

Chemische Funktionalisierung von Oberflächen von biomedizinischen Materialien für die regenerative Therapie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Jessica Buchholz

geboren am 02.04.1984 in Bremervörde

2016

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 05.02.2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2012 bis September 2015 unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Zusammenfassung

Jessica Buchholz

Chemische Funktionalisierung von Oberflächen von biomedizinischen Materialien für die regenerative Medizin

Schlagworte: extrakorporale Membranoxygenierung – Implantate – Plasmachemie – Oberflächenmodifizierung – magnetische Nanopartikel – Wirkstofftransport

Durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft verändern sich die Anforderungen an die Medizin und die damit verbundenen Therapien. Krankheiten oder der Alterungsprozess können bei einzelnen Organen zu einem Funktionsverlust führen. Um den Verlust auszugleichen, stehen verschiedenste medizinische Geräte zur Verfügung, die als extrakorporales Gerät oder Implantat zum Einsatz kommen.

Ein solches medizinisches Gerät ist eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das dort eingesetzte Material Poly-4-methyl-1-penten (PMP) durch verschiedene Adhäsionsfaktoren modifiziert, um eine biokompatible Oberfläche zu erzeugen. Die Ansiedlung einer stabilen Endothelzellen-Monolage sollte die Hämokompatibilität des ECMO gewährleisten und die Lebensdauer des Gerätes erhöhen.

Als Modell für Zahnimplantate und Herzschrittmacher diente das Material Titan. Durch die kovalente Bindung eines cyclischen RGD-Peptids wurde eine biokompatible Oberfläche geschaffen. Sowohl die Osseointegration, als auch das Einwachsen in weiches Gewebe konnte durch die Funktionalisierung verbessert werden, um möglichen Infektionen vorzubeugen.

Eine neuartige Krebs-Therapie stellt die Kombination einer lokalen Wirkstofffreisetzung und der Hyperthermie dar. Die sollte durch die thermoreversible Bindung eines Wirkstoffes an einen magnetischen Nanopartikel realisiert werden. Damit eine möglichst genaue Dosierung des Wirkstoffes möglich ist, wurde die Beladung des Nanopartikels bestimmt.

Abstract

Jessica Buchholz

Chemical functionalisation of surfaces of biomedical materials for the regenerative medicine

Keywords: extracorporeal membrane oxygenation – implants – plasma chemistry – surface modification – magnetic nano particle – drug delivery

Due to the demographic change in our society the demands to medicine and associated therapies need to be varied. Diseases and the ageing process could lead to a loss of function of several organs. To compensate the damage of the organ there are different medical devices available. This could be an extracorporeal device or an Implant.

Such an extracorporeal device is an extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). In this work, the commonly used material poly-4-methyl-1-pentene was modified with different adhesion factors, to create a biocompatible surface. The seeding of an endothelial cell monolayer ensured the hemo-compatible character and extend the life-time of the ECMO.

As a model for teeth implants and pacemakers titanium was used. With the covalent connection of a cyclic RGD-peptide a biocompatible surface was created. The osseointegration as well as the incorporation in soft tissue was improved by the functionalization, to prevent possible infections.

A new cancer therapy is the combination of local drug release and hyperthermia. This was realized via a thermo cleavable linkage of a drug and a magnetic nano particle. For an exact dosage of the drug it was necessary to determine the loading of the nano particle.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	9
1.2 Medizinische Produkte	11
1.2.1 Oxygenatoren.....	11
1.2.2 Herzschrittmacher	12
1.2.3 Zahn- und Knochenimplantate	12
1.3 Faktoren für die Zelladhäsion	15
1.4 Funktionalisierung von Makromolekülen	18
1.4.1 1,3-Dipolare Cycloaddition	20
1.4.2 DIELS-ALDER Cycloaddition	22
1.5 Plasmachemie	24
1.6 Wirkstofftransport durch Nanopartikel	25
2. Zielsetzung	29
3. Funktionalisierung von Poly-4-methylpent-1-en	32
3.1 Einleitung	32
3.2 Plasmabehandlung von PMP	34
3.2.1 Plasmamodifizierung mit Formiergasplasma	36
3.3 Nitreninsertion und Kupplung eines Linkers an PMP.....	37
3.3.1 Synthese von PFPA-PEG ₁₂ NH ₂ 36 und Nitreninsertion	37
3.3.2 Synthese von Oxanorbornadien 47 und Kupplung an PMP-Folie	38
3.4 Metallfreie Ligation von Signalstoffen an PMP	40
3.4.1 Darstellung verschiedener Azide.....	42
3.4.2 Ligation von Aziden an modifizierte PMP-Folie 48.....	49
3.5 Streptavidin-Biotin Strategie	50
3.6 XPS-Analyse	57
3.7 REM-Aufnahmen	64
3.8 Biologische Evaluation der modifizierten Oberflächen	65
4. Funktionalisierung von Titanplatten	77
4.1 Einleitung	77
4.2 Polieren und Strukturieren von Titanplatten	78
4.2.1 Polieren von Titanplatten	78
4.2.2 Strukturieren von Titanplatten.....	78
4.3 Plasmabehandlung von Titan.....	79
4.4 Silanisierung von Titan.....	80
4.5 Anbringung eines PEG und Kupplung eines Linkers.....	82
4.6 Metallfreie Ligation von cRGDFK.....	85
4.7 XPS-Analyse	87
4.8 REM-Aufnahmen	92

4.9	Biologische Evaluation der funktionalisierten Oberflächen	97
5.	Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel	122
5.1	Einleitung	122
5.2	Synthese von Furanderivaten für die Diels-Alder Reaktion.....	125
5.3	Untersuchungen zur Diels-Alder Cycloaddition	130
5.4	Bestimmung der Belegung von Nanopartikeln durch photometrische Untersuchungen .	132
5.5	DIELS-ALDER Cycloaddition an Nanopartikeln	139
5.6	Einsatz von Nanopartikeln in nicht fluiden Medien	144
6.	Zusammenfassung und Ausblick	149
6.1	Zusammenfassung	149
6.2	Ausblick	153
7.	Experimenteller Teil	156
7.1	Allgemeine Hinweise	156
7.2	Analytische Methoden.....	156
7.3	Synthesen	160
8.	Anhang	204
8.1	Spektren.....	204
8.2	Messdaten und Kalibrierreihen	213

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abs.	Absorption
Ac	Acetyl
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
Äq	Äquivalente
BE	Bindungsenergie
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
c	centi oder cyclo
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexycabodiimid
δ	chemische Verschiebung
DIC	Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DiPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extra cellular matrix</i>)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EtOAc	Essigsäureethylester
E_{kin}	kinetische Energie
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	et alii
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
GV	Geschwindigkeit Verfahrtsch
h	Stunde (<i>hour</i>)
HMBC	<i>hetronuclear multiple quantum coherence</i>
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMDSO	Hexamethyldisiloxan
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HR	hoch aufgelöst (<i>high resolution</i>)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
k	kilo
K	Kelvin
k. A.	keine Angabe
KW	Kontaktwinkel

IG	Ionisationsgas
IR	Infrarot
L	Liter
λ	Wellenlänge
m	milli oder Meter
M	Mega
μ	mikro
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
Mw	Mikrowelle
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
N	nano
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIR	nahes Infrarot
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCT	Puls-Pause-Verhältnis
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMP	Poly-4-methylpent-1-en
ppm	<i>parts per million</i>
quant.	Quantitativ

REM	Rasterelektronenmikroskopie
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
ss	single stranded
<i>tert.</i>	Tertiär
THF	Tetrahydrofuran
™	unregistrierte Warenmarke (<i>unregistered trade mark</i>)
TMS	Trimethylsilyl
t _R	Retentionszeit
U	Units (Enzymmenge, die pro Minute ein mol Substrat umsetzt)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vergl.	Vergleich
w/w	Gewichtsprozent
w/v	Volumenprozent
XPS	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (<i>X-ray photoelektron spectroscopy</i>)
3D	dreidimensional
°C	Grad Celcius
%	Prozent

‰

Promille

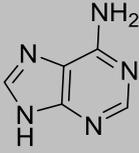
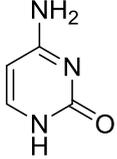
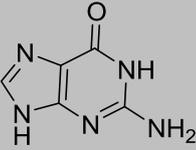
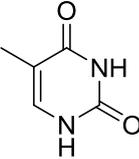
®

registrierte Warenmarke (*registered trade mark*)

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

DNA-Nukleotidbasen in Aptameren:

Nukleotid	Abkürzung	Struktur
Adenin	A	 <chem>Nc1ncnc2[nH]cnc12</chem>
Cytosin	C	 <chem>Nc1cc[nH]c(=O)n1</chem>
Guanin	G	 <chem>Nc1nc2[nH]cnc2c(=O)[nH]1</chem>
Thymin	T	 <chem>Cc1c[nH]c(=O)[nH]c1=O</chem>

1. Einleitung

1.1 Regenerative Medizin

Immer mehr Umwelt- und soziale Faktoren verursachen den demographischen Wandel in unserer Gesellschaft, also eine stetig ansteigende Lebenserwartung. Bis zum Jahr 2030 wird die Altersgruppe der 65-jährigen um etwa 33 % von 16,7 Millionen (2008) auf 22,3 Millionen Personen ansteigen. Allerdings wird sich die Bevölkerungszahl in dieser Zeit um ca. 5 Millionen Einwohner auf 77 Millionen reduzieren. Dies zieht nicht nur gesellschaftlich und politisch viele Folgen nach sich, auch das Gesundheitswesen ist diesem Wandel unterlegen.¹

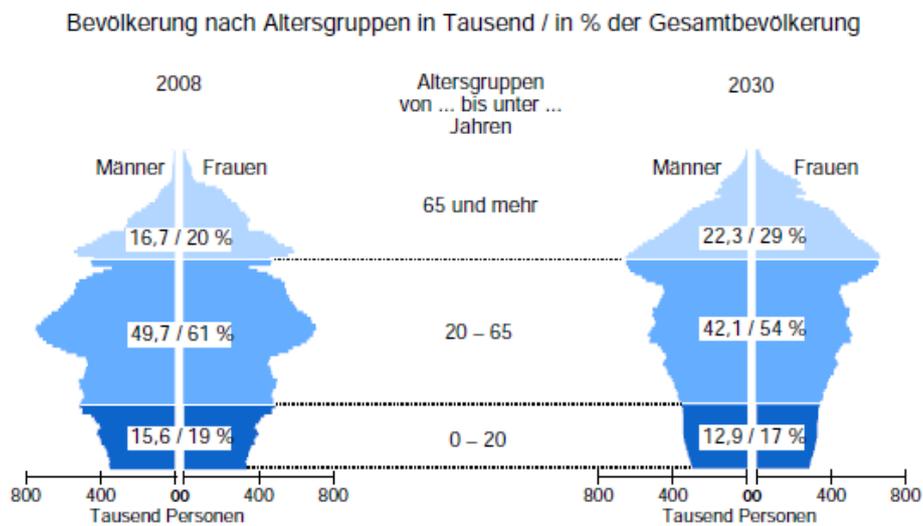


Abbildung 1: Altersaufbau der Bevölkerung in Deutschland.¹

Die Ursachen für Erkrankungen können vielfältig sein, wie genetische Veranlagung oder der Lebenswandel. Die moderne Medizin ist in der Lage eine Vielzahl an Krankheiten und Fehlfunktionen zu behandeln, oder gar zu heilen. Dennoch sind den Therapiemöglichkeiten Grenzen gesetzt, wenn es um den Verlust eines Organs, oder Teilen davon geht. In diesem Fall sind Patienten darauf angewiesen, ein geeignetes Spenderorgan zu erhalten.

Den benötigten Organen steht allerdings eine vergleichsweise geringe Anzahl an Spenderorganen gegenüber. Den Angaben von Eurotransplant nach standen beispielsweise im Jahr 2014 1283 Patienten in Deutschland auf der Warteliste für ein Herz. Es wurden

¹ Statistische Ämter des Bundes und der Länder – Demografischer Wandel in Deutschland, Heft 1, 2011.

aber nur 842 Transplantationen im gleichen Jahr durchgeführt. Für andere Organe, wie Lunge (800 Patienten, 417 Transplantationen) oder Niere (11120 Patienten, 7717 Transplantationen) zeichnete sich ein ähnliches Bild ab.²

Bis ein geeignetes Spenderorgan gefunden wird, muss die Zeit bis zu einer Transplantation überbrückt, oder nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht werden. In diesem Fall kommen nicht selten Implantate (Zahnimplantate, Knochenschrauben) oder medizinische Produkte (Herzschrillmachern, Oxygenatoren) zum Einsatz. Die Anforderungen an die verwendeten Materialien sind dabei enorm. Nicht nur mechanische Eigenschaften müssen erfüllt werden, auch die Biokompatibilität hat eine hohe Bedeutung, um eine Immunreaktion des ohnehin geschwächten Patienten vermeiden zu können.

Im Bereich der regenerativen Medizin ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Fachbereiche unerlässlich. Die Entwicklung von Wirkstoffen und modifizierten Materialien liegt im Bereich der Chemie, während Physiker sich mit den veränderten mechanischen Eigenschaften und der Oberflächenzusammensetzung befassen. Eine Überprüfung von biologischen Aktivitäten, Toxizität, oder eine Zellbesiedlung führen Biologen durch, bevor an einen Einsatz in humanem Gewebe zu denken ist. Ist die Biokompatibilität von medizinischen Geräten gewährleistet, ist ein Einsatz im klinischen Alltag möglich. Doch auch hier ist es die Aufgabe der Mediziner vor Ort patientennah Erfahrungen zu sammeln und konsequent den Einsatz dieser Geräte zu überprüfen, um mögliche Verbesserungen vornehmen zu können.

² <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=Year+Statistics+2014.pdf> (Zugriff: 16.04.2015),

<http://de.statista.com/statistik/daten/studie/239533/umfrage/personen-auf-der-eurotransplant-warteliste-fuer-organspenden-nach-organ> (Zugriff: 16.04.2015).

1.2 Medizinische Produkte

1.2.1 Oxygenatoren

Die Gründe für Lungenerkrankungen liegen häufig in genetischer Veranlagung, verschmutzter Atemluft, oder wiederholten Erkrankungen der Atemwege (Lungenentzündung) und können lebensbedrohliche Auswirkungen annehmen. Das akute progressive Lungenversagen (*Acute Respiratory Distress Syndrom* – ARDS) und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease* - COPD) führen zu dem Verlust der Fähigkeit, Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff im Blut auszutauschen. In diesen Fällen ist eine mechanische Beatmung nicht zu vermeiden. Diese kann aber die Atemwege durch den hohen Druck zusätzlich schädigen und Entzündungsreaktionen in anderen Organen hervorrufen.

Alternativ kann der Patient an eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) angeschlossen werden, um den Gasaustausch ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{O}_2$) ohne mechanische Belastung gewährleisten zu können. Diese Geräte sind mit einer Hohlfasermembran ausgestattet, in denen ein Überdruck mit Sauerstoff angelegt wird. Durch den Herzschlag des Patienten fließt das Blut außen um die Membran, an deren Grenzfläche der Gasaustausch stattfindet.

Bei dem Material der Membran handelt es sich um das Polymer Poly-4-methylpent-1-en, welches sich durch seine hohe Gasdurchlässigkeit, aber auch durch chemische Beständigkeit und seine geringe Feuchtigkeitsabsorption auszeichnet.³ Der hydrophobe Charakter des Materials führt aber auch gleichzeitig zu einer Beeinträchtigung der ECMO. Nach einer Anwendungszeit von 11 ± 7 Tagen können Blutkoagulate die Membran blockieren und so die Sauerstoffversorgung unterbrechen.⁴

Die Beschichtung mit Heparin/Albumin von HESS *et al.* führte zu einer erfolgreichen Besiedlung mit Endothelzellen und durch Maskierung mit diesen zu einer Unterdrückung der Blutplättchenadhesion, konnte aber unter Flussbedingungen nicht stabilisiert werden. Die Folge war eine Ablösung der Beschichtung und somit auch der Endothelzellen, sodass nach kurzer Zeit wieder das Polymer freigelegt wurde.⁵

³ <http://www.goodfellow.com/> TPX® Datenblatt (17.06.2014 13:27).

⁴ K. Lehle, A. Philipp, O. Gleich, A. Holzamer, T. Müller, T. Bein, C. Schmid *ASAIO* **2008**, *54*, 612-617.

⁵ 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

Der Herzschrittmacher gehört zu den medizinischen Geräten, die schon seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt werden. Diese bewährte Behandlung von Herzerkrankungen, wie Bradykardie oder Arrhythmie, arbeitet über elektrische Impulse die den Herzmuskel regelmäßig anregen. Durch den Einsatz von Lithium-Iod-Batterien (Feststoffbatterien) können Herzschrittmacher, nach Implantation, über Jahre hinweg im Körper verbleiben, und ermöglichen dem Patienten ein nahezu beschwerdefreies Leben.^{6,7}

Gründe für eine Explantation können vielfältig sein. Häufig ist die Lebensdauer der Batterie ein limitierender Faktor und das Gerät muss entsprechend getauscht werden. Wie bei jedem operativen Eingriff können Komplikationen auftreten. Dabei handelt es sich oft um Infektionen, ausgelöst von dem Bakterium *Staphylococcus aureus*. In diesem Fall sind eine Explantation und eine Behandlung mit Antibiotika notwendig.⁸

Ein weiteres Problem tritt auf, wenn der Herzschrittmacher schon mehrere Jahre im Körper des Patienten ist. Da die Oberfläche an sich zwar keine Infektion hervorruft, aber vom Körper und dem umliegenden Gewebe nicht erkannt wird, kann es zu einer Verkapselung um den Herzschrittmacher herum führen. Da das Gewebe im Brustkorb aber weich und nachgiebig ist, wandert diese Verkapselung innerhalb des Körpers. Ein Eingriff stellt immer ein gewisses Risiko dar, deshalb sollte immer minimalinvasiv vorgegangen werden. Bei einer Migration muss an einer Stelle der alte Herzschrittmacher entfernt werden und an einer anderen Position ein neuer Herzschrittmacher eingesetzt werden.⁹

1.2.3 Zahn- und Knochenimplantate

Im Bereich der Implantologie liegt die größte Herausforderung darin geeignete Implantate in der Mundhöhle zu setzen. Das Implantat soll nicht nur im Kieferknochen anwachsen (Osseointegration), sondern muss auch in weiches Gewebe einwachsen. Seit den 1960er werden Titan und Keramik für die Zahnimplantologie verwendet. Eigenschaften wie Biokompatibilität und Stabilität, sowie die Möglichkeit zur Verarbeitung machen Titan zu

⁶ Y. Yaniv, K. Tsutsui, E. Lakatta *Front. Physio.* **2015**, 6, 47.

⁷ D. C. Bock, A. C. Marschlok, K. J. Takeuchi, E. S. Takeuchi *Electrochim. Act.* **2012**, 84, 155-164.

⁸ P. Tornos, T. Gonzalez-Alujas, F. Thuny, G. Habib, *Curr. Prob. Cardiology* **2011**, 36, 175-222

⁹ H. A. Sabti, R. G. Menon, M. M. Maddali, J. Valliattu *J. Med. Case Rep.* **2008**, 2, 163-167.

einem beliebigen Material für Implantate. Auch 10 Jahre nach der Setzung bleiben 95 % der Implantate im Kieferknochen verankert.¹⁰

Die Setzung eines Implantates wird in mehreren Schritten durchgeführt. Zunächst wird an der betroffenen Stelle das Zahnfleisch geöffnet und im darunter befindliche Kieferknochen durch Bohrung Platz für das Implantat geschaffen. Nach Setzen des Titanstiftes erfolgt das Vernähen des Zahnfleisches, gefolgt von einer Einheilphase über mehrere Monate. Das Implantat wird erneut freigelegt und mit einem Aufsatz versehen, auf den abschließend die Krone gesetzt werden kann (Abbildung 2).¹¹

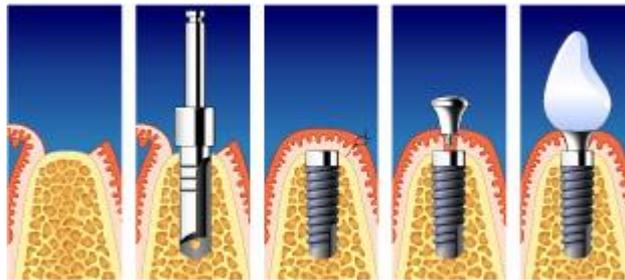


Abbildung 2: Schritte zum Setzen eines Zahnimplantates¹¹

Bei Betrachtung dieses Vorgangs wird klar, dass bei zweimaligem Öffnen des Zahnfleisches, die Möglichkeit besteht, dass Bakterien in die Wunde gelangen.

Im Speichel befinden sich bis zu 600 mikrobielle Spezies, unter anderem zahlreiche Bakterien, die für die Funktionalität des Körpers unerlässlich sind. Aber auch Bakterienstämme, wie *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Sie sind die Hauptverursacher von Plaque, Karies und Parodontitis. Sind bereits Zähne und Zahnfleisch betroffen, kann es zu einer weiteren Schädigung des Kieferknochens und des umliegenden Gewebes kommen. Teilweise ist ein Verlust eines Implantates unausweichlich, und eine Neusetzung unmöglich, sobald sich die Entzündungen im Körper des Patienten ausbreiten.¹² Die Verabreichung von Antibiotika kann in diesen Fällen hilfreich sein. Allerdings sind diesen Grenzen gesetzt, nicht nur durch Resistenzen, sondern auch durch die Bildung von Biofilmen.

¹⁰ P. Borsay, *Zahnimplantate & Co.: die Implantologie in der modernen Zahnheilkunde*, Thieme, Stuttgart 2007.

¹¹ <http://www.zahnarztpraxis-engelmann.de/therapie.php> (Zugriff: 20.04.2015).

¹² Dr. med. dent. J. Lechner, *Gesunde Zähne – gesunder Mensch: wie wichtig eine ganzheitliche Zahnheilkunde ist*, LambertSandmann, München 2009.

Biofilme bilden sich häufig an organischen oder anorganischen Grenzschichten, durch Adhäsion von Pionierzellen. Diese Pionierzellen helfen dann anderen Zellen, ein Konglomerat zu bilden, welches umgeben von einer wässrigen Matrix von außen fast unangreifbar ist (Abbildung 3). Im Vergleich sind Bakterien in Biofilmen 10-1000-mal resistenter, als ihre planktonische Form.¹³

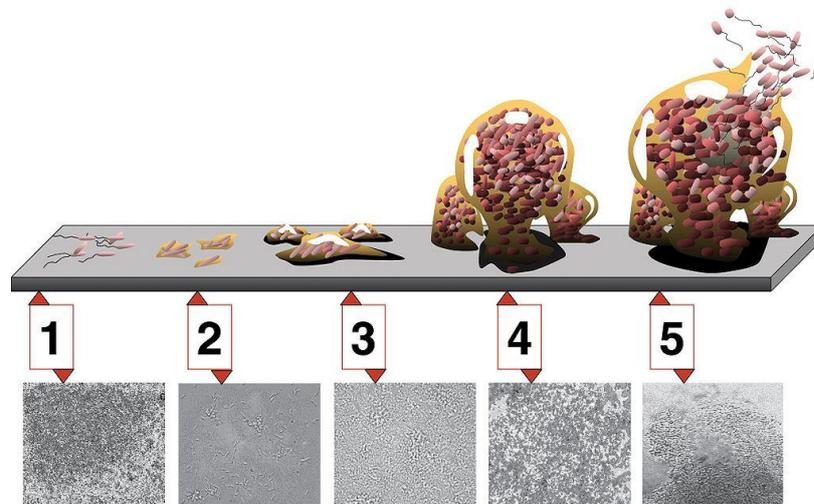
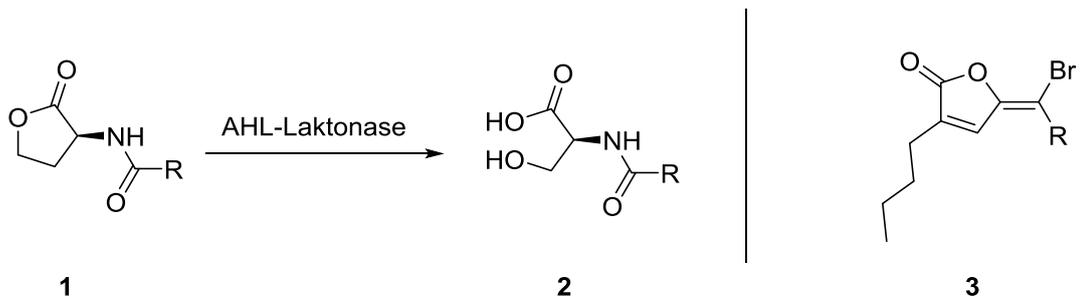


Abbildung 3: Die fünf Stadien der Biofilmbildung¹³

Die Resistenz von Biofilmen macht eine Behandlung schwierig und uneffektiv. Die Bakterien kommunizieren über das *quorum sensing* miteinander. Sie sondern Signalstoffe, wie *N*-Acyl-L-homoserinlaktone (AHL) ab. Ist ein gewisses Level an Signalstoffen erreicht, kann durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Genexpression aktiviert werden. Mit der Inhibierung dieses Signalweges, dem *quorum quenching*, kann die Expression spezifischer Funktionen unterdrückt werden. Das Ziel ist es, auf diesem Wege die Pathogenität, und somit auch Resistenzen zu verhindern. Beispielsweise kann dies durch Enzyme, wie die AHL-Laktonease oder durch Inhibitoren (halogenierte Furanone) erreicht werden (Schema 1).¹⁴

¹³ D. Monroe *PLOS Biology* **2007**, *5*, 2458-2461.

¹⁴ S. Uroz, Y. Dessaux, P. Oger *ChemBioChem* **2009**, *10*, 205-216.



Schema 1: Abbau von *N*-Acyl-L-homoserinlaktone durch AHL-Laktonase (links), halogeniertes Furanon (rechts)

1.3 Faktoren für die Zelladhäsion

Die Kommunikation einer Zelle mit der extrazellulären Matrix (ECM) verläuft über die Anbindung von Proteinen an Integrine auf der Zelloberfläche. Diese Integrine bestehen oft aus zwei Heterodimeren, die nach der Anbindung des Liganden miteinander wechselwirken und dann über Signalkaskaden Informationen in der Zelle weiterleiten (Abbildung 4). Diese Proteine können für die Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion verantwortlich sein.¹⁵

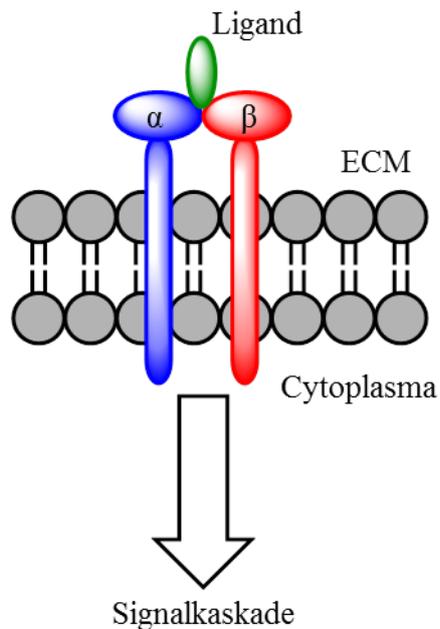


Abbildung 4: $\alpha\beta$ -Integrin in der Zellwand bei Anbindung eines Liganden.¹⁵

¹⁵ E. Zamir, B. Geiger *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3583-3590.

Die Integrine können in vier Klassen unterteilt werden, Collagen-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren, Leukozyten-spezifische Rezeptoren und RGD-Rezeptoren. Bekannt sind 24 $\alpha\beta$ -Heterodimere, die sich aus acht verschiedenen β -Einheiten und 18 verschiedenen α -Einheiten zusammensetzen (Abbildung 5).¹⁶

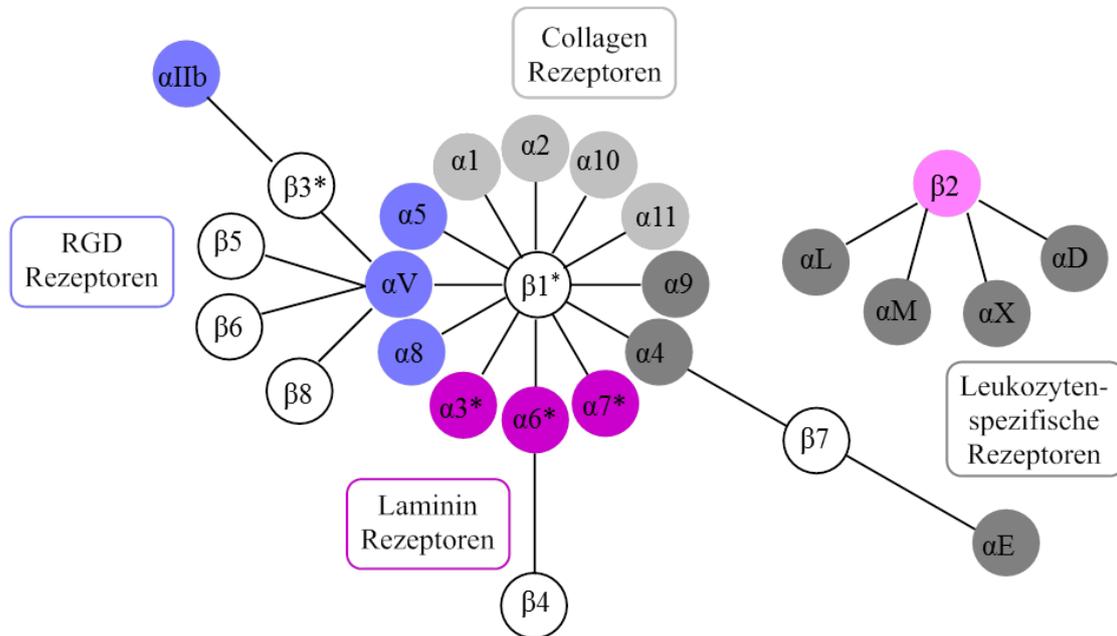


Abbildung 5: Mitglieder der Integrin-Familie unterteilt nach bindenden Liganden.¹⁶

In vielen Proteinen der ECM liegt das Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) vor, welche an einen Großteil der bekannten Integrine bindet. Ein Beispiel hierfür, ist Fibronectin. Es ist bekannt dass dieses Tripeptid für die Adhäsion von Zellen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten viele Oberflächen entsprechend funktionalisiert, um biokompatible und biomimetische Materialien herzustellen.¹⁷ Sowohl die lineare RGD Sequenz, als auch zyklische Peptide binden an $\alpha\beta$ -Rezeptoren. Zyklische RGD-Peptide mit der Form cRGDXX wurden unter anderem von GUAN *et al.* und NASONGKLA *et al.* für eine tumoradressierte Wirkstofffreisetzung von Doxorubicin verwendet.^{18,19}

Während das RGD-Peptid **4** in der Lage ist an diverse Integrine zu binden und sich somit verschiedene Effekte hervorrufen lassen, ist das Tetrapeptid Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin (REDV) **5** ein Strukturmotiv, welches spezifisch an $\alpha4\beta1$ -Integrine

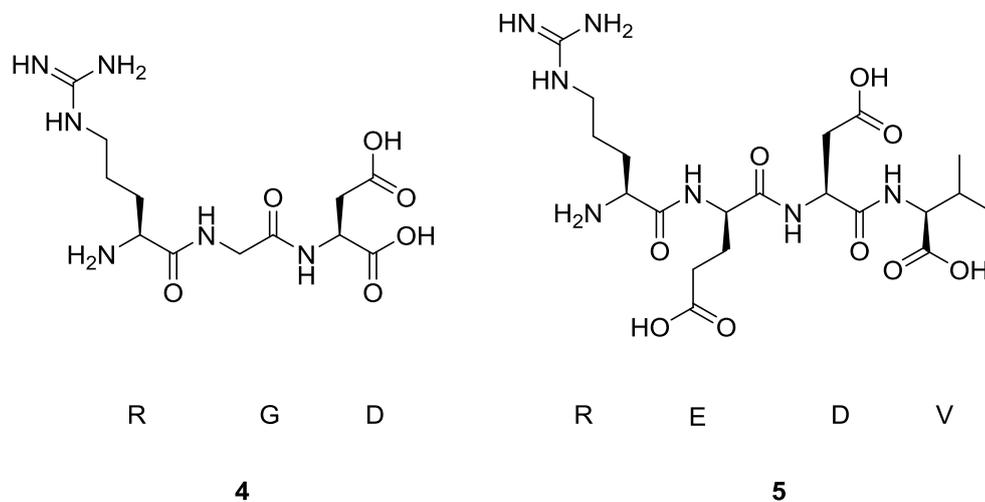
¹⁶ R. O. Hynes *Cell* **2002**, *110*, 673–687.

¹⁷ U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385-4415.

¹⁸ X. Guan, X. Hu, Z. Li, H. Zhang, Z. Xie *RSC Adv.* **2015**, *5*, 22957-22964.

¹⁹ N. Nasongkla, X. Shuai, H. Ai, B. D. Weinberg, J. Pink, D. A. Boothman, J. Gao *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6323-6327.

von humanen Endothelzellen bindet (Schema 2).²⁰ Diese Selektivität des Liganden bietet die Möglichkeit ausschließlich Endothelzellen anzubinden, die unter anderem auch für die Vaskularisierung im Gewebe verantwortlich sind. WANG *et al.* konnten zeigen, dass mit REDV modifiziertes Alginat genutzt werden kann, um *human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)* selektiv adherieren und proliferieren zu lassen und Angiogenese möglich ist.²¹



Schema 2: Strukturen vom linearen RGD-Peptid und linearen REDV-Petid.

Eine weitere Möglichkeit, bestimmte Signale an eine Zelle zu geben, um Adhäsion auszulösen, sind Aptamere. Dabei handelt es sich um ssDNA- oder RNA-Oligonukleotide, welche durch ihre spezielle Form und Faltung an bestimmte Rezeptoren binden können. Ihren Anfang hat dieses Konzept in der Erforschung des HI-Virus in den 1980er Jahren. Dieser Virus kodiert kleine RNA-Strukturen, um diese selektiv und mit einer hohen Affinität an virale oder zelluläre Proteine zu binden. Obwohl Antikörper für molekulare Erkennung lange Zeit in einer Vielzahl von Anwendungen ihren Nutzen fanden, haben Aptamere doch entscheidende Vorteile. Im Gegensatz zu Antikörpern denaturieren Aptamere bei hohen Temperaturen nicht, sondern kehren in ihre native Form beim Abkühlen zurück. Sie können in gleichbleibender Qualität synthetisiert werden und lösen keine Fremdkörperreaktionen aus, da sie vom Immunsystem nicht als fremde Substanz erkannt werden. Darüber hinaus ist es möglich, Aptamere für eine Vielzahl von Anwendungen zu produzieren, da sie sich sehr leicht chemisch modifizieren lassen.²²

²⁰ S. P. Massia, J. A. Hubbell *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 14019-14026.

²¹ W. Wang, L. Guo, Y. Yi, Z. Chen, R. Zhou, Z. Yuan *Journal of Biomedical Materials Research A* **2015**, 103A, 1703-1712.

²² K.-M. Song, S. Lee, C. Ban *Sensors* **2012**, 12, 612-631.

Die Vielsetigkeit von Aptameren zeigt sich in ihrer Anwendung. Sie lassen sich für einen Wirkstofftransport ebenso verwenden, wie als Biomarker oder den Nachweis von Krankheiten. Hier kommen auch die chemischen Modifizierungen, in Form von Fluoreszenzmarkern, zum Tragen.^{22,23}

1.4 Funktionalisierung von Makromolekülen

Der Anspruch auf Biokompatibilität kann für viele Materialien nur gewährleistet werden, wenn diese gezielt für chemische Reaktionen modifiziert werden.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Kombination von (Bio)Polymeren mit Peptiden oder Naturstoffen. Diese Biokonjugate vereinen die Eigenschaften beider Stoffklassen. Proteine könne in einem Konjugat ein Polymer mit biofunktionellen Eigenschaften ausstatten, während das Polymer dem Konjugat Stabilität geben kann. Die Art der Modifizierung von Oberflächen und Polymeren kann dabei grundsätzlich in „*grafting from*“ und „*grafting onto*“ unterteilt werden.²⁴ Prinzipiell ist diese Art der Anbindung, auch Ligation genannt, ebenfalls auf anderen Materialien, wie Nanopartikeln oder Metallen anwendbar. Die Strategie zur Anbindung ist immer von den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche abhängig (Abbildung 6).²⁵ Idealerweise sind diese Reaktionen mit wenig Aufwand durchführbar, in denen Substrate eingesetzt werden, welche leicht zugänglich sind und die lösemittelfrei oder in ungiftigen Lösemitteln (Wasser) ablaufen. Zusätzlich sollte die Reaktion zu guten Ausbeuten ohne toxische Nebenprodukte führen und eine einfache Isolierung des Produktes zulassen. Sind diese Kriterien erfüllt, wird von einer „CLICK“-Reaktion gesprochen.²⁶ Findet die Reaktion zwischen zwei funktionalen Gruppen chemoselektiv und ohne zytotoxische Reagenzien oder Bildung von Nebenprodukten unter physiologischen Bedingungen (neutraler pH-Wert, 25 °C - 37 °C) statt, wird zusätzlich von Bioorthogonalität gesprochen. Die Besonderheit bioorthogonalen Reaktionen ist, dass diese in lebenden Organismen stattfinden können, ohne in biologische Prozesse einzugreifen, oder diese zu stören.^{27,28}

²³ K. Germer, M. Leonard, X. Zhang *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, 4,27-40.

²⁴ L. A. Canalle, D. W. P. M. Lowik, J. C. M. van Hest *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 329-353.

²⁵ K. E. Sapsfor, W. R. Algar, L. Berti, K. Boeneman, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Mednitz *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1904-2074.

²⁶ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

²⁷ E. Sletten, C. R. Bertozzi *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974-6998.

²⁸ J.A. Prescher, D. H. Dube, H. Danielle, C. R. Bertozzi *Nature* **2004**, 430, 873-877.

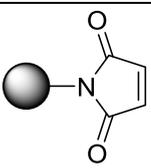
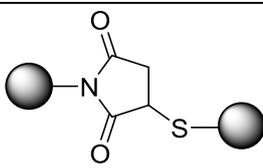
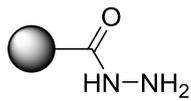
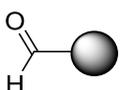
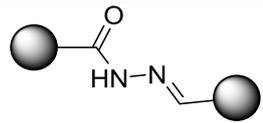
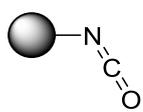
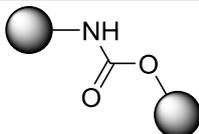
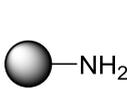
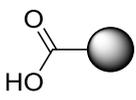
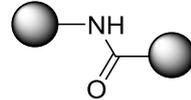
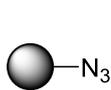
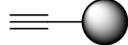
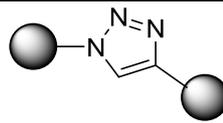
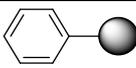
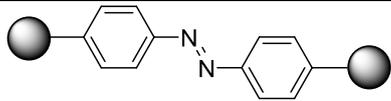
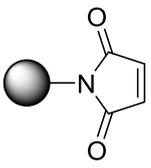
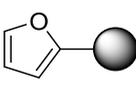
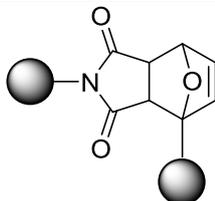
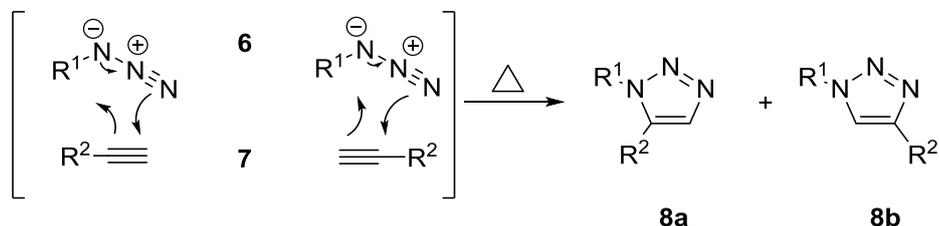
Substrat 1	Substrat 2	Produkt	Reaktion
	HS- 		Micheal-Addition
			Hydrazon-Bildung
	HO- 		Carbamat-Bildung
			Peptid-kupplung
			„CLICK“-Reaktion
			Azo-Kupplung
			DIELS-ALDER Cycloaddition

Abbildung 6: Ausgewählte Reaktionen für die Funktionalisierung von Materialien (● = Materialoberfläche oder bioaktive Verbindung).²⁵

1.4.1 1,3-Dipolare Cycloaddition

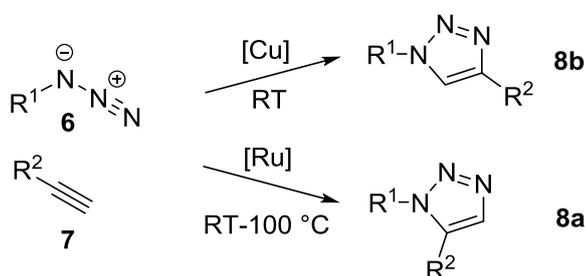
Eine der beliebtesten und meisten eingesetzten „CLICK“-Reaktionen ist die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden **6** mit Alkinen **7** zu 1,2,3-Triazolen **8a/b**. Die schon in den 1960er Jahren von HUISGEN entdeckte Reaktion verläuft nur bei hohen Temperaturen ab und liefert zwei Regioisomere (Abbildung 9).²⁹



Schema 3: HUISGEN 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden²⁹

Eine wichtige Entwicklung hinsichtlich des Einsatzes von Katalysatoren erfolgte erstmals 2002. SHARPLESS *et al.* verwendeten Cu(I)-Salze zur Vermittlung der 1,3-dipolaren Cycloaddition unter milden Bedingungen zum 1,4-substituierten 1,2,3-Triazol **8b**. Allerdings sind organische Lösemittel, die Zugabe von Basen oder der Ausschluss von Licht unerlässlich für eine erfolgreiche Reaktionsführung und hohe Ausbeuten.³⁰

Später entwickelten FOKIN *et al.* eine Ru-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition mit einem 1,5-substituiertem 1,2,3-Triazol **8a** als Produkt. Die Reaktionsführung unter Inertgasatmosphäre und die vergleichsweise harschen Bedingungen sind eher nachteilig.³¹



Schema 4: Cu- und Ru-katalysierte Cycloaddition von Aziden und Alkenen.^{30,31}

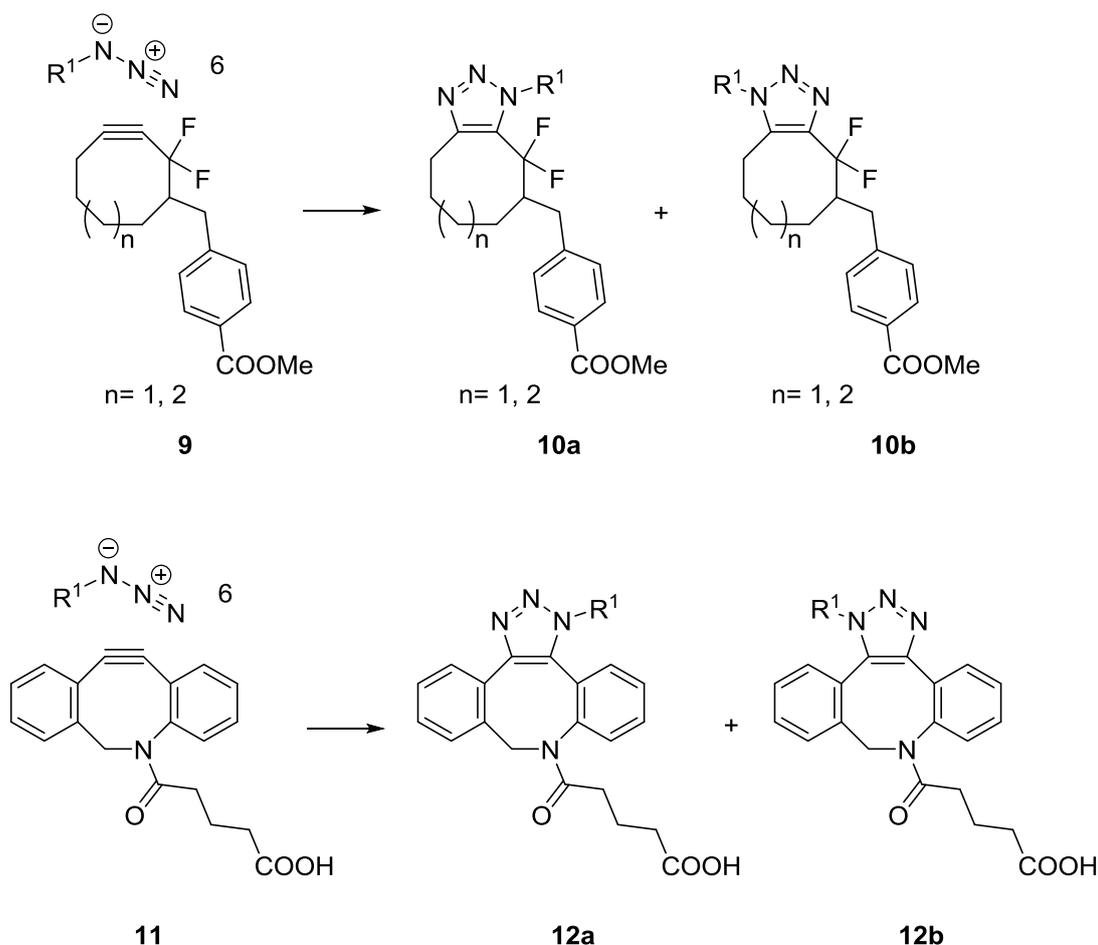
²⁹ R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507.

³⁰ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

³¹ B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923-8930.

Beide Ansätze haben sich für die biomedizinische Anwendung, wegen der möglichen Toxizität der Metalle auf Organismen, nicht durchsetzen können (Schema 4). Da der Einsatz von Metallen die Aktivierungsenergie in der Reaktion erniedrigt, stützen sich metall-freie Ansätze auf die Reaktion von Aziden mit hoch reaktiven Alkinen. Die zwei bekanntesten Varianten nutzen Dibenzo- bzw. Fluoro-substituierte Cyclooctine oder Oxanorbornadien-Systeme. In beiden Fällen verläuft die Reaktion metall-frei durch einen Abbau von Ringspannung und/oder die Absenkung des LUMOs einer der Reaktanden.

Die Strategie von BETROZZI *et al.* macht sich die Ringspannung von Cyclooctinen und Cyclononinen zu Nutze. Diese Variante der metall-freien Ligation gehört wohl zu der am weitesten verbreiteten Vorgehensweise (Schema 5).^{32,33,34}



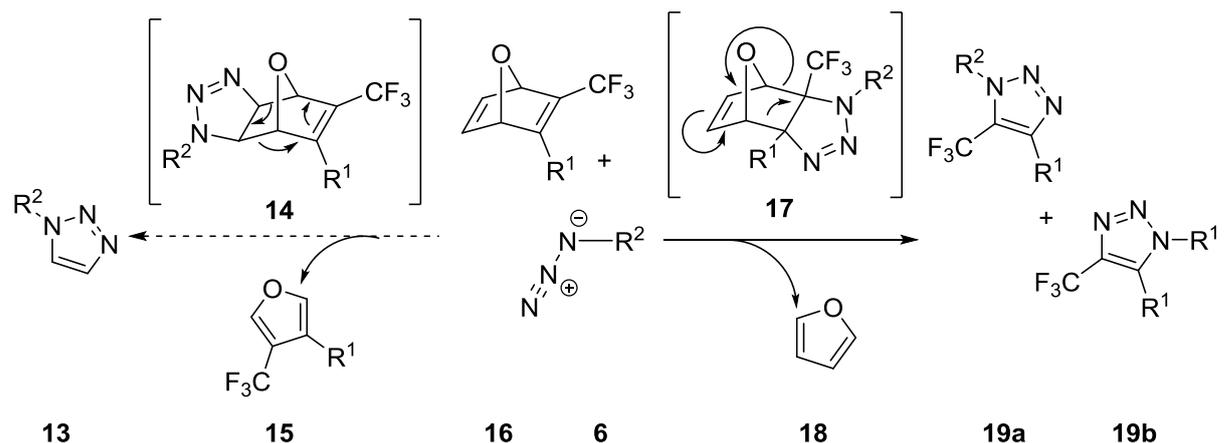
Schema 5: Metall-freie „Click“-Reaktion nach BERTOZZI³⁴

³² J. C. Jewett, C. R. Bertozzi *Cheme. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272-1279.

³³ C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4998-5006.

³⁴ E. M. Sletten, G. D. Almeida, C. R. Bertozzi *Org. Lett.* **2014**, 16, 1634-1637.

Trotz der großen Beliebtheit dieser Strategie wurde von RUTJES *et al.* ein Oxanorbornadien-System für die metall-freie „CLICK“-Reaktion entwickelt. Der Vorteil dieses Systems liegt in der hervorragenden Löslichkeit in wässrigen Systemen, ohne die Bildung von toxischen Nebenprodukten. Die milden Bedingungen und die Chemoselektivität lassen sich durch zwei Effekte erklären. Zum einen wird durch den CF₃-Substituenten am Olefin die Elektronendichte verringert und ein nucleophiler Angriff ermöglicht. Der zweite Effekt beruht auf der Maskierung des Alkins durch die Diels-Alder-Reaktion mit einem Furan, um das instabile Zwischenprodukt zu schützen und eine Ringspannung zu erzeugen, die die Cycloaddition von Aziden begünstigt (Schema 6).^{35,36}



Schema6: Metall-freie „Click“-Reaktion nach RUTJES³⁵

1.4.2 DIELS-ALDER Cycloaddition

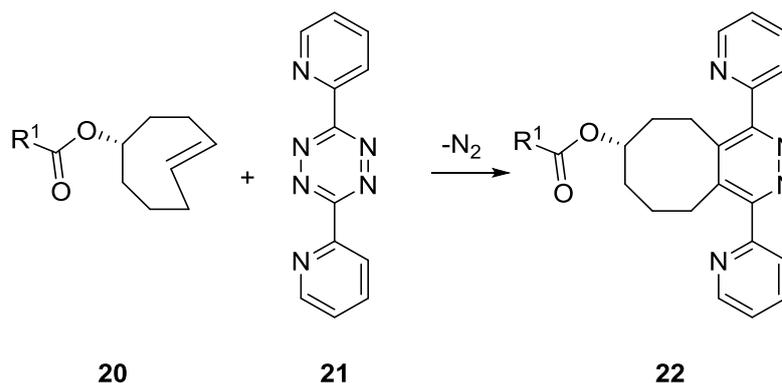
Eine vergleichsweise neue Strategie für eine bioorthogonale „CLICK“-Reaktion wurde von FOX *et al.* entwickelt. Die DIELS-ALDER Reaktion von Tetrazinen und *trans*-Cyclooctenen beruht auf einem inversen Elektronenbedarf (Schema 7). Diese Reaktion vereint viele Vorteile, denn sie verläuft sowohl in organischen Lösungsmitteln, als auch in wässrigen Medien (unter anderem Zellmedien), toleriert eine Vielzahl an Funktionalitäten, das einzige Nebenprodukt ist elementarer Stickstoff und sie verläuft innerhalb von Minuten.³⁷

³⁵ S. S. van Berkel, A. J. Dirks, M. F. Debetes, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504-1508.

³⁶ Y. Su, C. Kasper, A. Kirschning, G. Dräger, S. Berski *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 1028-1033.

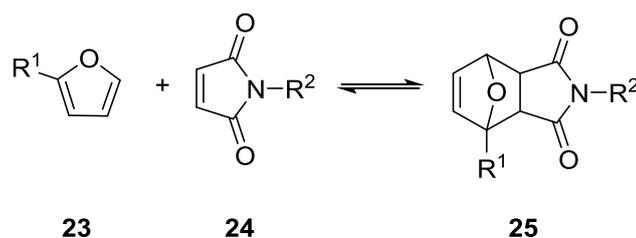
³⁷ M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519.

Diese Strategie findet sowohl in der Biologie durch die Bildung von lebenden Zellen, als auch in den Materialwissenschaften zur Vernetzung von Polymeren Anwendung.^{38,39}



Schema 7: DIELS-ALDER Cycloaddition von *trans*-Cycloocten mit Tetrazin³⁷

Die [4+2]-Cycloaddition von einem Dien mit einem Dienophil gehört wohl zu der bekanntesten Reaktion unter den Cycloadditionen.²⁵ Für die Vernetzung von Polymeren erforschten GANDINI *et al.* die reversible Cycloaddition zwischen 2-substituierten Furanen und *N*-Alkylmaleimiden, einer selektiven und effizienten Reaktion (Schema 8).^{40,41}



Schema 8: DIELS-ALDER Reaktion zwischen 2-substituierten Furanen und *N*-substituierten Maleimiden⁴⁰

³⁸ N. K. Deveraj, r. Weissleder, S. A. Hilderbrand *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299.

³⁹ C. F. Hansell, P. Espeel, M. M. Stamenovic, I. A. Barker, A. P. Dove, F. E. Du Prez, R. K. O'Reilly *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13828-13831.

⁴⁰ A. Gandini, D. Coelho, M. Gomes, B. Reis, A. Silvestre *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 8656-8664.

⁴¹ A. Gandini, A. Silvestre, D. Coelho *J. Poly. Sci.: Part A: Poly Chem.* **2010**, *48*, 2053-2056.

1.5 Plasmachemie

Unter Plasma wird der vierte Aggregatzustand der Materie verstanden, ein elektrisch neutraler Gasstrom. Neben Elektronen liegen auch Atome, Moleküle und Ionen im Plasma vor (Abbildung 7).

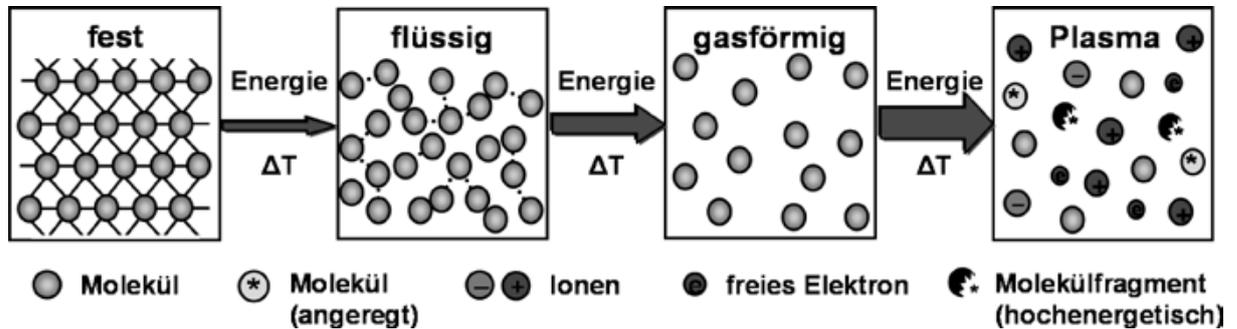


Abbildung 7: Die vier Aggregatzustände⁴²

Um Plasmen zu erzeugen werden Gasen Energie zugeführt, welche die elektronische Struktur der Bestandteile (Atome, Moleküle) in einen angeregten Zustand oder Ionen zu überführen. Die eingebrachte Energie kann thermisch sein, durch einen elektrischen Strom oder elektromagnetische Strahlung bereitgestellt werden. Bei Atmosphärendruckplasma überträgt das elektrische Feld Energie auf Elektronen im Gas. Die Elektronen sind vergleichsweise leicht und mobil. Sie kollidieren mit schwereren neutralen Spezies, wie Atomen oder Molekülen und übertragen hierbei die Energie. Abhängig von der zugeführten Energie kommt es zu elastischen oder unelastischen Stößen. Bei elastischen Stößen ändert sich lediglich die kinetische Energie der neutralen Teilchen. Ist die elektrische Energie hoch genug kommt es zu unelastischen Stößen, bei denen der Aufprall die elektronische Struktur von neutralen Spezies verändert. Hier wird die kinetische Energie in innere Energie umgewandelt und führt so zu einem Wärmeaustausch.⁴³

Durch die Art des Stoßprozesses kann das Plasma in zwei Kategorien unterteilt werden. Im kalten Plasma (*non-equilibrium-plasma*) kommt es vorwiegend zu unelastischen Stößen bei einer geringen Ionisationsrate von 10^{-4} - 10 %, sowie einer hohen Temperaturabweichung zwischen Elektronen und schwereren Spezies.⁴⁴ Im Gegensatz dazu treten im heißen Plasma (*near-equilibrium-plasma*) hauptsächlich elastische Stöße auf. Hierbei nähern sich die Temperaturen der Elektronen und der schwereren Spezies

⁴² T. Beer, A. Knospe, Ch. Buske *Medizintechnik* **2009**, 839-862.

⁴³ C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmason, P. Leprince, *Spectrochim. Acta, Part B* **2006**, 61, 2-30.

⁴⁴ Ferencz S. Denes, Sorin Manolache, *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 815-885.

einander an, was zu einer fast vollständigen Ionisation führt. Die Erzeugung von Plasma bei Atmosphärendruck gehört zu den heißen Plasmen.^{45,46}

Plasmen lassen sich sowohl unter niedrigem Druck (*non-equilibrium-plasma*), als auch bei Atmosphärendruck (*near-equilibrium-plasma*) erzeugen. Für industrielle Prozesse hat sich allerdings das Atmosphärendruckplasma bewährt, da hier ein kontinuierlicher Prozess möglich ist und keine zusätzlichen Geräteteile wie Pumpen benötigt werden.

Der Anwendungsbereich von Atmosphärendruckplasma ist weitläufig. Die Reaktionen auf Oberflächen und die erzeugten Stoffklassen sind von der Art des Substrates, dem Ionisationsgas, aber auch den Plasmabedingungen abhängig. Industriell hat sich Atmosphärendruckplasma als probates Mittel etabliert, um Bauteile für den weiteren Prozess vorzubereiten. Hier stehen die Reinigung der Oberflächen und die Haftungsvermittlung für Lacke oder Klebstoffe im Vordergrund. Dies wird durch die Veränderung der elementaren Zusammensetzung und der Hydrophilie erreicht. Im Fall von Polymeren ändert sich zusätzlich die Morphologie im Nanometerbereich.^{47,48}

Niederdruckplasmen finden in der Einzelfertigung ihre Anwendung. Beispielsweise werden im Bereich der Medizin kalte Plasmen für die Sterilisation von Geräten, Verbrauchsmaterialien und lebenden Gewebe angewandt.⁴⁹

1.6 Wirkstofftransport durch Nanopartikel

Die Forschung im Bereich Nanomaterialien für die biomedizinische Anwendung hat sich in den letzten Jahren zu einem wachsenden Markt entwickelt. Die Möglichkeiten der Anwendung sind so vielfältig wie die Arten der Nanomaterialien selbst. Beispiele hierfür sind Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie, nanostrukturierte Gerüstmaterialien für das *tissue engineering* oder auch Nanosysteme die auf molekularer Ebene mit Zellen und Gewebe interagieren. Für die Behandlung von Krankheiten liegt ein

⁴⁵R. W. Smith, D. Wei, D. Apelian, *Plasma Chem. Plasma Process.* **1989**, 9, 135S-165S.

⁴⁶X. Chen, E. Pfender, *Plasma Chem. Plasma Process.* **1983**, 3, 351-366.

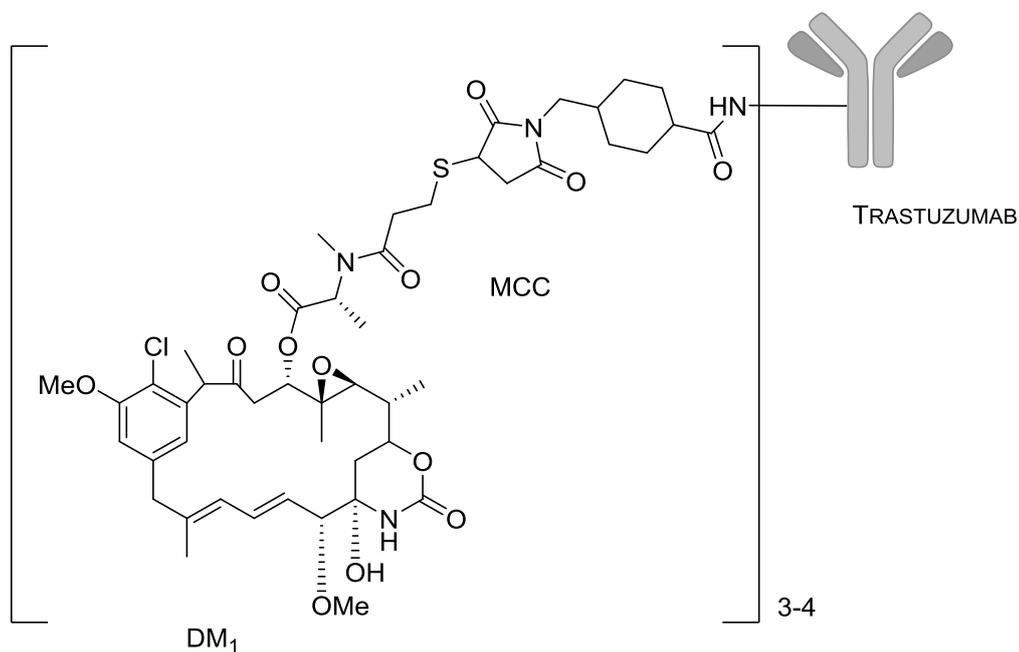
⁴⁷N. De Geyter, R. Morent, T. Desmet, M. Trentesaux, L. Gengembre, P. Dubruel, C. Leys, E. Payen, *Surf. Coat. Technol.* **2004**, 204, 3272–3279.

⁴⁸R. Morent, N. De Geyter, L. Gengembre, C. Leys, E. Payen, S. Van Vlierberghe, E. Schacht, *Eur. J. Appl. Phys.* **2008**, 43, 289-294.

⁴⁹G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, A. Fridman, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 503-533.

besonderes Interesse daran, Wirkstoff-Transport-System zu entwickeln, die selektiv auf angegriffenes Gewebe abzielen und die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen erhöhen.^{50,51}

Eine große Herausforderung stellt die Behandlung von Krebs dar. Die Therapieansätze, wie chirurgische Eingriffe, Hormontherapie oder der Einsatz von Zytostatika haben starke Nebenwirkungen, greifen gesundes Gewebe an oder führen zu einer unvollständigen Heilung.⁵² Ein erster Ansatz in diesem Bereich ist das Medikament KADCYLA der Firma ROCHE, einem Antikörper-Wirkstoffkonjugat zur Behandlung von HER2-positivem metastasierendem Brustkrebs. Es besteht aus dem Antikörper TRASTUZUMAB und dem Chemotherapeutikum DM1, einem zytotoxischem Maytansinoid (Schema 9). Obwohl dieses Konjugat durch den Antikörper schon eine erhöhte Selektivität aufweist treten Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen, Darmträgheit, ein Mangel an Thrombozyten oder Müdigkeit auf.^{53,54}



Schema 9: Struktur von KADCYLA

⁵⁰ S. Krol, R. Macrez, F. Docane, G. Defer, S. Laurent, M. Rahmen, M. J. Hajipour, P. G. Kehoe, M. Mahmoudi *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1877-1903.

⁵¹ J. Rauch, W. Koch, S. Laurent, M. Mahmoudi *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3391-3406.

⁵² <https://www.krebsinformationsdienst.de/> (Zugriff: 21.04.2015).

⁵³ S. Girisch, M. Gupta, B. Wang, D. Lu, I. E. Krop, C. L. Vogel, H. A. Burris III, P. M. LoRusso, J.-H. Yi, O. Saad, B. Tong, Y.-W. Chu, S. Holden, A. Joshi *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 1229-1240.

⁵⁴ <http://www.druginformation.com/RxDrugs/A/Ado-trastuzumab Emtansine Injection.htm> (Zugriff: 21.04.2015).

Eine andere Variante der Krebstherapie von soliden Tumoren stellt die Hyperthermie dar. Bei dieser Behandlungsmethode werden Tumorareale für eine bestimmte Zeit auf 42-45 °C erhitzt. Da Krebszellen hitzeempfindlicher sind, als gesunde Zellen, kommt es zu selektiver Apoptose. Des Weiteren werden die Tumorareale besser durchblutet, wodurch mit Strahlen- und Chemotherapie eine bessere Wirkung erreicht werden kann.⁵² Die Wirksamkeit der Hyperthermie ist dabei abhängig von dem betroffenen Gewebe, der Dauer der Anwendung und der erreichten Temperatur.⁵⁵ Die Hyperthermie lässt sich nicht nur durch externe Quellen, wie elektromagnetische Wellen realisieren. Auch der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln, welche durch ein externes Magnetfeld angeregt werden, ist möglich.

Ähnlich dem KADCYLA sollen magnetische Nanopartikel mit zielgerichteter Wirkstofffreisetzung kombiniert werden. Vor der Injektion wird auf den Nanopartikeln ein Zytostatikum fixiert. Anschließend sorgt ein externes Hoch-Gradienten-Magnetfeld für die Konzentration der Nanopartikel an der Zielstelle im Tumor (Abbildung 8). Die Freisetzung des Wirkstoffes kann durch enzymatische Aktivität oder die Veränderung von physiologischen Parametern (pH-Wert, Temperatur) erfolgen.^{56,57}

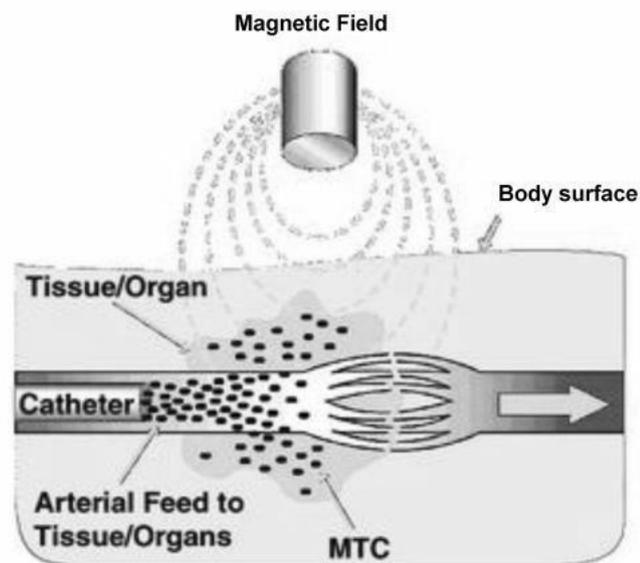


Abbildung 8: Darstellung des magnetischen Wirkstofftransports⁵⁷

⁵⁵ D. Ortega, Q. A. Pankhurst *Nanoscience* **2013**, *1*, 60-88.

⁵⁶ Q. A. Pankhurst, J. Conolly, S.K. Jones, J. Dobson *J.Phys.D: Apply.Phys.* **2003**, *36*, R167-R181.

⁵⁷ Z. M. Saiyed, S. D. Telang, C. N. Ramchand *Biomagn. Res. Tech.* **2003**, *1:2*.

Die Anforderungen an Nanopartikel für die biomedizinische Anwendung sind schon seit 1978 von SENYEI *et al.* definiert.

- Der ideale Nanopartikel ist klein genug sein ($< 1,4 \mu\text{m}$) um Kapillargefäße zu passieren.
- Die Nanopartikel sprechen unter physiologischen Flussbedingungen auf ein äußeres magnetisches Feld an.
- Der Nanopartikel sollte mit vielfältigen biologisch aktiven Wirkstoffen beladen werden können und eine angemessene Menge zum Zielorgan transportieren ohne den Organismus mit magnetisierbarem Material zu überladen.
- Am Zielorgan sollte der Wirkstoff kontrolliert vom Träger gelöst werden können.
- Die Oberfläche ist biokompatibel und ruft keine Fremdkörperreaktion hervor.
- Der Nanopartikel, der Wirkstoff und deren Abbauprodukte sollten biologisch ausscheidbar sein.⁵⁸

⁵⁸ A. Senyei, K. Widder, G. Czerlinski, *J. Appl. Phys.* **1978**, *49*, 3578-3583.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten Oberflächen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und Wirkung auf den Organismus verändert werden. Dabei lassen sich drei Bereiche unterscheiden.

Im ersten Teil geht es um *in vivo* die Einsatzdauer von Membranen in Oxygenatoren. Die Membran sollte über drei verschiedene Strategien hämokompatibel gestaltet werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde ein cyclisches RGD-Peptid zur Modifizierung eingesetzt und anschließend zur Maskierung mit Endothelzellen besiedelt.⁵⁹ Hierdurch sollte die Blutkoagulation auf der Oberfläche permanent verhindert werden. Da das RGD-Peptid aber an viele Integrine bindet, sollte getestet werden, ob das für Endothelzellen spezifische REDV-Peptid eine ähnliche oder vielleicht bessere Adhesion hervorruft.

Eine weitere Strategie sollte über die Anbindung von Biotin an die Oberfläche Streptavidin fixieren. Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin gehört zu den stärksten nichtkovalenten Bindungen, die in biologischen Systemen bekannt sind. Da das Streptavidin vier Bindungstaschen hat, aber nur ein oder zwei zur Bindung an die Oberfläche belegt werden, sollten die restlichen Bindungstaschen mit biotinmodifizierten Adhäsionsvermittlern belegt werden.⁶⁰

Ein anderer Ansatz beschäftigt sich mit der Vermeidung von Zellaggregation und Adhäsion auf der Oberfläche. Die Poly- α -2,8-*N*-acetylneuraminsäure ist ein Polysaccharid, welches in der embryonalen Entwicklung vorkommt. In erster Linie ist es verantwortlich für die anti-adhäsive Interaktion von Cadherinen und Integrinen und damit einer Zell-Zell-Abstoßung. Dieser Effekt sollte auf Poly-4-methylpent-1-en übertragen werden, ohne eine Fremdkörperreaktion hervorzurufen.⁶¹

⁵⁹ L. Möller *Dissertation* **2012**, Leibniz Universität Hannover.

⁶⁰ M.J. Wheelock, K.R. Johnson, *Annu. Rev. Cell.Dev. Biol.* **2003**, 207-235.

⁶¹ Y. Su, C. Kasper, A. Kirschning, G. Dräger, S. Berski, *Macromolecular Bioscience* **2010**, *10*, 1028-1033; S. Berski, J. van Bergeijk, D. Schwarzer, Y. Stark, C. Kasper, T. Scheper, C. Grothe, R. Gerardy-Schahn, A. Kirschning, G. Dräger, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2353-2359.

