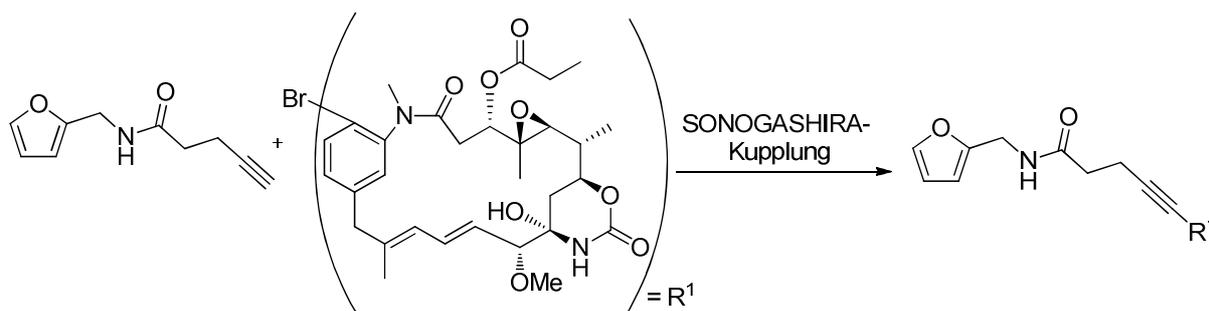
Da im Rahmen dieser Arbeit keine Funktionalisierung der Hyaluronsäure über eine metallfreie „Klick“-Chemie mit zyklischen RGD-Peptiden erreicht werden konnte, sollten in nachfolgenden Arbeiten weitere Ligationstechniken untersucht werden. Auf diese Weise könnten Hydrogele synthetisiert werden, die eine Adhäsion von Zellen ermöglichen, ohne dem *scaffold* tierisch-produzierte Gelatine zuzusetzen. Neben RGD-Peptiden könnten, je nach medizinischer Anwendung des Hydrogels, auch andere Erkennungsfaktoren ligiert werden.

Zudem sollte der Abbau und die Bioverträglichkeit der Hydrogele *in vitro* und *in vivo* eingehender untersucht und optimiert werden. Dazu könnten zum Beispiel Komposite mit weiteren Polymeren wie Polysacchariden, Peptiden oder synthetisch hergestellten Polyestern erzeugt werden. Zudem könnten weitere Vernetzungsstrategien entwickelt werden, womit der Abbau des Polymers reguliert

werden kann. Eine Mikrostrukturierung des Hydrogels mit Poren geeigneter Größe könnte zudem die Migration der Zellen durch das Hydrogel verbessern.

Hinsichtlich des Projekts zur Entwicklung eines magnetischen Wirkstofftransporters sollte in folgenden Arbeiten die Ligation des Wirkstoffs Ansamitocin mit einem Furanderivat untersucht werden (Schema 60). Dieses Konstrukt sollte im Folgenden in einer DIELS-ALDER Reaktion an das Maleimid-funktionalisierte MAGSILICA[®] gekuppelt werden und die Wirkstofffreisetzung analog zu den in dieser Arbeit gezeigten Modellstudien durchgeführt werden.

Das Furan-Ansamitocin Addukt sollte zudem auf seine biologische Aktivität untersucht werden, da dieses nach der thermisch induzierten retro-DIELS-ALDER Reaktion *in vivo* freigesetzt wird. Im Falle einer zu geringen biologischen Potenz sollten alternative Ligationen zwischen Furan und Wirkstoff studiert werden.

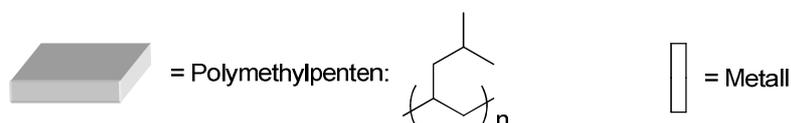


Schema 60: Synthese eines Furan-funktionalisierten Ansamitocinderivats durch SONOGASHIRA-Kupplung zur Anwendung im Bereich des *magnetic drug targetings*.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine Hinweise

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien einschließlich Lösungsmittel ohne weitere Reinigung in p.a. Qualität von SIGMA-ALDRICH oder ACROS ORGANICS, Geel (Belgien) erhalten. Es wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet. Poly-4-methyl-1-penten (PMP) Membranen (Schichtdicke 30 μm) wurden von GOODFELLOW, Bad Nauheim (Deutschland) bezogen. Metallplatten wurden von K. Kerber des Instituts für Werkstoffkunde der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt. Im Folgenden werden die beiden Materialien wie folgt schematisch dargestellt:



Chromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumfolien des Typs F254 (MERCK, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die Spots mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder verschiedenen Färbereagenzien unter Wärmezufuhr visualisiert. Säulenchromatographie wurde mittels Kieselgel der Firma MACHERY-NAGEL, Düren (Deutschland) (Korngröße 40-63 μm) und leichtem Überdruck durchgeführt. Zudem wurde zur Größenausschlusschromatographie SephadexTM LH-20 Kieselgel und Methanol als Lösungsmittel verwendet. Sofern angegeben, wurde präparative HPLC-Chromatographie mit der Anlage MERCK HITACHI LaChrom (Pumpe: L-7150, Interface D-7000 und einem Diode-Array-Detektor L-7450 $\{\lambda = 220-400 \text{ nm}\}$) betrieben. Dabei wurde als stationäre Phase eine C-18-P_[A]Trentec Reprisil 120 C 18 AQ (5 mm, 250 mm Durchmesser: 25 mm) Säule verwendet. Präparative Dünnschichtchromatographie wurde mit PSC Fertigplatten (KS 60 F-254, Größe: 20 x 20 cm, Schichtdicke: 1 mm) der Firma MERCK durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Alle ¹H-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. Dabei wurden deuterierte Lösungsmittel von DEUTERO, Kastellaun (Germany) verwendet und deren Restprotonengehalt als Standard verwendet. Die zur Kalibrierung verwendeten chemischen Verschiebungen wurden der Arbeit von GOTTLIEB *et al.* entnommen und werden für alle Lösungsmittel jeweils angegeben.¹⁴⁷ Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten in Herz. Die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, s^{br} = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett und sext = Sextett. Die Nummerierung der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome bei den NMR-Daten ist jeweils angegeben und wurde pragmatisch festgelegt.

¹³C-Spektren wurden mit den Spektrometern Advance-400 oder DPX-400 (100 MHz) der Firma BRUKER gemessen. Die Kalibrierung erfolgt wie für ¹H-Spektren beschrieben. Für den Substitutionsgrad der Kohlenstoffe werden folgende Abkürzungen verwendet: p = primärer Kohlenstoff, s = sekundärer Kohlenstoff, t = tertiärer Kohlenstoff, q = quarterer Kohlenstoff. Zur vollständigen Interpretation der Spektren verschiedener Substanzen wurden zudem ¹H-¹H Korrelationen und ¹H-¹³C Korrelationen analysiert. Dazu wurden COSY, HSQC und HMBC Experimente durchgeführt.

Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem LCT (ESI) der Firma MICROMASS, Manchester (UK) in Methanol oder Acetonitril gemessen. Die Injektion erfolgte dabei im Loop-Modus in einer HPLC Anlage von WATERS (Alliance 2695). Alternativ wurde ein Q-TOF mit einer WATERS Aquity Ultraperformance LC Anlage verwendet.

Plasmachemie

Die Plasmabehandlung von Oberflächen wurde mit Geräten der Firma PLASMATREAT, Steinhagen (Germany) durchgeführt (s. Kapitel 3.4). Dazu gehörten: ein Generator FG 5001, ein Transformator HTR12 L133, eine rotierende Plasmadüse RD1004 mit dem Düsenaufsatz 10157 und eine Verfahrtschicht PT 60). Der Aufbau entspricht dem serieller Prozesse und wird in einem Patent von FÖRNSEL *et al.*

¹⁴⁷ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

beschrieben.⁸¹ Die Parameter zur Behandlung der verschiedenen Oberflächen wurden im vorangegangenen Kapiteln jeweils angegeben.

XPS

Um die elementare Zusammensetzung der verschiedenen Oberflächen zu analysieren, wurden die Probenkörper mit einer Anlage der Firma LEYBOLD bei einem Druck von 1×10^{-7} mbar vermessen. Als Röntgenquelle diente eine duale Anode LH RQ20/63 von LEYBOLD, die sowohl $MgK\alpha$ als auch $AlK\alpha$ Strahlung emittieren kann. Für die in dieser Arbeit gemessenen XP-Spektren wurde jedoch ausschließlich nicht-monochromatische $MgK\alpha$ Strahlung ($E = 1253,6$ eV; 0,7 eV Linienbreite) verwendet. Die Röntgenröhre arbeitete bei 210-240 W, erreichte eine Beschleunigungsspannung von 7 bis 8 kV und einen Emissionsstrom von 30 mA. Der Winkel zwischen Röntgenquelle und Analysator betrug $54,7^\circ$. Die Energie der emittierten Elektronen wurde mit einem Halbkugelkondensator LH EA10/100 (Durchmesser: 100 mm) der Firma LEYBOLD bestimmt. Dessen Schlitzöffnung hatte eine Größe von 20×2 mm, sodass sich ein Auflösungsvermögen von 0.01 ergibt. Die jeweiligen Pass-Energien sind für jedes Spektrum separat angegeben.

Kontaktwinkel

Die Hydrophilie, beziehungsweise Hydrophobie der verschiedenen Oberflächen wurde mit einem Kontaktwinkelmessgerät SURFTENS UNIVERSAL (OEG, Frankfurt/Oder) bestimmt. Dabei wurde das Verfahren des ruhenden Tropfens (*sessile drop*) bei Raumtemperatur verwendet. Es wurden mindestens fünf Tropfen Wasser auf die Oberfläche aufgebracht und deren Kontaktwinkel gemittelt.

Ultraviolett Spektren

UV-Spektren wurden mit einem SHIMADZU, Duisburg (Germany) UV-1601PC Spektrophotometer gemessen.

Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät Optimelt der Firma SRS, Sunnyvale (USA) bestimmt.

Infrarot Spektren

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

CNH Analysen

Elementaranalysen mit einem Vario EL Gerät von ELEMENTAR ANALYSENSYSTEME durchgeführt.

Photochemie

Als UV-Lichtquelle für die Insertionsreaktion 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.

GC-MS

GC-MS-Spektren wurden mit den Geräten GC-17 und QP-500 der Firma SHIMADZU EUROPA GMBH (Duisburg) gemessen und enthielten eine Optima-5-MS-Kapillarsäule (0.25 mm, 30 m 0.32 mm, Firma MACHEREY-NAGEL, Düren).

MAGSILICA[®]

In dieser Arbeit wurde MAGSILICA[®] 50/85: FO018-10, der Firma EVONIK INDUSTRIES (Essen) erhalten. Vor Gebrauch wurden die Partikel in Wasser aufgeschlämmt und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Wasser im Vakuum entfernt und das MAGSILICA[®] im Vakuum getrocknet.

Induktives Heizen¹³⁶

Temperaturmessung:

Die Temperatur der induktiv geheizten Partikel wurde mit einem Infrarot-Digitalthermometer des Typs GIM 3590 optris LaserSight der Firma GREISINGER ELECTRONIC GMBH (Regenstauf) bestimmt. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurde die hintere Reaktorfläche mit einem schwarzen Lack abgedeckt. Der Emissionsfaktor wurde entsprechend auf 1.0 eingestellt.

Induktoren/Generatoren:

Zum induktiven Heizen der beschichteten Nanopartikel wurde der Generator EW5 mit einer Maximalleistung von 7.0 kW (IFF, Ismaning) verwendet. Das Gerät wurde mit Wasser gekühlt und war bei der verwendeten Frequenz stufenlos von 8 bis 25 kHz regulierbar. Es ließen sich Pulsweitenmodulationen von 100 bis 1000 Promille stufenlos einstellen, wobei Werte von 750 Promille nicht überschritten werden sollten. Zudem wurde ein mit Wasserkühlung betriebener Induktor mit der Seriennummer IS-0166 eingesetzt. Bei den Induktoren handelte es sich um Prototypen.

Polyacrylamidgelelektrophorese¹⁴⁸

Puffer und Lösungen:

10 x TBE-Puffer: 0.98 mol/L Tris, 0.98 mol/L Borsäure, 0.02 mol/L EDTA in Wasser;

Acrylamid-Lösung (16%): 4 g Acrylamid, 0.15 g Bisacrylamid, auf 25 mL mit Wasser auffüllen;

Auftragspuffer: 2 mol/L Succrose in 10 x TBE;

Fixier-Lösung: 40% Ethanol, 5% Essigsäure in Wasser;

Silbernitrat-Lösung: 1.6 mL Ammoniak (25%ig), 1 mL NaOH (2 mol/L), 0.6 g Silbernitrat auf 100 mL mit Wasser auffüllen;

Periodsäure-Lösung: 0.7 g Periodsäure auf 100 mL mit Fixier-Lösung auffüllen;

Formaldehydentwickler-Lösung: 100 mL Zitronensäure (240 µmol/L in Wasser), 135 µL Formaldehyd (37%);

Trockner-Lösung: 10% Glycerin, 20% Ethanol in Wasser.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Untersuchung der Abbauprodukte der Hyaluronsäure-Hydrogele verwendet. Dazu wurden Hydrogele analog zu der Beschreibung auf Seite 196 hergestellt und in einem 2 mL EPPENDORF-Reaktionsgefäß mit dem jeweiligen Puffer (1.5 mL) unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen mit der jeweiligen Menge an Hyaluronidase inkubiert (vergl Tabelle 15, Kapitel 5.3.4). Vom Überstand wurden täglich 5 µL entnommen und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

Dazu wurde die Acrylamid-Lösung (16%, 5.0 mL) mit 10 x TBE-Puffer (1.0 mL) und Wasser (4.0 mL) versetzt und durch Zugabe von APS-Lösung (10%, 150 µL) und

¹⁴⁸ Analog zu Silke Berski, Dissertation, Leibniz Universität Hannover 2008.

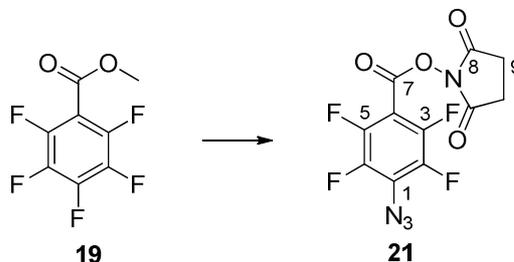
TEMED (12.5 μ L) polymerisiert. Der Analysat wurde im Verhältnis von 1:1 mit dem Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer für 14 Stunden bei 4 °C und 60 V durchgeführt.

Die Gele wurden mittels Silbernitratfärbung analysiert. Dazu wurde zunächst Alcinablau (0.5 g) mit Wasser (100.0 mL) versetzt und für 15 min bei 40 °C erwärmt. Die Lösung wurde filtriert und das Gel im Filtrat für 30 min gefärbt. Anschließend wurde mit Wasser bis zur Farblosigkeit des Überstands gespült. Es wurde in Fixier-Lösung (30-60 min), Periodsäure-Lösung (5 min), Wasser (drei Mal 15 min), Silbernitrat-Lösung (10 min), Wasser (3 x 10 min), Formaldehydentwickler-Lösung (1-3 min, bis zur deutlichen Färbung der Banden), Essigsäure (5%, 5 min) und Trockner-Lösung (30-60) inkubiert.

8.2 Synthesen

8.2.1 Synthesen literaturbekannter Substanzen

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **21**⁷⁵



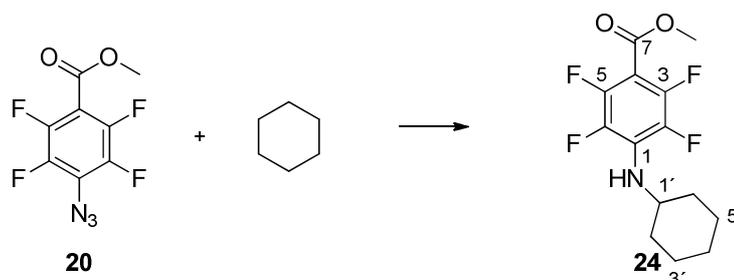
Zu einer Lösung von Methylpentafluorobenzoat **19** (1.0 g, 4.4 mmol, 1.0 Äq) in einer Mischung aus Wasser/Aceton (20.0 mL, 3/8) wurde Natriumazid (316.5 mg, 4.9 mmol, 1.1 Äq) gegeben und für 7.5 Stunden auf 85 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde drei Mal mit Petrolether extrahiert, die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Methyl 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **20** wurde in einer Ausbeute von 95% (1.05 g, 4.2 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

Methyl-4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **20** (200.0 mg, 803.2 µmol, 1.0 Äq) wurde mit 20%iger Natronlauge (0.3 mL) und Methanol (3.5 mL) versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 2 N Salzsäure auf pH<1 angesäuert und drei Mal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten, organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel des Filtrats entfernt. 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoessäure **16** wurde in einer Ausbeute von 98% (195.9 mg, 833.3 µmol) als farbloser Feststoff erhalten.

4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoessäure **16** (1.0 g, 4.3 mmol, 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (28.0 mL) gelöst und Dicyclocarbodiimid (895.5 mg, 4.3 mmol, 1.0 Äq) sowie *N*-Hydroxysuccinimid (489.7 mg, 4.3 mmol, 1.0 Äq) wurden zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 95/5) gereinigt. Es wurden 98% (1.4 mg, 4.2 mmol) von 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **21** als farbloser Feststoff erhalten.

Smp. = 113 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 2.91 (s, 4 H, 9-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 24.8 (s, C-9, C-10), 101.2 (q, C-4), 125.6 (q, C-1), 138.4, 141.0, 144.3, 146.9 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 154.4, 156.6 (q, C-8, C-11), 167.50 (q, C-7) ppm.

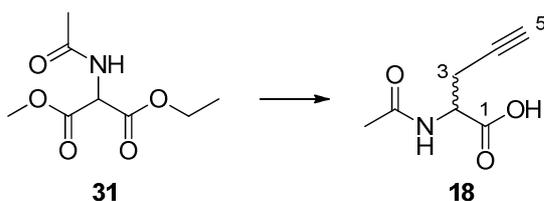
Methyl 4-(zyklohexylamino)-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **24**⁷⁵



Zur Durchführung einer Modellreaktion für die UV-vermittelte Insertion von Nitrenen in Kohlenwasserstoffgerüste, wurde 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoessäure methylester **20** (124.0 mg, 498.0 μmol) in Cyclohexan (100.0 mL) gelöst und in einen Quarzglaskolben unter Argonatmosphäre gegeben. Anschließend wurde für 4.5 Stunden mit einer Niederdruck Quecksilberlampe belichtet.

Der Überschuss an Cyclohexan wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Hexan 1/3 → 1/1) gereinigt. Es wurden 63.5 mg von 4-Cyclohexylamino-2,3,5,6-tetrafluoro-benzoessäuremethylester **24** (208.1 μmol, 41%) als farblose Kristalle erhalten.

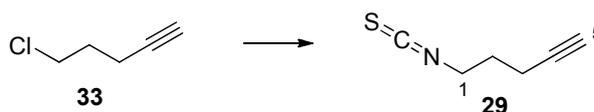
Smp. = 87 °C; **DC:** R_f (Dichlormethan/Hexan 1/2) = 0.18; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 1.15-1.29 (m, 3 H, 2'-H^a, 6'-H^a, 4'-H^a), 1.33-1.46 (m, 2 H, 3'-H^a, 5'-H^a), 1.63-1.72 (m, 1 H, 4'-H^b), 1.75-1.84 (m, 2 H, 3'-H^b, 5'-H^b), 2.02-2.11 (m, 2 H, 2'-H^b, 6'-H^b), 3.69 (m, 1 H, 1'-H), 3.93 (s, 3 H, 8-H), 4.02-4.11 (m, 1H, NH) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 24.8, 25.6 (s, C-2', C-3', C-5', C-6'), 34.7 (s, C-4'), 52.7 (p, C-8), 53.7 (t, C-1'), 130.8, 135.4, 137.9, 144.0, 145.5, 148.1, (q, C-1 bis C-6), 161.5 (q, C-7) ppm; **HR-MS:** C₁₄H₁₅F₄NNaO₂ [M+Na]⁺ berechnet: 328.0937, gefunden: 328.0944.

2-Acetamidopent-4-insäure **18**⁸⁴

Zu einer Lösung von Diethylacetamidomaleat **31** (10.0 g, 46.1 mmol, 1.0 Äq) in absolutem Dioxan (285.0 mL) wurde unter Argonatmosphäre Kalium-*tert.*-Butanolat (5.7 g, 50.7 mmol, 1.1 Äq) getropft und für 2.5 Stunden auf 60 °C erwärmt. Anschließend wurde Propargylbromid (80% in Toluol, 6.2 mL, 46.1 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde abfiltriert und der Rückstand mit Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit den Eluenten Petrolether/Essigsäureethylester 2/1 gereinigt. Es wurden 6.7 g (26.2 mmol, 57%) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

Diethyl-2-acetamido-2-(prop-2-yn-1-yl)malonat **32** (6.6 g, 25.9 mmol, 1.0 Äq) wurde in 10%iger Natronlauge (54.0 mL) gelöst und fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 6 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 angesäuert und eingeeengt. Die Lösung wurde für fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt, heiß über eine Celite/Aktivkohlemischung abfiltriert und der Rückstand mit viel Wasser gespült. Der pH-Wert des Filtrats wurde mit 10%iger Salzsäure auf pH = 3 eingestellt und die wässrige Lösung wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde entfernt, sodass 2-Acetamidopent-4-insäure **18** in einer Ausbeute von 50% (2.0 g, 12.8 mmol) als farbloser Feststoff erhalten werden konnte.

Smp. = 138-139 °C; **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO, DMSO = 2.50 ppm): δ = 1.86 (s, 3 H, Ac), 2.52- 2.60 (m, 2 H, 3-H), 2.88 (t, $J_{H,H}$ = 2.7 Hz, 1 H, 5-H), 4.26-4.39 (m, 1 H, 2-H), 8.26 (d, $J_{H,H}$ = 7.8 Hz, 1 H, NH), 12.82 (s^{br}, 1 H, CO₂H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, DMSO = 39.5 ppm): 21.2 (s, C-1'), 22.3 (p, C-1), 50.9 (t, C-4), 73.1 (t, C-3'), 80.5 (q, C-2'), 169.3 (q, C-2), 171.9 (q, C-5) ppm; **HR-MS**: C₇H₈NO₃ [M+H]⁺ berechnet: 157.0504, gefunden: 157.0502.

5-Isothiocyanato-1-pentin **29**⁸⁵

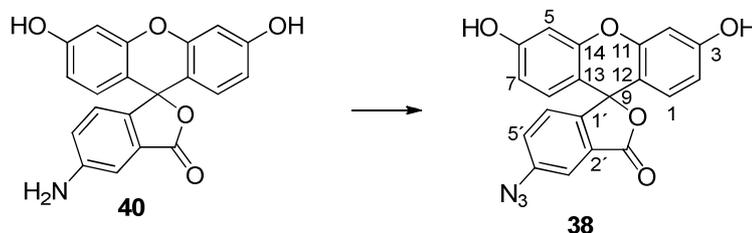
5-Chlor-1-pentin **33** (5.0 mL, 491.0 mg, 47.2 mmol, 1.0 Äq), Kaliumphthalimid (10.2 g, 55.1 mmol, 1.2 Äq) und Kaliumiodid (8.9 g, 53.6 mmol, 1.1 Äq) wurden in Dimethylformamid (25 mL) gelöst und für sechs Stunden auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und in Wasser gegeben. Dabei fiel ein farbloser Feststoff aus, der abfiltriert, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert wurde. Es wurden 92% (9.3 g, 43.4 mmol) von 2-(pent-4-in-1-yl) isoindolin-1,3-dion **34** als farbloser Feststoff erhalten.

2-(Pent-4-in-1-yl)-isoindolin-1,3-dion **34** (4.5 g, 21.1 mmol, 1.0 Äq) sowie eine 65%ige Hydrazin-Lösung (2.2 mL, 45.7 mmol, 2.2 Äq) wurden in Ethanol (70.0 mL) gegeben und zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser (15.0 mL) zugegeben und der dabei ausfallende Feststoff abfiltriert, mit Wasser gewaschen und verworfen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt. Dabei fiel erneut Feststoff aus, mit dem verfahren wurde wie zuvor beschrieben. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase bei 0 °C mit 10 M NaOH (15.0 mL) versetzt und mit Dichlormethan vier Mal extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Produkts konnten 34% von Pent-4-in-1-amin **35** (602.9 mg, 7.3 mmol) als farbloses Öl isoliert werden.

Pent-4-in-1-amin **35** (602.9 mg, 7.3 mmol, 1.0 Äq) sowie Triethylamin (2.0 mL, 1.5 g, 14.5 mmol, 2.0 Äq) wurden in Dichlormethan (20.0 mL) gelöst. Bei -20 °C wurde Triphosgen (553.1 µL, 834.0 mg, 7.3 mmol, 1.0 Äq) zugetropft, sodass die Innentemperatur nicht über -10 °C stieg. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über zwölf Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde fünf Mal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen wurden vier Mal mit Wasser gewaschen bis dieses farblos war. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** wurde in einer Ausbeute von 83% (750.0 mg, 6.0 mmol) als rotes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 1.90$ (quint, $J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2 H, 2-H), 2.02 (t, $J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, 1 H, 5-H), 2.37 (dt, $J_{\text{H,H}} = 6.4, 2.7$ Hz, 2 H, 3-H), 3.68 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, 2 H, 1-H) ppm.

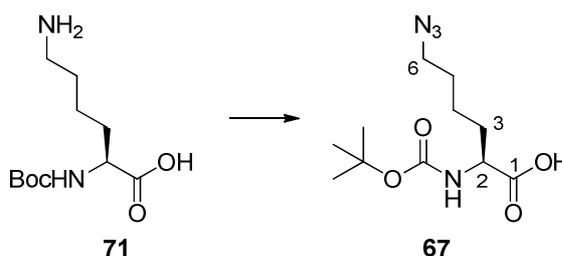
Azidofluorescein **38**⁸⁶



Fluoresceinamin **40** (200.0 mg, 576.2 μmol , 1.0 Äq) wurde in einer Mischung aus Dimethylformamid und Wasser (20.0 mL, 1/1) unter Lichtausschluss gelöst. Anschließend wurde Schwefelsäure (2.0 mL) und Amylnitrit (400.0 μL , 348.0 mg, 3.0 mmol, 5.2 Äq) zugegeben und für 30 min bei 0 °C gerührt. Es wurde Natriumazid (400.0 mg, 6.2 mmol, 10.7 Äq) in Wasser (8.0 mL) gelöst, zur Reaktionsmischung gegeben und weitere 45 min bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung auf eine Gesamtmenge von 40.0 mL aufgefüllt und der dabei entstandene Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit 1%iger (w/v), wässriger Natriumchlorid-Lösung gespült und im Vakuum getrocknet. Es wurden 58% von Azidofluorescein **38** (124.5 mg, 33.7 μmol) isoliert.

Smp. = Zersetzung über 165 °C; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, DMSO, DMSO = 2.50 ppm): $\delta = 6.53$ -6.63 (m, 4 H, 2-H, 4-H, 5-H, 7-H), 6.69 (d, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, 1-H, 8-H), 7.30 (d, $J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.51 (dd, $J_{\text{H,H}} = 8.2, 2.2$ Hz, 1 H, 5'-H), 7.64 (d, $J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, 1 H, 3'-H) ppm; **HR-MS**: $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 374.0777, gef: 374.0769, $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet: 372.0620, gefunden: 372.0621.

Boc-Lys(N_3)-OH **67**⁹⁶

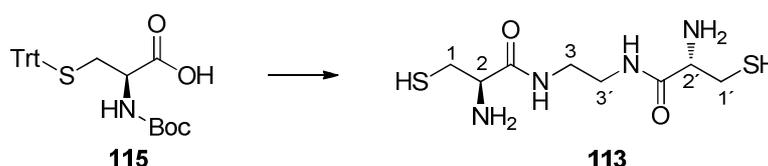


Trifluormethansulfonsäureanhydrid (359.0 μL , 2.2 mmol, 2.0 Äq) wurde langsam zu einer auf 0 $^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von Natriumazid (700.9 mg, 10.8 mmol, 10.0 Äq) in Wasser/Dichlormethan (1.7 mL/2.9 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten, organischen Phasen über Natriumcarbonat getrocknet. Das generierte Trifluormethansulfonsäureazid wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Boc-Lys-OH **71** (266.0 mg, 1.1 mmol, 1.0 Äq), Kaliumcarbonat (252.0 mg, 1.6 mmol, 1.5 Äq) und Kupfersulfat Pentahydrat (2.6 mg, 10.6 μmol , 0.01 Äq) wurden in Wasser/Methanol (3.5 mL/7.0 mL) gelöst und das Trifluormethansulfonsäureazid wurde vorsichtig zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie mit den Eluenten Dichlormethan/Methanol 95/5 gereinigt. Es wurden 269.9 mg (991.7 μmol , 92%) von Boc-Lys(N₃)-OH **67** als grünes Öl erhalten.

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95/5 + 2 Tropfen Essigsäure) = 0.35; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 1.38-1.51 (m, 11 H, Boc, 4-H), 1.54-1.74 (m, 3 H, 5-H, 3-H^a), 1.86 (m, 1 H, 3-H^b), 3.27 (t, $J_{\text{H,H}}$ = 6.83 Hz, 2 H, 6-H), 4.26 (m, 1 H, 2-H), 5.32 (s^{br}, 1 H, NH) ppm; **HR-MS:** C₁₁H₂₀N₄NaO₄ [M+Na]⁺ berechnet: 295.1382, gefunden: 295.1371.

NH₂-Cys-Ethylendiamin-Cys-NH₂ **113**¹³⁴



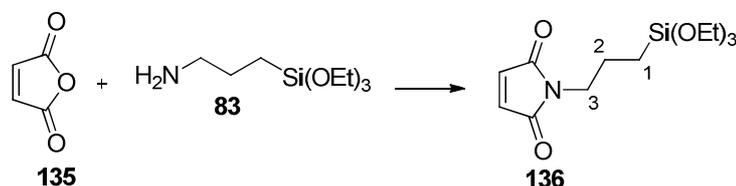
Unter Argonatmosphäre wurde Boc-Cys(Trt)-OH **115** (500 mg, 1.1 mmol, 2.4 Äq) in Dichlormethan (4.0 mL) gelöst und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid hydrochlorid (172.5 mg, 900 μmol , 2.0 Äq), 1-Hydroxybenzotriazol (121.4 mg, 900 μmol , 2.0 Äq), Di-*iso*-propylethylamin (485.5 μL , 2.7 mmol, 6.0 Äq) sowie Ethylendiamin (30.1 μL , 0.5 mmol, 1.0 Äq) wurden zugegeben. Nach zwölfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Dichlormethan verdünnt und mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck

entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) gereinigt. Es wurden 59% (253.2 mg, 266.4 μmol) des Boc-Cys(Trt)-Ethylendiamin-Cys(Trt)-Boc als farbloser Feststoff erhalten.

Boc-Cys(Trt)-Ethylendiamin-Cys(Trt)-Boc (100.0 mg, 105.2 μmol) wurde in einer Mischung aus Dichlormethan/Trifluoressigsäure/Tri-*iso*-propylsilylchlorid 50/47/3 (2.5 mL) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 0 °C kaltem Diethylether gegeben, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Dieser Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Diethylether gewaschen, in Methanol aufgenommen und erneut aus kaltem Diethylether gefällt. Es wurden 63% (17.7 mg, 66.5 μmol) von NH_2 -Cys-Ethylendiamin-Cys- NH_2 **113** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_3 = 3.31 ppm): δ = 2.95 (dd, $J_{\text{H,H}}$ = 14.7, 6.8 Hz, 2 H, 1- H^{a} , 1'- H^{a}), 3.05 (dd, $J_{\text{H,H}}$ = 14.7, 5.1 Hz, 2 H, 1- H^{b} , 1'- H^{b}), 3.33-3.54 (m, 4 H, 3-H, 3'-H), 3.96-4.01 (m, 2 H, 2-H, 2'-H) ppm.