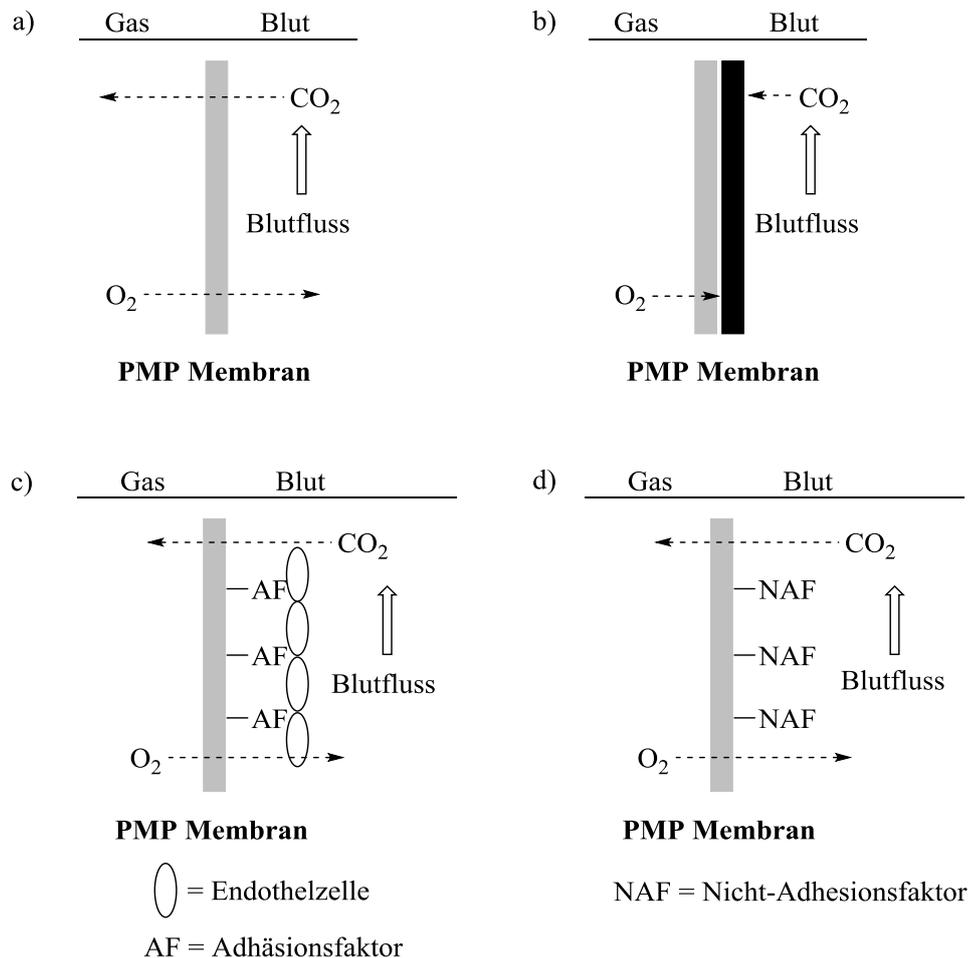
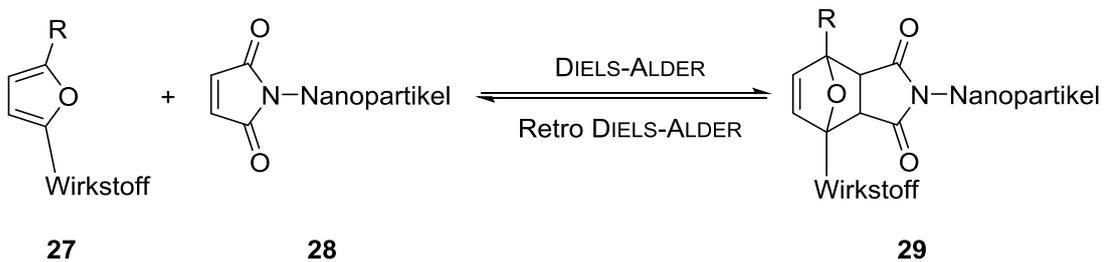


Abbildung 9: a) PMP-Membran bei ungehindertem Gasaustausch; b) PMP-Membran bei gehindertem Gasaustausch durch Blutkoagulation; c) PMP-Membran bei ungehindertem Gasaustausch durch chemische Modifizierung und Maskierung mit Endothelzellen; d) PMP-Membran bei ungehindertem Gasaustausch durch chemische Modifizierung.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Biokompatibilität von Titan erhöht werden. Titan ist ein Material, welches in der Implantologie sehr vielseitig eingesetzt werden kann. Die Herausforderung besteht darin die Biokompatibilität mit verschiedenen Gewebearten herzustellen. Aus diesem Grund sollte Titan mit einem zyklischen RGD-Peptid modifiziert und auf die Fähigkeit zur Osseointegration und Gewebeintegration untersucht werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob eine Vergrößerung des Abstands vom Peptid zur Oberfläche einen positiven Effekt hinsichtlich der Adhäsion von Zellen zeigt. Die Kombination von einer Nanostrukturierung und einer chemischen Modifizierung sollte untersucht werden, um einen zusätzlichen Adhäsions- und Gewebeintegrationseffekt zu erzielen.

Im letzten Teil sollten superparamagnetische Nanopartikel thermoreversibel mittels einer DIELS-ALDER Cycloaddition zwischen einem Furanderivat und einem *N*-substituierten Maleimid funktionalisiert werden. Zuvor sollte die DIELS-ALDER Cycloaddition anhand von verschiedenen Furanderivaten optimiert werden, um einen hohen Belegungsgrad der Nanopartikel zu erreichen (Schema 9). Zusätzlich sollte eine Methode entwickelt werden, anhand derer die Belegung auf den Nanopartikeln quantifiziert werden kann. Diese Methode sollte so gestaltet sein, dass auch die Ablösung durch eine retro DIELS-ALDER Reaktion nachverfolgt werden kann (Schema 9). Letztlich sollte der Grad der Ablösung im induktiven Feld ermittelt werden. Diese Untersuchungen sollten darauf abzielen ein Wirkstofftransport-System zu entwickeln, welches in der Behandlung von kanzerogenen Zellen eingesetzt werden kann.

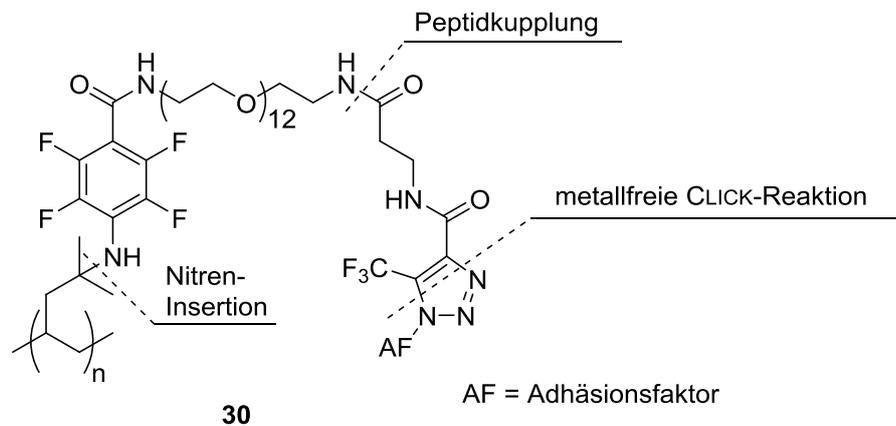


Schema 9: Bildung eines thermoreversiblen Konjugates zwischen Wirkstoff und Nanopartikel über eine DIELS-ALDER und Retro DIELS-ALDER Reaktion für eine Wirkstofftransport-System.

3. Funktionalisierung von Poly-4-methylpent-1-en

3.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Poly-4-methylpent-1-en-Folien (PMP-Folien) durch verschiedene Strategien hämokompatibel gestaltet werden, um den Einsatz in extrakorporalen Membranoxygenatoren (ECMO) zu verbessern. Wie schon in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Funktionalisierung mit einem cyclischen RGD-Peptid möglich, um die Besiedlung mit Endothelzellen zu erreichen (Schema 10).⁵⁹ Da die RGD-Sequenz keine große Selektivität für Endothelzellen besitzt, sollen andere Peptidsequenzen und selektive Adhäsionsfaktoren für Endothelzellen eingesetzt werden. In einer ähnlichen Weise wie das cyclische RGD-Peptid soll das Tripeptid REDV durch eine metallfreie „CLICK“-Reaktion an die PMP-Folien kovalent gebunden werden. Diese Sequenz ist spezifisch für Endothelzellen und könnte die Aggregation von anderen Zelltypen, wie Thrombozyten, vermeiden.



Schema 10: Strategie zur Ligation von Adhäsionsfaktoren auf PMP-Folien.

Um die Aggregation von Zellen und deren Anwachsen zu unterdrücken, sollen die PMP-Folien mit Poly- α -2,8-*N*-acetylneuraminsäure ebenfalls über eine metallfreie „CLICK“-Reaktion funktionalisiert werden. Dieses Polysaccharid wurde bereits als Material für das *tissue engineering* eingesetzt und konnte nicht mit Zellen besiedelt werden, sondern zeigte eine zellabstoßende Wirkung.⁶²

Als Alternative zur metallfreien „CLICK“-Reaktion soll eine Strategie entwickelt werden, mit der es möglich ist, größere Adhäsionsfaktoren auf die Oberfläche zu bringen, ohne

⁶² U. Assmann, A. Szentivanyi, Y. Stark, T. Scheper, S. Berski, G. Dräger, R.H. Schuster, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **2010**, 2115-2124.

eine Denaturierung durch Adsorption hervorzurufen. Die wohl stärksten Bindungspartner, die in biologischen Systemen bekannt sind, Biotin und Streptavidin, sind durch ihre Eigenschaften besonders geeignet, um ein solches System aufzubauen.⁶³ Die vier Bindungstaschen des Streptavidins erlauben eine Bindung an eine Oberfläche und gleichzeitig die Bindung von Adhäsionsfaktoren (Abbildung 10).

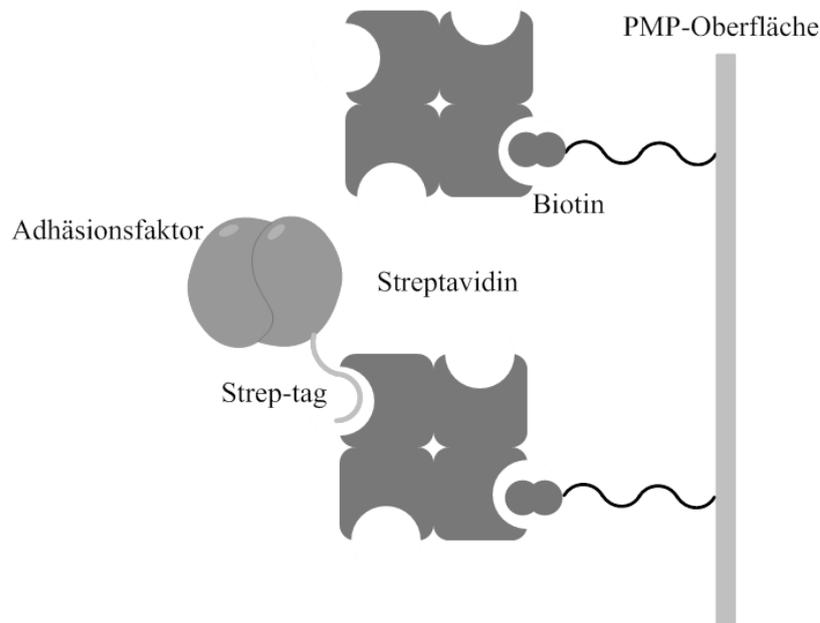


Abbildung 10: Genereller Aufbau zur Funktionalisierung der Oberfläche mit einem Biotin/Streptavidin System.

⁶³ D.E. Hyre, I. Le Trong, E. A. Merrit, J. F. Eccleston, N. M. Green, R. E. Stenkamp, P. S. Stayton *Protein Sci.* **2006**, 459-467.

3.2 Plasmabehandlung von PMP

Die Eigenschaften von PMP sind hervorragend für den Einsatz in extrakorporalen Membranoxygenatoren geeignet. Die geringe Dichte von 0.833 g/cm^3 ist die niedrigste unter allen bekannten Polymeren und dafür verantwortlich, das PMP eine so hohe Gasdurchlässigkeit hat. Es lässt sich sehr gut mit Dampf sterilisieren, da die Feuchtigkeitsabsorption sehr gering ist, was auch ein Vorteil bei dem Kontakt mit Blut ist. Diese geringe Benetzbarkeit ist aber ein Nachteil, wenn es darum geht hydrophile Substanzen kovalent an die Oberfläche zu binden. Die Struktur des Polymers bietet nur wenige funktionellen Gruppen, die eine chemische Modifizierung ermöglichen. Aus diesem Grund mussten die PMP-Folien einem Prozess unterzogen werden, in dem die Hydrophilie erhöht werden konnte.

Eine besonders geeignete Methode ist die Behandlung mit Atmosphärendruckplasma. Bei der Behandlung von Polymeren mit Plasma können bei der Wahl eines geeigneten Ionisationsgases oxidative Prozesse stattfinden (Kapitel 1.6). Die Bedingungen und das Material bestimmen dann welche Bindungen sich im Material bilden, beispielsweise Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen. Diese neuen funktionellen Gruppen können die Hydrophilie des Materials erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Geräten der Firma PLASMATREAT, Steinhagen (Deutschland) gearbeitet, die auf die Herstellung von Atmosphärendruckplasmaanlagen spezialisiert sind. Diese Art der Plasmabehandlung lässt sich auch für industrielle Prozesse einsetzen und erleichtert einen kosteneffizienten Zugang zu hydrophilen Oberflächen.⁶⁴

Die verwendete Plasmaanlage besteht aus einem Generator FG 5001, einem Transformator HTR 12 L133 und einem Verfahrtsch PT 60. Der Aufbau wird in einem Patent von FÖRNSEL *et al.* beschrieben⁶⁵ und entspricht dem Aufbau serieller Prozesse (Abbildung 11).

⁶⁴ <http://www.plasmatreat.de/> (Zugriff: 30.04.2015).

⁶⁵ P. Försnel, C. Buske, U. Hartmann, A. Baalmann, G. Ellinghorst, K. D. Vissing, US-Patent-Nr. 6,800,366 B1, 2004.

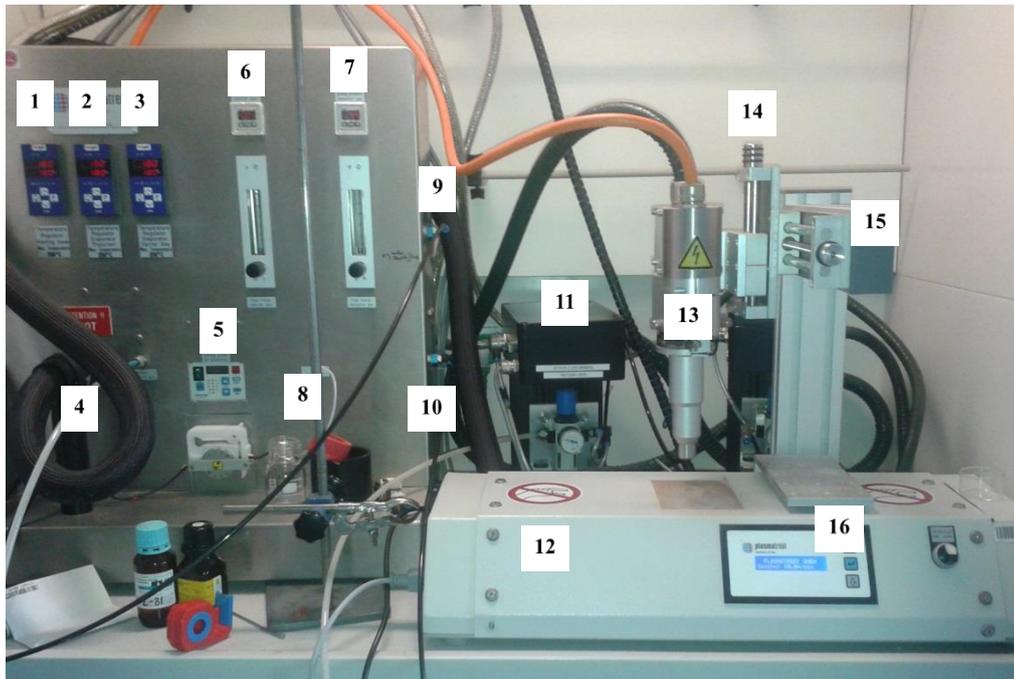


Abbildung 11: Plasmaanlage für Atmosphärendruckplasma mit verschiedenen Düsen; 1) Temperaturregulator beheizbarer Schlauch, 2) Temperaturregulator Verdampfeinheit *Precursor*, 3) Temperaturregulator Trägergas, 4) beheizbarer Schlauch, 5) Schlauchpumpe, 6) Gasdurchflussmesser Trägergas, 7) Gasdurchflussmesser Ionisationsgas, 8) Vorratsgefäß *Precursor*, 9) Ionisationsgaseinlass, 10) Trägergaseinlass, 11) Transformator, 12) Verfahrtsch, 13) rotierende Düse RD 1004 mit Aufsatz 10157, 14) Stellrad zur Regulation des Plasmadüse-Substrat-Abstandes, 15) Stellrad zur horizontalen Justierung der Plasmadüse, 16) Substrathalter.

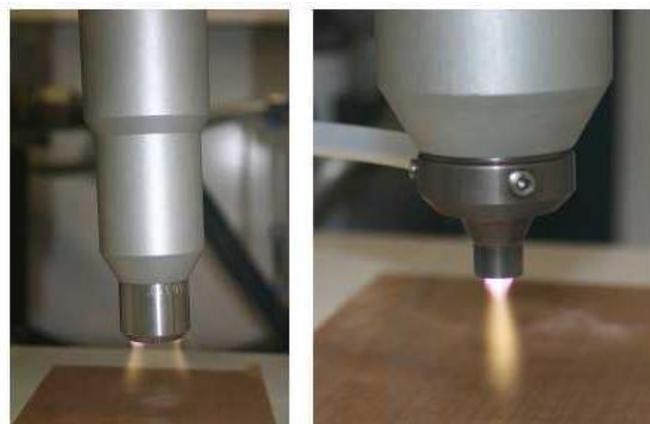


Abbildung 12: Verschiedene Düsen für die Generierung von Atmosphärendruckplasma: Links Rotationsdüse für Ionisationsgasströme von etwa 3000 L/h; rechts statische Düse für Ionisationsgasströme von etwa 3000 L/h mit *Precursor*-Zustrom.⁵⁹

Die Plasmadüse wurde immer abhängig von dem erzeugten Plasma und dem Verwendungszweck gewählt. Für großflächige Anwendungen wurde eine rotierende Düse verwendet (Typ 10157). Für den Zusatz von *Precursoren* wurde eine statische Düse verwendet (Typ 19328). Der jeweilige *Precursor* wurde über eine Schlauchpumpe aus einem Vorratsgefäß in eine Verdampfeinheit transportiert. Die Temperatur lag hier bei 180 °C. Durch ein vorgeheiztes Trägergas konnte der verdampfte *Precursor* dem Plasmastrom direkt in die Düse zugeführt werden.

3.2.1 Plasmamodifizierung mit Formiergasplasma

Um die PMP-Folien mit Plasma modifizieren zu können, müssen gewisse Rahmenbedingungen erfüllt werden. In erster Linie darf das hochenergetische Plasma nicht zu thermischen Verformungen oder Löchern in den Folien führen, da hierdurch die Eigenschaften, wie Gasdurchlässigkeit, des Polymers zusätzlich verändert werden können. Diese Veränderung kann später beim Einsatz in einer ECMO unerwünschte Folgen haben, wie die Vermischung von Blut und Gas, welche zu Störung der Funktion führen können. Dennoch sollte ein hoher Funktionalisierungsgrad erreicht werden, um eine gleichbleibende Qualität der Folgestufen zu gewährleisten. In vorangegangenen Arbeiten wurde getestet, welche Bedingungen zu einer hohen Hydrophilie bei geringer bis gar keiner sichtbaren Deformation führen.⁵⁹ Diese Bedingungen (Tabelle 1, Eintrag 1) wurden zunächst übernommen und führten zu der gewünschten Funktionalisierung. Bei einer neuen Charge PMP-Folie führten diese Bedingungen allerdings zu einer erheblichen Deformation. Da aus der alten Charge keine Daten über die Dicke der Folie vorliegen, kann es sein, dass die Dicke der Folie sich verändert hat. Deshalb führte die gleiche Art der Behandlung zu einem nicht gewünschten Ergebnis. Aus diesem Grund wurden die Bedingungen verändert, um ein besseres Ergebnis zu erzielen (Tabelle 1, Eintrag 2).

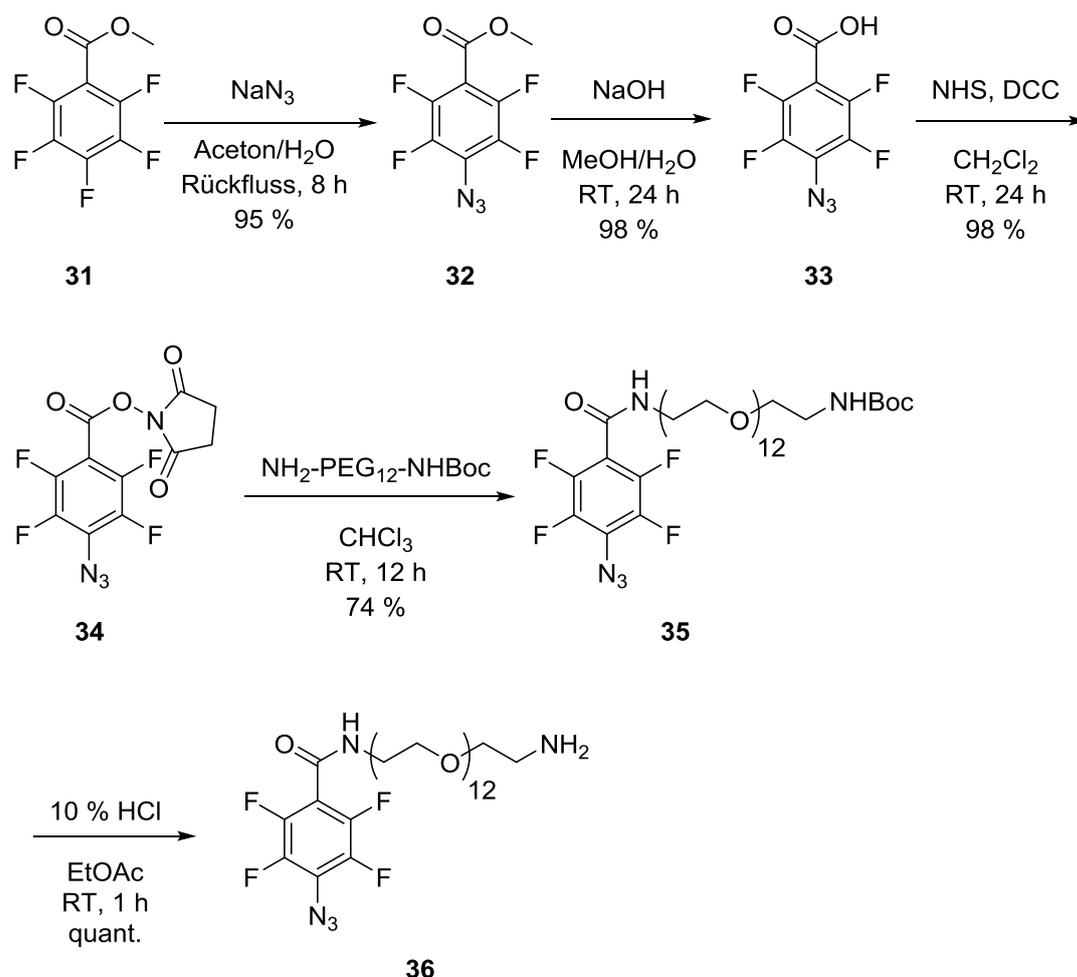
Eintrag	Frequenz [kHz]	Spannung [V]	Abstand [mm]	Puls-Pause-Verhältnis
1	19	300	8	100
2	20	280	12	100

Tabelle 1: Bedingungen für die Plasmabehandlung von Oberflächen. Ionisationsgasstrom 3000 L/h, Geschwindigkeit Verfahrtsch 10 m/min

3.3 Nitreninsertion und Kupplung eines Linkers an PMP

3.3.1 Synthese von PFPA-PEG₁₂NH₂ **36** und Nitreninsertion

Das fluoridierte Phenylazid PFPA-PEG₁₂-NH₂ **36** wurde über fünf Stufen aus Pentafluorbenzoesäuremethylester **31** nach YAN et al. dargestellt (Abbildung 24).^{66,67} Beginnend mit einer Umsetzung zum Azid **32** wurde anschließend eine Entschützung der Säure vorgenommen. Danach wurde der Aktivester **34** gebildet, welcher freundlicherweise von MÖLLER zur Verfügung gestellt wurde.⁵⁹ Der Aktivester **34** wurde mit NH₂-PEG₁₂-NHBoc gekuppelt und das Peptid **35** abschließend entschützt. Die Ausbeuten lagen im guten Bereich.

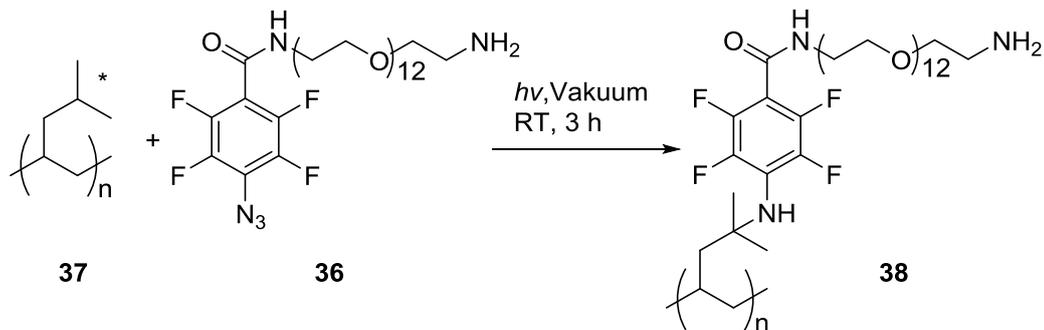


Schema 11: Synthese von PFPA-PEG₁₂-NH₂

⁶⁶ L.-H. Liu, M. Yan *React. Funct. Polym.* **2000**, *45*, 137-144.

⁶⁷ L.-H. Liu, M. Yan *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43*, 1434-1443.

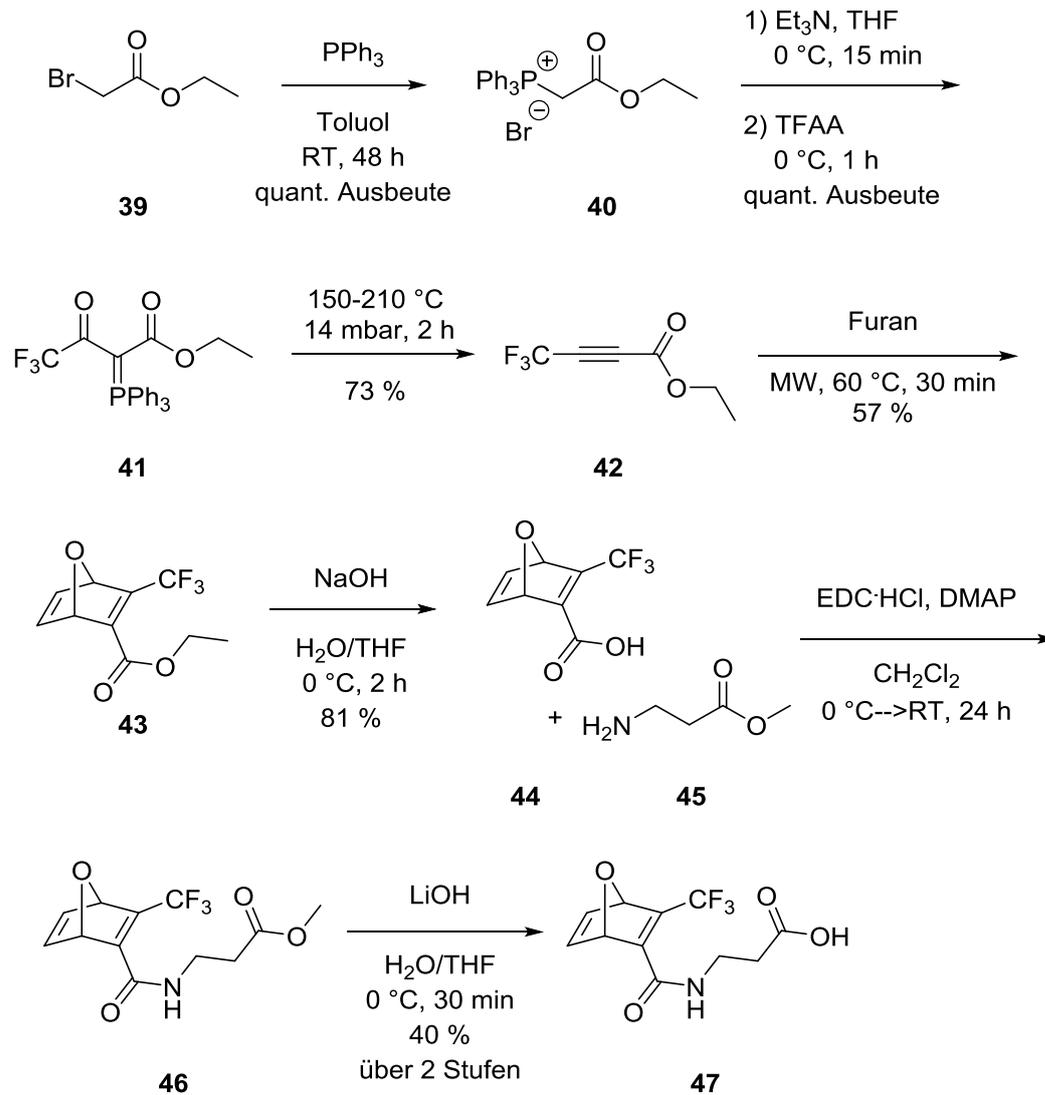
Der so erhaltene PFPA-PEG₁₂-NH₂ Spacer **36** konnte nun in einer Nitreninsertion mit plamabehandelter PMP-Folie eingesetzt werden. Hierfür wurde eine methanolische Lösung des Spacers **36** hergestellt, in der die Folien über Nacht eingelegt wurden. Nach Trocknung wurden die Folien mit einer Quecksilber-Lampe im UV-Bereich bestrahlt. Aus Azid **36** wurde hierbei ein Nitren gebildet, welches in die CH-Bindung der Folie insertieren konnte. Durch die Evakuierung eines Quarzglasgefäßes, indem sich die Folie befand, konnten eventuelle Reaktionspartner (zum Beispiel Wasser oder Sauerstoff) aus der Atmosphäre permanent abgeführt werden.⁵⁹



Schema 12: Nitreninsertion von PFPA-PEG₁₂NH₂ auf plasmaaktivierter PMP-Folie

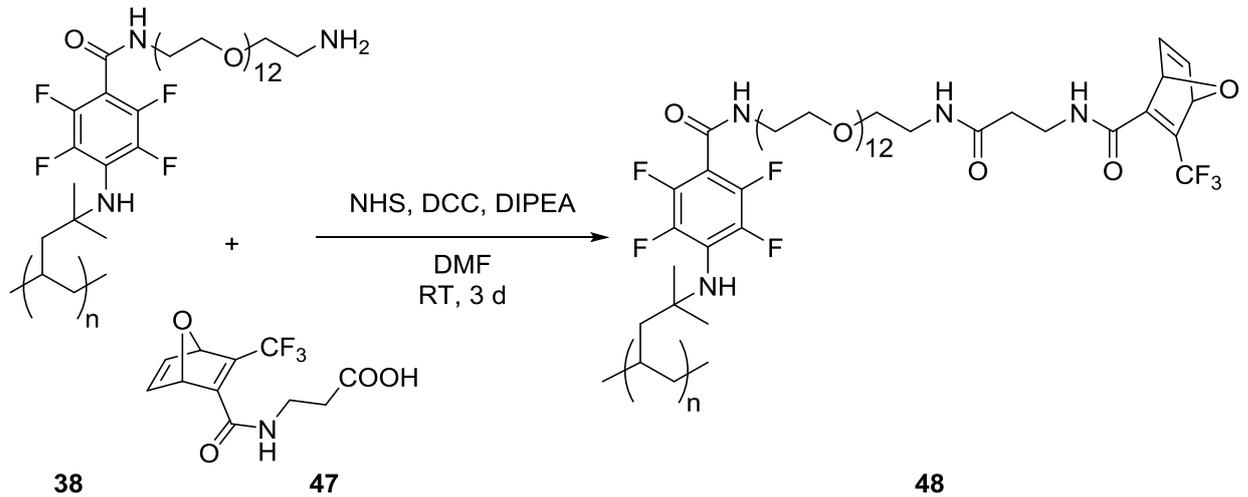
3.3.2 Synthese von Oxanorbornadien **47** und Kupplung an PMP-Folie

Für die Anbindung von Signalstoffen an die PMP-Folie soll eine metallfreie Strategie verfolgt werden, um metallische zelltoxische Rückstände auf der Oberfläche zu vermeiden und die Biokompatibilität auf diesem Wege zu gewährleisten. Die Azid-Oxanorbornadien-Ligationsstrategie (Kapitel 1.4.1) von RUTJES *et al.*³⁵ wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Synthese des Linkers erfolgte ausgehend von Bromessigsäureethylester **39** nach den Arbeiten von RUTJES *et al.*, welche durch SU *et al.* modifiziert wurde (Schema 13).³⁶ Durch Umsetzung mit Triphenylphosphin wird zunächst das korrespondierende Phosphoniumsalz **40** erhalten. Es folgten eine Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid und eine Pyrolyse um Alkin **42** zu erhalten. Wegen der Instabilität des Alkins **42** wurde es umgehend eine DIELS-ALDER Cycloaddition mit Furan durchgeführt. Die Verseifung mit Natriumhydroxid ergab ausschließlich Säure **44**. Durch eine Kupplung mit β -Alaninmethylester und erneuter Verseifung konnte Oxanorbornadien **47** erhalten werden.



Schema 13: Synthesesequenz zur Darstellung von Oxanorbornadien **47**.

Darauf folgte eine Kupplung des Oxanorbornadiens **47** an die PMP-Folien **38**. Die Reaktionszeit für die Folien war im Vergleich zu Peptidkupplungen in Lösung verlängert worden, da das Polymer die reaktiven Zentren abschirmen kann und eine eingeschränkte Dynamik der Reaktionspartner gegeben war.⁵⁹



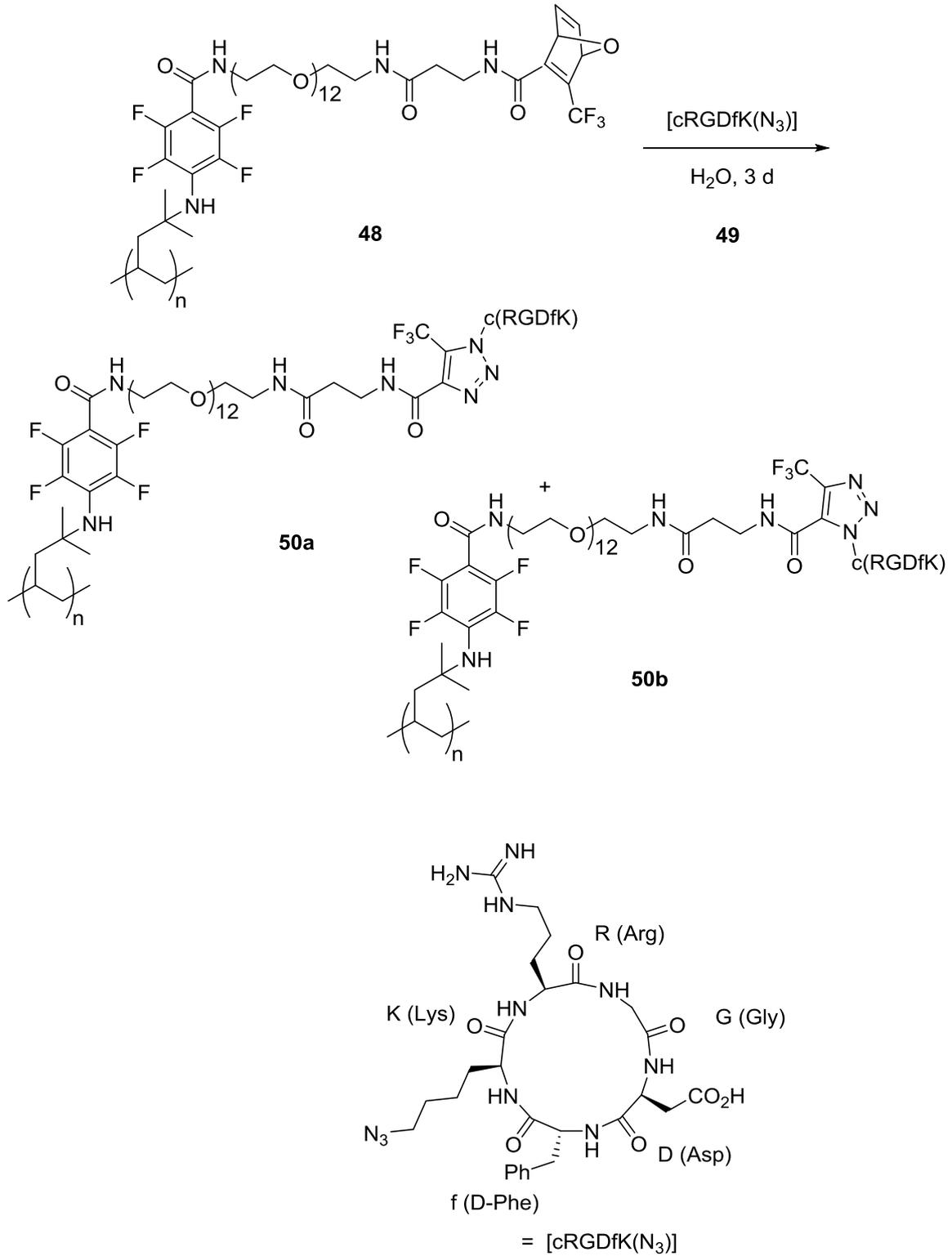
Schema 14: Kupplung des Oxanorbornadiens **47** an PMP-Folie.

3.4 Metallfreie Ligation von Signalstoffen an PMP

Die metallfreie Ligation von Signalstoffen an die Oberfläche ist durch die kovalente Anbindung eines Oxanorbornadiens **47** möglich. Mechanistisch folgt die Ligation dem von RUTJES *et al.* untersuchten Reaktionen diesbezüglich.³⁵ Da es bereits Untersuchungen zur Anbindung von cRGDfK(N₃) **49** gab⁵⁹, diente ein entsprechend modifiziertes Material zum Vergleich mit anderen Signalstoffen (Abbildung 28). Die Synthese von cRGDfK(N₃) **49** wurde durch DIETER *et al.*⁶⁸ nach PALEČEK *et al.*⁶⁹ modifiziert und das Peptid **49** zur Verfügung gestellt.

⁶⁸ B. Dieter *unveröffentlichte Ergebnisse* **2015**, Leibniz Universität Hannover.

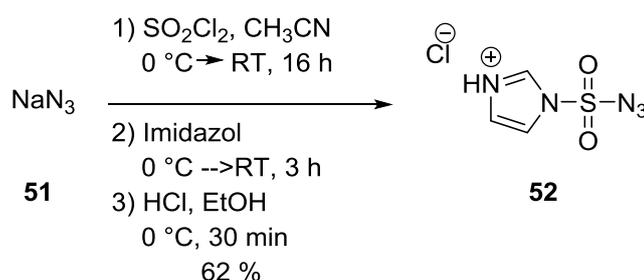
⁶⁹ J. Paleček, G. Dräger, A. Kirschning *Synthesis* **2011**, *4*, 653-661.



Schema 15: Ligation von cRGDfK(N₃) **49** an modifizierte PMP-Folie **48**.

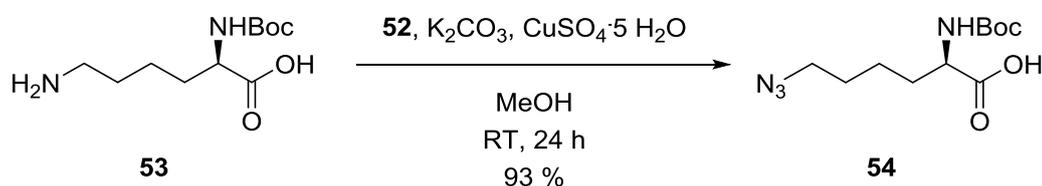
3.4.1 Darstellung verschiedener Azide

Es sollten verschiedene Peptide in Azide überführt werden, um diese anschließend auf die PMP-Folie **48** aufzubringen. Als Azid-Transfer-Reagenz wurde Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid **52** gewählt.⁷⁰ Auf die Verwendung eines *in situ* generierten Triflatazids wurde verzichtet, da bei der Synthese von cRGDfK(N₃) **49** nur ein geringer Umsatz und schlechte Ausbeuten erzielt werden konnten.⁶⁸ Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid **52** lässt sich hingegen einfach aus Natriumazid **51**, Sulfonylchlorid und Imidazol herstellen (Schema 16) und ergibt einen farblosen Feststoff, welcher stabil gelagert werden kann und unempfindlich gegen Sauerstoff und Feuchtigkeit ist.⁷⁰



Schema 16: Synthese von Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid **52**.

Als Referenzsubstanz wurde die Übertragung eines Azids zunächst an Lysin **53** untersucht. Da in allen verwendeten Peptiden, wie auch schon in cRGDfK(N₃) **49**, an der Lysinseitenkette der Azidtransfer durchgeführt werden sollte (Schema 17).

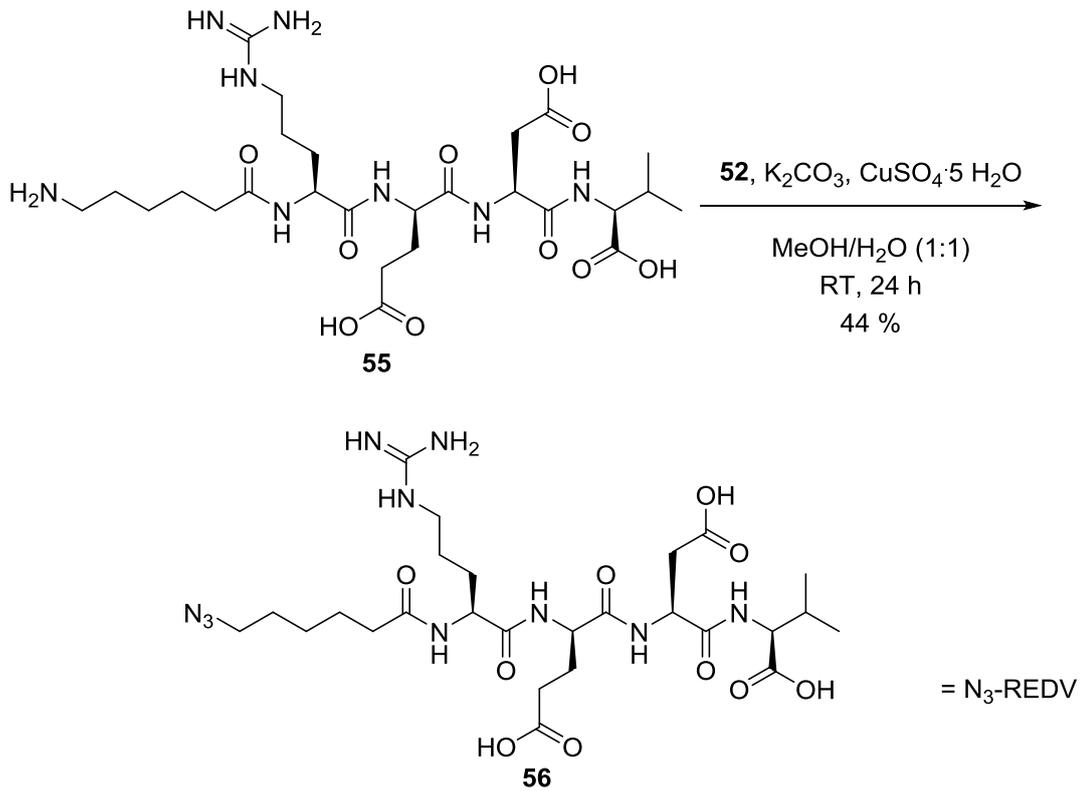


Schema 17: Azid-Transfer an Lysin **53**.

Nachdem diese Reaktion mit einem vollständigen Umsatz verlief, konnten die Bedingungen auf das REDV-Peptid **55** übertragen werden. Da die Polarität von Peptiden sehr hoch ist, wurde statt Methanol eine Mischung aus Wasser und Methanol (1:1) als Lösemittel gewählt. Auch hier war nach 24 Stunden Reaktionszeit ein vollständiger

⁷⁰ E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800.

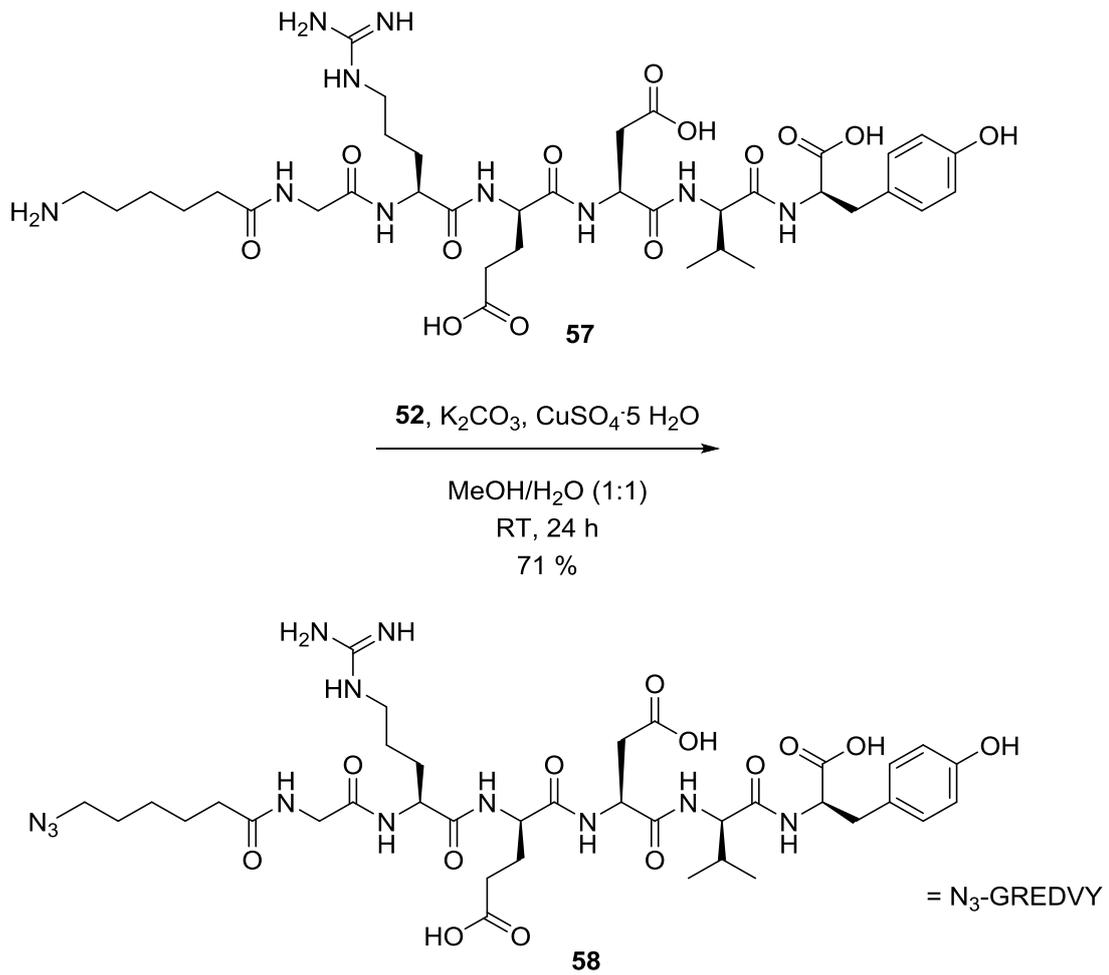
Umsatz zu beobachten und es wurden gute Ausbeuten für das mittels HPLC isolierte Azid **56** erreicht.



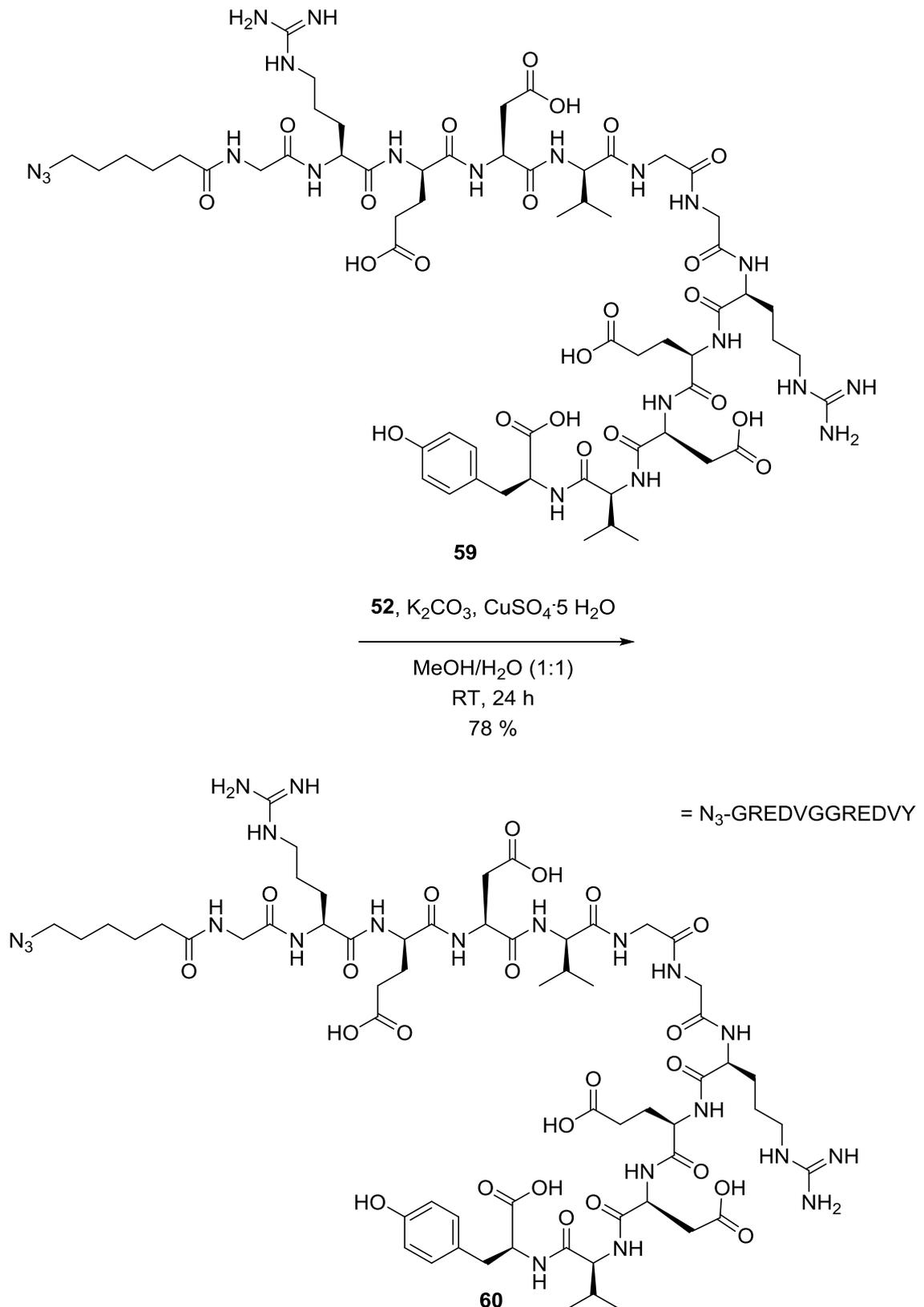
Schema 18: Azid-Transfer an REDV **55**.

Hinsichtlich der biologischen Aktivität kann es von Vorteil sein, wenn Peptidsequenzen eine bestimmte räumliche Anordnung aufweisen. Durch die Faltung der Peptide wird für eine bestimmte Sequenz die räumliche Ausrichtung erhalten, welche in die Bindungstasche von Integrinen passt. Aus diesem Grund weisen zyklische RGD-Peptide eine höhere Affinität zu $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen auf, als die lineare Form.⁷¹ Um beim REDV-Peptid eine solche räumliche Anordnung zu erreichen, wurden zwei Peptide gewählt, in denen das Strukturmotiv von weiteren Aminosäuren umgeben war, zum einen die Variante GREDVY (Glycin-Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin-Tyrosin) **57** und eine doppelte Variante GREDVGGREDVY (Glycin-Arginin-Asparaginsäure-Valin-Glycin-Glycin-Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin-Tyrosin) **59**. Beide Peptide wurden ebenfalls mit dem Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid **52** und den erprobten Bedingungen in die entsprechenden Azide überführt (Schema 19 und 20).

⁷¹ M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911.

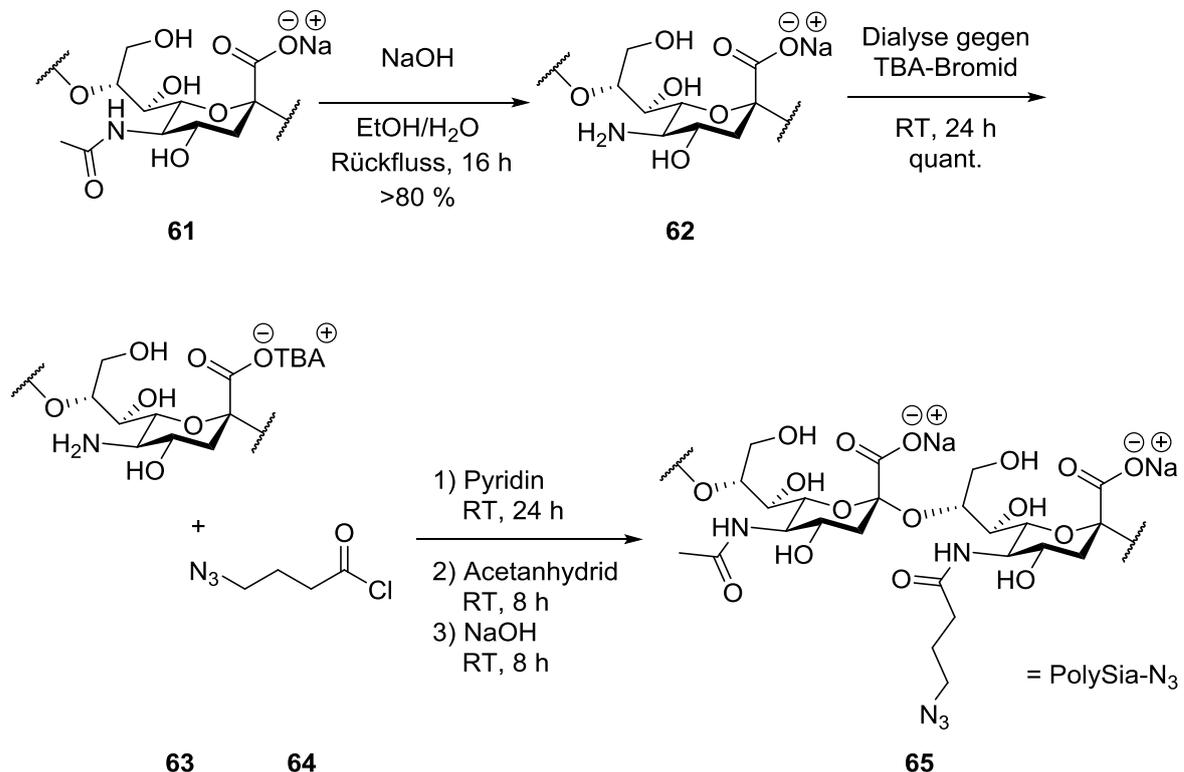


Schema 19: Azid-Transfer an GREVDY **57**.



Schema 20: Azid-Transfer an GREDVGGREDVY **59**.

Als Alternative dazu sollte ein Polysaccharid eingesetzt werden, welches die Zelladhäsion komplett inhibieren und für die Unterdrückung einer Fremdkörperreaktion sorgen sollte. Die poly-alpha-2,8-*N*-Acetylneuraminsäure **61** ist dafür bekannt, für eine Zell-Zell-Abstoßung zu sorgen und wurde bereits ausgiebig innerhalb eines DFG-Projekts als Biomaterial für das *tissue engineering* untersucht.⁷² Innerhalb dieses Projektes wurde poly-alpha-2,8-*N*-Acetylneuraminsäure **61** zunächst deacyliert und anschließend vom Natriumsalz **62** in das TBA-Salz **63** überführt um die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu verbessern. Danach konnte eine Azid-Seitenkette eingeführt werden und abschließen die nicht reagierten Amine acyliert werden (Schema 21). Freundlicherweise wurde dieses Material **65** mit einem Derivatisierungsgrad von 80 % von SU zur Verfügung gestellt.⁷³

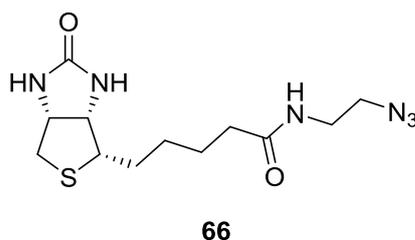


Schema 21: Synthesesequenz zur Darstellung von N-(4-Azidobutyl)-PolySia **65**.⁷³

Für eine alternative Strategie zu kleinen Peptidsequenzen und Polysacchariden wurde für die Modifizierung der PMP-Folien ein Biotinazid **66** (Schema 22) benötigt. Dieses sollte über eine Peptidkupplung mit einer Azid-Seitenkette versehen werden.

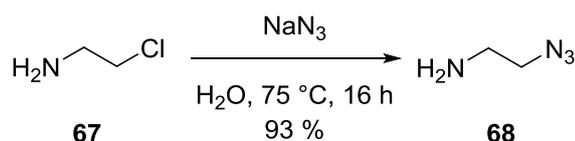
⁷² <http://www.polysia.org/> (Zugriff: 06.05.2015).

⁷³ Y. Su *Dissertation* **2011**, Leibniz Universität Hannover.



Schema 22: Biotin-Derivat **66**.

Zunächst wurde 2-Azidethan-1-amin **68** aus 2-Chlorethan-1-amin **67** durch eine Substitutionsreaktion mit einer Ausbeute von 93 % hergestellt (Schema 23).⁷⁴

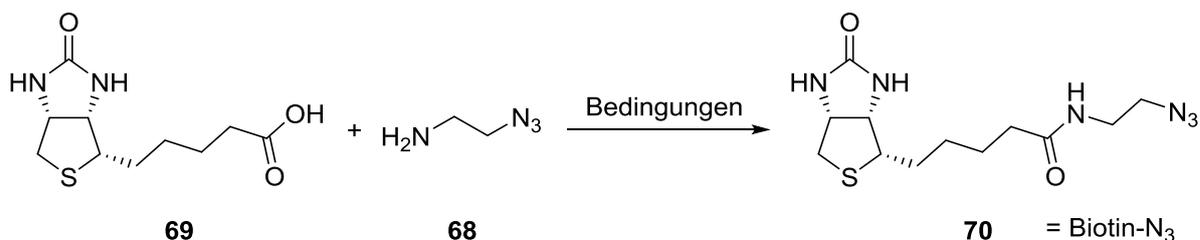


Schema 23: Synthese von 2-Azidethan-1-amin **68**.

Für die Peptidkupplung zwischen Biotin **69** und Amin **68** wurden verschiedene Bedingungen getestet. Die entsprechenden Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die direkte Kupplung von Azid **68** an Biotin **69** stellte sich als äußerst schwierig heraus. Erst die Bildung eines Aktivesters durch den Einsatz von *N*-Hydroxysuccinimid und eine anschließende Peptidkupplung von Biotin war erfolgsversprechend, allerdings musste hier die Reaktion nach 24 h abgebrochen werden, um eine höhere Ausbeute zu erreichen (Eintrag 7). Bei längeren Reaktionszeiten wurden schlechtere Ausbeuten erzielt (Eintrag 6). Die Bedingungen sind dabei modifiziert von MAYER *et al.* übernommen worden.⁷⁴

⁷⁴ T. Mayer, E. M. Maier *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 28, 4711-4720.



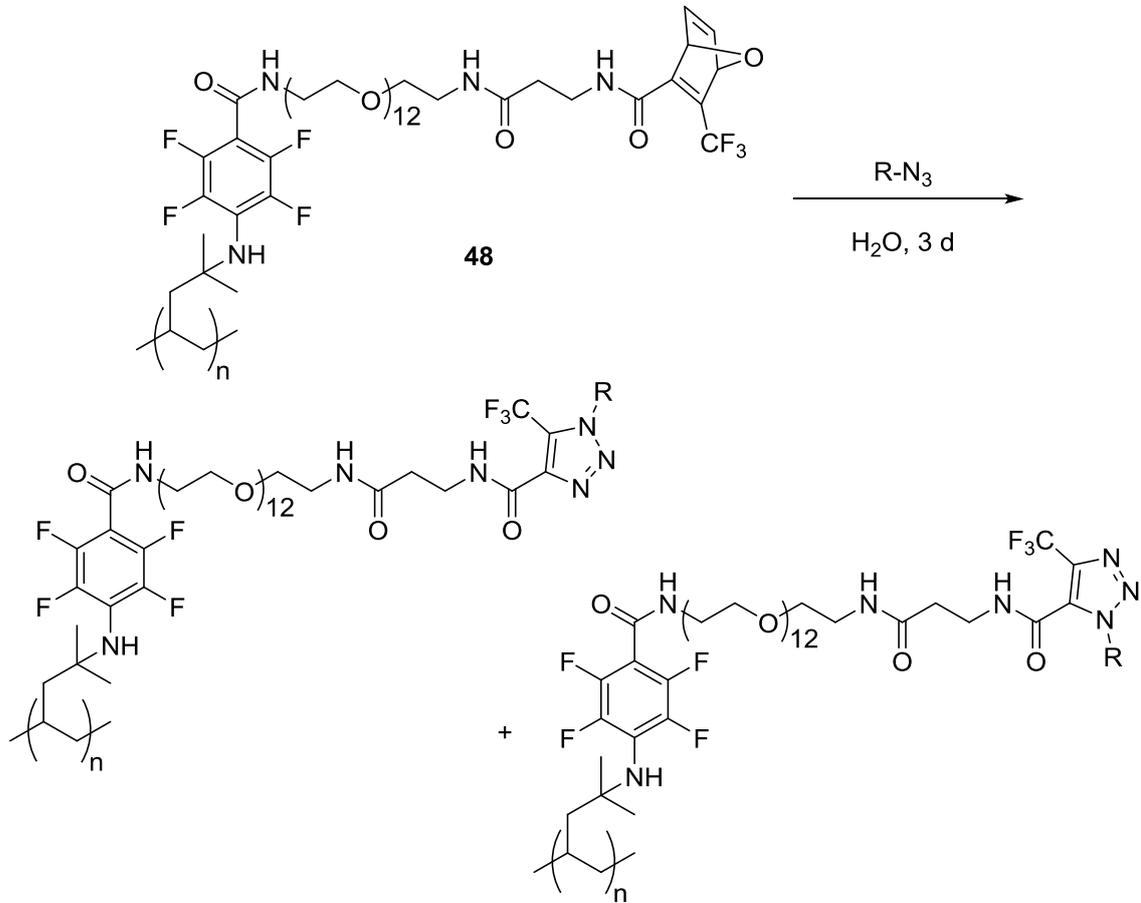
Schema 24: Synthese des Biotinderivates **70**.

Eintrag	Bedingungen	Reagenzien	Ausbeute	Anmerkung
1	3 d, 40 °C	2.0 Äq. 68 , 1.1 Äq. HATU, 1.1 Äq. HOBT, 5.0 Äq. DIPEA	-	Isolierung nicht möglich
2	3 d, 40 °C	2.0 Äq. 68 , 1.25 Äq. HATU, 1.25 Äq. HOBT, 1.5 Äq. DIPEA	-	Isolierung nicht möglich
3	24 h, RT	1.0 Äq 68 , 2.0 Äq. NHS, 2.0 Äq. DCC, 5.0 Äq. DIPEA	-	Isolierung nicht möglich
4	24 h, 0 °C → RT	1.0 Äq. 68 , 1.25 Äq. EDC·HCl, 1.5 Äq. HOBT, 1.5 Äq. DIPEA	-	Lösemittel DCM, Isolierung nicht möglich
5	24 h, 0 °C → RT	1.0 Äq. 68 , 1.25 Äq. EDC·HCl, 1.5 Äq. HOAt, 1.5 Äq. DIPEA	-	Lösemittel DCM, Isolierung nicht möglich
6	1. 3 d, 40 °C	1. 1.2 Äq NHS, 1.2 Äq. EDC·HCl	92 %	-
	2. 3 d, RT	2. 1.2 Äq. 68 , 1.0 Äq. Et ₃ N	57 %	
7	1. 3 d, 40 °C	1. 1.2 Äq. NHS, 1.2 Äq. EDC·HCl	92 %	-
	2. 24 h, RT	2. 1.4 Äq. 68 , 1.0 Äq. Et ₃ N	67%	

Tabelle 2: Bedingungen für die Kupplung von Biotin **69** mit **68**.

3.4.2 Ligation von Aziden an modifizierte PMP-Folie 48

Nachdem alle Azide hergestellt werden konnten, wurde unter den gleichen Bedingungen, wie cRGDfK(N₃) **49** die metallfreie Ligation an den modifizierten PMP-Folien **48** durchgeführt. Um der Zersetzung der Azide vorzubeugen wurden alle Reaktionen unter Ausschluss von Licht durchgeführt.



56, 71a/b: R = REDV

58, 72a/b: R = GREDVY

60, 73a/b: R = GREDVGGREDVY

65, 74a/b: R = PolySia

70, 75a/b: R = Biotin

Schema 25: Metallfreie Ligation der Azide **56, 58, 60, 65** und **70** an modifizierte PMP-Folie **48**.

3.5 Streptavidin-Biotin Strategie

Unter den nicht kovalenten Bindungen ist die von Biotin und Streptavidin die wohl stärkste bekannte Bindung. Diese starke und in biologischen Systemen stabile Bindung sollte ausgenutzt werden, um Signalfaktoren auf die Oberfläche zu fixieren. Dieses System wird bereits verwendet, um rekombinante Proteine nach einer Expression über eine Affinitätschromatographie zu isolieren. Die Proteine sind dabei mit einem sogenannten Strep-Tag ausgestattet, einem Peptid, welches reversibel in die Bindungstasche von Streptavidin bindet. Das Protein kann durch eine kompetitive Elution mit D-Biotin **76** wieder von der Chromatographie-Matrix abgelöst werden (Abbildung 13).⁷⁵

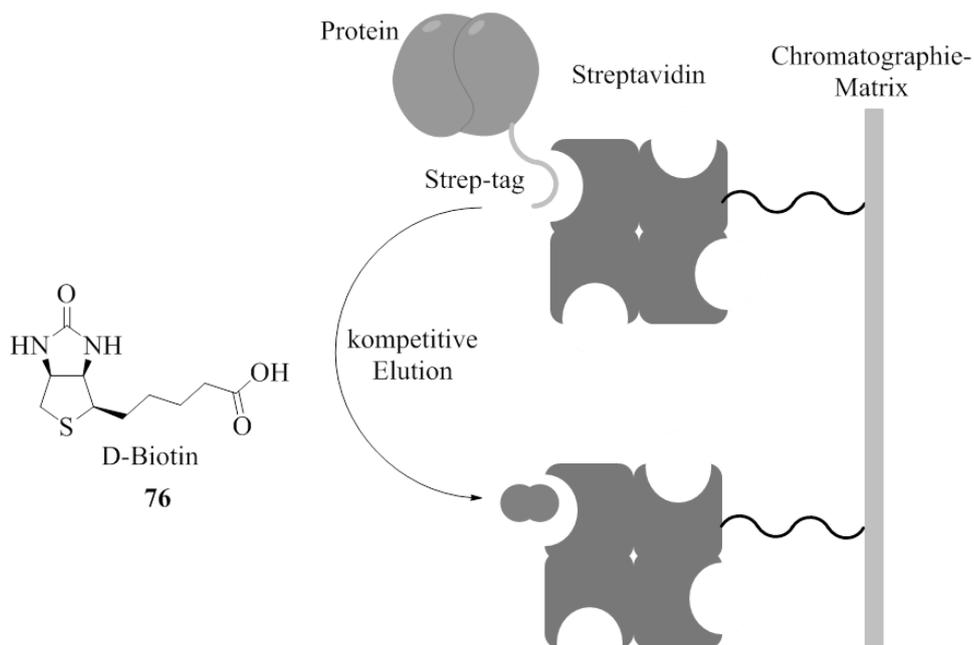
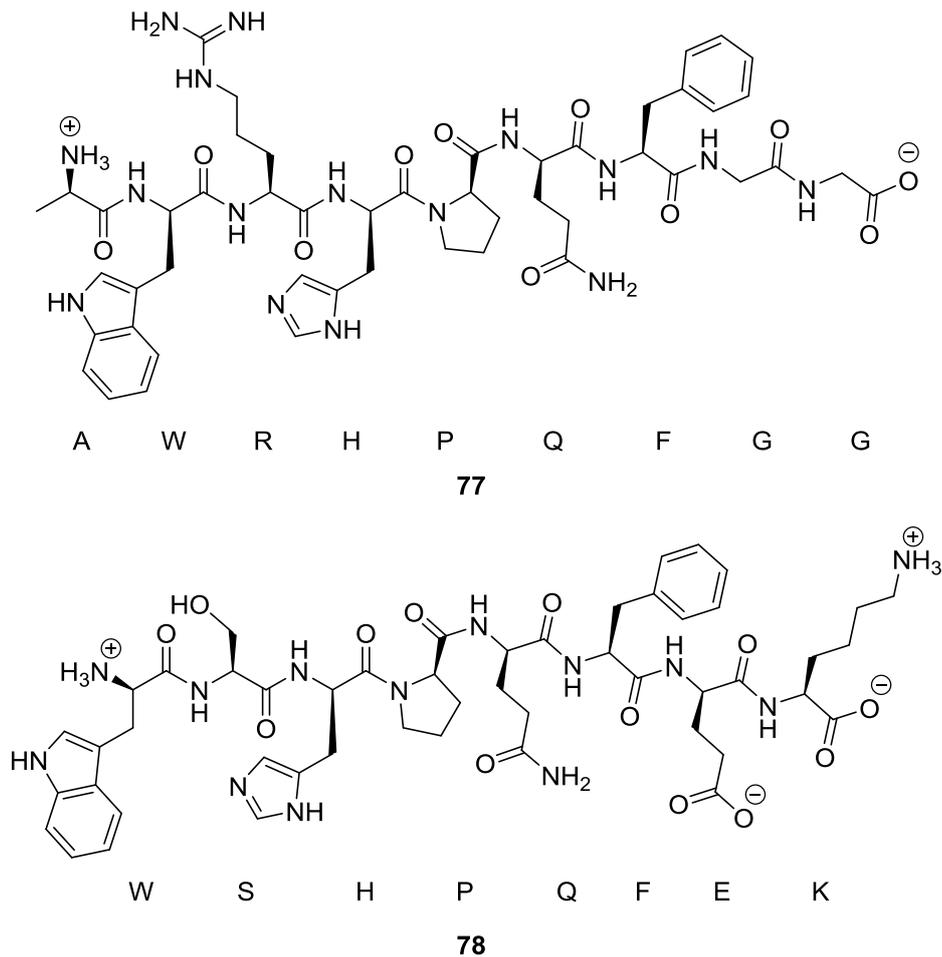


Abbildung 13: Prinzip der Streptavidin-Affinitätschromatographie rekombinanter Proteine.

Der Strep-Tag selbst ist am C-Terminus des Proteins angebracht. Es gibt den Strep-Tag **77** und den Strep-TagII **78** (Schema 26), welche beide die Bindungstasche von Biotin besetzen. Allerdings können diese voluminösen Peptide nicht so tief eindringen, wie es bei Biotin der Fall ist. Aus diesem Grund ist auch eine kompetitive Ablösung des Proteins durch Elution mit Biotin möglich.⁷⁵

⁷⁵ A. Skerra *BIOspektrum* **2003**, 189-192.



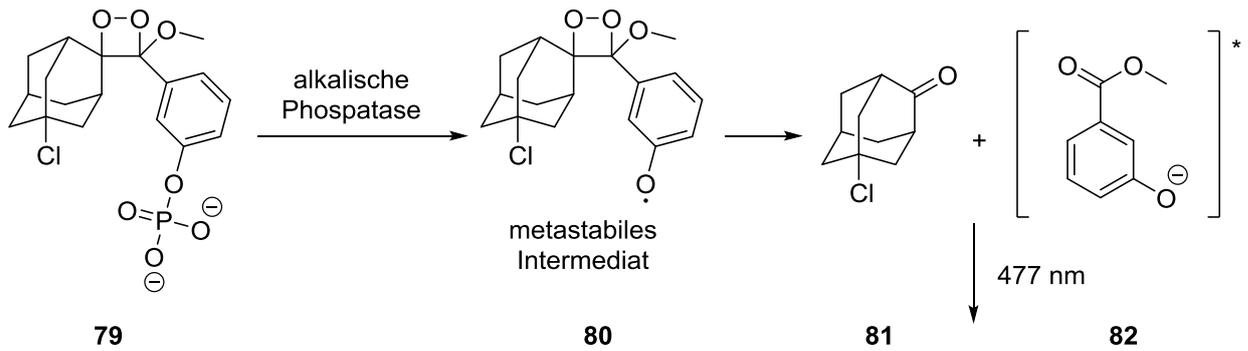
Schema 26: Strep-Tag **77** und Strep-TagII **78**.⁷⁵

Für die Anbindung von Signalfaktoren an die PMP-Folien wurde dabei zunächst Biotin **70** angebracht, da dies unter physiologischen Bedingungen stabiler als ein Strep-Tag an Streptavidin bindet. Dadurch sollte verhindert werden, dass ein Peptid durch physiologisch vorhandenes Biotin aus einer Bindungstasche in Streptavidin verdrängt wird.

Um zunächst die Modifizierung mit Biotin **70** auf der Oberfläche zu überprüfen, sollte eine Quantifizierung über ein photometrisches Verfahren verwendet werden.

Streptavidin gekoppelt an eine alkalische Phosphatase bindet an Biotin und katalysiert die Reaktion eines chemielumineszenten Reagenzes (CSPD – Dinatrium-2-chloro-5-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan)-4-yl]-1-phenylphosphat) **79** (Schema 27).⁷⁶

⁷⁶ Manual *Biotin Luminescent Detection Kit* Roche Applied Science **2004**.



Schema 27: Reaktion von CSPD **79** mit der alkalischen Phosphatase des Streptavidins.

Versuche, eine Kalibriergerade zu erstellen, scheiterten. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Für biologische Anwendungen wird oft ein *Detection Kit* mit allen benötigten Reagenzien verwendet. Möglich ist, dass die 0.025 M Lösung von CSPD **79** nicht mehr der angegebenen Molarität entsprach, womit es unmöglich wäre eine entsprechende Kalibriergerade zu erstellen. Darüber hinaus wurde in der Literatur die Biotin-Konzentration der Oberfläche auf einem anderen Material bestimmt. Die PMP-Folien unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von Nylonmembranen oder Nitrocellulose.⁷⁷

Durch die Kalibriergerade mit dem Streptavidin-Konjugat sollte ein Fehler ausgeschlossen werden, der sich durch die Mehrfachbindung von Biotin an Streptavidin ergeben könnte. Es sollte nur das auf der Oberfläche gebundene Streptavidin gemessen werden, welches für eine Konjugation mit Adhäsionsfaktoren zur Verfügung steht.

Allerdings ließ sich durch die Behandlung der Folie eine qualitative Aussage über die Bindung von Streptavidin an die biotinylierte Oberfläche **75** machen. Dies wurde durch die Analyse der elementaren Oberflächenzusammensetzung gestützt.

Im Anschluss daran konnte eine Anbindung eines selektiven Adhäsionsfaktors erfolgen. Zu diesem Zweck wurde ein Aptamer ausgewählt, welches durch YANG *et al.* auf seine adhäsiven Eigenschaften gegenüber Epithelzellen untersucht wurde.⁷⁸ Die ssDNA-Sequenz **83** (Schema 28) bindet spezifisch an EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) einem transmembranen Glykoprotein.

⁷⁷ <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/roche/cdp-star-ready-to-use.html> (Zugriff: 25.09.2015).

⁷⁸ Y. Song, Z. Zhu, Y. An, W. Zhang, H. Zhang, D. Liu, C. Yu, W. Duan, C. J. Yang *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4141-4149.

5' AGC GTC GAA TAC CAC TAC AGA GCT CCG
 GGG TTT TTG GGG GTT TTT CTG GGG TTT TTT
 GGG GCT AAT GGA GCT CGT GGT CAG-3'

83

Schema 28: ssDNA-Sequenz für die spezifische Bindung an EpCAM **83**.⁷⁸

Um die Strategien der enzymatischen und kovalenten Bindung zu Vergleichen, wurde nicht nur ein biotinyliertes Aptamer **84**, sondern auch ein Aptamer mit Azid-Funktion **85** eingesetzt (Schema 29). Auf diesem Wege konnte sichergestellt werden, welches der beiden Systeme unter biologischen Bedingungen die bessere biologische Aktivität aufweist. Allerdings wurde darauf verzichtet, die von YANG *et al.* verkürzten DNA-Sequenzen zu verwenden.

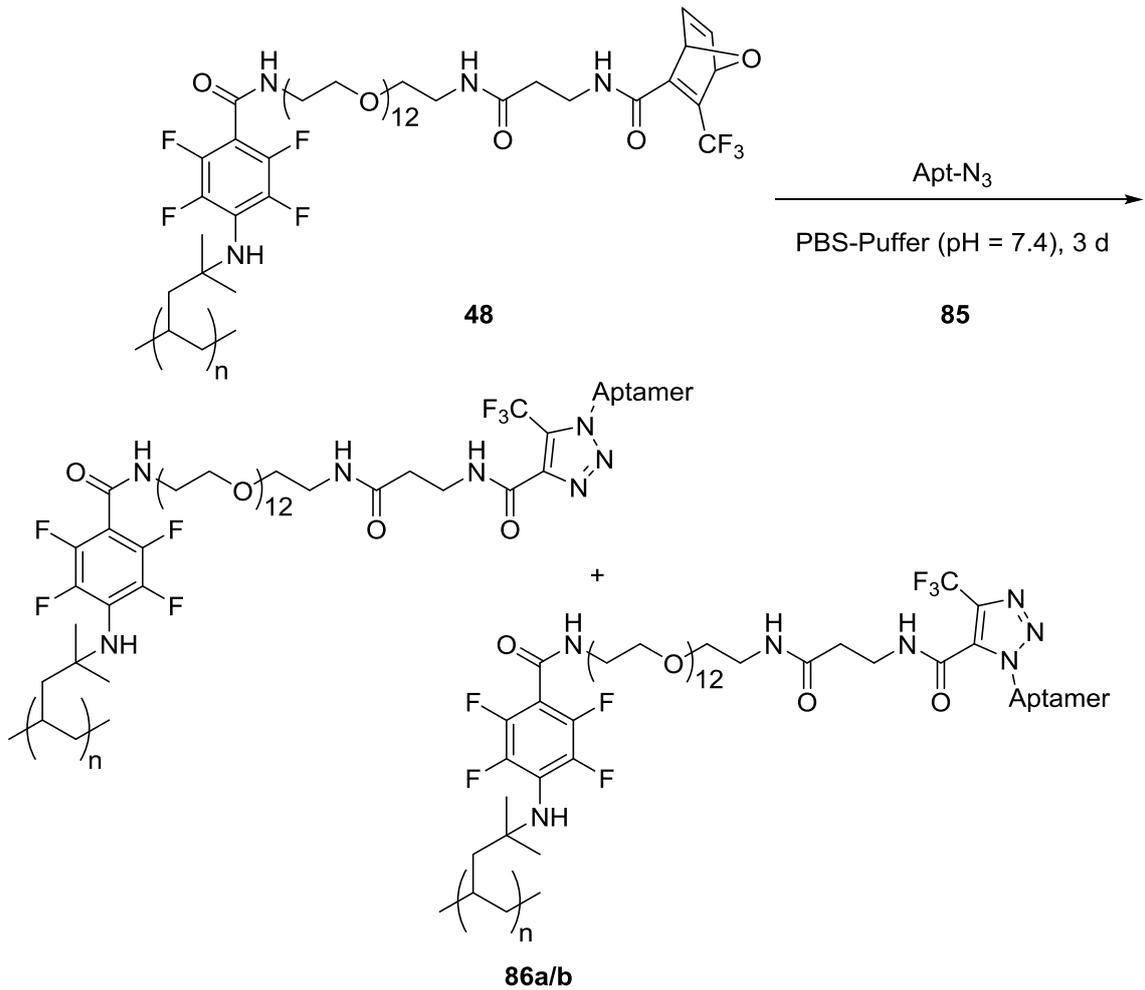
5'/5BiotinTEG/-AGC GTC GAA TAC CAC TAC AGA
 GCT CCG GGG TTT TTG GGG GTT TTT CTG GGG = Biotin-Apt
 TTT TTT GGG GCT AAT GGA GCT CGT GGT CAG-3'
84

5'/5AzideN/-AGC GTC GAA TAC CAC TAC AGA
 GCT CCG GGG TTT TTG GGG GTT TTT CTG GGG = N₃-Apt
 TTT TTT GGG GCT AAT GGA GCT CGT GGT CAG-3'
85

Schema 29: Biotinyliertes Aptamer **84** und Aptamer mit Azid-Funktion **85**.

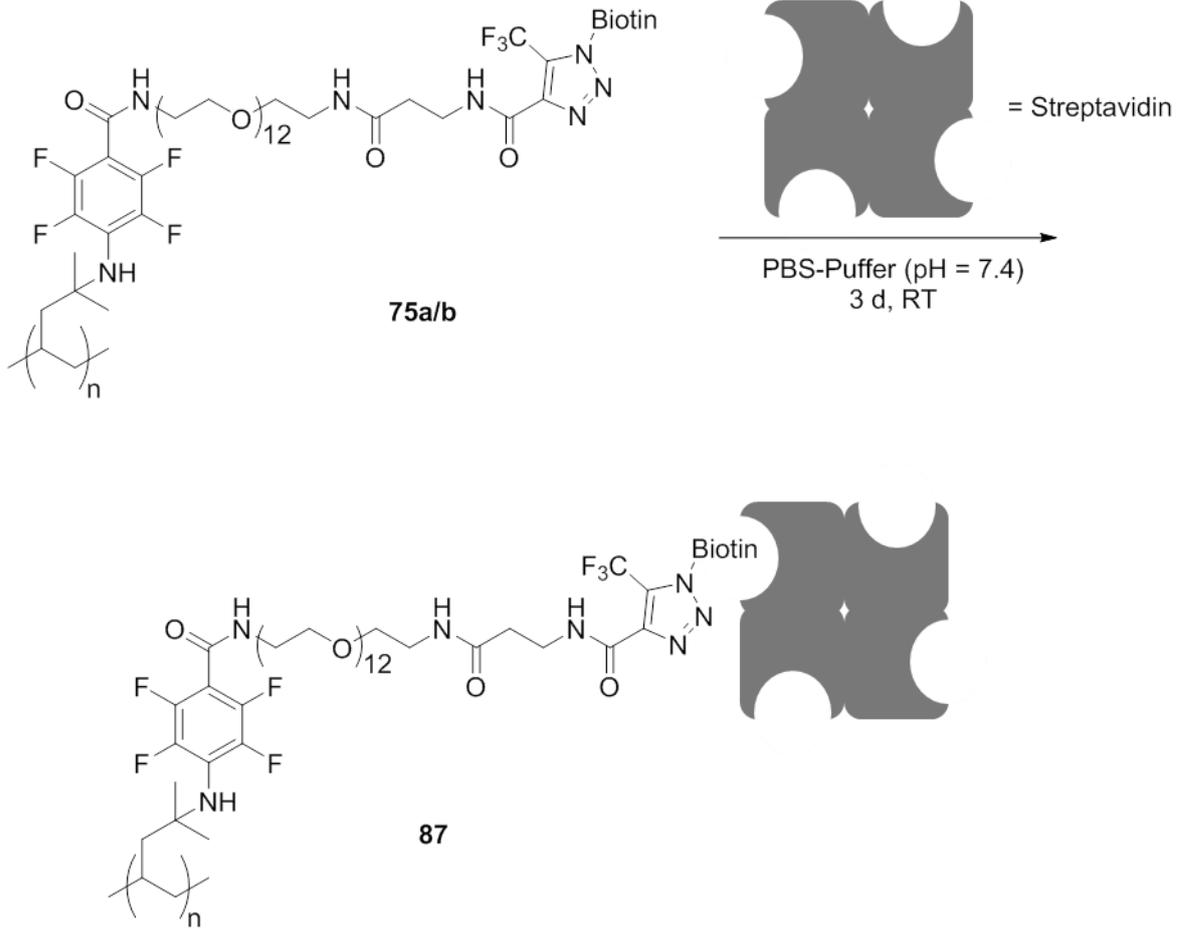
Um die PMP-Folien mit den Aptameren zu modifizieren, mussten die PMP-Folien zunächst entsprechend vorbereitet werden. Hierfür wurden das biotinylierte Aptamer **84** und das Aptamer mit Azid-Funktion **85** in PBS-Puffer für für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend in Eis heruntergekühlt. Durch diesen Prozess wurde sichergestellt, dass die künstlichen Aptamere eine natürliche Faltung annehmen.

Das Aptamer mit Azid-Funktion **85** konnte wie schon zuvor an die PMP-Folie **48** in PBS-Puffer (pH = 7.4) für drei Tage inkubiert werden, dabei verläuft die Reaktion unter Bildung von zwei Regioisomeren **86a/b** (Schema 30).



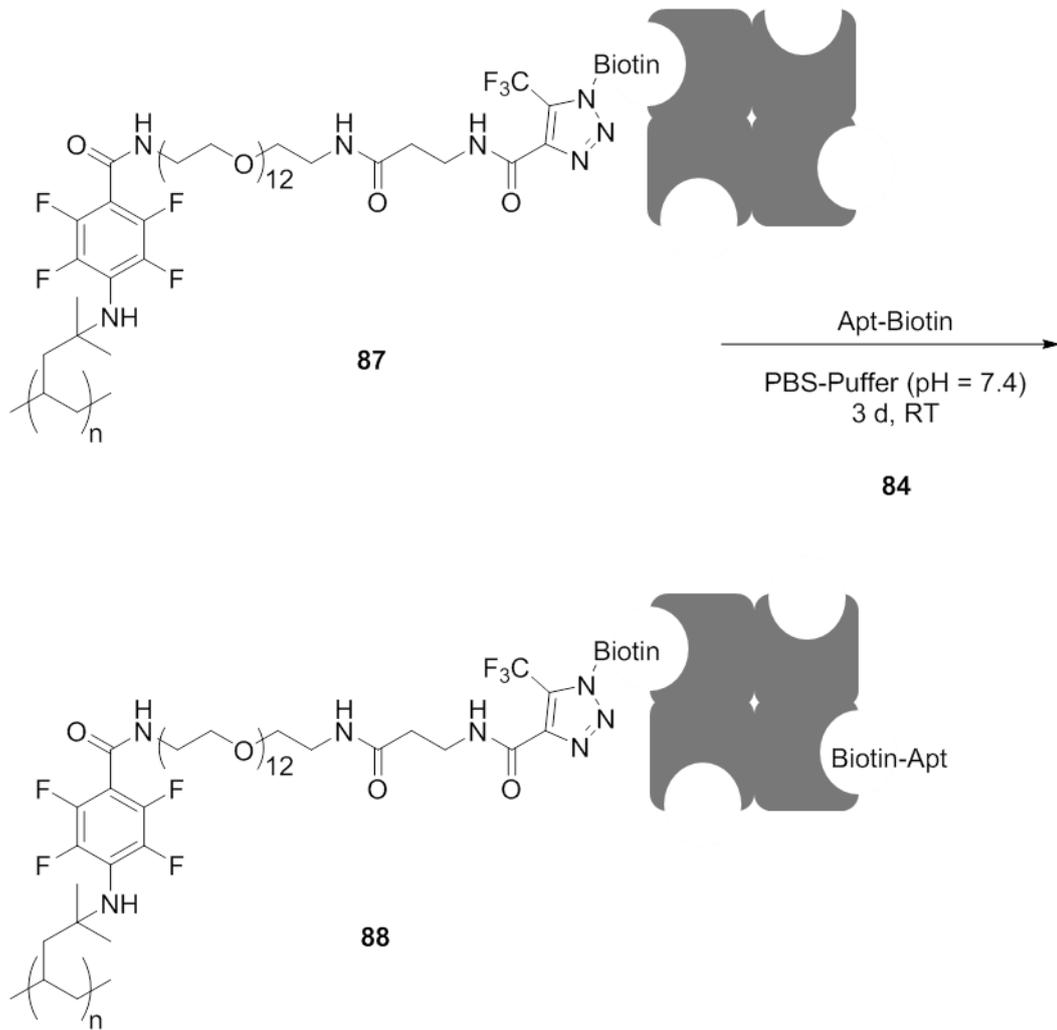
Schema 30: Ligation von Aptamer **85** an die PMP-Oberfläche **48**.

Für das biotinylierte Aptamer **84** musste die biotinylierte PMP-Folie **75a/b** zuvor mit Streptavidin belegt werden. Das Streptavidin wurde in PBS-Puffer (pH= 7.4) gelöst und die PMP-Folien **75a/b** für drei Tage inkubiert (Schema 31).



Schema 31: Bildung des Biotin-Streptavidin-Konjugates **87** auf der PMP-Oberfläche.

Durch erneute Inkubation in PBS-Puffer (pH = 7.4) mit dem biotinylierten Aptamer **84** konnte die modifizierte Folie **88** erhalten werden (Schema 32).



Schema 32: Bildung des Konjugates **88** zwischen biotinyliertem Aptamer **84** und Streptavidin modifizierter PMP-Folie **87**.

Die so erhaltenen Folien konnten für die Zellaussaat verwendet werden.

3.6 XPS-Analyse

Die Analyse von Oberflächen und deren Zusammensetzung ist schwierig und oft nicht sehr eindeutig. Mittels Infrarot-Spektroskopie lassen sich einige funktionelle Gruppen sehr gut nachweisen, wenn es aber darum geht, Elemente nachzuweisen, welche sich auf der Oberfläche befinden, versagt diese Methode weitestgehend. Aus diesem Grund wurde eine Untersuchung durch EDX (*energy dispersive X-ray spectroscopy*) angestrebt. Bei dieser Methode werden die Atome der Probe durch einen Elektronenstrahl mit gleichbleibender Energie angeregt. Die Atome emittieren dann eine elementspezifische Röntgenstrahlung. Die Nachweisgrenze dieser Methode ist eher gering, da hier mit vergleichsweise niedriger Strahlungsintensität gearbeitet wird.⁷⁹ Diese geringe Nachweisgrenze ist im Fall der PMP-Folie eher von Nachteil, da hier bestimmte Elemente von benachbarten Banden überlagert wurden und somit nicht nachweisbar waren. Am Beispiel von einer unbehandelten PMP-Folie **37** und einer REDV modifizierten PMP-Folie **71a/b** (Abbildung 42) lässt sich erkennen, dass nur Kohlenstoff und Sauerstoff direkt nachweisbar sind und alle anderen Elemente unter der Nachweisgrenze liegen. Zuvor mussten die Folien dünn mit Gold beschichtet werden, da sonst eine Analyse nicht möglich gewesen wäre. Zu der niedrigen Nachweisgrenze kommt noch hinzu, dass die Spektrallinien einiger Elemente von denen anderer überlagert werden. So konnten in der REDV-Probe **71a/b** kein Stickstoff (0,392 keV) oder Fluor (0,677 keV) nachgewiesen werden, da diese von Sauerstoff (0,523 keV) und Kohlenstoff (0,277 keV) überdeckt werden.⁸⁰ Allerdings konnte schon auf der unbehandelten Probe Kupfer (8,040 keV)⁸⁰ nachgewiesen werden, welches entweder auf Verunreinigungen im Gold zurückgeführt werden können oder im Herstellungsprozess der PMP-Folie eingetragen werden.⁸¹

⁷⁹ <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-05-01098> (Zugriff: 07.05.2015).

⁸⁰ www.edax.com/periodic-table/index.aspx (Zugriff: 07.05.2015).

⁸¹ Messungen durch Tetyana Melnyk, Laserzentrum Hannover eG.

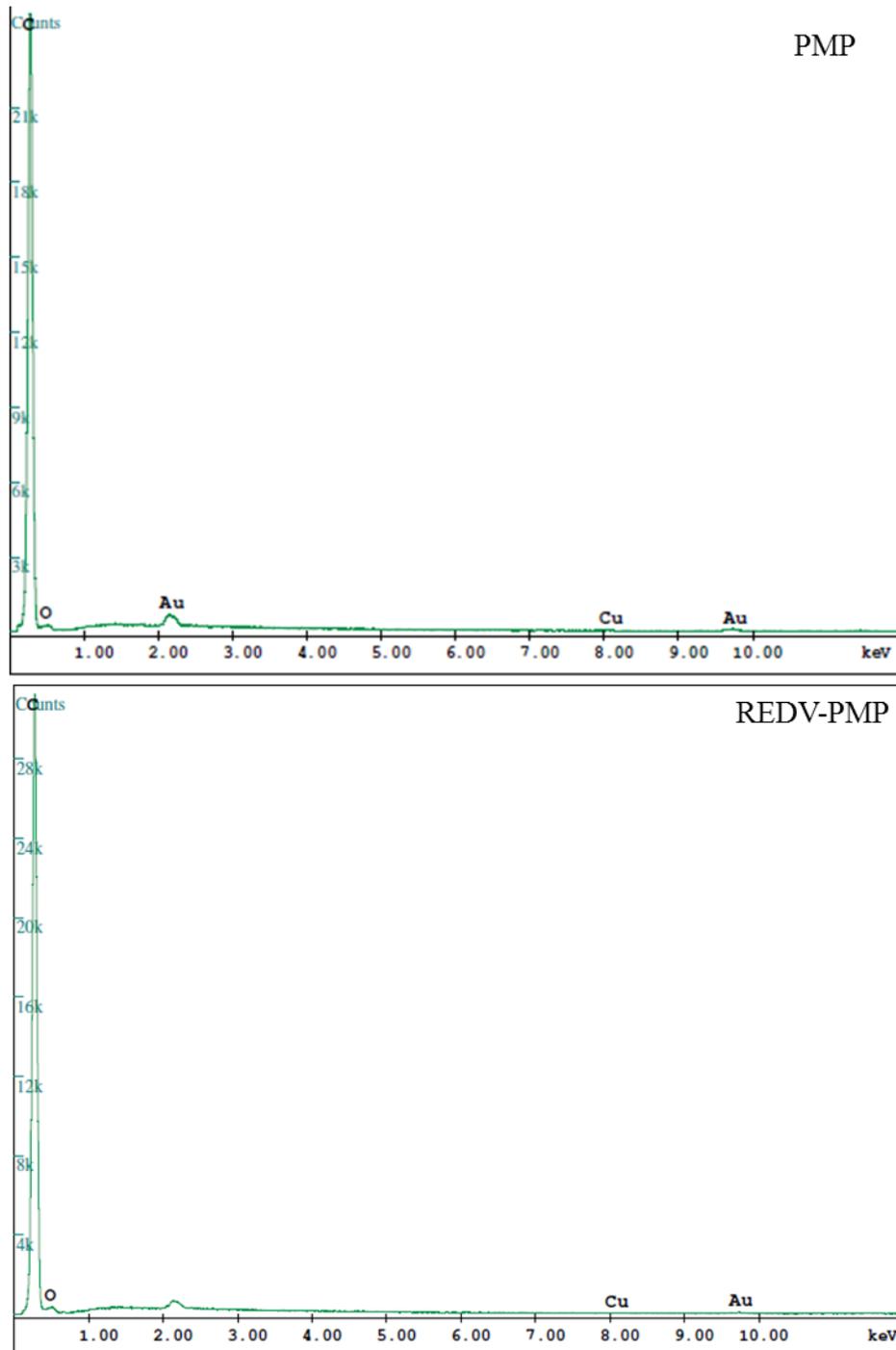


Abbildung 14: EDX-Spektren von unbehandelter PMP-Folie **37** und REDV modifizierter PMP-Folie **71a/b**.⁸¹

Da die Analyse mit EDX nicht ausreichend sensitiv für diverse Elemente war, wurde auf eine andere Methode zurückgegriffen. In der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (*x-ray photoelectron spectroscopy* – *XPS*) beruht das physikalische Prinzip auf dem äußeren photoelektrischen Effekt. Die Oberfläche wird mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt, deren Energie größer ist als die Austrittsarbeit der Probe. Dabei werden Elektronen aus

ihren besetzten Anfangszuständen in einen unbesetzten und ungebundenen Endzustand angeregt. Bei oberflächennahen Atomen können diese charakteristischen Photoelektronen emittieren und detektiert werden. Je nachdem was für ein Elektron angeregt wurde, können zum Teil auch Aussagen über den Bindungszustand des Atoms getroffen werden.⁸²

Für die unbehandelte PMP-Folie **37** kann ausschließlich ein Signal für Kohlenstoff gefunden werden. Es konnten keine andern Elemente nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass bei der EDX-Analyse ein Fehler durch die Messung oder die Beschichtung mit Gold aufgetreten sein muss. Darüber hinaus ist hier auch Sauerstoff nicht nachzuweisen. Dies kann an den Messbedingungen und dem Einbringen der Probe in den Messraum liegen.

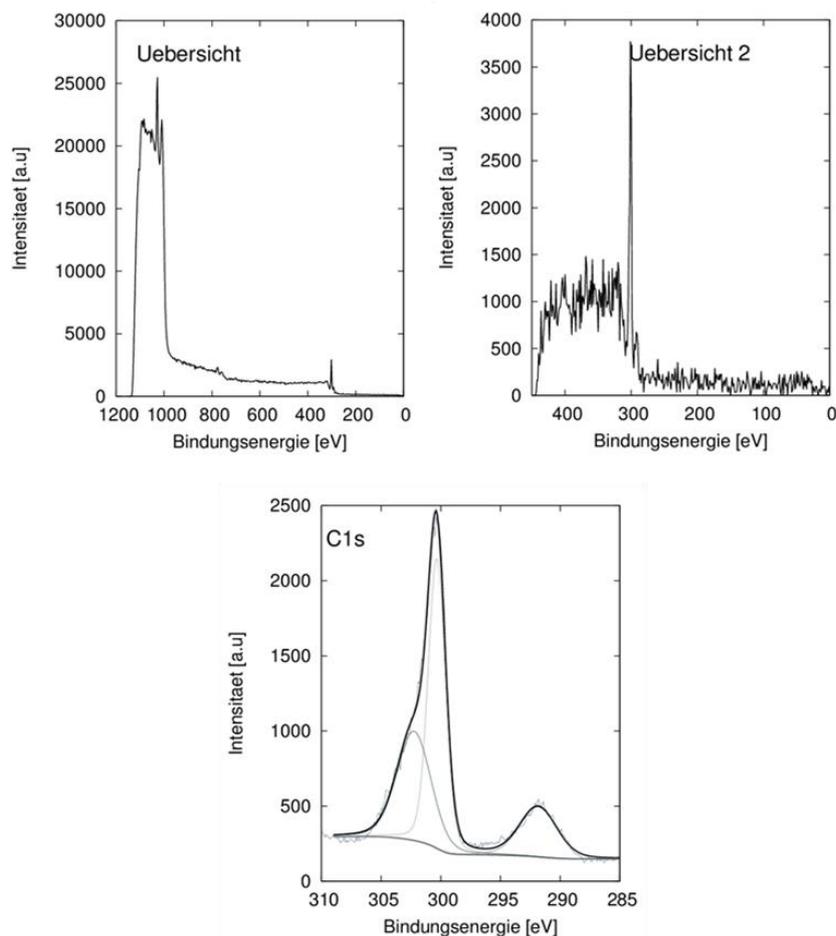


Abbildung 15: XPS-Spektren für unbehandelte PMP-Folien **37** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 0-400 eV; Spektrum C1s-Signal)

⁸² Skript: *Grundlagen der Röntgenphotoelektronenspektroskopie* **2008**, Institut für Festkörperphysik, Abteilung ATMOS, Leibniz Universität Hannover.

Bei der Betrachtung der Strukturen von PFPA-PEG-NH₂ modifizierter PMP-Folie **38** und Oxanorbornadien modifizierter PMP-Folie **48** wird klar, dass die Elementzusammensetzung der beiden Proben identisch ist. Von den nachzuweisenden Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Fluor, konnte Stickstoff nicht nachgewiesen werden. Dies kann vielfältige Gründe haben. Möglicherweise lagen bei den untersuchten Proben nicht ausreichend Stickstoffatome im Einstrahlungsbereich an der Oberfläche vor. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Empfindlichkeit nicht ausreichend ist, da bei dieser Messmethode Stickstoff generell schlecht detektierbar ist. Eine Möglichkeit, warum kein Stickstoff gefunden wurde, könnte das Polymer selbst sein. Für die Detektion müssen sich die zu detektierenden Elemente an der Oberfläche befinden. Hier macht sich auch die Eindringtiefe des Röntgenstrahls bemerkbar, die sich nach dem Winkel mit dem die Röntgenstrahlung auf die Oberfläche trifft verändert. Umso flacher der Winkel gewählt wird, umso geringer ist hier auch die Eindringtiefe des Röntgenstrahls. Des Weiteren unterliegt die Röntgenquelle einem Alterungsprozess, bei dem das Magnesium zur Erzeugung der Strahlung verbraucht wird. Dieser Alterungsprozess macht sich mit einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis bemerkbar.⁸² Dennoch ist von einer erfolgreichen Modifizierung auszugehen. Im Gegensatz zur unbehandelten Probe konnten hier neben Kohlenstoff auch Sauerstoff und Fluor nachgewiesen werden (Abbildung 16 und 17).

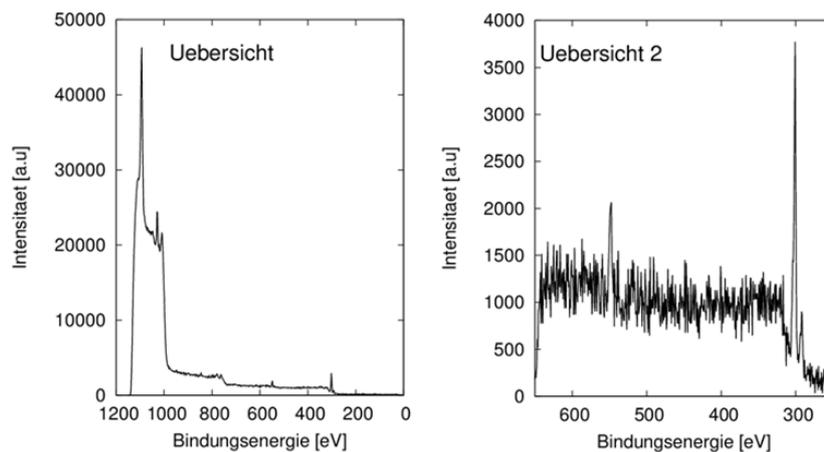


Abbildung 16: XPS-Spektren Oxanorbornadien modifizierte PMP-Folien **48** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 250-650 eV).

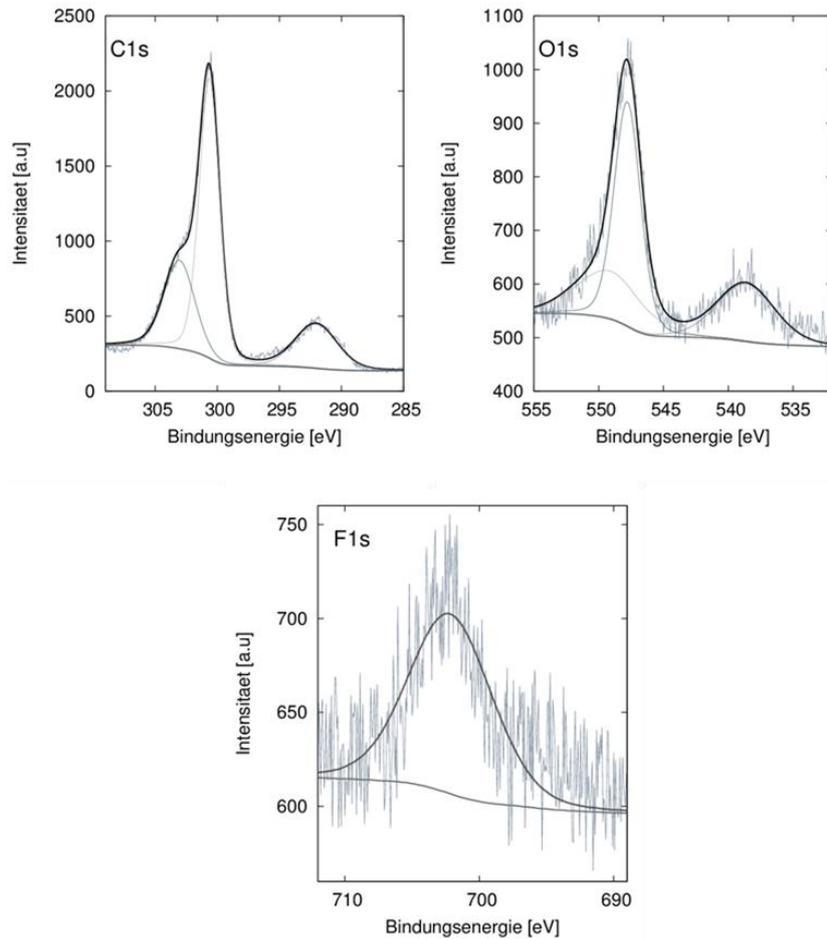


Abbildung 17: XPS-Spektren Oxanorbordien modifizierte PMP-Folie **48** (C1s-Signal; O1s-Signal; F1s-Signal).

Bei der Ligation von Signalfaktoren, wie cRGDFK oder REDV, konnte kein neues Element auf die Oberfläche gebracht werden. Deshalb wurden diese Proben nicht für eine XPS-Analyse herangezogen. Ausgehend von Modell-Studien von MÖLLER ist eine Übertragung auf die Oberflächen möglich und davon auszugehen, dass diese Reaktion auf der Oberfläche ebenso abläuft.⁵⁹

In Gegensatz dazu konnte die mit Biotin modifizierte PMP-Folie **75a/b** untersucht werden, da in diesem Fall mit Schwefel ein neues Element auf die Oberfläche gebracht wurde. Neben Schwefel, konnten wie zuvor auch Kohlenstoff, Sauerstoff und Fluor nachgewiesen werden (Abbildung 18 und 19).

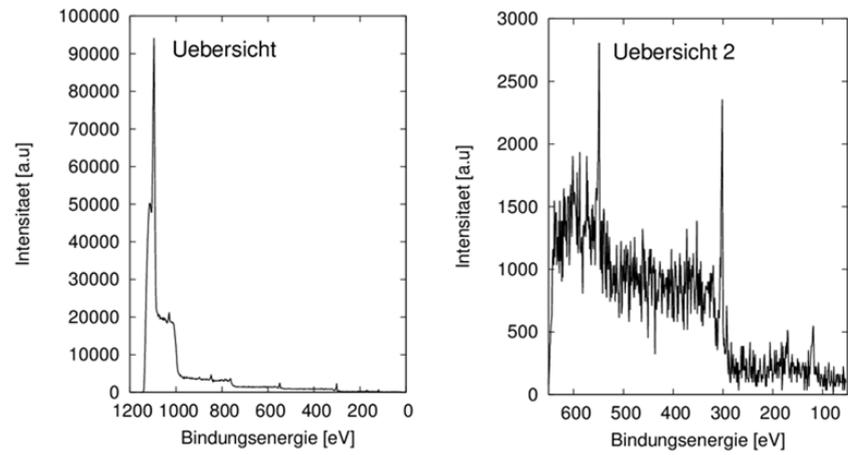


Abbildung 18: XPS-Spektren Biotin modifizierte PMP-Folie **75 a/b** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 50-650 eV).

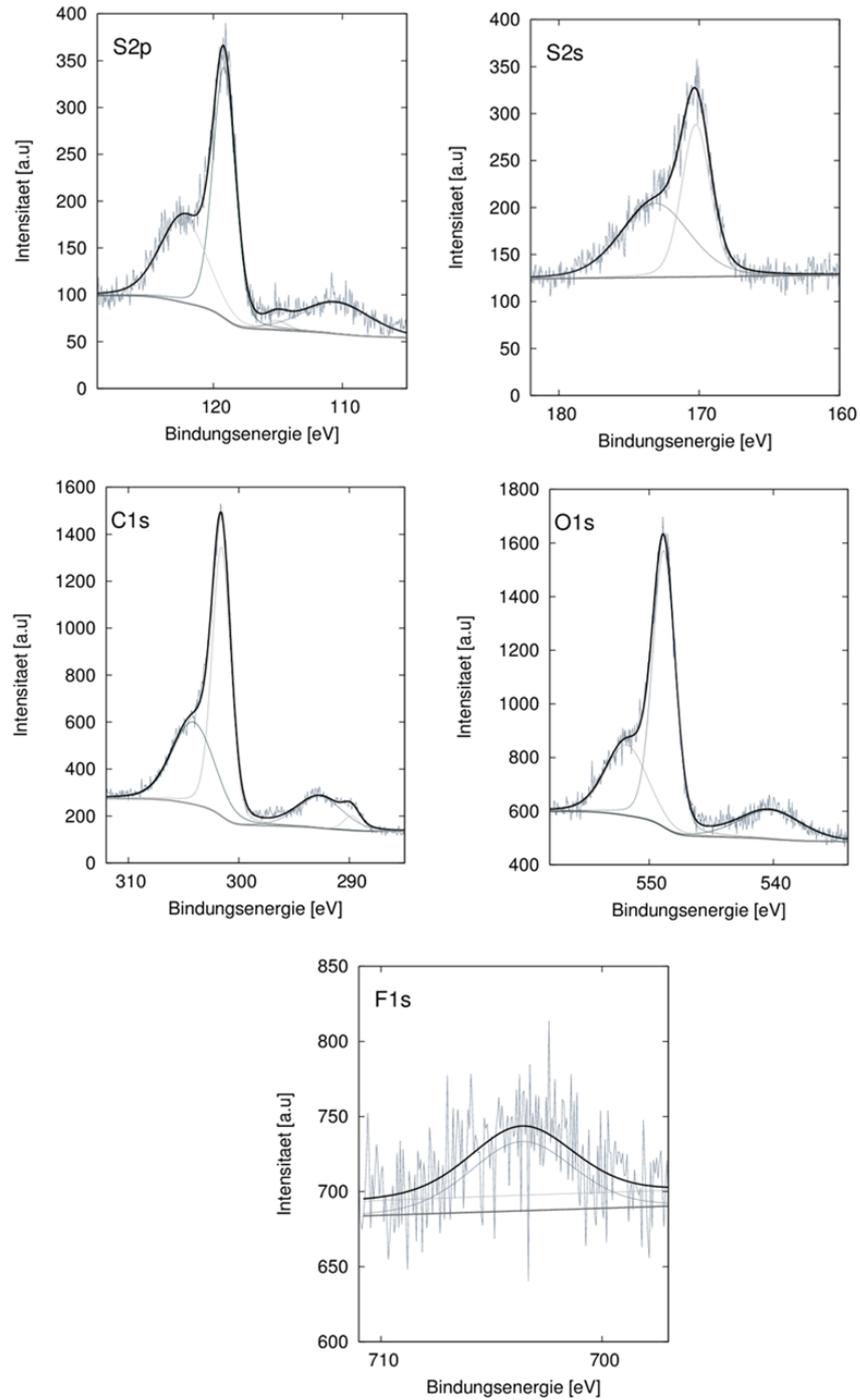


Abbildung 19: XPS-Spektren Biotin modifizierte PMP-Folie **75a/b** (S2p-Signal, S2s-Signal, C1s-Signal, O1s-Signal, F1s-Signal).

3.7 REM-Aufnahmen

Die modifizierten Proben sollten hinsichtlich ihrer Morphologie durch Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht werden. Die Aufnahmen wurden in Kombination mit den EDX-Spektren aufgenommen.⁸¹

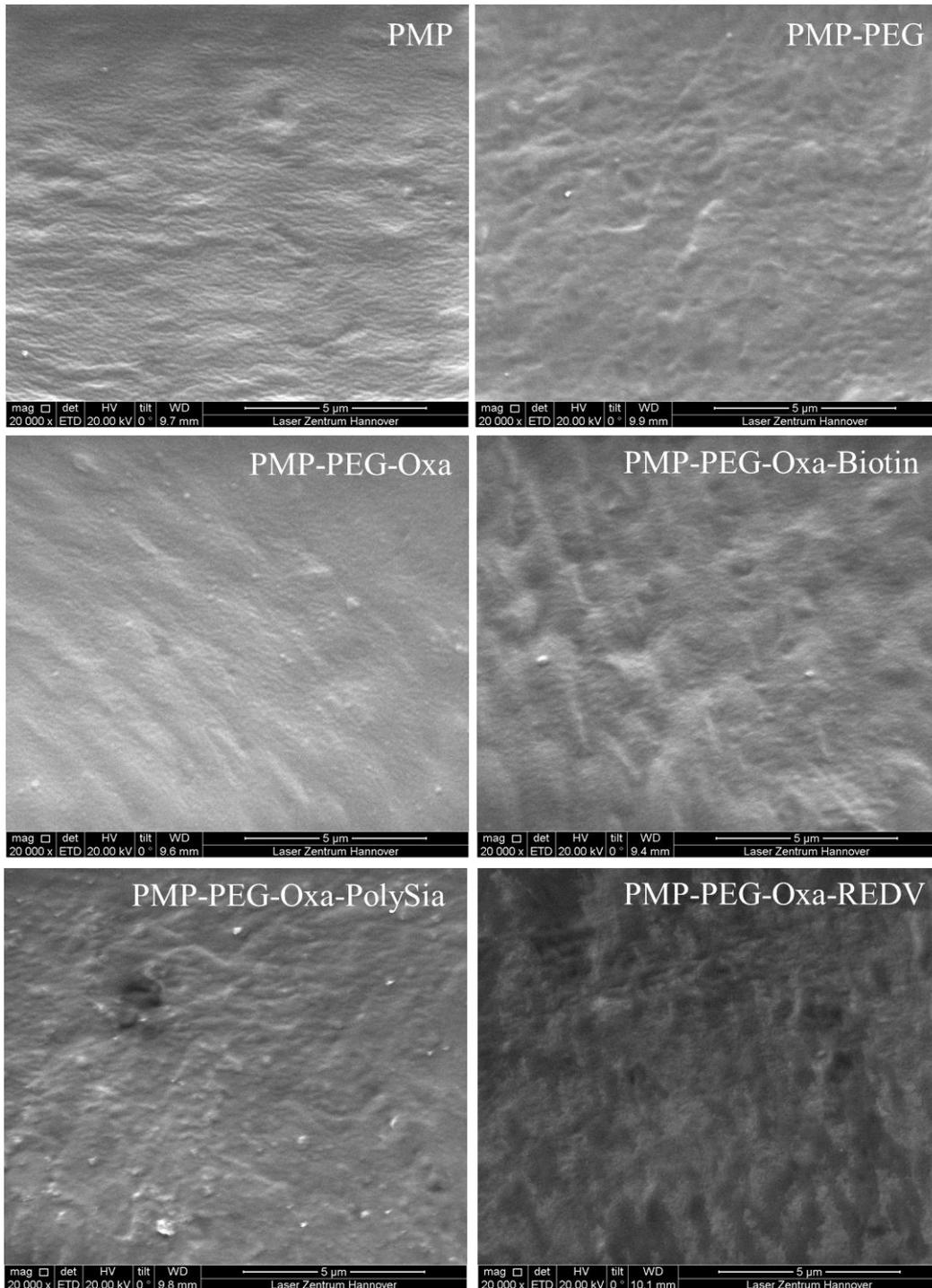


Abbildung 20: REM-Aufnahmen von unmodifizierter und modifizierter PMP-Folie [37(PMP), 38(PMP-PEG), 48(PMP-PEG-Oxa), 75a/b(PMP-PEG-Oxa-Biotin), 71a/b(PMP-PEG-Oxa-PolySia), 74a/b (PMP-PEG-Oxa-REDV)].⁸¹

Anhand der Aufnahmen bei 20000facher Vergrößerung lässt sich erkennen, dass die Morphologie sich, obwohl makroskopisch kein Unterschied zu erkennen ist, ändert. Während auf der unbehandelten Folie **37** eine stark ausgeprägte feine Wellenstruktur zu erkennen ist, verschwimmt diese schon bei dem ersten Schritt der Funktionalisierung. Dennoch sind gröbere Wellen auf der Oberfläche ersichtlich. Auch in den Folgeschritten bleibt eine grobe Welligkeit erhalten. Besonders interessant ist die Morphologie der PolySia modifizierten PMP-Folie **74a/b**. Es scheint, als wenn die Funktionalisierung mit einem Polysaccharid im Gegensatz zu den anderen Funktionalisierungen zu einer Ansammlung auf der Oberfläche führt. Möglich ist, da es sich ja in beiden Fällen um Polymere handelt, dass sich in den Poren oder Wellen des PMP PolySia **65** absetzt.

3.8 Biologische Evaluation der modifizierten Oberflächen

Nach der Untersuchung der modifizierten PMP-Folien hinsichtlich ihrer Oberflächenzusammensetzung, konnten diese auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht werden. Die entsprechenden Untersuchungen wurden von Dr. S. SCHMECKEBIER an der Medizinischen Hochschule Hannover vorgenommen. Die Folien wurden jeweils mit Iso 3 (*human cord blood derivde endothelial cells*) oder hFF (*human foreskin fibroblasts*) besiedelt. Die Folien umfassten dabei jeweils 1,5 x 1,5 cm und wurden mit 20.000 Zellen in 0.5 mL Lösung besiedelt. Das Nährmedium (1.0 mL, EGM-2) wurde nach einer Stunde zugefügt und die Proben anschließend für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die Zellen mit 4 % PFA (Formaldehyd in PBS-Puffer) fixiert werden. Zusätzlich wurde eine Zellkulturplastik (TCP) als positive Kontrolle angefertigt.

Die mit PolySia modifizierten Folien **74a/b** sollten einen anti-adhäsiven Effekt auf die Zellen haben. Nach Besiedelung mit Endothelzellen (Iso 3) wurde nach 24 h deutlich, dass die Endothelzellen wider Erwarten adhärirten (Abbildung 21). Auch nach 6 d änderte sich dieses Verhalten nicht. Im Gegensatz zu der Arbeit von Dr. L. MÖLLER wurden auch auf den Folien **38** und **48** Endothelzellen adhären (Abbildung 21). Dies kann vielfältige Gründe haben, wie beispielsweise der Vitalität der Zellen oder der Zelltyp oder die Art der Kultivierung. Dennoch wurde deutlich, dass im Vergleich zur Kontrolle auf allen anderen modifizierten Folien optisch weniger Zellen adhärirten. Auf den Folien **74a/b** adhärirten zumindest nach 24 h weniger Zellen, als auf allen anderen Oberflächen. Dieser Effekt ist nach 6 d nicht mehr auszumachen.

Iso 3 P12

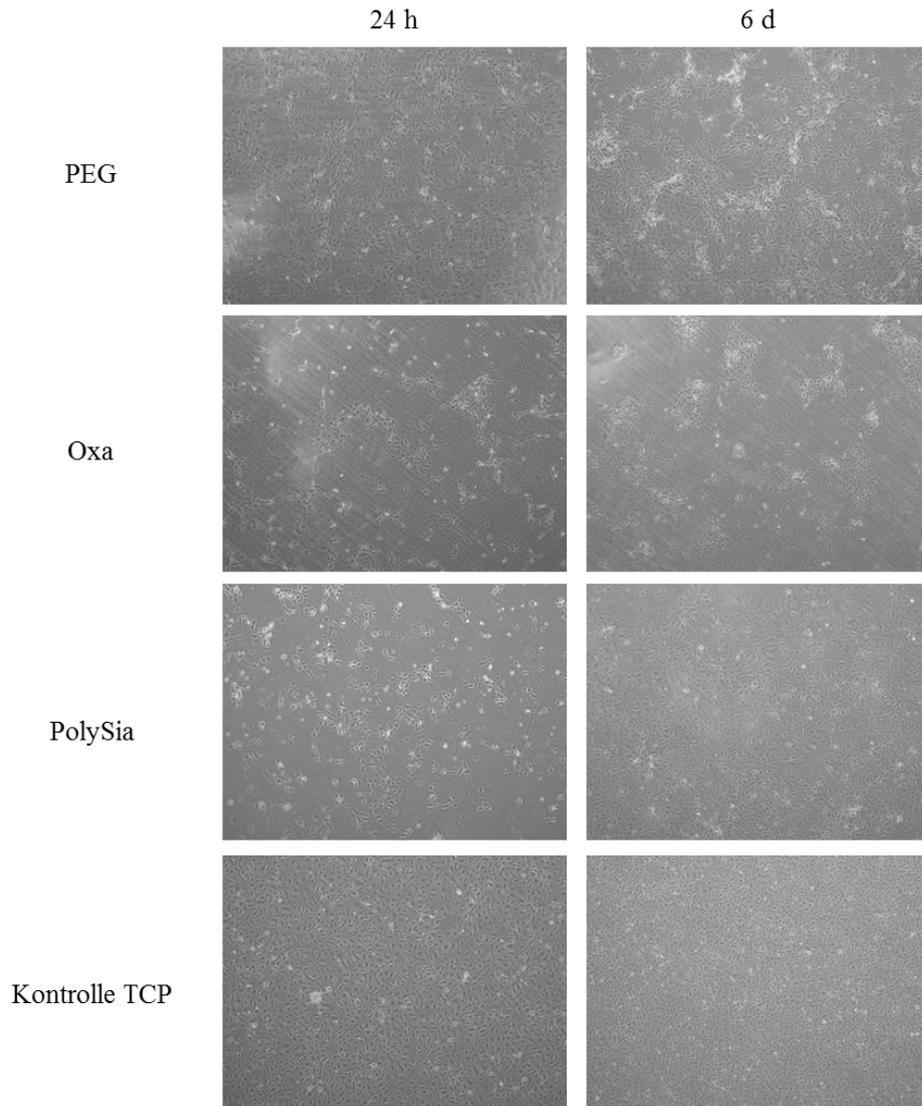


Abbildung 21: Besiedlung der PMP-Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **74a/b** (PolySia) und einer positiven Kontrolle (TCP) 1 h ohne EGM2-Medium, dann nach 24 h und 6 d bei 37 °C mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Eine höhere Konzentration an PolySia auf den Folien **74a/b** konnte leider nicht zu einer Vermeidung der Zelladhäsion führen.

Mit den Folien **71a/b**, **72a/b** und **73a/b** sollten die Oberflächen hinsichtlich der Biokompatibilität und der Selektivität gegenüber Endothelzellen überprüft werden. Als Vergleich standen sowohl eine Zellkulturplastik, als auch die Folien **38**, **48** und **50a/b** zur Verfügung.

Nach der Besiedelung mit Iso 3 zeigte sich nach 24 h, dass auf allen Folien Zellen angewachsen sind (Abbildung 22). Dabei wurde ersichtlich dass auf den Folien **38** und **48** nur vereinzelt Zellen anwuchsen. Wie zu erwarten war, konnte auf der RGD-Folie **50a/b** eine gleichmäßige und stärkere Besiedlung ausgemacht werden. Auf den REDV-Folien **71a/b** und GREDV-Folien **72a/b** war die Besiedlung etwas weniger stark. Eine vergleichbare Besiedlung war lediglich unter den RGD-Folien **50a/b** und den GREDVGGREDVY-Folien **73a/b** auszumachen (Abbildung 22). Dies spricht für die bessere biologische Verfügbarkeit von der längeren Peptidsequenz für Endothelzellen.

Iso 3 P10

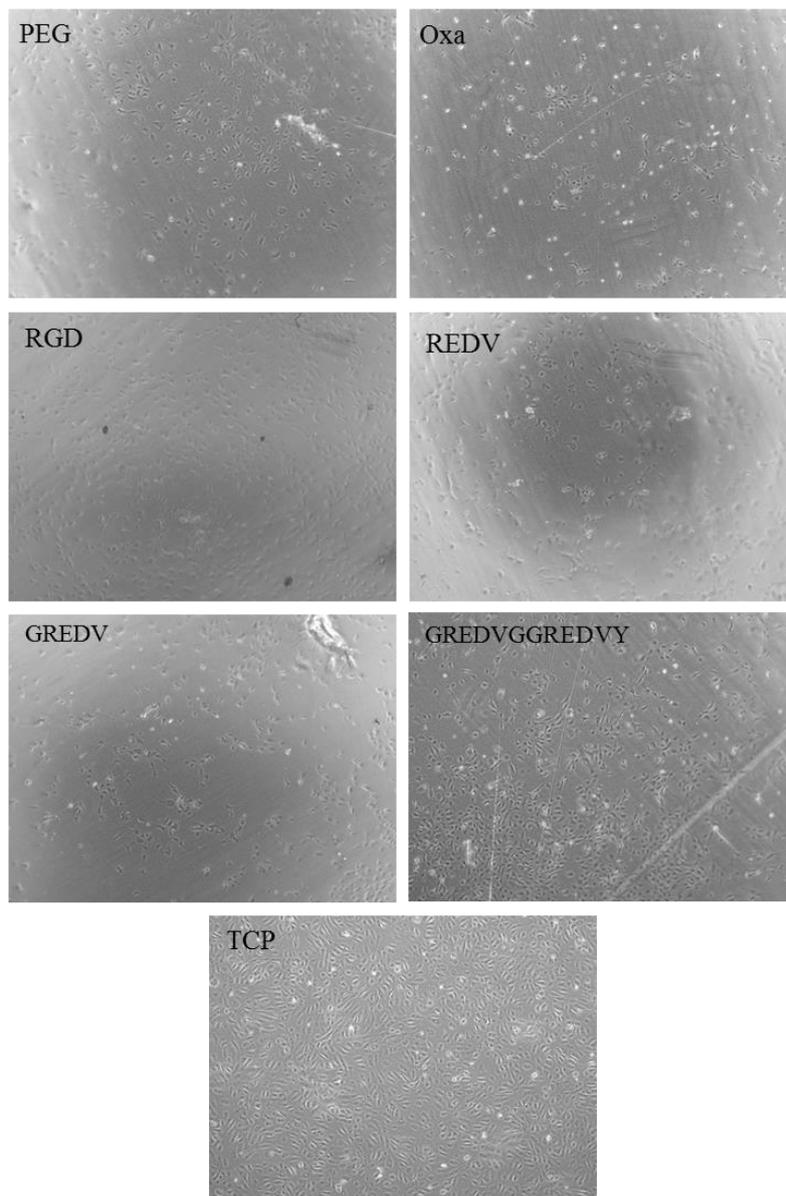


Abbildung 22: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **50a/b** (RGD), **71a/b** (REDV) **72a/b** (GREDVY), **73a/b** (GREDVGGREDVY) und TCP 1 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Bei dem Versuch die Zellen für 2 h ohne EGM2-Medium anwachsen zu lassen ergab sich ein vergleichbares Bild. Auf den Folien **38** und **48** zeigte sich eine stärkere Besiedlung mit den Endothelzellen. Die beste biologische Aktivität zeigten auch hier die RGD-Folien **50a/b** und die GREDVGGREDVY-Folien **73a/b** und waren untereinander vergleichbar. Etwas weniger Zellen ließen sich auf den Folien **71a/b** und **72a/b** ansiedeln (Abbildung 23).

Iso 3 13

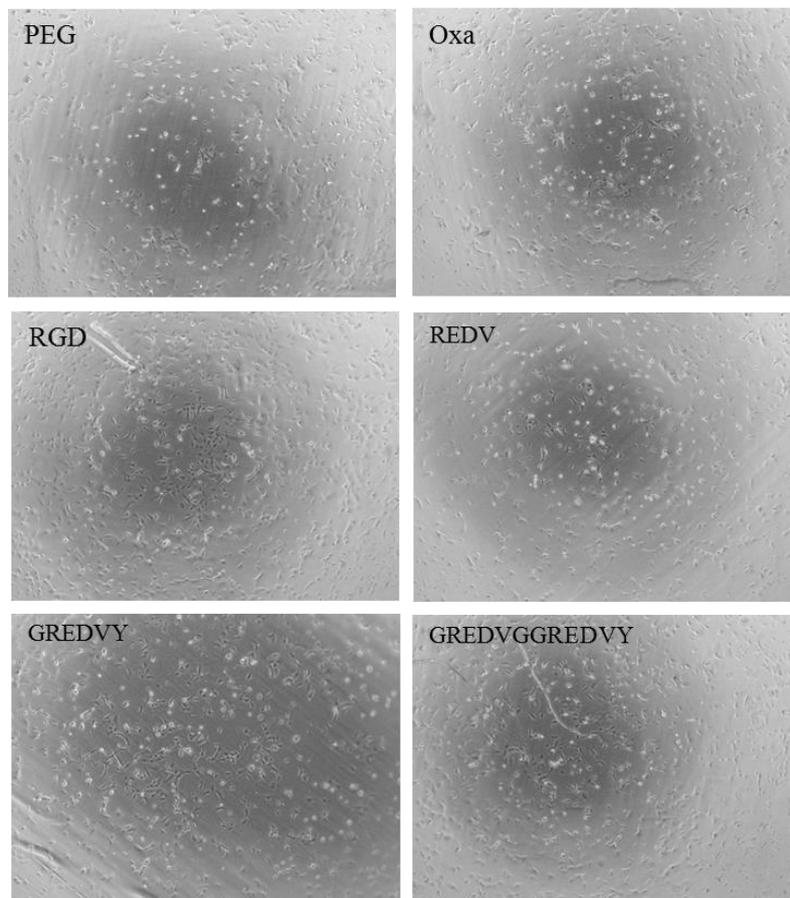


Abbildung 23: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **50a/b** (RGD), **71a/b** (REDV) **72a/b** (GREDVY) und **73a/b** (GREDVGGREDVY) 2 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Durch die Besiedlung mit Fibroblasten (hFF) konnte die Selektivität der Folien gegenüber bestimmten Zelltypen getestet werden. Wie schon zuvor konnten auf den Folien **38** und **48**

weniger Zellen, als auf den übrigen Folien ausgemacht werden. In etwas damit vergleichbar waren die REDV-Folien **71a/b**. Auf den übrigen Folien konnte eine bessere Besiedlung mit Fibroblasten erreicht werden. Die RGD-Folien **50a/b** und die GREDVGGREDVY-Folien **73a/b** waren auch in diesem Fall mit einer ähnlichen Dichte besiedelt. Im Gegensatz zu den Endothelzellen, wurden aber auch auf den GREDVY-Folien **72a/b** vermehrt Fibroblasten angesiedelt (Abbildung 24). Dies sprach dafür, dass die verschiedenen REDV-Varianten, anders als in der Literatur²⁰ nicht selektiv für Endothelzellen sind.

hFFs P21

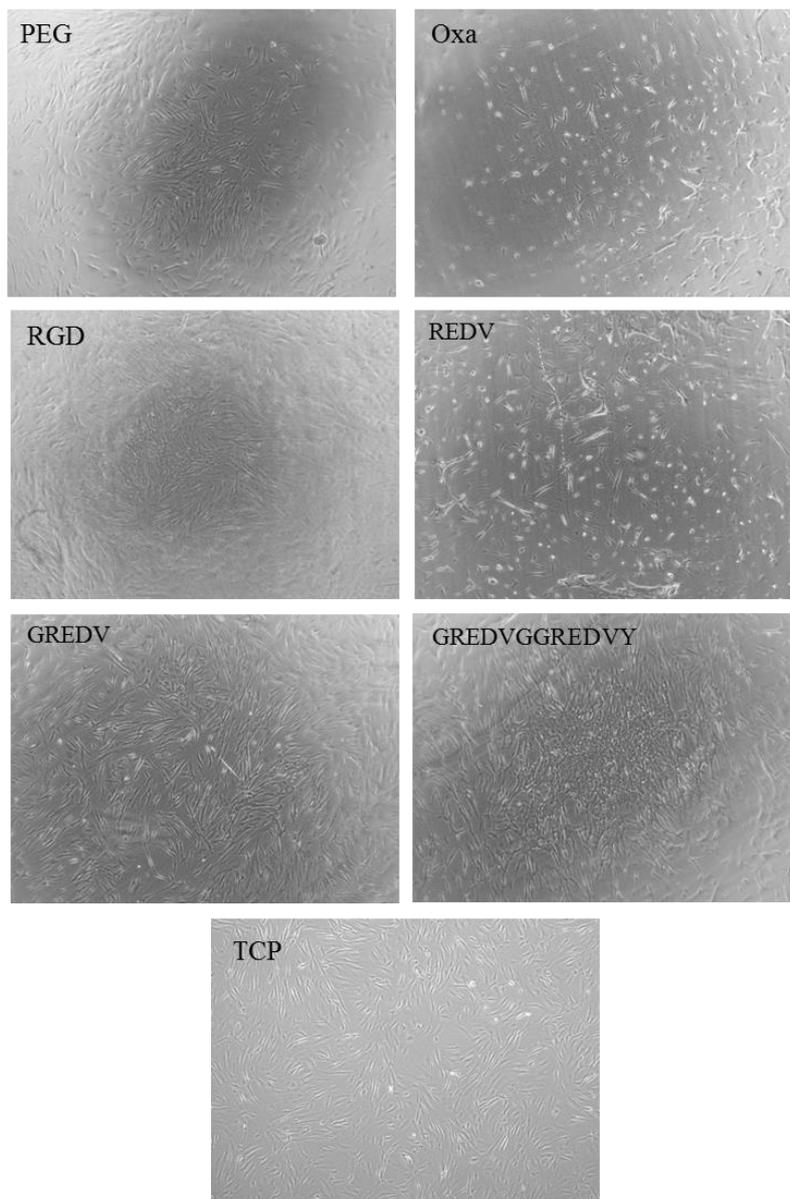


Abbildung 24: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **50a/b** (RGD), **71a/b** (REDV) **72a/b** (GREDVY), **73a/b** (GREDVGGREDVY) und TCP 1 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit hFF Zellen.

Auch hier wurden die Zellen erneut auf den Folien angesiedelt, dabei zunächst für 2 h ohne EGM2-Medium und anschließend für 24 h mit EGM2-Medium. Durch diese Besiedlung konnten keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, da auch hier auf allen Folien Fibroblasten angesiedelt werden konnten (Abbildung 25).

hFFs P24

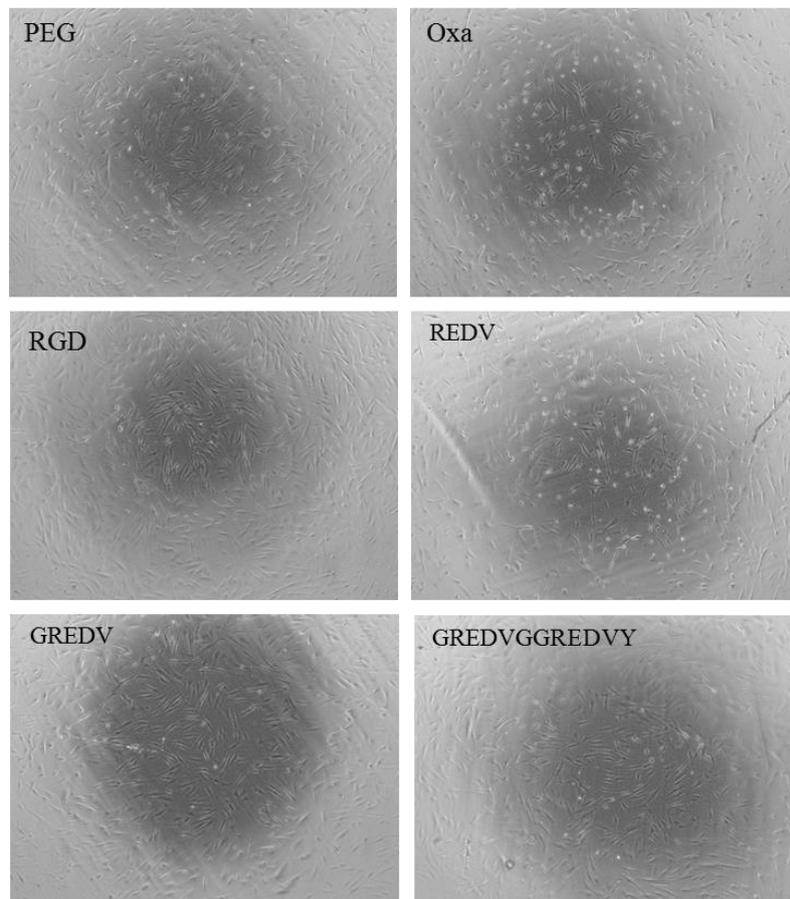


Abbildung 25: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **50a/b** (RGD), **71a/b** (REDV) **72a/b** (GREDVY) und **73a/b** (GREDVGGREDVY) 2 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit hFF Zellen.

Generell ließ sich mit diesen Untersuchungen feststellen, dass die Folien mit einer verlängerten REDV-Sequenz **73a/b** eine ähnliche biologische Aktivität aufweisen, wie die RGD-Folien **50a/b** und die lineare isolierte REDV-Sequenz auf den PMP-Folien **71a/b** zu

einer geringeren biologische Aktivität führte. Eine Selektivität gegenüber einem bestimmten Zelltyp war durch diese Untersuchungen nicht nachzuweisen.

Im Anschluss daran sollte die Anbindung von Aptameren untersucht werden. Auch hier wurden sowohl Endothelzellen (Iso3) als auch Fibroblasten (hFF) auf den Folien angesiedelt.

Die Aussaat von Iso 3 zeigte, dass auf allen Folien eine Besiedlung möglich war. Wieder waren auf den Folien **38** und **48** vergleichsweise wenige Zellen angesiedelt. Schon die Funktionalisierung mit Biotin auf den Folien **75a/b** führte zu einer vermehrten Zellansiedlung. Auf den Folien **86a/b**, die über Biotin/Streptavidin mit dem Aptamer funktionalisiert wurden, konnte eine vermehrte Besiedlung mit den Zellen erreicht werden. Wider Erwarten war die Zelldichte auf den Folien **86a/b** mit 5 nmol und 10 nmol etwas geringer, als mit 1 nmol und 20 nmol. Möglicherweise war die Beschichtung nicht homogen genug, um eine gleichmäßig starke Besiedlung mit Zellen erreichen zu können. Der Vergleich mit der Anbindung über das Azid **85** zeigte dagegen bei allen Konzentrationen, dass auf den Folien **87** in etwa die gleiche Zelldichte erreicht wurde (Abbildung 26).