1-(3-(triethoxysilyl)propyl)-1H-pyrrol-2,5-dion **136**¹⁴¹

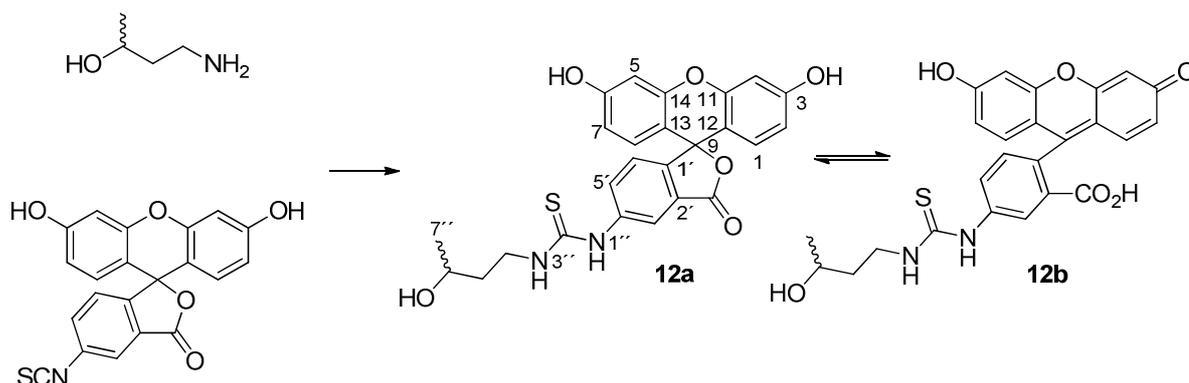


Maleinsäureanhydrid **135** (5.0 g, 51.0 mmol, 1.0 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in Toluol (23.0 mL) gelöst und 3-Aminopropyltriethoxysilan **83** (12.0 mL, 51.0 mmol, 1.0 Äq) in Toluol (16.0 mL) wurde binnen 15 Minuten bei Raumtemperatur zugetropft. Es wurde zwei Stunden bei gleicher Temperatur gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde mit Zinkchlorid (7.0 g, 51.0 mmol, 1.0 Äq) und nach 30 Minuten mit Hexamethyldisilazan (10.8 mL, 51.0 mmol, 1.0 Äq) in Toluol (16 mL) versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt und der Feststoff wurde abfiltriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluenten Dichlormethan/Methanol 95/5 gereinigt. Es wurden 2.3 g (7.6 mmol, 15%) von Maleimid **136** als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 0.53\text{-}0.63$ (m, 2 H, 1-H), 1.21 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 9 H, CH_2CH_3), 1.60-1.78 (m, 2 H, 2-H), 3.51 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2 H, 3-H), 3.80 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 6.67 (s, 2 H, CH) ppm, **HR-MS**: $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NnaO}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 324.1243, gefunden: 324.1412.

8.2.2 Synthesen neuer Verbindungen

Fluorescein mit sekundärem Alkohol **12**

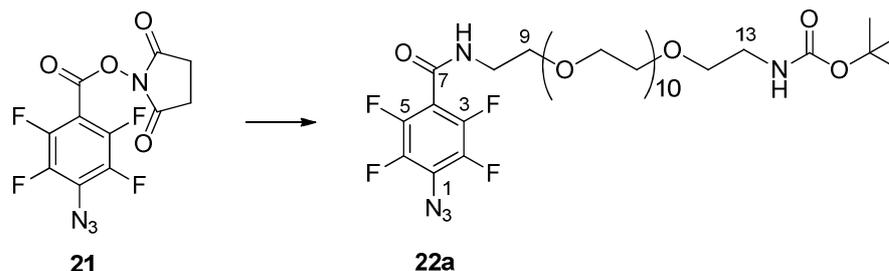


Fluoresceinisothiocyanat (58.0 mg, 149.1 μmol , 1.0 Äq) wurde in Dimethylformamid (600.0 μL) gelöst und 4-Aminobutanol (28 μL , 298.2 μmol , 2.0 Äq) wurde hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0 °C kaltem Acetonitril (6.0 mL) beendet. Der ausfallende Feststoff wurde fünf Minuten bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wurde anschließend in 5%iger, wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (7.0 mL) gelöst. Es wurde solange HCl (1 M) zugegeben bis das Produkt erneut ausgefallen war und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt werden konnte. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurde Produkt **12** in einer Ausbeute von 67% (47.6 mg, 99.6 μmol) als roter Feststoff erhalten.

Smp.= Zersetzung <140 °C; **DC**: R_f (Chloroform/Methanol 9/1) = 0.09; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO-}d_5 = 2.50$ ppm): $\delta = 1.10$ (d, $J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 3 H, 7''-H), 1.52-1.72 (m, 2 H, 5''-H), 3.53-3.62 (m, 2 H, 4''-H), 3.71 (sext, $J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 1 H, 6''-H), 6.53-6.71 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 4-H, 5-H, 7-H, 8-H), 7.17 (d, 1 H, $J_{\text{H,H}} = 8.2$ Hz, 5'-H), 7.71-7.80 (m, 1 H, 6'-H), 8.14 (s^{br} , 1 H, 1''-H oder 3''-H), 8.24-8.30 (m, 1 H, 3'-H), 10.07, 10.14 (s^{br} , 2 H, 1''-H oder 3''-H und CO_2H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO-}d_6 = 39.52$ ppm): $\delta = 23.8$ (p, C-7''), 37.6 (s, C-5''), 41.5 (s, C-4''), 64.3 (t, C-6''), 102.2 (t, C-4'), 109.7 (q, C-12), 112.6 (t, C-2), 116.3 (t, C-3'), 124.0 (t,

C-5'), 126.5 (q, C-2'), 129.1 (t, C-1), 129.5 (t, C-6'), 141.4 (q, C-1'), 151.9 (q, C-11), 159.5 (q, C-3), 168.6 (q, CO₂H), 180.4 (q, C-2''), Die Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten. Die Signale für C-1', C-4' und C-9 konnten nicht zugeordnet werden;¹⁴⁹ **HR-MS**: C₂₅H₂₃N₂O₆S [M+H]⁺ berechnet: 479.1277, gefunden: 479.1279.

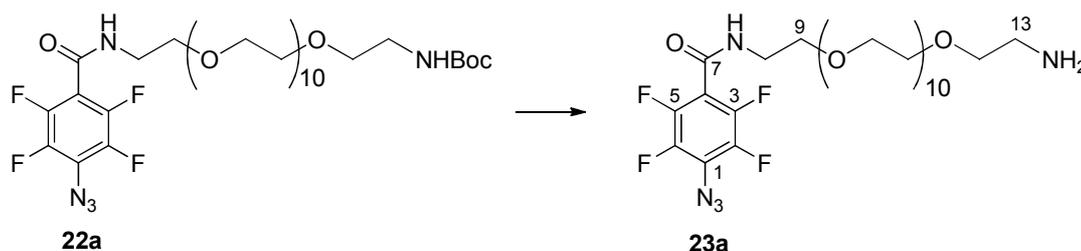
PFPA-PEG₁₂-NHBoc **22a**



NH₂-PEG₁₂-NHBoc (265.0 mg, 412.5 μmol, 1.0 Äq) und 4-Azidotetrafluorobenzoessäure-*N*-succinimidylester **21** (164.0 mg, 495.0 μmol, 1.2 Äq) wurden in Chloroform (20 mL) gelöst und für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels SephadexTM-Säulenchromatographie (Methanol) gereinigt. PFPA-PEG₁₂-NHBoc **22a** wurde in einer Ausbeute von 92% (326.9 mg, 380.4 μmol) als farbloses Öl erhalten.

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95/5) = 0.21; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 1.43 (s, 9 H, Boc), 3.15-3.96 (m, 48 H, 8-H bis 13-H), 5.04 (s^{br}, 1 H, NH), 6.96 (s, 1 H, NH) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 27.5 (p, Boc), 39.2, 39.5 (s, C-8, C-13), 68.5-69.7 (s, C-9 bis C-12), 78.2 (q, Boc), 111.2 (q, C-4), 120.6 (q, C-1), 138.3, 140.7, 141.9, 144.4 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 155.3, 156.9 (q, C-7, Boc) ppm; **HR-MS**: C₃₆H₅₉F₄N₅NaO₁₃ [M+Na]⁺ berechnet: 884.3892, gefunden: 884.3885.

PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a**

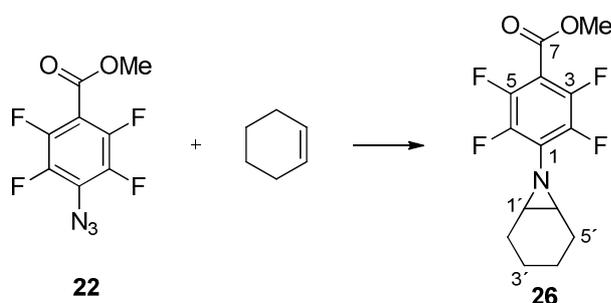


¹⁴⁹ U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, A. Piischl, K. Schaumburg, *Struct. Chem.* **1995**, 6, 161-165.

Zu einer Lösung von PFPA-PEG₁₂-NH₂Boc **22a** (666.2 mg, 772.9 μmol, 1.0 Äq) in Essigsäureethylester (15.0 mL) wurde langsam wässrige Salzsäure (10%, 10.0 mL) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, sodass PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** als farbloses Öl in einer Ausbeute von 98% (576.6 mg, 757.39 μmol) erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 3.19-3.87 (m, 48 H, 8-H bis 13-H), 6.26 (s^{br}, 1 H, NH), 7.89 (s^{br}, 2 H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 40.0, 40.4 (s, C-8, C-13), 66.9-70.5 (s, C-9 bis C-12), 112.4 (q, C-4), 121.3 (q, C-1), 139.2, 141.8, 142.8, 145.3 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 158.3 (q, C-7) ppm; **HR-MS**: C₃₁H₅₂F₄N₅O₁₂ [M+H]⁺berechnet: 762.3549, gefunden: 762.3550.

Methyl 4-(7-azabicyclo[4.1.0]heptan-7-yl)-2,3,5,6-tetrafluorobenzoat **26**



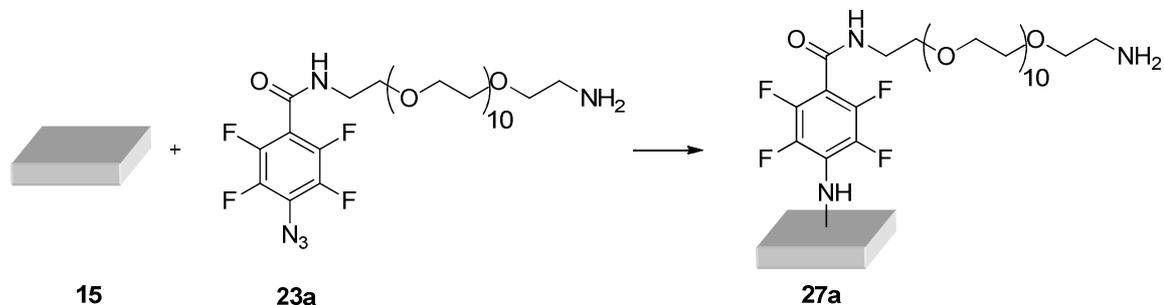
Zur Durchführung einer UV-vermittelten Modelreaktion zwischen Nitrenen und ungesättigten Kohlenwasserstoffen, wurde 4-Azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoensäuremethylester **22** (62.0 mg, 249.0 μmol) in Cyclohexen (50.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde in einem Quarzglas Kolben für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, während sie mit einer Niederdruck Quecksilberlampe belichtet wurde.

Der Überschuss an Cyclohexen wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Petrolether 1/3) gereinigt. Es wurden 35.8 mg von 4-Cyclohexylamino-2,3,5,6-tetrafluoro-benzoensäuremethylester **26** (118.1 μmol, 47%) als farblose Kristalle erhalten.

Smp. = 60-65 °C; **DC**: R_f (Dichlormethan/Hexan 1/3) = 0.17; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 1.26-1.39 (m, 2 H, 3'-H^a, 4'-H^a), 1.45-1.58 (m, 2 H, 3'-H^b, 4'-H^b), 1.86-1.97 (m, 2 H, 2'-H^a, 5'-H^a), 2.06-2.18 (m, 2 H, 2'-H^b, 5'-H^b), 2.56-2.61 (m, 2 H, 1'-H, 6'-H), 3.92 (s, 2 H, 8-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 20.0 (s, C-3', C-4'), 23.7 (s, C-2', C-5'), 41.6 (t, C-1', C-6'), 53.0 (p, C-8), 127.6 (q, C-4), 131.8 (q, C-1), 139.96, 142.4, 144.5, 147.0 (q, C-2, C-3,

C-5, C-6), 161.1 (q, C-7) ppm; **HR-MS**: $C_{14}H_{13}F_4NNaO_2$ $[M+Na]^+$ berechnet: 326.0780, gefunden: 326.0775.

PMP-Derivat 27a

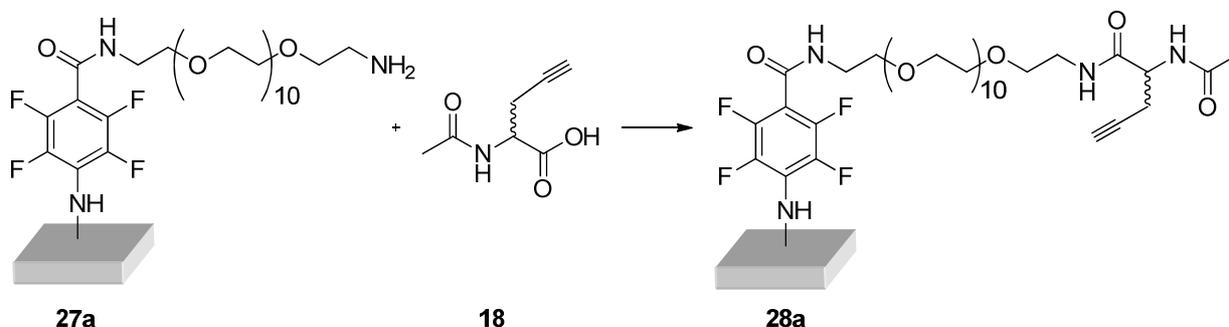


Die Plasma-behandelten oder nicht Plasma-behandelten PMP-Folien **15** wurden in einer Lösung von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** in Methanol ($c = 10$ mg/mL) für zwölf Stunden bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die benetzten Membranen wurden im Vakuum getrocknet und in Quarzglasröhrchen gelegt. Anschließend erfolgte eine dreistündige Belichtung mit einer Niederdruck-Quecksilberlampe. Währenddessen wurde das Quarzröhrchen evakuiert (0.05 mbar) und mehrmals gedreht, sodass die Folien gleichmäßig belichtet wurden. Anschließend wurden die Folien mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gespült und im Vakuum getrocknet.

Die Analyse der beschichteten Folien erfolgte mittels XP-Spektroskopie (Kapitel 3.5).

PMP-Derivat **27b** wurde in gleicher Weise aus Plasma-behandelten oder nicht Plasma-behandelten PMP-Folien **15** und Linker PFPA-PEG_n-NH₂ **27b** mit einer größeren Kettenlänge hergestellt.

PMP-Derivat 28a

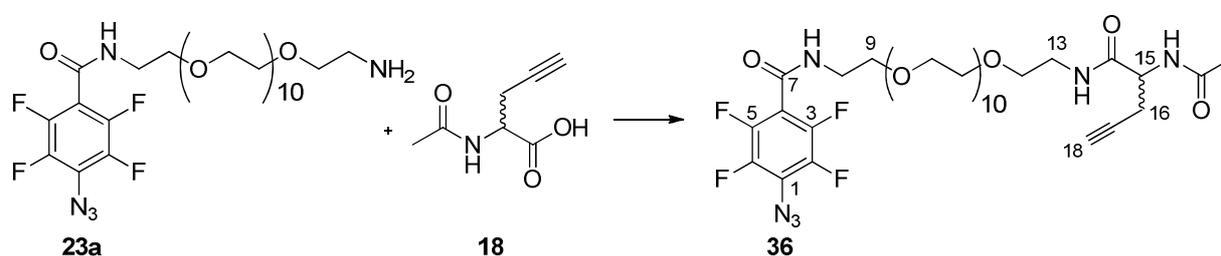


2-Acetamino-4-pentynsäure **18** (20.5 mg, 131.4 μ mol, 1.0 Äq),
N-Hydroxysuccinimid (30.4 mg, 264.4 μ mol, 2.0 Äq), Dicyclocarbodiimid (54.6 mg,

264.4 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$), und Di-*iso*-propylethylamin (112.4 μL , 661.1 μmol , 5.0 $\text{\AA}q$) wurden unter Argonatmosphäre in Dimethylformamid (30.0 mL) gelöst. Die derivatisierten PMP-Folien wurden zu der Reaktionsmischung gegeben und die Lösung wurde für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Folien mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Kupplung zwischen 2-Acetamino-4-pentylsäure **18** und PMP-Derivat **27b** wurde in gleicher Weise durchgeführt.

PFPA-Derivat **36**

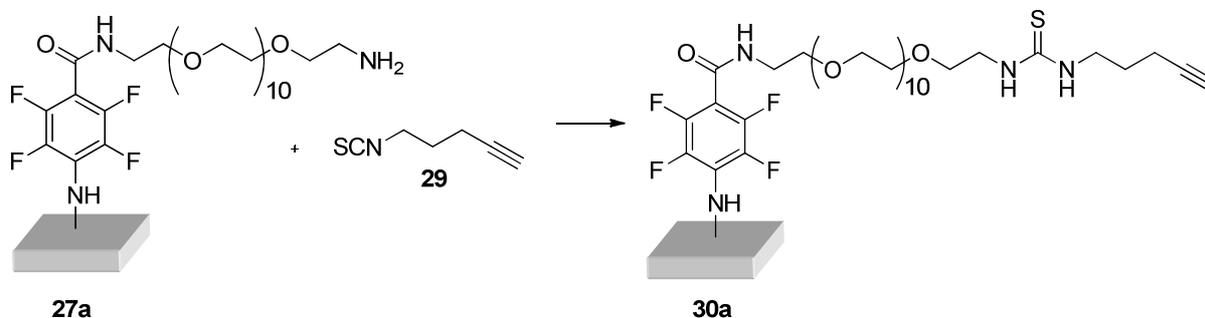


PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** (20.00 mg, 26.27 μmol , 1.00 $\text{\AA}q$) und 2-Acetamino-4-pentyl säure **18** (4.10 mg, 26.27 μmol , 1.00 $\text{\AA}q$) wurden unter Argonatmosphäre in Dimethylformamid (1.0 mL) gelöst. Anschließend wurde *N*-Hydroxysuccinimid (6.0 mg, 52.5 μmol , 2.00 $\text{\AA}q$), Dicyclocarbodiimid (10.8 mg, 52.5 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$) und *N,N*-Di-*iso*-propylethylamin (22.3 μL , 131,4 μmol , 5.0 $\text{\AA}q$) zugegeben und die Reaktionslösung für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan/Methanol 95/5) gereinigt. Das Produkt **36** wurde als farbloses Öl in einer Ausbeute von 61% (14.5 mg, 16.1 μmol) erhalten.

DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95/5) = 0.24; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 2.03 (s, 3 H, Ac), 2.14 (t, $J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1 H, 18-H), 2.60 (ddd, $J_{\text{H,H}} = 16.0, 5.5, 2.5$ Hz, 1 H 16-H^a), 2.75 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 16.0, 3.8, 2.5$ Hz, 1 H, 18-H^b), 3.39-3.85 (m, 48 H, 8-H bis 13-H), 4.50-4.56 (m, 1 H, 15-H), 6.61 (d, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 1 H, NH), 6.94-7.01 (s^{br}, 1 H, NH) 7.18 (s^{br}, 1 H, NH) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 22.8 (p, Ac), 23.4 (s, C-16), 39.7, 40.17 (s, C-8, C-13), 51.7 (s, C-15), 69.6-71.9 (s, C-9 bis C-12), 79.7 (q, C-17), 112.1 (q, C-4), 121.6 (q, C-1), 139.2, 141.8, 142.9, 145.4 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 158.0 (q, C-7),

169.9, 170.2 (q, C-14, Ac) ppm; **HR-MS**: $C_{38}H_{58}F_4N_6NaO_{14}$ $[M+Na]^+$ berechnet: 921.3845, gefunden: 921.3840.

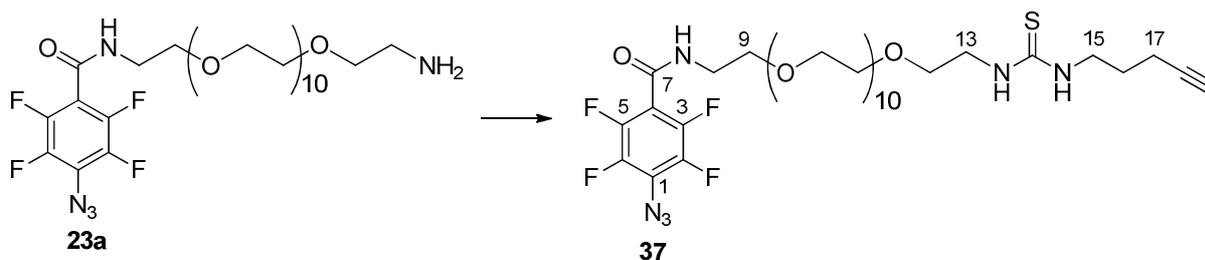
PMP-Derivat 30a



5-Isothiocyanato-1-pentin **29** (32.8 mg, 262.3 μ mol, 1.0 Äq) und Di-*iso*-propylethylamin (130.0 μ L, 787.0 μ mol, 3.0 Äq) wurden in Dichlormethan (20.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Die derivatisierten PMP-Folien **30a** wurden zu der Reaktionsmischung gegeben und die Lösung wurde für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Folien mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Kupplung zwischen 5-Isothiocyanato-1-pentin **29** und PMP-Derivat **27b** wurde in gleicher Weise durchgeführt.

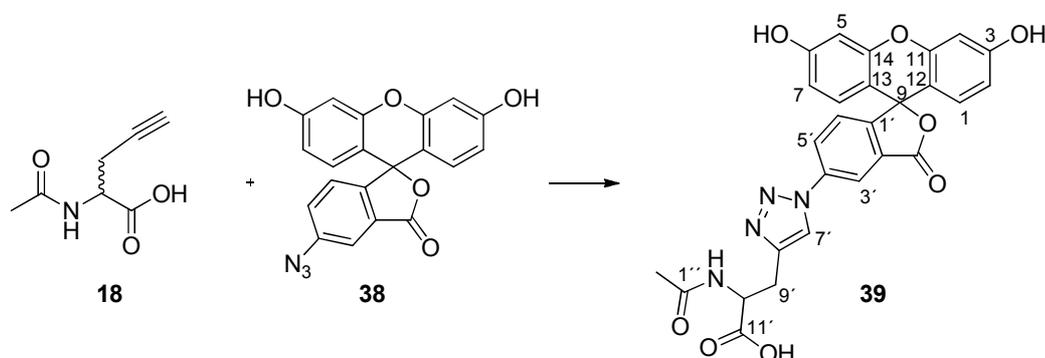
PFPA-Derivat 37



Zu einer Lösung von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** (20 mg, 26.3 μ mol, 1.0 Äq) in Dichlormethan (2.0 mL) wurden 3-Isothiocyanatopropan-1-amin (3.28 mg, 26.3 μ mol, 1.0 Äq) und Di-*iso*-propylethylamin (13.4 μ L, 10.2 mg, 78.8 μ mol, 3.0 Äq) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, das Dichlormethan im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 95/5) gereinigt. PFPA-Derivat **37** wurde in einer Ausbeute von 86% (20.0 mg, 22.6 μ mol) als farbloses Öl erhalten.

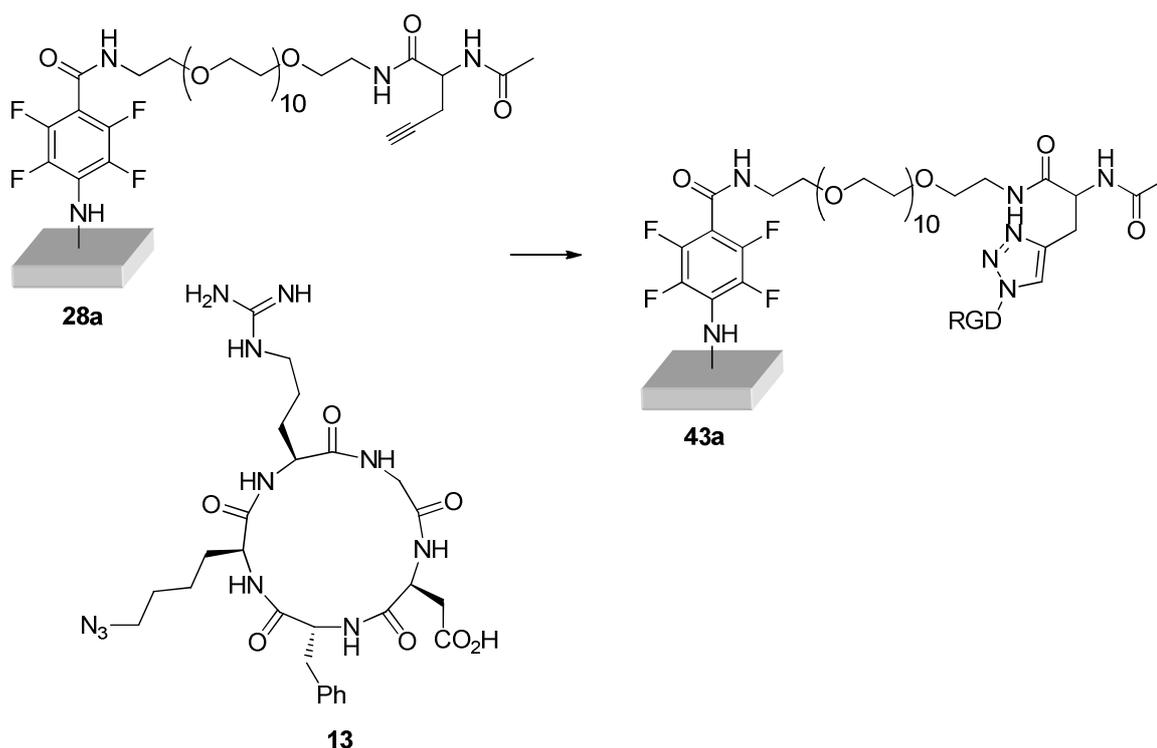
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 95/1) = 0.26; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , CHCl_3 = 7.26 ppm): δ = 1.81 (quint, $J_{\text{H,H}}$ = 7.0 Hz, 2 H, 16-H), 2.00 (t, $J_{\text{H,H}}$ = 2.5 Hz, 1 H, 19-H), 2.26 (dt, $J_{\text{H,H}}$ = 7.0, 2.5 Hz, 2 H, 17-H), 3.20-3.94 (m, 50 H, 8-H bis 13-H, 15-H), 6.71 (s^{br} , 2 H, NH), 7.11 (s^{br} , 1 H, NH) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CHCl_3 , CDCl_3 = 77.2 ppm): δ = 16.2 (s, C-17), 28.1 (s, C-16), 40.3 (s, C-8, C-13), 44.8 (s, C-15), 69.3-70.6 (s, C-9 bis C-12, C-19), 83.7 (q, C-18), 112.0 (q, C-4), 121.7 (q, C-1), 139.2, 141.7, 142.9, 145.3 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 157.9 (q, C-7), 183.2 (q, C-14); **HR-MS:** $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{F}_4\text{N}_5\text{O}_{15}$ $[\text{M-H}]^-$ berechnet: 874.3709, gefunden: 874.3704, $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M+H}]^+$ berechnet: 887.3848, gefunden: 887.3843.

Fluorescein-Derivat 39



N,N-Di-*iso*-propylethylamin (10.00 μL , 1% in Methanol) wurde zu einer Lösung von Azidofluorescein **38** (4.2 mg, 26.8 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) und 2-Acetylaminopent-4-ynsäure **18** (10.0 mg, 26.8 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) in Methanol (1.0 mL) unter Argonatmosphäre gegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung dreimal mittels *freeze-pump-thraw*-Verfahren entgast und Kupfer(I)iodid (0.5 mg, 2.7 mmol, 0.1 $\text{\AA}q$) zugegeben. Die Mischung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan/Methanol 93/7 \rightarrow 85/15 \rightarrow 75/25 \rightarrow 60/40) gereinigt. Fluorescein-Derivat **39** wurde als hochviskoses, rotes Öl in einer Ausbeute von 72% (10.2 mg, 19.3 μmol) erhalten.

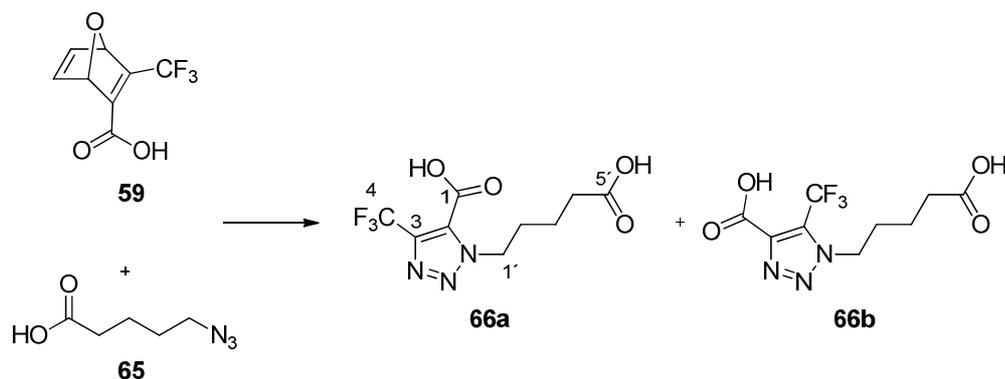
DC: R_f (Dichlormethan/Methanol 9.5/1) = 0.45; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, D_2O , HDO = 4.79 ppm): δ = 2.00 (s, 3 H, 2''-H), 3.10-3.48 (m, 2 H, 9'-H), 4.58-4.60 (m, 1 H, 10'-H), 6.62-6.79 (m, 4 H, 2-H, 7-H, 1-H, 8-H), 7.21-7.34 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 7.48-7.59 (m, 1 H, 3'-H), 7.94-8.06 (m, 1 H, 5'-H), 8.16-8.28 (m, 1 H, 6'-H), 8.44 (s, 1 H, 7'-H) ppm; das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden.

PMP-Derivat **43a**

Zur Durchführung der Kupfer-katalysierten 1,3-dipolaren Zyклоaddition wurde zunächst $c[\text{RGDfK}(\text{N}_3)]$ **13** (3.0 mg, 4.8 μmol) in Wasser (20.0 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend wurde Di-*iso*-propylethylamin (10.0 μL , 1% in Wasser) zugegeben und die Reaktionslösung dreimal mittels *freeze-pump-thraw* Verfahren entgast. Kupfer(I)iodide (0.1 mg, 0.5 μmol , 0.1 \AA q) und das modifizierte PMP-Derivat **28a** wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die PMP-Folien **43a** aus der Lösung entfernt, mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Kupplung zwischen $c[\text{RGDfK}(\text{N}_3)]$ **13** und PMP-Derivat **28b** wurde in gleicher Weise durchgeführt. Die Ligation von Azidofluorescein **38** an beide PMP-Derivate wurde ebenfalls mit dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zur photometrischen Untersuchung (Kapitel 3) wurde die Reaktion zum Fluorescein-gebundenem PMP drei Mal durchgeführt, wobei identische Absorptionsspektren erhalten wurden.

1-(4-Carboxybutyl)-4-(trifluoromethyl)-1H-1,2,3-triazole-5-Carbonsäure **66a** und 1-(4-Carboxybutyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-Carbonsäure **66b**

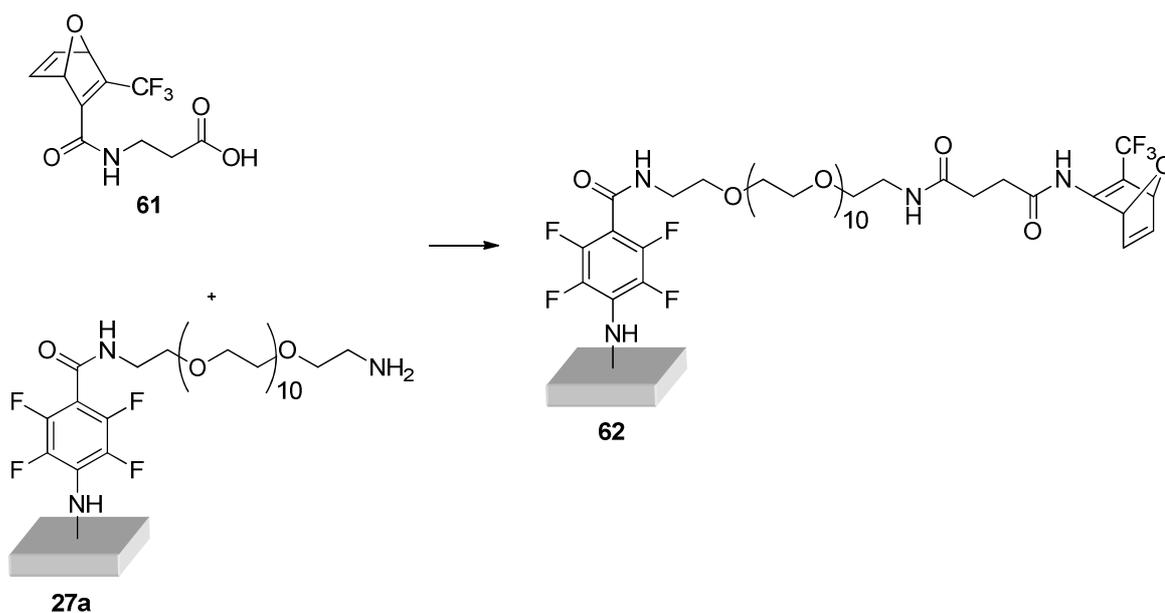


Als Modelreaktion für die Kupfer-freie 1,3-dipolare Zyклоaddition wurden Oxanorbornadien **59** (40.0 mg, 194.2 μmol , 1.0 Äq) und 5-Azidopentansäure **65** (27.8 mg, 194.2 μmol , 1.0 Äq) in Methanol (3.0 mL) gelöst und zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die zwei Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC (C18-P_[A]) (H₂O 95:5 {5 min}, 95:5→9:10 {5 min}, 90:10→70:30 {20 min}, 70:30→50:50 {20 min}, 50:50→0:100 {10 min}, 4 mL/min → 5 mL/min) getrennt. Isomer **66a** wurde bei einer Retentionszeit von $t_R = 42\text{-}44$ min in 22% Ausbeute (12.1 mg, 43.05 μmol) und Isomer **66b** nach $t_R = 55\text{-}56$ min in 32% Ausbeute (12.1 mg, 43.1 μmol) erhalten. Beide Diastereomere waren farblose Öle.