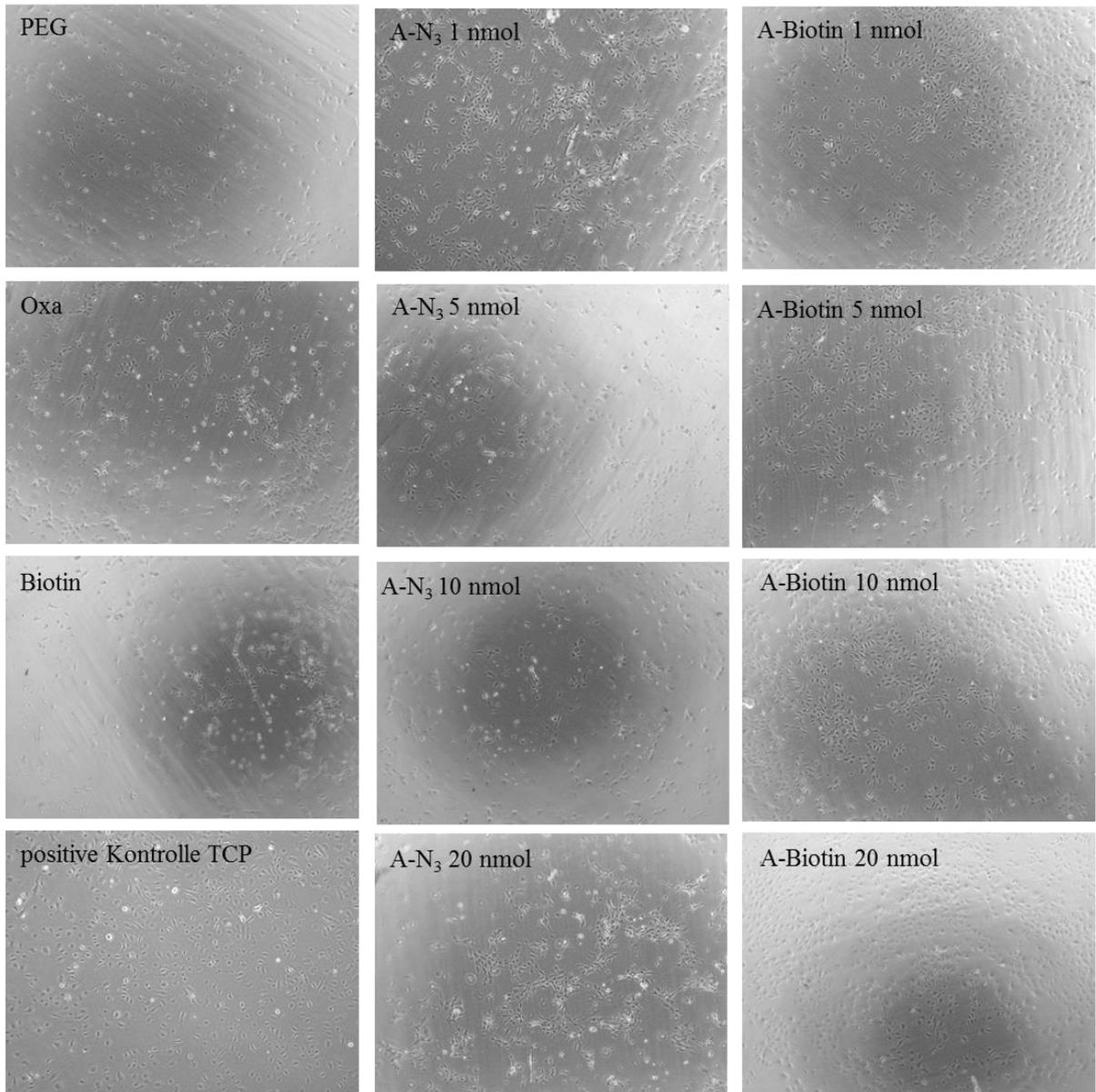
Iso 3 P10

Abbildung 26: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **75a/b** (Biotin), TCP, **86a/b** (A-N₃; 1-20 nmol) und **87** (A-Biotin; 5-20 nmol) 1 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Dieser Unterschied ließ sich bei einem Wechsel der Bedingungen nicht mehr ausmachen. Nach 2 h ohne EGM2-Medium und anschließend 24 h mit EGM2-Medium zeigte sich, dass zwischen den Aptamer-Folien **86a/b** und **87** eine ähnliche Besiedlung mit Endothelzellen erreicht werden konnte. Dahingegen wurde auf den Biotin-Folien **75a/b** eine stärkere Besiedlung mit Zellen festgestellt, als auf allen anderen Folien

(Abbildung 27). Allerdings ließ sich festhalten, dass die Aptamer-Folien **86a/b** und **87** mengenunabhängig zu einer ähnlichen Besiedlung mit Zellen führen (Abbildung 27).

Iso 3 P13

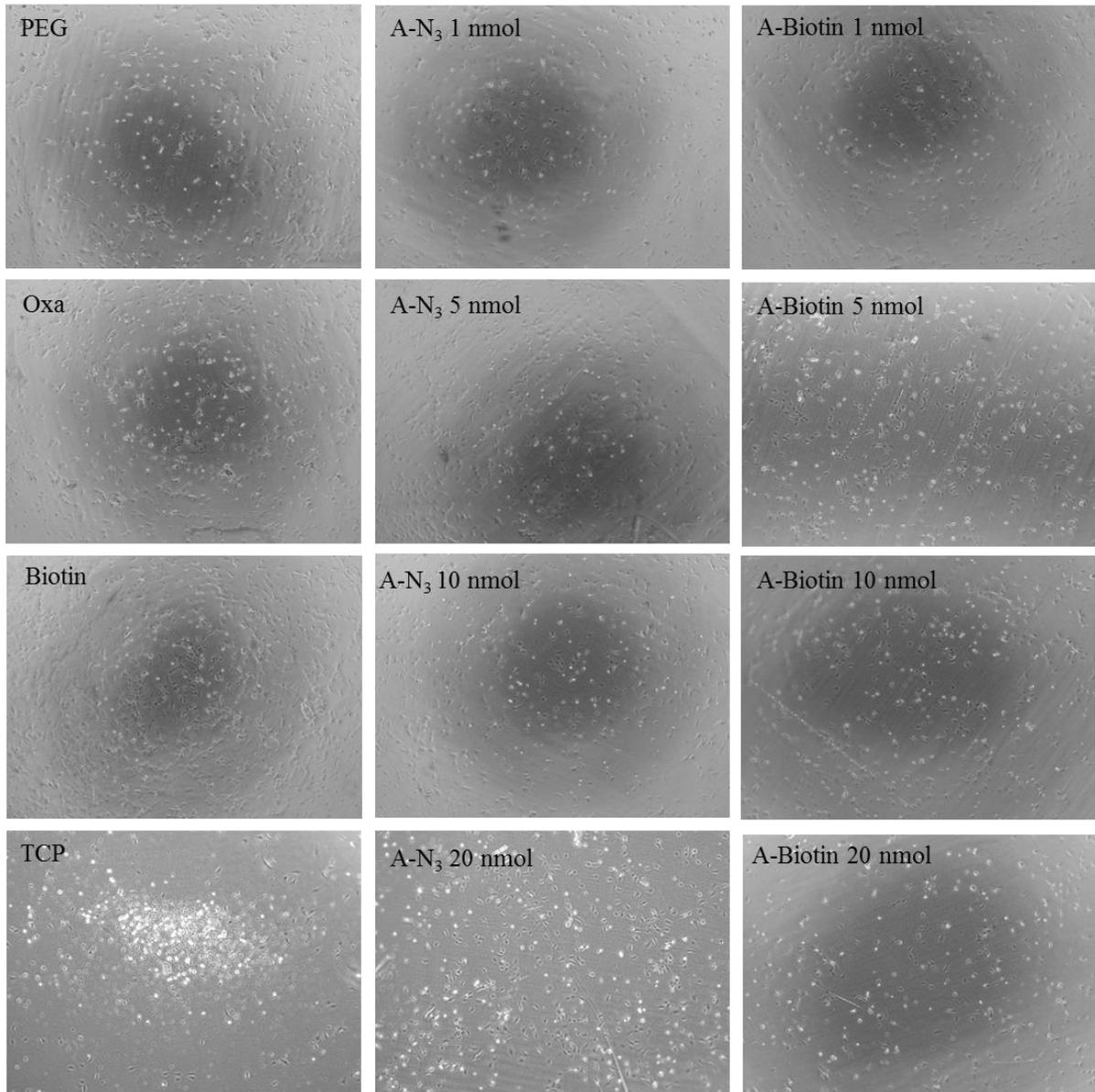


Abbildung 27: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **75a/b** (Biotin), TCP, **86a/b** (A-N₃; 1-20 nmol) und **87** (A-Biotin; 5-20 nmol) 2 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Die Untersuchung zur Besiedlung mit Fibroblasten (hFF) führte bei allen Folien zu einer starken Zellbesiedlung. Die Folien zeigten eine höhere biologische Aktivität gegenüber Fibroblasten (hFF), als gegenüber Endothelzellen (Iso 3). Im Vergleich zu den anderen Folien, waren auf den Folien **38** und **48** weniger Zellen ersichtlich. Auf den Biotin-Folien

75a/b wurden ähnlich viele Zellen angesiedelt. Die Aptamer-Folien **86a/b** und **87** führten dagegen zu einem sehr starker Zellbewuchs nach 24 h. Prinzipiell lässt sich aber ohne Zellzählung keine Tendenz hinsichtlich der Konzentration ausmachen (Abbildung 28).

hFF P21

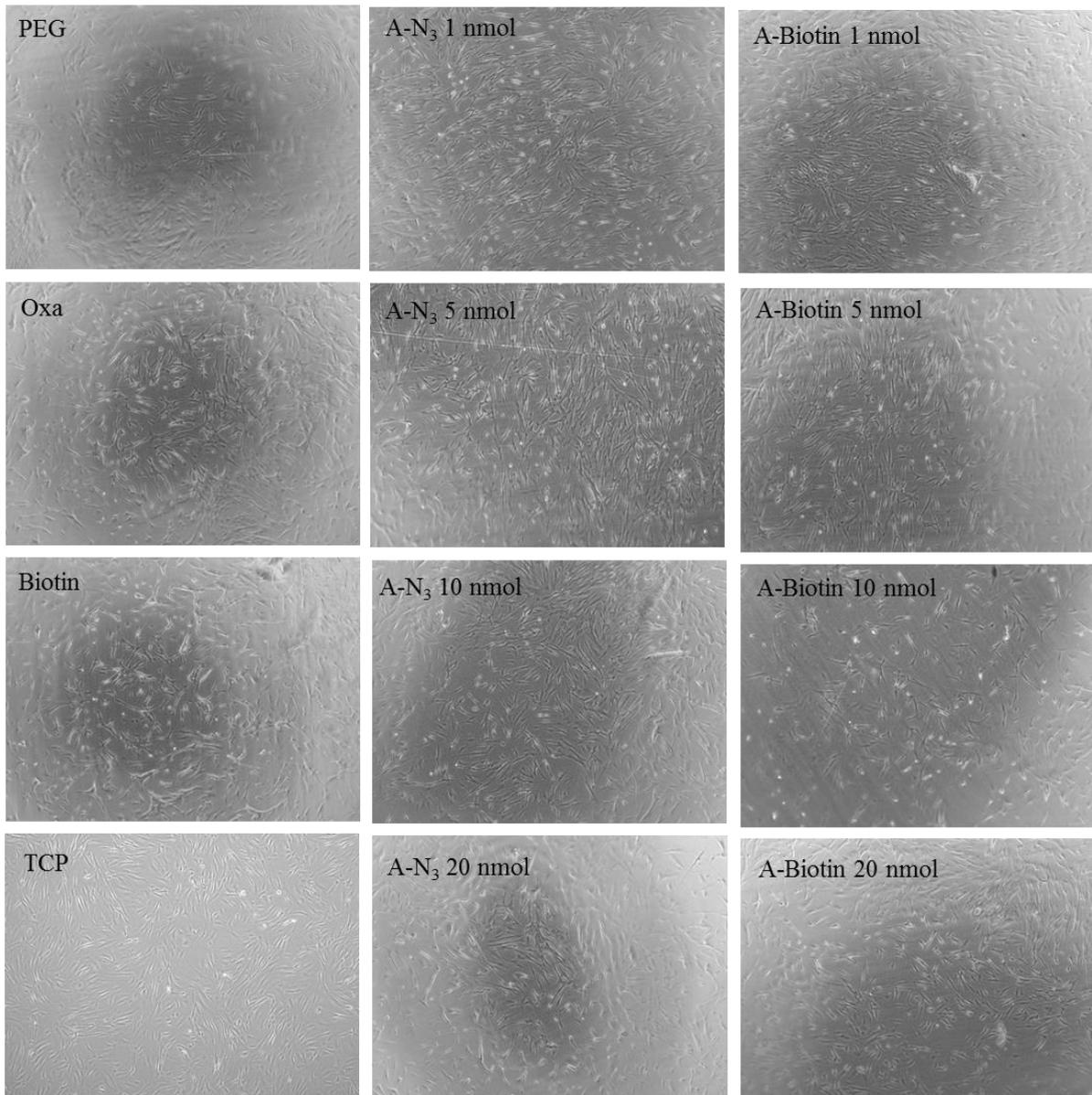


Abbildung 28: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **75a/b** (Biotin), TCP, **86a/b** (A-N₃; 1-20 nmol) und **87** (A-Biotin; 5-20 nmol) 1 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

Bei dem Versuch das EGM2-Medium erst nach 2 h zuzufügen, wurde im Vergleich zum vorigen Versuch eine weniger starke Besiedlung mit Zellen erzielt. Die Kontrollfolien PEG **38**, Oxa **48** und Biotin **75a/b** wiesen in diesem Versuch eine ähnliche biologische

Aktivität, wie die Aptamer-Folien **86a/b** und **87** auf. Wie schon im vorangegangenen Versuch lässt sich keine Beziehung zwischen der Aptamer-Konzentration und der Zellzahl herstellen. (Abbildung 29).

hFF P24

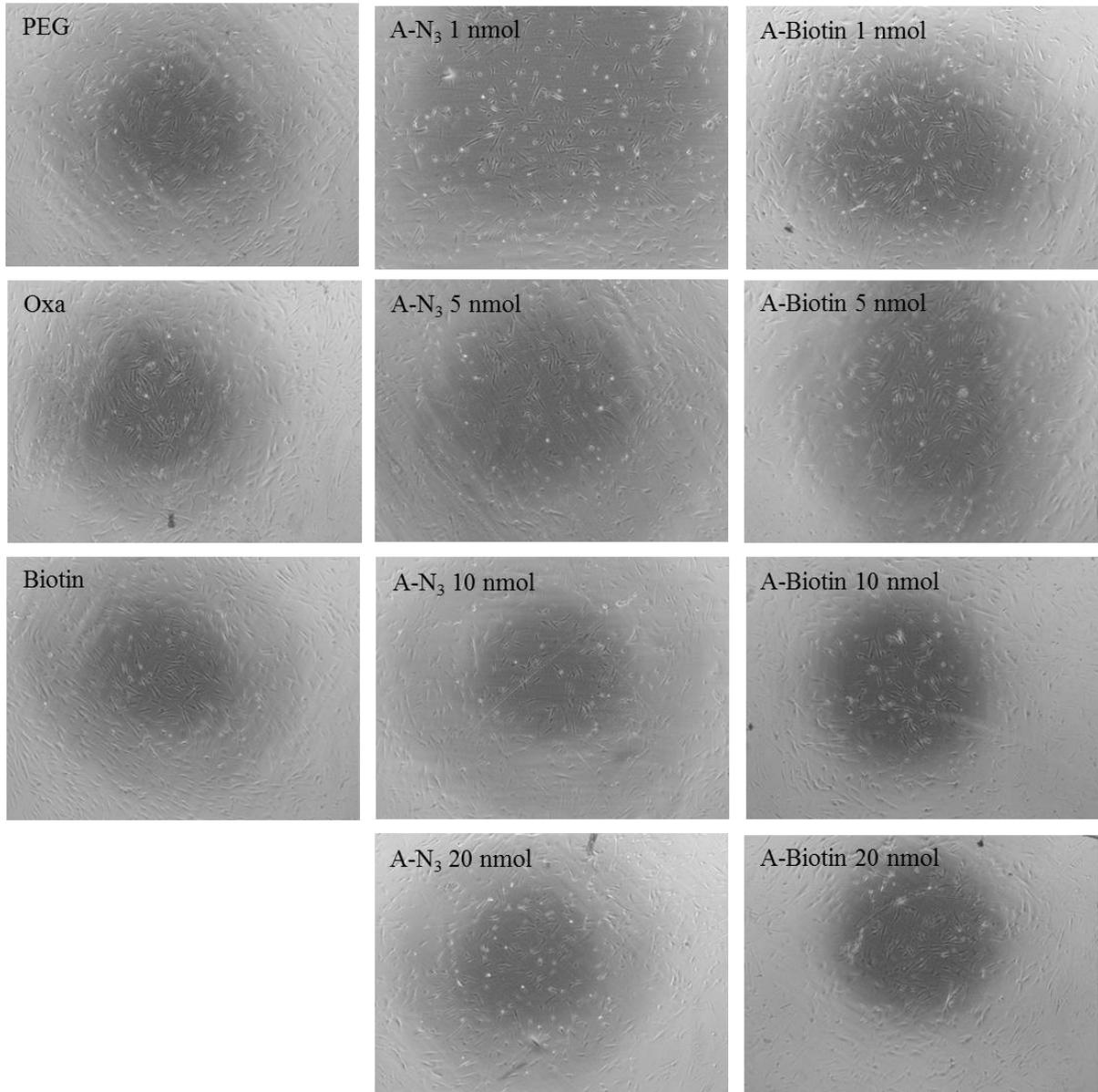


Abbildung 29: Besiedlung der Folien **38** (PEG), **48** (Oxa), **75a/b** (Biotin), **86a/b** (A-N₃; 1-20 nmol) und **87** (A-Biotin; 5-20 nmol) 2 h ohne EGM2-Medium, danach 24 h mit EGM2-Medium mit Iso 3 Zellen.

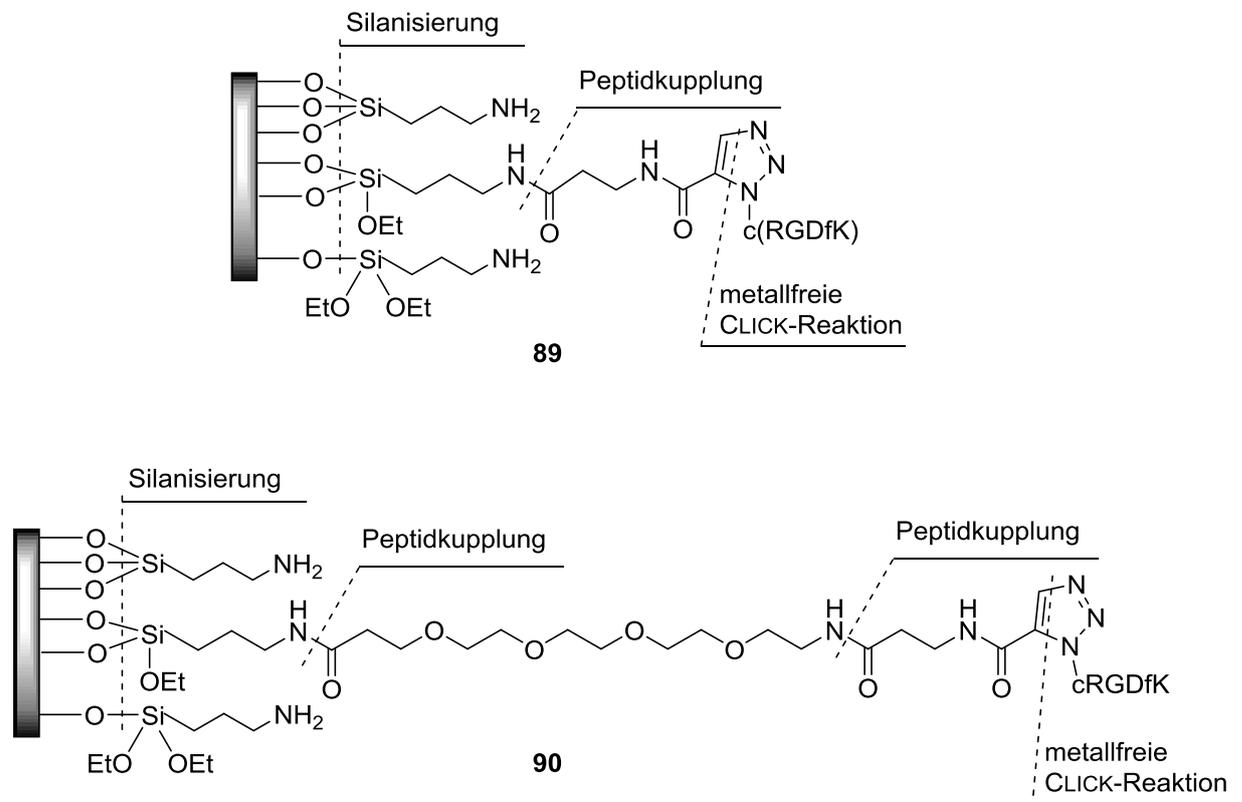
Prinzipiell wiesen die modifizierten Folien **72a/b**, **73a/b**, **75a/b**, **86a/b** und **87** eine erhöhte biologische Aktivität auf, waren aber nicht selektiv gegenüber Endothelzellen.

Fibroblasten konnten sogar besser auf den Folien **86a/b** und **87** angesiedelt werden, als Endothelzellen. Leider waren im Rahmen dieser Arbeit keine Versuche möglich, die eine nähere Auskunft über die Zellzahl oder die Adhärenz der Zellen geben können.

4. Funktionalisierung von Titanplatten

4.1 Einleitung

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Polymeroberflächen vielseitig funktionalisiert werden können, um die Biokompatibilität des Materials zu erhöhen. Bei vielen Implantaten, wie Herzschrittmachern und Zahnimplantaten kann es zu Komplikationen beim Einwachsen, durch Infektionen oder Verkapselung kommen.^{8,9,10} Um die Integration in Gewebe und Knochen zu verbessern, sollte Titan **91** mit cRGDfK(N₃) **49** funktionalisiert werden. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bereits bekannt, dass dies auf einer Titan-Silber-Legierung möglich ist.⁵⁹ Allerdings werden gerade in der Zahnmedizin ausschließlich elementreine Titanimplantate verwendet. Zudem sollte überprüft werden, ob die Vergrößerung des Abstandes zur Oberfläche von cRGDfK(N₃) **49** eine positive Auswirkung auf die biologische Aktivität hat.



Schema 33: Strategien zur Ligation von cRGDfK **49** ohne PEG **89** und mit PEG **90**.

4.2 Polieren und Strukturieren von Titanplatten

4.2.1 Polieren von Titanplatten

Um eine homogene Funktionalisierung der Titanplatten zu ermöglichen, musste zunächst die Rauigkeit auf der Oberfläche beseitigt werden. Die Titanplatten wurden in ca. 1 bis 2 mm dicke Platten gesägt, welche einen Durchmesser von 1 cm haben.⁸³ Dabei entstehen kleine Unebenheiten auf der Oberfläche (Abbildung 30). Die Titanplatten wurden danach zunächst auf eine gleiche Dicke gebracht und dann schrittweise mit Diamantschleifmittel (15 μm , 9 μm , 3 μm und 1 μm) poliert. Abschließend wurden etwaige Schleifrückstände mit Silicasuspension (0.02 μm) entfernt. Die so erhaltenen Titanplatten (Abbildung 30) konnten nun für Funktionalisierungen eingesetzt werden.



Abbildung 30: Titanplatte unpoliert (links) und poliert (rechts).

4.2.2 Strukturieren von Titanplatten

Durch die Nutzung von Ultrakurzpulslasern ist es möglich, Topographien auf den verschiedensten Materialien zu erzeugen, welche für Implantate im Einsatz sind. Diese Topographien sind homogen und reproduzierbar. Die elementare Oberflächenzusammensetzung bleibt dabei erhalten, lediglich die Nanostruktur ändert sich und kann die Benetzbarkeit mit Wasser herabsetzen. Durch diese Veränderung der Oberfläche konnte durch Zellkultivierung mit Neuroblasten und Fibroblasten gezeigt werden, dass eine selektive Herabsetzung von Entzündungen, bei Einwachsen in Gewebe hervorgerufen werden kann.⁸⁴ Entsprechend strukturierte Titanplatten (Abbildung 31) sollten verwendet werden, um den Effekt der Strukturierung mit dem von cRGDFK(N₃) **49** zu kombinieren. Für die Strukturierung ist ein vorheriges Polieren nicht notwendig.

⁸³Richard Werth, Klinik für Zahnärztliche Prothetik und biomedizinische Werkstoffkunde, Medizinische Hochschule Hannover.

⁸⁴E. Fadeeva, A. Dreiwick, B. Chichkov, S. Schlie-Wolter *Interface Focus* **2014**, 4, 20130048.



Abbildung 31: Strukturierte Titanplatte

4.3 Plasmabehandlung von Titan

Auf Metalloberflächen ist bereits eine natürliche Oxidschicht vorhanden. Im Gegensatz zu den PMP-Folien besteht hier auch nicht das Problem der Benetzbarkeit. Dennoch war es notwendig, eine homogene Oberfläche zu schaffen, die gleichmäßig und definiert funktionalisiert werden kann.

Die Abscheidung von silikon-ähnlichen Beschichtungen auf Metall ist bereits für den Korrosionsschutz bekannt. Wegen der sichereren Handhabung wurde von VAUTRIN-UL *et al.* auf Tetramethylsilan verzichtet und auf die nicht-toxischen, nicht-explosiven Alternativen Hexamethyldisiloxan (HMDSO) und Tetraethoxysilan (TEOS) zurückgegriffen. HMDSO hat allerdings einen weiteren Vorteil; der niedrige Dampfdruck bei Raumtemperatur erleichtert die Handhabung in der Plasmaanwendung.⁸⁵ Die Zuführung von HMDSO zu einem Plasmastrom führt bei der Behandlung von Oberflächen zu einer Abscheidung von Silikaten oder Silikonen. Durch (Luft-)Sauerstoff können oxidative Prozesse zu der Erzeugung von Silanolgruppen führen, die eine weitere Funktionalisierung ermöglichen.^{85,86}

Die Titanplatten wurden nach dem Polieren oder Strukturieren direkt für die Plasmabehandlung eingesetzt. Zunächst wurden die Platten ähnlich der PMP-Folie mit Formiergasplasma (N_2/H_2 95/5) behandelt, um durch Oxidation mit Luftsauerstoff die natürliche Oxidschicht noch zu verstärken. Allerdings konnten hier härtere Bedingungen gewählt werden, da hier nicht die Gefahr der Deformation durch Hitzeeinwirkung gegeben ist. Dadurch konnte der Abstand zur Oberfläche verringert

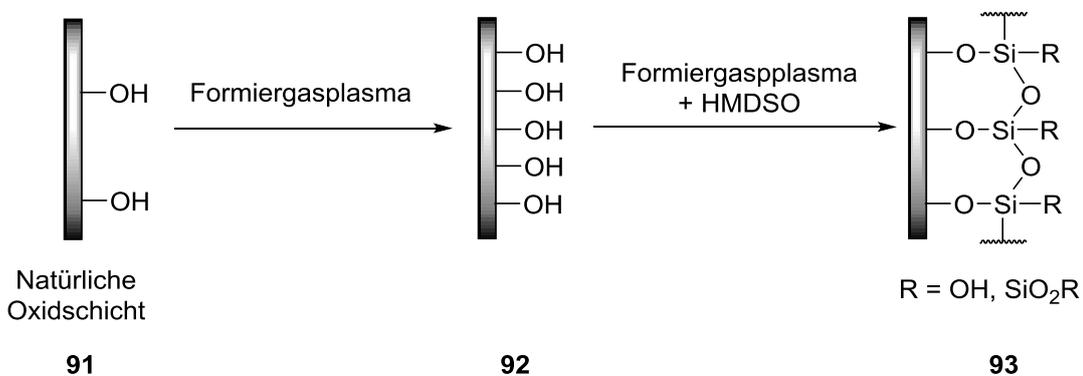
⁸⁵ C. Vautrin-UI, F. Roux, C. Boisse-Laporte, J. L. Pastol, A. Chausse *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 2318-2324.

⁸⁶ G.F. Leu, A. Brockhaus, J. Engemann, *Surf. Coat. Technol.* **2003**, *174-175*, 928-932.

werden. Nach der Behandlung mit Formiergasplasma wurde dem Plasma zusätzlich HMDSO zugesetzt (Tabelle 3). Die Farbe des Plasmastroms änderte sich bei der Zugabe von HMDSO von gelb nach blau. Für die Zugabe eines Vorläufers wurde die statische Düse verwendet (Abbildung 23, Kapitel 3.2).

Vorläufer	Frequenz [kHz]	Spannung [V]	Abstand [mm]	Puls-Pause- Verhältnis	Trägergas
-	21	280	7	100	-
HMDSO (2 mL/min)	21	280	7	100	N ₂ (300 L/h)

Tabelle 3: Bedingungen für die Behandlung von Titan mit Formiergas-Plasma und HMDSO-Plasma.



Schema 34: Funktionalisierung von Titanplatten **91** mit Plasma.

4.4 Silanisierung von Titan

Um Monoschichten auf Oberflächen zu generieren, werden häufig Alkylsilane verwendet. Der Einsatz von Silanen hat den Vorteil, dass schnell kovalente Bindungen zwischen dem Substrat und der Ankergruppe entstehen. Insbesondere geeignet sind Substrate, welche Si-OH Gruppen enthalten oder Metalloxide (Abbildung 34). Generell kann die Bildung der Monoschicht aus einer Lösung und aus der Gasphase erfolgen.⁸⁷

⁸⁷ S. P. Pujari, L. Scheres, A. T. M. Marcelis, H. Zuilhof, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6438-6474.

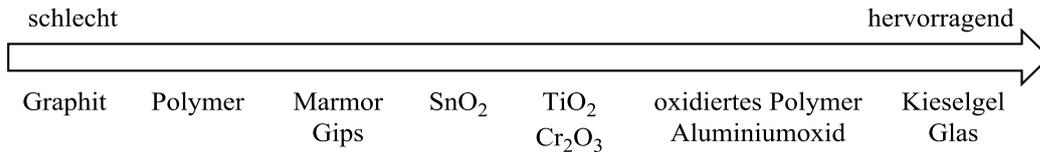
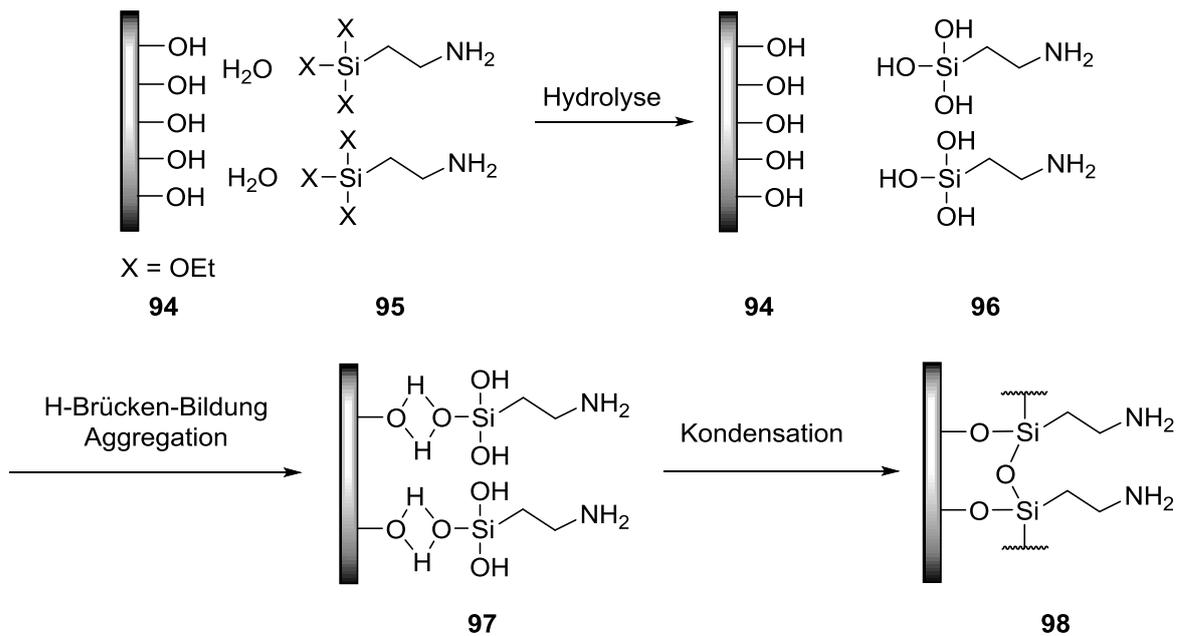


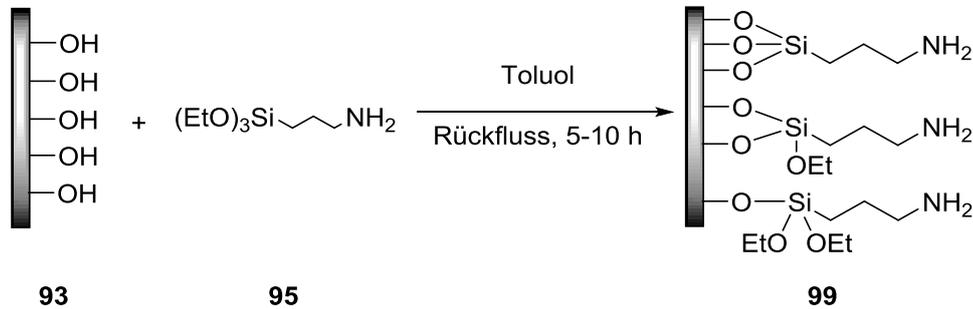
Abbildung 34: Effektivität von Silanmodifizierungen an verschiedenen Substraten.⁸⁷

Wegen der einfacheren Handhabung sollte in dieser Arbeit eine Silanisierung aus Lösung erfolgen. Am weitesten verbreitet ist dabei die Nutzung von Alkoxysilanen, wie Aminopropyltriethoxysilan (APTES) **95** oder wenn eine Polymerisation unterdrückt werden soll Aminopropyldiisopropylethoxysilan (APDIPES). Der Aufbau von selbstorganisierten Monoschichten (SAM) folgt dabei dem gleichen Mechanismus und die Qualität ist abhängig von adsorbiertem Wasser auf der Oberfläche und in der Lösung. An der Oxidschicht der Oberfläche adsorbiert Wasser und das Silan nähert sich zunächst an. Das adsorbierte Wasser reagiert mit dem Silan. Diese Hydrolyse führt zu der Abspaltung der Ether-Gruppen. Anschließend bilden sich zwischen den Hydroxygruppen des Silans und der Oxidschicht der Oberfläche Wasserstoffbrückenbindungen aus. Letztlich kommt es zu einer Kondensation und zur kovalenten Bindung der Siliciumspezies (Schema 35). Durch einen zu hohen Wassergehalt in der Lösung kann allerdings auch eine fehlgeordnete poröse mehrlagige Schicht gebildet werden.⁸⁷



Schema 35: Mechanismus zur Bildung von Monoschichten auf oxidierten Oberflächen.⁸⁷

Aus diesem Grund wurden die zuvor mit HMDSO-Plasma behandelten Titanplatten unter Energiezufuhr in einer 0,2 M Lösung APTES **95** in Toluol silanisiert (Schema 36). Insbesondere bei den strukturierten Titanplatten musste dafür gesorgt werden, dass die Oberfläche nicht durch ein etwaiges Zusammenstoßen beschädigt wird. Deshalb wurden diese Platten isoliert behandelt und ohne Rühren unter Rückfluss erhitzt.

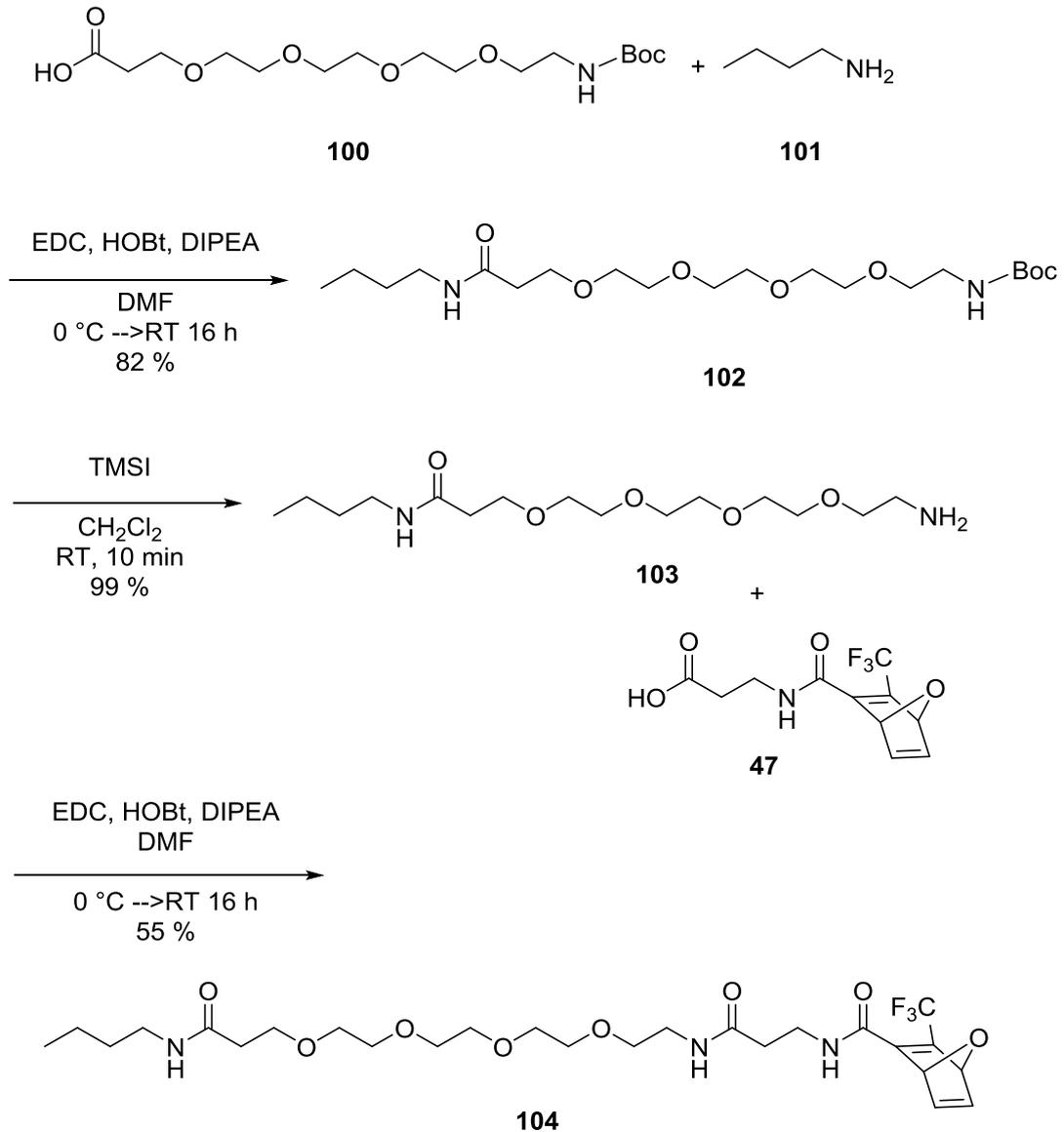


Schema 36: Silanisierung von Titanplatten **93** mit APTES **95**.

4.5 Anbringung eines PEG und Kupplung eines Linkers

Die silanisierten Titanplatten sollten mit dem Rutjes-Linker **47** oder einem Polyethylenglykol (PEG) und Rutjes-Linker **47** funktionalisiert werden. Da durch das APTES **95** ein terminales Amin auf der Oberfläche gebunden war, konnte dieses für die weitere Funktionalisierung verwendet werden. Zunächst wurde anhand eines Testsystems eine Reaktionssequenz erarbeitet, welche später auf die Titanoberfläche übertragen werden sollte. Hierfür wurde ein HOOC-PEG₄NHBoc **100** in einer Peptidkupplung mit *n*-Butylamin **101** eingesetzt. Die Bedingungen wurden dabei von OLTMANNs übernommen.⁸⁸ Nach der Entschützung mit TMSI konnte das freie Amin **103** in einer weiteren Peptidkupplung unter den zuvor genannten Bedingungen mit dem Oxanorbornadien **47** umgesetzt werden (Schema 37).

⁸⁸ M. Oltmanns, *Masterarbeit* **2014**, Leibniz Universität Hannover.

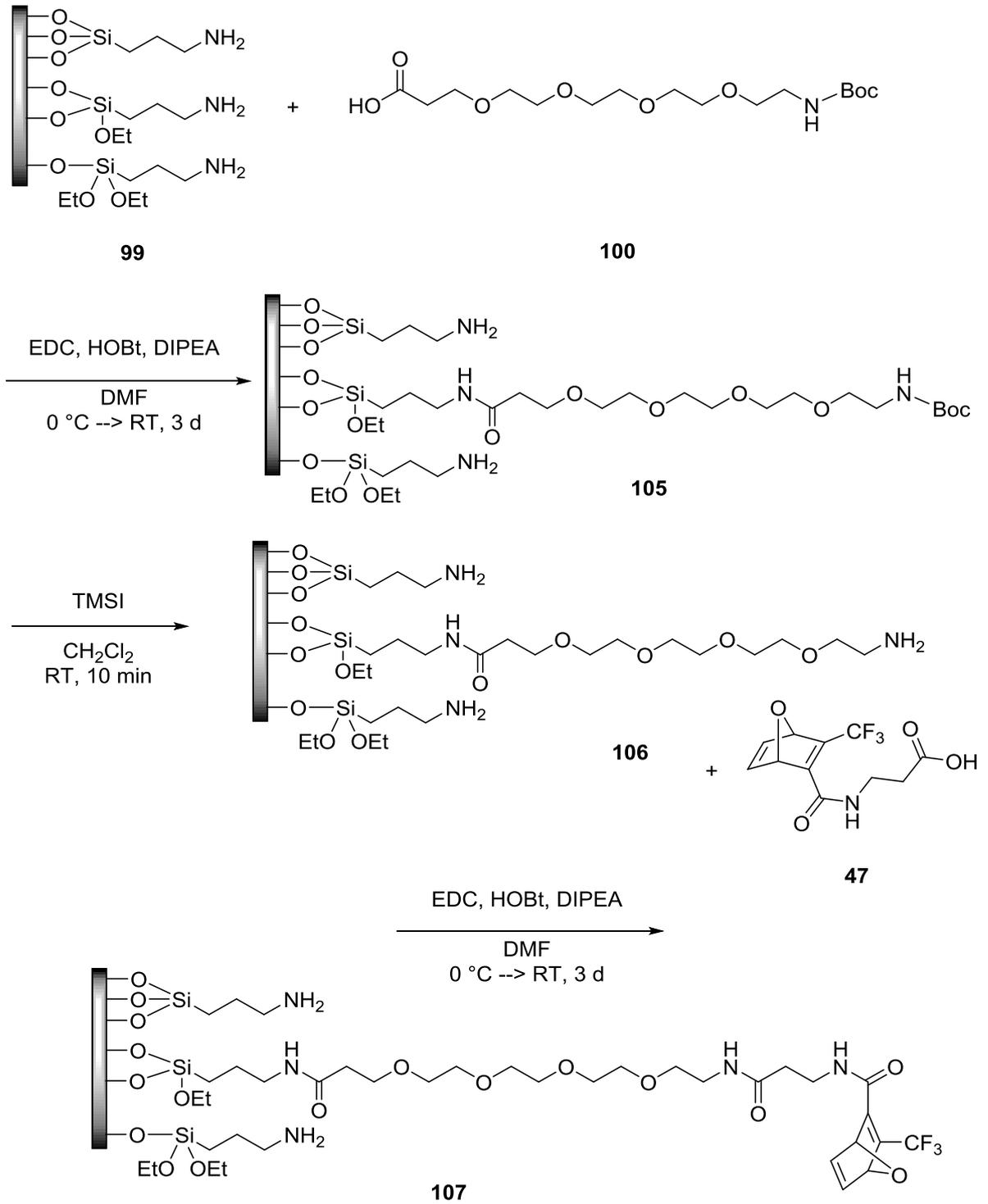


Schema 37: Synthesesequenz des PEG-Testsystems **104** für die Funktionalisierung von Titanplatten **99**.

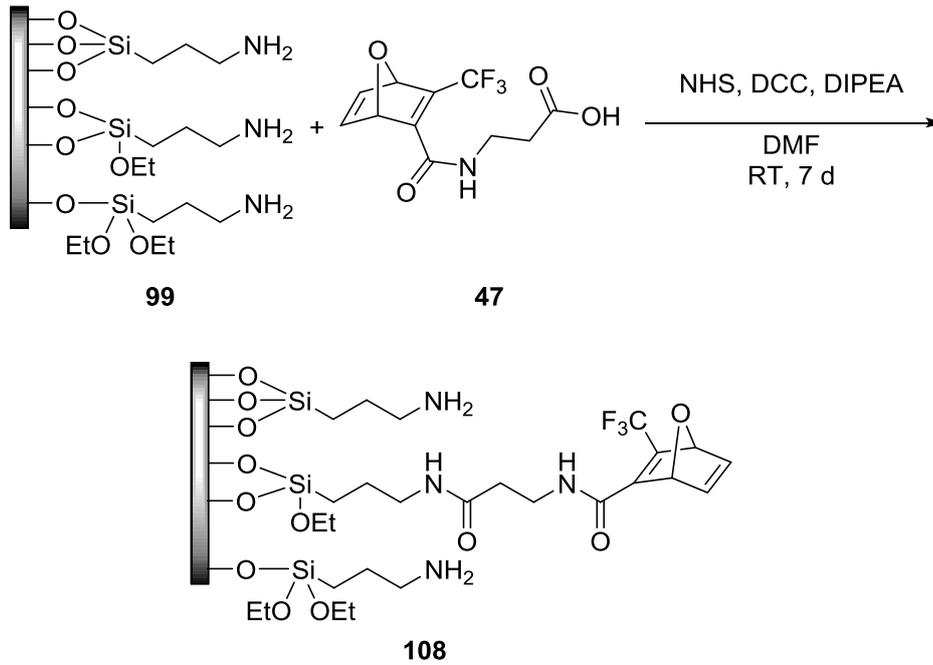
Von der weiteren Umsetzung in einer metallfreien CLICK-Reaktion wurde in diesem Fall abgesehen, da diese schon hinreichend durch Arbeiten von SU et al.³⁶, MÖLLER⁵⁹ und KRAUSE⁸⁹ untersucht wurde.

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten die Bedingungen auf die Oberfläche übertragen werden; nur die Reaktionszeiten wurden teilweise länger gewählt (Schema 37). Dabei wurden Titanplatten beladen mit PEG **100** und ohne PEG hergestellt. Bei der Bindung von Oxanorbornadien **47** ohne PEG wurden dabei die Bedingungen von MÖLLER verwendet (Abbildung 58).⁵⁹

⁸⁹ A. P. Krause *Dissertation 2012*, Leibniz Universität Hannover.



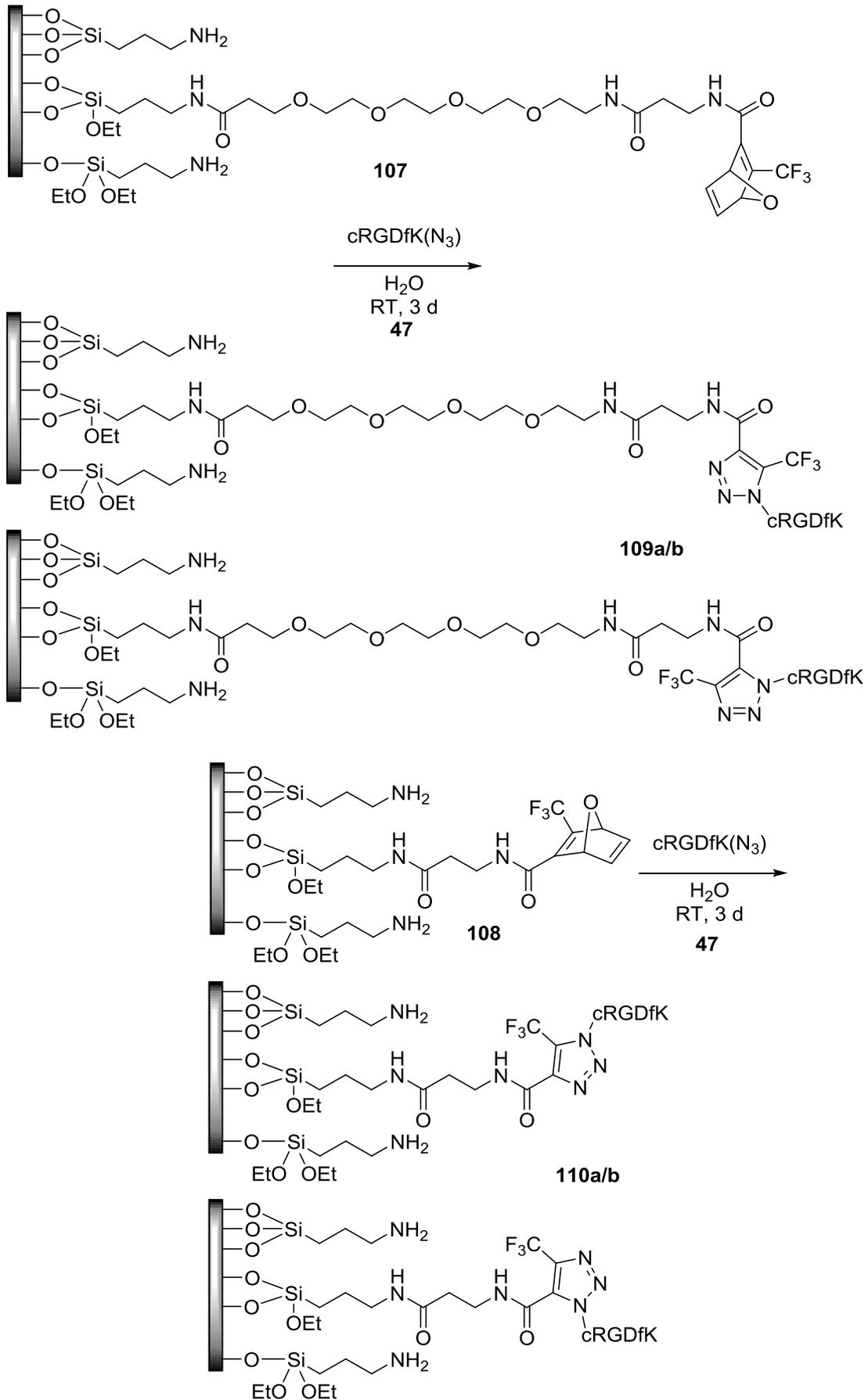
Schema 37: Reaktionen des silanisierten Titans **99** mit HOOC-PEG-NHBoc **100** und Oxanorbornadien **47**.



Schema 38: Reaktion des silanisierten Titans **99** mit Oxanorbornadien **47**.

4.6 Metallfreie Ligation von cRGDfK

Nach der Kupplung von Oxanorbornadien **47** war es möglich, cRGDfK(N₃) **49** in einer metallfreien 1,3-dipolaren Cycloaddition an die polierten, funktionalisierten Titanplatten **107** und **108** zu binden (Schema 39). Die Bedingungen wurden dabei ebenso gewählt, wie bei den funktionalisierten PMP-Folien und in gleicher Weise auf die strukturierten Titanplatten übertragen.



Schema 39: Metallfreie 1,3-dipolare Cycloaddition von cRGDFK **47** an funktionalisierten Titanplatten **107** und **108**

4.7 XPS-Analyse

Wie auch bei den PMP-Folien ist die Messung der Oberflächenzusammensetzung mit EDX nicht geeignet, denn auch hier ist die Überlagerung von Spektrallinien gegeben. Deshalb wurden alle Proben einer XPS-Analyse unterzogen. Zunächst wurde als Referenz unfunktionalisiertes, poliertes Titan **91** untersucht. Wie zu erwarten konnten Signale vom Titan, aber auch Sauerstoff detektiert werden. Dieses spricht dafür, dass ohne eine Aktivierung eine natürliche Oxidschicht auf der Oberfläche vorhanden ist (Abbildung 36).

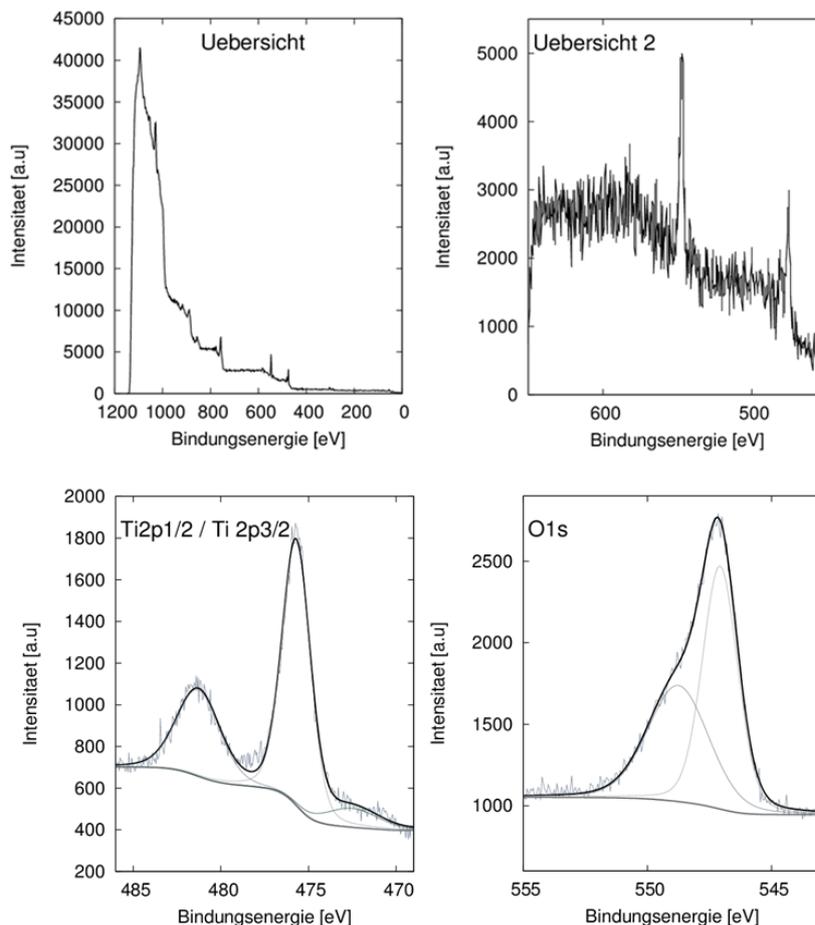


Abbildung 36: XPS-Spektren für blanko Titan **91** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 450-650 eV, Ti2p1/2- und Ti2p3/2-Signal; O1s-Signal).

Nach der Silanisierung von Titan war eine eindeutige Veränderung im Spektrum ersichtlich. Die Bedeckung des Metalls war vollständig und homogen, da das Signal von Titan fehlte. Zudem sind Signale für Silicium, Kohlenstoff und Stickstoff hinzugekommen. Diese Signale stammen von dem nun an der Oberfläche kovalent gebundenen APTES. Des Weiteren war ein Signal für Sauerstoff im Spektrum vorhanden, welches nun dem Silylether an APTES zugeordnet wurde.

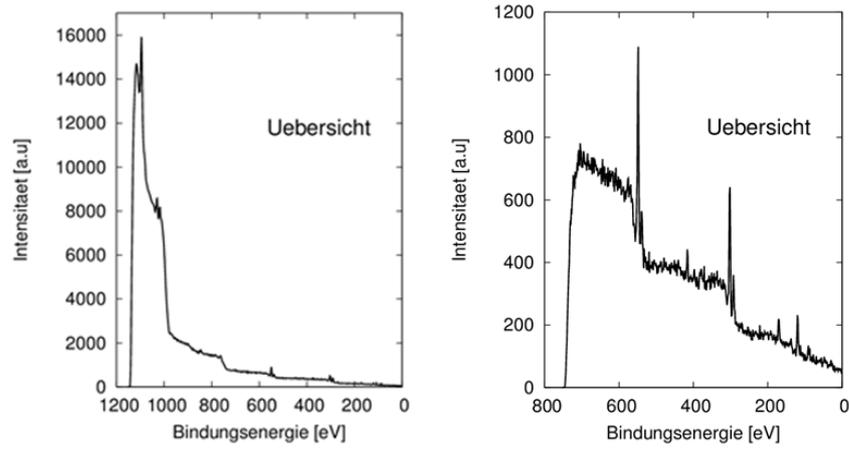


Abbildung 37: XPS-Spektren silanisiertes Titan **99** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 0-800 eV).

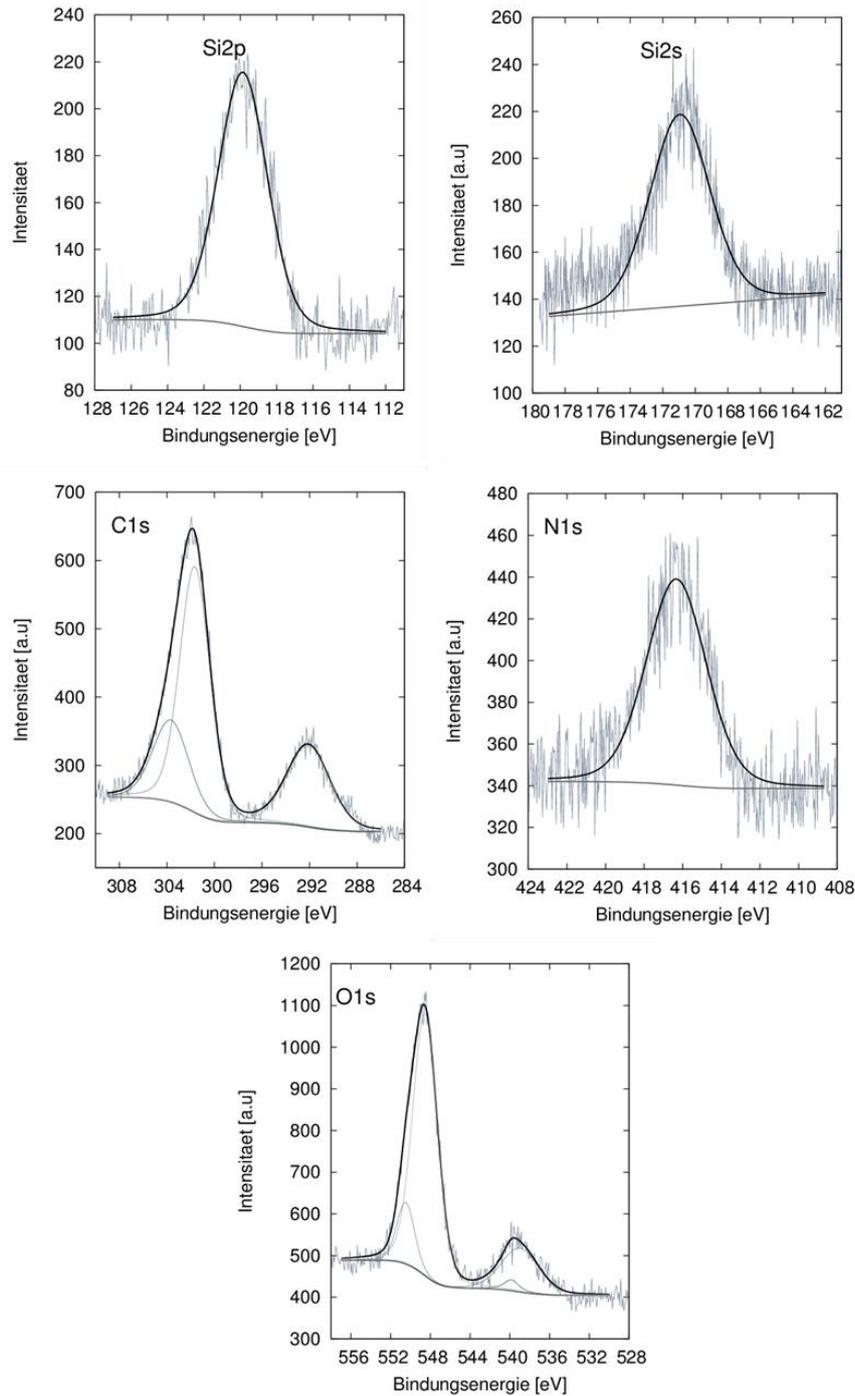


Abbildung 38: XPS-Spektren silanisiertes Titan **99** (Si2p-Signal; Si2s-Signal; C1s-Signal; N1s-Signal; O1s-Signal).

Im folgenden Schritt wurde Oxanorbondien **47** auf die Oberfläche gebracht. Durch diese Reaktion konnte Fluor, ein neues Element, auf die Oberfläche gebracht werden. Dieses Signal tauchte auch im Übersichtsspektrum bei 700 eV auf und konnte als F1s-Signal nachgewiesen werden. Weiterhin konnten die Signale für Silicium, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff nachgewiesen werden.

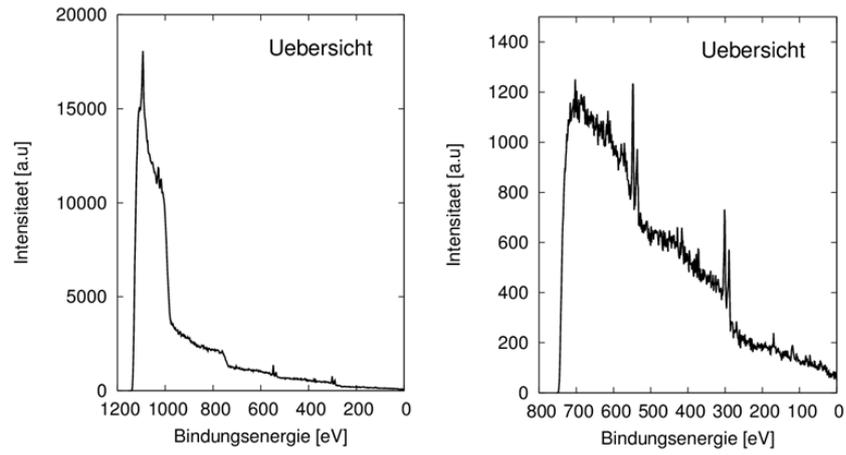


Abbildung 39: XPS-Spektren mit Oxanorbondien modifiziertes Titan **108** (Übersichtsspektrum 0-1200 eV; Übersichtsspektrum 0-800 eV).

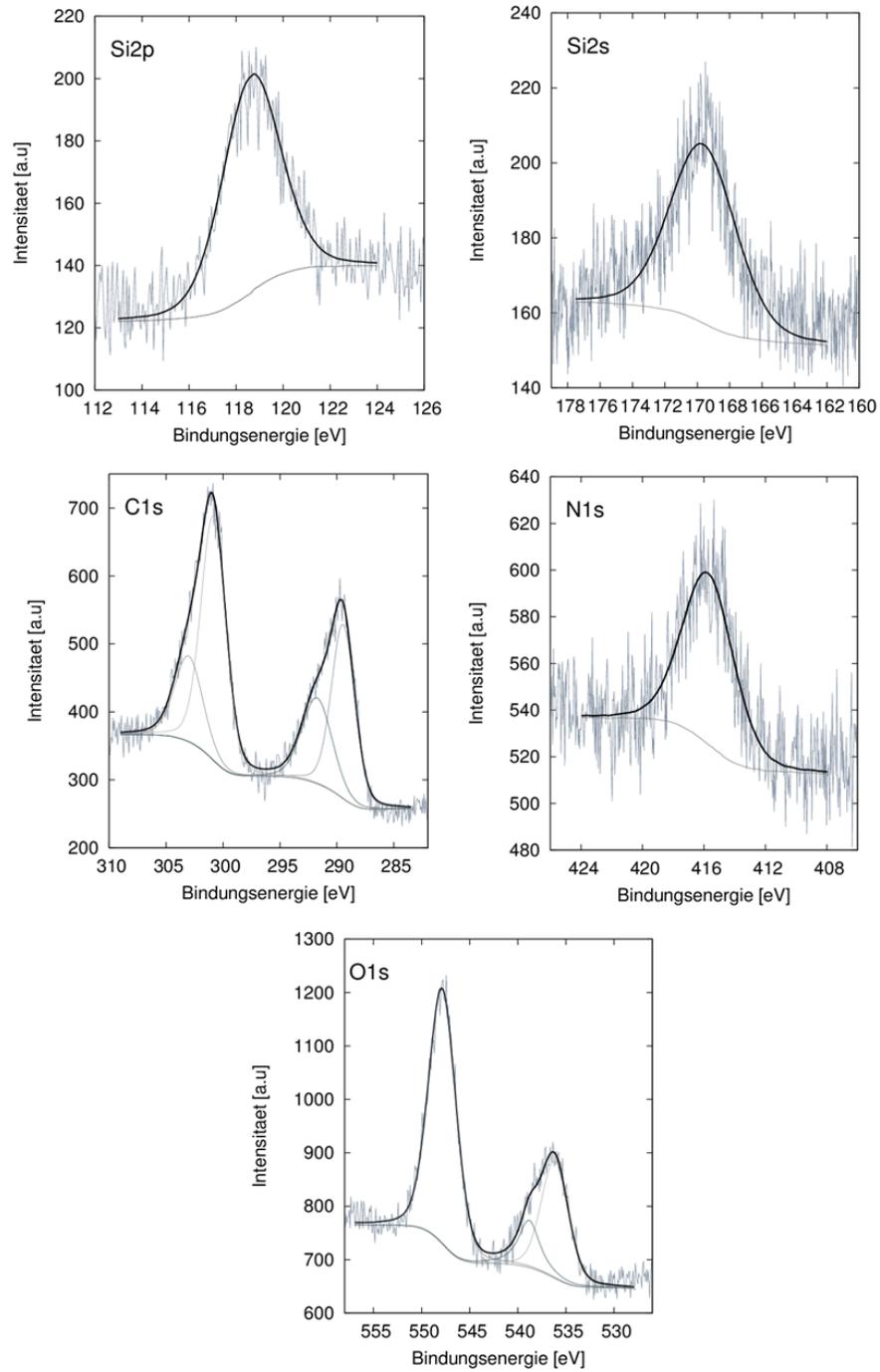


Abbildung 40: XPS-Spektren mit Oxanorbondien **108** modifiziertes Titan (Si2p-Signal; Si1s-Signal; C1s-Signal, N1s-Signal, O1s-Signal).

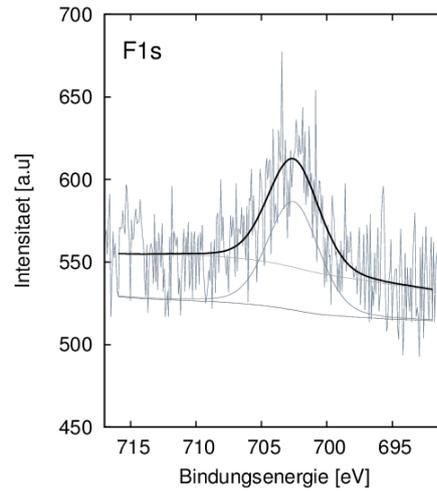


Abbildung 41: XPS-Spektrum mit Oxanorbordien **108** modifiziertes TitanF1s-Signal).

Für den nachfolgenden Schritt wurden keine weiteren Untersuchungen vorgenommen. Durch das cRGDfK(N₃) **47** konnte die Oberflächenzusammensetzung nicht verändert werden. Der Nachweis erfolgte im Anschluß durch biologische Untersuchungen des Materials.

4.8 REM-Aufnahmen

Wie auch schon die modifizierte PMP-Folie konnten die polierten und strukturierten Titanplatten mikroskopisch untersucht werden.

Bei den polierten Platten ist nach der Silanisierung zu erkennen, dass die vorher riefenlose Oberfläche eine Körnung ausweist.

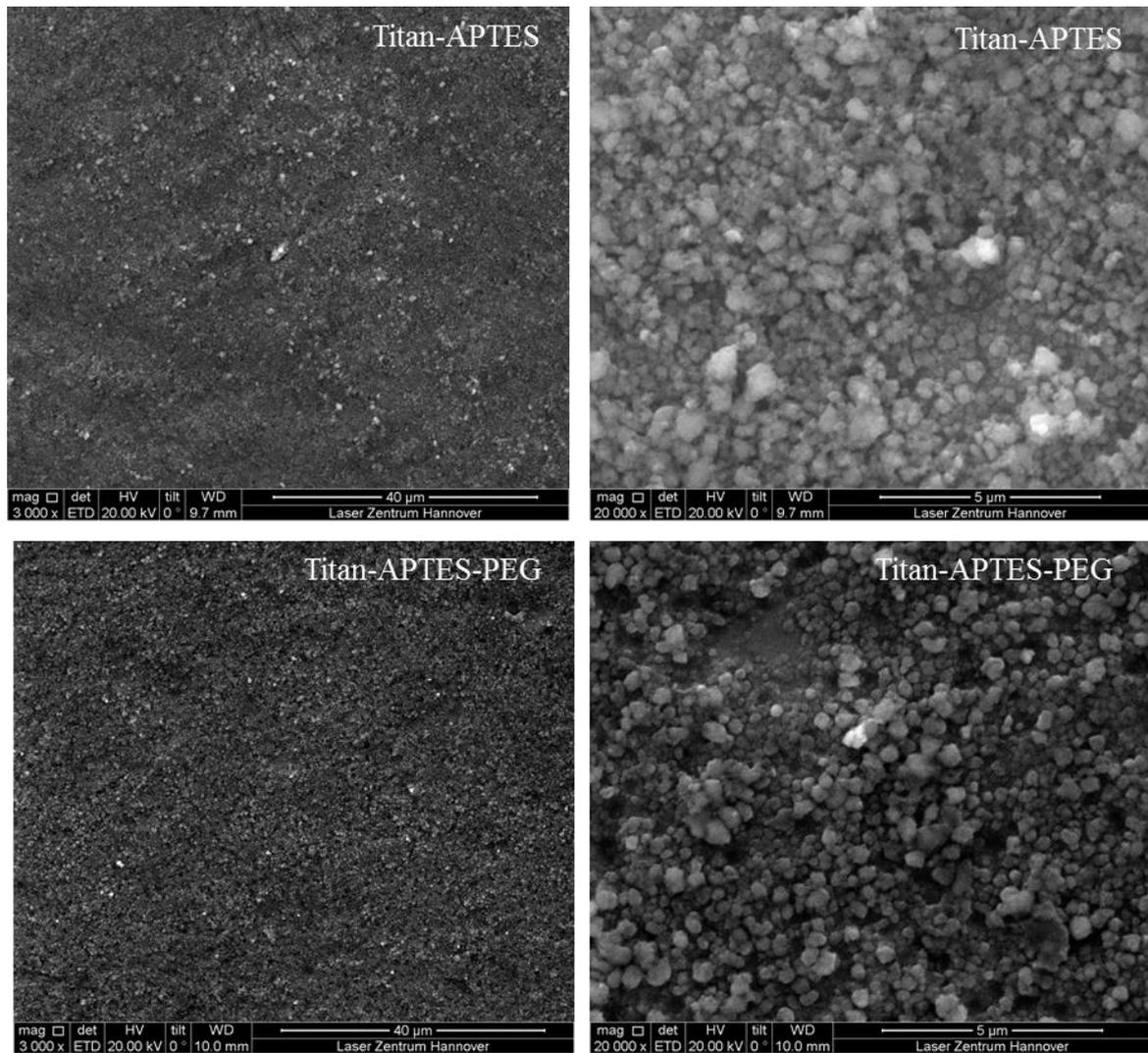


Abbildung 42: REM-Aufnahmen von polierten und modifizierten Titanplatten [99 (Ti-APTES) und 106 (Ti-APTES-PEG)] .⁸¹

Diese Körnung verteilte sich gleichmäßig über die Oberfläche und blieb in der nachfolgenden Kupplung HOOC-PEG-NHBoc erhalten (Abbildung 42). Auch die weiteren Funktionalisierungen änderten die Morphologie der Oberfläche nicht (Abbildung 43). Die leicht unterschiedliche Färbung der Aufnahmen ist durch den Bereich der Aufnahme zu erklären und ist nicht auf die Funktionalisierung zurückzuführen.