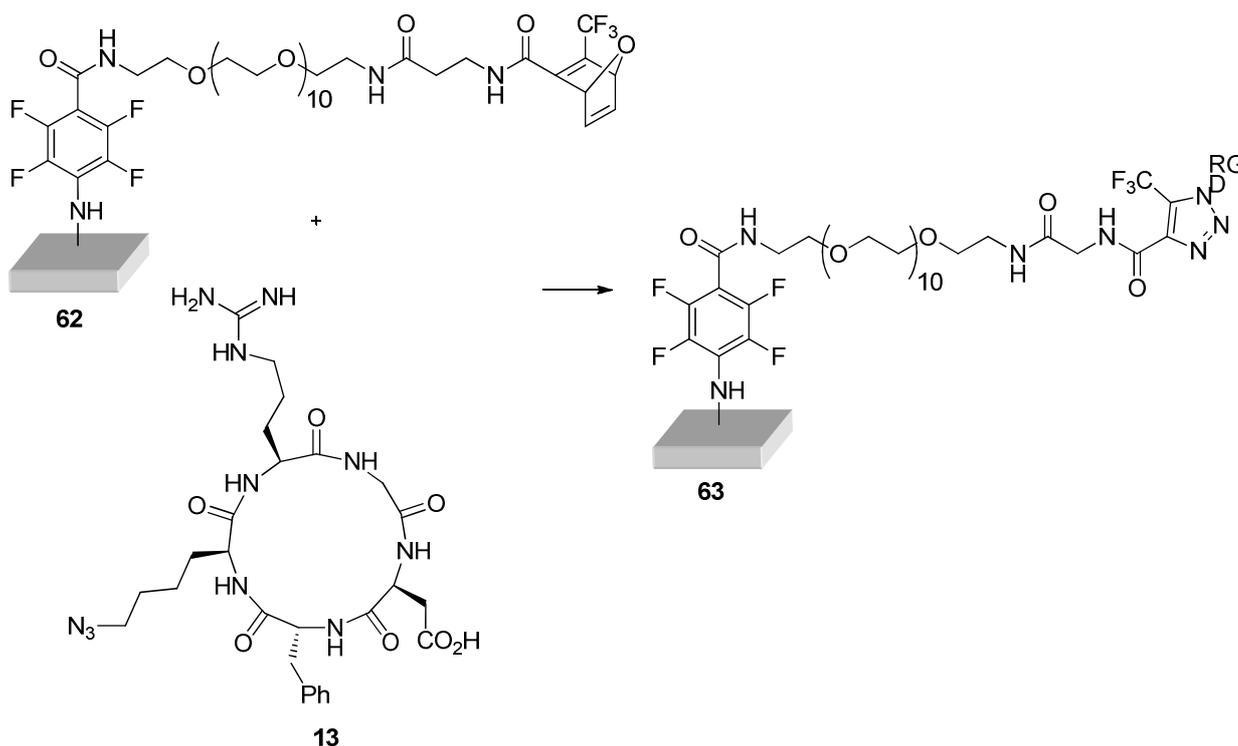
HR-MS: C₉H₉F₃N₃O₄ [M-H]⁻ berechnet: 280.0545, gefunden: 280.0541;

66a: ¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₃ = 3.31 ppm): $\delta = 1.69$ (quint, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 3'-H), 2.03 (quint, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 2'-H), 2.40 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 4'-H), 4.83 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 1'-H) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.0 ppm): $\delta = 22.8$ (s, C-3'), 30.6 (s, C-2'), 34.0 (s, C-4'), 51.8 (s, C-1'), 121.6 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 268.0$ Hz, C-4), 129.9 (q, C-2), 140.0 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 39.8$ Hz, C-3), 159.3 (q, C-1), 176.9 (q, C-5') ppm;

66b: ¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₃ = 3.3 ppm): $\delta = 1.70$ (quint, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 3'-H), 2.03 (quint, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 2'-H), 2.41 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 4'-H), 4.70 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, 1'-H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.0 ppm): $\delta = 22.7$ (s, C-3'), 30.5 (s, C-2'), 33.9 (s, C-4'), 52.6 (s, quart, $J_{\text{C,F}} = 2.7$ Hz, C-1'), 120.9 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 269.7$ Hz, C-4), 129.5 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 42.3$ Hz, C-3), 140.9 (q, C-2), 161.7 (q, C-1), 176.8 (q, C-5') ppm.

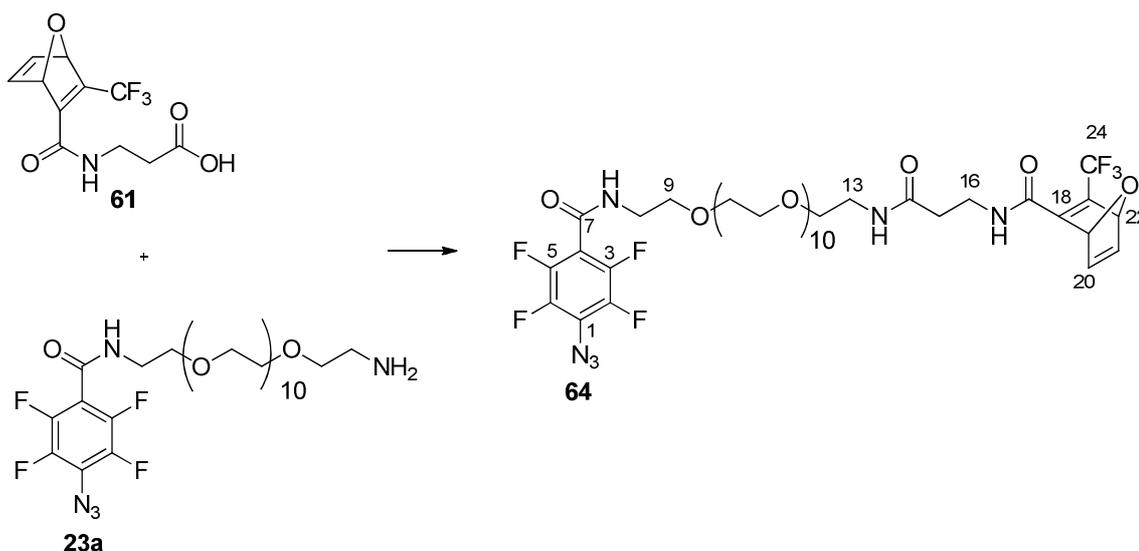
PMP-Derivat 62

Oxanorbornadien **61** (16.6 mg, 65.7 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), *N*-Hydroxysuccinimid (15.1 mg, 131.4 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$), Dicyclocarbodiimid (27.1 mg, 131.4 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$), und Di-*iso*-propylethylamin (55.8 μL , 328.4 μmol , 5.0 $\text{\AA}q$) wurden unter Argonatmosphäre in Dimethylformamid (15.0 mL) gelöst. Die PMP-Folien **27a** wurden zur Reaktionsmischung gegeben und diese wurde für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Folien mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

PMP-Derivat 63

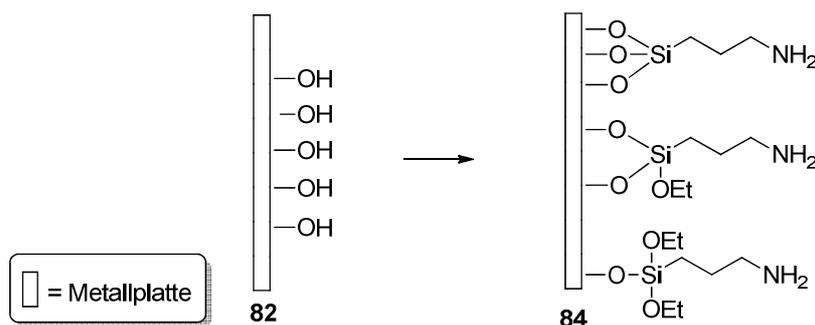
Zur Durchführung der Kupfer-freien 1,3-dipolaren Zykoaddition/retro-DIELS-ALDER Reaktion wurde zunächst c[RGDfK(N₃)] **13** (1.5 mg, 2.4 μmol) in Wasser (10.0 mL) gelöst und die Reaktionslösung wurde für drei Tage bei Raumtempertur inkubiert. Die PMP-Folien wurden aus der Lösung entfernt, mit Wasser, *iso*-Propanol und Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Ligation von Azidofluorescein **38** an PMP-Derivat **62** wurde ebenfalls mit dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zur photometrischen Untersuchung (Kapitel 3) wurde die Reaktion zum Fluorescein-gebundenem PMP drei Mal durchgeführt, wobei identische Absorptionsspektren erhalten wurden.

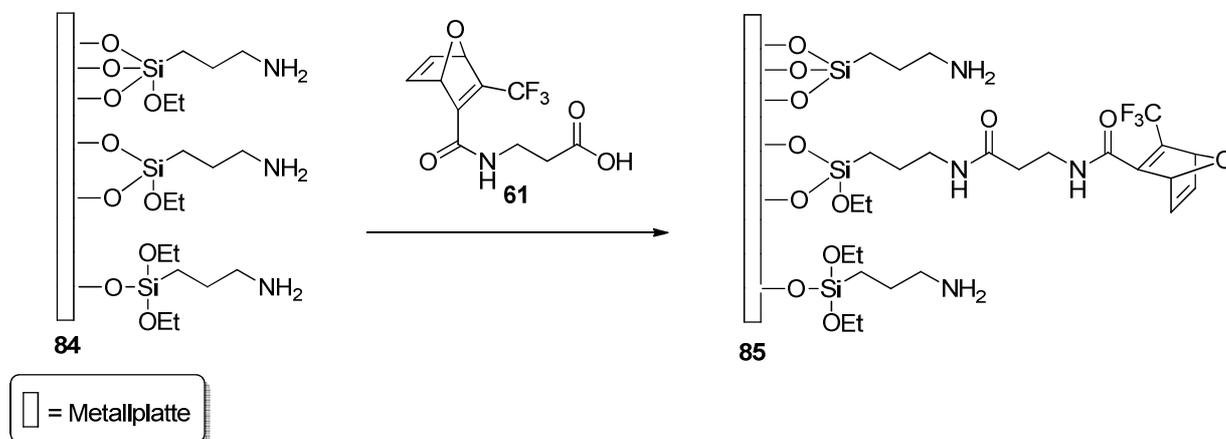
PFPA-Derivat **64**

Das Oxanorbornadien **61** (14.6 mg, 52.5 μmol , 1.0 Äq) wurde zu einer Lösung von PFPA-PEG₁₂-NH₂ **23a** (40.0 mg, 52.5 μmol , 1.0 Äq) in Dimethylformamid (2.0 mL) gegeben. Anschließend wurden *N*-Hydroxysuccinimid (12.1 mg, 105.1 μmol , 2.0 Äq), Dicyclocarbodiimid (21.7 mg, 105.1 μmol , 2.0 Äq) und *N,N*-Di-isopropylethylamin (43.4 μL , 262.7 μmol , 5.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, der Feststoff verworfen und das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SepadexTM-Kieselgel (Eluent: Methanol) gereinigt. PFPA-Derivat **64** wurde in Form farbloser Kristalle in einer Ausbeute von 60 % (32.1 mg, 31.3 μmol) erhalten.

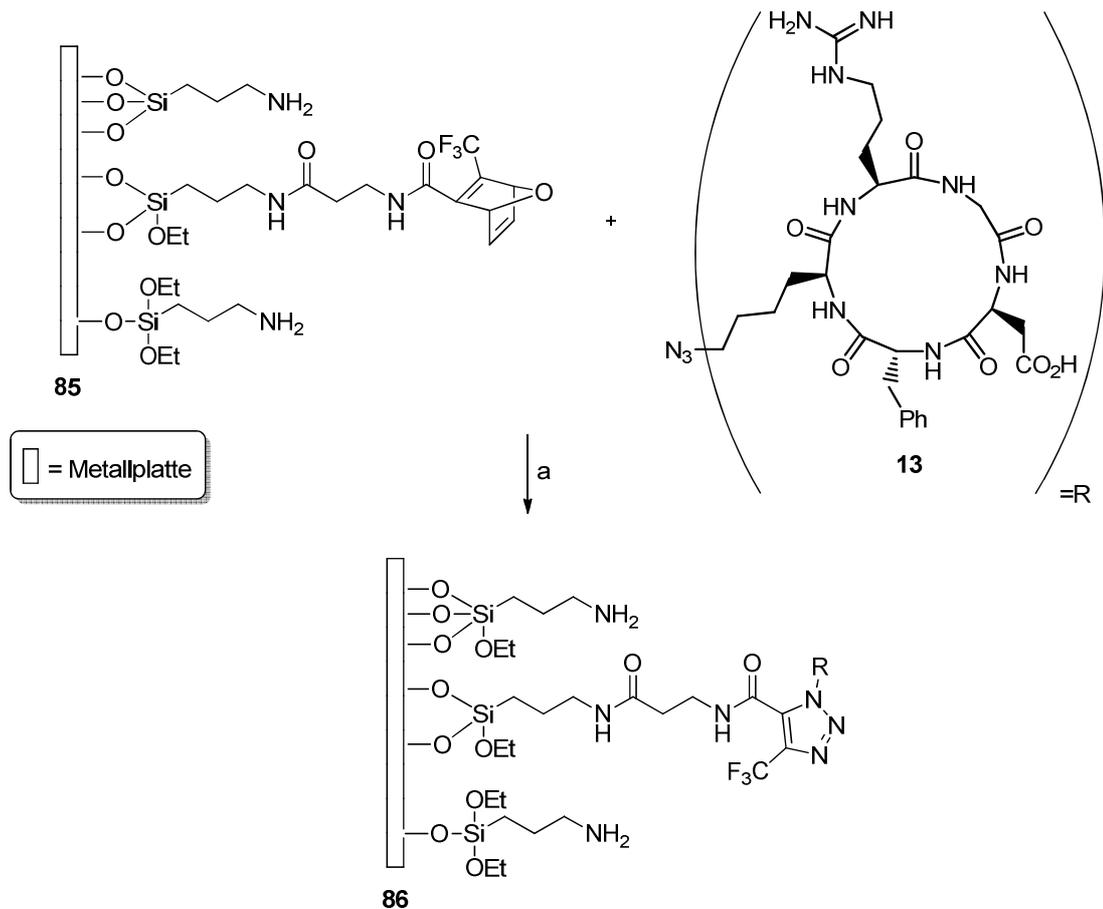
Smp.= Zersetzung >140 °C; **DC:** R_f (Dichlormethan/Methanol 9.5/1) = 0.5; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 2.48 (t, 2 H, $J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, 15-H), 3.39-3.69 (m, 50 H, 8-H bis 13-H und 16-H), 6.78 (s^{br}, 2 H, NH), 7.19 (s^{br}, 1 H, NH), 7.85-7.80 (m, 4 H, 19-H bis 22-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ = 35.1 (s, C-16), 36.0 (s, C-15), 39.3, 40.3 (s, C-8, C-13), 69.8-70.9 (s, C-9 bis C-12), 101.8 (q, C-4), 116.8 (q, quart, $J_{\text{C,F}}$ = 37.2 Hz, C-23), 118.6 (q, quart, $J_{\text{C,F}}$ = 19.6 Hz, C-18), 120.7 (q, C-1), 120.8 (q, quart, $J_{\text{C,F}}$ = 122.4 Hz, C-24), 126.0, 134.2 (t, C-19, C-22), 140.2, 142.5, 144.5, 145.2 (q, C-2, C-3, C-5, C-6), 144.8 (t, quart, $J_{\text{C,F}}$ = 6.6 Hz, C-21) 146.9 (t, C-20), 157.3, 160.5 (q, C-7, C-17), 172.0 (q, C-14) ppm; **HR-MS:** C₄₂H₆₀F₇N₆O₁₅ [M+H]⁺ berechnet: 1021.4005, gefunden: 1021.3970, C₄₂H₅₉F₇N₆NaO₁₅ [M+Na]⁺ berechnet: 1043.3824, gefunden: 1043.3837.

Silanisierte Metalloberflächen **84**

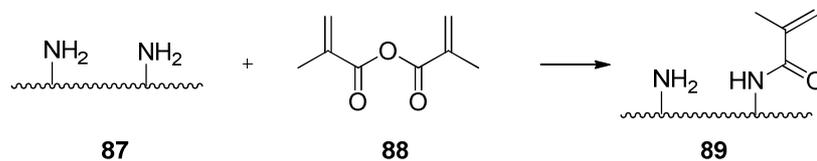
Die Formiergasplasma-behandelten Metallplatten wurde ohne weitere Reinigung unter Argonatmosphäre in eine Lösung aus 3-Aminopropyltriethoxysilan **83** (2.0 mL) in absolutem Toluol (50.0 mL) gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zwölf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Dabei wurde auf Rühren verzichtet, da dies ein gegenseitiges Beschädigen der Metallplatten zur Folge haben würde. Anschließend wurden die Metallplatten aus der Reaktionslösung entnommen und mit Toluol gespült.

Oxanorbornadien funktionalisierte Metalloberflächen **85**

Unter Argonatmosphäre wurde Oxanorbornadien **61** (7.0 mg, 25.3 μmol , 1.0 \AA q) in absolutem Dimethylformamid (10.0 mL) gelöst. Dazu wurden Dicyclocarbodiimid (7.8 mg, 37.9 μmol , 1.5 \AA q), *N*-Hydroxysuccinimid (4.4 mg, 37.9 μmol , 1.5 \AA q) und Di-*iso*-propylethylamin (31.7 mg, 41.7 μL , 252.6 μmol , 10.0 \AA q) gegeben und die Metallplatten wurden dazu gegeben. Es wurde sieben Tage bei Raumtemperatur inkubiert, wobei nicht gerührt, sondern nur gelegentlich geschwenkt wurde. Die Platten wurden entnommen, mit Dimethylformamid und Methanol gründlich gespült und im Vakuum getrocknet.

RGD funktionalisierte Metalloberflächen **86**

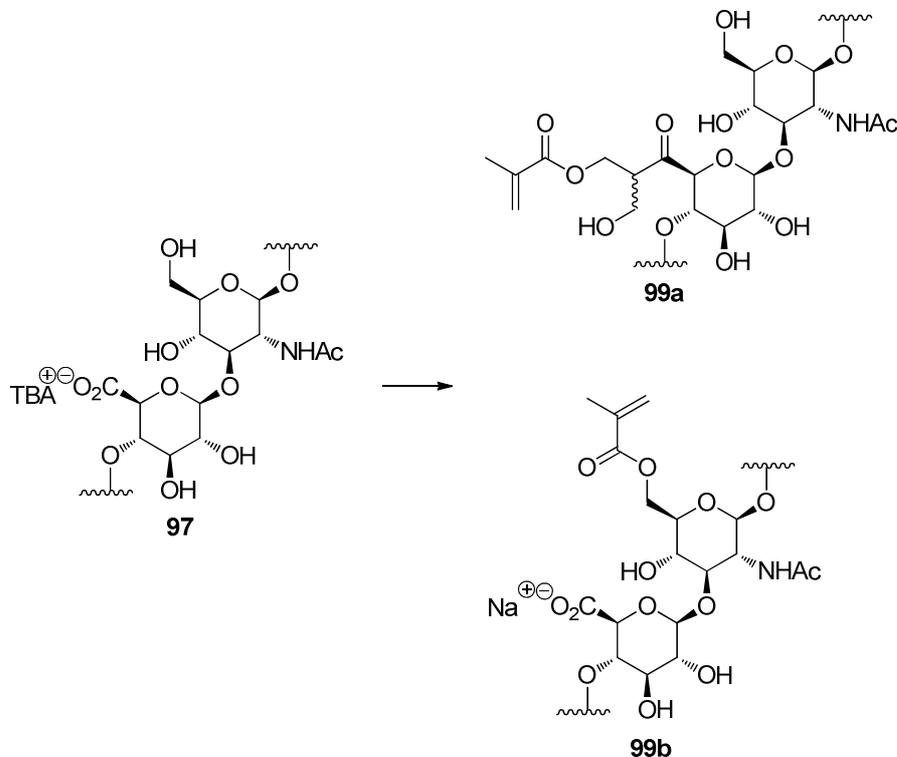
c[RGDfK(N₃)] **13** (3.0 mg, 5.0 μmol) wurde in Wasser (20.0 mL) gelöst und die beschichteten Metallplatten **85** wurden dazu gegeben. Das Gemisch wurde für sieben Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen und gelegentlich geschwenkt. Auf Rühren wurde verzichtet, da sich die Metallplatten dadurch gegenseitig beschädigten. Die Platten wurden der Reaktionslösung entnommen, mit Wasser sowie Methanol gründlich gespült und im Vakuum getrocknet.

Gelatine-Methacrylat (Derivatisierungsgrad 100%) **89**

Gelatine **87** (3.0 g, 1.0 mmol NH₂, 1.0 Äq) wurden bei 50 °C in Phosphatpuffer (80.0 mL, 0.1 M, pH = 7.5) gelöst und mit Methacrylanhydrid (1.3 mL, 5.0 mmol, 5.0 Äq) versetzt. Es wurde eine Stunde bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung ohne weitere Aufarbeitung fünf Tage

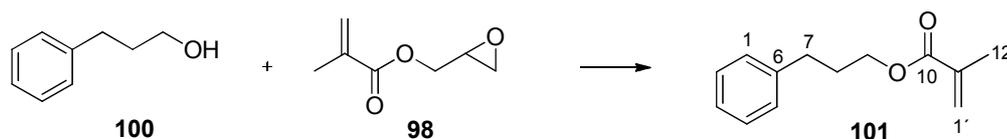
gegen Wasser dialysiert. Es wurden 1.7 g methacrylierte Gelatine **89** erhalten. Der Derivatisierungsgrad wurde mittels TNBS-Assay bestimmt.

Hyaluronsäure-Methacrylat (Derivatisierungsgrad 50%) **99**



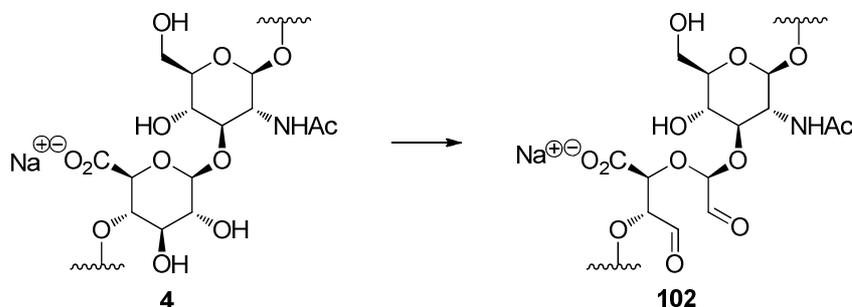
Hyaluronsäure-*tert.*-butylammoniumsalz **97** (500.0 mg, 806.0 μmol Zuckerdimere bei vollständiger Umsalzung, 1.0 Äq) wurden bei 60 °C unter Argonatmosphäre in absolutem Dimethylsulfoxid gelöst. Anschließend wurde Dimethylaminopyridin (0.1 g, 1.6 mmol, 2.0 Äq) und Glycidylmethacrylat (22.8 mg, 1.6 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und sechs Tage bei 55 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde aus Methanol gefällt, das ausgefallene Polymer in Wasser aufgenommen und drei Tage gegen 150 mM wässrige Natriumchlorid-Lösung sowie drei Tage gegen Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurden 307.7 mg (636.40 μmol bei gleicher Menge beider Produkte, 79%) der methacrylierten Produkte **99** erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, HDO = 4.79 ppm): 1.98 (s, CH₃Acetyl), 3.45-4.35 (m, CH und OH des Zuckers), 4.50-4.60 (m, CH^{anomer}), 4.85-5.20 (m, OH^{Aldehyd-Hydrat}) ppm.

3-Phenylpropylmethacrylat **101**

Zu einer Lösung von 3-Phenylpropanol **100** (300.0 mg, 2.2 mmol, 1.0 Äq) in absolutem Dimethylsulfoxid (30.0 mL) wurde Dimethylaminopyridin (274.0 mg, 2.3 mmol, 1.0 Äq) gegeben. Anschließend wurde Glycidylmethacrylat **98** (585.0 μ L, 4.4 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und die Lösung über Nacht bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Salzsäure (1.0 mL, 1 M) beendet, mit Wasser (20.0 mL) versetzt und dreimal mit Essigsäureethylester (je 150 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger Kochsalz-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Petrolether/Essigsäureethylester 15/1 \rightarrow 5/1) gereinigt. Es wurden 284.0 mg (1.4 mmol, 63%) des Produkts **101** als klare Flüssigkeit erhalten.

DC: R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) = 0.25; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 1.08$ (s, 3 H, 12-H), 1.98-2.06 (m, 2 H, 8-H), 2.75 (t, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 8.0$, 7-H), 4.19 (t, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 6.5$ Hz, 9-H), 5.59 (m, 1 H, 1'-H^a), 6.13 (m, 1 H, 1'-H^b), 7.19-7.34 (m, 5H, 1-H bis 5-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 18.6$ (p, C-12), 30.4 (p, C-8), 32.4 (p, C-7), 64.1 (s, C-9), 125.5 (s, C-1'), 126.2 (t, C-3), 128.6 (t, C-1, C-5), 128.6 (t, C-2, C-4), 136.6 (q, C-11), 141.4 (C-6), 167.4 (q, C-10) ppm; **HR-MS:** $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NaO}_2$ berechnet: 227.1048, gefunden: 227.1049.

Hyaluronsäure-Aldehyd (Derivatisierungsgrad 100%) **102**

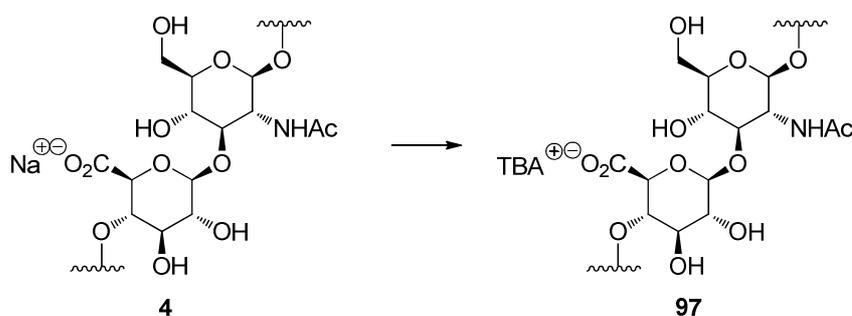
Das Natriumsalz der Hyaluronsäure **4** (300.0 mg, 748.0 μ mol, 1.0 Äq) wurde in Wasser (50.0 mL) gelöst. Anschließend wurde Natriumperodat (1.9 g, 9.0 mmol, 12.0 Äq) unter Lichtausschluss zu der Polymer-Lösung gegeben über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Polymer wurde aus Ethanol gefällt, abfiltriert und der

Rückstand in Wasser aufgenommen. Es wurde fünf Tage gegen Wasser dialysiert und das Polymer wurde lyophilisiert. Es wurden 283 mg (709.1 μmol , 95%) derivatisiertes Polymer **102** erhalten.

Die gleiche Vorschrift wurde auch zur Herstellung von Hyaluronsäurederivaten mit geringeren Derivatisierungsgraden verwendet. Die entsprechenden Äquivalente Natriumperodat sind in Kapitel 5.3.1 angegeben. Bei der Verwendung von weniger als zwei Äquivalenten ist das Polymer nach Fällung aus Ethanol bei 7200 Umdrehungen fünf Minuten zu zentrifugieren. Der Derivatisierungsgrad wurde mittels Purpald-Assay bestimmt.

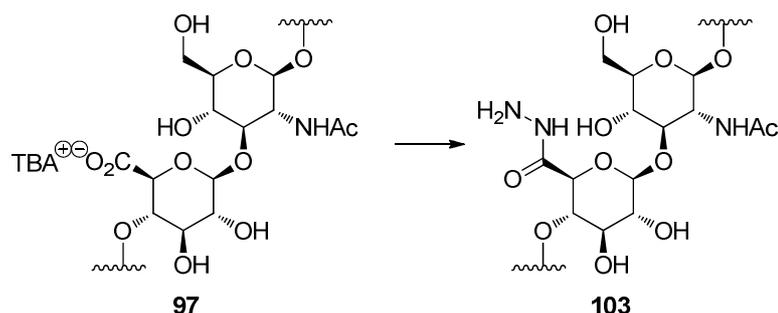
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , HDO = 4.79 ppm): 1.98 (s, $\text{CH}_3^{\text{Acetyl}}$), 3.45-4.35 (m, CH und OH des Zuckers), 4.50-4.60 (m, $\text{CH}^{\text{anomer}}$), 4.85-5.20 (m, $\text{OH}^{\text{Aldehyd-Hydrat}}$) ppm.

Hyaluronsäure-*tert.*-butylammoniumsalz **97**



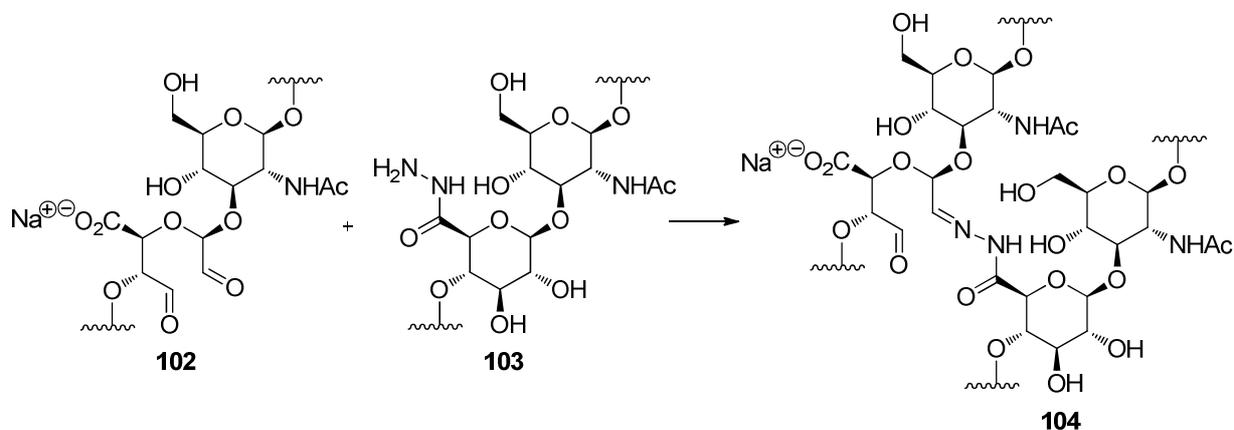
Zur Umsalzung des Hyaluronsäure Natriumsalzes **4** in das entsprechende *tert.*-Butylammoniumsalz wurde zunächst das Amberlit-Harz IR 120 (10.0 mL, H^+ -Form) mit Methanol, Wasser und erneut Methanol bis zur Farblosigkeit der Lösung gespült. Anschließend wurde der Ionentauscher mit 100 mL 1 M NaOH in das Natriumsalz überführt, um zu verhindern, dass nicht entfernte Protonen die Hyaluronsäure im Laufe der Synthese glykosidisch spalten. Nachdem das Harz erneut mit Wasser neutral gewaschen wurde, wurde eine *tert.*-Butylammoniumbromid-Lösung (300.0 mL, 0.25 m) zugeben und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen.

Das Hyaluronsäure-Natriumsalz (300 mg) wurde in Wasser (300 mL) gelöst und der Ionentauscher zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde dieser erneut abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Es wurden 676.0 mg (82%) des Hyaluronsäure-*tert.*-butylammoniumsalzes **97** erhalten.