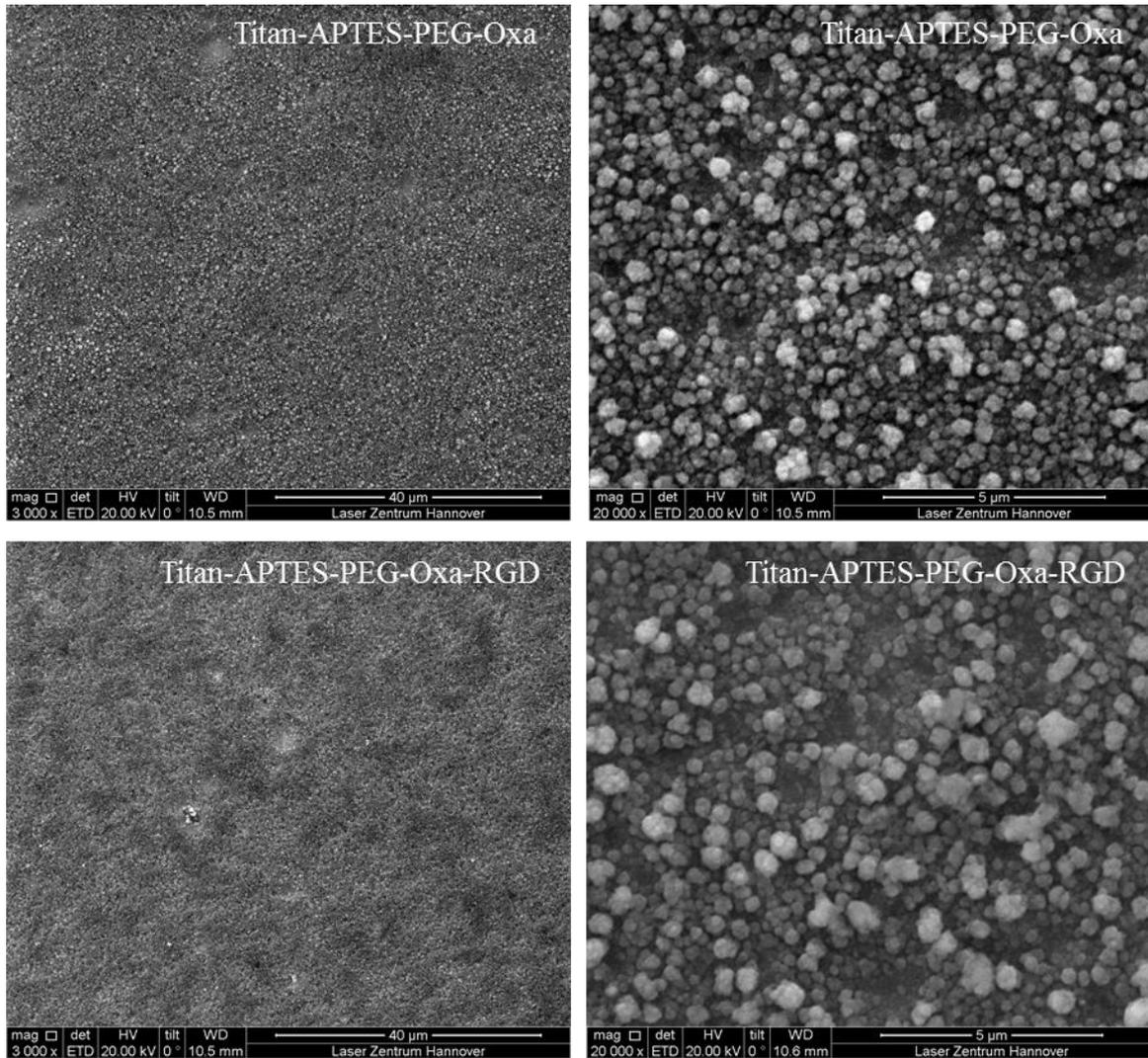


Abbildung 43: REM-Aufnahmen von polierten, modifizierten Titanplatten [107 (Titan-APTES-PEG-Oxa) und 109a/b (Titan-APTES-PEG-Oxa-RGD)].⁸¹

Bei den strukturierten Titanplatten musste zunächst geklärt werden, ob die Behandlung mit HMDSO-Plasma eine Veränderung der Nanostruktur hervorruft. Es war zu befürchten, dass die sehr harschen Bedingungen die Eigenschaften der Nanostruktur nachteilig verändern. Aus diesem Grund wurden direkt nach der Plasmabehandlung Vergleichsaufnahmen zwischen den strukturierten Titanplatten und den strukturierten und mit Plasma behandelten Platten gemacht. Es war eindeutig zu erkennen, dass zwischen den beiden Proben optisch kein signifikanter Unterschied besteht (Abbildung 44), lediglich die Zusammensetzung auf der Oberfläche wurde verändert (Kapitel 4.7).

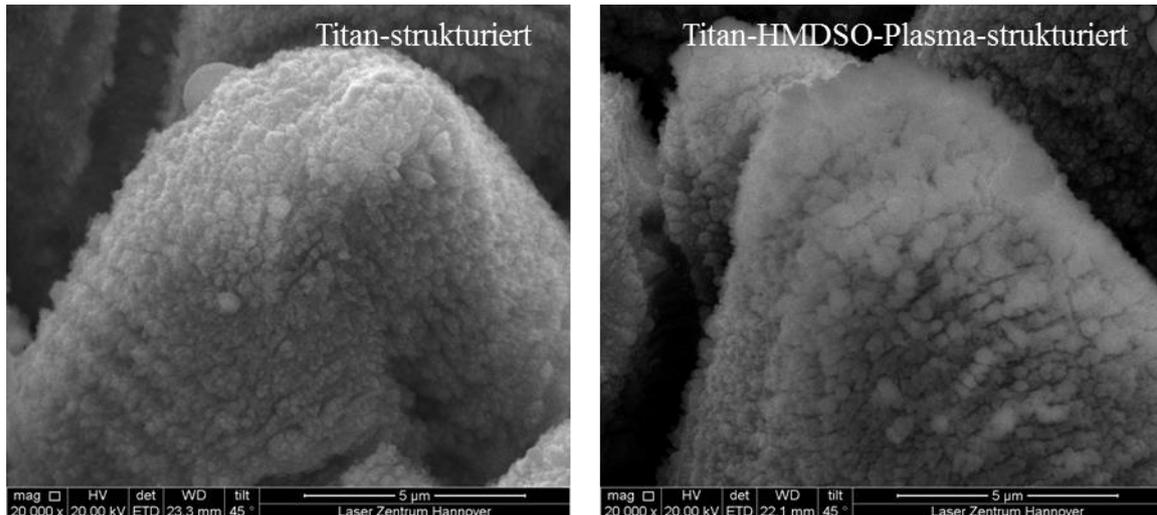


Abbildung 44: REM-Aufnahme strukturierte Titanplatte und strukturierte mit HMDSO-Plasma behandelte Titanplatte **93**.⁸¹

Anschließend konnten die strukturierten Titanplatten **91**, wie zuvor beschrieben, funktionalisiert werden. Der Vergleich zwischen den strukturierten Platten und den funktionalisierten Platten war schon makroskopisch auszumachen. Durch die Nanostruktur wird das eingestrahlte Licht komplett von der Oberfläche absorbiert, wodurch diese schwarz erscheint, aber schon nach der Silanisierung mit APTES **95** wurde eine hellere, weiß erscheinende Oberfläche erhalten (Abbildung 45).



Abbildung 45: strukturierte Titanplatte vor der Silanisierung **91** (links) und nach der Silanisierung **96** (rechts).

Durch die REM-Aufnahmen wurde ersichtlich, dass sich eine körnige Struktur auf der Nanostrukturierung bildet (Abbildung 46). Diese war wahrscheinlich für die veränderte Optik verantwortlich. Die Eigenschaften der Mikrostruktur wurden dabei allerdings nicht verändert.

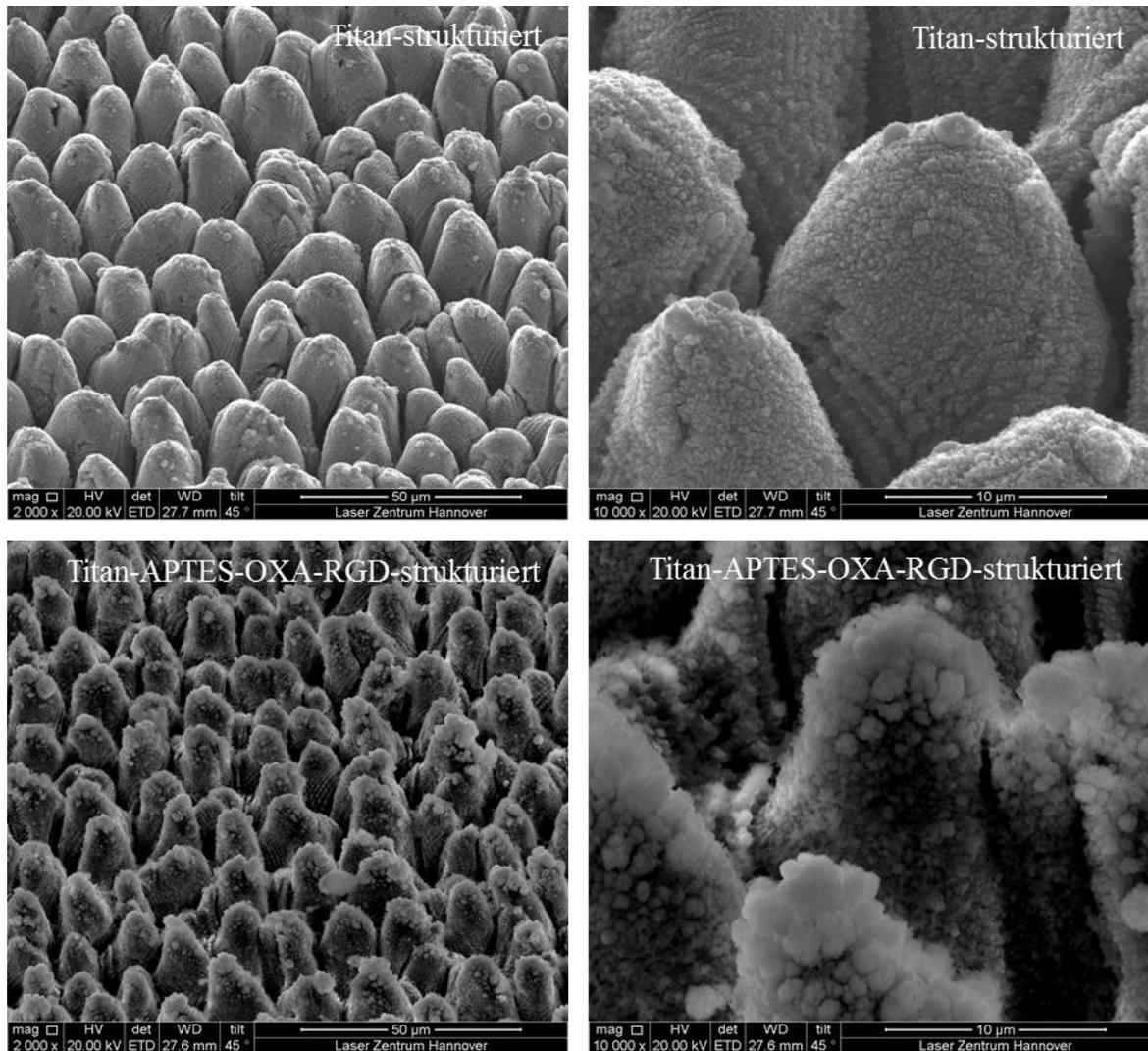


Abbildung 46: REM-Aufnahmen der strukturierten Titanplatte **31** und der strukturierten funktionalisierten Titanplatte **110a/b** (Titan-APTES-OXA-RGD-strukturiert).⁸¹

4.9 Biologische Evaluation der funktionalisierten Oberflächen

Nach den oberflächenanalytischen Untersuchungen der funktionalisierten Platten bezüglich der elementaren Zusammensetzung wurden die biologischen Eigenschaften des Materials **110a/b** untersucht. Als Referenz wurden nicht funktionalisierte, polierte Titanplatten **91** und eine Zellkulturplastik herangezogen. Sowohl humane Gingivafibroblasten als auch Osteoblasten wurden auf den verschiedenen Materialien für 24 h beziehungsweise 72 h kultiviert. Mit diesen beiden Zelltypen sollte das Einwachsen in Gewebe und Knochen simuliert werden, um das Einwachsen eines Zahnimplantates zu simulieren. Mit einem Lactat-Dehydrogenase-Assay wurde die Zelldichte auf der Probenoberfläche bestimmt. Die entsprechenden Versuche wurden freundlicherweise von Dr. A. WINKEL an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Im Fall der humanen Osteoblasten war die Zellzahl auf der Titanplatte **91** im Vergleich zur Zellkulturplastik sehr niedrig. Generell kann es hier zu einer Zellzahlreduzierung von etwa 30 % kommen; sie lag aber bei über 70 %.⁹⁰ Für die mit APTES beschichtete Titanplatte **96** und die mit RGD **110a/b** beschichtete Probe lag ein ähnliches Ergebnis, wie für das Titan **91** vor. Die Probe mit Oxanorbordien führte zu einem geringeren Zellbewuchs (Abbildung 47). Da schon die Titanplatte **91** nicht zu den erwarteten Ergebnissen geführt hat, ist davon auszugehen, dass in diesem Fall bei der Messung oder der Besiedlung ein Fehler aufgetreten ist. Leider konnte bis zum Abschluss dieser Arbeit keine erneute Untersuchung durchgeführt werden, um diesen Fehler auszuschließen.⁹¹

⁹⁰ A. Winkel *unveröffentlichte Ergebnisse*, Medizinische Hochschule Hannover.

⁹¹ A. Winkel, Medizinische Hochschule Hannover, biologische Evaluierung der Titanproben.

humane Osteoblasten

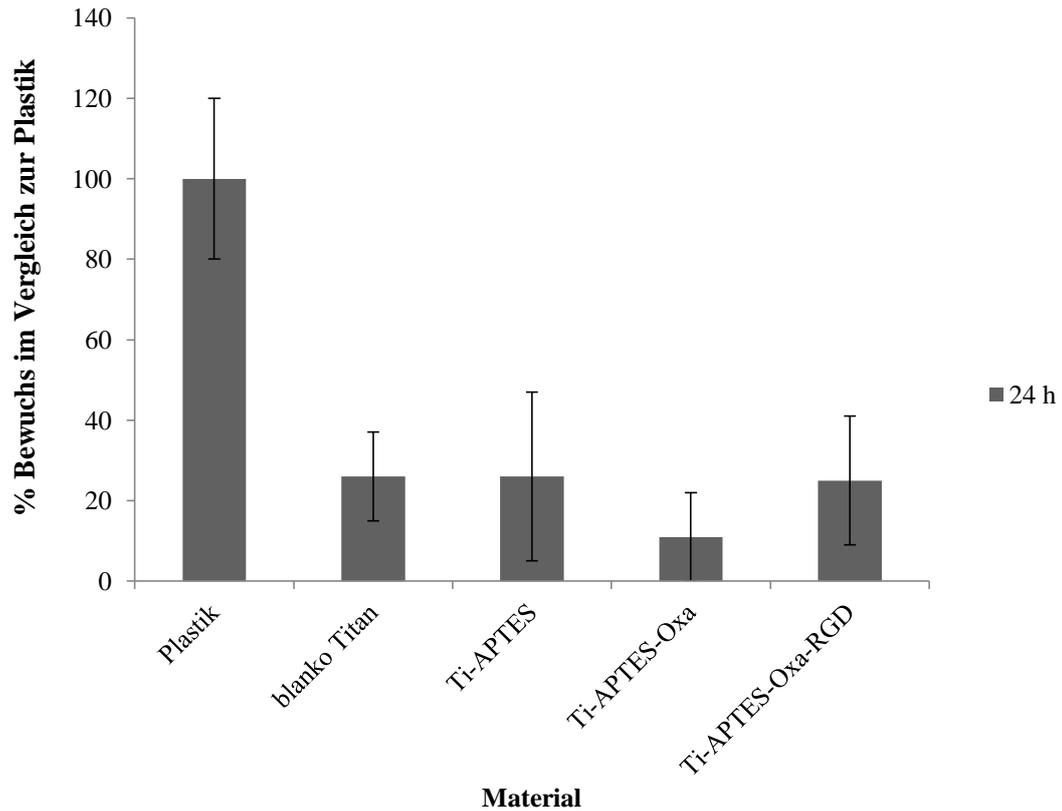


Abbildung 47: Zellbewuchs der verschiedenen Titanmaterialien im Vergleich zur Zellkulturplastik von humanen Osteoblasten nach 24 h (Plastik, blanko Titan **91**, Ti-APTES **96**, Ti-APTES-Oxa **107**, Ti-APTES-Oxa-RGD **110a/b**).

Nach 72 h hatte sich der Zellbewuchs verändert, denn die Titanplatte **91** war viel stärker mit Zellen bewachsen. Allerdings ergab sich für die RGD-Titanplatte **110a/b** ein äußerst niedriger Zellbewuchs, der den beiden Vorläufern ähnlich war. Zu erwarten wäre gewesen, dass die Vorläufer einen geringeren Zellbewuchs als die mit RGD beschichtete Titanplatte **110a/b** aufweisen würden. Da schon die 24 h Zellkultur fehlerhaft war, ist in dieser Zellkultur ebenfalls mit einem Fehler zu rechnen (Abbildung 48).⁹¹

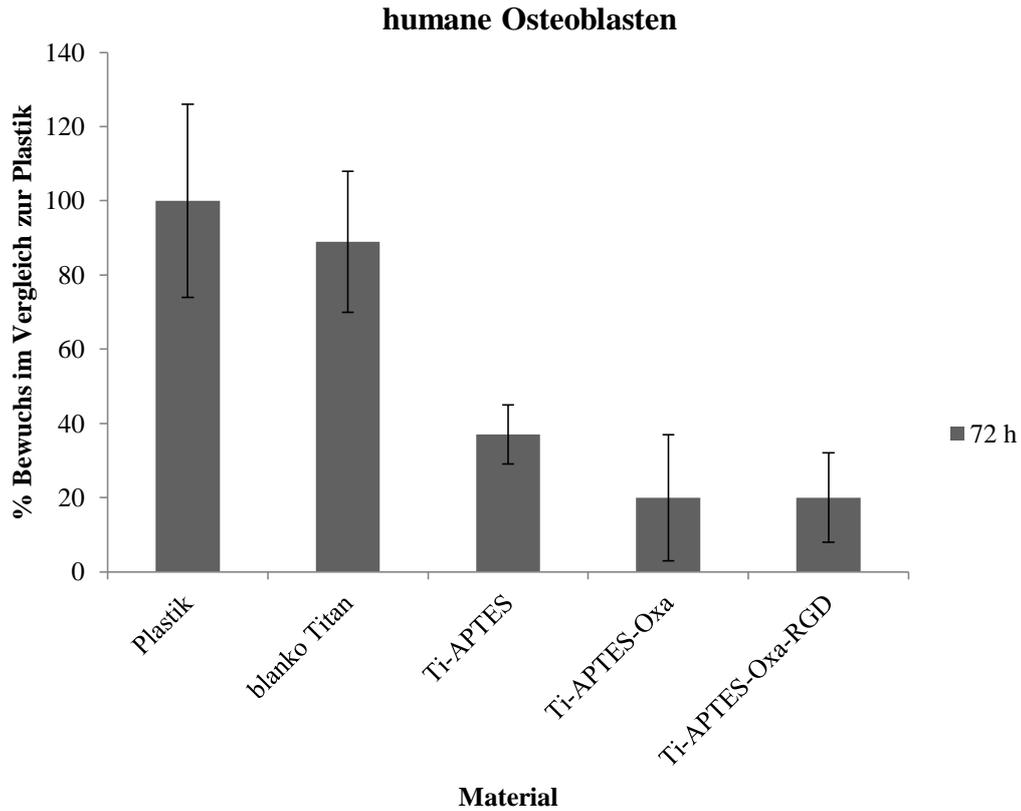


Abbildung 48: Zellbewuchs der verschiedenen Titanmaterialien im Vergleich zur Zellkulturplastik von humanen Osteoblasten nach 72 h (Plastik, blanko Titan **91**, Ti-APTES **96**, Ti-APTES-Oxa **107**, Ti-APTES-Oxa-RGD **110a/b**).

Bei der Zellkultur mit humanen Gingivafibroblasten zeigt sich ein veränderter Zellbewuchs der Proben. Durch die Versuche mit PMP-Folien und RGD war zu erwarten, dass die Zellart sehr gut auf den entsprechend funktionalisierten Titanplatten wächst. Es zeigte sich, dass die blanko Titanplatte im Vergleich zur Zellkulturplastik am besten für die Besiedlung geeignet ist. Dennoch war anhand dieser Zellkultur ein Trend auszumachen. Die RGD-Beschichtung **110a/b** führte zu einem eindeutig höheren Zellbewuchs, als bei den Vorläufermaterialien (Abbildung 49).⁹¹

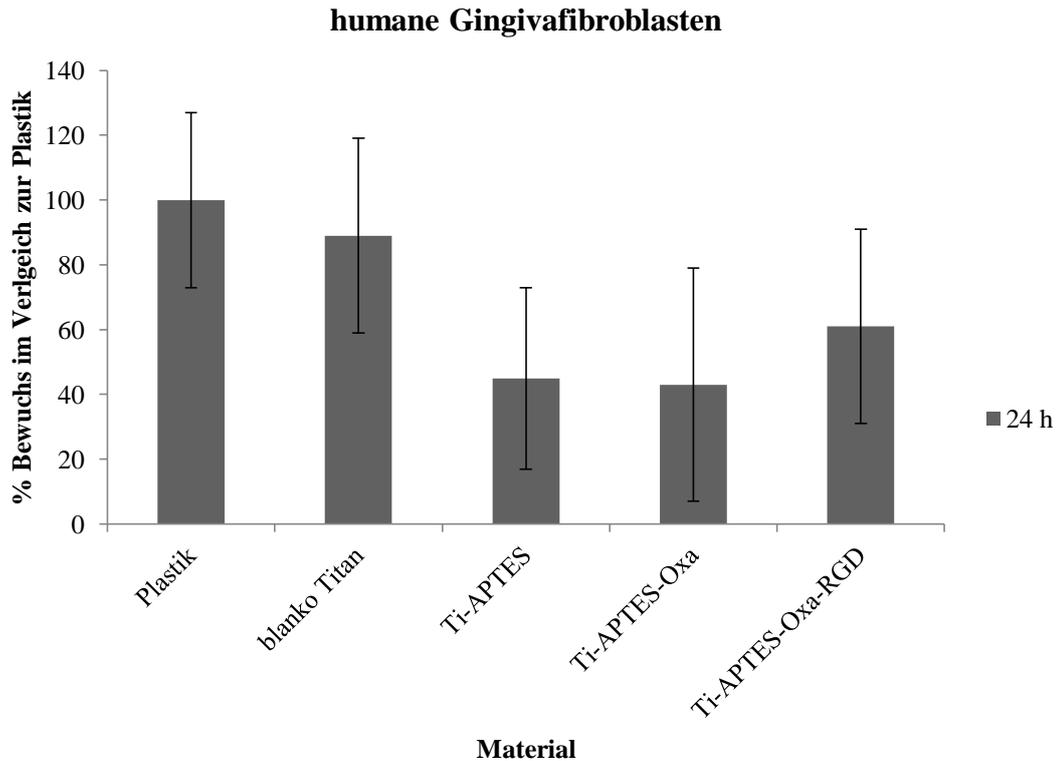


Abbildung 49: Zellbewuchs der verschiedenen Titanmaterialien im Vergleich zur Zellkulturplastik von humanen Gingivafibroblasten nach 24 h (Plastik, blanko Titan **91**, Ti-APTES **96**, Ti-APTES-Oxa **107**, Ti-APTES-Oxa-RGD **110a/b**).

Nach 72 Stunden zeigte sich, dass die blanko Titanplatte **91** im Vergleich zur Zellkulturplastik zu einem signifikant höheren Zellbewuchs führt. Im Vergleich dazu fielen die beschichteten Titanplatten stark ab, mit ähnlichen Werten untereinander (Abbildung 50). Diese Ergebnisse widersprachen allen zu erwartenden Ergebnissen.

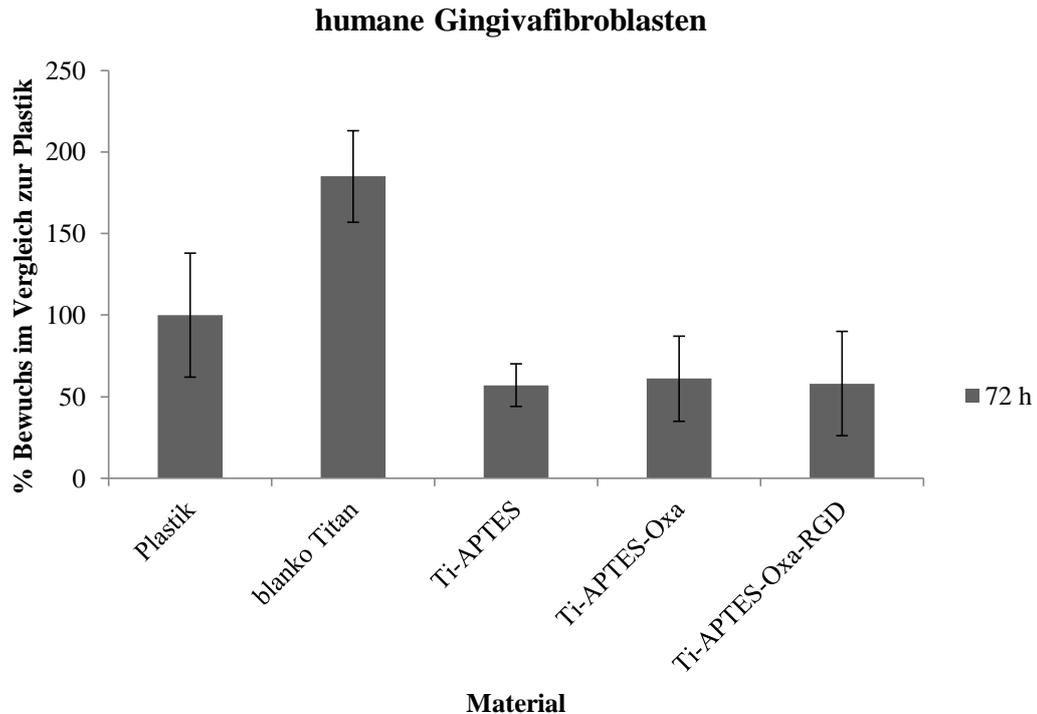


Abbildung 50: Zellbewuchs der verschiedenen Titanmaterialien im Vergleich zur Zellkulturplastik von humanen Gingivafibroblasten nach 72 h (Plastik, blanko Titan **91**, Ti-APTES **96**, Ti-APTES-Oxa **107**, Ti-APTES-Oxa-RGD **110a/b**).

Bei der Betrachtung der Zelldichten auf den Materialien wurde klar, dass in diesem Zellkulturversuch Gingivafibroblasten besser auf dem RGD-Material **110a/b** wuchsen und zu einer höheren Zellzahl auf der Oberfläche führten. Die Osteoblasten wuchsen zwar vergleichsweise schlecht an, dies galt aber auch für die Referenzen der Zellkulturplastik und der Titanplatte **91** (Tabelle 4). Anhand dieser Ergebnisse ließ sich nicht eindeutig bestimmen, wie biokompatibel die RGD beschichteten Titanplatten wirklich sind, da es innerhalb der Zellkultur zu Fehlern kam. Ob diese Fehler auf die Kultivierung selbst oder das Material zurückzuführen sind, ließ sich im Nachhinein nicht klären.

Probe	Zelldichte [Zellen/cm ²]			
	Humane Osteoblasten	Humane Osteoblasten	Humane Gingivafibroblasten	Humane Gingivafibroblasten
	24 h	72 h	24 h	72 h
Zellkultur- plastik	1125	2892	6866	18368
Titan blanko	291	2575	6139	33905
Ti-APTES	293	1057	3085	10404
Ti-APTES- Oxa	126	583	2976	11127
Ti-APTES- Oxa-RGD	279	571	4211	10582

Tabelle 4: Zelldichte von humanen Osteoblasten und humanen Gingivafibroblasten auf verschiedenen Materialien nach 24 und nach 72 Stunden.

Die osteogene Differenzierung von humanen Stammzellen auf RGD-beschichteten Titanplatten **110a/b** sollte über einen längeren Zeitraum näher untersucht werden, um zu klären inwieweit die bis dahin vorliegenden Ergebnisse repräsentativ für die Materialien sind. Die Versuche hierfür wurden von V. KELLER und Dr. S. SCHLIE-WOLTER am Laserzentrum Hannover e.G. durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Für die osteogene Differenzierung wurden humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (*human adipose derived stem cells* – hASC) verwendet. Es sollten verschiedene Marker betrachtet werden, welche signifikant für eine osteogene Differenzierung sind. Dazu gehört als Standardmarker die alkalische Phosphatase (ALP), welche am Mineralisierungsprozess beteiligt ist, und Collagen. Die Kalzifizierung der Knochenmatrix lässt sich über den Nachweis von eingelagertem Calcium verfolgen.⁹²

Zunächst sollte bestimmt werden wie viele Zellen auf der Oberfläche anwachsen. Zu diesem Zweck wurden hASCs als Kontrollzellen und als osteogen differenzierte Zellen (jeweils 40.000 Zellen) auf der Oberfläche für 7, 14 und 21 Tage kultiviert und die

⁹² E. Birmingham, G. L. Biebur, P. E. MacHugh, G. Shaw, F. P. Barry, L. M. McNamara *Eur. Cells Mater.* **2012**, 23, 13-27.

Zellzahl anhand eines LDH-Assays bestimmt (Abbildung 51). Es zeigte sich, dass auf den RGD beschichteten Titanplatten weniger Zellen, als auf den blanko Titanplatten anwuchsen. Im Gegensatz zu der Besiedlung mit humanen Osteoblasten, konnte mit den RGD-Titanplatten **110a/b** eine vergleichbare Zelldicht, wie auf den unbehandelten Titanplatten erreicht werden. Auf den RGD-beschichteten Titanplatten **110a/b** konnte die Zellzahl mehr als versechsfacht werden (7.847 Zellen – 7 d; 49.279 Zellen – 21d) während sich die Zellzahl auf den blanko Titanplatten verfünffachen konnte (9.429 Zellen – 7 d; 47.641 Zellen- 21 d).⁹³

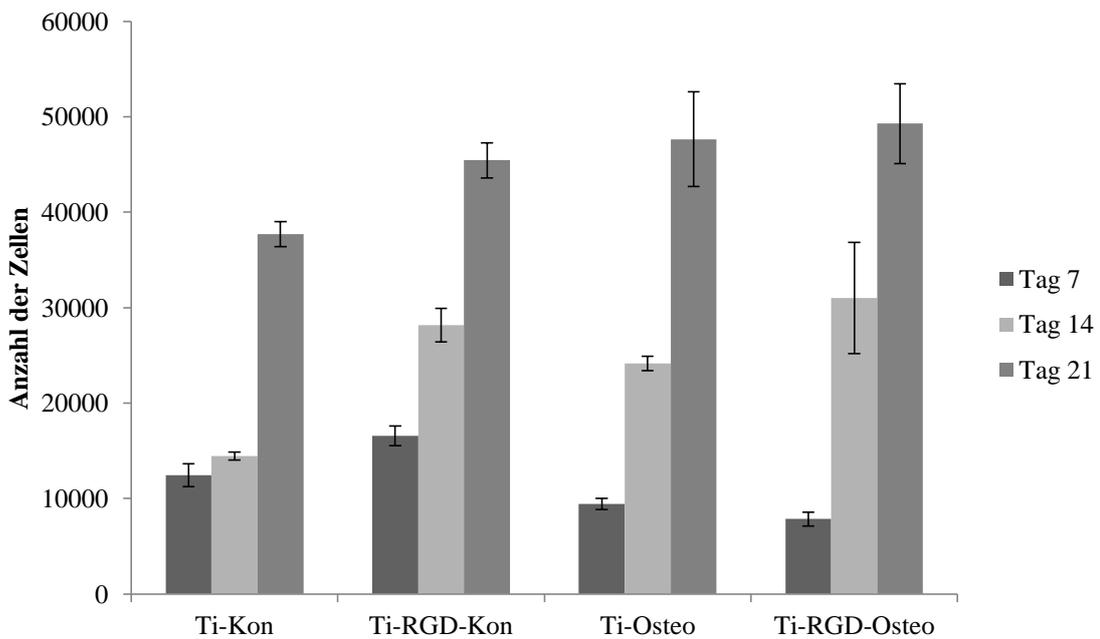


Abbildung 51: Ergebnisse des LDH-Assays zur Bestimmung der Zellzahl mit Kontrollzellen (RGD Con **110a/b**, Blank Con **91**) und osteogen differenzierten Zellen (RGD Osteo **110a/b**, Blank Osteo **91**).⁹³

Die ALP-Produktion der osteogen differenzierten Zellen war schon am erstem Messtag (7 d) für die RGD beschichteten Titanplatten **110a/b** höher, als für die blanko Titanplatten **91**. Nachfolgend sank die ALP-Produktion ab, stieg aber für die blanko Titanplatten **91**, welche mit osteogen differenzierten Zellen kultiviert wurde, an. Für die RGD-beschichteten Titanplatten **110a/b** blieb bis zum Tag 21 eine vergleichsweise starke ALP-Produktion erhalten, während bei den Kontrollen keine Aktivität nachzuweisen war.

⁹³ V. Keller *Masterarbeit* 2014, Laserzentrum Hannover e.G.

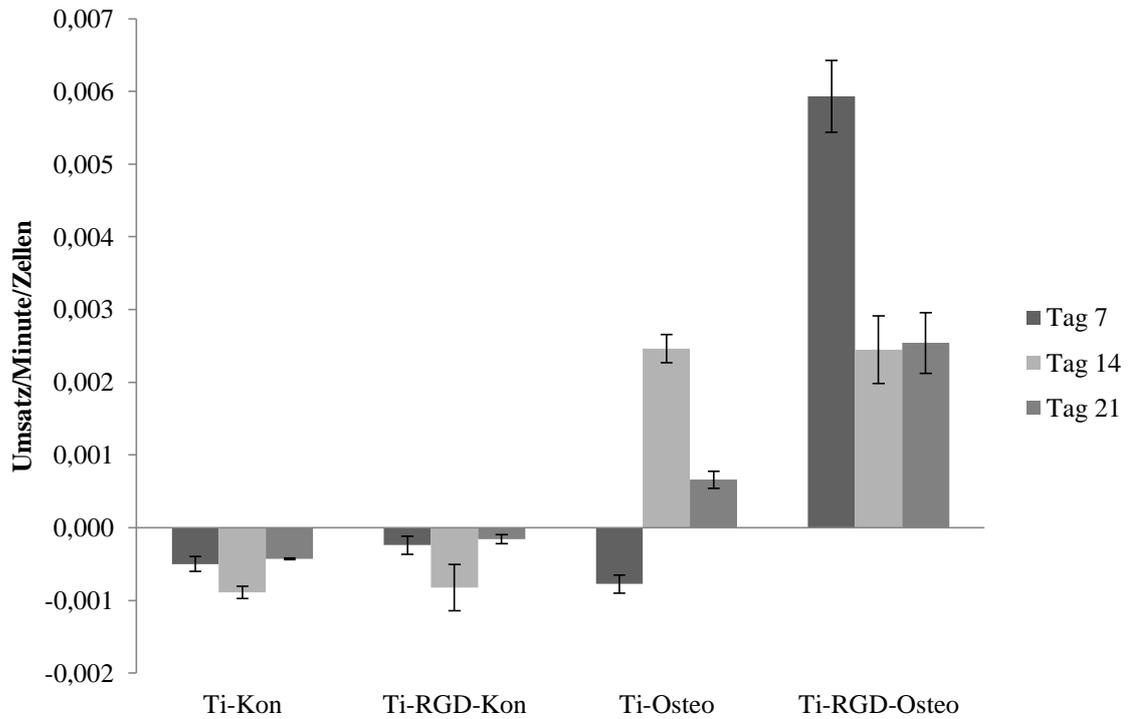


Abbildung 52: Ergebnisse des ALP-Aktivitätsassays mit Kontrollzellen (RGD Con **110a/b**, Blank Con **91**) und osteogen differenzierten Zellen (RGD Osteo **110a/b**, Blank Osteo **91**).⁹³

Bei der Calcium-Quantifizierung konnte lediglich auf den Proben mit osteogen differenzierten Zellen ein leichter Anstieg festgestellt werden. Bei den RGD-Titanplatten **110a/b** stieg die Calciumeinlagerung stetig an den Messtagen an und blieb auf einem Wert der etwas höher lag, als bei den Kontrollen und unmodifizierten Titanplatten **91**.

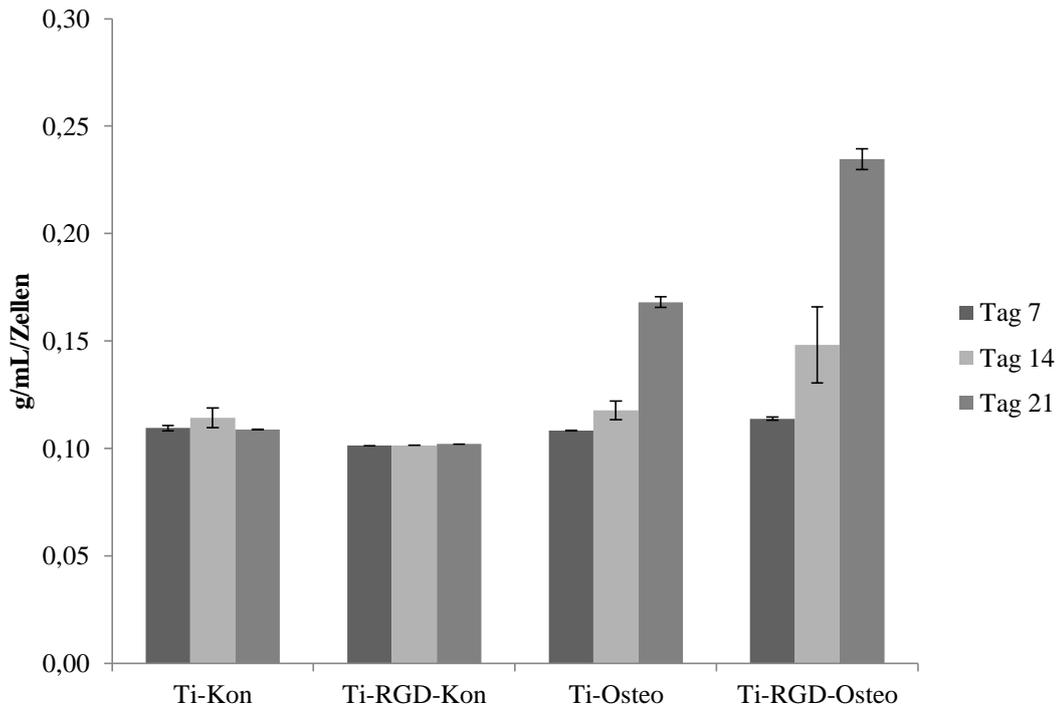


Abbildung 53: Ergebnisse der Calcium-Quantifizierung mit Kontrollzellen (RGD Con **110a/b**, Blank Con **91**) und osteogen differenzierten Zellen (RGD Osteo **110a/b**, Blank Osteo **91**).⁹³

Durch die verschiedenen Untersuchungen der RGD-beschichteten Titanplatten **110a/b** konnte gezeigt werden, dass eine Osseointegration durch das Material begünstigt wird, und sich eine höhere Zellzahl auf dem Material ansiedelte. Dadurch wurden zum Teil die Ergebnisse aus den Versuchen mit humanen Osteoblasten und humanen Gingivafibroblasten widerlegt. Eine Biokompatibilität des Materials wurde hierdurch bestätigt.

Anschließend sollte evaluiert werden, ob sich die Adhäsion verbessern lässt und eine höhere Anzahl an Zellen adhären gemacht werden kann. Dies sollte mittels der modifizierten Titanplatten **109a/b** untersucht werden. Durch die Verwendung von einem Polyethylenglykol-Linker **100** wurde der Abstand des Adhäsionsfaktors cRGDfK **47** zur Titanoberfläche vergrößert. Die exponierte Lage des cRGDfK **47** könnte somit zu einer besseren Verfügbarkeit für die Integrine an der Zelloberfläche führen. Zu diesem Zweck wurden Fibroblasten und Osteoblasten auf der Titanoberfläche kultiviert.

Nach einer Kultivierung von Fibroblasten auf der unmodifizierten **91** und modifizierten Titanoberfläche **109a/b** zeichnet sich nach 96 h ein Trend ab. Im Vergleich zur Kontrolle (Glas) (75.000 Zellen) wachsen ähnlich viele Zellen auf der unmodifizierten

Titanoberfläche **91** (73.000 Zellen). Besser verhält sich die modifizierte Titanoberfläche **109a/b** (96.667 Zellen) (Abbildung 53).⁹⁴

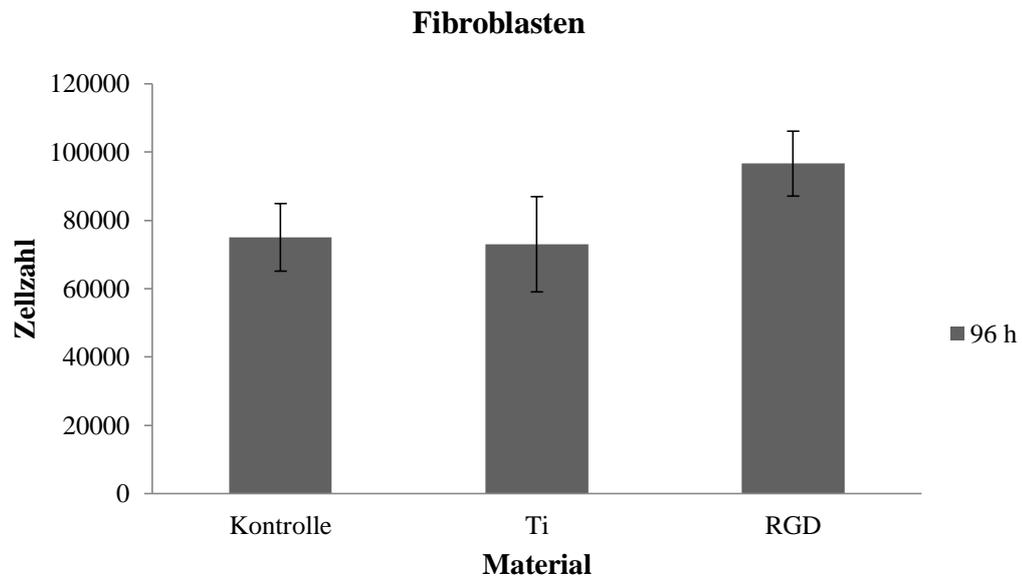


Abbildung 54: Ergebnisse der Zellzahl 96 h nach Aussaat (jeweils 18250 Zellen) von Fibroblasten auf Kontrolle, Titan **91** und mit RGD-beschichteten Titan **109a/b**.⁹⁴

Bei der Betrachtung der Zeit, in der sich die Zellzahl verdoppelt war der gleiche Effekt zu beobachten. Auch hier schnitt die modifizierte Titanoberfläche **109a/b** mit 40 h im Vergleich zur Kontrolle (48 h) und der unmodifizierten Titanoberfläche **91** (49 h) besser ab (Abbildung 55).⁹⁴

⁹⁴ S. Schlie-Wolter, Laserzentrum Hannover e. G., biologische Evaluation der Titanplatten.

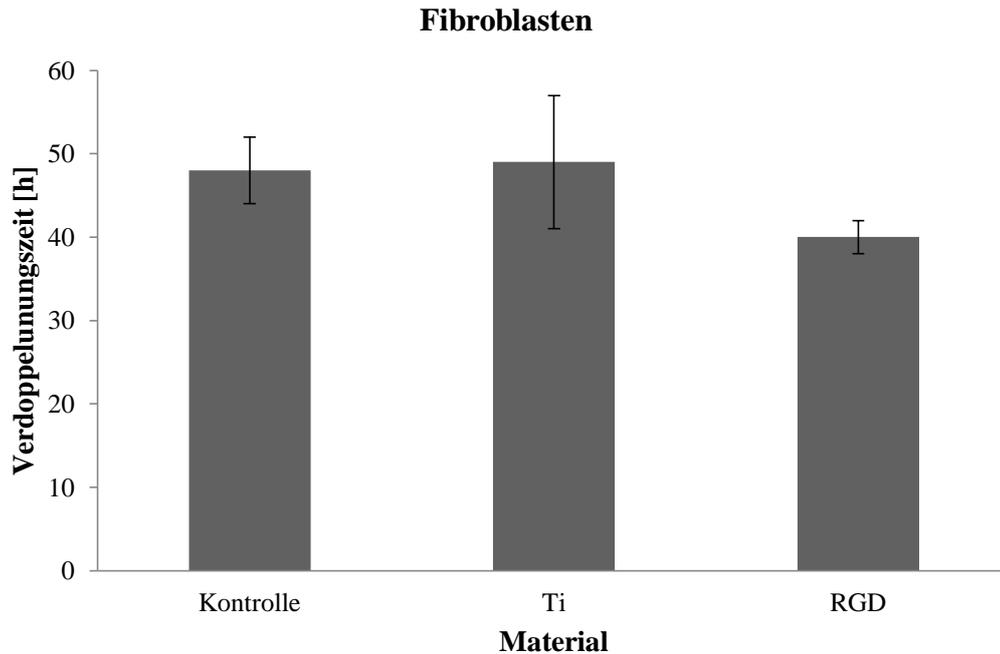


Abbildung 55: Verdoppelungszeit von Fibroblasten auf Kontrolle, unmodifizierter Titanoberfläche **91** und modifizierten Titanoberfläche **109a/b**.⁹⁴

Um zu kontrollieren in wie fern sich das neue Material **109a/b** auf die Integration in Gewebe auswirkt, sollten sowohl Fibroblasten, als auch osteogen differenzierte hASCs auf den Oberflächen kultiviert werden.

Um die Morphologie der Zellen ersichtlich zu machen wurden die Aktinfilamente der Zellen rot eingefärbt. Die Aktinfilamente bestehen aus dem Protein Aktin und bilden zusammen mit den Mikrotubuli und Intermediärfilamenten das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen.⁹⁵ Bei der Anfärbung mit Phalloidin Atto 488 wird ersichtlich, ob die Zellen isoliert vorliegen oder adhärent sind und Ausläufer zu anderen Zellen ausbilden.

Im Falle der Fibroblasten lagen bei Anfärbung auf der Kontrolle (Glas) Anhäufungen von Zellen vor. Auf der unmodifizierten Titanoberfläche **91** lag ein ähnliches Bild vor, wobei die Fibroblasten in geringerer Zahl Anhäufungen bildeten. Bei den modifizierten Titanplatten **109a/b** ist ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen zu erkennen. Die Fibroblasten lagen in höherer Anzahl vor und bildeten Ausläufer zu anderen Zellen (Abbildung 56). Dies spricht für ein Anwachsen der Zellen auf der modifizierten Oberfläche **109a/b**.⁹⁴

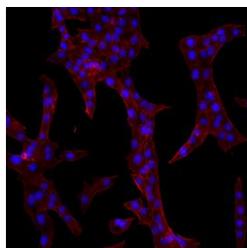
⁹⁵ K.C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, W. Kabsch *Nature* **1990**, 347, 21-22.

Die Kontrollgruppe der hASCs zeigt ein vergleichbares Verhalten. Während sich auf Glas durchaus Adhärenz erkennen lässt, liegen die Zellen auf Titan **91** sehr gestreckt vor. Lediglich auf den modifizierten Oberflächen **109a/b** bildet sich vermehrt eine Vernetzung der Zellen aus (Abbildung 56).⁹⁴

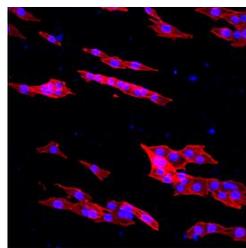
Die osteogen differenzierten hASCs verhalten sich ebenso wie die nicht differenzierten hASCs und bilden auf den modifizierten Oberflächen **109a/b** eine stärkere Vernetzung aus. Auf Titan **91** und auf Glas lagen die Zellen schmal und langgestreckt vor (Abbildung 56).

Zusammengefasst führt die Modifizierung mit cRGDfK **47** zu einer verbesserten Adhäsion und Vernetzung der Zellen unabhängig vom Zelltyp.

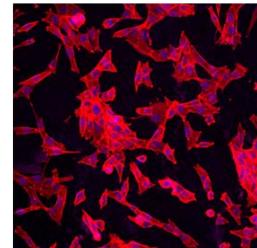
Fibroblasten



Glas

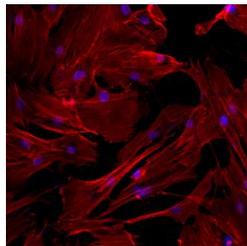


Titan glatt

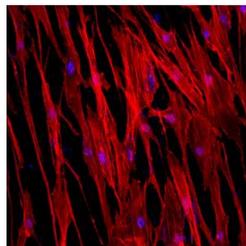


Titan glatt - RGD

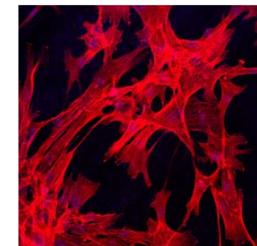
Humane ASCs: Kontrolle



Glas

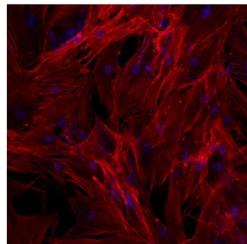


Titan glatt

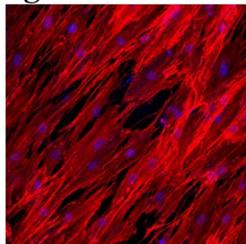


Titan glatt - RGD

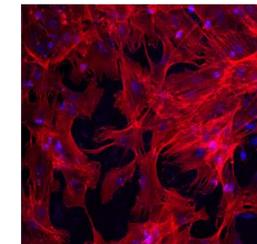
Humane ASCs: Osteogen differenziert



Glas



Titan glatt



Titan glatt - RGD

Abbildung 56: Morphologie von Fibroblasten (oben), nicht differenzierten hASCs (mitte), osteogen differenzierte hASCs (unten) auf Glas, Titan **91** und modifiziertem Titan **109a/b** nach 48 h, Aktinfilamente angefärbt mit Phalloidin (rot).⁹⁴

Der Nachweis der tatsächlichen Anbindung der Zellen an die Oberfläche sollte über eine Anfärbung der Integrine nach 48 h erfolgen. Die Untereinheiten α_5 -Integrin (grün) und β_1 -Integrin (rot) wurden unterschiedlich mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Darüber hinaus sollte das Enzym pFAK Tyr³⁹⁷ nachgewiesen werden. Dieses Enzym liegt lediglich dann exprimiert vor, wenn die Integrine an die extrazelluläre Matrix binden, die in diesem Fall durch das cRGDfK **47** simuliert werden sollte. Die Anfärbung sollte auch hier durch spezifische Antikörper erfolgen.

Da die modifizierten Titanplatten **109a/b** eine charakteristische grüne Eigenfluoreszenz aufweisen, ist für alle Zellen nur unter Vorbehalt ein Vergleich zu den anderen Materialien und der Adhäsion möglich. Die Fluoreszenz lässt sich möglicherweise auf die Bindung des cRGDfK **47** an die Oberfläche erklären. Die Reaktion verläuft unter Bildung eines Triazols, welches möglicherweise für die grüne Fluoreszenz verantwortlich ist (siehe Kapitel 5.4).⁹⁴

Die Integrine der Fibroblasten lassen sich sowohl auf Glas, als auch auf Titan **91** nachweisen. Es ist deutlich zu erkennen, dass Zellhaufen vorliegen und die Integrine unterschiedlich über die Zelle verteilt sind. Auf dem modifizierten Titan **109a/b** liegt die α_5 -Untereinheit über die gesamte Zelle verteilt vor. Dies bedeutet, dass die Zelle viele Adhäsionspunkte auf der Oberfläche hat. Dennoch lässt sich die β_1 -Untereinheit nur zu einem geringen Maße nachweisen und hebt sich nicht deutlich von der Eigenfluoreszenz des Materials ab.

Die Anfärbung der Integrine der nicht differenzierten hASCs unterscheidet sich deutlich von den Fibroblasten. Auf Glas ist vor allem die β_1 -Untereinheit stark angefärbt worden, während auf Titan **91** die α_5 -Untereinheit vermehrt über die gesamte Zelle angefärbt wurde. Auf Glas liegen die Integrine sehr konzentriert um den Zellkern herum vor. Auf Titan **91** verteilen sich die Integrine über die gesamte Zelle. Auf dem modifizierten Titan **109a/b** ist deutlich eine Anfärbung von beiden Untereinheiten ersichtlich, die sich von der Eigenfluoreszenz des Materials abhebt. Die Integrine sind hier über die komplette Zelle und die Vernetzung zwischen den Zellen verteilt.⁹⁴

Bei den osteogen differenzierten hASCs zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Verteilung auf Glas und Titan **91** verhält sich unterschiedlich. Auf dem modifizierten Titan **109a/b** ist erneut eine Verteilung der Integrine über das gesamte Zellnetzwerk ersichtlich.⁹⁴

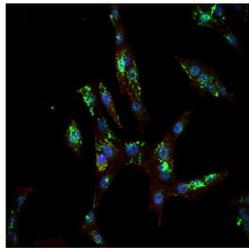
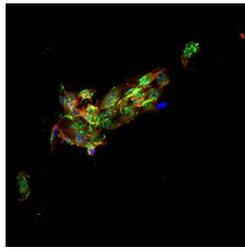
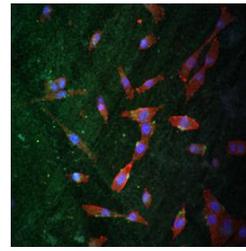
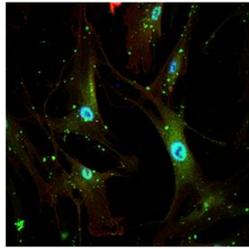
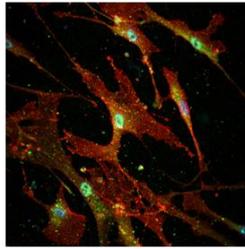
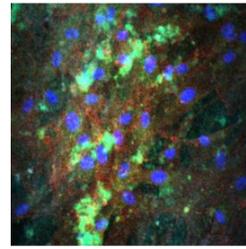
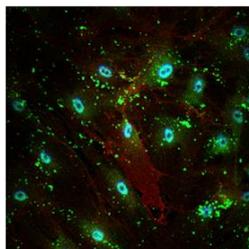
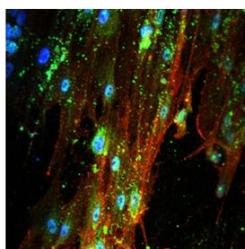
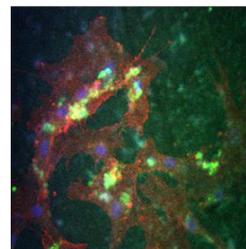
Fibroblasten**Glas****Titan glatt****Titan glatt - RGD****Humane ASCs: Kontrolle****Glas****Titan glatt****Titan glatt - RGD****Humane ASCs: Osteogen differenziert****Glas****Titan glatt****Titan glatt - RGD**

Abbildung 57: Adhäsion von Fibroblasten (oben), nicht differenzierten hASCs (mitte), osteogen differenzierte hASCs (unten) auf Glas, Titan **91** und modifiziertem Titan **109a/b** nach 48 h; Integrinuntereinheit α_5 (grün) und β_1 (rot) angefärbt durch spezifische Antikörper.⁹⁴

Bei der Anfärbung von pFAK Tyr³⁹⁷ konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden. In diesem Fall störte die Eigenfluoreszenz der modifizierten Titanplatte **109a/b** die Auswertung der Anfärbung.

Auf Glas und Titan **91** ist eine vergleichbare Verteilung von pFAK Tyr³⁹⁷ sichtbar. Auf dem modifizierten Titan **109a/b** hebt sich die Anfärbung nicht eindeutig ab.

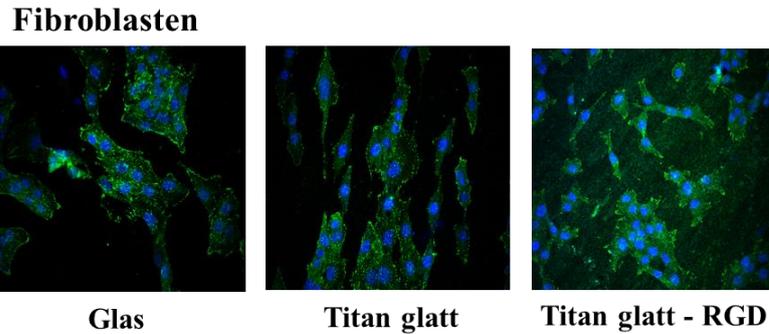


Abbildung 58: Adhäsion von Fibroblasten auf Glas, Titan **91** und modifiziertem Titan **109a/b** nach 48 h; pFAK Tyr³⁹⁷ (grün) angefärbt durch spezifische Antikörper.⁹⁴

Auf den strukturierten modifizierten Titanplatten **109a/b** sollte, wie schon zuvor für die polierten Titanplatten, die osteogene Differenzierung von hASCs untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Titanplatten mit einem Durchmesser von 6 mm verwendet, da hier der Strukturierungsprozess schneller abgeschlossen werden konnte. Auf den Proben wurden jeweils 40.000 Zellen ausgesät. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde die Zellzahl mittels LDH-Assay bestimmt. Wie schon zuvor, wurden an diesen Tagen die ALP-Aktivität, die Collagen-Produktion und die Einlagerung von Calcium untersucht. Als Kontrolle dienten eine Zellkulturplastik (Kon) und strukturierte Titanplatten (Lotus). Als Abgleich wurden auf allen Proben sowohl undifferenzierte, als auch osteogen differenzierte hASCs kultiviert.

Nach bereits 7 d zeigte sich, dass auf den modifizierten und strukturierten Titanplatten **109a/b** im Vergleich zur Zellkulturplastik (30.418 Zellen) und den strukturierten Titanplatten (23.781 Zellen) weniger osteogen differenzierte Zellen (12.728 Zellen) anwachsen. Obwohl sich die Zellen (17.838 Zellen – 14 d; 17.442 Zellen – 21d) vermehren liegen die Zellzahlen auch nach 14 und 21 d weit hinter der Zellkulturplastik (58.057 Zellen – 14d; 47.623 Zellen – 21d) und den strukturierten Titanplatten (50.629 Zellen – 14d; 41.269 Zellen – 21d). Diese Tendenz wurde durch die Untersuchung der Proben mit undifferenzierten hASCs bestätigt, auch hier wachsen die wenigsten Zellen auf den strukturierten Titanplatten **109a/b** an.⁹⁴

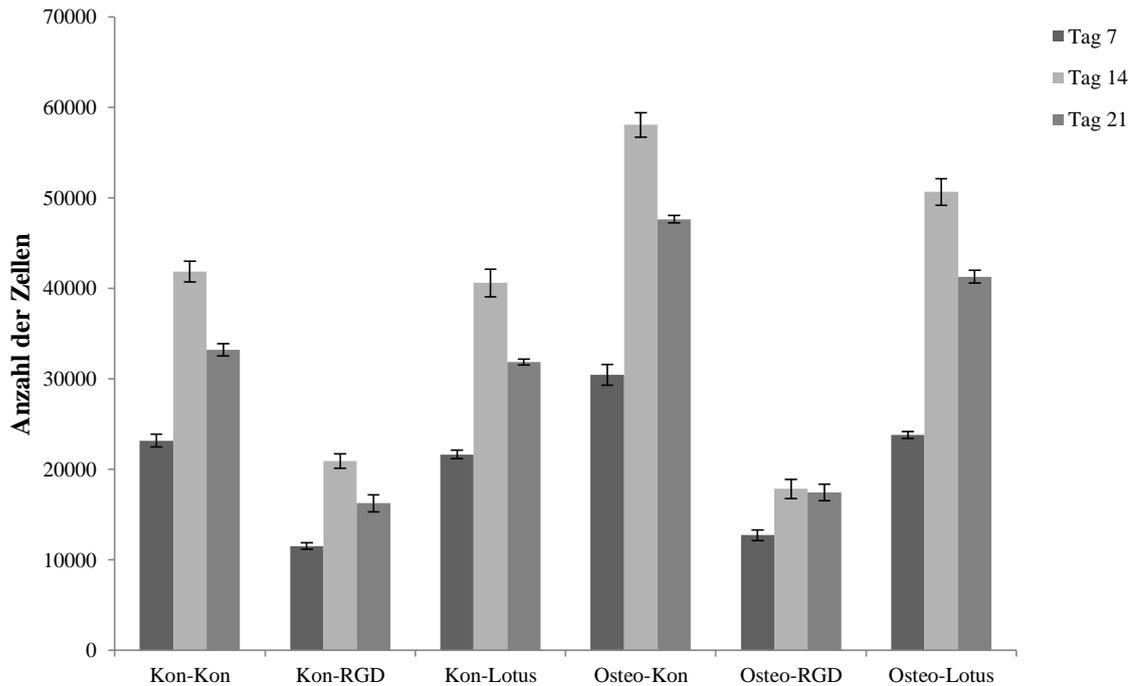


Abbildung 59: Ergebnisse des LDH-Assays zur Bestimmung der Zellzahl mit Kontrollzellen (Kon-Kon **91**, Kon-RGD **109a/b**, Kon-Lotus **91**) und osteogen differenzierten Zellen (Osteo-Kon **91**, Osteo-RGD **109a/b**, Osteo-Lotus **91**).⁹⁴

Im Gegensatz zu den polierten Titanplatten **109a/b**, konnte bei den strukturierten Titanplatten **109a/b** keine erhöhte ALP-Aktivität beobachtet werden. Obwohl diese bis nach 21 d ansteigt, lag die ALP-Aktivität der unmodifizierten strukturierten Titanplatten konsequent bei höheren Werten. Die Kontrollgruppe zeigte, wie zu erwarten war, keine oder geringe ALP-Aktivität (Abbildung 60).

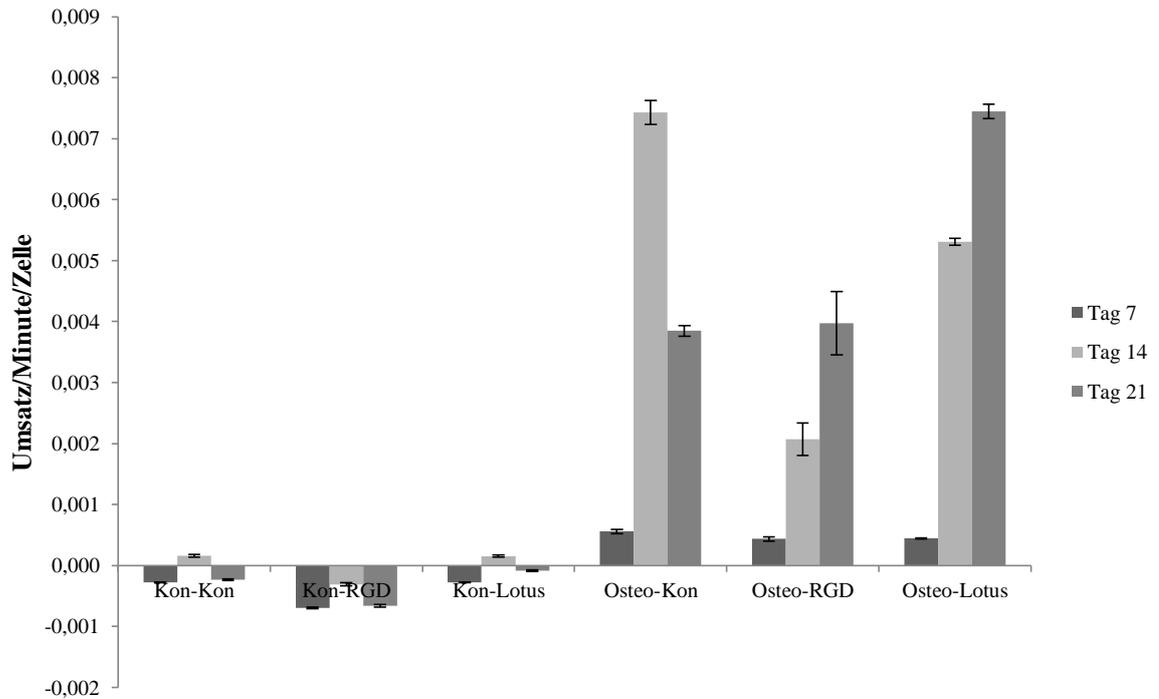


Abbildung 60: Ergebnisse des ALP-Aktivitätsassays mit Kontrollzellen (Kon-Kon **91**, Kon-RGD **109a/b**, Kon-Lotus **91**) und osteogen differenzierten Zellen (Osteo-Kon **91**, Osteo-RGD **109a/b**, Osteo-Lotus **91**).⁹⁴

Die Collagen-Quantifizierung führte bei allen Proben zu ähnlichen Ergebnissen. Die größten Mengen an Collagen konnten jeweils am ersten Messtag nachgewiesen werden. Nach weiteren 7 d konnte im Vergleich dazu weniger Collagen quantifiziert werden. Anschließend nach 21 d zeigte sich wieder eine erhöhte Menge. Dabei sind die Werte von der RGD-Titanplatte **109a/b** vergleichbar mit denen der strukturierten Titanplatte. Diese Werte lagen jeweils über denen Kontrollproben mit nicht differenzierten hASCs und der Zellkulturplastik mit osteogen differenzierten hASCs.

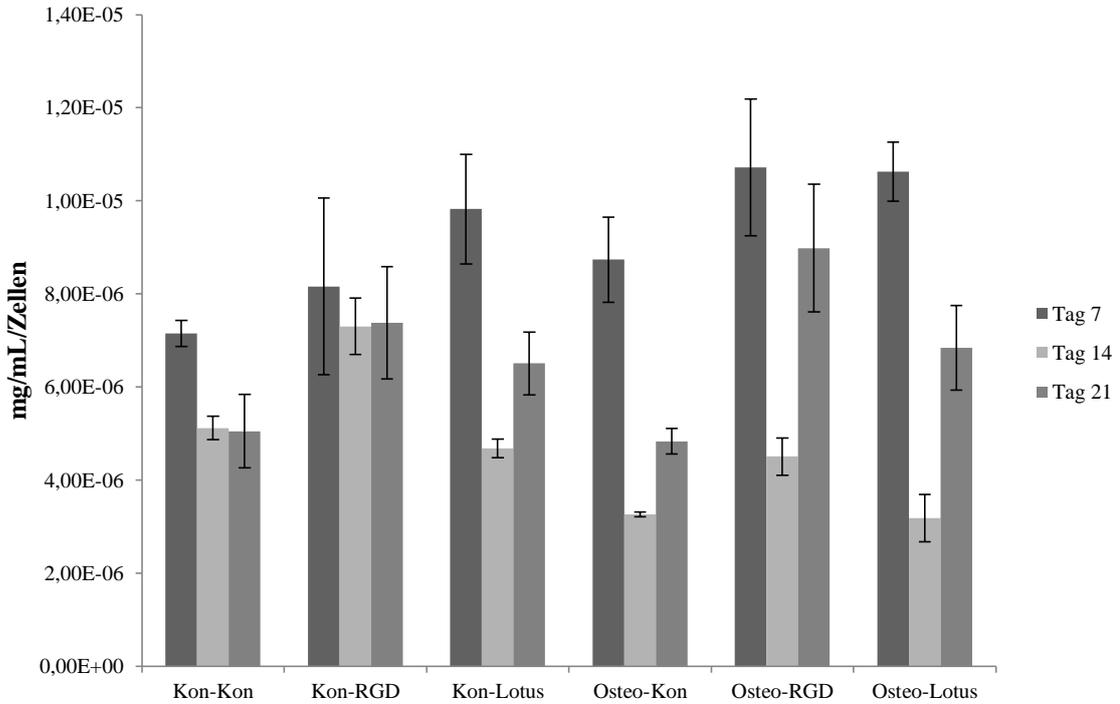


Abbildung 61: Ergebnisse der Collagen-Quantifizierung mit Kontrollzellen (Kon-Kon **91**, Kon-RGD **109a/b**, Kon-Lotus **91**) und osteogen differenzierten Zellen (Osteo-Kon **91**, Osteo-RGD **109a/b**, Osteo-Lotus **91**).⁹⁴

Auch die Calcium-Quantifizierung zeigte keinen signifikanten Effekt der RGD-Titanplatten **109a/b**. Nach 7 d und nach 14 d blieb die Calcium-Einlagerung in den Zellen auf nahezu ähnlichen Werten bei allen Proben. Dies änderte sich nach 21 d. Auf den Platten mit den osteogen differenzierten hASCs nahm die Calcium-Einlagerung zu. Jedoch konnte auch hier die strukturierte RGD-Titanplatte **109a/b** nicht an die Werte der strukturierten Titanplatte heranreichen. Dennoch deckten sich diese Ergebnisse mit denen der ALP-Aktivität, da diese auch er nach 21 d anstieg.