Hyaluronsäure-Hydrazid (Derivatisierungsgrad 30%) 103

Hyaluronsäure-*tert.*-butylammoniumsalz **97** (200.0 mg, 322.4 μmol Zuckerdimere bei vollständiger Umsalzung, 1.0 Äq) wurde bei 60 °C unter Argonatmosphäre in absolutem Dimethylsulfoxid gelöst. Anschließend wurde 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (123.6 mg, 644.8 μmol , 2.0 Äq), 1-Hydroxybenzotriazol (74.1 mg, 483.6 μmol , 1.5 Äq) und Di-*iso*-propylethylamin (53.3 μL , 322.4 μmol , 1.0 Äq) zugegeben. Nach Rühren für eine Stunde bei 50 °C wurde Hydrazin (156.4 μL , 3.2 μmol , 10.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Fällung in Ethanol beendet. Das Polymer wurde bei 7200 Umdrehungen fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das so erhaltene Pellet wurde erneut in Wasser gelöst und drei Tage gegen 150 m μ aq. Natriumchlorid-Lösung sowie drei Tage gegen Wasser dialysiert. Es wurden 138.20 mg (351.53 μmol , quant.) Hyaluronsäure-Hydrazid **103** erhalten.

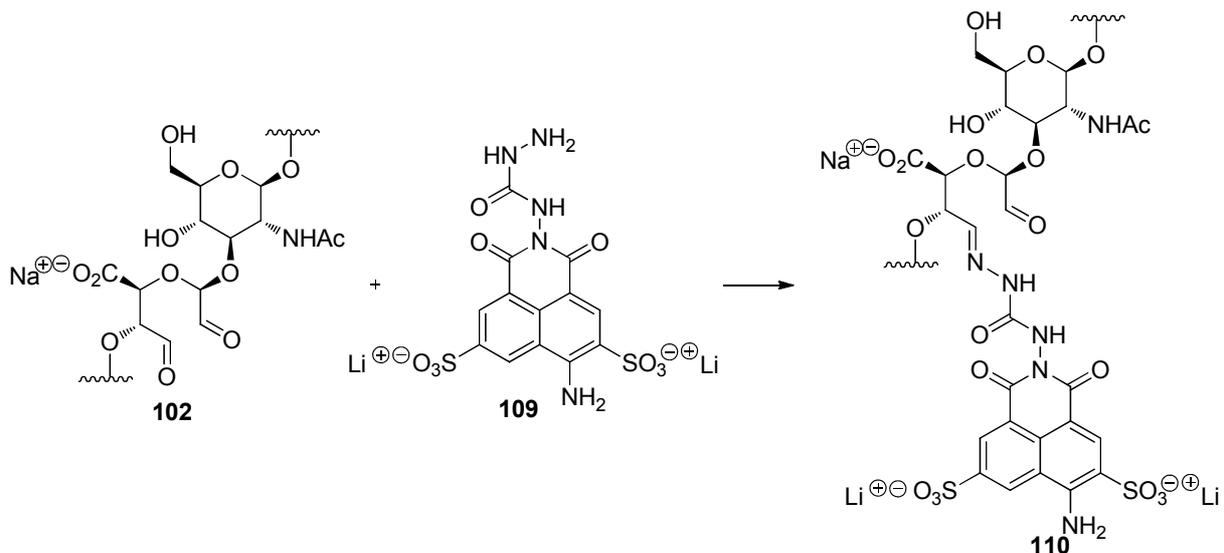
Die Analyse des Belegungsgrades der Hydrazid-modifizierten Hyaluronsäure erfolgte mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assay.

Hydrazon-Hydrogele 104

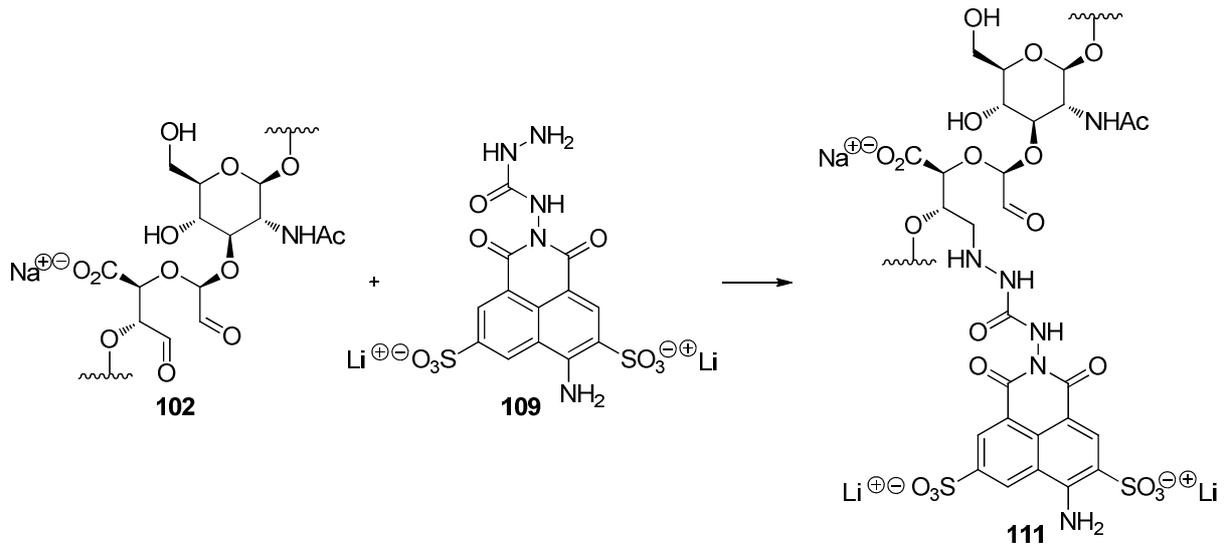
Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Hydrazon-Hydrogelen: Hyaluronsäure-Aldehyd **102** (4.0 mg, 10.0 μmol Zuckerdimere bei vollständiger Oxidation) sowie Hyaluronsäure-Hydrazid **103** (4.0 mg, 10.2 μmol Zuckerdimere bei vollständiger Umsetzung mit Ethylendiamin) in Wasser, isotonischer Kochsalz-Lösung oder DMEM-Kulturmedium (jeweils 200 μL) bei 50 $^{\circ}\text{C}$ für etwa 30 Minuten gelöst. Anschließend wurden die beiden Komponenten zusammengegeben und vorsichtig miteinander verrührt, bis der Gelationsprozess einsetzte. Je nach Umgebungstemperatur und Derivatisierungsgrad von Hyaluronsäure-Aldehyd **102** bzw. Hyaluronsäure-Hydrazid **103** konnte nach zehn bis 30 Minuten ein vollständig vernetztes Hydrogel **104** erhalten werden.

Zur Herstellung von Hyaluronsäure-Alginat Hydrogelblends wurde, wie oben beschrieben, entweder der Aldehyd oder das Hydrazid durch die jeweilige Alginatkomponente ersetzt und umgesetzt.

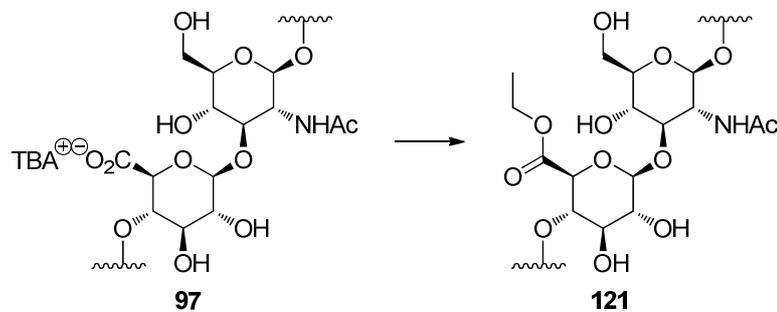
Lucifer-Gelb funktionalisierte Hyaluronsäure (nicht reduziert) **110**



Zu einer Lösung von Hyaluronsäure-Aldehyd **102** mit einem Oxidationsgrad von 100% (10 mg, 50.1 μmol) in Wasser (670.0 μL) wurde Lucifer Gelb **109** (3.44 mg, 7.5 μmol , 0.15 Äq im Verhältnis zu den Aldehydgruppen des Polymers) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde fünf Stunden bei 50 $^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend für sechs Tage gegen Wasser dialysiert. Für die in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Ausblutungsexperimente wurden regelmäßig Proben des Dialysewasser entnommen und UV-metrisch analysiert. Das Polymer wurde anschließend gefriergetrocknet. Es wurden 9.0 mg von Polymer **110** als gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

Lucifer-Gelb funktionalisierte Hyaluronsäure (reduziert) 111

Zu Phosphatpuffer (0.1 M, pH = 6.5, 670.0 μL) wurden Hyaluronsäure-Aldehyd **102** mit einem Oxidationsgrad von 100% (10 mg, 50.1 μmol) und Lucifer Gelb **109** (3.44 mg, 7.5 μmol , 0.85 Äq im Verhältnis zu den Aldehydgruppen des Polymers) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde fünf Stunden bei 50 $^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend mit Natriumcyanoborhydrid (472.3 μg , 7.5 μmol , 0.85 Äq im Verhältnis zu den Aldehydgruppen des Polymers) versetzt. Nach zwölf Stunden Rühren bei 4 $^{\circ}\text{C}$, wurde die Reaktionsmischung für sechs Tage gegen Wasser dialysiert. Für die in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Ausblutungsexperimente wurden regelmäßig Proben des Dialysewasser entnommen und UV-metrisch analysiert. Das gereinigte Polymer wurde anschließend gefriergetrocknet. Es wurden 9.5 mg von Polymer **111** als gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

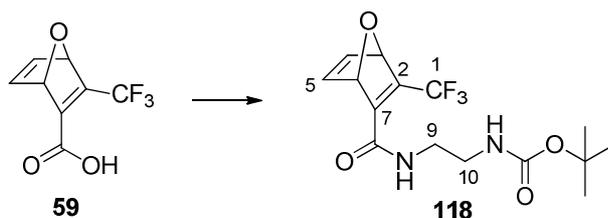
Hyaluronsäureethylester 121

Hyaluronsäure-*tert.*-butylammoniumsalz **97** (30.0 mg, 48.4 μmol Zuckerdimere bei vollständiger Umsalzung, 1.0 Äq) wurden bei 60 $^{\circ}\text{C}$ unter Argonatmosphäre in einer Mischung von absolutem Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid

(5.0 mL:1.0 mL) gelöst. Anschließend wurde Ethyleniodid (30.2 mg, 15.5 μ L, 193.4 μ mol, 4.0 Äq) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Natriumchlorid-Lösung (21.6 mg in 0.1 mL Wasser) versetzt. Durch Zugabe von Aceton wurde das Polymer gefällt und durch Zentrifugation bei 7200 Umdrehungen für fünf Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und erneut zweimal mit Aceton und zweimal mit Dichlormethan gefällt. Nach Lyophilisation wurden 30.3 mg (74.4 μ mol) des Produkts **121** als watteartiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, HDO = 4.79 ppm): δ = 1.26 (s, 3 H, CH₃CH₂), 1.96 (s, 3 H, CH₃), 2.90-4.60 (m, 17 H, Polymer und CH₂-CH₃).

tert.-Butyl(2-((1S,4R)-3-(trifluormethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamido)ethyl)carbamate **118**

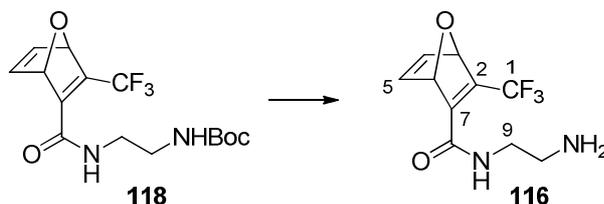


Oxanorbornadien **59** (100 mg, 480.7 μ mol, 1.0 Äq) sowie *N*-Boc-Ethylendiamin Hydrochlorid (76.9 mg, 75.8 μ L, 480.7 μ mol, 1.0 Äq) wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in Dichlormethan (2.0 mL) gelöst. 4-Dimethylaminopyridin (117.5 mg, 961.5 μ mol, 2.0 Äq) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidehydrochlorid (101.1 mg, 528.8 μ mol, 1.1 Äq) wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde per Säulenchromatographie (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) gereinigt. Es wurde Oxanorbornadien **118** als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 61% (102.3 mg, 293.9 μ mol) erhalten.

Smp. = 145 °C; **DC:** R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) = 0.52; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 1.46 (s, 9 H, Boc), 3.34 (m, 2 H, 10-H), 3.48 (m, 1 H, 9-H), 4.86 (s^{br}, 1 H, NH), 5.64 (m, 1 H, 6-H), 5.66 (m, 1 H, 3-H), 6.66 (s^{br}, 1 H, NH), 7.17 (dd, J_{H,H} = 5.2 Hz, J_{H,H} = 1.8 Hz, 1 H, 5-H), 7.37 (dd, J_{H,H} = 5.2 Hz,

$J_{H,H} = 1.8$ Hz, 4-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 28.4$ (p, Boc), 40.0 (s, C-10), 41.3 (s, C-9), 80.2 (q, Boc), 83.7 (t, quart., $^3J_{C,F} = 2.3$ Hz, C-3), 86.1 (t, C-6), 122.4 (q, quart., $J_{C,F} = 268.4$ Hz, C-1), 142.2 (t, C-5), 143.8 (t, C-4), 143.9 (q, quart., $J_{C,F} = 36.3$ Hz, C-2), 154.2 (q, quart., $J_{C,F} = 5.0$ Hz, C-7), 157.0 (q, Boc), 162.7 (q, C-8) ppm; **HR-MS**: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 371.1208, gefunden: 371.1195.

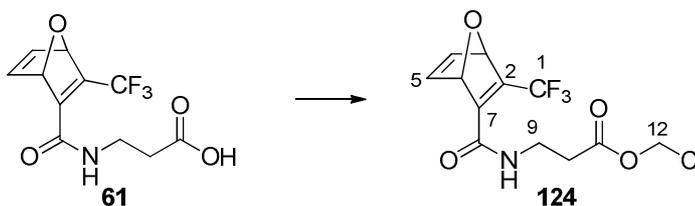
(1*S*,4*R*)-*N*-(2-aminoethyl)-3-(trifluormethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamide **116**



Oxanorbordien **118** (6.0 mg, 17.2 μmol , 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (1.0 mL) gelöst und ein Überschuss an Trifluoressigsäure (60.0 μL) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die restliche Trifluoressigsäure wurde durch Codestillation mit Toluol azeotrop entfernt. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt, bis Produkt **116** als farbloser Feststoff (4.2 mg, 16.9 μmol , quant.) erhalten wurde.

Smp. = 155 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_3 = 3.31$ ppm): $\delta = 2.73$ (dt, $J_{H,H} = 6.32$ Hz, $J_{H,H} = 2.7$ Hz, 2 H, 9-H) 3.44-3.68 (m, 2 H, 10-H), 5.63 (m, 1 H, 6-H), 5.70 (m, 1 H, 3-H), 7.25 (dd, $J_{H,H} = 5.3$, 1.9 Hz, 1 H, 5-H), 7.33 (dd, $J_{H,H} = 5.3$, 1.9 Hz, 4-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): $\delta = 38.2$ (s, C-9), 40.5 (s, C-10), 84.6 (t, quart., $J_{C,F} = 2.3$ Hz, C-3), 87.1 (t, C-6), 123.8 (q, quart., $J_{C,F} = 267.7$ Hz, C-1), 143.7 (t, C-5), 144.6 (t, C-4), 145.9 (q, quart., $J_{C,F} = 36.9$ Hz, C-2), 155.8 (q, quart., $J_{C,F} = 5.05$ Hz, C-7), 166.0 (q, C-8) ppm; **HR-MS**: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 249.0850, gefunden: 249.0851.

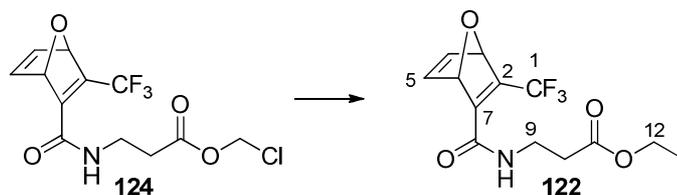
Chloromethyl 3-((1*S*,4*R*)-3-(trifluoromethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamido)propanoat **124**



Oxanorbornadien **61** (170.0 mg, 613.6 μmol , 1.0 Äq) wurde zusammen mit Natriumhydrogencarbonat (206.0 mg, 2.5 mmol, 4.0 Äq) und *n*-Butylammonium hydrogensulfat (20.8 mg, 61.4 μmol , 0.1 Äq) in einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (5 mL/5 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von Chlormethylchlorsulfat (121.5 mg, 75.9 μL , 736.3 mmol, 1.2 Äq) in Dichlormethan (0.5 mL) zugetropft. Es wurde weitere fünf Minuten bei dieser Temperatur und anschließend 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 99/1) gereinigt. Es wurden 177.7 mg (546.7 μmol , 89%) von Produkt **124** als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

Smp. = 86 °C; **DC:** R_f (Dichlormethan/Methanol 99/1) = 0.29; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 2.68$ (t, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 10-H), 3.56-3.77 (m, 2 H, 9-H), 5.63 (m, 1 H, 6-H), 5.65 (m, 1 H, 3-H), 5.71 (s, 1 H, 12-H), 6.40 (s^{br} , 1 H, NH), 7.15 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3, 1.9$ Hz, 5-H), 7.33 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3, 1.9$ Hz, 4-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 32.7$ (s, C-10), 33.8 (s, C-9), 67.8 (s, C-12), 82.8 (t, C-3), 85.2 (t, C-6), 121.3 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 278.0$ Hz, C-1), 141.1 (t, C-5), 142.8 (t, C-4), 143.1 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 36.3$ Hz, C-2), 153.0 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 5.2$ Hz, C-7), 161.4 (q, C-8), 169.6 (q, C-11) ppm; **HR-MS:** $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 348.0226, gefunden: 348.0215.

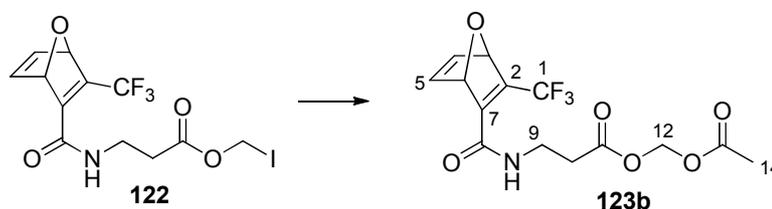
Iodomethyl 3-((1*S*,4*R*)-3-(trifluormethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamido)propanoate **122**



Zu einer Lösung von Chlorid **124** (177.7 mg, 546.7 μmol , 1.0 Äq) in Acetonitril (5.0 mL) wurde unter Argonatmosphäre Natriumiodid (81.9 mg, 546.7 μmol , 1.0 Äq) gegeben und für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Natriumchlorid wurde abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt und säulenchromatographisch (Petrolether/Essigsäureethylester 2/1) gereinigt. Es wurden 173.5 mg (416.1 μmol , 76%) von Produkt **122** in Form eines frablosen Feststoffs erhalten.

Smp. = 91 °C; **DC:** R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 2/1) = 0.25; **$^1\text{H-NMR}$** (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 2.62$ (t, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 10-H), 3.44-3.79 (m, 2 H, 9-H), 5.59-5.69 (m, 2 H, 3-H, 6-H), 5.91 (s, 1 H, 12-H), 6.38 (s^{br}, 1 H, NH), 7.15 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1.9 Hz, 5-H), 7.33 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1.9 Hz, 4-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 29.9$ (s, C-12), 33.8 (s, C-10), 34.8 (s, C-9), 83.8 (t, quart., $J_{\text{C,F}} = 2.2$ Hz, C-3), 86.2 (t, C-6), 122.4 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 266.8$ Hz, C-1), 142.1 (t, C-5), 143.8 (t, C-4), 144.1 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 36.4$ Hz, C-2), 154.1 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 4.7$ Hz, C-7), 162.4 (q, C-8), 170.6 (q, C-11) ppm; **HR-MS:** $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{INaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 439.9583, gefunden: 439.9578.

Acetoxymethyl 3-((1*S*,4*R*)-3-(trifluormethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamido)propanoat **123b**

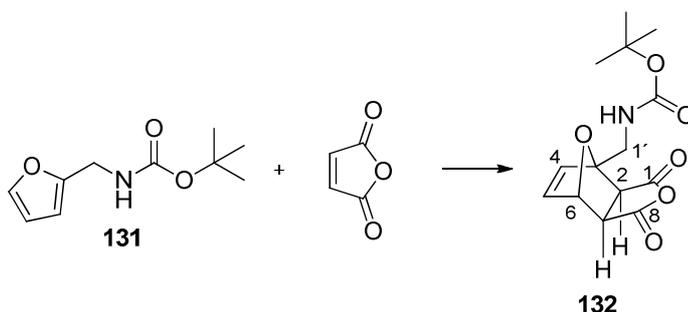


Essigsäure (2.2 mg, 2.0 μL , 36.0 μmol , 1.0 Äq) wurde in Dichlormethan (3.0 mL) gelöst und Di-*iso*-propylethylamin (9.3 mg, 11.9 μL , 71.9 μmol , 2.0 Äq) wurde zugefügt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurde Iodid **122** (15.0 mg, 36.0 μmol , 1.0 Äq) ebenfalls zugegeben und für weitere 22 Stunden bei gleicher Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das

Rohprodukt säulenchromatographisch (Petrolether/Essigsäureethylester 3/1 → 2/1) gereinigt. Produkt **123b** wurde als klares Öl in einer Ausbeute von 72% (9.0 mg, 25.8 μ mol) erhalten.

DC: R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 2/1) = 0.12; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 2.11$ (s, 3 H, 14-H), 2.64 (t, 2 H, $J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, 10-H), 3.54-3.75 (m, 2 H, 9-H), 5.60-5.63 (m, 1 H, 6-H), 5.63-5.66 (m, 1 H, 3-H), 5.75 (s, 2 H, 12-H), 6.44 (s^{br} , 1 H, NH), 7.14 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1.9 Hz, 5-H), 7.33 (dd, $J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, 1.9 Hz, 4-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 20.8$ (s, C-14), 33.7 (s, C-10), 34.8 (s, C-9), 79.5 (s, C-12), 83.8 (t, quart., $J_{\text{C,F}} = 2.3$ Hz, C-3), 86.2 (t, C-8), 122.5 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 266.6$ Hz, C-1), 142.0 (t, C-5), 143.82 (t, $J_{\text{C,F}} = 0.6$ Hz, C-4), 143.9 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 36.3$ Hz, C-2), 154.1 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 4.9$ Hz, C-7), 162.4 (q, quart, $J_{\text{C,F}} = 1.3$ Hz, C-8), 169.9, 171.3 (q, C-11, C-13) ppm; **HR-MS:** $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NNaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 372.0671, gefunden: 372.0665.

tert.-Butyl((1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-epoxy-*iso*-benzofuran-4-yl)methyl)carbammat **132**

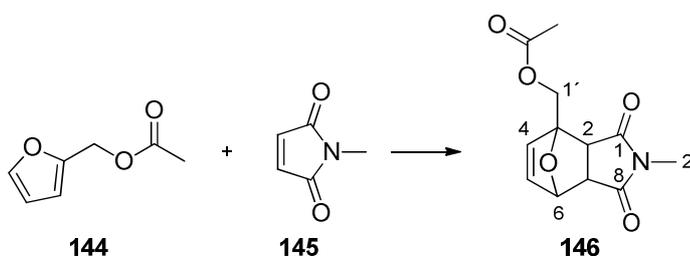


Zu einer Lösung von Maleinsäureanhydrid (535.3 mg, 546.2 mmol, 1.0 Äq) in Essigsäureethylacetat (30.0 mL) wurde *N*-Boc-Furfuylamin **131** (1.0 g, 507.3 mmol, 0.9 Äq) gegeben und für vier Stunden auf 70 °C erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (Petrolether/Essigsäureethylester 15/1) gereinigt. Das *exo*-Produkt **132** wurde in einer Ausbeute von 52% (782.6 mg, 265.2 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

Smp. = 109 °C; **DC:** R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 10/1) = 0.38; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 1.45$ (s, 9 H, Boc), 3.21 (d, $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1 H, 2-H oder 7-H), 3.32 (d, $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1 H, 2-H oder 7-H), 3.79 (dd, $J_{\text{H,H}} = 15.2$ Hz, 5.8 Hz, 1 H, 1'-H^a), 3.88 (dd, $J_{\text{H,H}} = 15.2$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 1 H, 1'-H^b), 5.06 (s^{br} , 1 H, NH), 5.39 (s, 1 H, 6-H), 6.43-6.63 (m, 2 H, 4-H und 5-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): $\delta = 28.5$ (p, Boc), 39.7 (s, C-1'), 49.8 (t, C-2

oder C-7), 51.8 (t, C-2 oder C-7), 80.2 (q, Boc), 82.1 (t, C-6), 110.5 (t, C-3), 137.7 (t, C-4 oder C-5), 139.1 (t, C-4 oder C-5), 155.8 (q, Boc), 169.0 (q, C-1 und C-8) ppm; Das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden.

(2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1H-4,7-epoxy-iso-indol-4-yl)
methylacetat **146**¹⁴⁵



Zu einer Lösung von *N*-Methylmaleimid **145** (158.6 mg, 1.4 mmol, 1.0 Äq) in Tetrachlorethan (30.0 mL) wurde Furfurylacetat **144** (200.0 mg, 180.1 μ L, 1.4 mmol, 1.0 Äq) gegeben und für drei Tage auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (Petrolether/Essigsäureethylester 2/1) gereinigt. Die Produkte *exo*-**146** und *endo*-**146** wurden in einer Ausbeute von 50% (178.9 mg, 712.1 μ mol) beziehungsweise 8% (27.6 mg, 109.9 μ mol) als farblose Feststoffe erhalten.

HR-MS: $C_{12}H_{13}NNaO_5$ $[M+Na]^+$ berechnet: 274.0691, gefunden: 274.0688;

endo-**146**: **Smp.** = 115 °C; **DC**: R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) = 0.47;

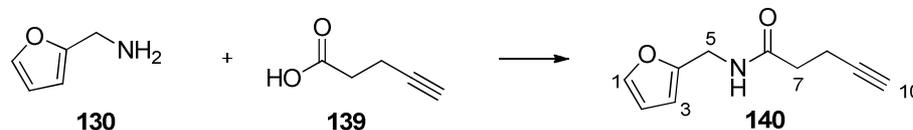
¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$ = 7.26 ppm): δ = 2.14 (s, 3 H, Ac), 2.83 (s, 3 H, 2'-H), 3.40 (d, $J_{H,H}$ = 7.7 Hz, 1 H, 2-H), 3.67 (dd, $J_{H,H}$ = 7.7, 5.5 Hz, 1 H, 7-H), 4.59 (d, $J_{H,H}$ = 12.7 Hz, 1 H, 1'-H^a), 4.86 (d, $J_{H,H}$ = 12.7 Hz, 1 H, 1'-H^b), 5.31 (dd, $J_{H,H}$ = 5.5, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.31 (d, $J_{H,H}$ = 5.8 Hz, 4-H), 6.46 (dd, $J_{H,H}$ = 5.8, 1.6 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$ = 77.2 ppm): δ = 20.9 (p, C-Ac), 24.8 (p, C-2'), 47.0 (t, C-2), 48.1 (t, C-7), 62.1 (s, C-1'), 79.7 (t, C-6), 89.7 (q, C-3), 134.6 (t, C-4), 135.8 (t, C-5), 170.7 (q, C-Ac), 174.6 (C-1 oder C-8), 174.7 (C-1 oder C-8) ppm;

exo-**146**: **Smp.** = 82 °C; **DC**: R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 1/1) = 0.33;

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$ = 7.26 ppm): δ = 2.10 (s, 3 H, Ac), 2.93 (d, $J_{H,H}$ = 6.1 Hz, 1 H, 2-H oder 7-H), 2.94-3.02 (m, 4 H, 2'-H und 2-H oder 7-H), 4.49 (d, $J_{H,H}$ = 12.9 Hz, 1'-H^a), 4.97 (d, $J_{H,H}$ = 12.9 Hz, 1 H, 1'-H^b), 5.28 (s, 1 H, 6-H), 6.45 (d, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz, 4-H), 6.59 (d, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$ = 77.16 ppm): δ = 20.9 (p, C-Ac), 25.2 (p, C-2'), 48.6 (t, C-2), 50.2 (t, C-7), 61.5 (s,

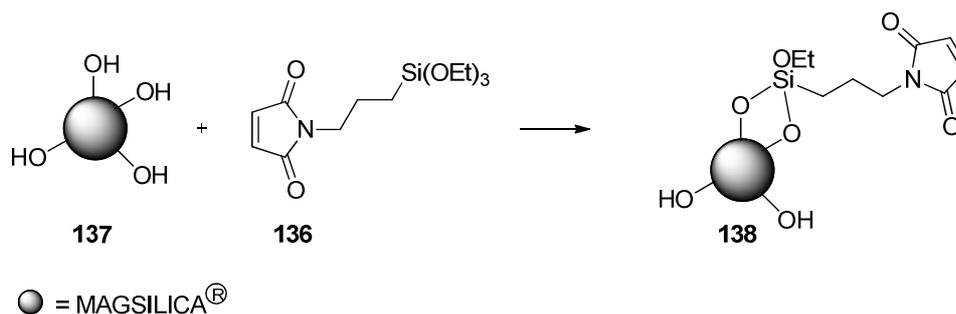
C-1'), 81.1 (t, C-6), 89.6 (q, C-3), 137.2 (t, C-4), 137.7 (t, C-5), 170.6 (q, Ac), 174.3 (q, C-1 oder C-8), 175.8 (q, C-1 oder C-8) ppm.

N-(Furan-2-ylmethyl)pent-4-ynamid **140**

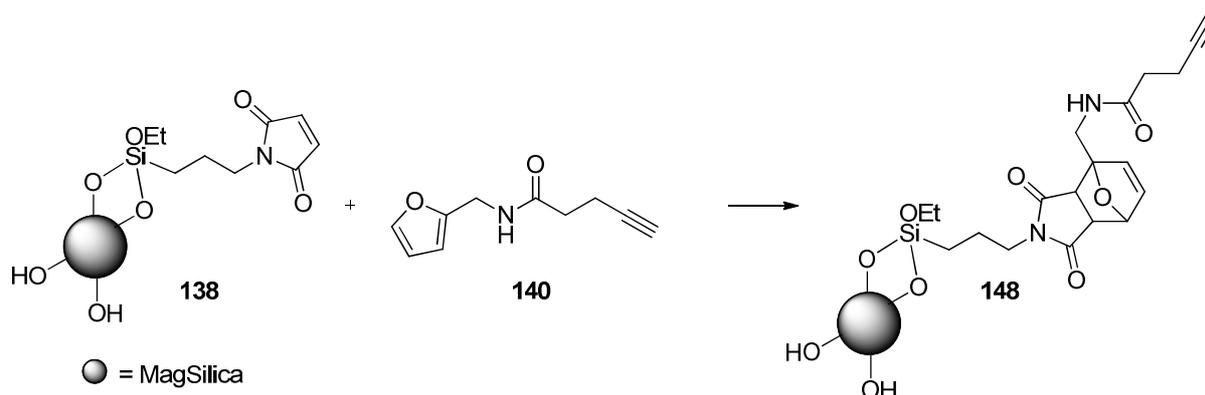


Zu einer Lösung von 4-Pentynsäure **139** (303.0 mg, 3.1 mmol, 1.0 Äq) in absolutem Dichlormethan (12.0 mL) wurden unter Argonatmosphäre Di-*iso*-propylcarbodiimid (776.5 mg, 963.4 μ L, 6.2 mmol, 2.0 Äq) und *N*-Hydroxysuccinimid (712.0 mg, 6.2 mmol, 2.0 Äq) gegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Furfurylamin **130** (333.5 mg, 314.4 μ L, 3.4 mmol, 1.1 Äq) und Di-*iso*-propylethylamin (2.5 mL, 15.4 mmol, 5.0 Äq) versetzt und für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstehende Feststoff wurde abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 98.5/1.5) gereinigt. *N*-(Furan-2-ylmethyl)pent-4-ynamide **140** wurde in einer Ausbeute von 68% (370.8 mg, 2.1 mmol) als farbloser Feststoff erhalten.

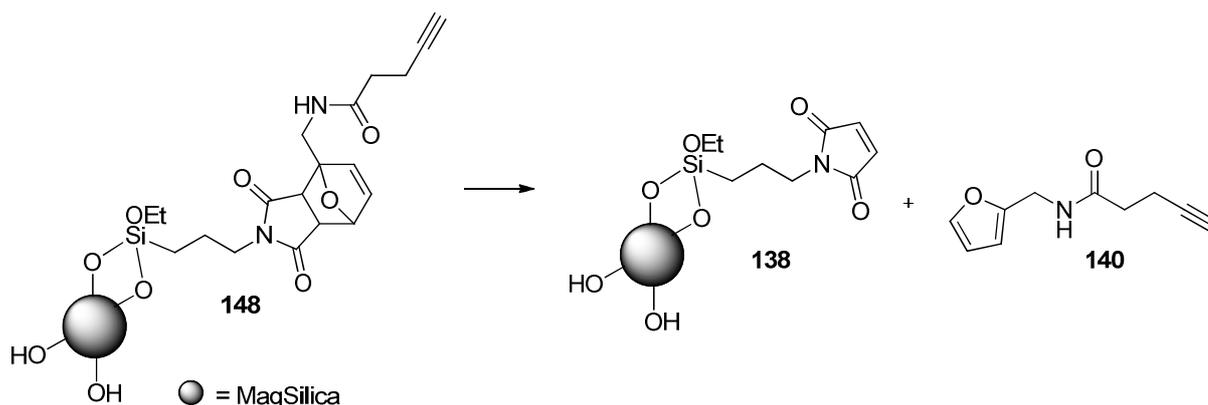
Smp. = 56 °C; **DC:** R_f (Dichlormethan/Methanol 95/5) = 0.70; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3 , CHCl_3 = 7.26 ppm): δ = 1.99 (t, $J_{\text{H,H}}$ = 2.7 Hz, 1 H, 10-H), 2.42 (dt, $J_{\text{H,H}}$ = 7.1 Hz, $J_{\text{H,H}}$ = 0.9 Hz, 2 H, 7-H), 2.55 (ddt, $J_{\text{H,H}}$ = 7.1 Hz, $J_{\text{H,H}}$ = 2.7 Hz, $J_{\text{H,H}}$ = 0.9 Hz, 2 H, 8-H), 4.46 (d, $J_{\text{H,H}}$ = 5.5 Hz, 2 H, 5-H), 5.91 (s^{br}, 1 H, NH), 6.24 (m, 1 H, 3-H), 6.32 (m, 1 H, 2-H), 7.35 (m, 1 H, 1-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , CDCl_3 = 77.2 ppm): δ = 14.9 (s, C-8), 35.4 (s, C-7), 36.7 (s, C-5), 69.5 (t, C-10), 83.0 (q, C-9), 107.7, 110.6 (t, C-2, C-3), 151.3 (t, C-1), 170.8 (q, C-6) ppm; **HR-MS:** $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{NaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet: 200.0687, gefunden: 200.0685.

Silanisierte MAGSILICA[®] -Nanopartikel 138

Die MAGSILICA[®] Partikel **137** (500.0 mg) wurden in Acetonitril gegeben und mit Ethoxysilan **136** (30.0 mg, 99.6 μmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 65 °C für 66 h erwärmt. Um das überschüssige Ethoxy silan zu entfernen wurden die Partikel magnetisch fixiert und der Überstand entfernt. Die Partikel wurden zehn Mal mit Acetonitril aufgeschwämmt und der Überstand entfernt. Anschließend wurden das beschichtete MAGSILICA[®] **138** im Vakuum getrocknet.

DIELS-ALDER Reaktion an MAGSILICA[®] -Nanopartikeln 148

Die silanisierten MAGSILICA[®] (500.0 mg) Nanopartikel wurden mit Tetrachlorethan (3.0 mL) versetzt und Furan **140** (30.0 mg, 169.4 μmol) wurde zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 72 °C erwärmt und zwei Tage bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde das überschüssige Furan entfernt, indem die MAGSILICA[®]-Partikel magnetisch fixiert und der Überstand verworfen wurde. Die Partikel wurden zehn Mal mit Essigsäureethylester aufgeschwämmt und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das beschichtete MAGSILICA[®] im Vakuum getrocknet.

Retro-DIELS-ALDER Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikeln **148***Durchführung mittels konventionellem Heizens:*

Für die retro-DIELS-ALDER wurden die beschichteten MAGSILICA[®]-Partikel **148** (250.0 mg) in Tetrachlorethan (500.0 μ L) gegeben und im Ölbad für 45 Minuten auf 120 °C erhitzt.

Durchführung mittels induktivem Heizens:

Die beschichteten MAGSILICA[®]-Partikel **148** (250.0 mg) wurden in einem Mikrowellengefäß in Tetrachlorethan (1.5 mL) gegeben. Anschließend wurde das verschlossene Reaktionsgefäß in den Induktor eingespannt und für 45 Minuten bei einer Pulsweitenmodulation von 600%₀₀ erhitzt. Es wurde eine Temperatur von etwa 90 °C gemessen.

Anschließend wurde das MAGSILICA[®]-Partikel magnetisch fixiert und der Überstand abgenommen. Es wurde einmal mit Tetrachlorethan (500.0 μ L) gespült, die Überstände vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rückstände wurden mittels GC-MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 6.5 beschrieben.

Durchführung des 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assays¹¹¹

Zur Quantifizierung von primären Aminen in Proteinen wurden 0.5 mg beziehungsweise 1.0 mg der Probe in Wasser (1.0 mL) gelöst. 200 μ L von dieser Lösung wurden mit 4%iger, aq. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (200 μ L) und anschließend mit 0.1%iger, wässriger 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (200 μ M) versetzt. Die Analyse-Lösung wurde zwei Stunden bei 40 °C inkubiert und anschließend mit wässriger Natrium-dodecylsulfat-Lösung (SDS, 200 μ L) sowie 1 M Salzsäure (100 μ L) versetzt.

Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 335 nm gemessen. Dabei wurde ein Mittelwert aus mindestens fünf Messungen gebildet. Die Absorptionen der 0.5 mg/mL und 1 mg/mL Proben wurden gegen die Konzentration aufgetragen und linear extrapoliert. Anschließend wurden die Absorptionen anhand einer mit Glycin erstellten fünf-Punkt-Eichgerade.

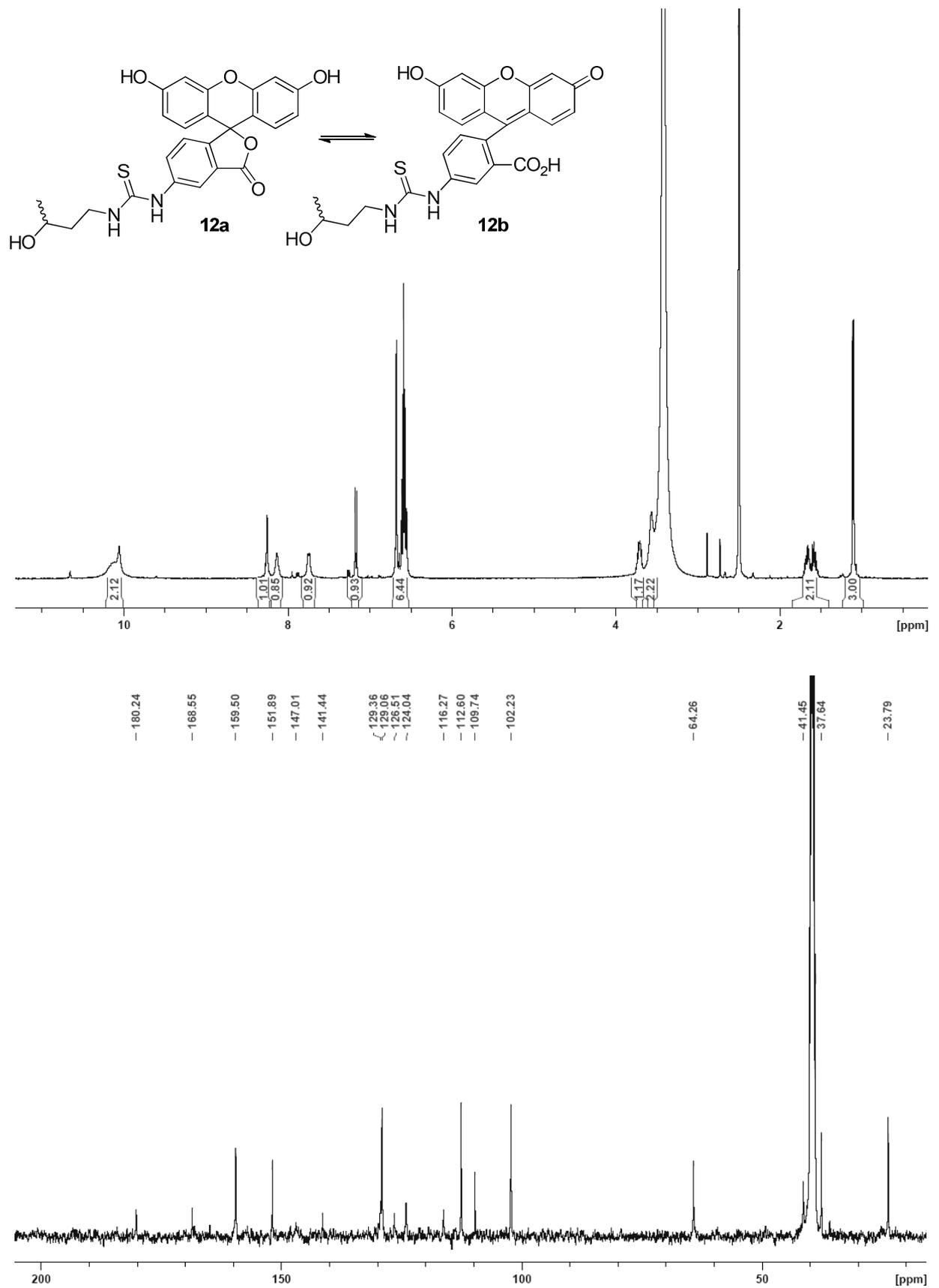
Durchführung des Purpald-Assays¹²⁵

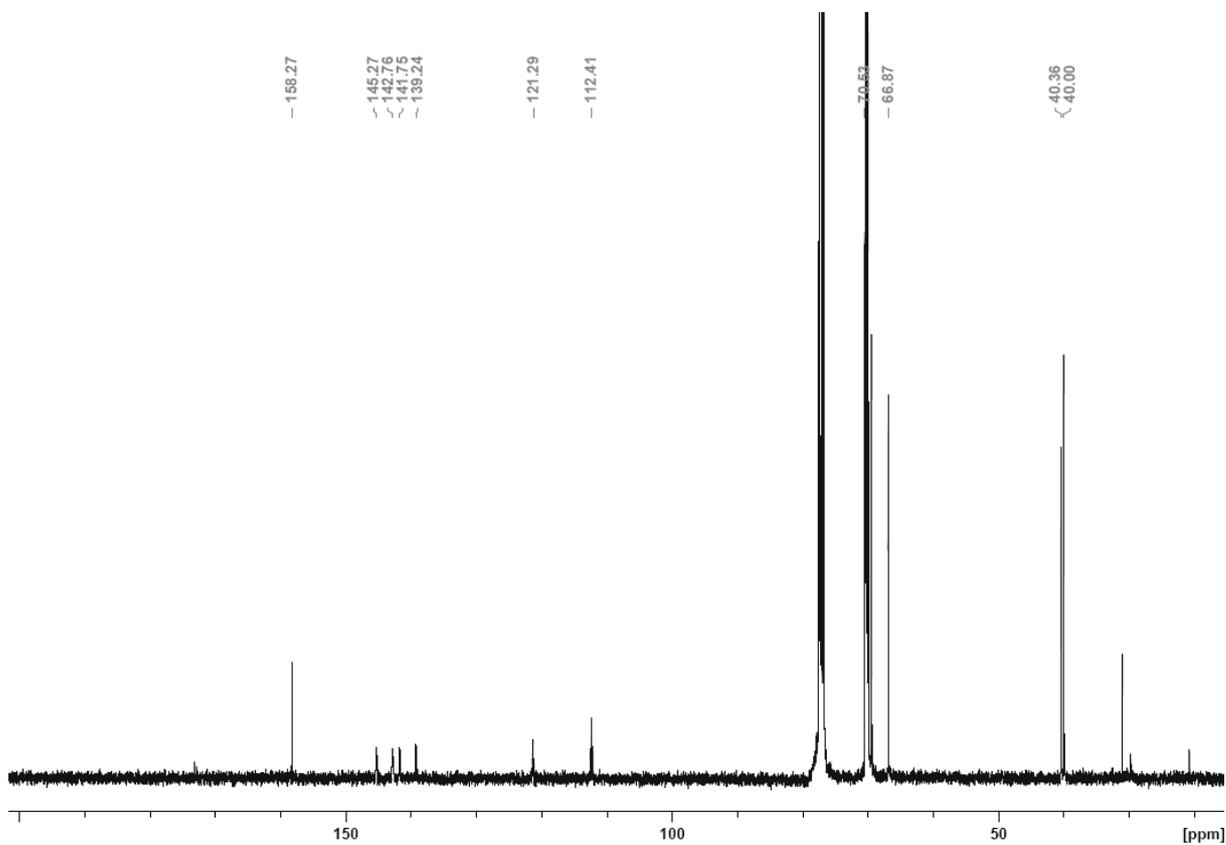
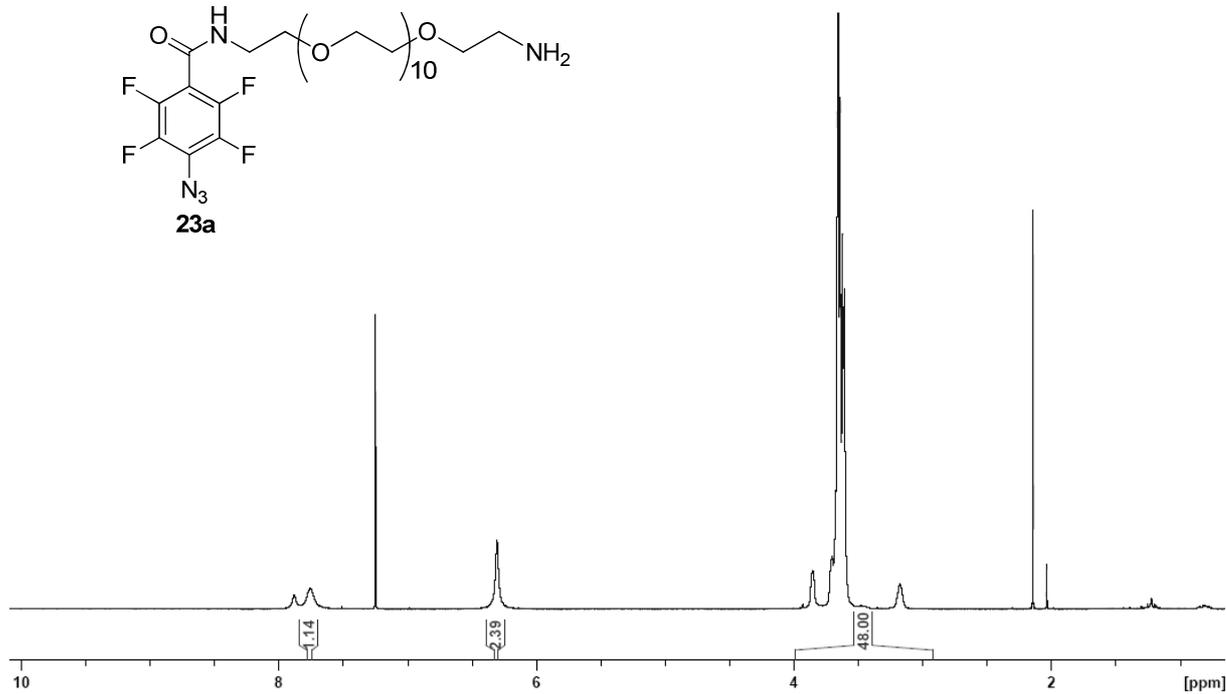
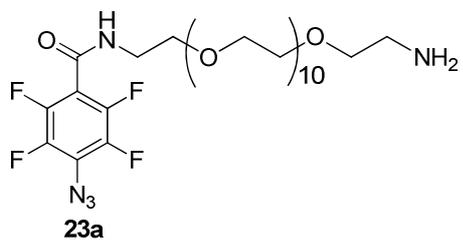
Zur Quantifizierung der Aldehydgruppen in der oxidierten Hyaluronsäure wurde das Polymer in einer Konzentration von 0.5 mg/mL in einer 1 M Natriumhydroxyd-Lösung gelöst. 300 µL dieser Lösung wurden mit der gleichen Menge Purpald (10 mg/mL in 1 M Natriumhydroxyd-Lösung) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur offen stehen gelassen. Nach erfolgter Reaktion war eine lila Färbung der Lösung zu beobachten. Die Absorption der verschiedenen Proben wurde am Maximum, bei 550 nm, drei Mal detektiert. Es wurde eine vier-Punkt-Eichgerade mit Propanal als Aldehydkomponente in verschiedenen Konzentrationen erstellt. Anschließend wurde durch Vergleich mit der Eichgerade für beide Konzentrationen der Derivatisierungsgrad bestimmt und die Werte gemittelt.

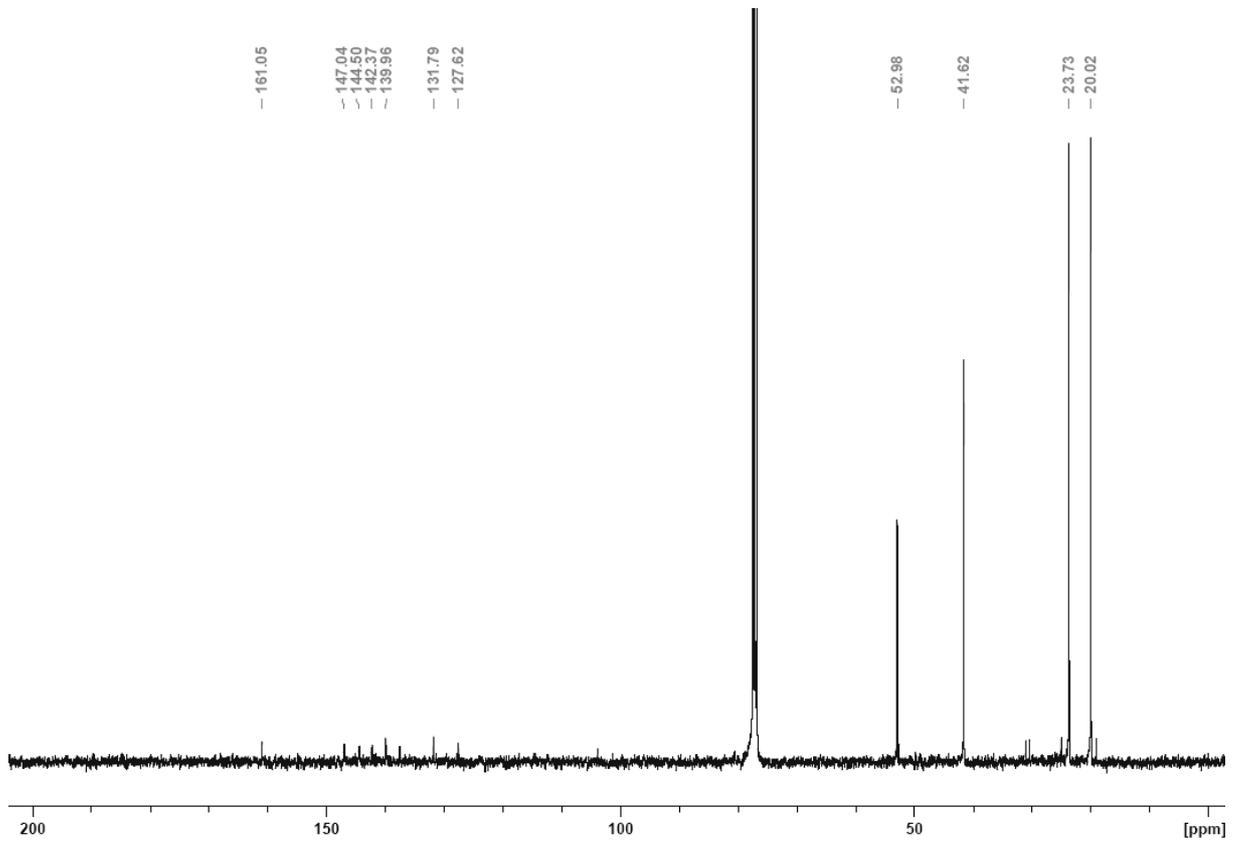
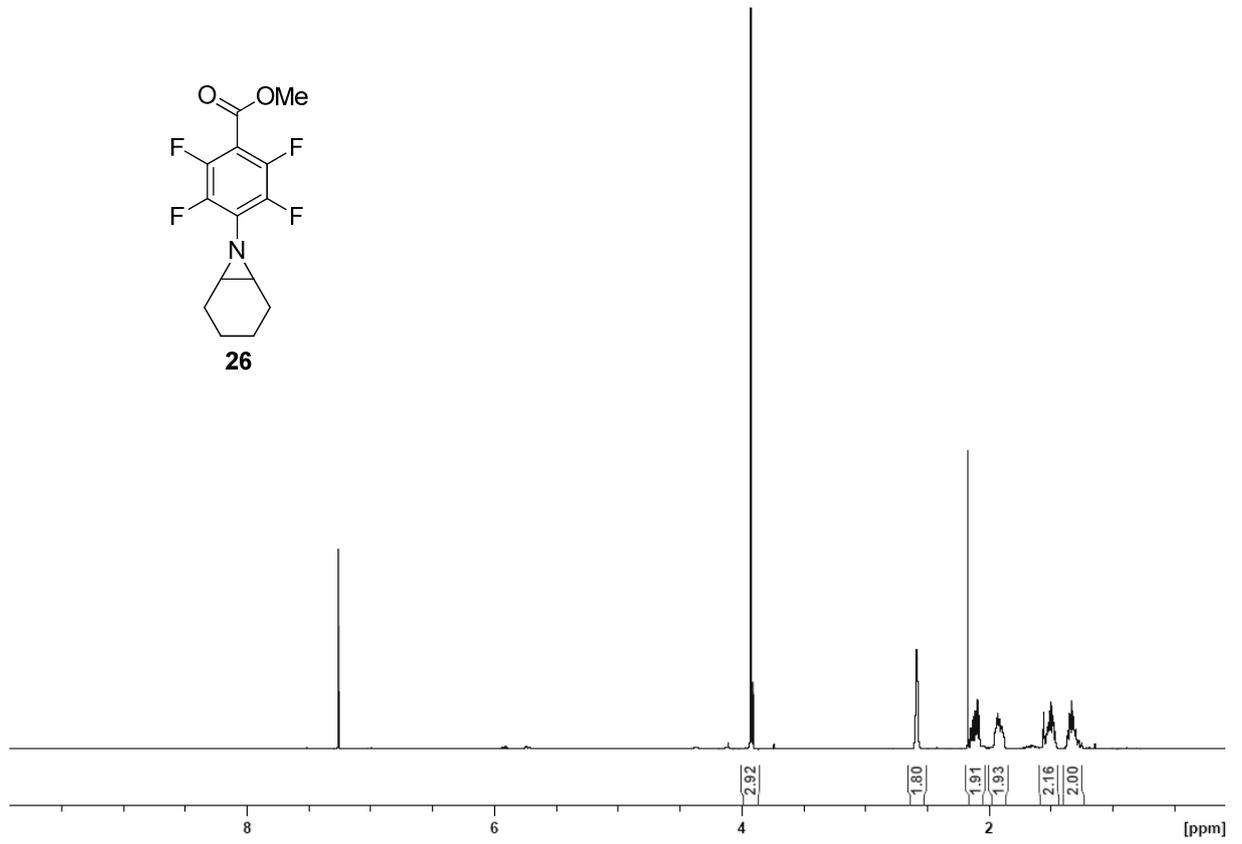
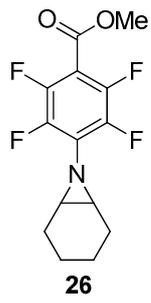
Durchführung des Carbazol-Assays¹²⁸

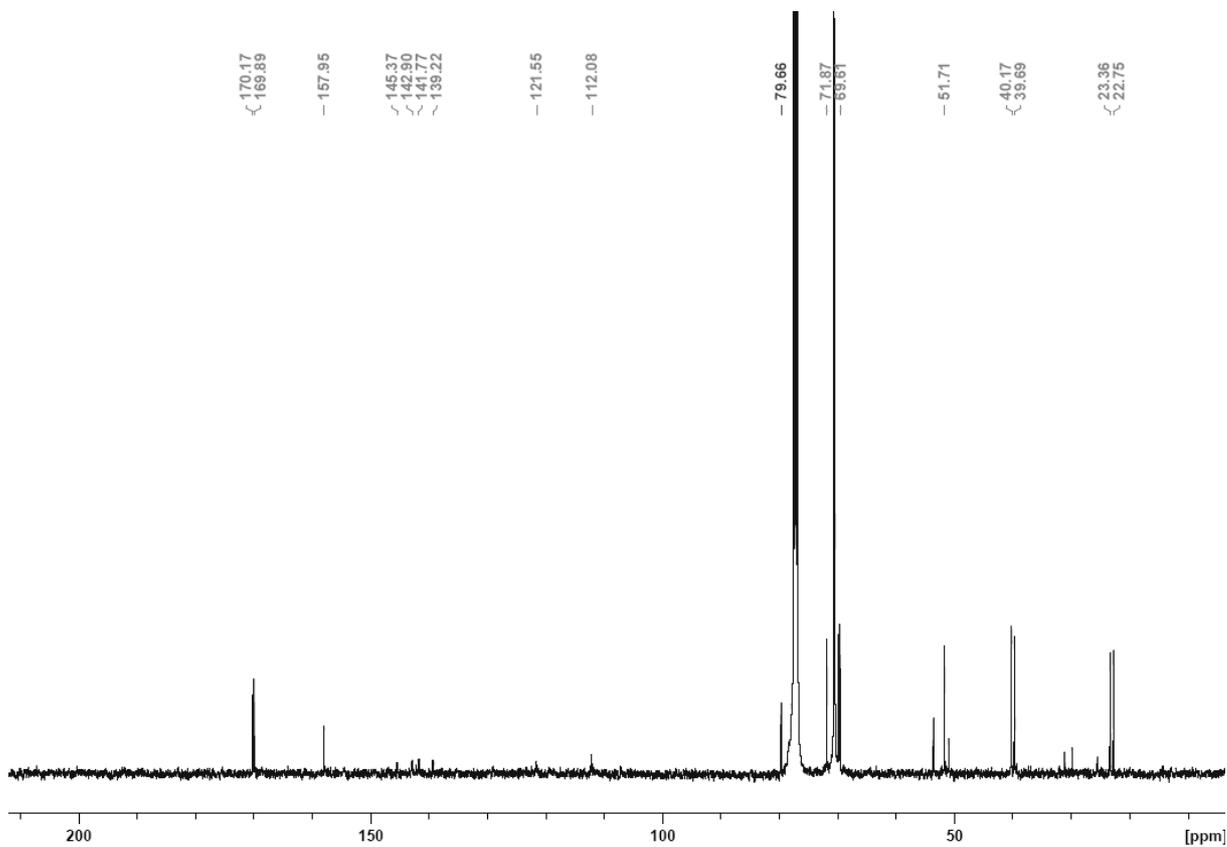
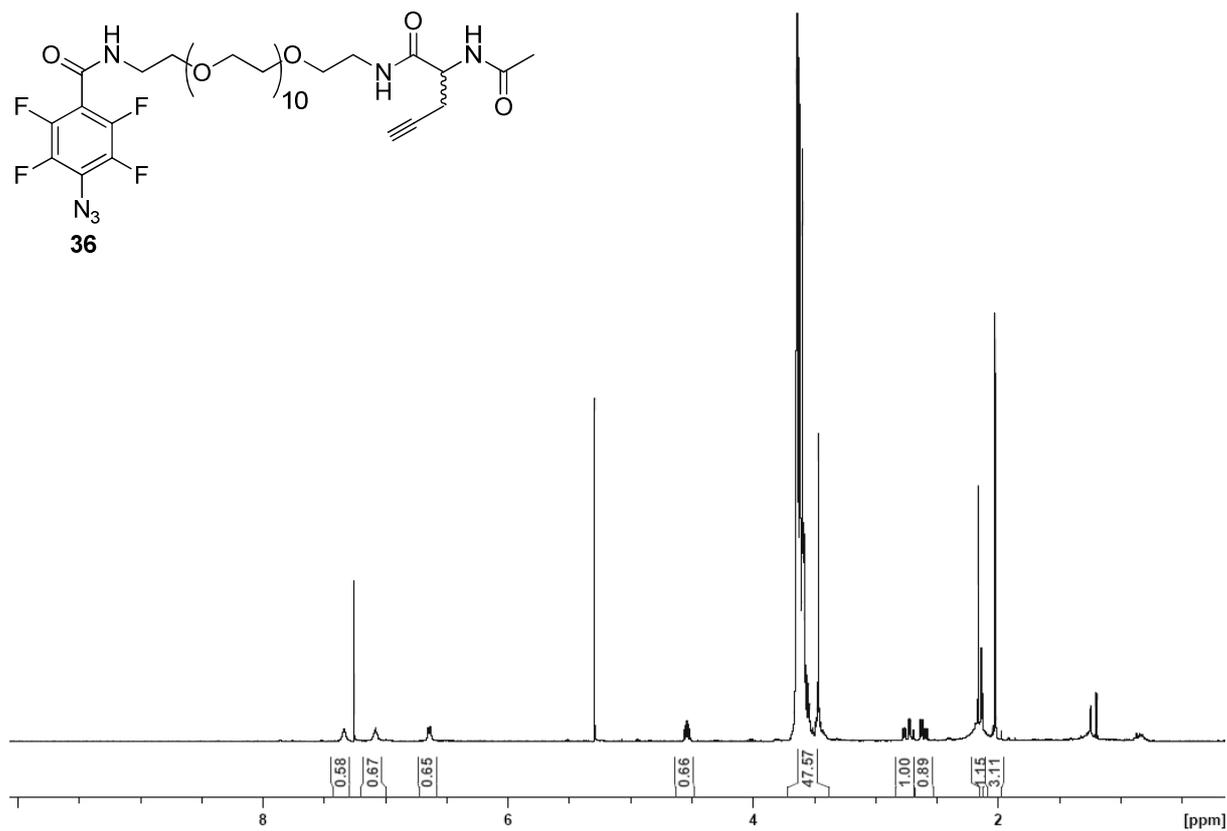
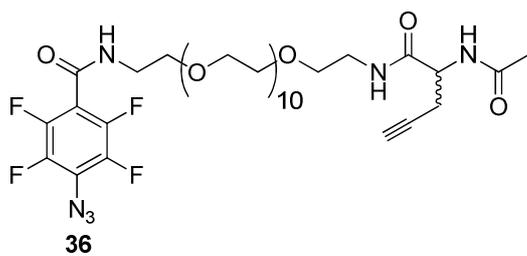
Zur Analyse der Degradationslösungen der Hydrogele auf Saccharid-Abbauprodukte wurden 25 µL der zu untersuchenden Lösung mit Borax (25 mM in H₂SO₄, 100 µL) versetzt und zehn Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten auf Raumtemperatur gehalten und Carbazol (0.125% in Ethanol, 50 µL) wurde zugegeben. Die Lösung wurde erneut für zehn Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Absorptionen der Proben bei 550 nm gemessen. Die Werte wurden untereinander verglichen.