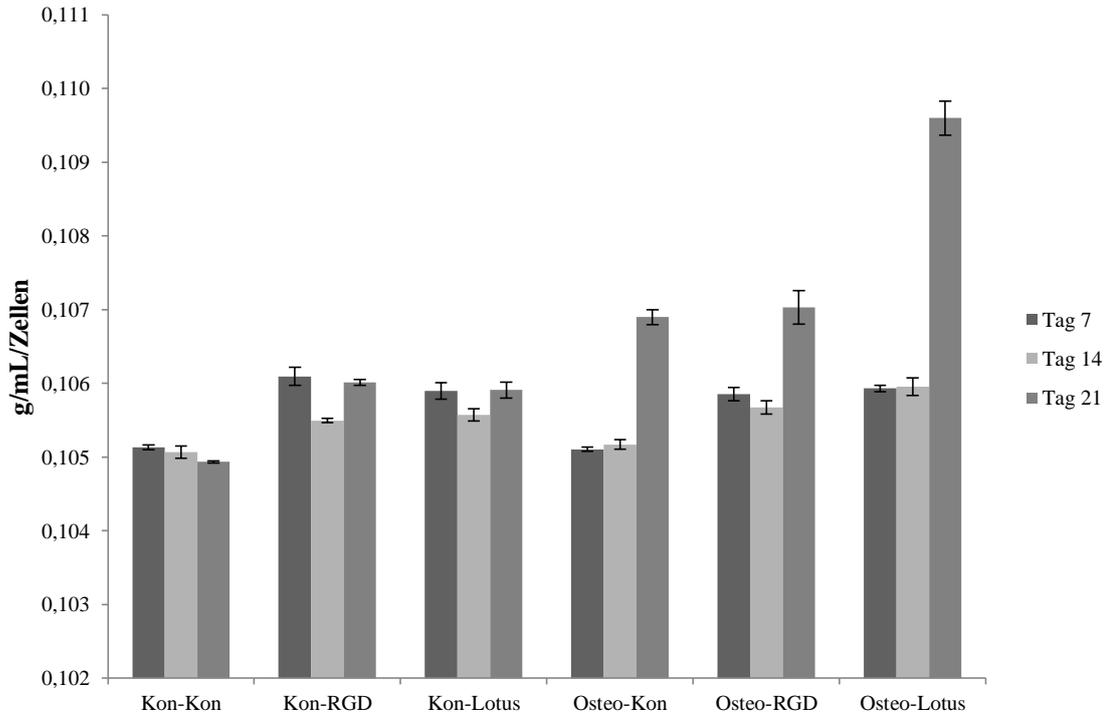


Abbildung 62: Ergebnisse der Calcium-Quantifizierung mit Kontrollzellen (Kon-Kon **91**, Kon-RGD **109a/b**, Kon-Lotus **91**) und osteogen differenzierten Zellen (Osteo-Kon **91**, Osteo-RGD **109a/b**, Osteo-Lotus **91**).⁹⁴

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein positiver Effekt der strukturierten und modifizierten Titanplatten **109a/b** hinsichtlich der biologischen Aktivität gegenüber osteogen differenzierten hASCs nachgewiesen werden. Die Ursache kann hierbei in der Oberflächentopographie gefunden werden. Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Struktur der Oberfläche nicht ausreichend RGD für die Zellen zur Verfügung stand. Andererseits ist es möglich, dass bei der Modifizierung ein Fehler unterlaufen ist. Zu diesem Zweck werden zu einem späteren Zeitpunkt erneute Untersuchungen stattfinden.

Schließlich wurden die Materialien untereinander verglichen und eine statistische Auswertung durch einen zweiseitigen unabhängigen Student t Test durchgeführt. Es wurden folgende Signifikanzniveaus verwendet: $p < 0.05$ (ein Zeichen); $p < 0.01$ (zwei Zeichen); $p < 0.001$ (drei Zeichen). Die Kontrolle wurde mit allen Materialien verglichen (#). Der Einfluss von RGD (+) wurde zwischen den glatten Titanplatten **91** und den glatten modifizierten Titanplatten **110a/b**, sowie den strukturierten Titanplatten **91** und den strukturierten modifizierten Titanplatten **109a/b** bestimmt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Lotus-Struktur (*) ermittelt. Die Berechnungen erfolgten jeweils zu den Messzeitpunkten und die undifferenzierten hASCs wurden unabhängig von den

differenzierten hASCs berechnet. Da die Werte der ALP-Produktion und der Calcium-Quantifizierung bei der Kontrollgruppe nicht ausschlaggebend für die Bewertung der (osteogenen) Differenzierung der Zellen waren, wurde an dieser Stelle keine statistische Auswertung durchgeführt.

Im direkten Vergleich zeigte sich, dass bei den nicht differenzierten Zellen, die Titanplatten mit RGD **110a/b** einen ebenso stetigen Anstieg der Zelldichte aufweisen, wie die Titanplatten **91**. Ähnlich verhielten sich die strukturierten Titanplatten **91**. Lediglich nach 21 Tagen ging die Zelldichte bei letzterem zurück. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Größe der Titanplatte nicht ausreichend war, da hier lediglich Titanplatten mit 6 mm anstatt 10 mm Durchmesser verwendet wurden. Am geringsten war die Zelldichte bei den strukturierten Titanplatten mit RGD **109a/b** (Abbildung 63). Wie schon zuvor erwähnt, besteht die Möglichkeit, dass die Funktionalisierung nicht erfolgreich war, oder dass das RGD zu schlecht zugänglich für die Zellen war.

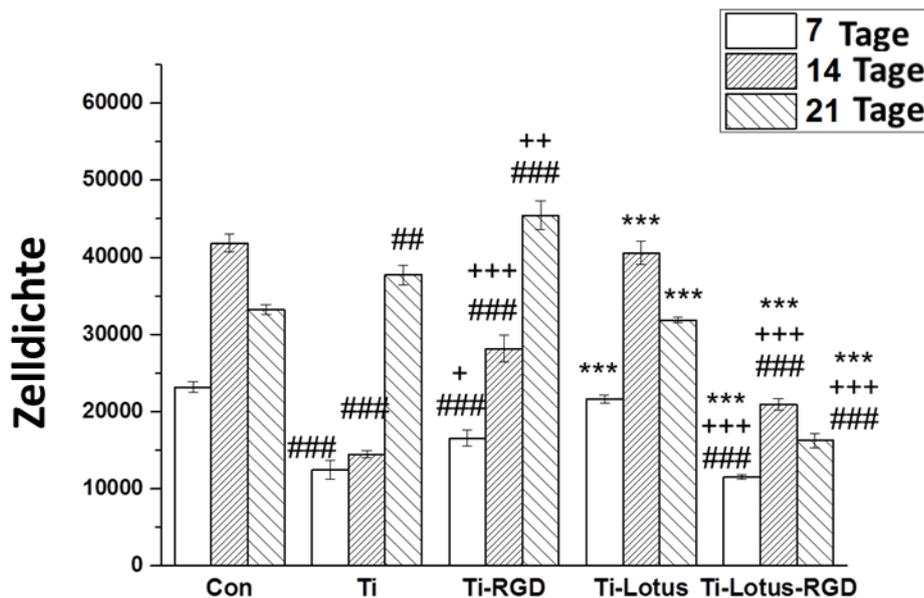


Abbildung 63: Vergleich der Zelldichte von nicht differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

Der Vergleich von osteogen differenzierten hASCs auf den verschiedenen Materialien führte zu einer ähnlichen Zelldichte, wie die Besiedlung mit nicht differenzierten hASCs. Auch hier war generell ein stetiger Anstieg der Zelldichte zu verzeichnen. Es war ebenfalls ein leichter Rückgang der Zelldichte auf den strukturierten Titanplatten **91** zu beobachten. Bei den strukturierten modifizierten Titanplatten **109a/b** wurde auch hier die geringste Zelldichte verzeichnet mit einem vergleichsweise geringen Anstieg über die gesamte Messzeit (Abbildung 63).

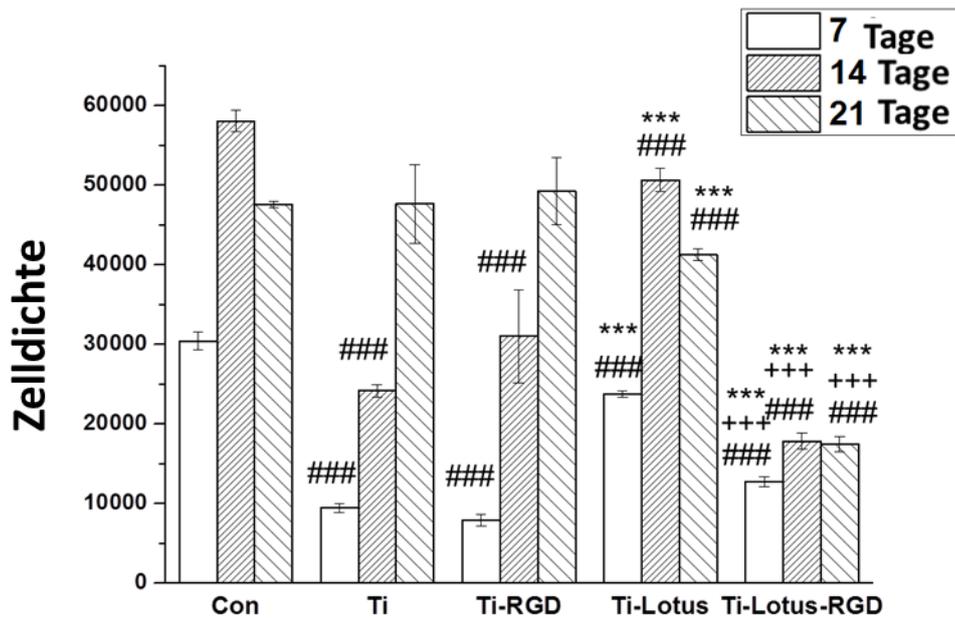


Abbildung 64: Vergleich der Zelldichte von osteogen differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

Wie zu erwarten, konnte mit den Kontrollzellen (nicht differenzierte hASCs) keine nennenswerte ALP-Aktivität festgestellt werden. Da ALP ein Marker für den Mineralisierungsprozess bei osteogener Differenzierung ist, war davon auszugehen das nicht differenzierte Zellen diesen Prozess nicht eingehen (Abbildung 64).

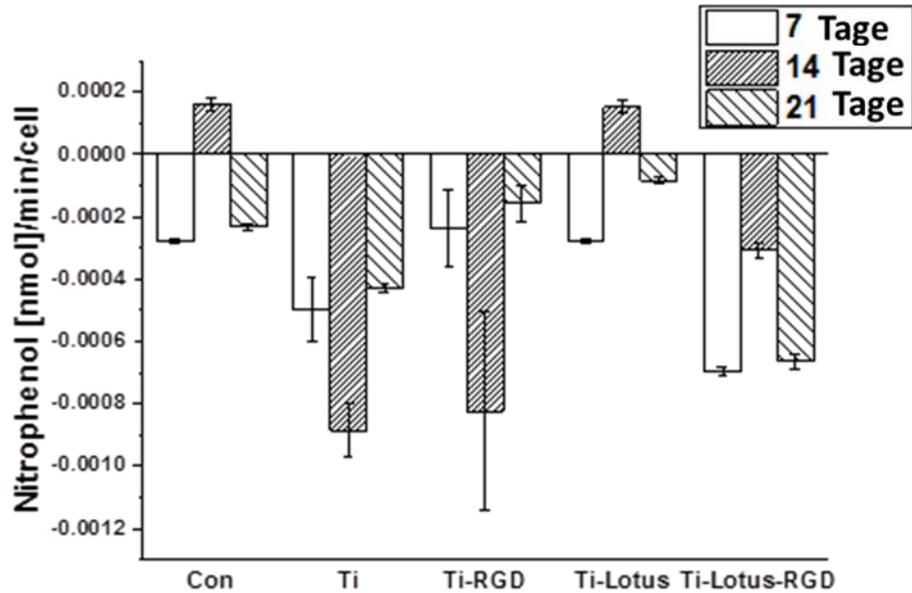


Abbildung 65: Vergleich des ALP-Aktivitätsassays von nicht differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

Auf fast allen Materialien begann die ALP-Aktivität an Tag 14, lediglich auf RGD-modifizierten Titanplatten **110a/b** begann die Aktivität von ALP bereits nach 7 Tagen und ging anschließend zurück. Dies legt die Vermutung nahe das eine Modifizierung mit RGD zu einer schnelleren Integration in Knochengewebe führen kann. Dieser Effekt konnte, wie schon zuvor auf den strukturierten und RGD-modifizierten Titanplatten **109a/b** nicht beobachtet werden. Die ALP-Aktivität lag zwar über der von polierten Titanplatten **91**, blieb aber, trotz Anstieg bis Tag 21, auf einem niedrigeren Level, als die strukturierten Titanplatten **91** und die RGD-modifizierten Titanplatten **110a/b** (Abbildung 66).

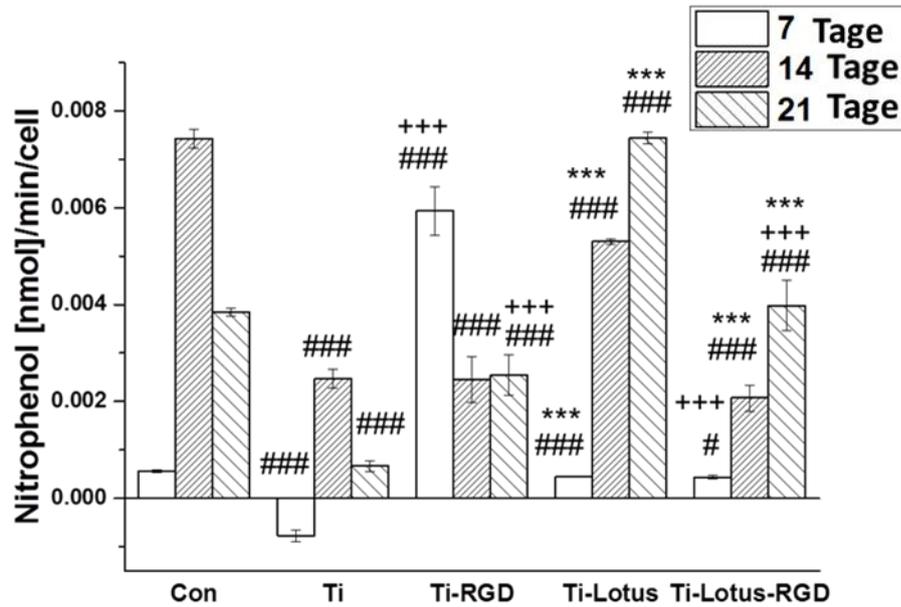


Abbildung 66: Vergleich des ALP-Aktivitätsassays von osteogen differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

In der Kontrollgruppe mit nicht differenzierten hASCs konnten auf allen Materialien vergleichbare Mengen an Calcium nachgewiesen werden. Ohne osteogene Differenzierung sollte es hier zu keiner erhöhten Calciumeinlagerung in den Zellen kommen. Die erhaltenen Daten entsprechen somit den Erwartungen (Abbildung 67).

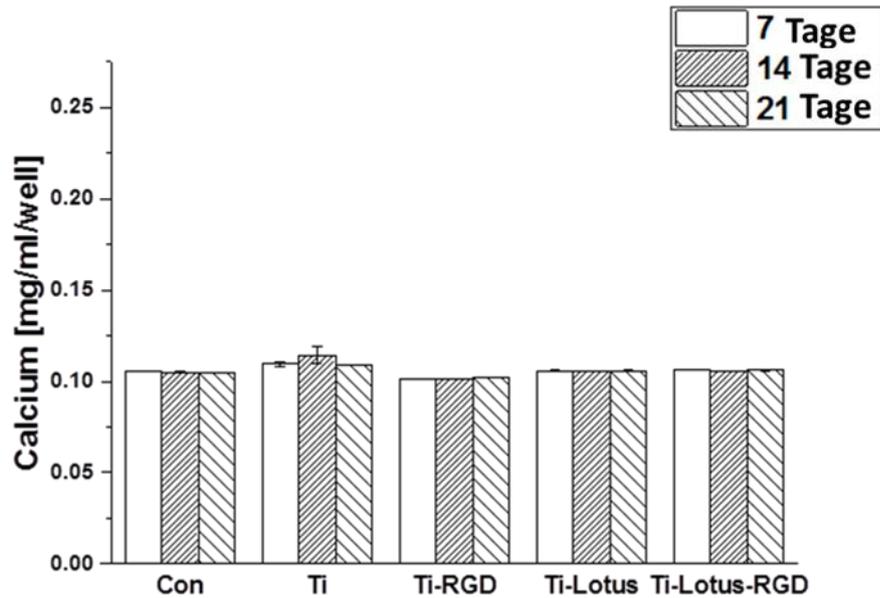


Abbildung 67: Vergleich der Calcium-Quantifizierung von nicht differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

Der Vergleich der Materialien nach der Besiedelung mit osteogen differenzierten hASCs zeigte Unterschiede in der Calciumeinlagerung der Zellen. Lediglich auf Titan **91** und RGD-modifiziertem Titan **110a/b** konnte ab Tag 14 ein leicht erhöhter Wert ermittelt werden. Dieser steigerte sich an Tag 21. Bei den strukturierten Titanplatten **91** und **109a/b** tritt dieser Effekt erst verspätet an Tag 21, mit einer sehr kleinen Steigerung in der Calciumeinlagerung, auf. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des der ALP-Aktivität, denn bei osteogen differenzierten Zellen steigert sich nach der erhöhten ALP-Aktivität die Calciumeinlagerung und damit die Integration in den Knochen (Abbildung 68).⁹²

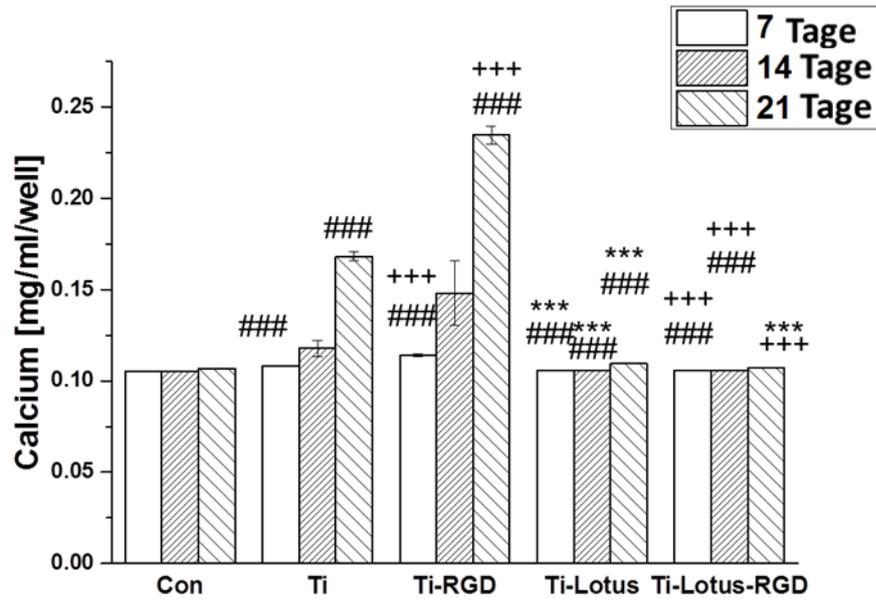


Abbildung 68: Vergleich der Calcium-Quantifizierung von osteogen differenzierten hASCs auf Zellkulturplastik (Con), poliertem Titan **91** (Ti), RGD-modifiziertes Titan **110a/b** (Ti-RGD), strukturiertem Titan **91** (Ti-Lotus) und strukturiertem RGD-modifiziertem Titan (Ti-Lotus-RGD).⁹⁴

5. Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel

5.1 Einleitung

Das Nanomaterial MAGSILICA[®] wurde zunächst für die Industrie zur Verklebung von Bauteilen von EVONIK INDUSTRIES hergestellt. Durch die Beimischung in Klebstoffen konnte durch induktives Heizen eine Haftvermittlung erzeugt werden, bevor der eigentliche Klebstoff für diese sorgt. Zudem konnten Bauteile auch wieder entfernt werden, da sich beim erneuten induktiven Heizen der Klebstoff thermisch löste.⁹⁶

Die Nanopartikel bestehen aus einem Eisenoxid-Kern (Maghemite γ -Fe₂O₃ und Magnetite Fe₃O₄) und einer Silica-Hülle. Diese Hülle soll die Agglomeration der Eisenoxid-Kerne verhindern, und die superparamagnetischen Eigenschaften erhalten (Abbildung 69). Die Größe der Nanopartikel variiert zwischen 10 und 40 nm.^{97,98,99}

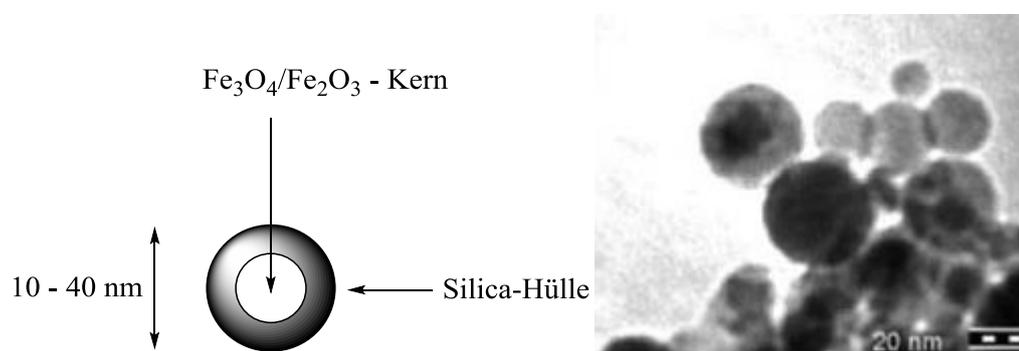


Abbildung 69: Aufbau von MAGSILICA[®] (rechts); TEM-Aufnahme von MAGSILICA[®] (rechts).⁹⁸

Die Substanzklasse der Ansamitocine **111** (Schema 40) sind Naturstoffe, welche bestimmte Krebszelllinien und solide Tumore an ihrem Wachstum hindern können. Schon im subnanomolaren Bereich sind diese Naturstoffe aktiv.¹⁰⁰ Durch die Verhinderung der Polymerisation von Mikrotubuli tritt eine Zellschädigung auf, welche zur Apoptose der Zelle führt.¹⁰¹

⁹⁶ EVONIK INDUSTRIES *Product Story No. 1* **2008**, 1-5.

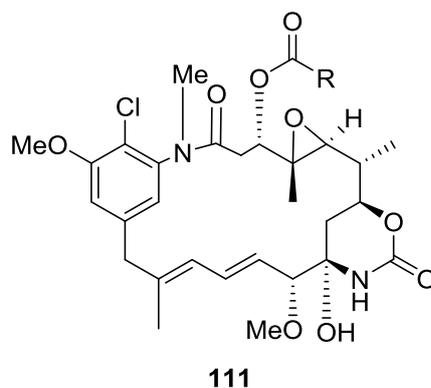
⁹⁷ S. Ceylan, C. Friese, C. Lammel, K. Mazac, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8950-8953.

⁹⁸ S. Ceylan, L. Coutable, J. Wegner, A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1884-1893.

⁹⁹ L. Kupracz, J. Hartwig, A. Kirschning *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 562-570.

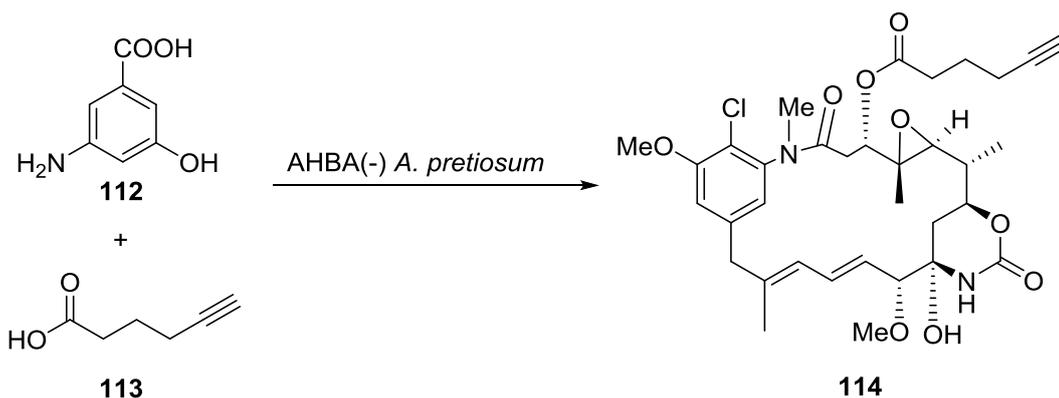
¹⁰⁰ L. Neckers, K. Neckers *Expert Opin. Emerging Drugs* **2005**, *10*, 137-149.

¹⁰¹ M. A. Biamonte, R. van de Water, J. W. Arndt, R. H. Scannevin, R. H. Perret, D. Perret, W.-C. Lee *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3-17.



Schema 40: Grundgerüst der Ansamitocin-Derivate mit veränderter Seitenkette.

Mit einer Blockmutante von *Actinosynnema pretiosum* (HGF073) können Ansamitocine mutasynthetisch durch Fermentation hergestellt werden. Als Bausteine können 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **112** (AHBA)-Derivate und Carbonsäure-Derivate eingesetzt werden, um neue Naturstoffe zu erhalten (Schema 41). Diese enthalten am aromatischen System oder an der Ester-Seitenkette neue funktionelle Gruppen, die die Aktivität nicht bedeutend beeinflussen.¹⁰²

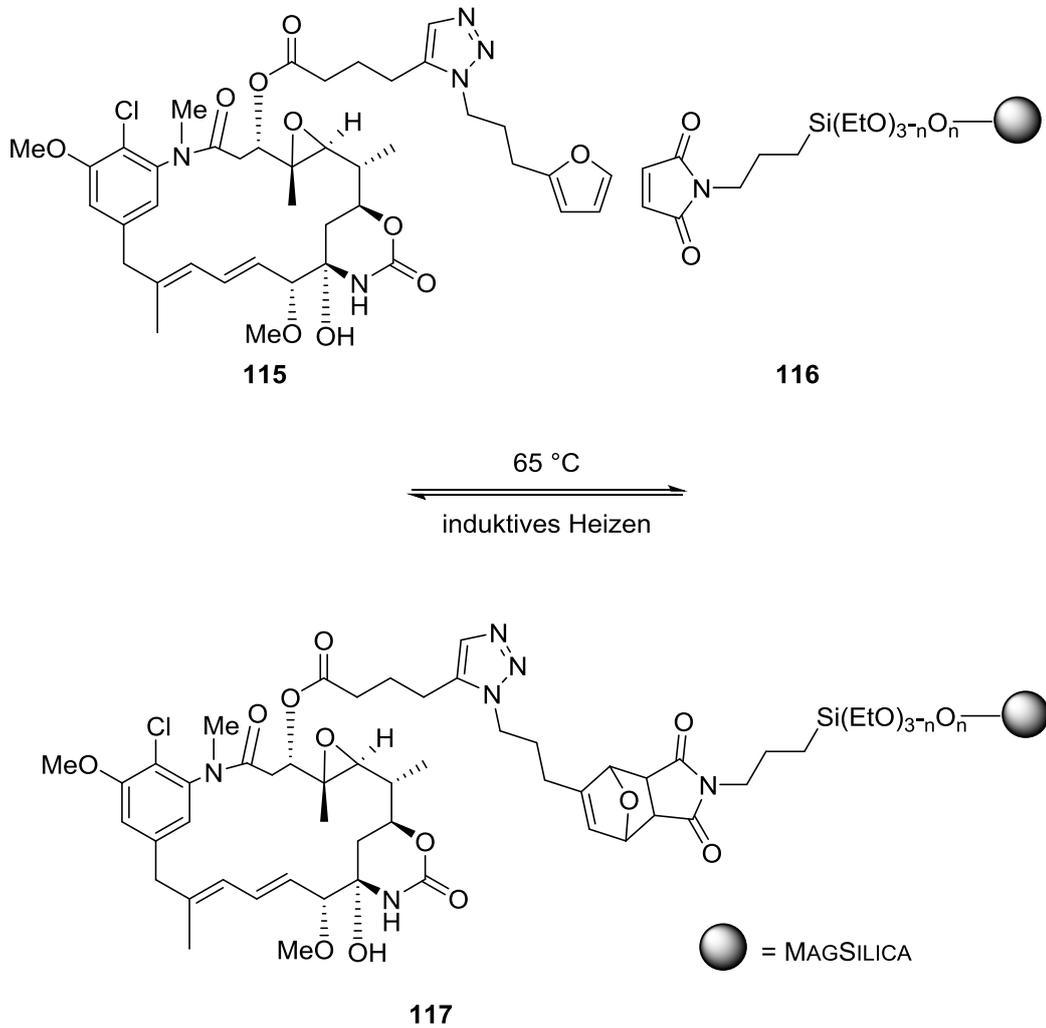


Schema 41: Zugang zu Ansamitocin-Derivaten durch Fermentation mit der Blockmutante AHBA(-) *A. pretiosum*.¹⁰²

Die Kombination von Naturstoffen mit Nanopartikeln zur zielgerichteten Tumorthherapie ist ein relativ neuer Ansatz in der Forschung. MAGSILICA[®] und Ansamitocin können mit einer Maleimid- beziehungsweise einer Furan-Funktion weiter modifiziert werden. Durch eine DIELS-ALDER-Cycloaddition kann das Nanopartikel mit dem Naturstoff beladen

¹⁰² L. Mancuso, T. Knobloch, J. Buchholz, J. Hartwig, L. Möller, K. Seidel, W. Collisi, F. Sasse, A. Kirschning *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17541-17551.

werden und löst sich unter Wärmezufuhr wieder ab (Schema 42). Da MAGSILICA[®] magnetisch dirigierbar und induktiv heizbar ist, ist eine selektive und ortsbegrenzte Anwendung in Gewebe prinzipiell möglich. Das induktive Heizen ermöglicht neben der Wirkstofffreisetzung auch eine Erwärmung der Tumorgewebes, welche die Apoptose ebenfalls begünstigt.¹⁰²

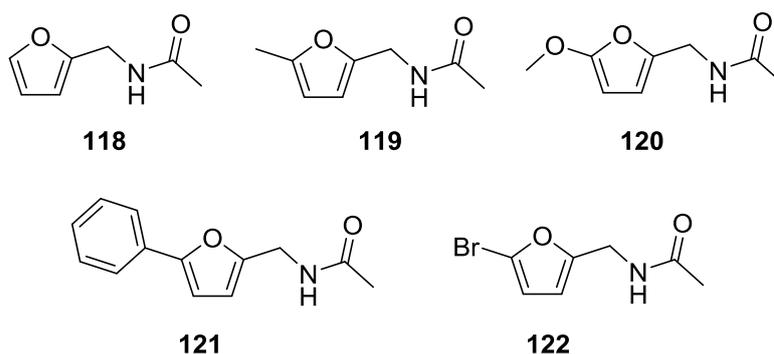


Schema 42 : Funktionalisierung von MAGSILICA[®] **116**, Ansamitocin-Derivat **115** und thermische Freisetzung.

Mittels Synthese verschiedener Furan-Derivate sollte die DIELS-ALDER Cycloaddition dahingehend optimiert werden, dass eine möglichst hohe Beladung der Nanopartikel und eine gute Freisetzung zu erreichen ist. Darüber hinaus sollte eine analytische Methode entwickelt werden, mit der die Beladung von MAGSILICA[®] nach der DIELS-ALDER Cycloaddition und der Retro- DIELS-ALDER Reaktion verfolgt werden kann.

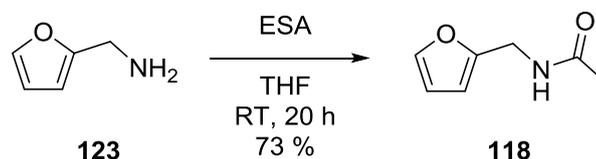
5.2 Synthese von Furanderivaten für die Diels-Alder Reaktion

Die Synthese verschiedener Furanderivate sollte dazu genutzt werden, herauszufinden welche Furanderivate für die DIELS-ALDER Cycloaddition am besten geeignet sind. Dabei sollten Substituenten mit verschiedenen elektronischen Eigenschaften in den Ring eingebracht werden, um die Cycloaddition entsprechend zu beeinflussen. Ausgehend von dem unsubstituierten Furan **118** als Referenz wurden Methyl **119**, Methoxy **120**, Phenyl **121** und Brom-funktionalisiertes Furan **122** als geeignete Derivate angesehen, sie erlauben Untersuchungen der Cycloaddition. Die Position 2 sollte dabei ein Amidgruppe in benzylicher Position tragen, um die mögliche Anbindung an Ansamitocin zu simulieren (Schema 43).



Schema 43: Furan-Derivate für die Untersuchung der DIELS-ALDER Cycloaddition.

Ausgehend von 2-Furfurylamin **123** konnte *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in guten Ausbeuten erhalten werden (Schema 44). Dabei wurde nach ROGER *et al.* vorgegangen.¹⁰³



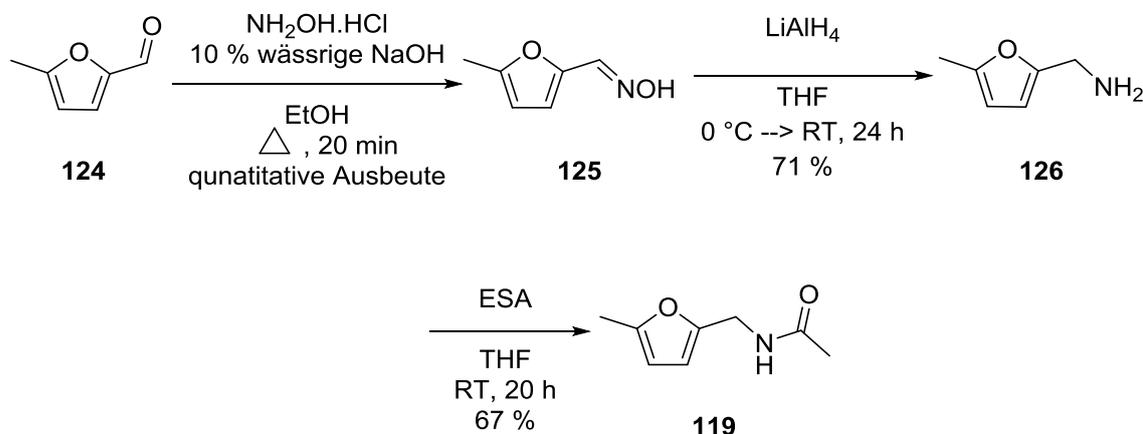
Schema 44: Synthese von *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118**.

Für die Darstellung von *N*-[(5-Methylfuran-2-yl)methyl]acetamid **119** wurde aus 5-Methylfurfural **124** zunächst quantitativ das Oxim **125** nach SHIH *et al.* gebildet.¹⁰⁴ Durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid konnte das korrespondierende Amin **126**

¹⁰³ H- Doucet, J. Roger *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 4412 – 4425.

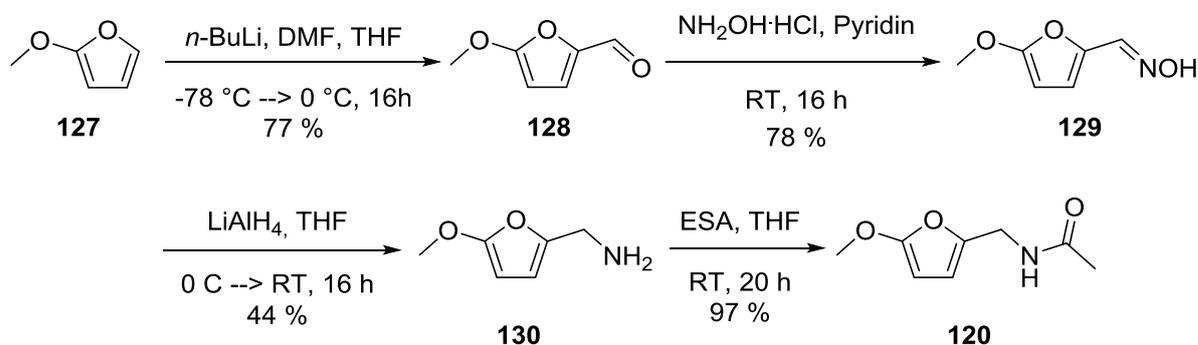
¹⁰⁴ Y.-H. Kuo, K.-S. Shih *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 181-183.

in guten Ausbeuten erhalten werden. Schließlich folgte die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid zum Acetamid **119** (Schema 45).¹⁰³



Schema 45: Synthese von *N*-[(5-Methylfuran-2-yl)methyl]acetamid **119**.

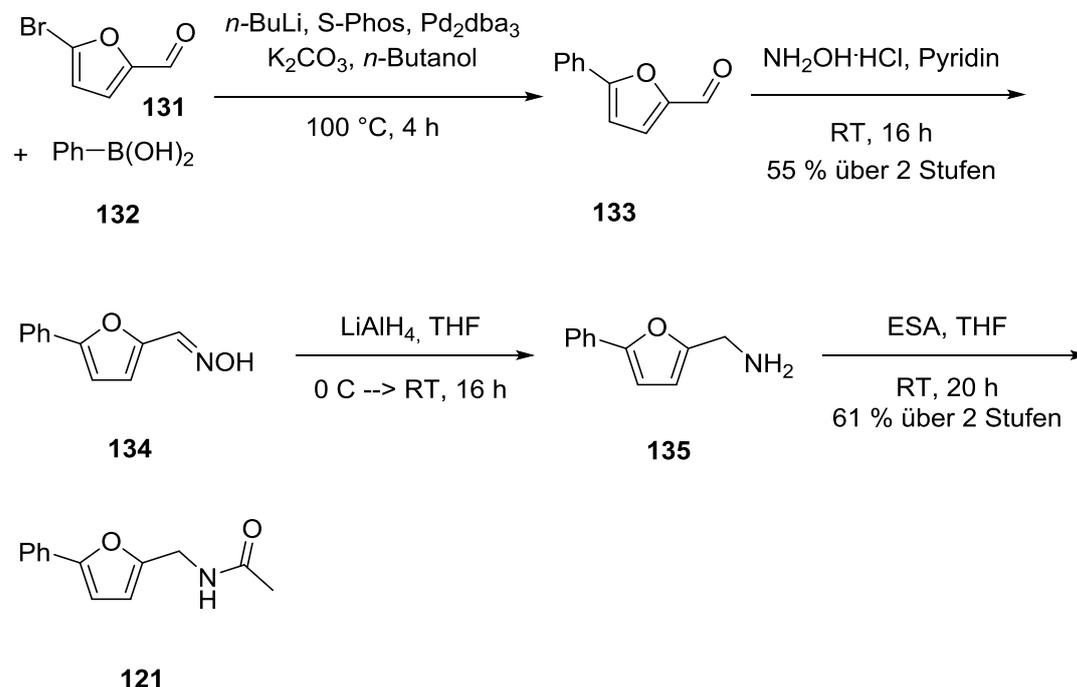
Ausgehend von der Synthese nach KIELMANN¹⁰⁵ wurde die Darstellung von *N*-[(5-methoxyfuran-2-yl)methyl]acetamid **120** leicht modifiziert. 2-Methoxyfuran **127** wurde mit *n*-BuLi und DMF zu 2-Methoxyfurfural **128** umgesetzt. Nach der Reaktion zum Oxim **129** wurde eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid vorgenommen. Abschließend konnte mit Essigsäureanhydrid das Acetamid **120** in einer sehr guten Ausbeute gebildet werden (Schema 46).



Schema 46: Synthese von *N*-[(5-Methoxy-2-yl)methyl]acetamid **120**.

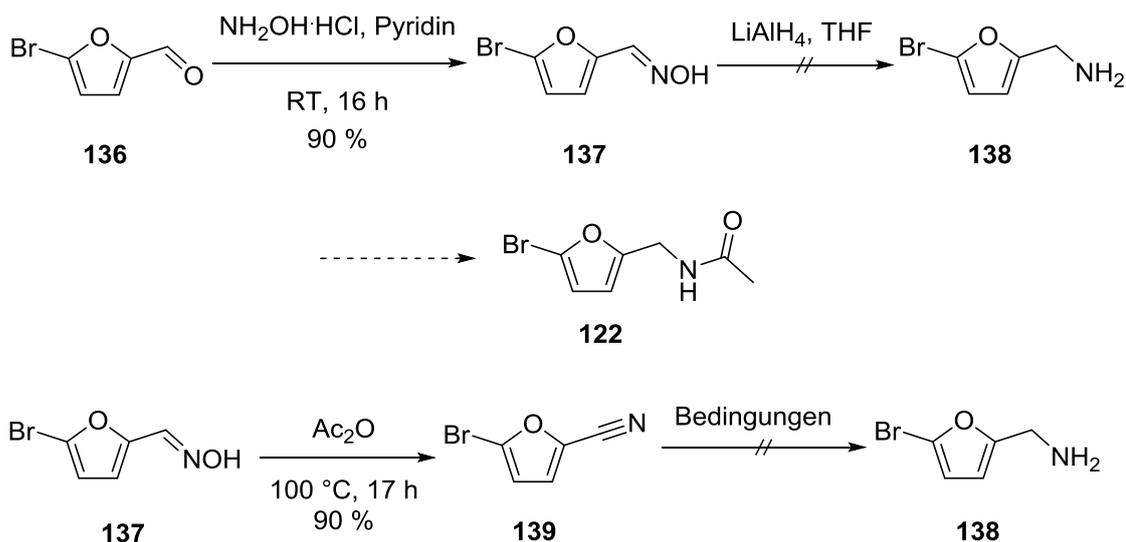
¹⁰⁵ M. Kielmann, *Bachelorarbeit* 2013, Leibniz Universität Hannover.

Die Darstellung von *N*-[(5-Phenylfuran-2-yl)methyl]acetamid **121** wurde von KIELMANN durchgeführt und freundlicherweise für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Schema 47).¹⁰⁵



Schema 47: Synthese von *N*-[(5-Phenyl-2-yl)methyl]acetamid **121**.

Ausgehend von 5-Bromofuran-2-carbaldehyd **136** sollte *N*-[5-Bromfuran-2-yl)methyl]acetamid **122** dargestellt werden. Die Bildung des Oxims **137** verlief mit guter Ausbeute. Die Reduktion zum Amin **138** warf allerdings einige Probleme auf. Nachdem die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid unter Zersetzung verlief, wurde versucht zunächst das Nitril **139** herzustellen und dann eine Reduktion durchzuführen. Die Verwendung verschiedener Reduktionsreagenzien (Tabelle 5) führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt.

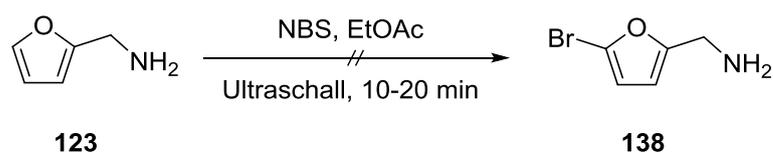


Schema 48: Synthesesequenz zur Darstellung von *N*-[(5-Bromofuran-2-yl)methyl]acetamid **122**.

Eintrag	Bedingungen	Reagenzien	Anmerkungen
1	$0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h	1.0 Äq. LiAlH_4 , THF	Zersetzung
2	$0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h	1.2 Äq. LiAlH_4 , THF	Zersetzung
3	$-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h	4.0 Äq. DIBAL, THF	Zersetzung
4	$0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h	3.0 Äq. NaBH_4 , THF	Zersetzung
5	$0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 16 h	2.0 Äq. NaBH_3CN , MeOH	Zersetzung

Tabelle 5: Bedingungen für die Reduktion von **139** zu **138**.

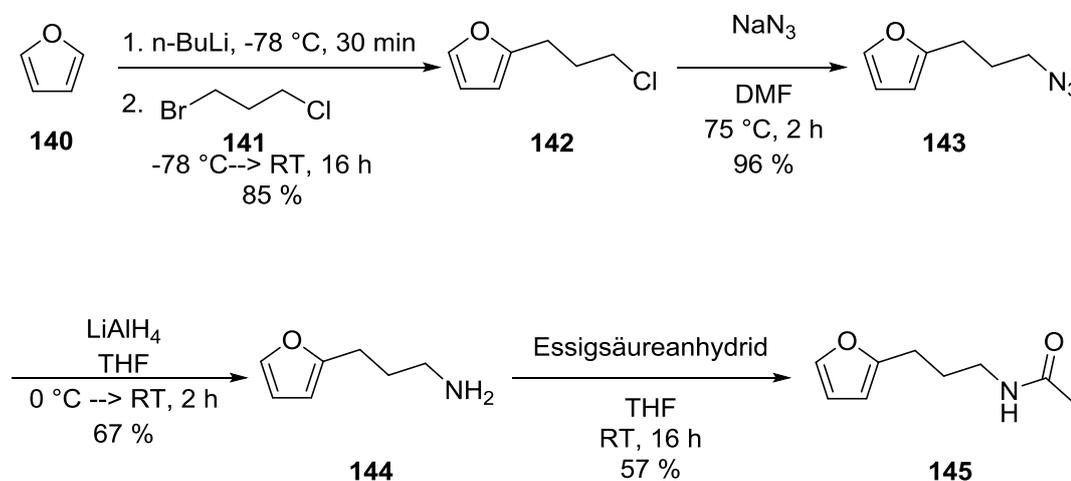
Als Alternative wurde versucht, Verbindung **138** ausgehend von 2-Furfurylamin **123** über eine Bromierung mit NBS darzustellen. Doch auch diese Route war nicht zielführend. Weder Edukt noch Produkt konnten isoliert werden. Es ist damit zu rechnen, dass sich ein eventuelles Intermediat zersetzt hat. Dies ist ebenfalls für die Reduktion von **137** und **139** anzunehmen.



Schema 49: Synthese von *N*-[(5-Bromofuran-2-yl)methyl]acetamid **138**.

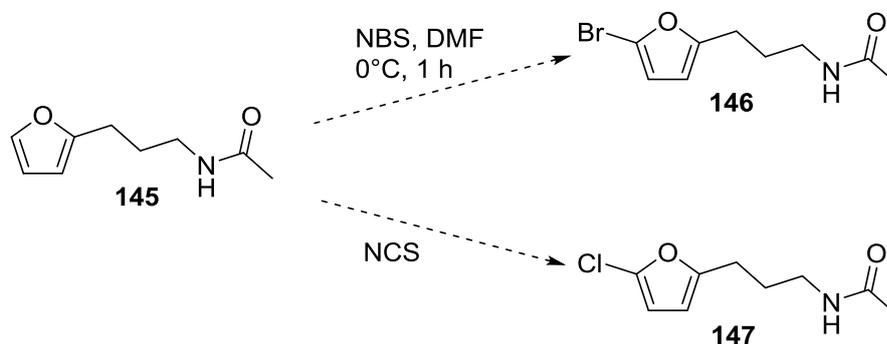
Da die vorangegangenen Versuche, ein Furanderivat herzustellen, welches an der 5-Position mit Brom substituiert ist, nicht erfolgreich waren, wurde eine neue Synthesestrategie angestrebt. Um die Probleme der benzyliischen Amingruppe zu

umgehen, wurde ausgehend von Furan **140**, eine 1-Chlorpropyl-Seitenkette eingeführt. Anschließend wurde das Chloratom durch ein Azid ausgetauscht, um so reaktiv zum Amin **144** zu gelangen. **144** wurde dann im letzten Schritt zum Acetamid **145** umgesetzt.¹⁰⁶



Schema 50: Synthesesequenz zur Darstellung von *N*-[3-(Furan-2-yl)propyl]acetamid **144**.

Mit dem Furanderivat **145** wurde eine Substitution in 5-Position angestrebt. Durch diese Reaktion sollten sowohl Brom als auch Chlor als Substituenten eingeführt werden. Aus zeitlichen Gründen wurde diese Synthese aber nicht weiter verfolgt.

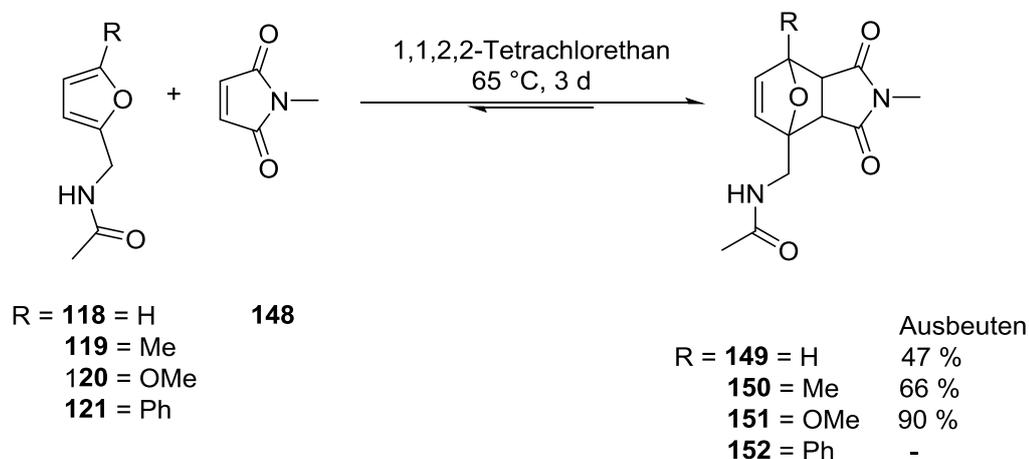


Schema 51: Umsetzung von *N*-[3-(Furan-2-yl)propyl]acetamid **145** zu *N*-[3-(5-bromofuran-2-yl)propyl]acetamid **146** und *N*-[3-(5-Chlorofuran-2-yl)propyl]acetamid **147**.

¹⁰⁶ S. Helmsen *Bachelorarbeit* 2015, Leibniz Universität Hannover.

5.3 Untersuchungen zur Diels-Alder Cycloaddition

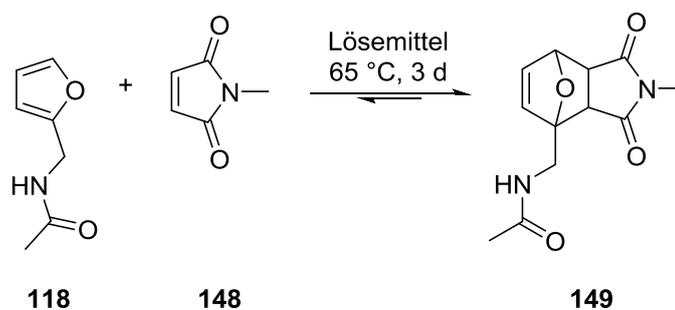
Für die DIELS-ALDER Cycloaddition wurden die Furanderivate **118** - **121** mit *N*-Methylmaleimid **148** bei 65 °C umgesetzt. Um zunächst die Reaktivität der Furanderivate vergleichen zu können, wurden die Reaktionen in 1,1,2,2-Tetrachlorethan durchgeführt, ein zuvor etabliertes Lösemittel. Aus diesem Grund wurde auch die Reaktionszeit von drei Tagen gewählt (Schema 52).⁵⁹



Schema 52: DIELS-ALDER Cycloaddition in 1,1,2,2-Tetrachlorethan.

Deutlich zu erkennen ist, dass in diesem Lösungsmittel die besten Ausbeuten mit dem Methoxyfuran **120** erreicht wurden. Die Ausbeuten für das unsubstituierte Furan **118** und das Methylfuran **119** liegen noch im moderaten Bereich, während das Phenylfuran **121** zu keiner Umsetzung führte. Weder durch spektroskopische oder massenanalytische Methoden ließ sich Verbindung **152** nachweisen.

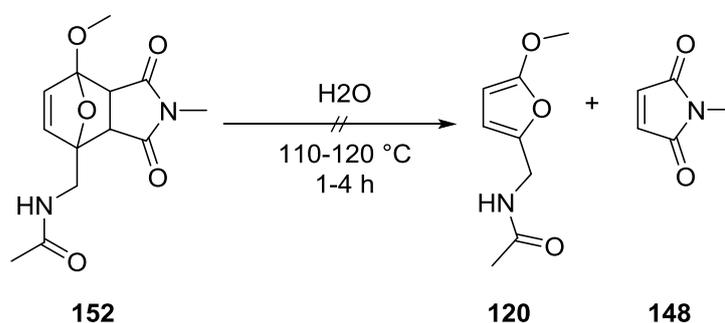
Für eine Anwendung in der Tumorthherapie, also im Körper des Patienten, sind die verwendeten Lösungsmittel entscheidend. Ideal wäre es, wenn die Nanopartikel mit quantitativer Ausbeute in einer wässrigen Suspension beladen und direkt appliziert werden könnten, möglichst mit einem pH-Wert und Zusammensetzung, die dem Blut entspricht. Aus diesem Grund wurden mit Furan **118** und Maleimid **149** verschiedene Lösungsmittel getestet. Zunächst wurden hierbei Wasser und Tetrachlorethan verglichen. In Wasser konnte eine bessere, aber immer noch moderate Ausbeute erreicht werden. Der Test der beiden Lösungsmittel THF und Acetonitril führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Ausbeute (Schema 53).



	Ausbeute
Lösungsmittel: 1,1,2,2-Tetrachlorethan	- 51 %
Wasser	- 59 %
THF	- 59 %
MeCN	- 59 %

Schema 53: DIELS-ALDER Cycloaddition in verschiedenen Lösungsmitteln.

Von besonderem Interesse für die spätere Anwendung ist allerdings die Rückreaktion, die innerhalb eines Organismus stattfinden soll. Zu diesem Zweck sollte das Methoxyfuran-DIELS-ALDER Addukt **151** untersucht werden. Als Lösungsmittel wurde Wasser gewählt, um den Bedingungen im biologischen System nahe zu kommen. Bei einer Reaktionszeit von einer Stunde und einer Temperatur von 110 °C konnte die Bildung des Furans nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Reaktionszeit auf vier Stunden verlängert, was aber nicht zielführend war. Auch die Erhöhung der Temperatur um 10 °C war nicht erfolgreich (Schema 54).



Schema 54: Retro-DIELS-ALDER Cycloaddition mit Methoxy-DIELS-ALDER-Produkt **152**.

In der DIELS-ALDER Cycloaddition wird das HOMO des Furans **120**, also des Diens, von der Methoxygruppe beeinflusst. Durch die freien Elektronenpaare des Ethers wird die Elektronendichte im Dien erhöht (+M-Effekt) und das HOMO angehoben. Die Überlappung mit dem LUMO des Dienophils wird zusätzlich begünstigt. Durch den

elektronenziehenden Effekt (-M-Effekt) der Carbonylgruppen im Maleimid **148** wird das LUMO herabgesetzt. Die Überlappung des HOMOs vom Dien **120** und des LUMOs des Dienophils **148**, unter diesen günstigen Bedingungen führt zu einem äußerst stabilen DIELS-ALDER Addukt **152**. Dies bedeutet auch, dass die Aktivierungsenergie für eine DIELS-ALDER Cycloreversion sich auf einem sehr hohen Niveau befindet. In diesem Fall wirken sich die Eigenschaften der Substituenten, im Gegensatz zur DIELS-ALDER Cycloaddition, negativ aus.^{107,108} Die gewählten Bedingungen trugen zu wenig Energie in das System ein, um zu den Substraten **120** und **148** zu führen. Allerdings wäre eine unendliche Steigerung des Energieeintrags nicht sinnvoll, da der Temperaturbereich in der Anwendung *in vivo* begrenzt ist. Aus diesem Grund ist dieses Furanderivat auch für einen Einsatz im Wirkstofftransportsystem ungeeignet, da der Wirkstoff nicht freigesetzt werden könnte.

Von einer weiteren Untersuchung der Addukte **149** und **150** wurde abgesehen, da mit dem Wirkstoff bereits ein an der 2-Position unsubstituiertes Furan verwendet wurde.¹⁰⁹

5.4 Bestimmung der Belegung von Nanopartikeln durch photometrische Untersuchungen

Für die Kupplung an funktionalisierten Nanopartikeln wurde mit ein an 5-Position unsubstituiertes Furan eingesetzt. Allerdings wurden die Modellfurane aus dem vorangegangenen Kapitel nicht verwendet, da diese in Lösung nur schwer quantifizierbar sind. Von HARTWIG wurden aus diesem Grund Furane mit Fluorescein- **153** und Coumarin-Seitenkette **154** (Schema 55) hergestellt und mit den Nanopartikeln zur Reaktion gebracht. Bei dem Versuch den Überstand aus dieser Reaktion zu untersuchen, wurde festgestellt, dass das Fluoreszenzsignal des Triazolrings bei einer photometrischen Analyse getilgt wurde.¹¹⁰ Alternativ dazu wurde von MANCUSO eine Kalibriergerade mit dem entsprechenden Ansamitocin-Derivat als internen Standard erstellt, um die Reaktionen verfolgen zu können. Dies gelang nur, da die Ansamitocine im UV-Bereich absorbieren. Die Untersuchung wurde an einer HPLC gekoppelt mit einem

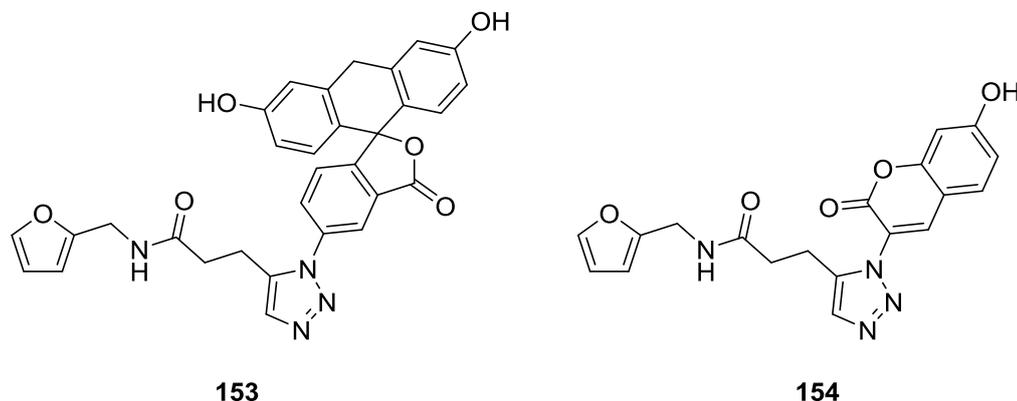
¹⁰⁷ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers *Organic Chemistry*. New York, 1. Auflage **2001**, S. 905 ff.

¹⁰⁸ R. C. Boutelle, B. H. Northrop *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 7994-8002.

¹⁰⁹ L. Mancuso *Dissertation* **2014**, Leibniz Universität Hannover.

¹¹⁰ J. Hartwig *unveröffentlichte Ergebnisse*, Leibniz Universität Hannover.

Massenspektrometer durchgeführt. Nachteilig ist hier, dass ein Konzentrationsbereich von 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ abgedeckt wird und dass der wertvolle Naturstoff für die Analytik verwendet werden muss.¹⁰⁹



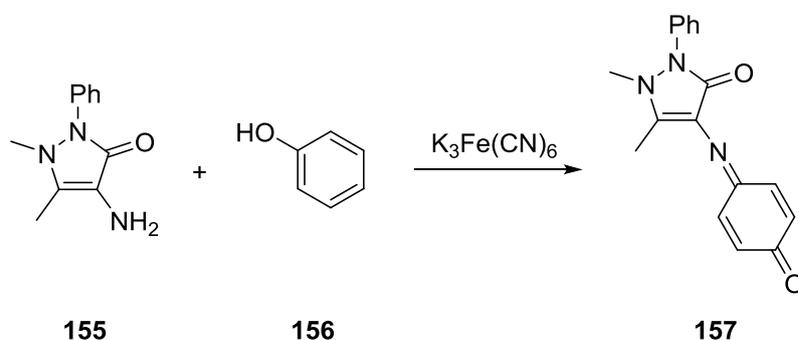
Schema 55: Furanerivate **153** und **154** mit fluoreszenzaktiven Gruppen.

In dieser Arbeit sollte hierfür eine Methode gefunden werden, in der nicht der Wirkstoff selbst nachgewiesen werden sollte, sondern ein kleineres Molekül, welches sich durch den Zusatz von Reagenzien im sichtbaren Licht analysieren lässt. Auch die Quantifizierung sollte gegeben sein, um die Beladung der Nanopartikel und die anschließende Ablösung bestimmen zu können.

Als eine geeignete Methode stellte sich die Reaktion von Phenolen **156** mit 4-Aminoantipyrin (4-AAP) **155** heraus. Die beiden Substanzen sind selbst farblos, aber unter oxidativen Bedingungen bildet sich ein Chinon-Derivat **157**, welches eine kräftige rote Färbung zeigt (Schema 56). Diese Methode wird bereits seit Jahrzehnten für die Bestimmung von Phenolen im Grundwasser verwendet.¹¹¹ Auch in jüngerer Vergangenheit wird diese Methode immer noch genutzt und in chromatographische Methoden eingebunden.¹¹²

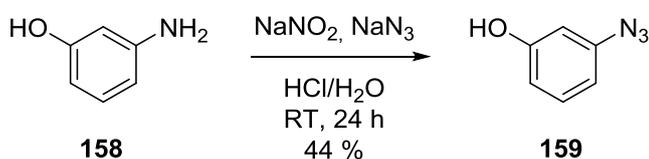
¹¹¹ M. B. Ettinger, C. C. Ruchhoft, R. J. Lischka *Anal. Chem.* **1951**, 1783-1788.

¹¹² Y. Fiamegos, C. Stalikas, G. Pilidis *Analytica Chimica Acta* **2002**, 467, 105-114.



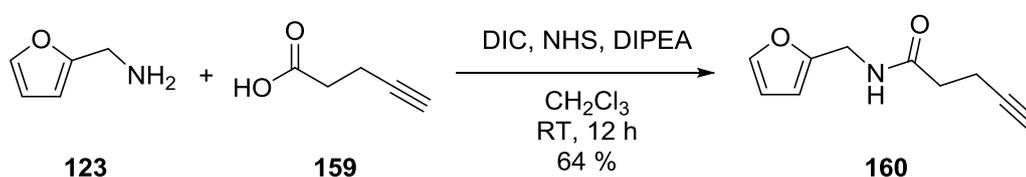
Schema 56: Reaktion von 4-Aminoantipyrin **155** mit Phenol **156**.

Für die Übertragung dieser Methode in die Anwendung mit Nanopartikeln musste zunächst ein geeignetes Phenolderivat dargestellt werden. Durch Diazotierung konnte aus 3-Hydroxyanilin **158** nach EMRICK *et al.* 3-Hydroxyazid **159** synthetisiert werden (Schema 57).¹¹³



Schema 57: Diazotierung von 3-Hydroxyanilin **158**.

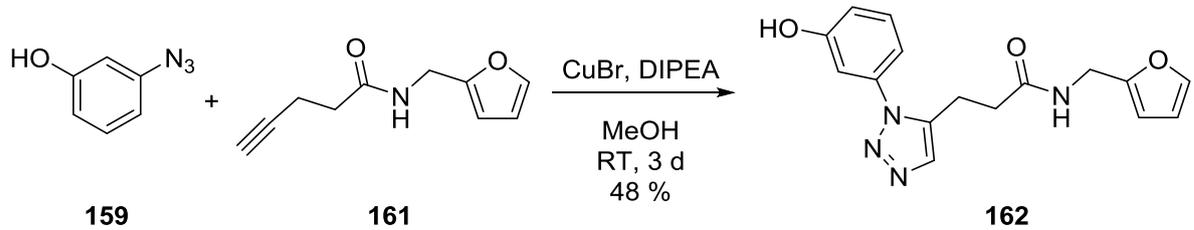
Anschließend wurde Furfurylamin **123** in einer Peptidkupplung mit Pent-4-insäure **160** nach MÖLLER in guten Ausbeuten umgesetzt (Schema 58).⁵⁹



Schema 58: Peptidkupplung zwischen Furfurylamin **123** und Pent-4-insäure **160**.

In einer Cu(I) medierten 1,3-dipolaren Cycloaddition konnten Furan **161** und 3-Hydroxyazid **159** zum Triazol **162** verknüpft werden. Die Ausbeuten lagen mit 48 % im moderaten Bereich (Schema 59).

¹¹³ B.-Y. Ryu, T. Emrick *Macromolecules* **2011**, *44*, 5693-5700.



Schema 59: 1,3-dipolare Cycloaddition von 3-Hydroxyazid **159** und Furan **161**.

Bevor diese Substanz eingesetzt werden konnte, wurden die Absorptionsmaxima der einzelnen Reagenzien für die Photometrie bestimmt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die Substanzen in dem gleichen Wellenlängenbereich absorbieren, wie das Addukt aus Phenol **162** und 4-AAP **155**. Außerdem sollte das Auslöschen von Signalen, wie bei Coumarin oder Fluorescein, vermieden werden.

Die Spektren wurden jeweils von Lösungen zwischen 0,0 mmol/L und 1,0 mmol/L aufgenommen, um den Konzentrationsbereich abzudecken, der später analysiert werden soll. In Abbildung 70, 71 und 72 sind die Spektren von Phenol **162**, 4-AAP **155** und Kaliumhexacyanoferrat(III) aufgeführt. Aus allen drei Spektren wird ersichtlich, dass die Absorptionsmaxima in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 300 nm und damit im gewünschten UV-Bereich befinden. Da die Reaktion von 4-AAP **155** mit Phenolen aber zu einem roten Farbstoff führt, der im sichtbaren Bereich absorbiert, war von einer Störung der Reagenzien bei der Messung vorläufig nicht auszugehen.

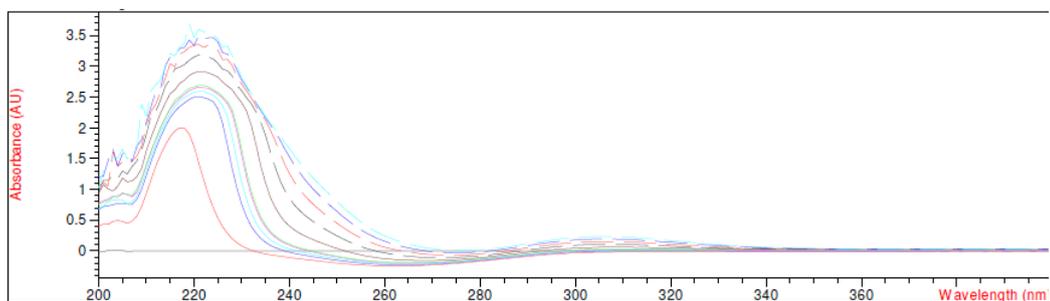


Abbildung 70: Absorptionsspektrum von Phenol **162** zwischen 0.0 und 1.0 mmol/L.

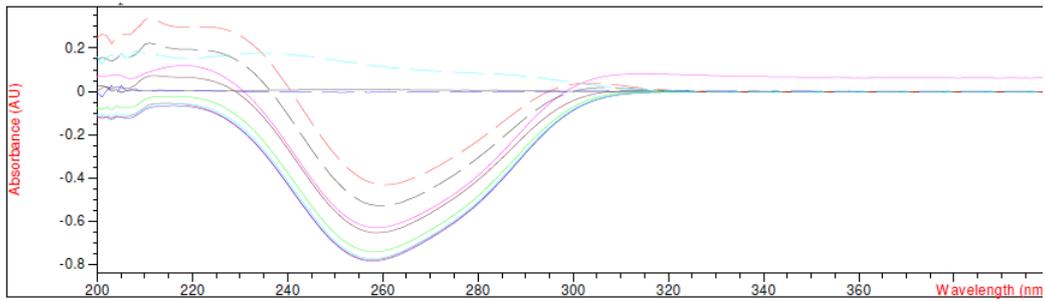


Abbildung 71: Absorptionsspektrum von 4-AAP **155** zwischen 0.0 und 1.0 mmol/L.

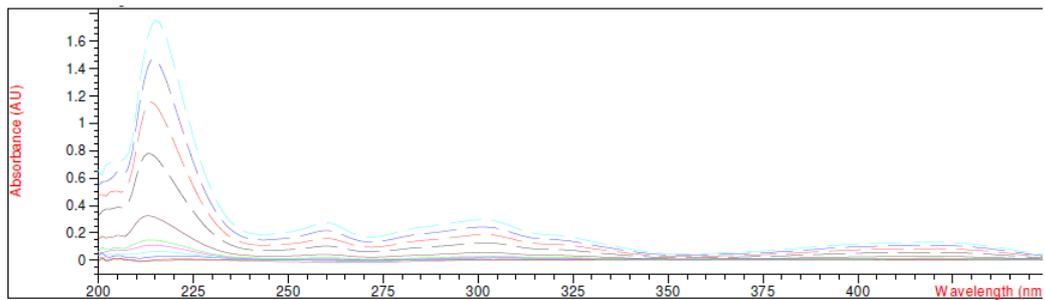


Abbildung 72: Absorptionsspektrum von Kaliumhexacyanoferrat(III) zwischen 0.0 und 3.0 mmol/L.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Quantifizierung von Phenolen möglich ist, wenn die Reagenzien stöchiometrisch oder im Überschuss eingesetzt werden. Auch hier wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,0 mmol/L und 1,0 mmol/L bezogen auf das Phenol **162** eingesetzt. Als Blindwert diente hier zunächst eine Probe aus Puffer und den Reagenzien ohne das Phenol **162**.

In den Spektren ist deutlich zu erkennen, dass ein Absorptionsmaximum bei 510 nm liegt (Abbildung 73 und 74). Im Fall des stöchiometrischen Einsatzes von Reagenzien fiel auf, dass sich im UV-Bereich kein Maximum ausbildet. Diese Beobachtung spricht dafür, dass ein vollständiger Umsatz gegeben war und die Reagenzien verbraucht wurden (Abbildung 74).

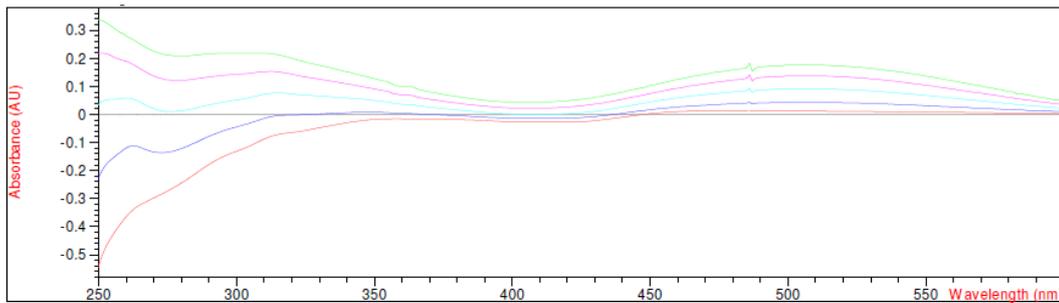


Abbildung 73: Absorptionsspektrum für die stöchiometrische Verwendung der Reagenzien.

Bei dem Einsatz der Reagenzien im Überschuss wurde deutlich, dass sowohl im UV-Bereich, als auch im sichtbaren Bereich Absorptionsmaxima vorhanden waren. Allerdings wurde auch gezeigt, dass das Maximum im sichtbaren Wellenlängenbereich bei 510 nm lag. Dennoch wurde die Messung der Proben und der Kalibriergeraden bei 500 nm vorgenommen. In diesem Fall waren beide Spektren miteinander vergleichbar. Dies sprach für eine Reproduzierbarkeit der Methode (Abbildung 74).

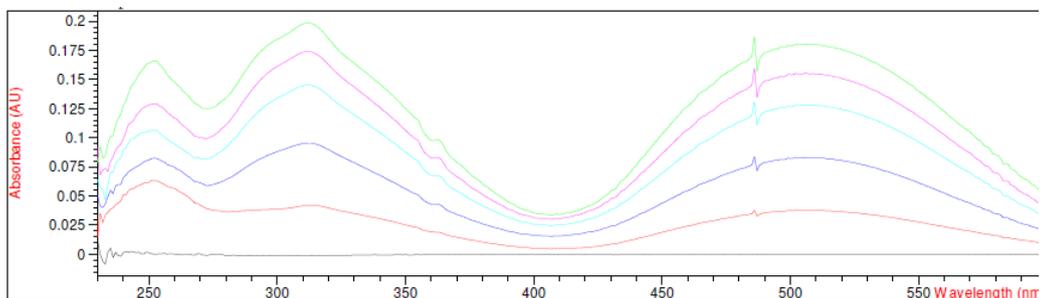


Abbildung 74: Absorptionsspektrum für die Verwendung der Reagenzien im Überschuss.