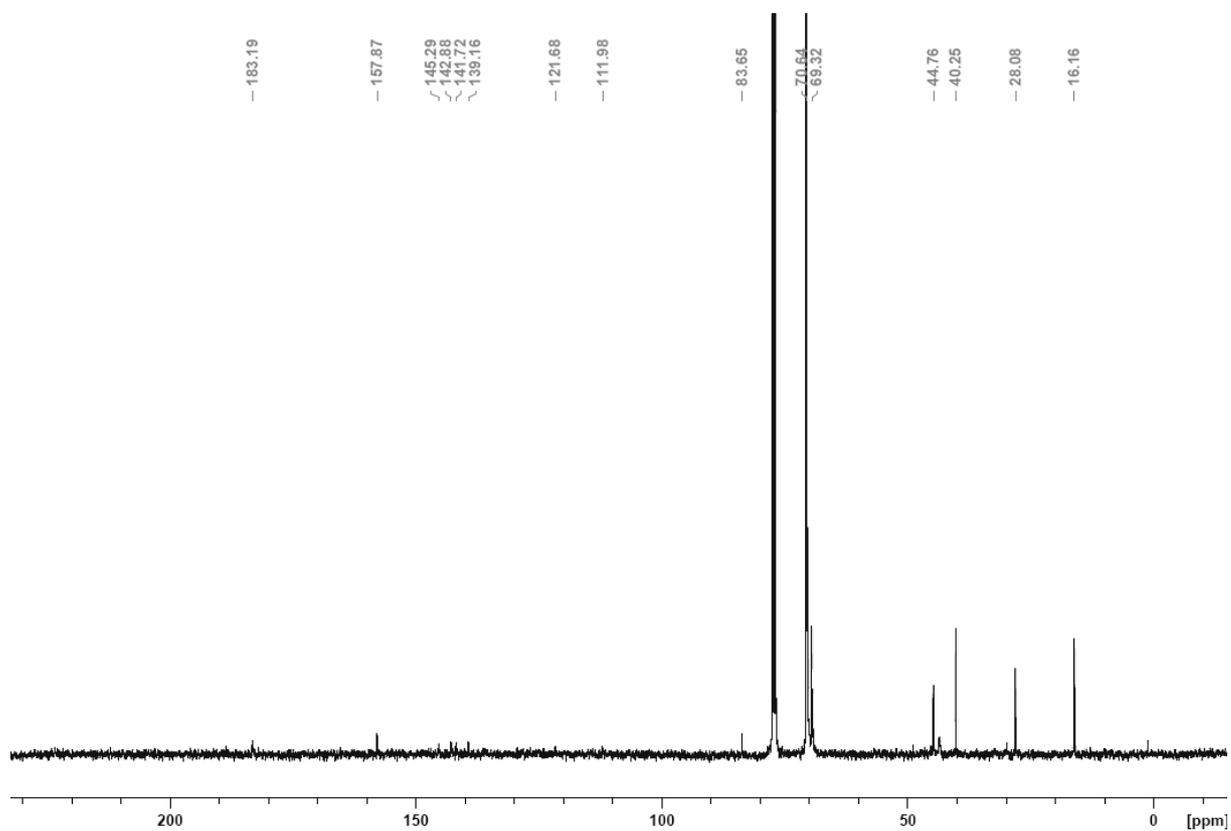
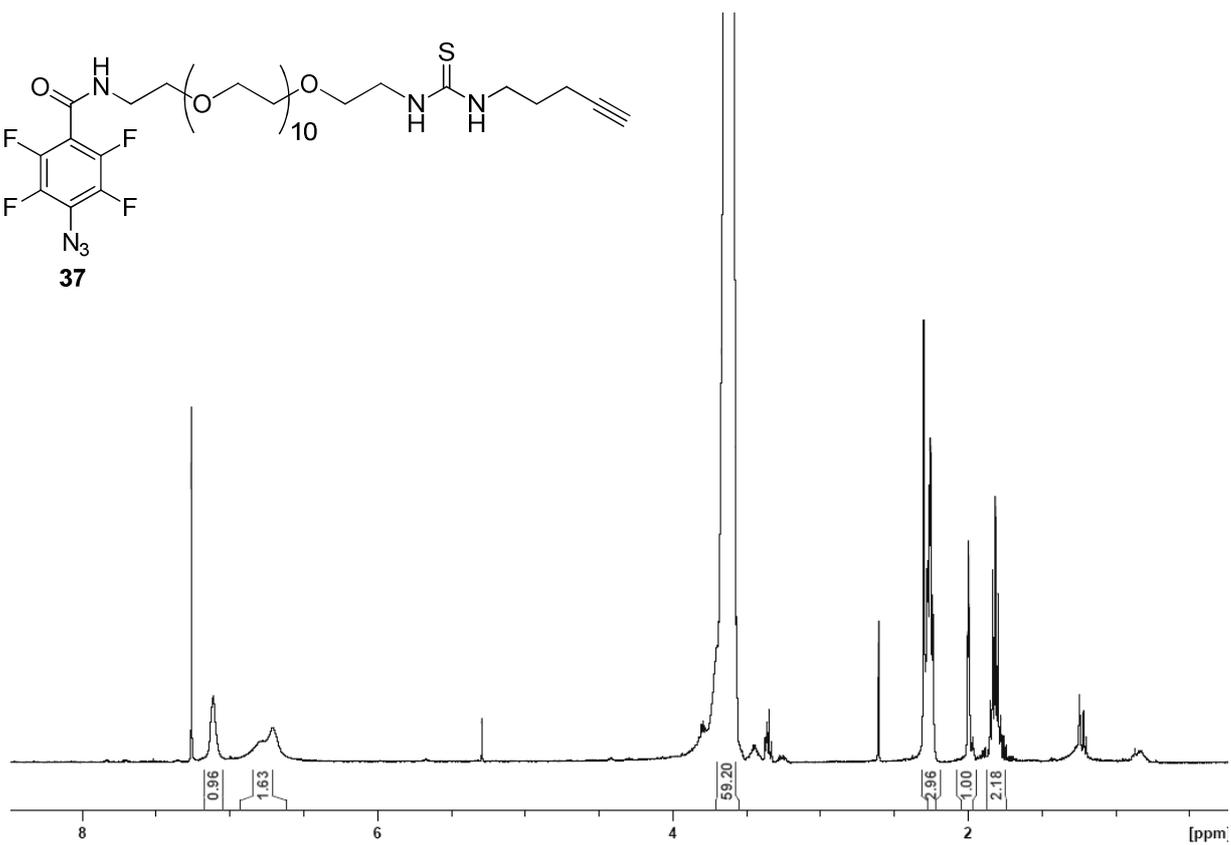
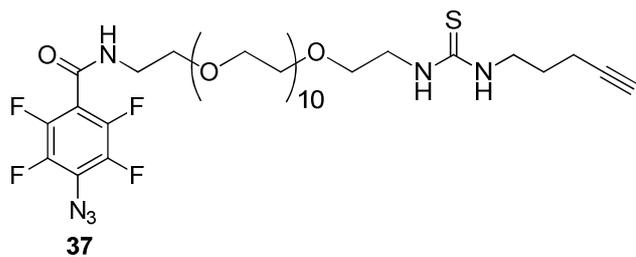
9 Anhang

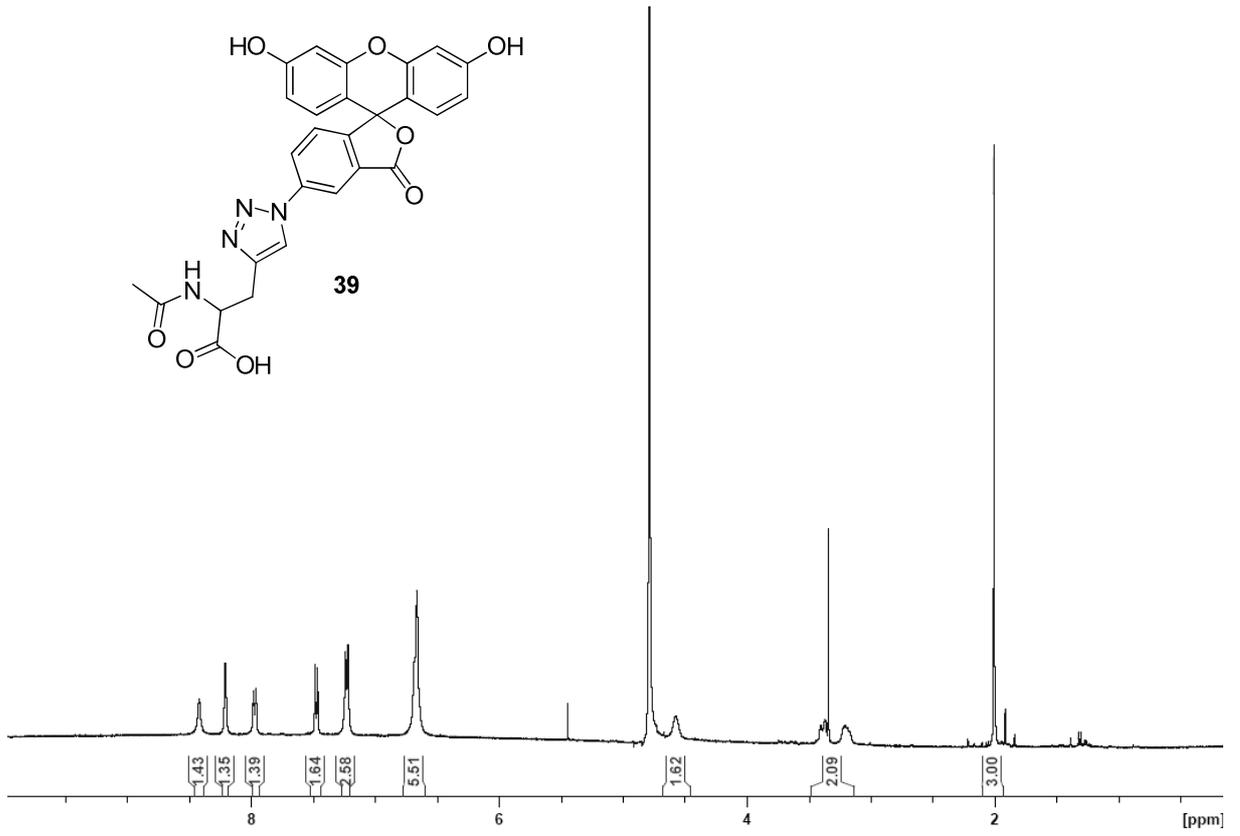
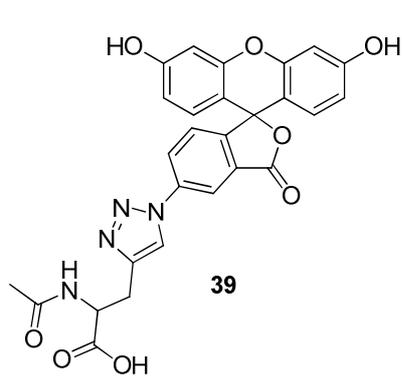


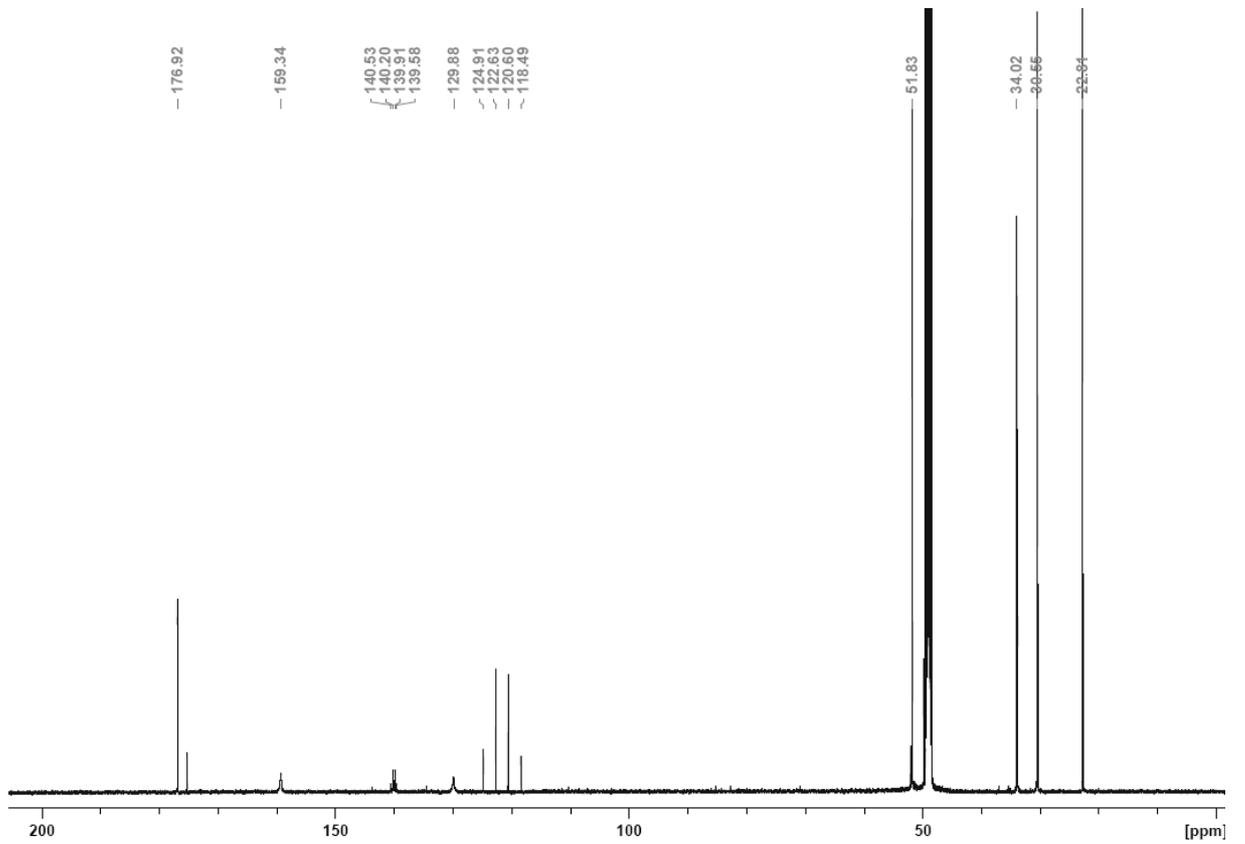
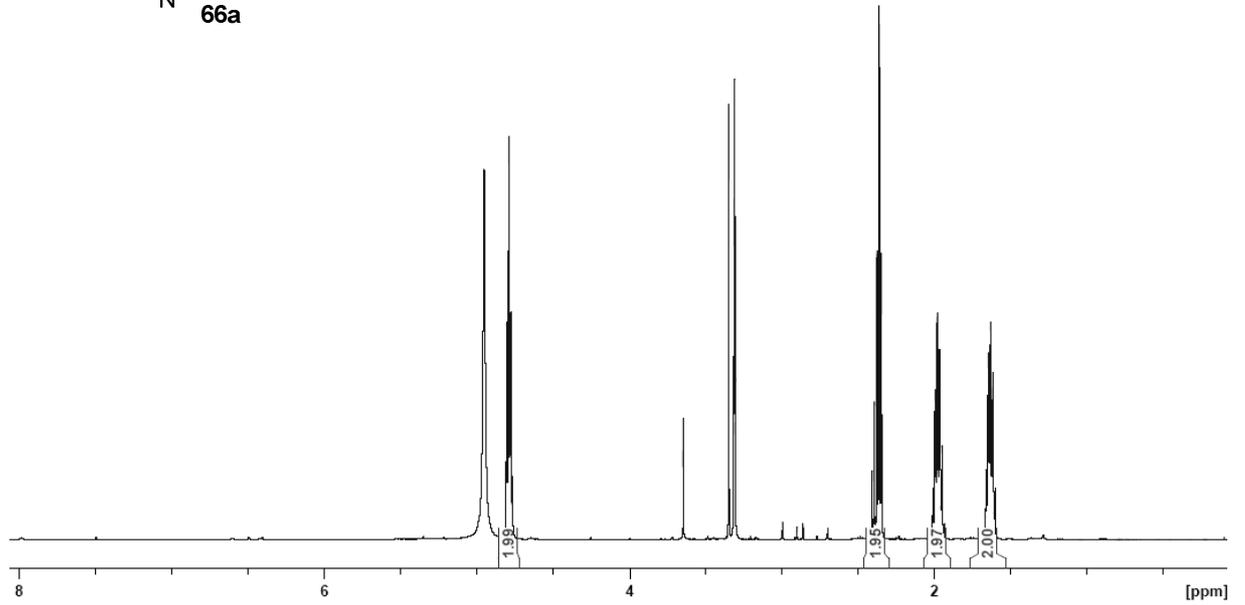
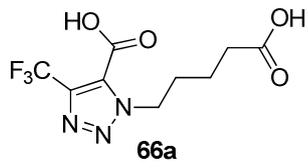


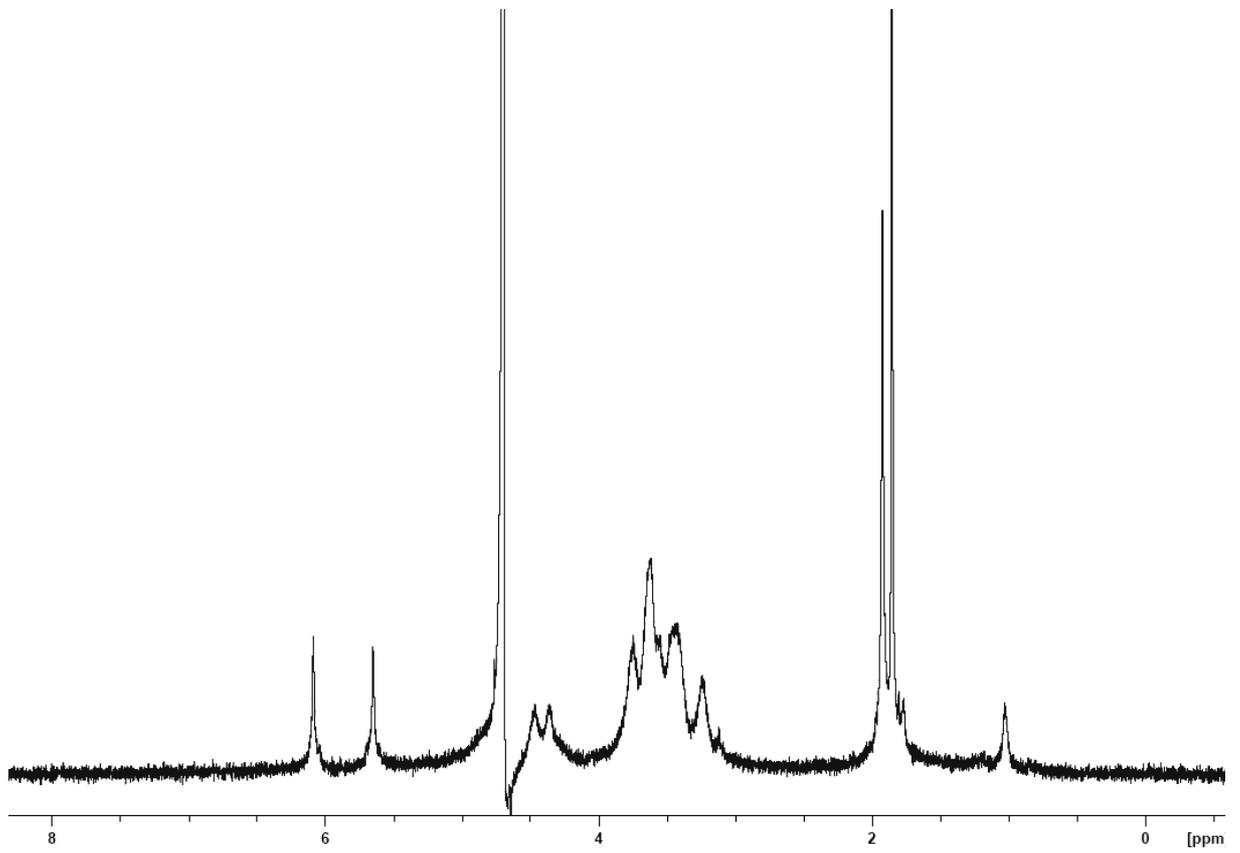
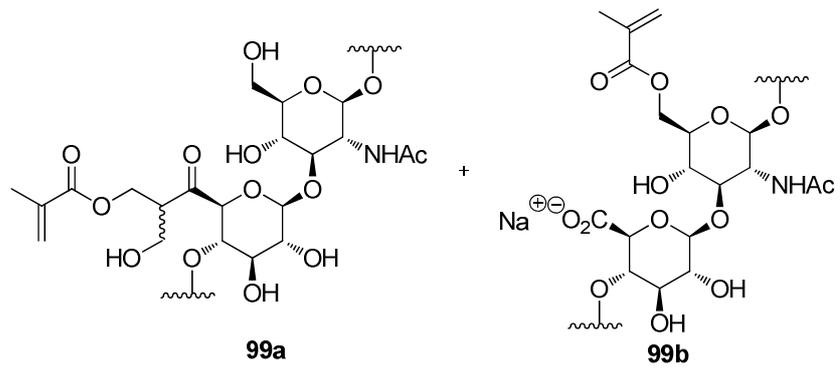


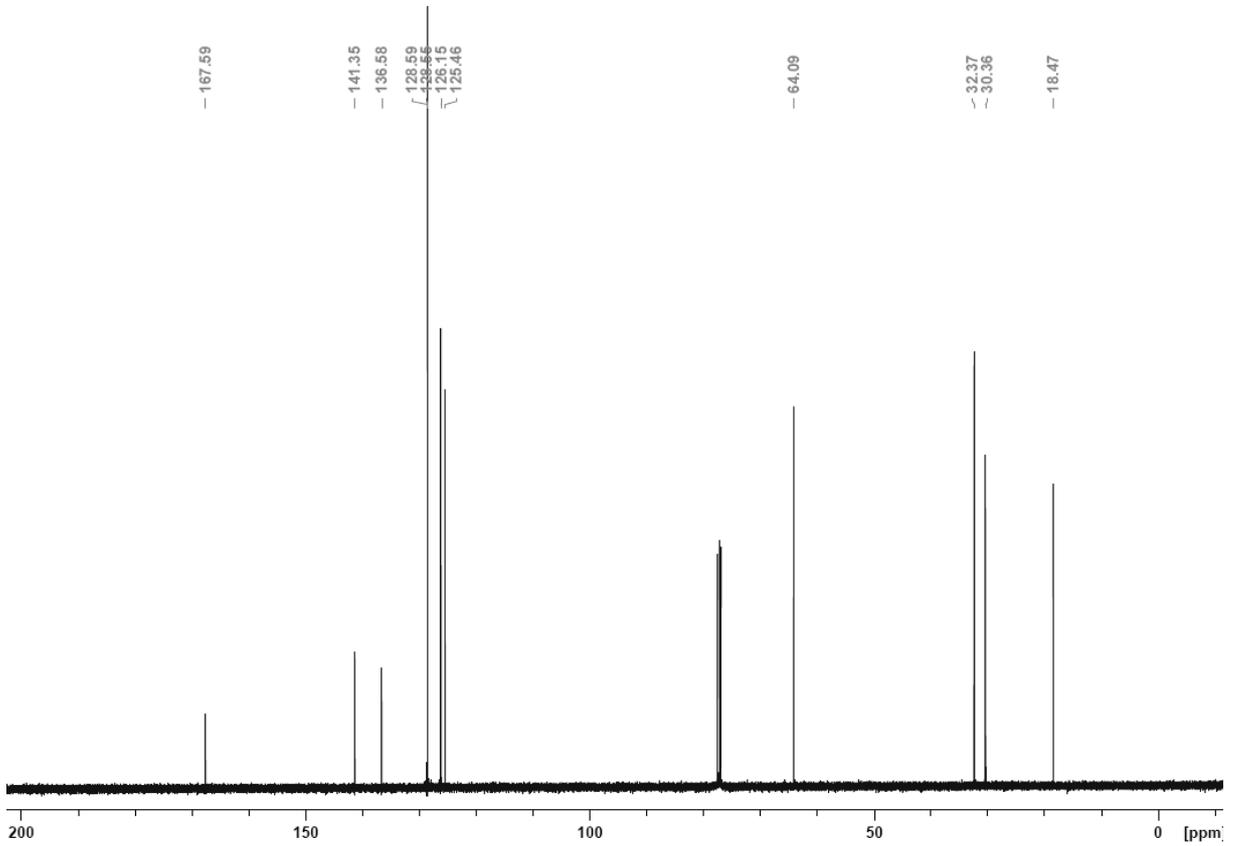
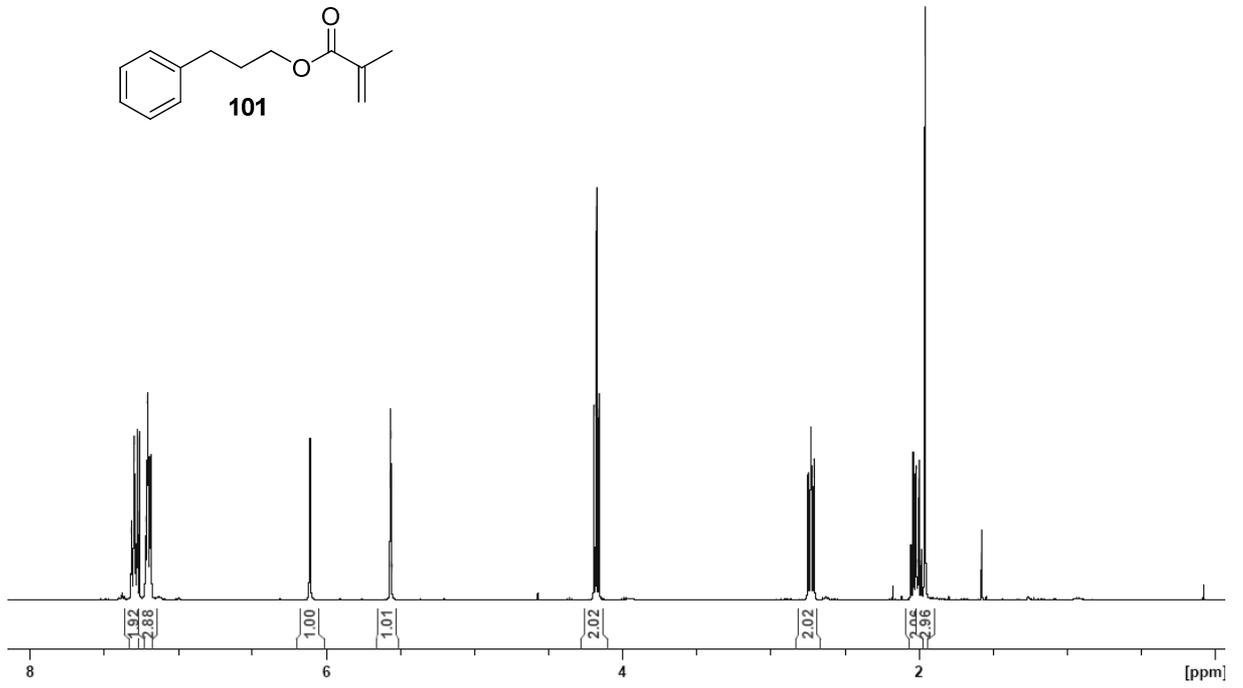
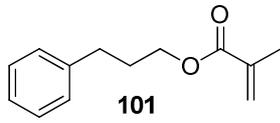


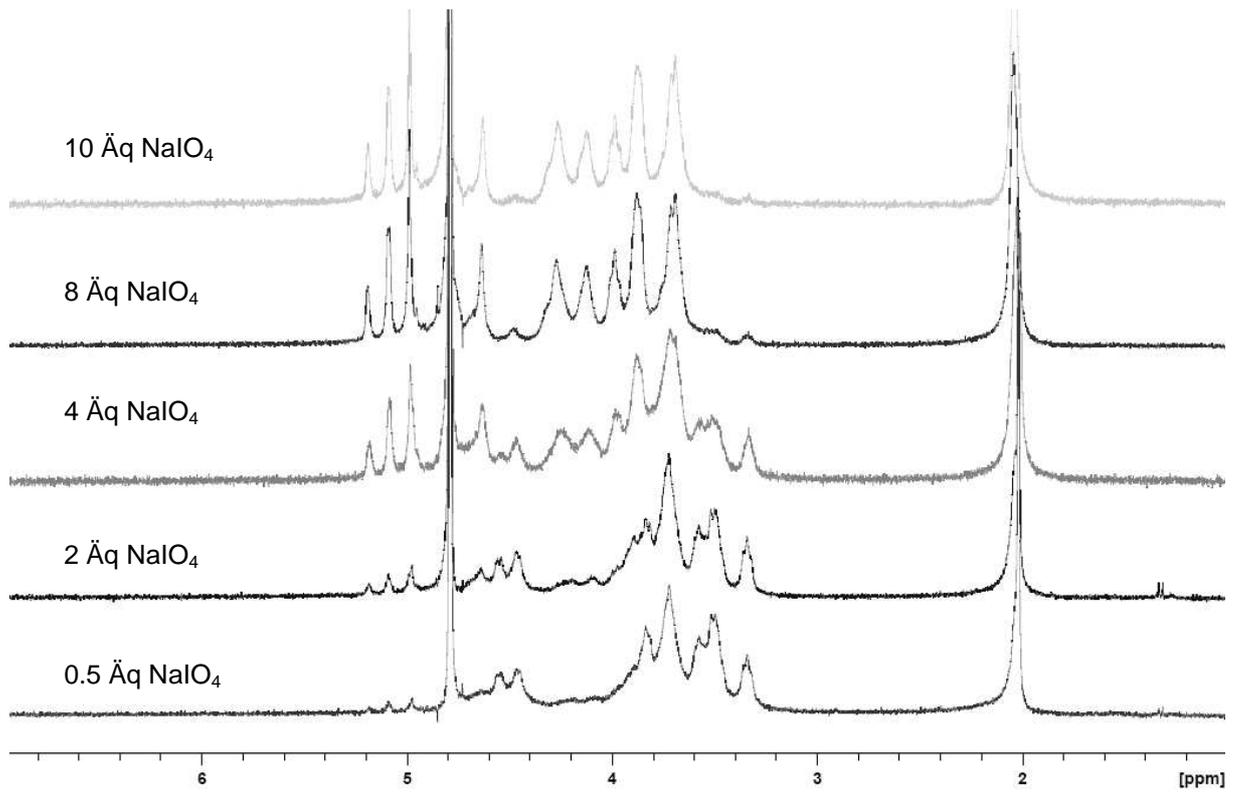
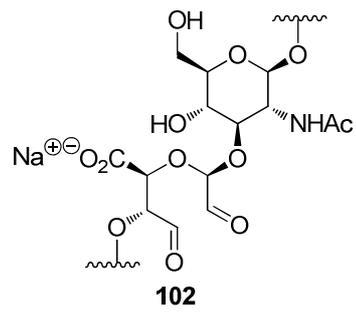


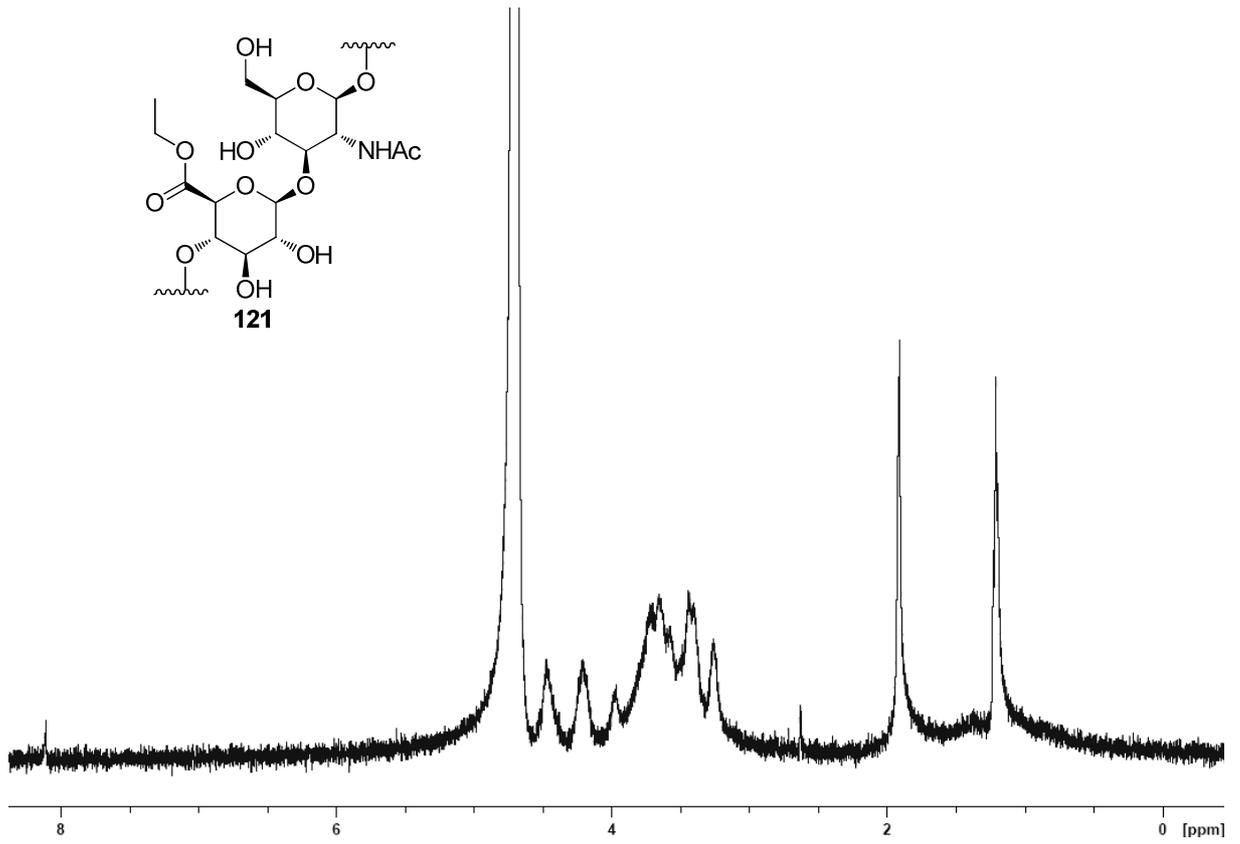
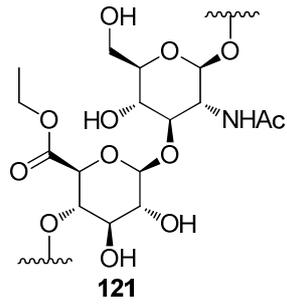


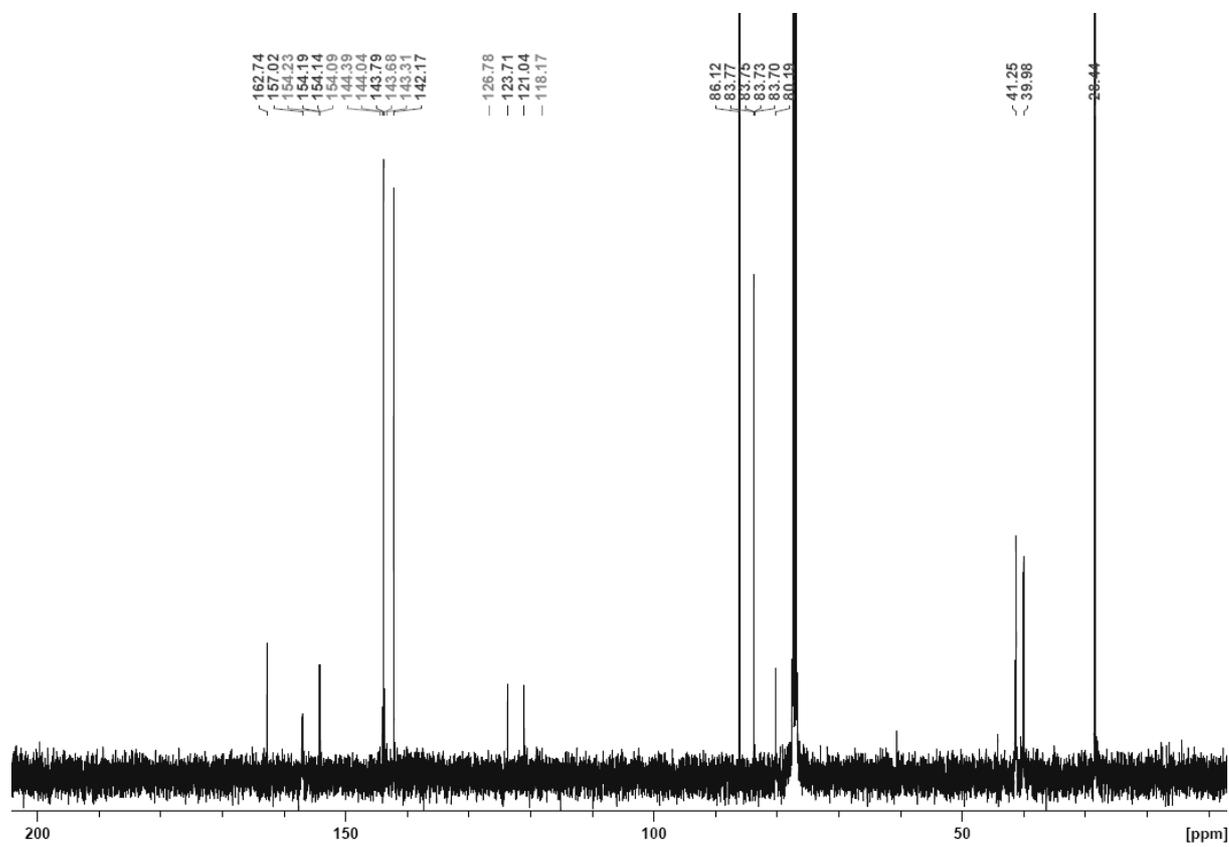
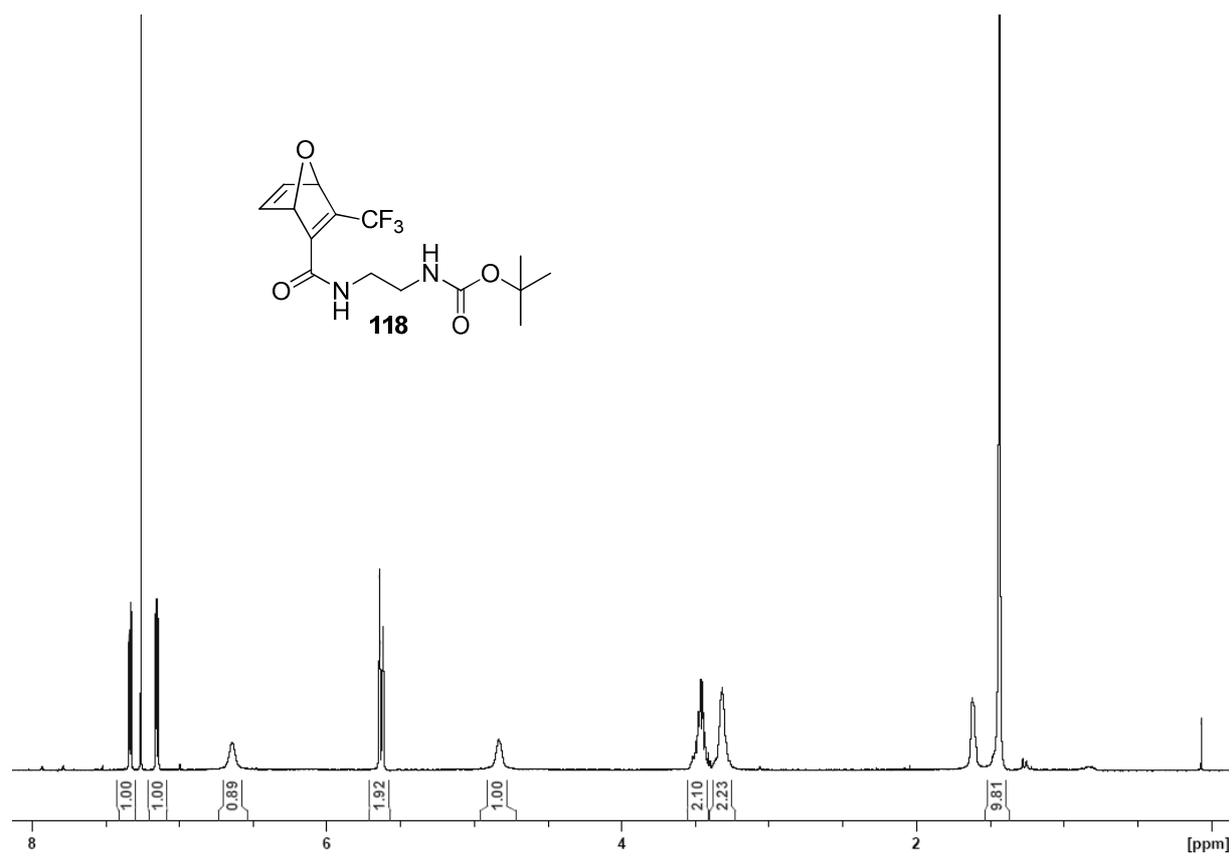


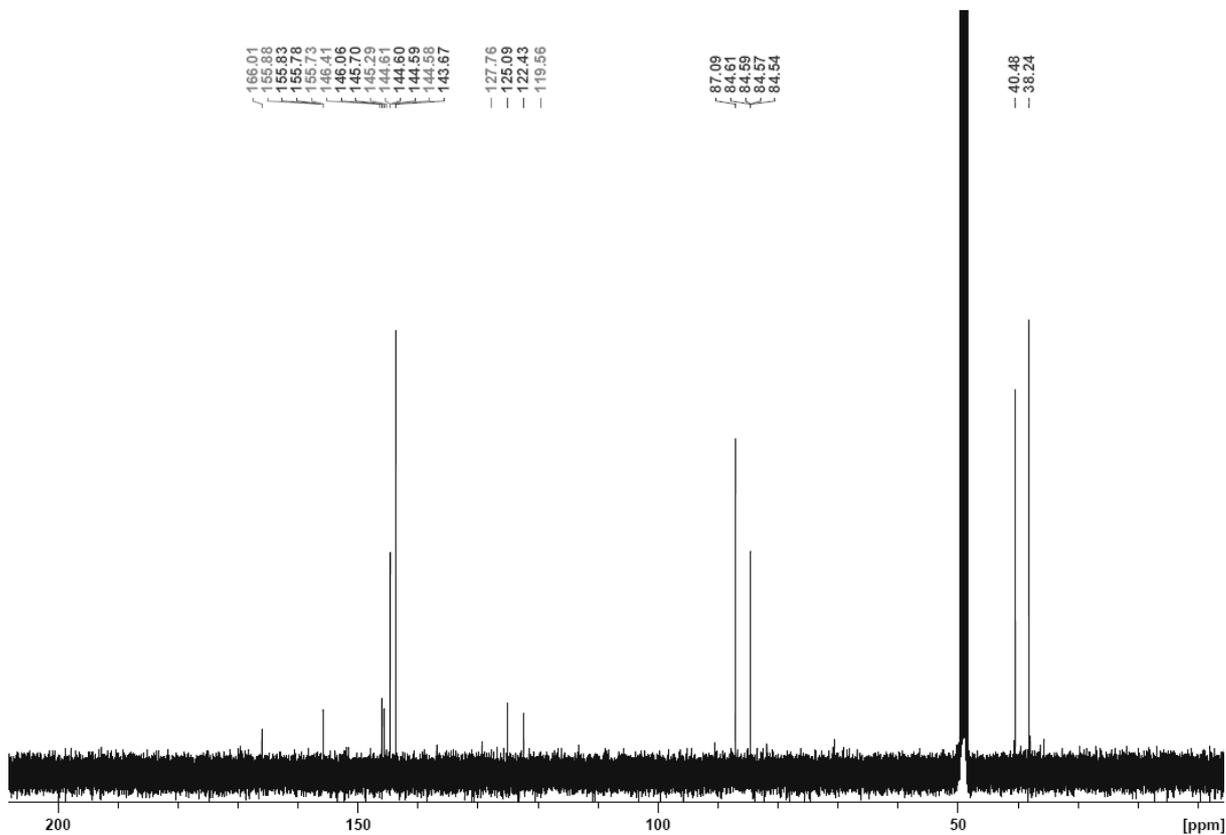
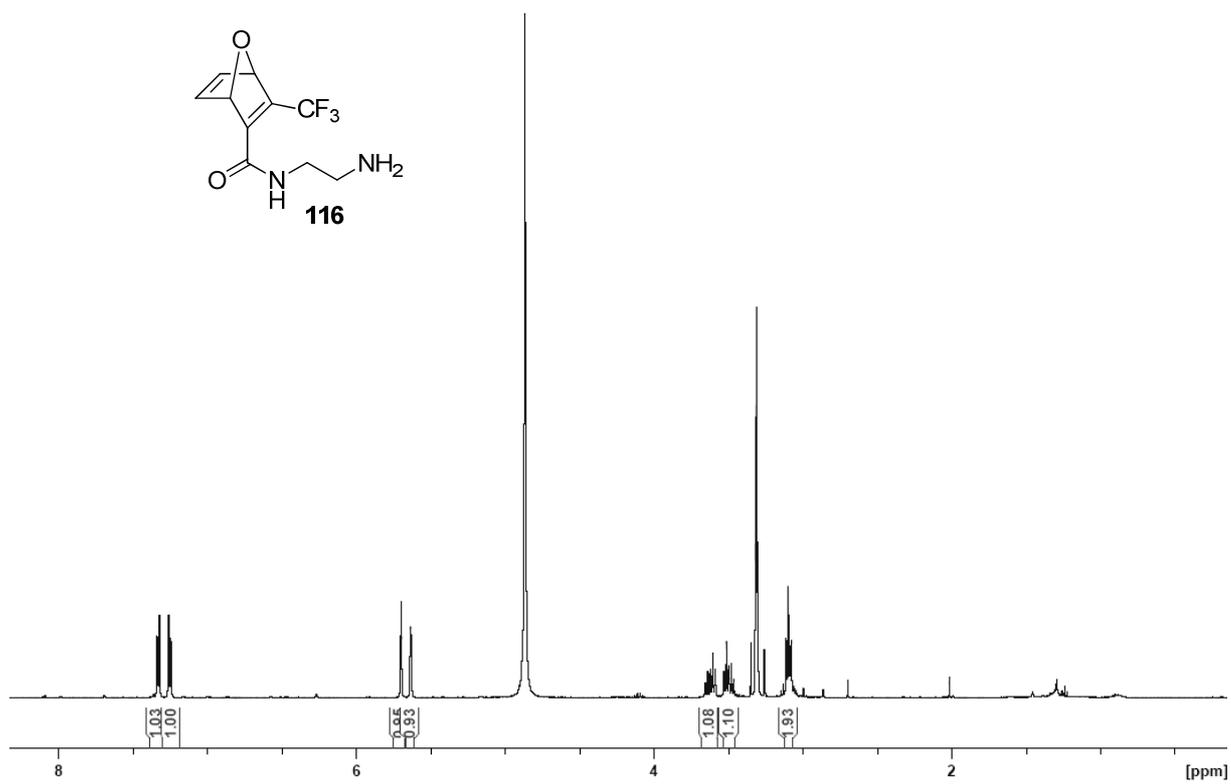
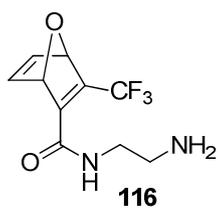


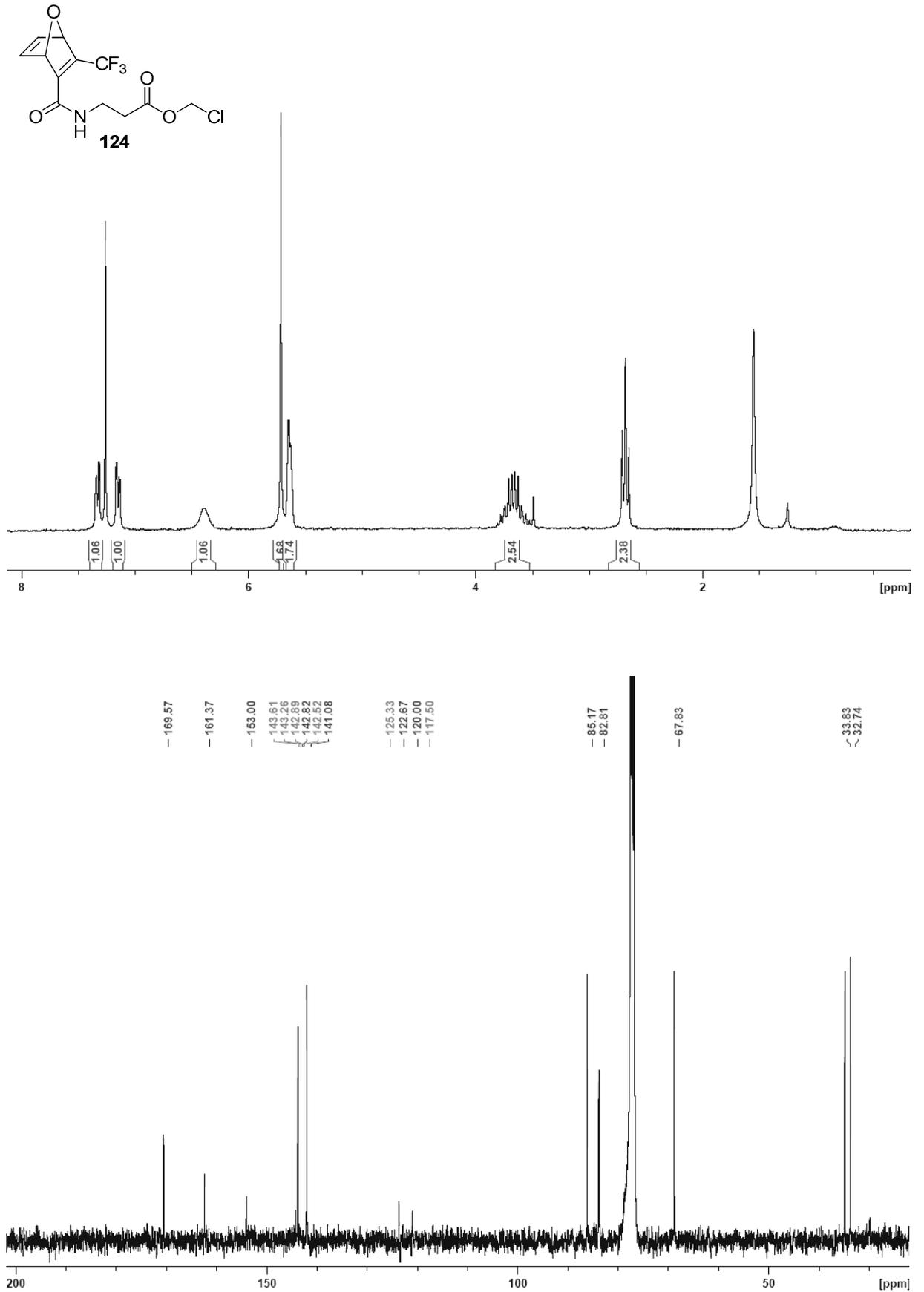


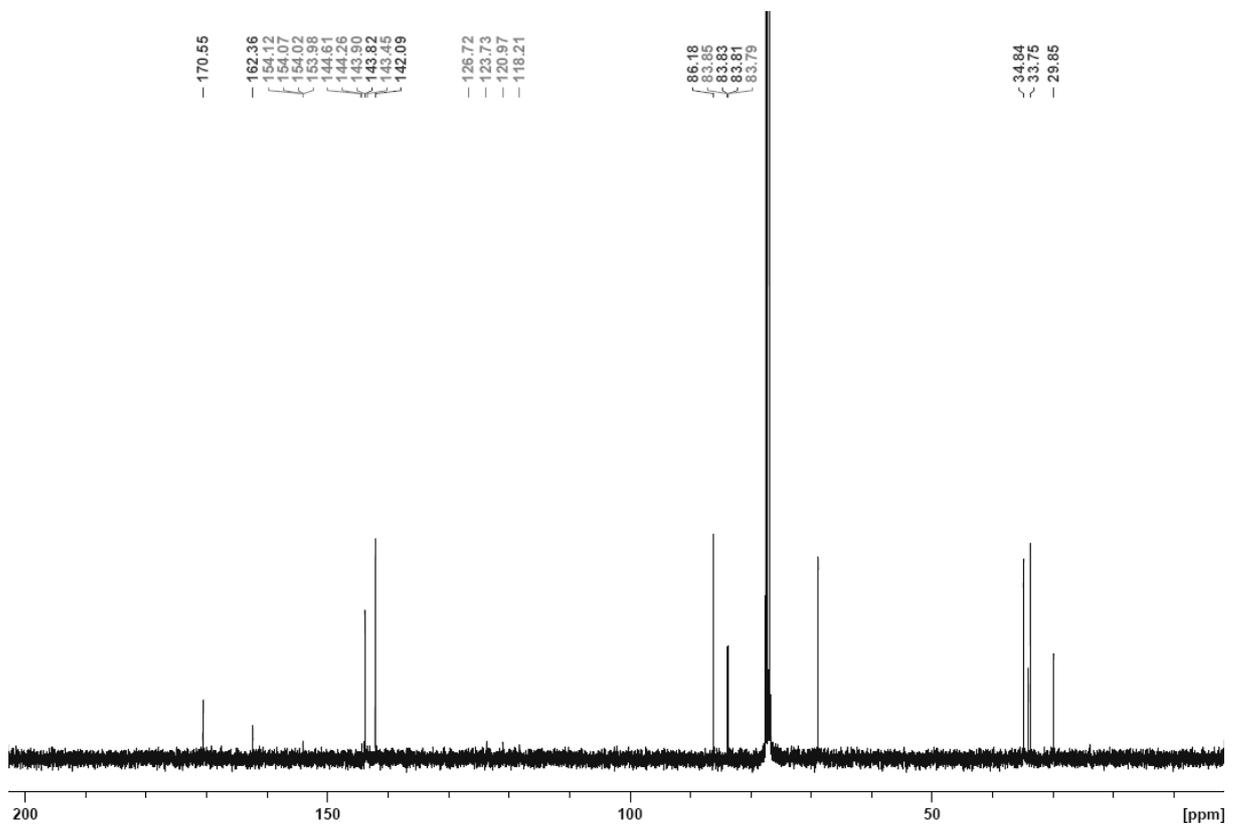
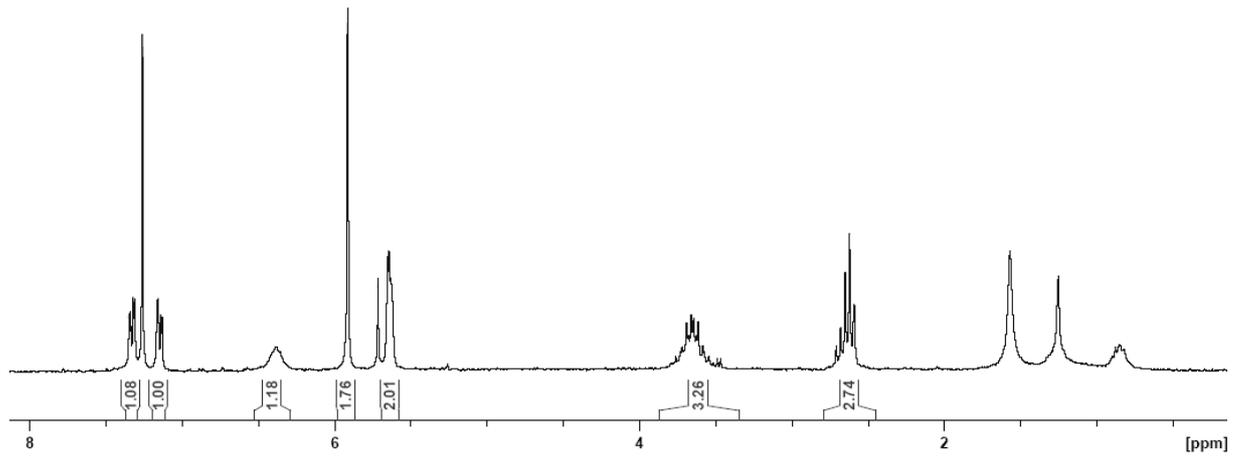
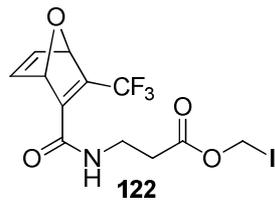


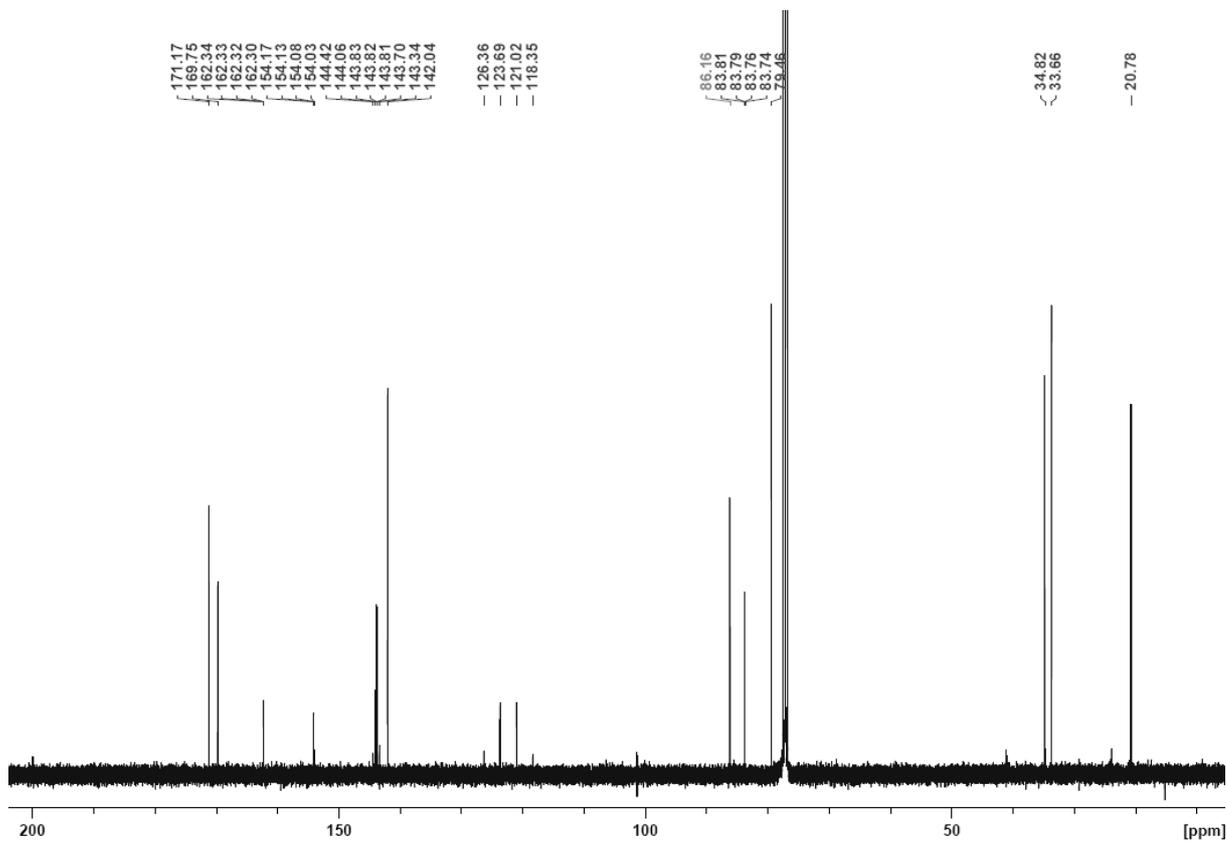
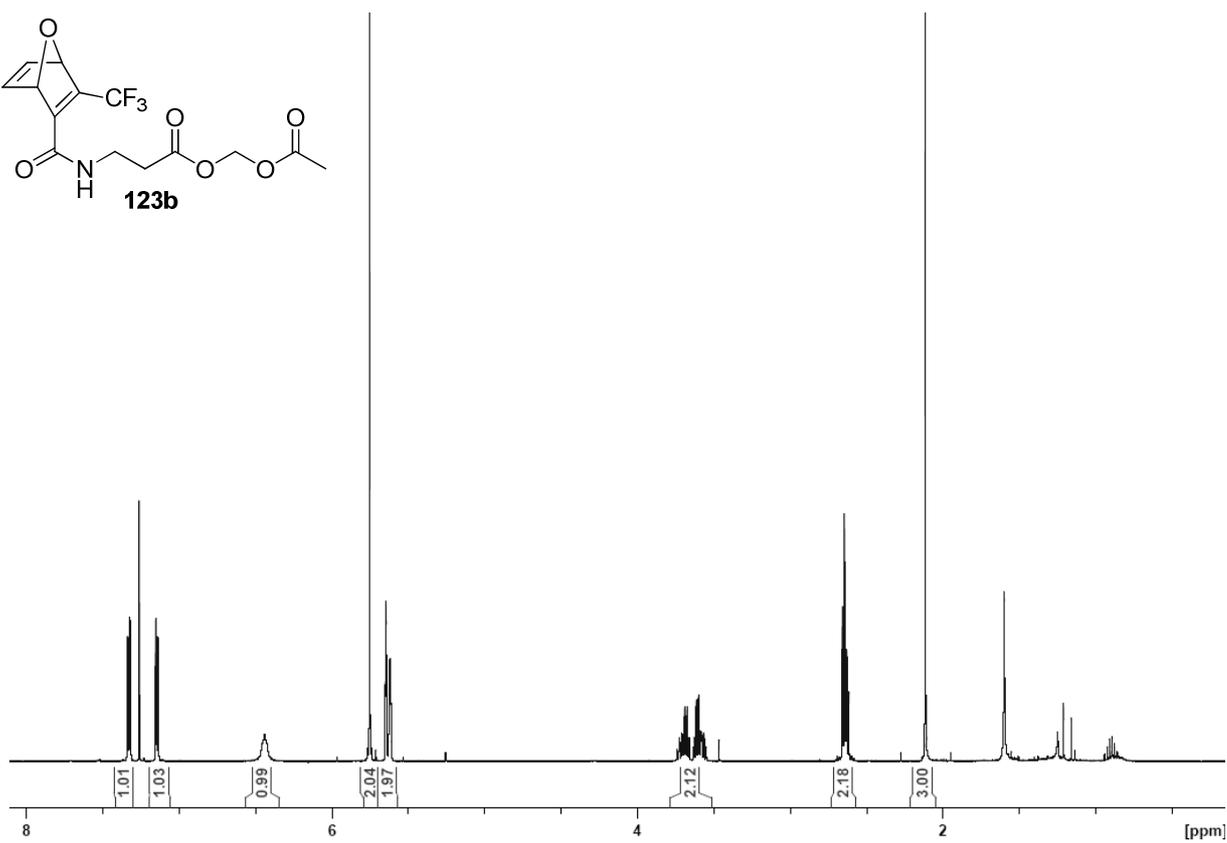
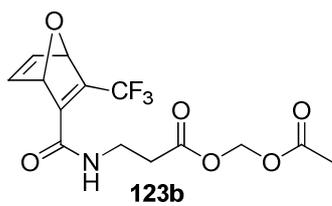


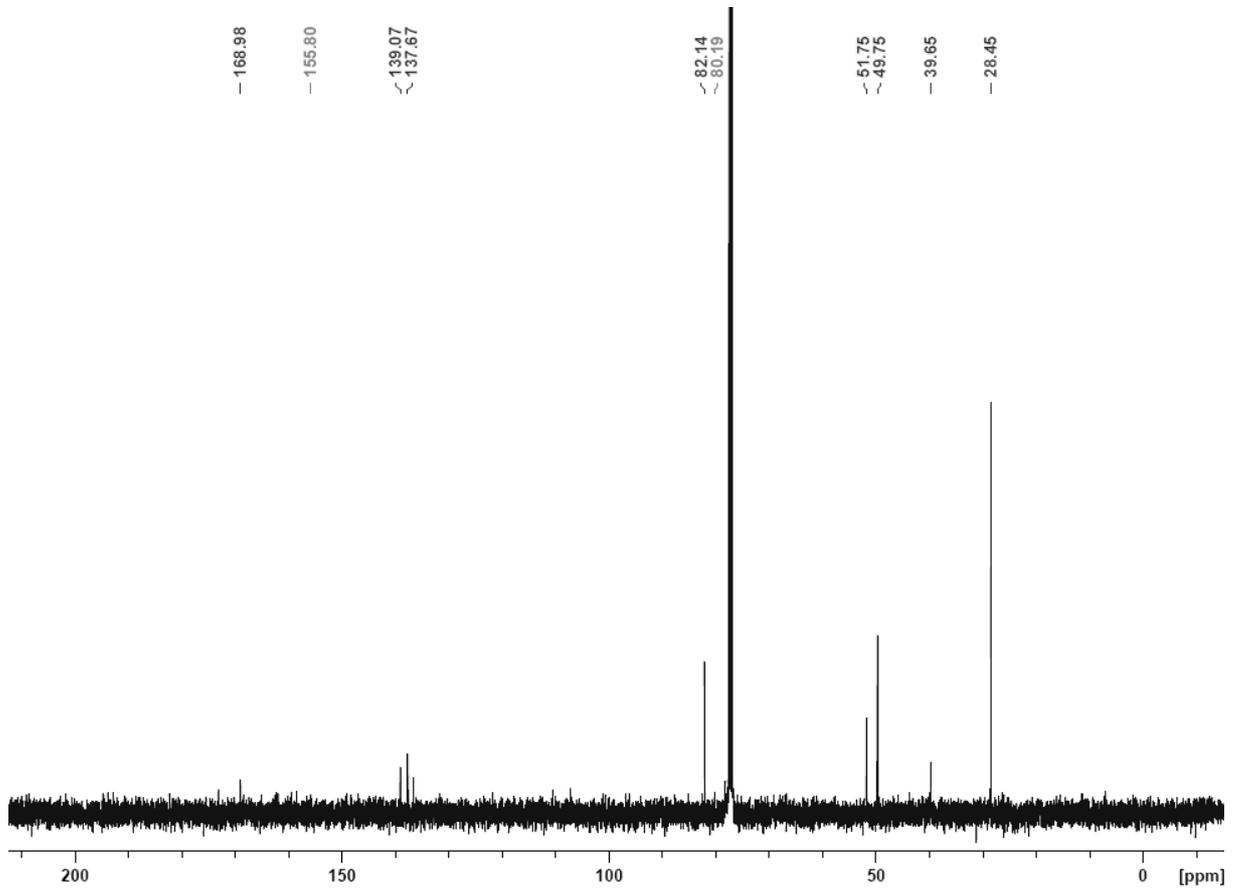
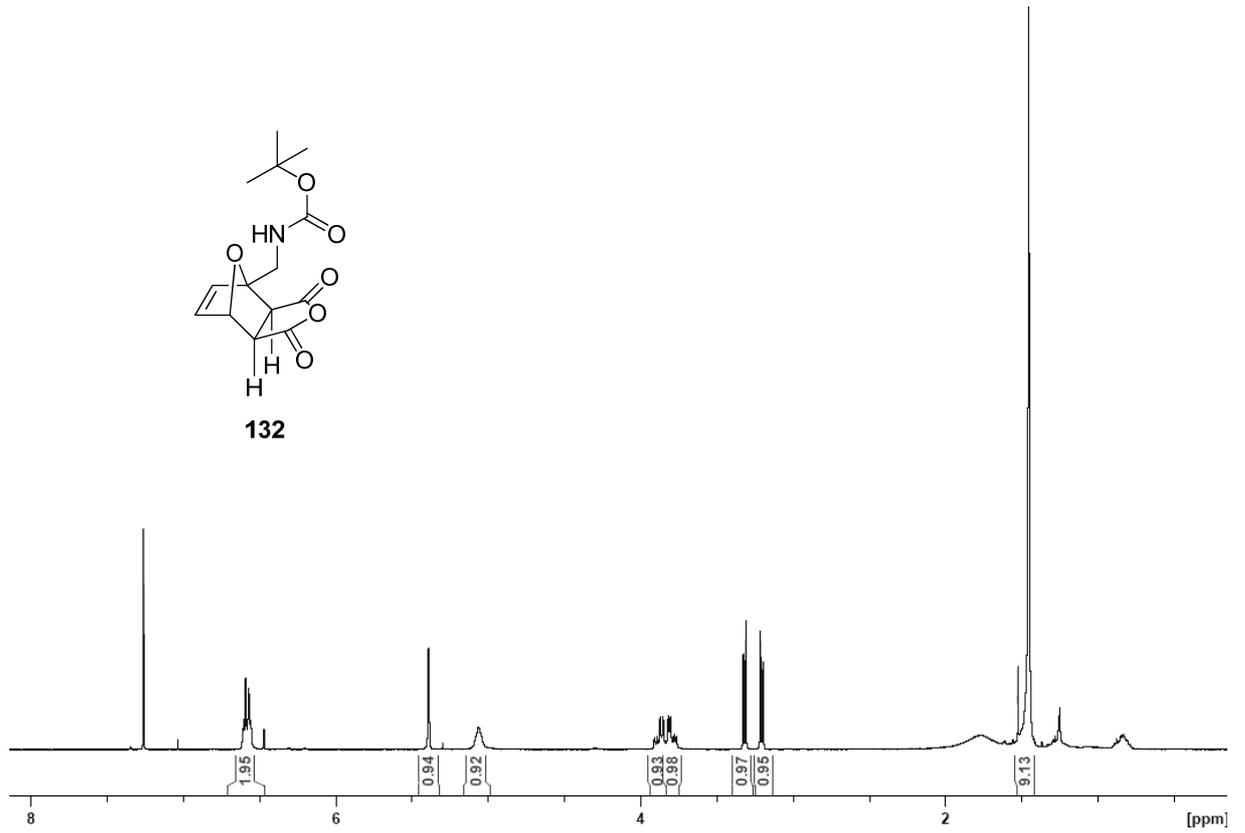
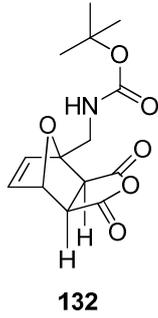