Bei der Betrachtung der Graphiken wurde klar, dass die Abstände zwischen den höchsten Konzentrationen dichter beieinander liegen, als die der niedrigen Konzentrationen. Aus diesem Grund wurde entschieden, für die Aufnahme einer Kalibriergerade Lösungen der Konzentration 0.0 mmol/L bis 0.6 mmol/L zu vermessen. Zur Überprüfung der Robustheit der Methode wurden acht Kalibriergeraden aufgenommen. Die erneute Kalibrierung erfolgte dabei in unregelmäßigen zeitlichen Abständen, wenn Messungen zur Bestimmung der Beladung durchgeführt wurden (Abbildung 75).

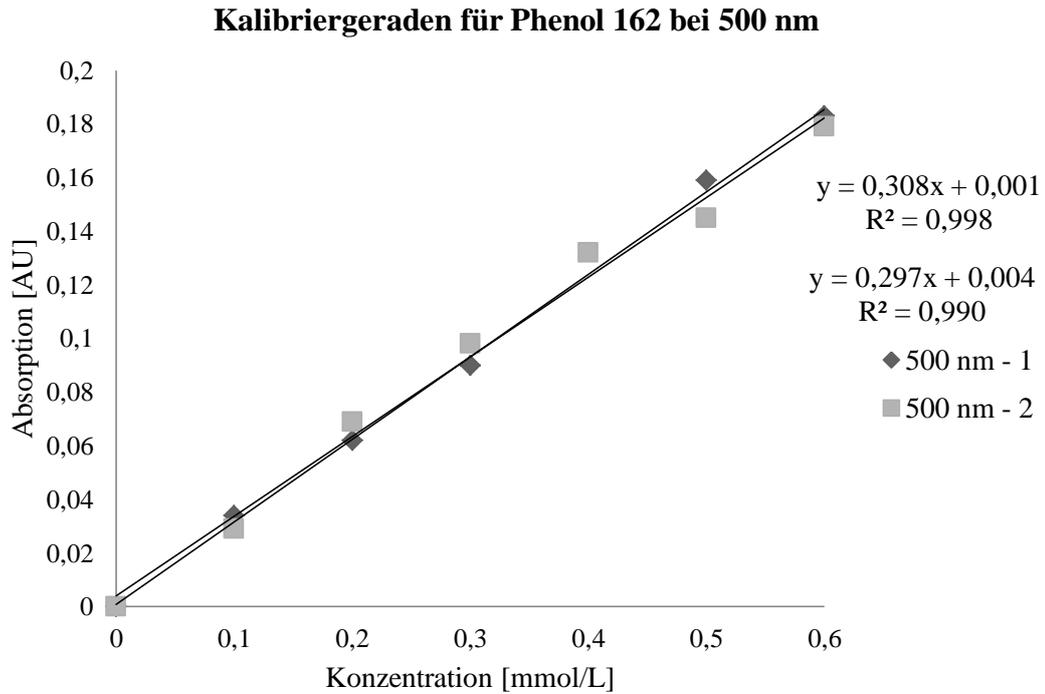


Abbildung 75: Kalibriergeraden von Phenol **162** bei 500 nm, Messung innerhalb von 30 min.

Die Kalibriergeraden wurden innerhalb von 30 min nach Herstellung der Lösung vermessen. Um weiterhin die Robustheit der Methode zu untersuchen, wurden Messungen nach 90 min und nach 150 min vorgenommen (Abbildung 76).

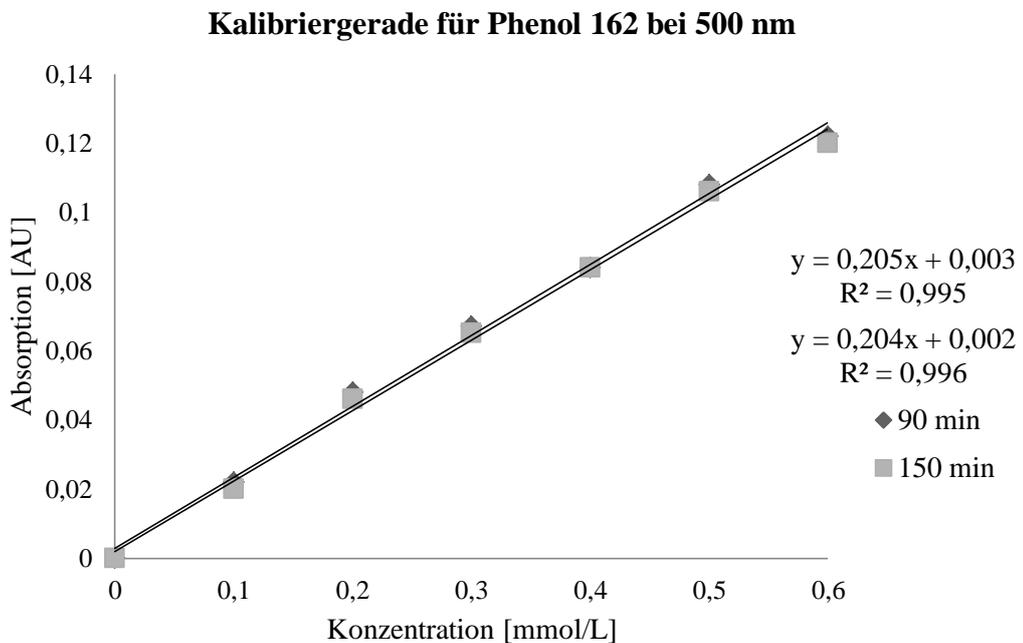


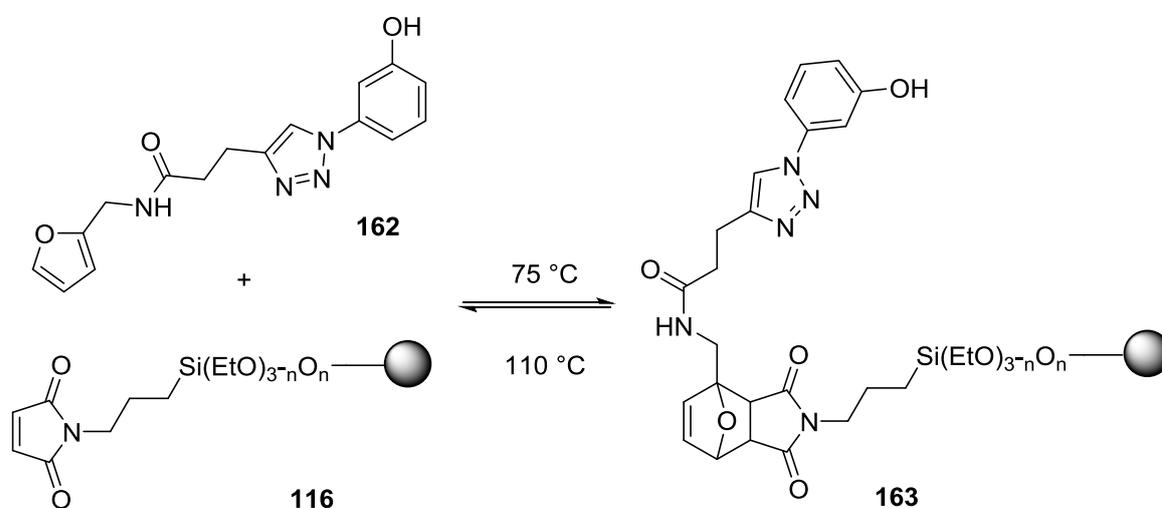
Abbildung 76: Kalibriergeraden von Phenol **162**, Messung nach 90 min und 150 min.

Durch die Bestimmung des Vertrauensbereiches (VB = 0.09) nach Fieller¹¹⁴ wurde festgestellt, dass die Steigung der Kalibriergeraden nicht mehr innerhalb dieses Bereiches lagen (vergleiche Kapitel 8.2). Dies spricht dafür, dass der gebildete Farbstoff nicht über einen längeren Zeitraum stabil ist. Obwohl die Kalibriergeraden eine sehr hohe Genauigkeit aufweisen, wurden die Messungen für Proben und Kalibriergeraden weiterhin innerhalb von 30 min nach Herstellung der Probenlösung durchgeführt.

5.5 DIELS-ALDER Cycloaddition an Nanopartikeln

Für die Bestimmung der zur Verfügung stehenden Maleimid-Gruppen auf der Oberfläche von funktionalisiertem MAGSILICA[®] **116** mussten vergleichbare und reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden. Da bei der Herstellung und anschließenden Überprüfung der Nanopartikel durch JAN HARTWIG ein Gemisch aus THF/Wasser (1:4) verwendet wurde, wurden auch für die hier vorliegenden Versuche mit diesem Gemisch gearbeitet. Langfristig sollte, in Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung, mit Wasser bzw. wässrigen biokompatiblen Lösungen gearbeitet werden.

Für die Beladung wurden verschiedene Mengen an Phenol **162** mit 100 mg Nanopartikeln **116** und 1 mL Lösungsmittel eingesetzt, um die Vergleichbarkeit untereinander zu sichern. Bei den Bedingungen wurden die Erkenntnisse aus den Versuchen mit Furanderivaten (Kapitel 5.3) eingebunden.



Schema 60: DIELS ALDER Cycloaddition von Phenol **162** an funktionalisiertem MAGSILICA[®] **116**.

¹¹⁴ K. Camman *Instrumentelle Analytische Chemie*. Heidelberg; Berlin, 1. Auflage **2001**, S. A-1 ff.

Von JAN HARTWIG und MONA OLTMANNs wurde funktionalisiertes MAGSILICA[®] **116** hergestellt und freundlicherweise für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Dabei lagen verschiedene Chargen vor, die jeweils miteinander verglichen wurden.

Zunächst wurde die Charge JH33B verwendet und unterschiedliche Mengen von Phenol **162** eingesetzt. Wie sich herausstellte, verfärbte sich das verwendete THF/Wasser-Gemisch nach der Reaktion gelblich. Dieses wirkte sich störend in der photometrischen Bestimmung der Konzentration aus. Wahrscheinlich war, dass sich im Herstellungsprozess von MAGSILICA[®] **116** Nebenprodukte an den Nanopartikel anlagern und bei Hitzeeinwirkung wieder freigesetzt werden. Da unterschiedliche Chargen des nicht modifizierten MAGSILICA[®] für die Funktionalisierung zur Verfügung standen, besteht die Möglichkeit, dass die Silica-Hülle Defekte aufweist. Dies kann dazu führen, dass Eisenionen aus Nanopartikeln in die Lösung diffundiert. Dennoch wurde exemplarisch die Beladung bestimmt (Tabelle 6). Zu diesem Zweck wurde MAGSILICA[®] (100 mg) mit der angegebenen Menge des Phenol **162** in 1.0 mL THF/Wasser (1:4) suspendiert und in einem verschlossenen Gefäß für 3 d bei 75 °C erhitzt. Da zuvor eine definierte Konzentration in der Lösung vorlag, konnte über den Überstand die Konzentration, nach der DIELS-ALDER Cycloaddition, von Phenol **162** mit der photometrischen Methode (vergleiche Kapitel 5.4) bestimmt werden. Mit der erhaltenen Konzentration konnte die Menge an Phenol **162** berechnet werden, die nicht reagierte. Durch die Berechnung der Differenz der Mengen vor der DIELS-ALDER Cycloaddition und danach, konnte die Menge die mit MAGSILICA[®] reagierte, ermittelt werden.

Eintrag	Konzentration von 162 vor DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 vor DIELS-ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 nach DIELS-ALDER [mg]	Masse von 162 auf MAGSILICA [®] [mg/100 mg]
1	5.8	1.8	0.4	0.1	1.7
2	2.9	0.9	0.4	0.1	0.8
3	1.6	0.5	0.4	0.1	0.4
4	10.6	3.3	0.6	0.2	3.2

Tabelle 6: Bestimmung der Belegung von MAGSILICA[®] **116** (JH33B).

Nachfolgend wurde von dem funktionalisiertem MAGSILICA® **116** jeweils eine Probe in Lösungsmittel ohne Phenol **162** zusätzlich zu den Proben bei der entsprechenden Temperatur behandelt. Diese Probe diente als Abgleich der restlichen Proben im Vergleich zu Kalibriergerade. Es stellte sich dabei heraus, dass die Färbung einen sehr starken Einfluss hatte und die Reaktion einer entsprechenden Probe von Nanopartikel **116** essentiell für genaue Messungen war. Mit diesen Erkenntnissen wurden die Chargen JH33, JH33B und MO12/14 miteinander verglichen (Tabelle 7).

Charge	Konzentration von 162 vor DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 vor DIELS-ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 nach DIELS-ALDER [mg]	Masse von 162 auf MAGSILICA® [mg/100 mg]
JH33	5.1	1.6	5.0	1.6	0.0
JH33B	6.4	2.0	4.7	1.5	0.5
MO12/14	5.4	1.7	5.0	1.6	0.1

Tabelle 7: Bestimmung der Belegung von MAGSILICA® **116**.

Obwohl auf der Charge JH33 keine Belegung festgestellt werden konnte, wurden zunächst alle Proben für die Retro DIELS-ALDER Reaktion eingesetzt. Es wurde etwas von den vorherigen Bedingungen abgewichen und für 4 Stunden auf 120 °C im Ölbad erhitzt (Tabelle 8).

Charge	Konzentration von 162 vor Retro DIELS- ALDER [mmol/L]	Masse von 162 auf MAGSILICA® vor Retro DIELS-ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach Retro DIELS- ALDER [mmol/L]	Masse nach von 162 Retro DIELS-ALDER [mg]	Masse auf von 162 MAGSILICA® [mg/100 mg]
JH33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JH33B	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5
MO12/14	0.0	0.1	0.1	0.03	0.1

Tabelle 8: Bestimmung der Belegung von MAGSILICA® **116**.

Wie sich herausstellte, war eine Ablösung von Phenol **162** nur mit der Charge MO12/14 möglich, die in den nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde. Die Chargen JH33 und JH33B wurde nicht weiter untersucht, da eine Freisetzung des Phenols **162** unabdingbar für den Einsatz als Wirkstoff-Transport-System ist. Es besteht die Möglichkeit, dass Phenol **162** an der Oberfläche lediglich adsorbiert was aufgrund von zu wenig Maleimid an der Oberfläche oder zu großen Poren an der Oberfläche von MAGSILICA[®]. Möglicherweise wurde dadurch das Phenol **162** durch Spülen vor dem Einsatz in der Retro DIELS-ALDER entfernt wurde. Die Charge MO12/14 wurde anschließend mit unterschiedlichen Mengen Phenol **162** beladen, um zu überprüfen ob die Beladung mit einer größeren Menge verbessert werden konnte (Tabelle 9).

Eintrag	Konzentration von 162 vor DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 vor DIELS-ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 nach DIELS-ALDER [mg]	Masse von 162 auf MAGSILICA [®] [mg/100 mg]
1	10.8	3.4	3.5	1.1	2.3
2	20.8	6.5	4.0	1.3	5.2
3	31.1	9.7	5.2	1.7	8.0
4	11.2	3.5	3.9	1.2	2.3
5	16.3	5.1	4.5	1.4	3.7
6	27.9	8.7	5.6	1.8	6.9

Tabelle 9: Bestimmung der Beladung von MAGSILICA[®] **116** (MO12/14).

Es stellte sich heraus, dass die Beladung mit ähnlichen Mengen an Phenol **162** zu einer vergleichbaren Beladung führte. Bei dem Einsatz einer größeren Menge wurden dementsprechend höhere Beladungen erzielt. Dies spricht dafür, dass die Kapazität des MAGSILICA[®] **116** noch nicht erreicht wurde. Von den so beladenen MAGSILICA[®] **116** wurden Eintrag 1 bis 3 konventionell durch Erhitzen im Ölbad einer Retro DIELS-ALDER Reaktion unterzogen (Tabelle 10). Wohingegen die Einträge 1 bis 6 durch induktives Heizen zur Reaktion gebracht wurden. Dabei wurde für 3 h mit einer Energie von 100% und einer maximalen Temperatur von 80 °C gearbeitet, da bei niedrigeren Temperaturen kein Phenol **162** nachgewiesen werden konnte. Es ist aber davon auszugehen, dass auf den Nanopartikeln selbst eine sehr viel höhere Temperatur erreicht wird, da von außen lediglich mit einem IR-Pyrometer die Temperatur verfolgt werden konnte. Für den Einsatz

in der Hyperthermie sollte allerdings versucht werden, eine Ablösung bei geringeren Temperaturen zu ermöglichen. Bei Eintrag 6 (Tabelle 10) konnte mit 0.08 mmol/L eine, im Vergleich zu den anderen Einträgen, geringe Konzentration ermittelt werden. Hier wäre eine deutlich höhere Konzentration zu erwarten gewesen. Entweder unterlief bei der Beladung ein Fehler, oder ein Teil des Phenols **162** war nicht kovalent gebunden, sodass es beim Spülen entfernt wurde. Möglich ist aber auch, dass die Beladung korrekt war und bei der Bestimmung der Konzentration ein Fehler unterlaufen ist.

Eintrag	Konzentration von 162 vor Retro DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 auf MAGSILICA® vor Retro DIELS-ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach Retro DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 nach Retro DIELS-ALDER [mg]	Masse von 162 auf MAGSILICA® [mg/100 mg]
1 _a)	0.0	2.3	0.19	0.1	2.2
2 _a)	0.0	5.2	0.39	0.1	5.1
3 _a)	0.0	8.0	0.54	0.2	7.8
4 _b)	0.0	2.3	0.22	0.1	2.2
5 _b)	0.0	3.7	0.22	0.1	3.6
6 _b)	0.0	6.9	0.08	0.03	6.9

Tabelle 10: Bestimmung der Belegung von MAGSILICA® **116** [Bedingungen: a) 4 h, 120 °C, Ölbad; b) 3 h, 100 %, induktives Heizen].

Die Freisetzung von Phenol **162** vom MAGSILICA® **163** war durch konventionelles Heizen ebenso möglich, wie durch induktives Heizen. Die erreichten Konzentrationen waren dabei vergleichbar. Obwohl sich nur vergleichsweise wenig vom Nanopartikel löste, waren die Konzentrationen von 0.1 mmol/L bis 0.5 mmol/L durchaus zufriedenstellend. Der Wirkstoff Ansamitocin ist schon bei einer Konzentration im nanomolaren Bereich biologisch aktiv.¹⁰² Dies bedeutet, dass nur eine geringe Menge des Wirkstoffs sich vom Nanopartikel ablösen müsste, um die gewünschte Wirkung zu erzielen.

Dennoch sollte auch die Beladungskapazität ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Mengen an MAGSILICA® **116** eingesetzt und mit jeweils der gleichen Menge an Phenol **162** zur Reaktion gebracht (Tabelle 11).

Eintrag / MAGSILICA [®] 116 [mg]	Konzentration von 162 vor DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 vor DIELS- ALDER [mg]	Konzentration von 162 nach DIELS-ALDER [mmol/L]	Masse von 162 nach DIELS- ALDER [mg]	Masse von 162 auf MAGSILICA [®] [mg/100 mg]
1/32.6	16.0	5.0	4.6	1.4	11.4
2/59.2	16.0	5.0	4.3	1.4	6.1

Tabelle 11: Bestimmung der Belegung von MAGSILICA[®] **116**.

Die Nanopartikel wurden in diesem Fall im Verhältnis mit mehr Substrat umgesetzt, und ebenfalls eine höhere Beladung ermittelt. Damit lässt sich ein Trend dahingehend erkennen, dass mit mehr Einsatz an Phenol **162** auch eine verbesserte Beladung erreicht werden kann.

5.6 Einsatz von Nanopartikeln in nicht fluiden Medien

Der Einsatz des funktionalisierten MAGSILICA[®] **116** ist für die Therapie von soliden Tumoren gedacht, also festem Gewebe. Der Wärmeübertrag und das Verhalten des Wirkstoffes in einem solchen Gewebe sind anders, als in einem fluiden Medium, wie zum Beispiel Wasser oder Blut. Um den Widerstand von Gewebe zu simulieren sollte eine Einbettung des beladenen Nanopartikels in 5 %iger wässriger Agarose, einem Polysaccharid (Abbildung 78), erfolgen. Agarose löst sich unter Hitzeeinwirkung in Wasser und bildet beim Abkühlen ein festes Gel, welches für die Trennung von Proteinen via Gelelektrophorese eingesetzt wird.¹¹⁵

Zunächst wurde überprüft, welche Bedingungen im induktiven Feld nötig sind, um eine Erwärmung des Agarosegels zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden MAGSILICA[®] **163** in ein Mikrowellengefäß in Agarose mit einer Spritze injiziert (Abbildung 68). Es war dabei deutlich zu erkennen, dass sich keine gleichmäßige Verteilung erreichen ließ, sondern Depots in dem Gel gebildet wurden. Aus diesem Grund wurde die Temperatur an den entsprechenden Stellen gemessen. Das Glasgefäß wurde mit einer schwarzen Farbe markiert. Dadurch ließ sich mit einem IR-Pyrometer ein Punkt auf der Oberfläche des

¹¹⁵ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5304?lang=de®ion=DE> (Zugriff: 09.09.2015).

Glases fixieren. Ohne die Farbe wäre es zu einer Spiegelung des Glases gekommen, und hätte eine Temperaturmessung verhindert. Die Temperatur wurde jeweils am oberen Teil, in der Mitte und am unteren Teil des Glases gemessen (Abbildung 77).

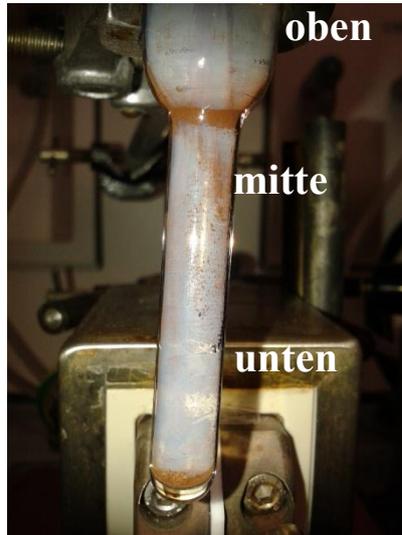


Abbildung 77: 5%iges Agarosegel mit MAGSILICA[®] 116.

Bei der Verwendung von Leistungen zwischen 5 und 40 % wurden die Temperaturen jeweils nach 10 min gemessen. Bei einer Ausgangstemperatur von ungefähr 20 °C konnte zunächst keine Veränderung festgestellt werden. Bei steigender Leistung konnte allerdings ein gleichmäßiger Temperaturanstieg ausgemacht werden. In dem Bereich, in dem viel MAGSILICA[®] 116 lokalisiert war, waren die Temperaturen auch entsprechend höher, der Rest des Gels konnte weniger stark erwärmt werden. Mit einer maximalen Leistung von 40 % konnten Temperaturen bis zu 53 °C erreicht werden. Für die Hyperthermie werden Temperaturen von etwa 42-45 °C benötigt. Folglich war eine Auslastung des Systems nicht nötig (Abbildung 79).

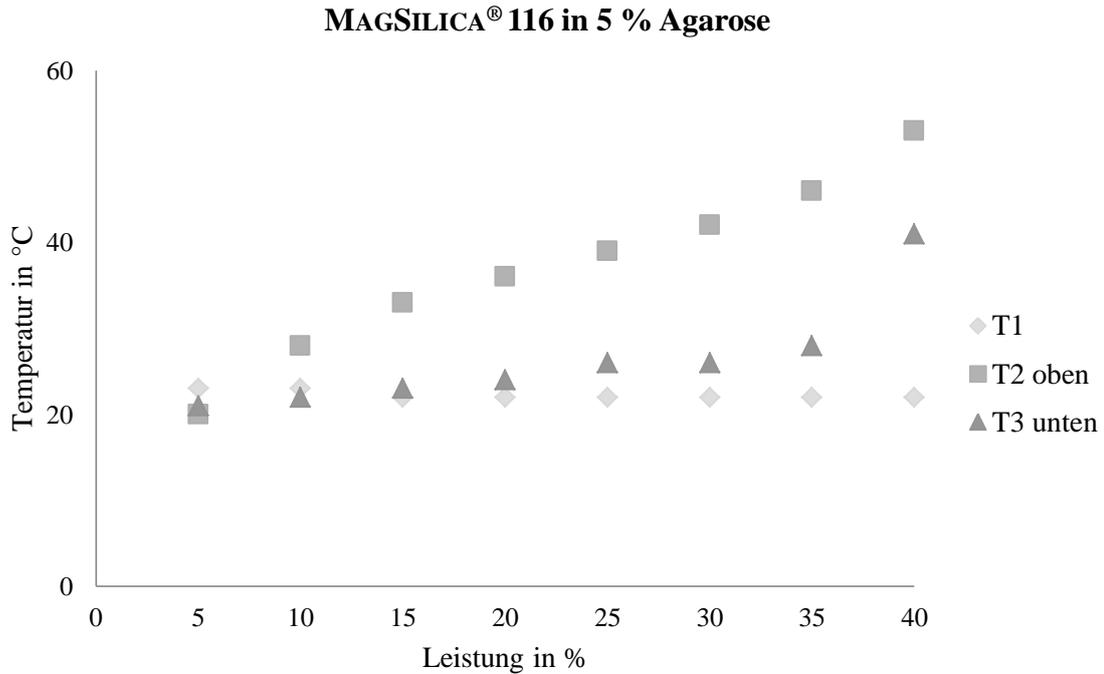


Abbildung 79: Temperaturprofil von MAGSILICA® 116 in 5 %iger Agarose (T1 = Temperatur vor dem Heizen, T2 = Temperatur oben am Gefäß, T3 Temperatur unten am Gefäß).

Anschließend sollte verglichen werden, welche Auswirkung eine gleichmäßige Schichtung von MAGSILICA® 116 im Gegensatz zu der Injizierung hat. Zu diesem Zweck wurden Mikroreaktionsgefäße verwendet und entsprechend vorbereitet.

Dieses Mal wurde mehr MAGSILICA® 116 eingesetzt, und aus diesem Grund wurden in beiden Fällen schon bei einer Leistung von 20 % Temperaturen im Bereich von 40 °C innerhalb von 20 min erreicht. Da sich im Falle der Injizierung erneut Depots bildeten, war eine homogene Aufheizung der kompletten Agarose und des Kerns fragwürdig. Die Depots wurden allerdings sehr gut erwärmt und erreichten Temperaturen bis zu 90 °C (Abbildung 80).

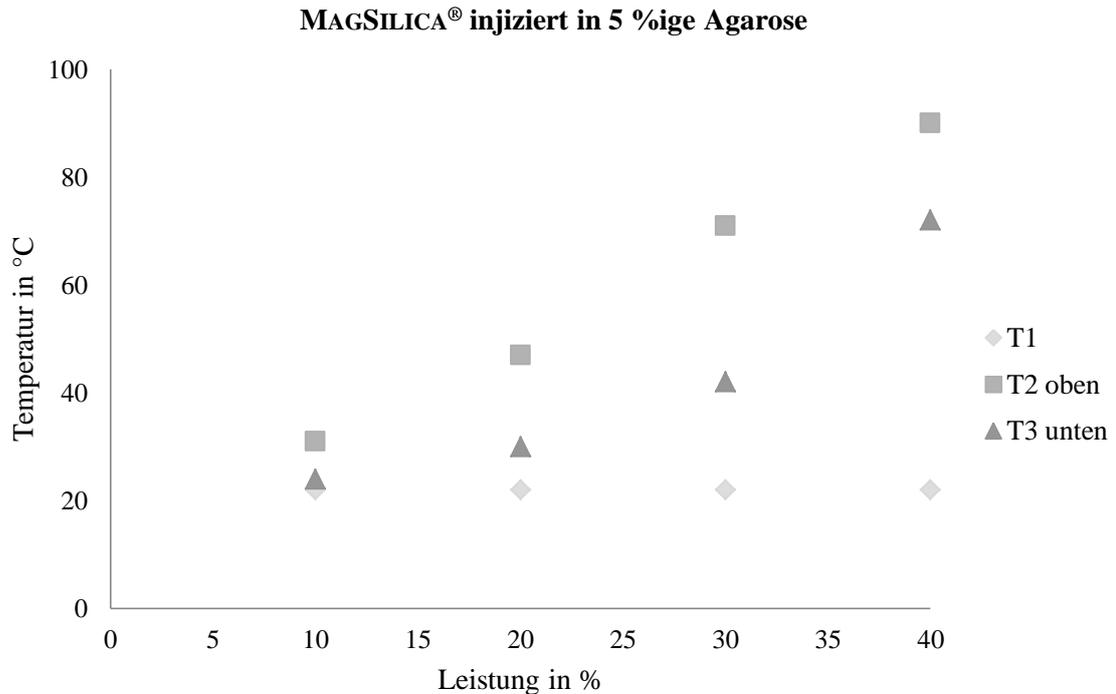


Abbildung 80: Temperaturprofil von MAGSILICA® 116 injiziert in 5 %ige Agarose (T1 = Temperatur vor dem Heizen, T2 = Temperatur oben am Gefäß, T3 Temperatur unten am Gefäß).

Wurde die Agarose mit MAGSILICA® 116 geschichtet, konnte eine Erwärmung aller Bereiche erfolgen. Die Wärme verteilte sich im gesamten Bereich und führte zu einem gleichmäßigen Anstieg der Temperatur. Mit 80 °C lag auch hier bei einer maximalen Leistung von 40 % die Temperatur, oberhalb der auch hier angestrebten Temperatur von 40 °C (Abbildung 81).

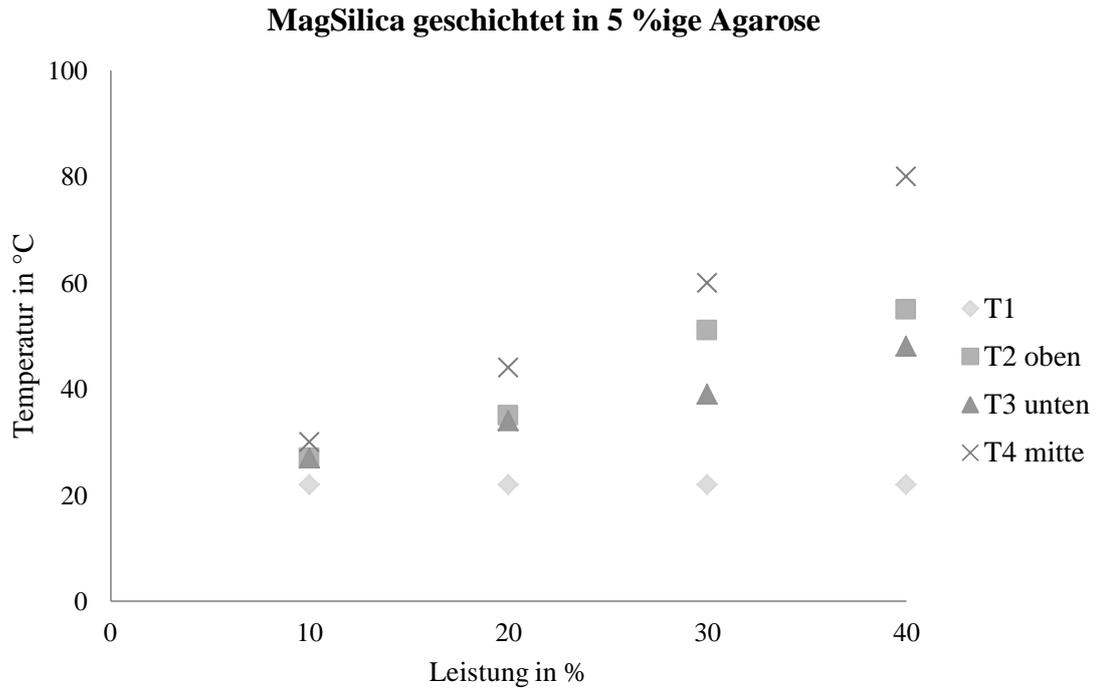


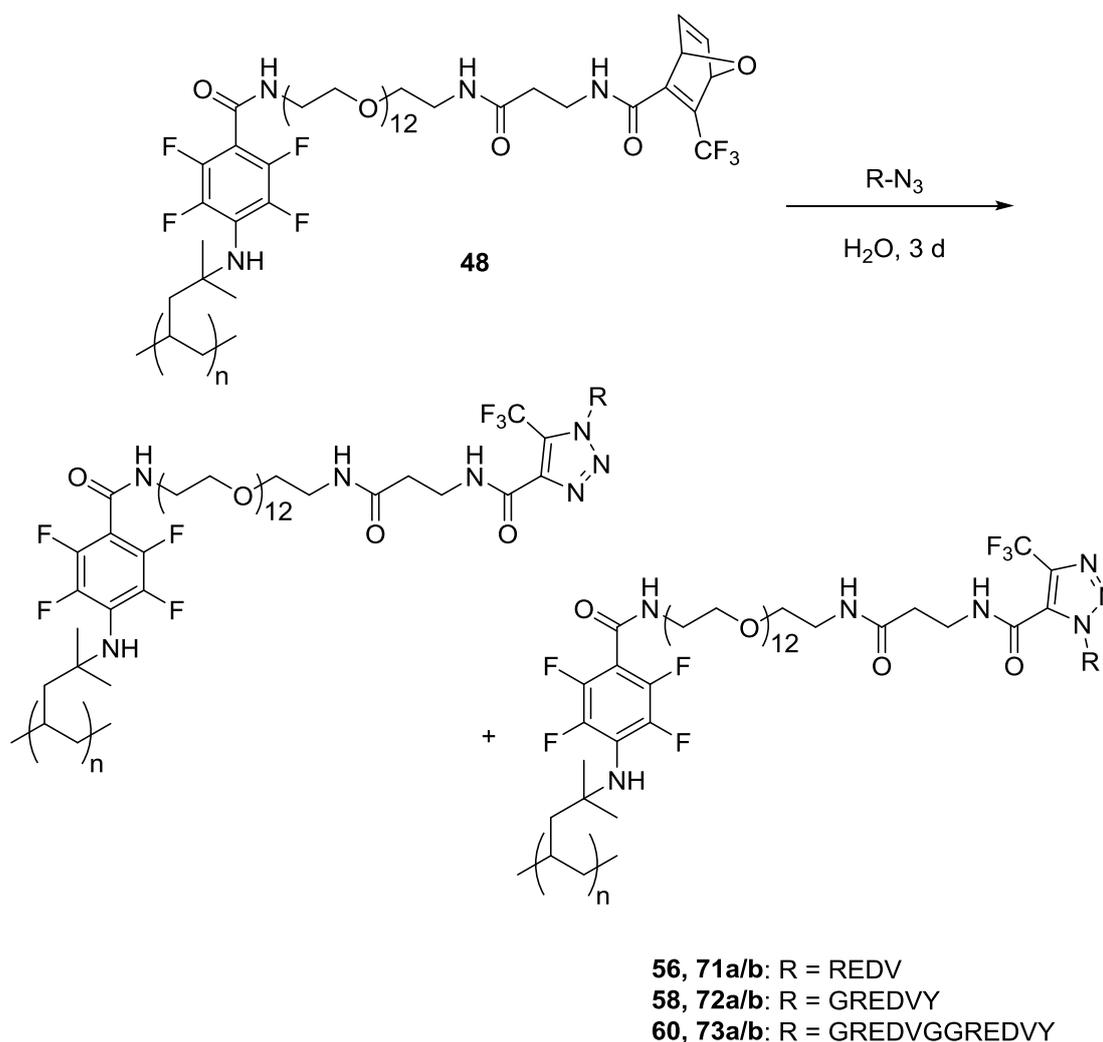
Abbildung 81: Temperaturprofil von MAGSILICA[®] 116 injiziert in 5 %ige Agarose (T1 = Temperatur vor dem Heizen, T2 = Temperatur oben am Gefäß, T3 = Temperatur unten am Gefäß, T4 = Temperatur in der Mitte des Gefäßes).

Generell reichte eine Leistung von 20 % um die gewünschte Temperatur von 40 °C zu erreichen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit konnten die Peptide **55**, **57** und **59** erfolgreich zu den entsprechenden Aziden **56**, **58** und **60** umgesetzt werden. Nachfolgend konnte eine metallfreie CLICK-Reaktion mit den Peptiden **56**, **58**, und **60** an den modifizierten PMP-Folien **48** durchgeführt werden.



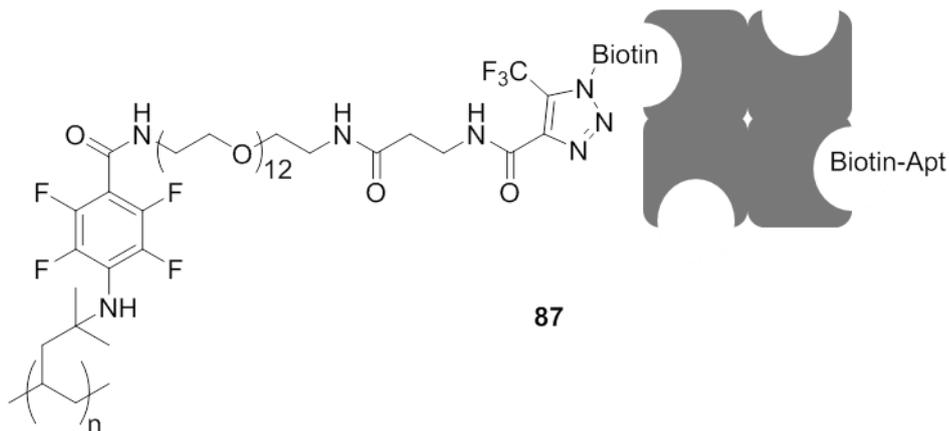
Schema 61: Metallfreie Ligation der Azide **56**, **58** und **60** an modifizierte PMP-Folie **48**.

Die biologische Aktivität wurde über die Besiedlung mit Endothelzellen und Fibroblasten getestet. Es stellte sich heraus, dass die Folien **71a/b**, **72a/b** und **73a/b** wie auch schon die Folien **50a/b** keine Selektivität gegenüber Endothelzellen aufwiesen. Dennoch war eine erhöhte Biokompatibilität gegenüber nicht-modifizierten PMP-Folien **37** gegeben.

Die Funktionalisierung der PMP-Folien mit PolySia **66** konnte auch in verschiedenen Konzentrationen nicht zu dem gewünschten anti-adhäsiven Effekt führen. Aus diesem Grund wurde von einer erneuten Testung abgesehen.

Das Biotin-Azid **67** wurde erfolgreich dargestellt und im Anschluss auf die Oberfläche aufgebracht. Die XPS-Analyse der Folien **75a/b** diente zunächst als Nachweis für eine erfolgreiche metallfreie CLICK-Anbindung an die PMP-Folien. Der Nachweis über die photometrische Methode mit Streptavidin alkalischer Phosphatase und CSDP **79** stützte diesen Befund. Die Quantifizierbarkeit war mit dieser Methode bis zum Abschluss der Arbeit nicht möglich.

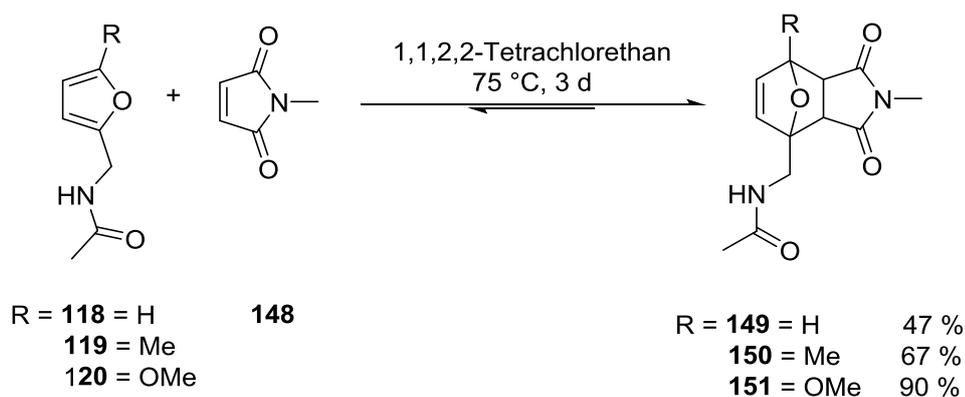
Die PMP-Folien **75a/b** konnten mit Streptavidin modifiziert werden. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, das Aptamer **84** auf der Oberfläche zu fixieren. Zum Vergleich wurden die Folien **48** ebenfalls mit einem Aptamer **85** funktionalisiert. Auch hier wurde die Biokompatibilität durch die Besiedlung mit Zellen nachgewiesen. Wie schon zuvor zeigte sich hier ebenfalls keine Selektivität gegenüber Endothelzellen. Beide Folien **86a/b** und **88** zeigten bei den verschiedenen Konzentrationen eine gleichbleibende Besiedlung mit Zellen. Bei dem Versuch Fibroblasten anzusiedeln konnte eine bessere Ansiedlung erreicht werden, als mit Endothelzellen.



Schema 62: PMP-Folie **87**, modifiziert durch Streptavidin und biotinyliertes Aptamer **85**.

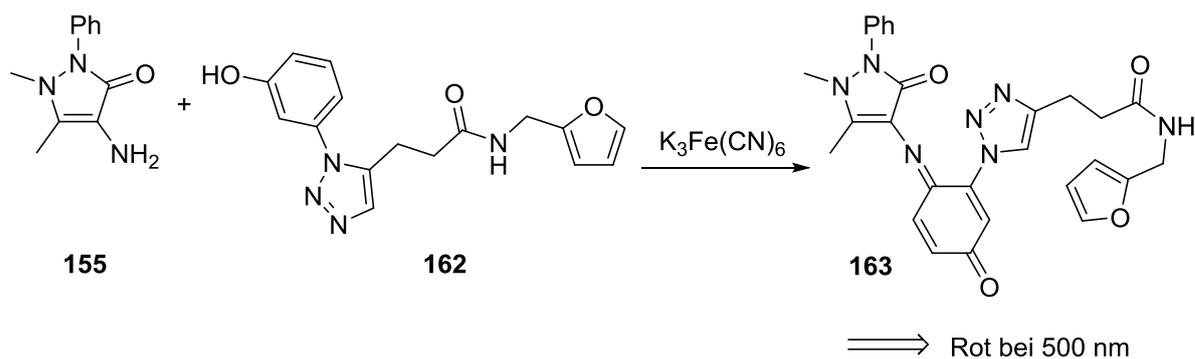
Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals auf elementreinem Metall (Titan) eine chemische Funktionalisierung mit einem cyclischen RGD-Peptid durchgeführt werden. Obwohl die Titanplatten **108** schon eine gute biologische Aktivität zeigten und die Osseointegration förderten, konnte diese Aktivität verbessert werden. Durch die

gengenteiligen Effekt hatte. Dennoch war der Methoxy-Substituent eher hinderlich, denn in diesem Fall führte die retro DIELS-ALDER Reaktion unter den verwendeten Bedingungen nicht zur Abspaltung der Furans **120**. Somit stellt für das Nanopartikel-Wirkstoffkonjugat weiterhin das unsubstituierte Furan-Konstrukt die beste Möglichkeit dar. Der synthetisch einfache Zugang und das Verhalten unter den geforderten Bedingungen sprechen für das Furan **118**.



Schema 64: DIELS-ALDER Cycloaddition in 1,1,2,2-Tetrachlorethan.

Anschließend konnte durch die Synthese des Phenols **162** die Beladung der Nanopartikel **116** bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine photometrische Methode mit 4-Aminoantipyrin **155** entwickelt und etabliert. Auf diesem Wege konnte auch die Ablösung des Phenols durch Hitzeeinwirkung nachverfolgt und quantifiziert werden. Durch diese Methode wurden die Probleme mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein **153** und Cumarin **154**, sowie damit verbundener Fluoreszenzauslöschung, umgangen. Auch die Ablösung durch konventionelles und induktives Heizen des Phenols **162** vom Nanopartikel konnte durch diese Methode nachverfolgt und quantifiziert werden.



Schema 65: Reaktion von 4-Aminoantipyrin **155** mit Phenol **162**.

Um die Nanopartikel in einem nicht fluiden Medium zu testen, wurden die Nanopartikel in Agarose eingebettet. Dadurch konnten Temperatur-/Leistungsprofile im induktiven Feld aufgenommen werden. Dies stützt später die Findung der optimalen Bedingungen für Tiermodelle oder klinische Studien.

6.2 Ausblick

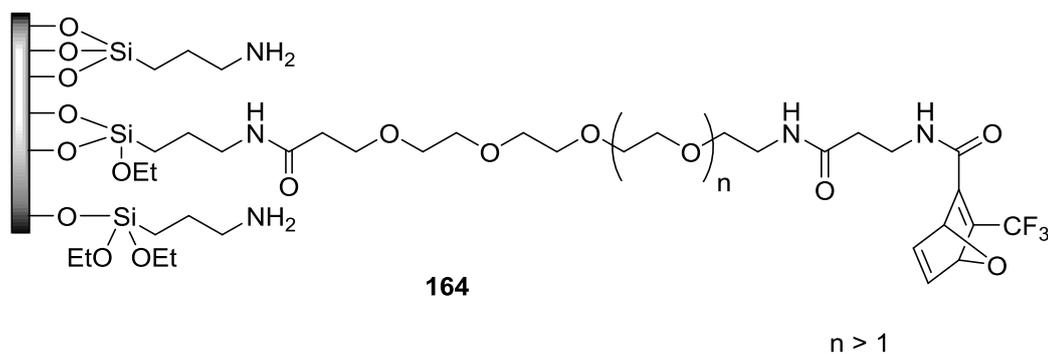
Für die PMP-Folien sollten weiterhin Signalfaktoren getestet werden, die einen selektiven biologischen Effekt auf Endothelzellen haben. Ein Beispiel hierfür wäre das Protein CD31 (*Cluster of Differentiation 31*), auch PECAM1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*), welches für die Adhäsion von Thrombozyten und Endothelzellen verantwortlich ist.¹¹⁶ Das CD 31 könnte dann über die Biotin/Streptavidin-Strategie ohne Denaturierung an der Oberfläche auf den PMP-Folien fixiert werden.

Bei der Biotin/Streptavidin-Strategie ist die Optimierung der Photometrie mit CSDP und Alkalischer Phosphatase notwendig, um eine Aussage über die gebundene Menge an Biotin treffen zu können. Mit einer mikroskopischen Aufnahme dieses Konstruktes könnte dann auch die Verteilung und Homogenität auf der Oberfläche bestimmt werden.

Generell sollte für die Besiedlung mit Endothelzellen und Fibroblasten eine langfristige Überprüfung der Vitalität der Zellen stattfinden und die Gasdurchlässigkeit der besiedelten PMP-Membranen überprüft werden, um einen Einsatz in der ECMO zu gewährleisten. Da die Ergebnisse bis zum Ende dieser Arbeit nur als vorläufig anzusehen sind, sollten die Materialien erneut besiedelt werden, um die Zellzahl zu bestimmen und einen Life-Dead-Assay durchzuführen. Hierdurch würde überprüft, wie gut die Zellen auf dem Material überleben.

Für die Beschichtung von Titanplatten mit c(RGDfK) sollte die PEG-Länge variiert werden. Da mit einer Ketten-Länge von 4 Monomeren schon eine erhebliche Verbesserung der Adhäsionseigenschaften erzielt wurde, könnte mit einer optimierten Kettenlänge die biologische Verfügbarkeit von c(RGDfK) optimiert werden.

¹¹⁶ P. J. Newman, M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, C. Paddock, W. A. Muller *Science* **1990**, *247*, 1212-1219.

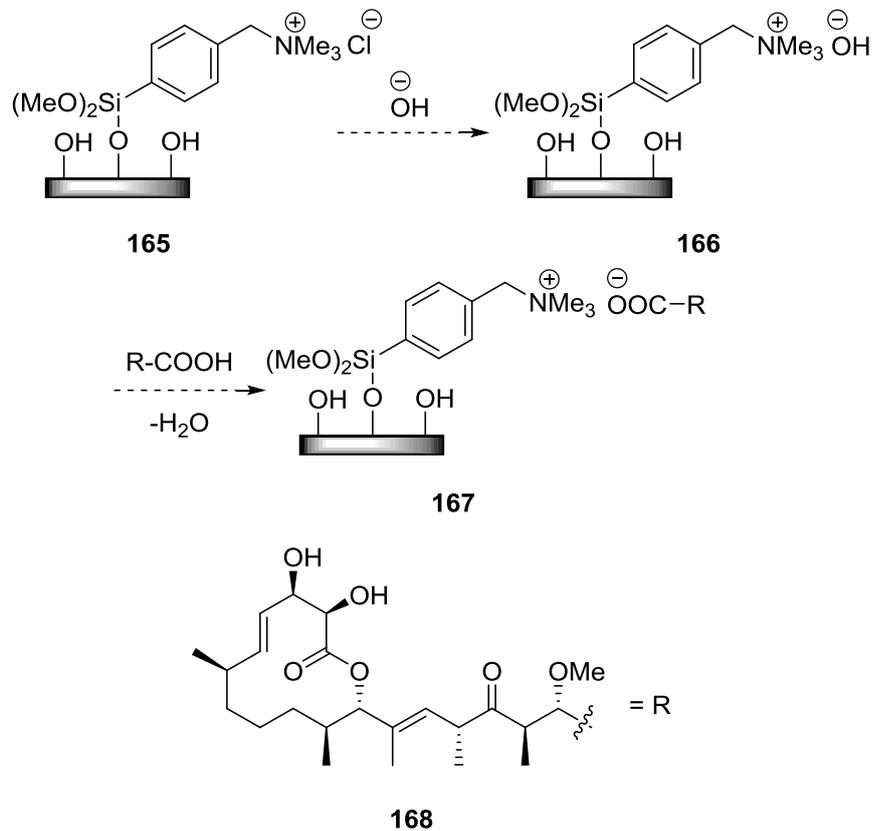


Schema 66: Titanoberfläche mit veränderter PEG-Länge **164**.

Da auch Infektionen, neben der Integration in Gewebe, ein Problem bei Implantationen darstellen, sollte getestet werden, ob beispielsweise *staphylococcus aureus* stärker auf die modifizierte Oberfläche anspricht. Hier kann gegebenenfalls eine Kombination aus einer Wirkstofffreisetzung und dem c(RGDfK) angedacht werden. Auf diesem Wege könnte die Oberfläche ohne Infektion in das Gewebe einwachsen. Da Antibiotika nur eine begrenzte Wirkung bei Biofilmen haben, sollte in diesem Fall auf einen Biofilminhibitor zurückgegriffen werden. Ein potentieller Kandidat für diese Anwendung ist das hochpotente Carolacton **168**.¹¹⁷ Dies könnte über die Anbindung eines Aromaten mit quartärem Ammoniumsalz realisiert werden. Diese Funktionalisierung wurde von Ceylan *et al.* bereits auf Nanopartikeln zur Immobilisierung von katalytisch aktiven Spezies, wie Pd(0), realisiert.¹¹⁸

¹¹⁷ N. Stumpp, P. Premnath, T. Schmidt, J. Ammermann, G. Dräger, M. Reck, R. Jansen, M. Stiesch, I. Wagner-Döbler, A. Kirschning *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5765-5774.

¹¹⁸ S. Ceylan, C. Friese, C. Lammel, K. Mazac, A. Kirschning *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8950-8953.



Schema 67: Mögliche reversible Bindung von Carolacton auf eine Titanoberfläche.

Das Nanopartikel-Ansamitocin-Konjugat ist so weit entwickelt, dass eine Anwendung mit Krebszelllinien *in vitro* und *in vivo* untersucht werden kann. Dabei sollte versucht werden, farbgebende Substanzen neben dem Ansamitocin zu verwenden. Auf diesem Wege könnte die Diffusion der abgelösten Substanz zu den Zellen und im Blutkreislauf des Tiermodells untersucht werden. Allerdings sollte hier die Cu-vermittelte CLICK-Reaktion vermieden werden, damit die Wirkung des Ansamitocins untersucht werden kann, und eventuelle Cu-Rückstände die Ergebnisse nicht verfälschen. Durch Versuche mit entsprechenden Furanen konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Besser wäre hier eine peptidische Bindung zwischen dem Furan und einer fluoreszierenden Substanz.

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Hinweise

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, ACROS ORGANICS, FISHER CHEMICAL, HONEYWELL, RIEDEL-DE HAËN, ROTH, SIGMA ALDRICH, TCI, VWR CHEMICALS, IRIS BIOTECH und SYN PEPTIDE erhalten, und wenn nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Bei Verwendung luft- und feuchtigkeitsempfindlicher Substanzen wurden vor Versuchsdurchführung alle Glasgeräte unter Vakuum ausgeheizt und die Reaktionen unter Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt. Bei sauerstoffsensitiven Reaktionen wurden die Reagenzien nach Ausfrieren im Vakuum (*freeze-pump-thaw degassing*) entgast. Trockenes Tetrahydrofuran wurde über Natrium mit Benzophenon als Indikator getrocknet und frisch destilliert. Dichlormethan, Petrolether und Essigsäureethylester wurden ebenfalls frisch destilliert und die gesamten Arbeiten ausschließlich mit demineralisiertem Wasser durchgeführt. Die Feststoffe wurden im Bereich von 1.00 g bis 1.00 mg auf den Feinwaagen QUINTIX und ATILON der Firma SARTORIUS abgewogen. Bei wässrigen Lösungen handelte es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

7.2 Analytische Methoden

NMR-Spektroskopie

Alle ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten DPX-200 (200 MHz), Advance-400, DPX-400 (400 MHz) und DPX-500 (500 MHz) der Firma BRUKER gemessen. Es wurden dabei deuterierte Lösemittel von DEUTERO verwendet. Das Restprotonensignal wurde zur Kalibrierung der Spektren verwendet und die entsprechenden chemischen Verschiebungen der Arbeit von GOTTLIEB *et al.* entnommen und jeweils für alle Lösemittel angegeben.¹¹⁹ Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und die Kopplungskonstanten in Hz. Die Aufspaltung der Signale werden folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Für den Substitutionsgrad der Kohlenstoffatome wurden folgende Abkürzungen verwendet: p = primär, s = sekundär, t = tertiär, q = quartär.

¹¹⁹ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.

Die Nummerierung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome in Molekülen erfolgte pragmatisch und ist entsprechend angegeben. Zur vollständigen Interpretation der Spektren wurden für verschiedene Substanzen zusätzlich ^1H - ^1H -Korrelationspektren (COSY) und ^1H - ^{13}C -Korrelationspektren (HSQC, HMBC) verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-beschichteten Aluminiumfolien, ALUGRAM[®]XTRA SIL G/UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Dabei wurden die Spots mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder verschiedenen Färbereagenzien unter Wärmezufuhr visualisiert.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mittels Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL (Korngröße 40-63 μm) und leichtem Überdruck durchgeführt. Zudem wurde zur Größenausschlusschromatographie SephadexTM LH-20 Kieselgel und Methanol als Lösemittel verwendet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Präparative HPLC wurde an einer VARIAN (HPLC-Anlage (Pumpen preStar Model 218, variabler Wellenlängendetektor proStar [$\lambda = 284 \text{ nm}$]) mit paralleler Massendetektion (MICROMASS Typ ZMD ESI Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phase **C18** (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm 250 mm \cdot \varnothing 25 mm, mit passender Vorsäulenkartusche 10 μm , 30 mm \cdot \varnothing 20 mm) durchgeführt.

Als Lösemittel wurden sowohl membran-filtriertes, bidestilliertes Wasser, sowie käuflich erhältliche HPLC-Qualität-Lösemittel eingesetzt. Alle Lösemittel wurden vor ihrer Verwendung im Ultraschallbad entgast, sowie in einem Verhältnis von 1:1000 mit Ameisensäure gemischt. Die charakteristischen Parameter (Eluentenzusammensetzung, Gradient und Retentionszeit) der Trennung sind in der Versuchsdurchführung angegeben.

Infrarot-Spektren

Infrarot-Spektren wurden mit einem ATR-FT-IR Spektrometer (Vector 22) von BRUKER oder einem IRAffinity-1S Spektrometer von SHIMADZU aufgenommen.

UV/VIS-Spektren

UV/VIS-Spektren wurden an einem AGILENT 8453 Spektrophotometer aufgenommen.

Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden Acquity UPLC (WATERS) Anlage gekoppelt mit einem Q-ToF Premier Massenspektrometer (WATERS) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI). Alternativ wurden die Messungen mit einem MICROMASS LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus einer HPLC-Anlage (WATERS, Alliance 2695). Angegeben werden sowohl die berechnete, als auch die gefundene Masse.

Plasmachemie

Die Plasmabehandlung von Oberflächen wurde mit Geräten der Firma PLASMATREAT, Steinhagen (Germany) durchgeführt. 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.* beschrieben.⁶⁵ Die Parameter zur Behandlung der verschiedenen Oberflächen wurden in 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 nichtmonochromatische $MgK\alpha$ 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 x 2 mm, sodass sich ein Auflösungsvermögen von 0.01 ergibt. Die jeweiligen Pass-Energien sind für jedes Spektrum separat aufgeführt.

Schmelzpunkte

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

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.

MAGSILICA[®]

Die Trennung der Partikel vom Lösemittel erfolgte nach der Reaktion durch magnetische Fixierung der Nanopartikel durch ein von außen an das Reaktionsgefäß gelegten starken Magneten. Durch die Ansammlung der Partikel in dessen Nähe konnte der Überstand abdekantiert werden. Analog wurde für die Reinigung mit THF verfahren.

Mikrowellengerät

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

Induktives Heizen

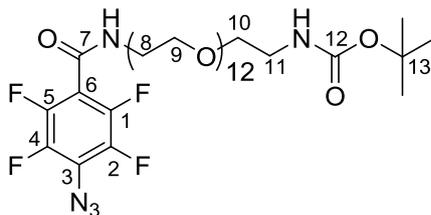
Für die Mittelfrequenzerwärmung [IH(MF)] wurde das Gerät EW5 (IFF GMBH, Ismaning) mit einer Maximalleistung von 7.0 kW verwendet. Bei dem wassergekühlten Gerät kann die Frequenz stufenlos von 8 bis 25 kHz eingestellt werden. Mit der stufenlosen Einstellung der Pulsweitenumodulation von 100 bis 1000 Promille kann die eingestrahelte Leistung eingestellt werden, wobei Werte über 750 Promille nicht überschritten werden sollten. Als Induktor wurde eine Schwingkreisspule verwendet, da es sich um einen Prototyp handelt, liegt keine Typen- oder Seriennummer vor.

Temperaturmessung im induktiven Magnetfeld

Für die Messung wurde ein digitales Infrarotthermometer des Typs GIM 3590 optris LaserSight der Firma GREISINGER ELECTRONIC GmbH verwendet.

7.3 Synthesen

7.3.1 PFPA-PEG₁₂NHBoc (35T)

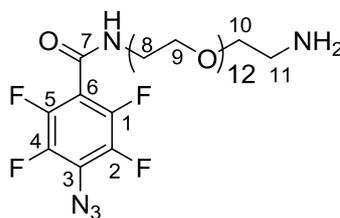


In 20 mL Chloroform wurden 265 mg (0.41 mmol, 1.00 Äq.) NH₂PEG₁₂NHBoc und 164 mg (0.50 mmol, 1.20 Äq.) 4-Azidotetrafluorobenzoessäure-*N*-succinimidylester gelöst. Es wurde für zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels SephadexTM-Säulenchromatographie (Methanol/LH-20) isoliert. Das Produkt wurde als farbloses Öl in einer Ausbeute von 74 % (261 mg, 0.30 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm) δ = 6.96 (s, 1H, NH), 5.04 (s, 1H, NH), 3.15-3.96 (m, 48H, H-8 bis H-11), 1.43 (s, 9H, Boc) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁶⁶

7.3.2 PFPA-PEG₁₂NH₂ (36)

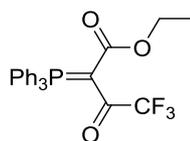


In 6 mL Essigsäureethylester wurden 241 mg (0.29 mmol, 1.0 Äq.) PFPA-PEG₁₂NHBoc gelöst und langsam mit 3.6 mL wässriger Salzsäure (10 %) versetzt. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde im Vakuum das Lösemittel entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl in einer quantitativen Ausbeute (210 mg, 0.29 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm) δ = 7.89 (s, 2H, NH₂), 6.26 (s, 1H, NH), 3.19-3.87 (m, 48H, H-8 bis H-11) ppm.

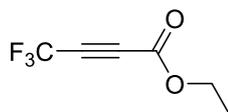
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁶⁶

7.3.5 Ethyl-4,4,4-trifluoro-3-oxo-2-(triphenylphosphoranylyliden)butanoat (40)



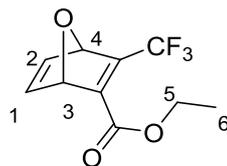
Es wurden 50.0 g (117 mmol, 1.00 Äq.) Ethoxycarbonylmethyl-triphenylphosphoniumbromid vorgelegt und in 125 mL THF (absolut) suspendiert. Die Mischung wurde mit 40.6 mL (293 mmol, 2.50 Äq.) Triethylamin versetzt und für 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und 19.8 mL (140 mmol, 1.20 Äq.) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Es wurde für 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem THF so lange gewaschen bis der Filterkuchen farblos blieb. Das gelbe Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 125 mL kaltem Wasser versetzt und kräftig geschüttelt. Hierbei fiel ein gelber Feststoff aus. Über Nacht wurde diese Suspension im Kühlschrank gelagert, damit die Kristallisation abgeschlossen werden konnte. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten und ohne Charakterisierung weiterverwendet.

7.3.6 Ethyl-4,4,4-trifluorobut-2-inoat (41)



Es wurden 32.9 g (71.5 mmol, 1.00 Äq.) Ethyl-4,4,4-trifluoro-3-oxo-2-(triphenylphosphoranylyliden)butanoat vorgelegt. Der Feststoff wurde bei ca. 170 °C geschmolzen. Im Vakuum von 15 mbar wurde für 40 min auf 180 – 230 °C geheizt. Das Produkt der Pyrolyse wurde bei -78 °C als gelbe, zähe Flüssigkeit gesammelt. Es wurde eine Ausbeute von 41 % (52.5 mmol, 8.70 g) des Rohprodukts über drei Stufen erreicht, welches unverzüglich in der folgenden Reaktion eingesetzt wurde.

7.3.7 3-Trifluoromethyl-7-oxa-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carbonsäureethylester (42)



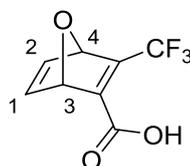
In ein Mikrowellenglas wurden 8.70 g (52.5 mmol, 1.00 Äq.) Ethyl-4,4,4-trifluorbut-2-inoat und 4.55 mL (62.9 mmol, 1.20 Äq.) Furan vorgelegt. Die Mischung wurde für 30 min bei 60 °C unter Mikrowellenstrahlung gerührt. Anschließend wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (DCM) gereinigt. Das Produkt wurde als rotes Öl mit einer Ausbeute von 57 % (29.9 mmol, 7.00 g) erhalten.

R_f (DCM) = 0.69.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 7.29$ (dd, $J = 5.3, 1.9$ Hz, 1H, H-1), 7.20 (dd, $J = 5.3, 1.9$ Hz, 1H, H-2), 5.74 (dq, $J = 1.2, 2.8$ Hz, 1H, H-3), 5.66 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-4), 4.20 – 4.37 (m, 2H, H-5), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-6) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷³

7.3.8 3-Trifluoromethyl-7-oxa-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carbonsäure (43)



Es wurden 7.00 g (29.9 mmol, 1.00 Äq.) 3-Trifluoromethyl-7-oxa-bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carbonsäureethylester in einer Mischung aus 54 mL THF und 360 mL Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 105 mL 1M wässriger LiOH-Lösung versetzt. Zunächst wurde für 30 min bei 0 °C gerührt, dann bei RT für weitere 60 min. Die hellgelbe Lösung wurde mit 70 mL EtOAc versetzt. Danach wurde die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 1M HCl auf einen pH-Wert von etwa 2 - 3 gebracht und mit Diethylether das Produkt extrahiert. Die so gewonnene organische Phase

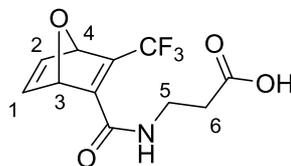
wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Das Produkt lag als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 81 % (24.3 mmol, 5.01 g) vor.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 7.31$ (dd, $J = 5.3, 1.9$ Hz, 1H, H-1), 7.22 (dd, $J = 5.3, 1.9$ Hz, 1H, H-2), 5.74 (m, 1H, H-4), 5.69 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-3) ppm.

S_{mp} : 109 °C (Lit.: 107.5-109.5 °C).

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.^{35,73}

7.3.9 3-(Trifluoromethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamidpropan-säure (44)



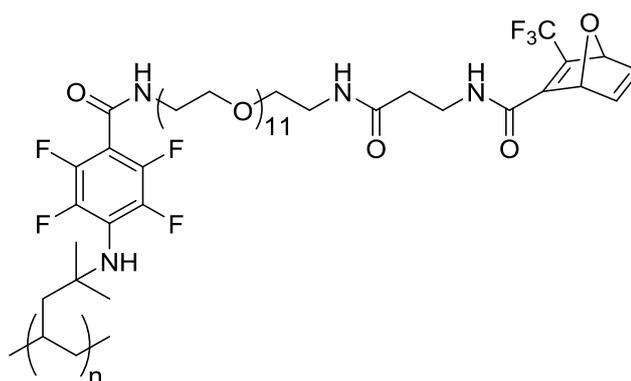
Unter Argon-Atmosphäre wurde 1.00 g (4.81 mmol, 1.00 Äq.) 3-Trifluoromethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carbonsäure in 10 mL CH_2Cl_2 gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 0.68 g (4.81 mmol, 1.00 Äq.) β -Alaninmethylesterhydrochlorid, 1.19 g (9.61 mmol, 2.00 Äq.) DMAP und 1.02 g (5.29 mmol, 1.10 Äq.) EDC·HCl zugegeben und für 25 min gerührt. Danach wurde das Kältebad entfernt und die gelb-braune Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Das Gemisch wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit konzentrierter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (PE/EtOAc = 1:1, $R_f = 0.53$) gereinigt. 0.93 g (3.19 mmol) des Rohproduktes wurden in 5 mL THF aufgenommen und mit 0.5 mL 0.25 M wässriger LiOH-Lösung versetzt. Nach 90 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde drei Mal mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1M HCl-Lösung auf pH = 2 gebracht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde danach über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösemittel entfernt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff in einer Ausbeute von 40 % (1.94 mmol, 0.54 g) erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.33 (dd, *J* = 5.3, 1.9 Hz, 1H, H-1), 7.15 (dd, *J* = 5.3, 1.9 Hz, 1H, H-2), 6.50 (s, 1H, NH), 5.64 (dq, *J* = 1.5, 1.3, 3.5 Hz, 2H, H-3, H-4), 3.52 – 3.76 (m, 2H, H-5), 2.66 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-6) ppm.

S_{mp}: 144-147 °C (Lit: 145-149 °C).

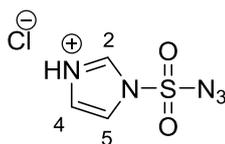
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷³

7.3.10 PMP-Folien (48)



In 30 mL DMF wurden 33.2 mg (0.13 mmol, 1.00 Äq.) Oxanorbornadien (**44**), 30.2 mg (0.26 mmol, 2.00 Äq.), 54.2 mg (0.26 mmol, 2.00 Äq.) Dicyclocarbodiimid und 111 µL (0.64 mmol, 5.00 Äq.) DiPEA gelöst. Zu dieser Lösung wurden 12 (6 x 3 cm) PMP-Folien (**38**) gegeben und 3 d bei Raumtemperatur unter wiederholtem Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurden die Folien mit Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

7.3.11 Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid (52)



In 30 mL Acetonitril wurden 1.52 g (23.2 mmol, 1.00 Äq.) Natriumazid vorgelegt. Bei 0 °C wurden langsam 1.86 mL (23.2 mmol, 1.00 Äq.) Sulfurylchlorid zugetropft, wobei sich ein gelblicher Niederschlag bildete. Anschließend wurde für 16 h bei RT gerührt. Nachdem die Suspension auf 0 °C gekühlt wurde, konnten langsam 3.00 g (44.1 mmol, 1.90 Äq.) Imidazol zugegeben werden. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch in 50 mL EtOAc aufgenommen. Nach Waschen mit Wasser und wässriger NaHCO₃-Lösung wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. In 10 mL Ethanol wurden bei 0 °C über 15 min 2.48 mL (34.8 mmol, 1.50 Äq.) Acetylchlorid zugetropft und 10 min gerührt. Die erhaltene Lösung wurde bei 0 °C über 20 min in das gewaschene und getrocknete Reaktionsgemisch getropft. Dabei schieden sich farblose Kristalle ab. Die erhaltene Suspension wurde abfiltriert und der Feststoff mit wenig EtOAc gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Produkt als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 62 % (3.03 g, 14.5 mmol) erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 9.25 (s, 1 H, H-1), 7.95 (m, 1 H, H-5), 7.53 (m, 1 H, H-4) ppm.

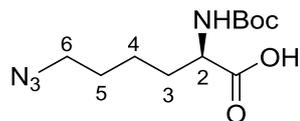
IR (ATR, neat): $\tilde{\nu}$ = 3102, 2169 (stark), 1910, 1518, 1508, 1426, 1322, 1298, 1229, 119, 1160, 1137, 1103, 1068, 968, 900, 837, 777, 632 cm⁻¹.

S_{mp} = 101 °C (Lit.: 99-104 °C)¹²⁰

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷⁰

¹²⁰ <http://synquestlabs.com/product/id/71037.html> (Zugriff: 27.09.2015)

7.3.12 N^2 -(*tert*-Butoxycarbonyl)- N^6 -diazido-D-lysin (54)



In 3 mL Methanol wurden 98 mg (0.40 mmol, 1.00 Äq.) (*tert*-Butoxycarbonyl)-D-lysin, 138 mg (1.00 mmol, 2.50 Äq.) K_2CO_3 und 1 mg (4.00 μ mol, 0.01 Äq.) $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ vorgelegt. Nach Zugabe von 100 mg (0.48 mmol, 1.20 Äq.) Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid wurde für 16 h bei RT gerührt. Mit konzentrierter Salzsäure wurde die Mischung angesäuert (pH = 2) und mit EtOAc drei Mal extrahiert. Die erhaltene organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 96 % (104.9 mg, 0.39 mmol) erhalten.