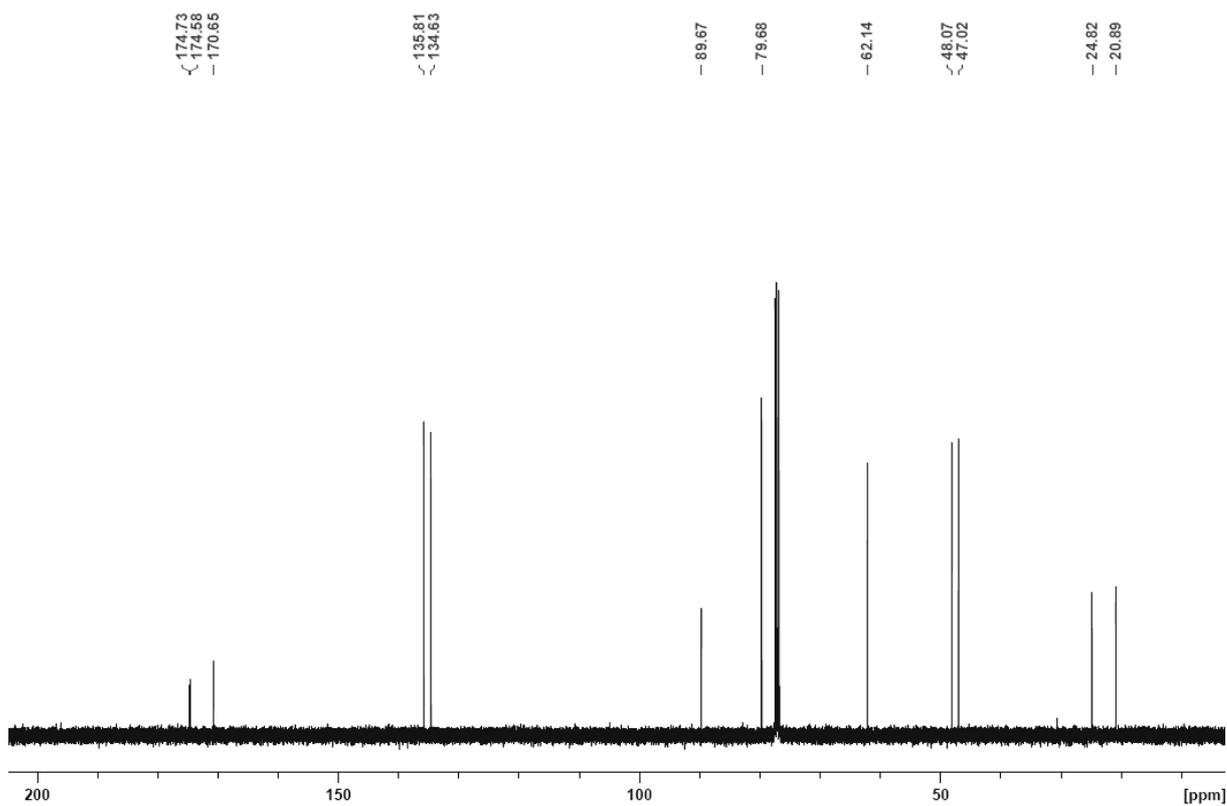
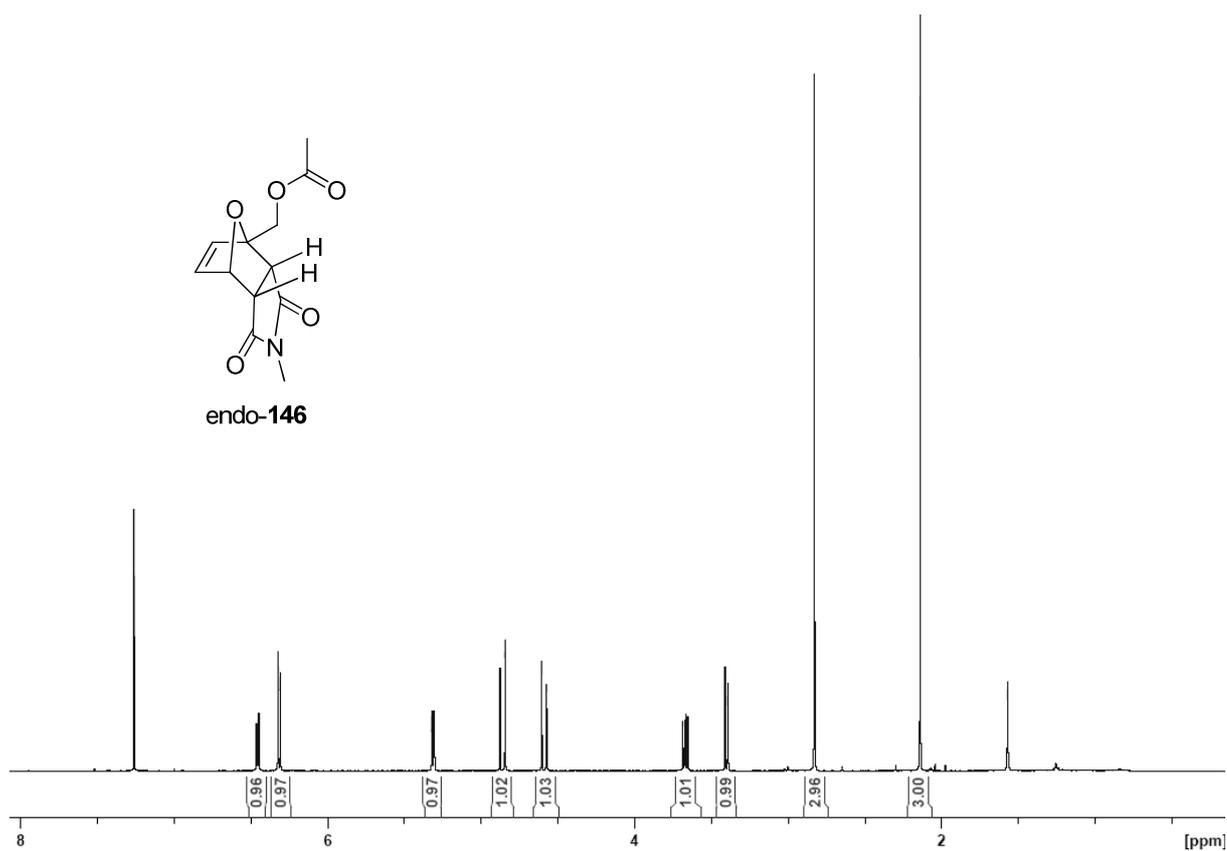
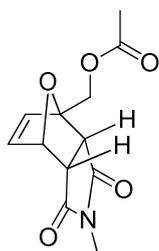


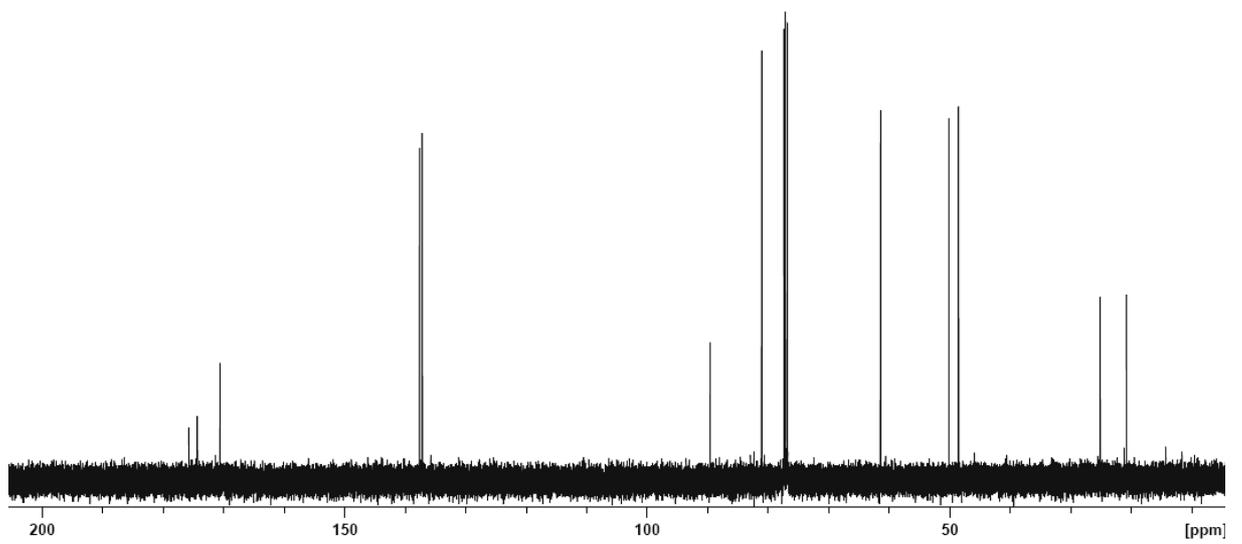
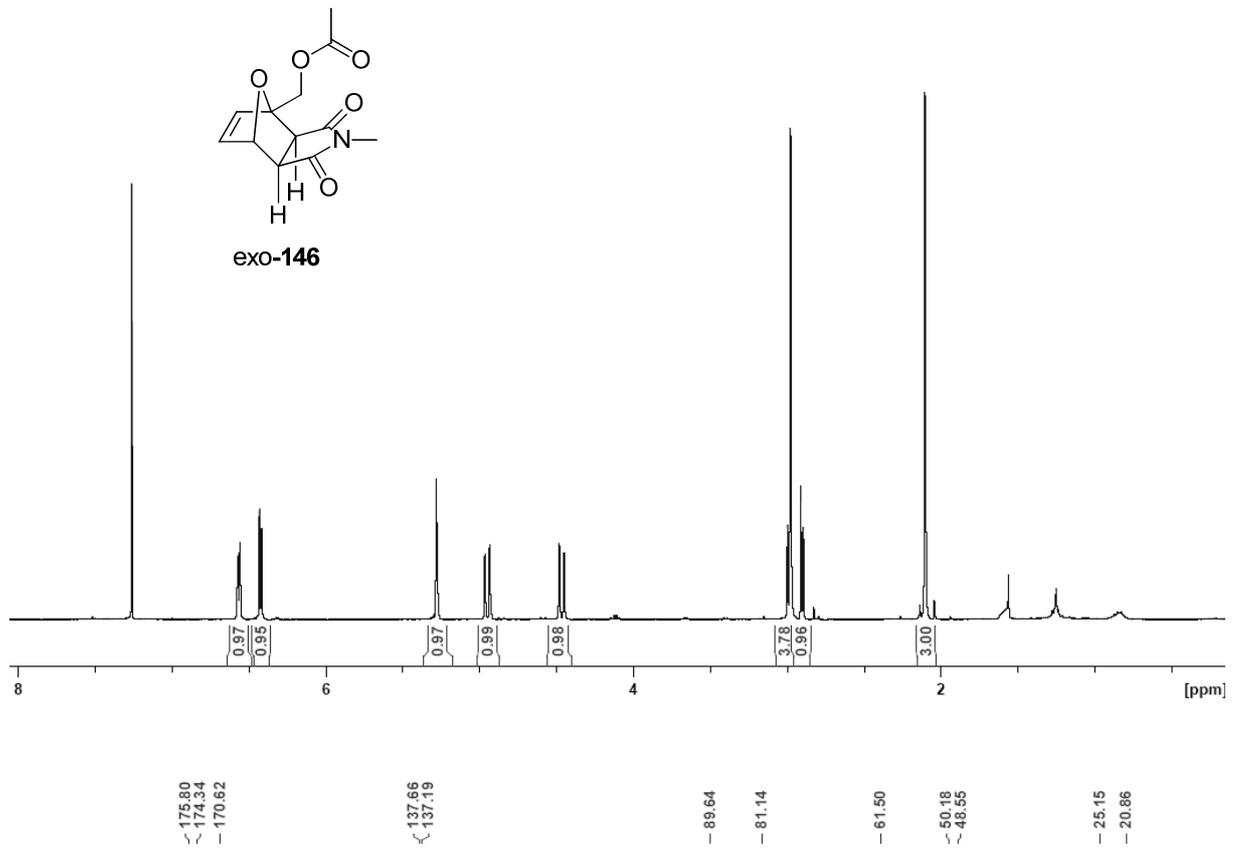


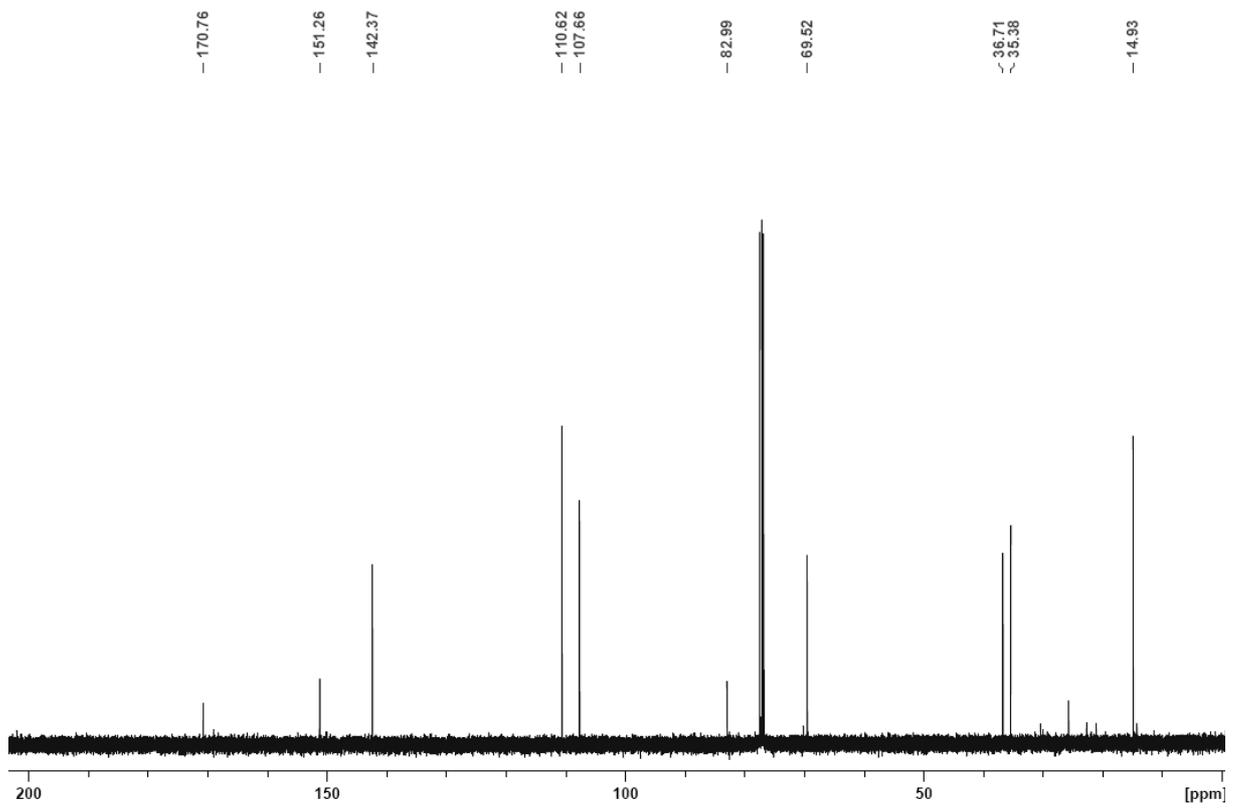
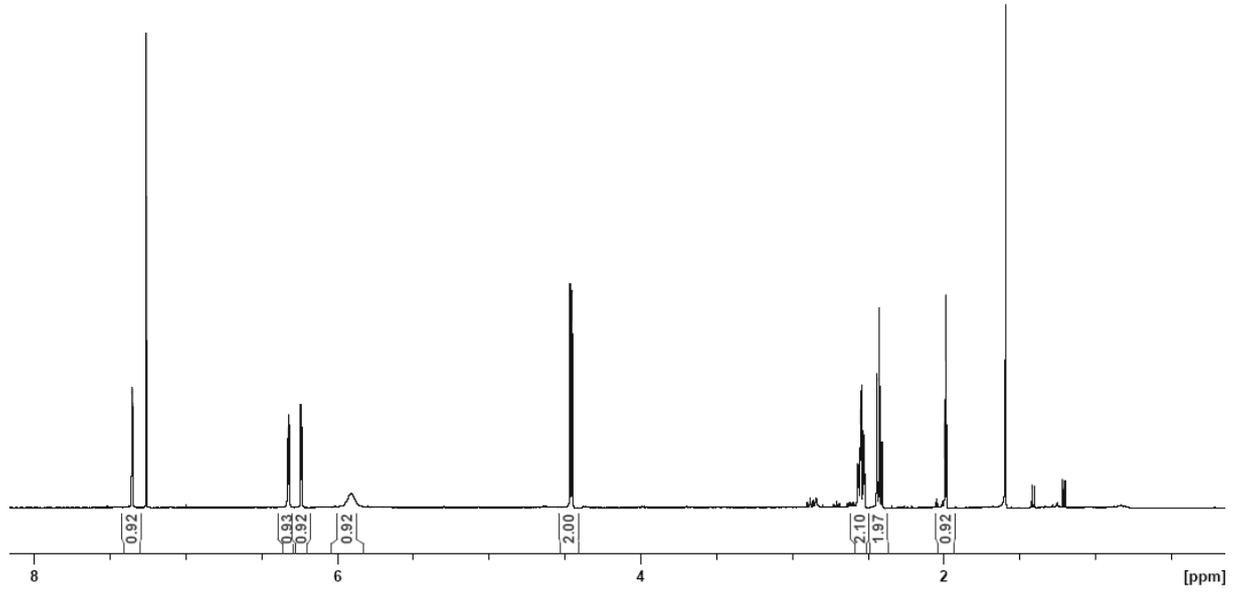
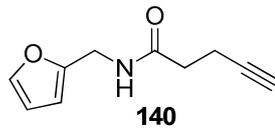


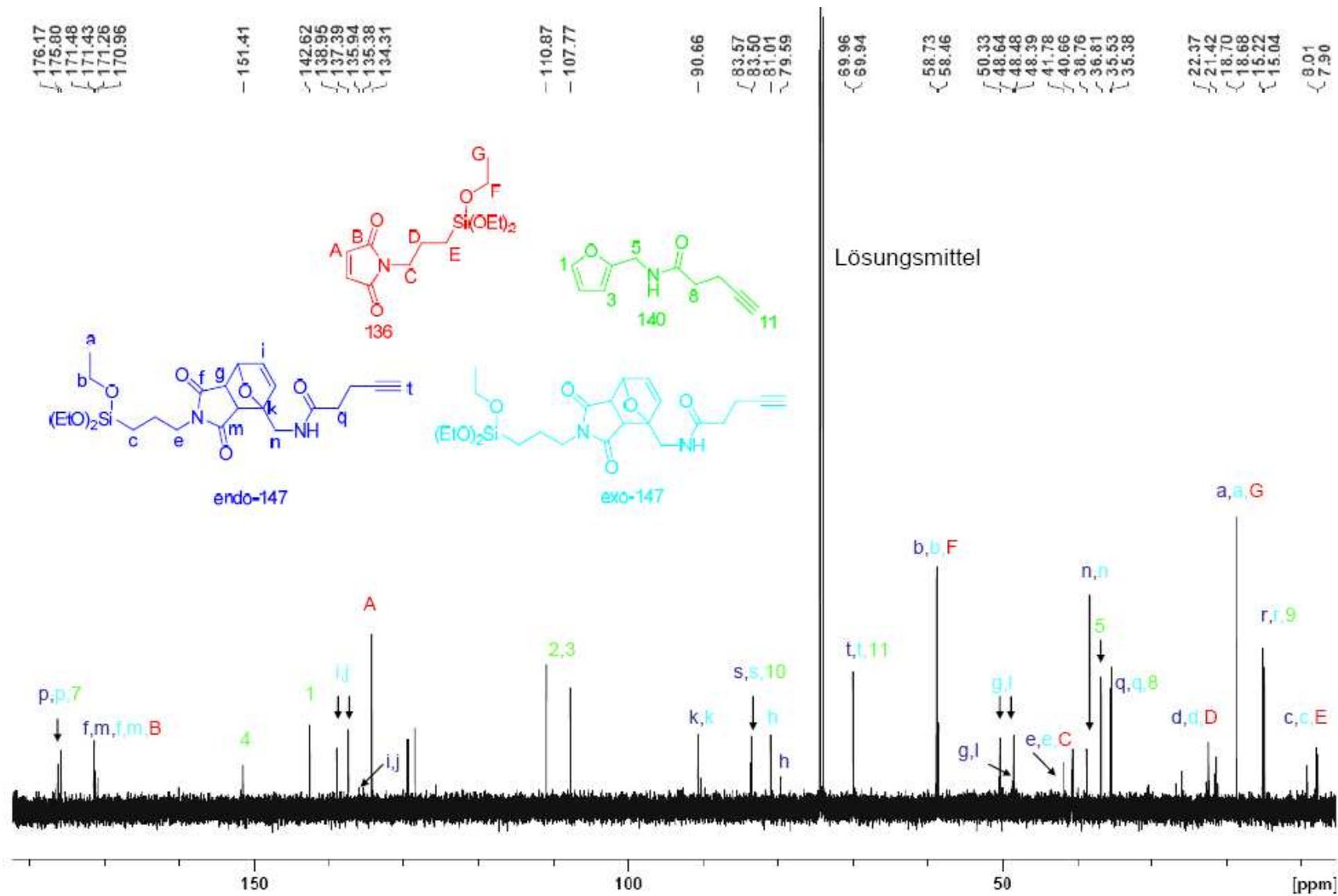












^{13}C -NMR-Spektrum in Tetrachlorethan- d_2 der Reaktion zwischen Maleimid **136** und Furan **140** bei 72 °C (Tabelle 19B)

Danksagung

Meine erster Dank gilt meinen zwei Doktorvätern, Prof. Andreas Kirschning und Dr. Gerald Dräger, für die spannenden Projekte an denen ich während meiner Dissertation arbeiten durfte und für die wissenschaftlich Freiheit, die ich im Rahmen dessen genossen habe. Vielen Dank auch für die Unterstützung bei den kleinen und großen Dingen des Alltags und für die Möglichkeit mich mit Kollegen auszutauschen; sei es innerhalb von *rebirth* oder auf den Konferenzen.

Vielen Dank an Prof. Mike Boysen für die Übernahme des Korreferats und an Prof. Ulrich Martin für die Übernahme der Drittprüferschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Laborkollegen Andreas Krause bedanken, ohne dessen ehrliche Worte und wissenschaftlichen Einsatz diese Arbeit sicher um einige Seiten dünner geworden wäre. Danke auch an meine anderen Labor/ Bürokollegen: Jens Wegner, Anne Pieper, Dr. Carsten Zeilinger für die schöne Zeit und an Dr. Jiri Palecek für die Bereitstellung des RGD-Peptids.

Außerdem möchte ich dem ganzen Arbeitskreis für die nette Atmosphäre in der Gruppe und für viele gemeinsame Kaffee/ Teepausen und Arbeitskreisausflüge danken. Danke, dass ihr mich auch als Nicht-Hannoveranerin so nett bei euch aufgenommen und mir viele Fragen beantwortet habt. Es war eine schöne Zeit mit euch.

Vielen Dank an Dr. Gerald Dräger, Jana Franke, Anja Heutling, Andreas Kipke, Andreas Krause, Dr. Nadin Schläger, Thomas Schmidt und Dr. Jens Wegner für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch ohne unsere Kooperationspartner, besonders in *rebirth*, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Meine besonderer Dank gilt Dr. Christian Hess für die nette und unbürokratische Zusammenarbeit auf dem Gebiet der künstlichen Lungen. Julia Dahmann und Ihrer Gruppenleiterin Dr. Ina Gruh danke ich für die vielen biologischen Untersuchungen im Bereich des kardiomyocidalen *tissue engineerings* und die vielen erhellenden Gespräche. Außerdem danke ich den vielen anderen: Dr. Bettina Wiegmann (PMP-Röhren und Herzschrittmacher), Dr. Ivonne Bartsch und Dr. Frank Witte (*in vivo* Abbau der Hydrogele), Dr. Aleksandr Ovsianikov und Prof. Boris Chichkov (Laserstrukturierung von Hydrogelen), Dr. Stefanie Sandvoß, Prof. Michael Binnewies (magnetische Nanopartikel), die Gruppe um Prof. Herbert Pfnür (Unterstützung bei den XPS-Messungen), Dr. Andreas Knospe (PLASMATREAT)....

Außerdem danke ich den Damen aus dem Sekretariat: Monika Griese, Kristina Struckmeier und Christine Bartetzko für den reibungslosen Ablauf bei bürokratischen Fragen.

Den Mitarbeitern der spektroskopischen und spektrometrischen Abteilungen sowie allen Leuten, die dafür sorgen, dass das Institut „funktioniert“ möchte ich zudem herzlich danken. Dem NMR-*Team* Monika Rettstadt, Dagmar Körtje, Dr. Edgar Hofer und Dr. Jörg Fohrer danke ich für die vielen, oft etwas ungewöhnlichen Messungen und die gute Beratung bei der Gestaltung und Auswertung der NMR-Experimente. Vielen Dank auch an Rainer Nötel, Roswitha Reichel und Dr. Gerald Dräger für die vielen Massen, Mihail Astratov für die Bestellungen und Christine Bartetzko für die Elementaranalysen.

Vielen Dank an all die Praktikanten und Bacheloranten, die uns im dritten Stock Gesellschaft geleistet haben und uns immer wieder mit wichtigen Bausteinen für unsere Arbeit versorgt haben.

Danke an das ganze Institut für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern muss ich für so Vieles danken. Allem voran dafür, dass sie mich während des ganzen Studiums und während der Dr.-Arbeit immer in jeglicher Form unterstützt und aufgemuntert haben. Vielen Dank auch an meine Freunde für die schöne gemeinsame Zeit in Göttingen und Hannover.

Zuletzt möchte ich Tilo Pölitz danken, dass er immer für mich da ist und alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit mir durchlitten hat.

Lebenslauf

Lena Möller, geboren am 25. Juli 1984 in Rinteln, ledig

Schulbildung

1990 - 1994 Grundschule Hessisch Oldendorf
1994 – 1996 Orientierungsstufe Hessisch Oldendorf
1996 – 2003 Schiller-Gymnasium Hameln (Abschluss: allgemeine
Hochschulreife)

Akademische Ausbildung

10/2003-07/2008 Chemiestudium an der GEORG AUGUST UNIVERSITÄT,
Göttingen
10/2005 Diplomvorprüfung
07/2007-03/2008 Diplomarbeit am Institut für biomolekulare und organische
Chemie der GEORG AUGUST UNIVERSITÄT, Göttingen bei
Prof. Dr. U. Diederichsen
*„Synthese und Organisation zyklischer,
nukleobasenfunktionalisierter β -Peptide“*
07/2008 Diplomprüfung
10/2008-12/2011 Promotion am Institut für organische Chemie der GOTTFRIED
WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT, Hannover bei Prof. Dr. A.
Kirschning
*„Biologische Funktionalisierung von Oberflächen und
Hyaluronsäure-basierte Hydrogele für die Anwendung in
der Regenerativen Medizin“*

Sonstiges

10/1999 -06/2003 Ehrenamtliche Jugendarbeit bei der Stadt Hessisch
Oldendorf mit Erwerb der Jugendgruppenleiterlizenz
10/2005 -10/2008 Ehrenamtliche Mitarbeit in der studentischen
Selbstverwaltung des Wohnheims Albrecht-Thaer-Weg,
Göttingen

10/2008-12/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für organische Chemie der GOTTFRIED WILHELM LEIBNIZ UNIVERSITÄT, Hannover mit Betreuung chemischer Praktika im Rahmen der Chemie-Diplom, Chemie-Bachelor und Biochemie-Bachelor Studiengänge

Publikationen

- 1) C. Hess, B. Wiegmann, A. N. Maurer, P. Fischer, L. Möller, U. Martin, A. Hilfiker, A. Haverich, S. Fischer, “*Reduced Thrombocyte Adhesion to Endothelialized Poly 4-Methyl-1-Pentene Gas Exchange Membranes-A First Step Toward Bioartificial Lung Development*”, *Tiss. Eng. Part A*. **2010**, 16, 3043-3053.
- 2) L. Möller, A. Krause, J. Dahmann, I. Gruh, A. Kirschning and 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.
- 3) G. Dräger, A. Krause, L. Möller, and S. Dumitriu, “*Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications, chapter 7: Carbohydrates*”, Andreas Lendlein (Ed.), Wiley-VCH, **2011**.
- 4) A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubrue, L. Möller, G. Dräger, B. Chichkov, “*Laser Fabrication of Three-Dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applications in Tissue Engineering*”, *Biomacromol.* **2011**, 12, 851-858.
- 5) 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**, accepted.

Wissenschaftliche Vorträge

- 1) 20. Nachwuchsgruppensymposium Bioorganische Chemie "*Funktionalisierung von PMP mit RGD-Peptiden zur Verbesserung der Biokompatibilität von künstlichen Lungen*", Karlsruhe **2011**.
- 2) NTH Bottom-up Symposium "*Biocompatible Medical Devices by Functionalization of TPX with RGD Peptides*", Burg Warberg **2011**.

Ausgewählte Posterbeiträge

- 1) 42nd JUPAC congress, "*Covalent functionalization of Polymethylpentene for applications in the field of tissue engineering*", Glasgow **2009**.
- 2) 459. WE-Heraeus-Seminar, "*Preparation of Hydrogel-Composites from Methacylated Hyaluronic acid, Alginate and Gelatin*", Bad Honnef **2010**.
- 3) i-PolyMat, "*Functionalisation of Polymethylpentene Membranes with cyclic RGD Peptides for Applications in the Field of Tissue Engineering*", Kerkrade **2010**.
- 3) EUPOC, "*Towards Biocompatible Medical Devices: Functionalisation of TPX with RGD Peptides*", Gargnano **2011**.