1H -NMR (400 MHz, D_2O , $H_2O = 4.79$ ppm): $\delta = 4.02$ - 4.11 (m, 1H, H-2) 3.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-6), 1.81- 1.97 (m, 1H, H-3, H-5), 1.58- 1.76 (m, 3H, H-3, H-5), 1.45- 1.54 (m, 2H, H-4), 1.43 (s, 9H, *Boc*) ppm.

S_{mp} : 185-187 °C unter Zersetzung (Lit.: keine Angabe) .

IR (ATR, neat): $\tilde{\nu} = 3281, 2960, 2096$ (stark), 1693, 1514, 1367, 1255, 1161, 1047, 1003, 923, 857, 771, 659 cm^{-1} .

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹²¹

7.3.13 Synthese von Peptid-Aziden

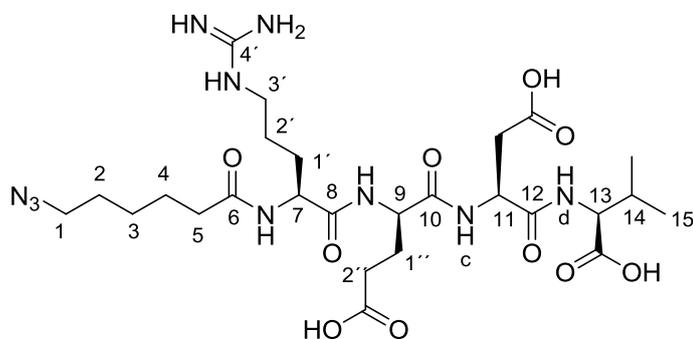
Allgemeine Vorschrift:

In 5 mL/mmol Methanol/Wasser (1:1) wurden 1.00 Äq. Peptid, 1.20 Äq. K_2CO_3 und 0.01 Äq. $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ vorgelegt und langsam 1.20 Äq. Imidazol-1-sulfonylazidhydrochlorid zugegeben. Anschließend wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel

¹²¹ O. I. Bol'schakov, I. O. Lebedyeva, A. R. Katritzky *Synthesis* **2012**, 44, 2926-2932.

wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

7.3.13.1 REDV-N₃ (56)

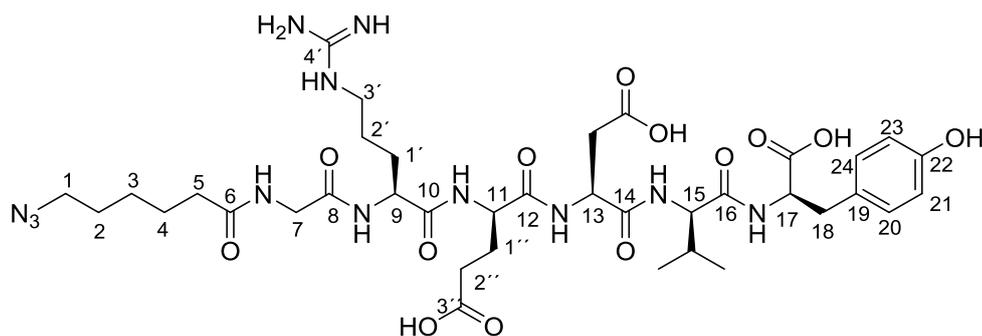


3 mL Methanol, 25.0 mg (39.6 μmol , 1.00 Äq.) REDV-NH₂, 14.0 mg (99.1 μmol , 2.50 Äq.) K₂CO₃, 0.10 mg (0.40 μmol , 0.01 Äq.), CuSO₄·5 H₂O und 10.0 mg (47.6 μmol , 1.20 Äq.) Imidizaol-1-sulfonylazidhydrochlorid wurden zusammen gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach der Trennung mittels HPLC (C18) (Gradient Wasser/Methanol 95:5 → 40:60 in 45 min → 0:100 in 1 min dann 34 min MeOH halten, 3.0 mL/min) ($t_R = 31.0$ -39.0 min) wurde ein farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 44 % (11 mg, 17.4 μmol) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): $\delta = 8.31$ (s, 1 H), 4.86 (s, 1 H), 4.59-4.66 (m, 1 H), 4.49 (dd, $J = 9.6, 4.6$ Hz, 1 H), 4.40 (dd, $J = 8.0, 5.2$ Hz, 1 H), 4.26 (s, 1 H) 3.72 (s, 1 H), 3.66 (s, 2 H), 3.45 (dt, $J = 3.2, 1.6$ Hz, 0.5 H), 3.33-3.34 (m, 1 H), 3.29 (s, 1 H), 3.24-3.28 (m, 1 H) 3.17 (dt, $J = 3.2, 1.6$ Hz, 0.5 H) 3.10-3.16 (m, 1 H), 2.75-2.82 (m, 1 H), 2.63 (dd, $J = 18.1$ Hz, 4.5 Hz, 1 H), 2.40-2.51 (m, 2 H), 2.27 (t, 3 H), 2.11-2.24 (2 H), 2.03-2.11 (m, 1 H), 1.86-1.96 (m, 1 H) 1.70-1.81 (m, 2 H), 1.58-1.67 (m, 5 H), 1.38-1.45 (m, 2 H) 1.31-1.37 (m, 1 H), 1.30 (s, 1 H), 0.94 (m, 6 H) ppm.

Während der Messung des ¹³C-NMR-Spektrum fiel die Substanz im NMR-Röhrchen aus, sodass eine eindeutige NMR-Analytik und die entsprechende Zuordnung nicht möglich war.

HRMS: m/z berechnet für C₂₆H₄₄N₁₀O₁₀ [M+H⁺] 657.3321, gefunden 657.3322.

7.3.13.2 GREDVY-N₃ 58

4 mL Methanol/H₂O (1:1), 20 mg (24 μ mol, 1.0 $\ddot{\text{A}}$ q.), GREDVY-NH₂, 9.0 mg (60 μ mol, 2.5 $\ddot{\text{A}}$ q.), K₂CO₃, 0.05 mg (0.2 μ mol, 0.01 $\ddot{\text{A}}$ q.), CuSO₄·5 H₂O, 6.0 mg (29 μ mol, 1.2 $\ddot{\text{A}}$ q.) und Imidizaol-1-sulfonylazidhydrochlorid wurden zusammen gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach der Trennung mittels HPLC (C18) (Gradient Wasser/Methanol 90:10 (10 min) → 5:95 in 80 min → 0:100 in 5 min dann 5 min MeOH halten, 15.0 mL/min) (t_R = 42.0-50.0 min) wurde ein farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 71 % (15 mg, 17 μ mol) erhalten.

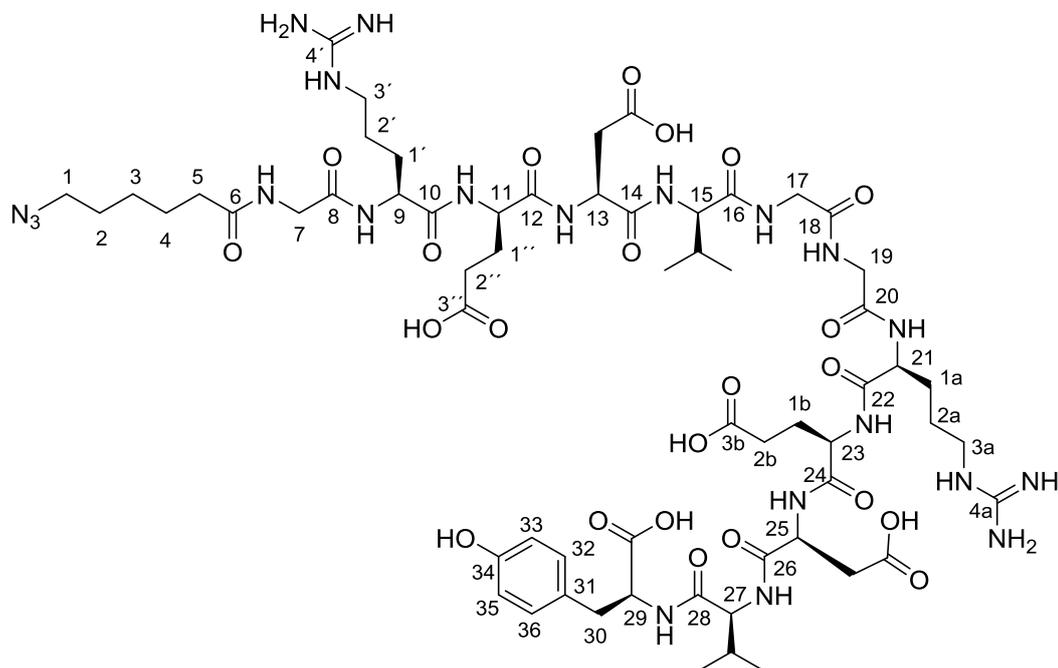
¹H-NMR (500 MHz, D₂O, H₂O = 4.79 ppm): δ = 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-20, H-24), 6.80 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-21, H-23), 4.62 (dd, J = 7.9, 5.5 Hz, 1H, H-13), 4.45 (dd, J = 8.6, 5.1 Hz, 1H, H-17), 4.37 – 4.32 (m, 2H, H-9, H-11), 4.05 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-15), 3.91 (dd, J = 37.7, 16.8 Hz, 2H, H-7), 3.30 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H-3'), 3.23 – 3.13 (m, 2H, H-18), 3.09 (dd, J = 14.0, 5.0 Hz, 1H, H-18), 2.86 (dd, J = 14.0, 8.6 Hz, 1H, CH₂COOH), 2.76 – 2.63 (m, 2H, CH₂COOH, CH(CH₃)₂), 2.44 – 2.34 (m, 2H, H-2''), 2.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-2''), 2.14 – 2.06 (m, 1H, H-1'), 2.02 – 1.82 (m, 4H, H-5, H-1'), 1.70-1.77 (m, 1H, H-1'), 1.60 (m, 7H, H-2, H-3, H-4, H-2'), 1.42 – 1.30 (m, 3H, H-2, H-3), 0.81 (dd, J = 12.1, 6.8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O): δ = 178.4 (q, C-3''), 177.6 (q, C-6), 173.5 (q, COOH), 172.9 (q, C-14), 172.2 (q, C-12), 172.1 (q, C-10), 171.6 (q, C-16), 156.7 (q, C-4'), 154.0 (q, C-22), 130.6 (t, C-20, C-24), 129.1 (q, C-19), 115.2 (t, C-21, C-23), 59.3 (t, C-17), 55.8 (t, C-15), 53.2 (t, C-13), 50.9 (t, C-9, C-11), 50.8 (s, C-1), 42.4 (s, C-7), 40.4 (s, C-3'), 36.9 (s, C-18), 36.6 (s, C-5), 35.2 (s, CH₂COOH), 31.1 (t, CH(CH₃)₂), 30.1 (s, C-2''), 28.2 (s, C-2), 27.6 (s, C-1'), 26.4 (s, C-1''), 25.4 (s, C-3), 24.6 (s, C-4), 24.2 (s, C-2'), 18.3 (p, CH(CH₃)₂), 17.3 (p, CH(CH₃)₂) ppm.

IR (ATR, neat): $\tilde{\nu}$ = 3242, 2932, 2100, 1638, 1560, 1516, 1448, 1394, 1252, 1031 cm⁻¹.

HRMS: m/z berechnet für $C_{36}H_{56}N_{12}O_{13}$ $[M+H^+]$ 877.4168, gefunden 877.4166.

7.3.13.3 GREDVGGREDVY- N_3 60



4 mL Methanol/ H_2O (1:1), 10 mg (6.8 μmol , 1.0 Äq.), GREDVGGREDVY- NH_2 , 3.0 mg (17 μmol , 2.5 Äq.) K_2CO_3 , 0.01 mg (0.07 μmol , 0.01 Äq.), $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 2.0 mg (8.2 μmol , 1.2 Äq.) und Imidizaol-1-sulfonylazidhydrochlorid wurden zusammen gegeben und für 24 h bei RT gerührt. Nach der Trennung mittels HPLC (C18) (Gradient Wasser/Methanol 90:10 (10 min) \rightarrow 5:95 in 80 min \rightarrow 0:100 in 5 min dann 5 min MeOH halten, 15.0 mL/min) ($t_R = 39.0\text{-}46.0$ min) wurde ein farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 78 % (8.0 mg, 5.3 μmol) erhalten.

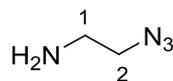
1H NMR (500 MHz, D_2O , $H_2O = 4.79$ ppm) δ 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-33, H-35), 6.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-32, H-36), 4.65 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-25), 4.63 – 4.58 (m, 1H, H-13), 4.42 (dd, $J = 8.1, 5.1$ Hz, 1H, H-29), 4.37 – 4.28 (m, 4H, H-9, H-11, H-21, H-23), 4.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-27), 4.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-15), 4.00 – 3.85 (m, 6H, H-7, H-17, H-19), 3.33-3.27 (m, 2H, H-3', H-3a), 3.22 – 3.14 (m, 4H, H-3', H-3a, H-30), 3.08 (dd, $J = 14.0, 4.9$ Hz, 1H, H-30), 2.85 (dd, $J = 13.9, 8.5$ Hz, 1H, CH_2COOH), 2.58-2.78 (m, 5H, CH_2COOH , $CH(CH_3)_2$), 2.37 – 2.27 (m, 4H, H-2'', H-2b), 2.19 – 2.03 (m, 3H, H-5, H-1'', H-1a), 2.02 – 1.82 (m, 5H, H-1', H-1a, H-1'', H-1b), 1.80 – 1.69 (m, 2H, H-1', H-1a), 1.65 – 1.55 (m, 9H, H-1, H-2, H-4, H-2', H-2a), 1.41 – 1.31 (m, 3H, H-2, H-3),

0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, C-15 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.81 (dd, $J = 14.0, 6.7$ Hz, 6H, C-27 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) $\delta = 177.6$ (q, C-6), 174.1 (q, C-18, C-20), 173.7 (q, C-18, C-20), 173.5 (q, COOH), 173.4 (q, CH_2COOH), 173.2 (q, CH_2COOH), 173.0 (q, C-14, C-26), 172.4 (q, C-12, C-24), 172.0 (q, C-10, C-24), 171.6 (q, C-14, C-26), 171.4 (q, C-16, C-28), 156.6 (q, C-4', C-4a), 154.0 (q, C-34), 130.5 (C-32, C-36), 129.3 (q, C-31), 115.2 (t, C-33, C-35), 59.7 (t, C-15, C-27), 59.3 (t, C-15, C-27), 56.2 (t, C-29), 53.6 (t, C-9, C-11, C-21, C-23), 53.3 (t, C-9, C-11, C-21, C-23), 53.2 (t, C-9, C-11, C-21, C-23), 51.1 (s, C-1), 50.9 (s, C-1), 40.4 (s, C-3', C-3a), 36.7 (s, C-5, C-30), 35.2 (s, CH_2COOH), 30.1 (s, C-2'', C-2b), 29.7 (s, C-2'', C-2b), 28.2 (s, C-2), 27.6 (s, C-1', C-1a), 26.8 (s, C-1'', C-2b), 26.8 (s, C-1'', C-2b), 25.4 (s, C-3), 24.7 (s, C-4), 24.2 (s, C-2', C-2a), 24.2 (s, C-2', C-2a), 18.3 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 17.3 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{95}\text{N}_{21}\text{O}_{23}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 1490.6988, gefunden 1490.6975.

7.3.14 2-Azidethan-1-amin (68)



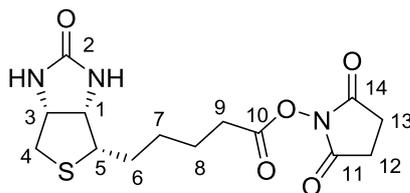
2.00 g (17.2 mmol, 1.00 Äq.) 2-Chlorethylaminhydrochlorid und 3.36 g (51.7 mmol, 3.00 Äq.) Natriumazid wurden in 15 mL Wasser gelöst und für 16 h bei 75 °C gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit 3.00 g Kaliumhydroxid versetzt und drei Mal mit 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum (>300 mbar, da Produkt leicht flüchtig) eingengt. Es wurden 93 % (15.9 mmol, 1.37 g) eines farblosen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 3.30$ (t, 2H, H-2), 2.82 (t, 2H, H-1), 1.29 (s, 2H, NH_2) ppm.

IR (ATR, neat): $\tilde{\nu} = 3371, 2940, 2864, 2091$ (stark), 1596, 1465, 1344, 1285, 847, 631 cm^{-1} .

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷⁴

7.3.15 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl,5-[(4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno(3,4-*d*)imidazol-4-yl]pentanoat

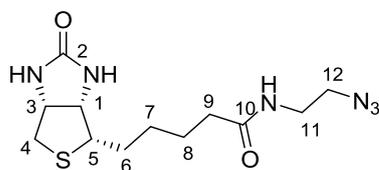


Unter Argonatmosphäre wurden 0.50 g (2.05 mmol, 1.00 Äq.) Biotin in 50 mL DMF (abs.) gelöst. Die Lösung wurde mit 0.28 g (2.46 mmol, 1.20 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid und 0.47 g (2.46 mmol, 1.20 Äq.) EDC·HCl versetzt und für 72 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit einer wässrigen gesättigten Natriumcarbonat-Lösung und einer wässrigen gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wurden 92 % (1.90 mmol, 0.65 g) des Produktes als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO = 2.50 ppm): δ = 8.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 6.42 (s, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, NH), 4.28-4.32 (m, 1H, H-1), 4.12-4.17 (m, 1H, H-3), 3.07-3.14 (m, 1H, H-12), 2.92-3.05 (m, 1H, H-4), 2.78-2.87 (m, 5H, H-4, H-12, H-13), 2.67 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-4), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H, H-4), 1.58-1.70 (m, 3H, H-8, H-9), 1.35 - 1.55 (m, 3H, H-7, H-8) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷⁴

7.3.16 *N*-(2-Azidoethyl)-5-[(4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno(3,4-*d*)imidazol-4-yl]-pentanamid (70)



61 mg (0.49 mmol, 1.40 Äq.) wurden in 4 mL DMF (abs.) gelöst. 49 µL (0.35 mmol, 1.00 Äq.) Triethylamin und 119 mg (0.35 mmol, 1.00 Äq.) 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl,5-

((4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoat wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei RT gerührt. Unter vermindertem Druck wurde das Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel (Aceton/MeOH 10:1) gereinigt. Es wurden 67 % (0.21 mmol, 73 mg) des Produktes als farblose kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO = 2.50 ppm): δ = 8.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 6.42 (s, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, NH), 4.30 (dd, *J* = 7.6, 5.2 Hz, 1H, H-1), 4.10-4.15 (m, 1H, H-3), 3.23 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-12), 3.05-3.13 (m, 1H, H-11), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H, H-4), 2.56 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H-4), 2.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2), 1.55-1.66 (m, 1H, H-9), 1.40-1.55 (m, 3H, H-7, H-9), 1.22-1.40 (m, 2H, H-8) ppm.

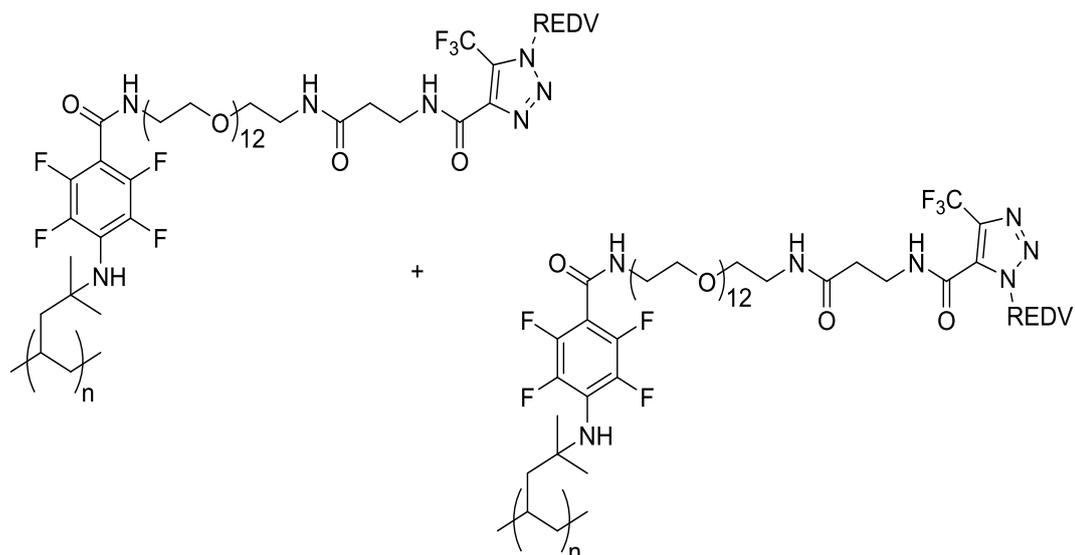
¹³C-NMR: (100 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO = 39.52 ppm): δ = 172.4 (q, C-10), 162.7 (q, C-2), 61.0 (t, C-3), 59.2 (t, C-1), 55.4 (t, C-5), 50.0 (s, C-12), 38.1 (s, C-11), 35.1 (s, C-6), 28.2 (s, C-8), 28.0 (s, C-9), 25.1 (s, C-7), ppm.

IR (ATR, neat): $\tilde{\nu}$ = 3217, 2926, 2820, 2094 (stark), 1697, 1641, 1545, 1460, 1263 cm⁻¹.

Smp: 137 °C (Lit.: keine Angabe).

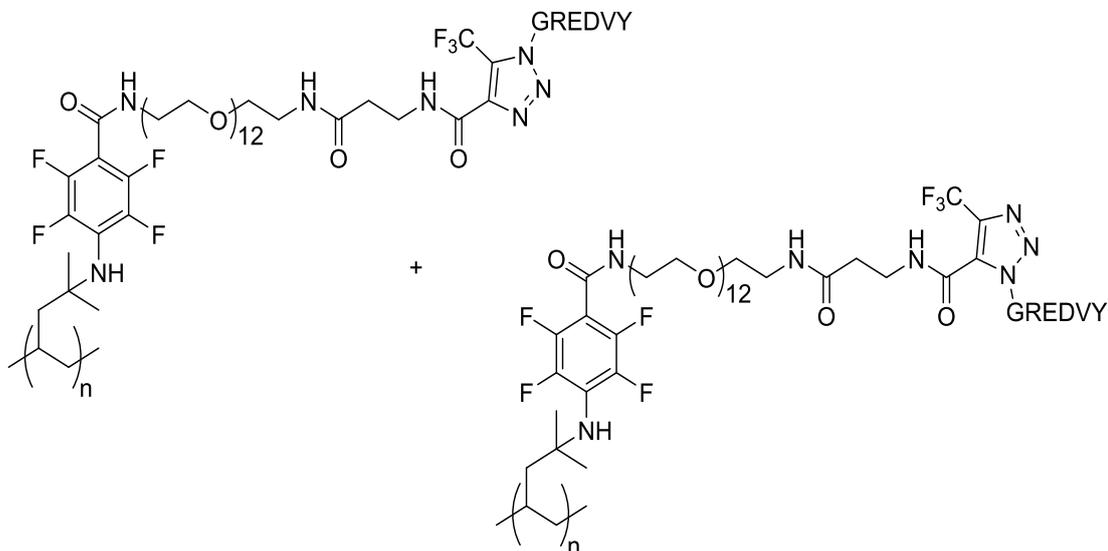
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁷⁴

7.3.18 PMP-Folie (71a/b)

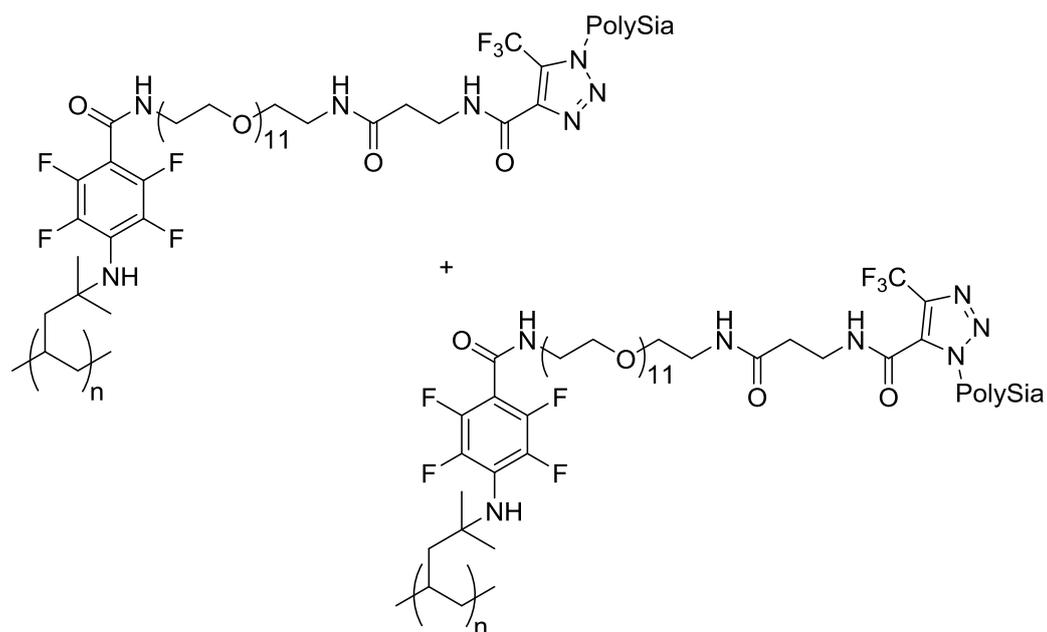


In 10 mL Wasser/Methanol (1:1) wurden 3 mg (2.4 μmol) REDV(N₃) gelöst. Vier PMP-Folien (**48**) wurden für drei Tage bei Raumtemperatur unter wiederholtem Schwenken in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Folien mit Methanol gewaschen und getrocknet. Sollten die Folien für biologische Tests verwendet werden, wurde zusätzlich mit 2-Propanol gewaschen.

7.3.19 PMP Folie (72a/b)



7.3.21 PMP-Folie (74a/b)



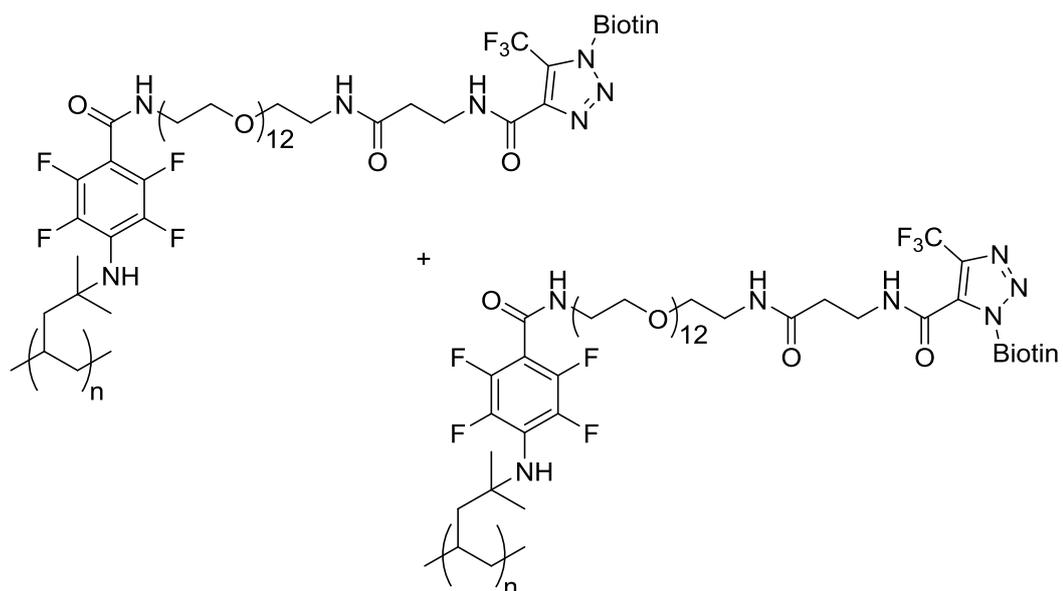
Variante A

Vier PMP-Folien (**48**) wurden in eine Lösung aus 4.0 mg (7.6 μmol) *N*-(4-Azidobutyl)-PolySia (**62**) und 20 mL Wasser gegeben und für 3 Tage unter wiederholtem Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurden die Folien mit Methanol gewaschen und getrocknet. Sollten die Folien für biologische Tests verwendet werden, wurde zusätzlich mit 2-Propanol gewaschen.

Variante B

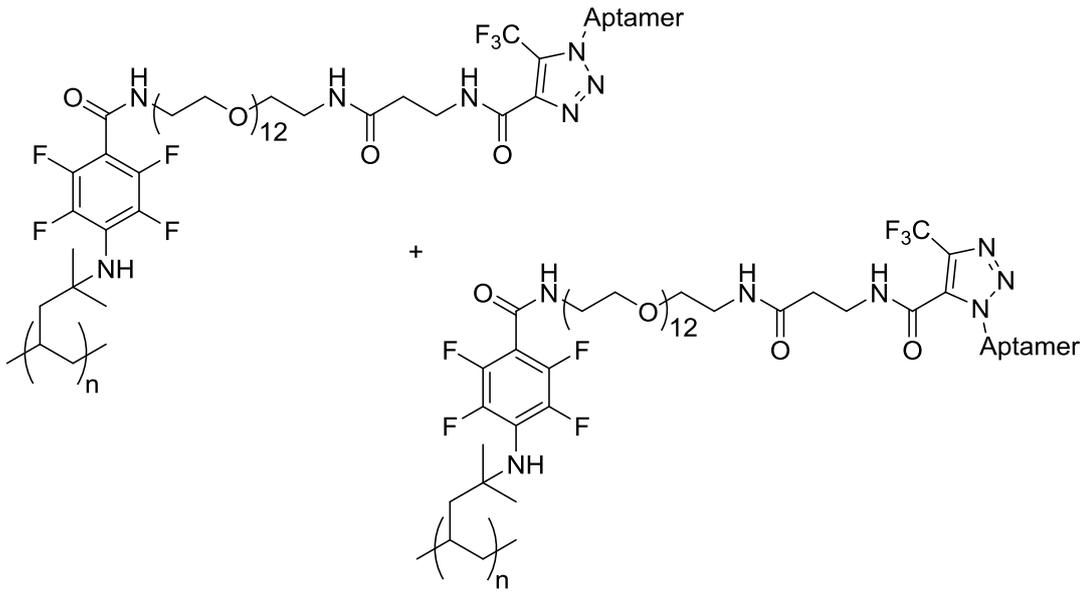
Vier PMP-Folien (**48**) wurden in eine Lösung aus 12.0 mg (22.8 μmol) *N*-(4-Azidobutyl)-PolySia (**62**) und 20 mL Wasser gegeben und für 3 Tage unter wiederholtem Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurden die Folien mit Methanol gewaschen und getrocknet. Sollten die Folien für biologische Tests verwendet werden, wurde zusätzlich mit 2-Propanol gewaschen.

7.3.22 PMP-Folie (75a/b)



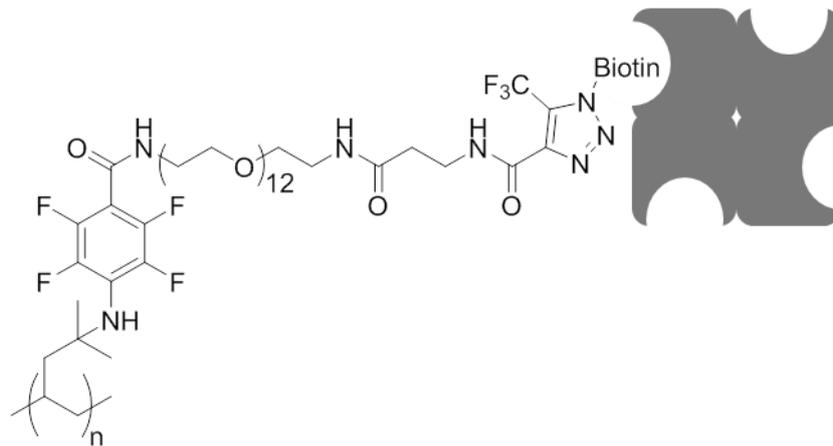
In 20 mL Wasser/Methanol (4:1) wurden 5 mg (17.4 μmol) *N*-(2-azidoethyl)-5-([4*S*]-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamid gelöst. In diese Lösung wurden vier PMP-Folien (**48**) gegeben und für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Folien mit Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet.

7.3.23 PMP-Folie (86a/b)



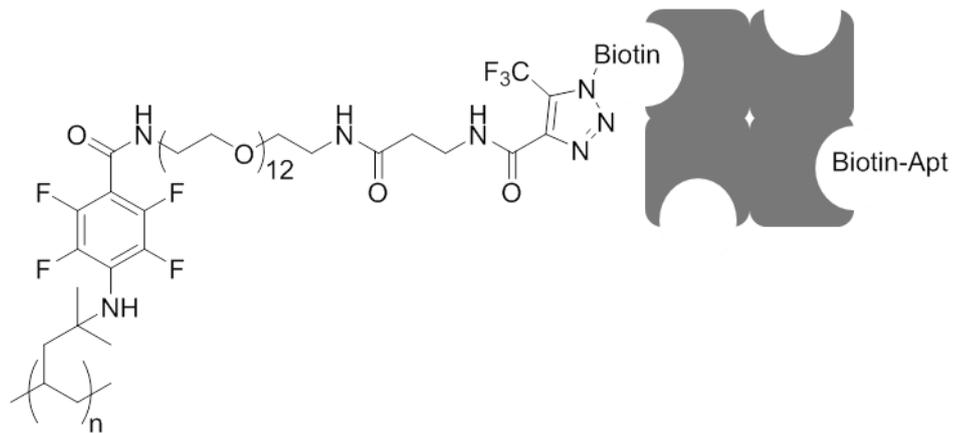
Es wurden je 1.0 nmol, 5.0 nmol, 10 nmol und 20 nmol Aptamer (**84**) in 5 mL PBS-Puffer (pH=7.4) gelöst. In dieser Lösung wurden jeweils drei PMP-Folien (**48**) für drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Folien mit PBS-Puffer und Wasser gründlich gespült und getrocknet.

7.3.24 PMP-Folie (87)



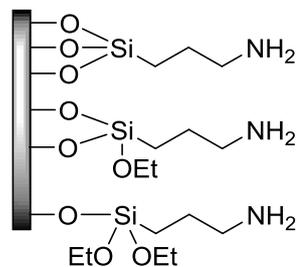
Zwölf PMP-Folien (**75a/b**) wurden in eine Lösung aus 1.0 mg (60 nmol, 1.0 Äq.) Streptavidin in 5 mL PBS-Puffer (pH = 7.4) gegeben und für drei Tage bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Folien mit PBS-Puffer gründlich gespült und sofort für die folgende Reaktion eingesetzt.

7.3.25 PMP-Folie (88)



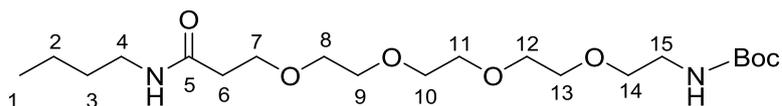
Es wurden je 1.0 nmol, 5.0 nmol, 10 nmol und 20 nmol Aptamer (**84**) in 5 mL PBS-Puffer (pH = 7.4) gelöst. In dieser Lösung wurden jeweils drei PMP-Folien (**87**) für drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Folien mit PBS-Puffer und Wasser gründlich gespült und getrocknet.

7.3.26 Titanplatten (99)



Die zuvor mit Plasma behandelten Titanplatten (24 Stück) wurden in einer Lösung aus 4 mL Aminopropyltriethoxysilan und 50 mL Toluol zunächst für 30 min inkubiert und dann für 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Danach wurden die Titanplatten mit Toluol gespült und unter vermindertem Druck getrocknet.

7.3.27 *tert*-Butyl(15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaicosyl)carbammat (**102**)



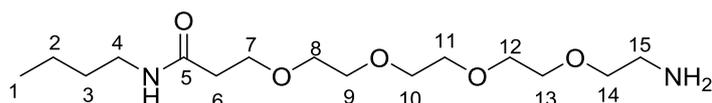
Es wurden 50 mg (0.14 mmol, 1.00 Äq.) BocNHPEG₄COOH **100** und 14 µL (0.14 mmol, 1.00 Äq.) *n*-Butylamin (**101**) in 2 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 0 °C mit 33 mg (0.17 mmol, 1.25 Äq.) EDC·HCl, 28 mg (0.21 mmol, 1.50 Äq.) HOBt und 37 µL (0.21 mmol, 1.50 Äq.) DiPEA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt und wurde anschließend unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (C18) (Gradient Wasser/Methanol 90:10 (10 min) → 5:95 in 80 min → 0:100 in 5 min dann 5 min MeOH halten, 15 mL/min) ($t_R = 73.0$ -82.0 min) isoliert. Die Verbindung **102** wurde in einer Ausbeute von 82 % (48 mg, 0.11 mmol) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm) $\delta = 3.72$ (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-14), 3.65 – 3.59 (m, 12H, H-8 bis H-13), 3.50 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-7), 3.22 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-15), 3.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-4), 2.43 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-6), 1.48 (m, 2H, H-3), 1.44 (s, 9H, *Boc*), 1.40 – 1.30 (m, 2H, H-2), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-1) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD, MeOD = 49.0 ppm) $\delta = 173.8$ (q, C-5), 158.4 (q, CO), 80.0 (q, C(CH₃)₃), 71.6-71.1 (s, C-8 bis C15), 68.3 (s, C-7), 41.3 (s, C-15), 40.1 (s, C-4), 37.7 (s, C-6), 32.5 (s, C-3), 28.8 (p, C(CH₃)₃), 21.1 (s, C-2), 14.1 (p, C-1) ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₂₆H₄₀F₃N₃O₈ [M+H⁺] 421.2914, gefunden 421.3118.

7.3.28 1-Amino-N-butyl-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amid (103)

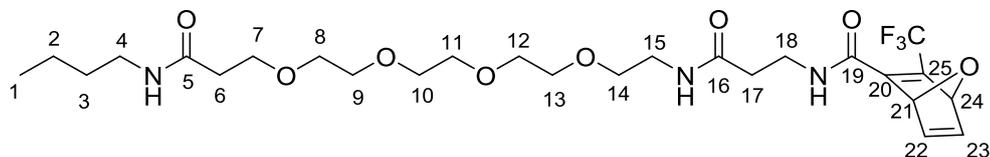


In 0.5 mL trockenem CH_2Cl_2 wurden 16.0 mg (38.0 μmol , 1.00 Äq.) von Verbindung (**102**) gelöst und bei RT mit 6.00 μL (45.7 μmol , 1.20 Äq.) Trimethylsilyliodid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 10 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0.50 mL Methanol unterbrochen. Nach dem Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt (**103**) als gelbliches Öl in einer Ausbeute von 99% (37.5 μmol , 12 mg) erhalten und wurde ohne weitere Charakterisierung in der folgenden Stufe eingesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm) δ = 3.78 – 3.61 (m, 20H, H-7 bis H-14, NH_2), 3.21 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-15), 3.17 – 3.13 (m, 2H, H-4), 2.50 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-6), 1.54 – 1.44 (m, 2H, H-3), 1.42 – 1.31 (m, 2H, H-2), 0.97 – 0.90 (m, 3H, H-1).

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_8$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 321.2389, gefunden 321.2391.

7.3.29 (1R,4S)-N-(3,19-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-4,20-diazatetracosyl)-3-(trifluoromethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]hepta-2,5-dien-2-carboxamid (104)



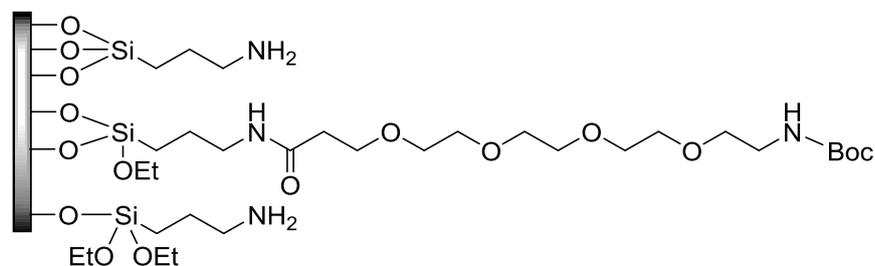
Es wurden 12.0 mg (37.5 μmol , 1.00 Äq) von Amin (**103**) und 10,0 mg (38.5 μmol , 1.00 Äq.) von der Säure (**44**) in 2 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 0 °C mit 10 mg (52.2 μmol , 1.25 Äq.) EDC·HCl, 8 mg (59.2 μmol , 1.50 Äq.) HOBt und 11 μL (59.2 μmol , 1.50 Äq.) DiPEA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt und wurde anschließend unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (C18) (C18) (Gradient Wasser/Methanol 90:10 (10 min) \rightarrow 5:95 in 80 min \rightarrow 0:100 in 5 min dann 5 min MeOH halten, 15 mL/min) (t_R = 69.0-75.0 min) isoliert. Die Produkt wurde in einer Ausbeute von 55 % (12.0 mg, 20.7 μmol) als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm) δ = 8.19 (brs, 3H, NH), 7.32 (dd, J = 5.3, 1.9 Hz, 1H, H-22), 7.24 – 7.22 (m, 1H, H-23), 5.67 (m, 1H, H-24), 5.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H-21), 3.71 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-17), 3.64 – 3.59 (m, 14H, H- bis H-8 bis H-14), 3.54 (m, 4H, H-7, H-18), 3.17 (m, 2H, H-4), 2.58 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H-16), 2.48 – 2.40 (m, 4H, H-6, H-15), 1.52 – 1.44 (m, 2H, H-3), 1.41 – 1.32 (m, 2H, H-2), 0.93 (t, J = 7.3 Hz, 3H, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD, MeOD = 49.0 ppm) δ = 173.4 (q, C-5), 144.6 (t, C-22), 143.6 (t, C-23), 87.1 (t, C-21), 84.4 (t, C-24), 71.5-70.5 (s, C-8 bis C14), 68.9 (s, C-7), 43.3 (s, C-15), 40.1 (s, C-4), 37.7 (s, C-7), 36.4 (s, C-17), 34.3 (s, C-18), 32.5 (s, C-3), 21.1 (s, C-2), 14.1 (p, C-1) ppm.

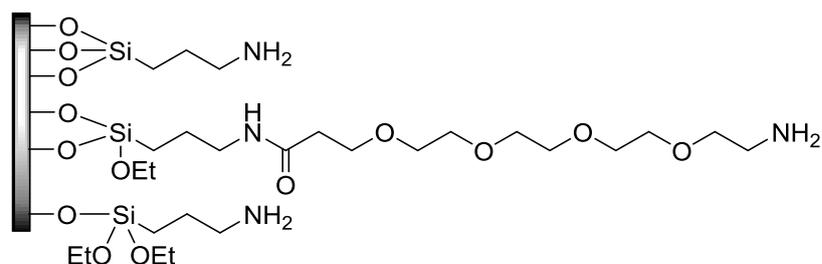
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₂₆H₄₀F₃N₃O₈ [M+H⁺] 580.2846, gefunden 580.2844.

7.3.30 Titanplatten (105)



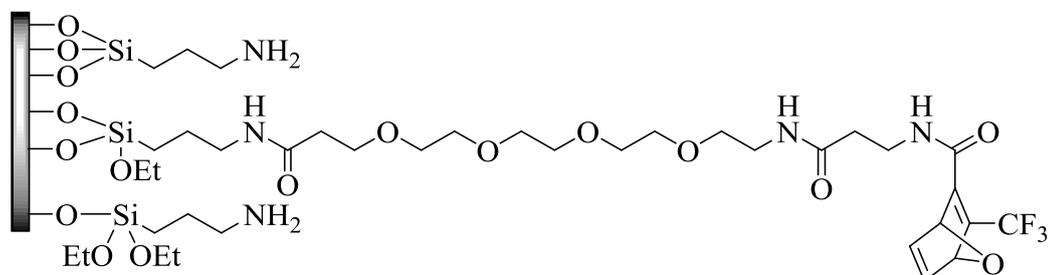
Es wurden 50.0 mg (0.14 mmol, 1.00 Äq) von BocNHPEG₄COOH **100** in 10 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 0 °C mit 33.0 mg (0.17 mmol, 1.25 Äq.) EDC·HCl, 26.0 mg (0.21 mmol, 1.50 Äq.) HOBt und 37.0 μ L (0.21 mmol, 1.50 Äq.) DiPEA versetzt. Anschließend wurden zwölf Titanplatten (**99**) in die Reaktionsmischung gegeben und für 4 d bei RT unter wiederholtem Schwenken inkubiert. Danach wurden die Titanplatten gründlich mit Methanol gespült und unter vermindertem Druck getrocknet.

7.3.31 Titanplatten (106)



Zwölf Titanplatten (**105**) wurden in 10 mL trockenes CH₂Cl₂ gegeben und mit 18.0 µL (0.13 mmol) Trimethylsilyliodid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 15 min geschwenkt. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 mL Methanol unterbrochen. Die Titanplatten wurden gründlich mit Methanol gespült und unter vermindertem Druck getrocknet.

7.3.32 Titanplatten 107



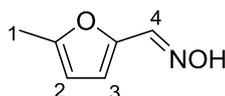
In 20 mL trockenem DMF wurden 33.2 mg (0.10 mmol, 1.00 Äq.) Oxanorbornadien (**44**), 60.8 mg (0.26 mmol, 2.00 Äq.) DCC, 30.2 mg (0.26 mmol, 2.00 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid und 116 µL (0.66 mmol, 5.00 Äq.) *Di*PEA gelöst. In die Reaktionsmischung wurden 12 Titanplatten (**106**) gegeben und für 4 d bei RT unter wiederholtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Titanplatten gründlich mit Methanol gespült und unter vermindertem Druck getrocknet.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.36 (dd, *J* = 0.9, 1.9 Hz, 1H, H-1), 6.32 (dd, *J* = 1.9, 3.2 Hz, 1H, H-3), 6.23 (ddd, *J* = 0.6, 1.5, 3.2 Hz, 1H, H-2), 4.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-4), 2.01 (s, 3H, H-5) ppm.

HRMS: *m/z* berechnet für C₇H₉NO₂ [M+Na⁺] 162.0531, gefunden 162.0530.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰³

7.3.37 5-Methylfuran-2-carbaldehydoxim (**125**)



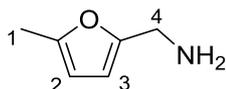
In einem 250 mL-Kolben wurden 5.00 g (45.5 mmol, 1.00 Äq.) 5-Methylfurfural (**124**), 5.05 g (75.8 mmol, 1.70 Äq.) Hydroxylaminhydrochlorid und 9.10 g (228 mmol, 5.00 Äq.) Natriumhydroxid in 50 mL Ethanol und 10 mL Wasser gelöst. Die Mischung wurde für 20 min unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde mit 2 M Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt in quantitativen Ausbeuten (5.71 g, 45.5 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.43 (s, 1H, H-4) 7.21 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-3), 6.14 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-2), 2.34 (s, 3H, H-1) ppm.

Smp: 84 °C (Lit.: 81-83 °C).

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁴

7.3.38 5-Methylfurfurylamin (126)

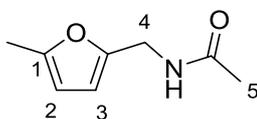


Es wurden 0.3 g (8.0 mmol, 2.0 Äq.) Lithiumaluminiumhydrid in 6 mL absolutem Diethylether gelöst. Bei 0 °C wurden 0.4 g (4.0 mmol, 1.0 Äq.) 5-Methylfuran-2-carboxaldehydoxim (**125**) in 4 mL Diethylether langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf RT gebracht und für 20 h bei dieser Temperatur gerührt. Unter Kühlung wurde die Reaktion langsam mit Wasser (5 mL), 10 %iger wässriger Natriumhydroxid-Lösung (5 mL) und wieder Wasser (5 mL) beendet. Nach 30 min Rühren bei RT und Filtration wurde das Filtrat mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 71 % (0.2 g, 2.1 mmol) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 5.97$ (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-2) 5.85 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, H-3) 3.74 (s, 2H, H-4), 2.25 (s, 3H, H-1) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁴

7.3.39 *N*-((5-Methylfuran-2-yl)methyl)acetamid (119)



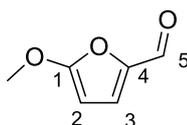
0.23 g (2.10 mmol, 1.00 Äq.) 5-Methylfurfurylamin (**126**) wurden in 2 mL THF gelöst und mit 0.25 mL (2.6 mmol, 1.25 Äq.) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt und anschließend unter vermindertem Druck das Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als gelbliches Öl mit einer Ausbeute von 67 % (1.40 mmol, 0.21 g) erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 6.10 (d, *J* = 3.4 Hz, 1 H, H-3), 5.89 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H, H-2), 4.36 (d, *J* = 5.8 Hz, 2 H, H-4), 2.26 (s, 3 H, H-1), 2.00 (s, 3 H, H-5) ppm.

HRMS: *m/z* berechnet für C₈H₁₁NO₂ [M+H⁺] 176.0687, gefunden 176.0685.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰³

7.3.40 5-Methoxyfuran-2-carbaldehyd (**128**)

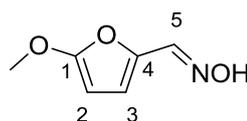


Es wurden 0.50 g (5.10 mmol, 1.00 Äq.) 2-Methoxyfuran (**127**) in 30 mL THF (abs.) gelöst. Anschließend wurden langsam 2.2 mL (2.5 M in Hexan, 5.36 mmol, 1.05 Äq.) *n*-BuLi bei 0 °C zugetropft. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde auf -78 °C gekühlt und 0.78 mL (10.2 mmol, 2.00 Äq.) DMF hinzugefügt. Über Nacht wurde die Reaktionsmischung unter Rühren auf RT erwärmt. Nach Zufügen von 20 mL gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung wurde die wässrige Phase drei Mal mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden drei Mal mit 20 mL gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösemittel entfernt und 77 % (3.90 mmol, 0.49 g) des Produktes als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 9.30 (s, 1H, H-5), 7.21 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-2), 5.47 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-3), 4.01 (s, 3H, OMe) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁵

7.3.41 5-Methoxyfuran-2-carbaldehydoxim (**129**)

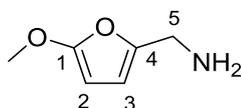


0.60 g (4.76 mmol, 1.00 Äq) 5-Methoxyfuran-2-carbaldehyd (**128**) wurden in 10 mL Pyridin gelöst und mit 1.65 g (23.8 mmol, 5.00 Äq.) Hydroxylaminhydrochlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 10 mL gesättigte wässrige Natriumchlorid-Lösung zugegeben und die wässrige Phase drei Mal mit 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) gereinigt. Es wurden 0.53 g (3.76 mmol, 78 %) des Produktes als orangebrauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 7.25$ (s, 2 H, H-2, H-3), 5.30 (m, 1 H, H-5), 3.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 3 H, *OMe*) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁵

7.3.42 (5-Methoxyfuran-2-yl)methanamin (**130**)

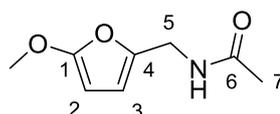


Es wurden 0.30 g (7.44 mmol, 2.00 Äq.) Lithiumaluminiumhydrid in 10 mL THF (abs.) suspendiert. Bei 0 °C wurde eine Lösung aus 0.53 g (3.72 mmol, 1.00 Äq.) 5-Methoxyfuran-2-carbaldehydoxim (**129**) in 5 mL THF langsam zugetropft. Über Nacht wurde die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und anschließend mit 10 %iger wässriger Kaliumhydroxidlösung versetzt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und die wässrige Phase drei Mal mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 44 % (1.65 mmol, 0.21 g) des Produktes als rot-braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 6.01-6.03 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-2), 5.07-5.08 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-3), 3.87 (s, 3H, OMe), 3.73 (s, 2H, H-5), 1.58 (br s, 2H, NH₂) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁵

7.3.43 *N*-((5-Methoxyfuran-2-yl)methyl)acetamid (**120**)

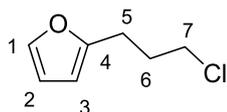


Zu einer Lösung aus 0.21 g (1.65 mmol, 1.00 Äq.) (5-Methoxyfuran-2-yl)methanamin (**130**) und 10 mL THF wurden 0.19 mL (2.03 mmol, 1.25 Äq.) Essigsäureanhydrid gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert und die wässrige Phase drei Mal mit 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 97 % (1.60 mmol, 0.27 g) des Produktes als rot-brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 4.30 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-2), 3.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-3), 3.83 (s, 2H, H-5), 2.18 (s, 3H, OMe), 2.01 (m, 3H, H-7), 0.84 (brs, 1H, NH) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁵

7.3.44 2-(3-Chloropropyl)furan (142)

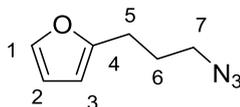


Es wurden 2.77 mL (38.2 mmol, 1.20 Äq.) Furan in 60 mL THF (abs.) gelöst. Bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 23.8 mL (2.5 M in Hexan, 47.7 mmol, 1.50 Äq.) *n*-BuLi langsam zugetropft und für 1 h gerührt. Anschließend wurde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Dann wurden über 30 min 3.14 mL (31.8 mmol, 1.00 Äq.) 1-Brom-3-Chlorpropan in 20 mL THF (abs.) zugetropft. Über Nacht wurde die Reaktionsmischung unter Rühren auf RT erwärmt. Es wurden 40 mL gesättigte wässrige Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und die wässrige Phase mit 100 mL Diethylether drei Mal extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden zunächst mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel (PE/EE = 1:2) gereinigt. Es wurden 85 % (27.0 mmol, 3.90 g) des Produktes als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26\text{ ppm}$): $\delta = 7.36$ (dd, $J = 1.9, 0.8\text{ Hz}$, 1H, H-1), 6.33 (dd, $J = 3.1, 1.9\text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.08 (m, 1H, H-2), 3.60 (t, $J = 6.5\text{ Hz}$, 2H, H-7), 2.85 (t, $J = 7.2\text{ Hz}$, 2H, H-5), 2.16 (m, 2H, H-6) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁶

7.3.45 2-(3-Azidopropyl)furan (143)

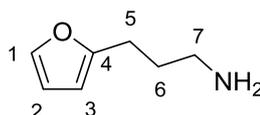


Es wurden 3.80 g (26.3 mmol, 1.00 Äq.) von 2-(3-Chloropropyl)furan in 50 mL DMF vorgelegt und mit 5.12 g (78.8 mmol, 3.00 Äq.) Natriumazid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die abgekühlte Lösung wurde in 150 mL Ethylacetat aufgenommen und sukzessive mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 96 % (25.3 mmol, 3.83 g) des Produktes als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.36 (dd, *J* = 1.9, 0.8 Hz, 1H, H-1), 6.33 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H, H-3), 6.07 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H, H-2), 3.36 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-7), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-5), 1.98 (m, 2H, H-5) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁶

7.3.46 3-(Furan-2-yl)propan-1-amin (144)

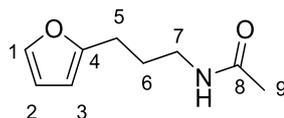


Unter Argonatmosphäre wurden 2.40 g (62.8 mmol, 2.50 Äq.) Lithiumaluminiumhydrid in 70 mL THF (abs.) suspendiert und langsam mit 3.80 g (25.1 mmol, 1.00 Äq.) 2-(3-Azidopropyl)furan in 20 mL THF (abs.) bei 0 °C versetzt. Es wurde für 30 min bei 0 °C und weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurden vorsichtig 20 mL Wasser zugefügt und die Reaktionsmischung in 50 mL Diethylether aufgenommen. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 67 % (16.8 mmol, 2.11 g) des Produktes als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.35-7.27 (m, 1H, H-1), 6.33-6.24 (m, 1H, H-3), 5.97-6.05 (m, 1H, H-2), 2.60-2.82 (m, 4H, H-5, H-7), 1.69-1.91 (m, 2H, H-6) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁶

7.3.47 *N*-[3-(Furan-2-yl)propyl]acetamid (**145**)



In 1 mL THF wurden 100 mg (0.80 mmol, 1.00 Äq.) 3-(Furan-2-yl)propan-1-amin gelöst und mit 0.10 mL (1.00 mmol, 1.25 Äq) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 20 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL CH₂Cl₂ aufgenommen. Anschließend wurde mit gesättigter wässriger Natriumcarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 57 % (0.46 mmol, 76.0 mg) des Produktes als bräunliches Öl erhalten.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 7.30 (dd, *J* = 1.8, 0.8 Hz, 1H, H-1), 6.28 (dd, *J* = 3.1, 1.9 Hz, 1H, H-3), 6.01 (dd, *J* = 3.2, 0.8 Hz, 1H, H-2), 5.47 (s, 1H, NH), 3.23-3.35 (m, 2H, H-7), 2.67 (t, *J* = 12.9, 6.9 Hz, 2H, H-5), 1.95 (s, 3H, H-9), 1.77-1.93 (m, 2H, H-6), ppm.

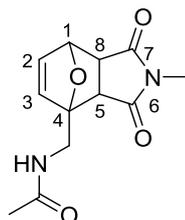
Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹⁰⁶

7.3.48 DIELS-ALDER-Cycloadditionen

Allgemeine Vorschrift:

0.45 mmol Furan wurde mit 0.45 mmol *N*-Methylmaleimid **148** vorgelegt und in 5 mL Lösemittel gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für 72 h bei 75 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über Kieselgel (PE/EE = 1:2) gereinigt.

7.3.48.1 N-[(2-Methyl-1,3-dioxo-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-4-yl)methyl]acetamid (149)



Variante A:

50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid, 62.5 mg *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** in 5 mL 1,1,2,2-Tetrachlorethan wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 47.2 % (0.21 mmol, 53.2 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

Variante B:

50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 62.5 mg *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** in 5 mL 1,1,2,2-Tetrachlorethan wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 51 % (0.23 mmol, 57.5 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

Variante C:

50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 62.5 mg *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** in 5 mL Wasser wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 59 % (0.27 mmol, 66.5 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

Variante D

50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 62.5 mg *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** in 5 mL THF wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 59 % (0.26 mmol, 66.4 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

Variante E:

50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 72.5 mg *N*-(Furan-2-ylmethyl)acetamid **118** in 5 mL Acetonitril wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 59 % (0.21 mmol, 66.1 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten.

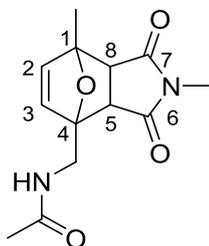
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 6.50-6.54 (m, 2H, H-2, H-3), 6.20 (s, 1H, NH), 5.24 (s, 1H, H-1), 3.92-3.99 (m, 1H, H-8), 3.88 (dd, *J* = 14.6, 6.8 Hz, 1H, H-5), 3.01 (s, 3H, NCH₃), 2.96-3.03 (m, 1H, NHCH₂), 2.89-2.92 (m, 1H, NHCH₂), 2.05 (s, 3H, COCH₃), ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 77.16 ppm): δ = 176.0 (q, C-6, C-7) 175.5 (q, C-6, C-7), 170.4 (q, COCH₃), 139.0 (C-2), 137.2 (C-3), 90.8 (C-4), 80.8 (C-1), 50.5 (s, CH₂NH₂), 45.8 (C-8), 38.8 (C-5), 25.2 (p, NCH₃), 23.5 (p, OCH₃) ppm.

HRMS: *m/z* berechnet für C₁₂H₁₄N₂O₄ [M+Na⁺] 273.0851, gefunden 273.0850.

Smp: 164 °C.

7.3.48.2 *N*-[(2,7-Dimethyl-1,3-dioxo-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1*H*-4,7-epoxyisoindol-4-yl)methyl]acetamid (**150**)



50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 68.9 mg *N*-[(5-Methylfuran-2-yl)methyl]acetamid **119** in 5 mL 1,1,2,2-Tetrachlorethan wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 67 % (0.30 mmol, 79.4 mg) eines farblosen kristallinen Feststoffes erhalten. Es wurde ein Gemisch aus *endo/exo*-Produkt (2:1) erhalten.

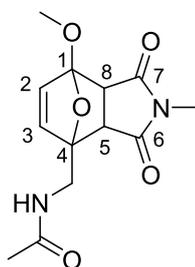
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ (*endo*) = 6.50 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3), 6.29 (m, 1H, H-2), 6.19 (s, 1H, NH), 3.93 (dd, *J* = 14.6, 6.5 Hz, 1H, H-8), 3.79 (dd, *J* = 14.6, 6.5 Hz, 1H, H-5), 2.99 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₂), 2.98 (s, 3H, NCH₃), 2.85 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₂), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.71 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, C-CH₃) ppm; δ (*exo*) = 6.29 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-3), 6.23 (m, 1H, H-2), 3.97 (dd, *J* = 14.5, 5.8 Hz, 1H, H-8), 3.87 (dd, *J* = 14.5, 5.8 Hz, 1H, H-5), 3.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH₂), 3.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH₂), 2.82 (s, 3H, NCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 1.80 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, C-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 77.16 ppm): δ (*endo*) = 174.7 (q, C-7), 174.3 (q, C-6), 170.4 (q, COCH₃), 141.1 (t, C-2), 139.3 (t, C-3), 90.2 (q, C-4), 88.1 (C-1), 52.3 (s, CH₂NH), 51.5 (t, C-8), 45.9 (t, C-5), 25.1 (p, NCH₃), 23.5 (p, COCH₃), 15.8 (p, C-1CH₃) ppm; δ (*exo*) = 175.4 (q, C-7, C-6), 175.4 (q, C-7, C-6), 138.9 (t, C-2), 135.8 (t, C-3), 53.3 (s, CH₂NH), 51.7 (t, C-8), 38.9 (t, C-5), 24.9 (p, NCH₃), 23.3 (p, COCH₃), 18.6 (p, C-1CH₃) ppm.

HRMS: *m/z* berechnet für C₁₃H₁₆N₂O₄ [M+Na⁺] 287.1008, gefunden 287.1010.

Smp: 173 °C.

7.3.48.3 *N*-[(7-Methoxy-2-methyl-1,3-dioxo-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-4-yl)methyl]acetamid (**151**)



50.0 mg (0.45 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Methylmaleimid **148**, 76.1 mg *N*-[(5-Methoxyfuran-2-yl)methyl]acetamid **120** in 5 mL 1,1,2,2-Tetrachlorethan wurden für 72 h bei 75 °C erhitzt. Es wurden 113.8 mg (0.41 mmol, 90 %) eines hellgelben kristallinen Feststoffes erhalten.

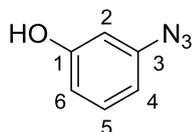
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 7.69$ (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-3), 7.07-7.17 (m, 1H, H-2), 6.75 (s, 1H, NH), 4.63 (s, 1H, H-5), 4.61 (s, 1H, H-8), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 3.14 (s, 3H, N- CH_3), 1.95 (s, 3H, COCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 77.16$ ppm): $\delta = 170.1$ (q, COCH_3), 169.4 (q, C-7), 166.9 (q, C-6), 156.2 (q, C-4), 138.2 (t, C-2), 129.6 (t, C-3), 117.7 (q, C-1), 56.5 (p, OCH_3), 53.3 (s, NHCH_2), 42.2 (t, C-8), 39.5 (t, C-5), 24.0 (p, NCH_3), 23.4 (p, COCH_3) ppm.

HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M-H}^+]$ 279.0981, gefunden 279.1008.

Smp: 187-189 °C unter Zersetzung.

7.3.49 3-Azidphenol (159)



Zu einer Lösung aus 5.00 g (45.0 mmol 1.00 Äq.) 3-Aminophenol in 2 N HCl (100 mL) wurden 15 mL einer wässrigen Natriumnitritlösung (3.79 g, 54.9 mmol, 1.22 eq.) bei 0 °C getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min gerührt und dann mit 4.5 g (69.0 mmol, 1.53 eq.) Natriumazid in 35 mL Wasser versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit 300 mL Ethylacetat versetzt. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 97 % (43.6 mmol, 5.89 g) eines dunkelroten Öls erhalten.

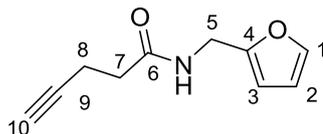
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 7.21$ (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 6.65-6.60 (m, 2H, H-4, H-6), 6.52 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2), 5.35 (br s, 1H, OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 77.16$ ppm): $\delta = 156.8$ (q, C-1), 141.6 (q, C-3), 130.8 (t, C-5), 112.3 (t, C-2), 111.4 (t, C-6), 106.4 (t, C-4) ppm.

IR (ATR, neat): $\tilde{\nu}$ = 3355, 2817, 2112 (stark), 1703, 1593, 1456, 1301, 1211, 1162, 1113, 999, 950 cm^{-1} .

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.¹¹³

7.3.50 *N*-(Furan-2-ylmethyl)pent-4-inamid (161)



Unter Argonatmosphäre wurden 1.00 g (10.2 mmol, 1.00 Äq.) 4-Pentinsäure in 40 mL Dichlormethan (abs.) gelöst. Zunächst wurde die Lösung mit 3.1 mL (20.4 mmol, 2.00 Äq.) DIC und 2.35 g (20.4 mmol, 2.00 Äq.) *N*-Hydroxysuccinimid versetzt. Dann wurde 1.0 mL (11.2 mmol, 1.10 Äq.) Furfurylamin zugetropft und langsam 8.25 mL (50.8 mmol, 5.00 Äq.) *Di*PEA zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand über Kieselgel ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 95:5, R_f = 0.75) gereinigt. Es wurden 64 % (6.5 mmol, 1.14 g) eines hellgelben kristallinen Feststoffes erhalten.

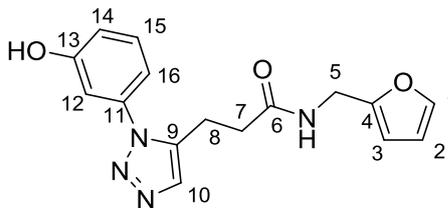
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO} = 2.50$ ppm): δ = 8.35 (t, $J = 5.1$ Hz, 1 H, NH), 7.56 (dd, $J = 1.8, 0.9$ Hz, 1 H, H-1), 6.38 (dd, $J = 3.2, 1.9$ Hz, 1 H, H-2), 6.23 (dd, $J = 3.2, 0.8$ Hz, 1 H, H-3), 4.25 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H, H-5), 2.76 (t, $J = 2.5$ Hz, 1 H, H-10), 2.33-2.40 (m, 2H, H-8), 2.27-2.33 (m, 2 H, H-7) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO} = 39.56$ ppm): δ = 170.2 (q, C-6), 152.2 (t, C-1), 142.1 (q, C-4), 110.4 (t, C-2, C-3), 106.8 (t, C-2, C-3), 83.8 (q, C-9), 71.3 (t, C-10), 35.5 (s, C-5), 34.0 (s, C-7), 14.3 (s, C-8) ppm.

Smp: 55 °C (Lit: 56 °C).

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.⁵⁹

7.3.51 N-(Furan-2-ylmethyl)-3-(1-(3-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propanamid (162)



0.5 g (2.80 mmol, 1.00 Äq.) *N*-(Furan-2-ylmethyl)pent-4-ynamid, 381 mg (2.80 mmol, 1.00 eq.) 3-Azidophenol und 95 μ L (0.55 mmol, 0.20 eq.) DiPEA wurden in 12.5 mL Methanol gelöst. Die Mischung wurde mit dem *freeze-pump-thaw* Verfahren drei Mal entgast. Dann wurden 40.5 mg (0.28 mmol, 0.1 eq.) CuBr zugefügt. Unter Lichtausschluss wurde für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand über Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 99/1 \rightarrow 95/1 \rightarrow 9:1) gereinigt. Es wurden 0.42 g (1.34 mmol, 48 %) eines hellgelben Feststoffes erhalten.

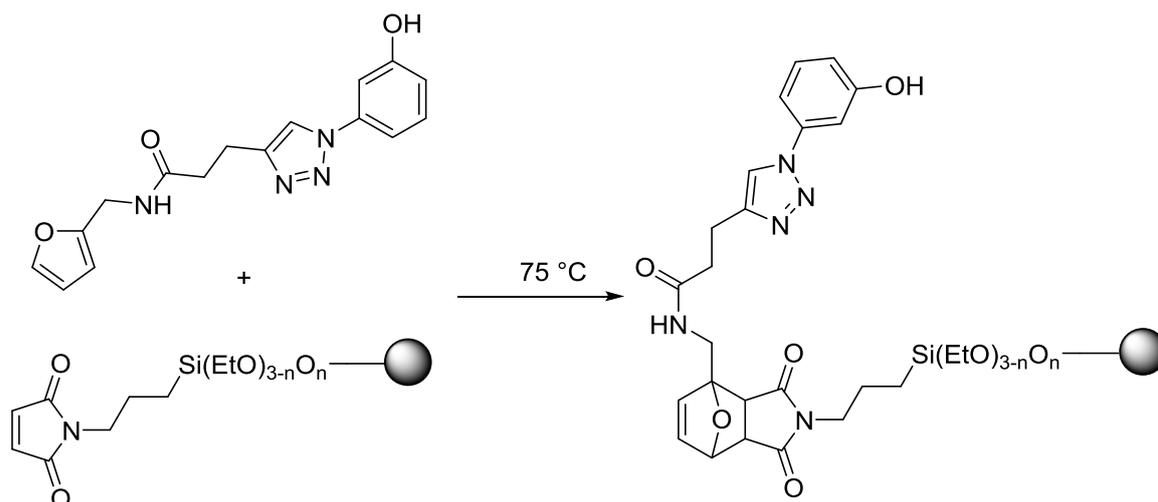
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $(\text{CH}_3)_2\text{SO} = 2.50$ ppm): $\delta = 10.01$ (s, 1H, OH), 8.38 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH), 8.41 (s, 1H, 10-H), 7.50 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, 15-H), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1-H), 7.20 – 7.27 (m, 2H, 14-H, 16-H), 6.86 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.33 (dd, $J = 3.1, 1.9$ Hz, 1H, 2-H), 6.16 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, H-3), 4.26 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, 5-H), 2.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 8-H), 2.54 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 7-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMSO-}d_6 = 39.5$ ppm): $\delta = 170.9$ (q, C-6), 158.4 (q, C-13), 152.3 (t, C-1), 147.7 (t, C-10), 141.9 (q, C-4), 137.7 (q, C-11), 130.7 (t, C-15), 120.2 (q, C-9), 115.3 (t, C-12), 110.4 (t, C-2, C-3), 110.2 (t, C-14), 106.8 (t, C-2, C-3), 106.6 (t, C-16), 35.4 (s, C-5), 34.5 (s, C-8), 21.2 (s, C-7) ppm.

HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 335.1120, gefunden 335.1119.

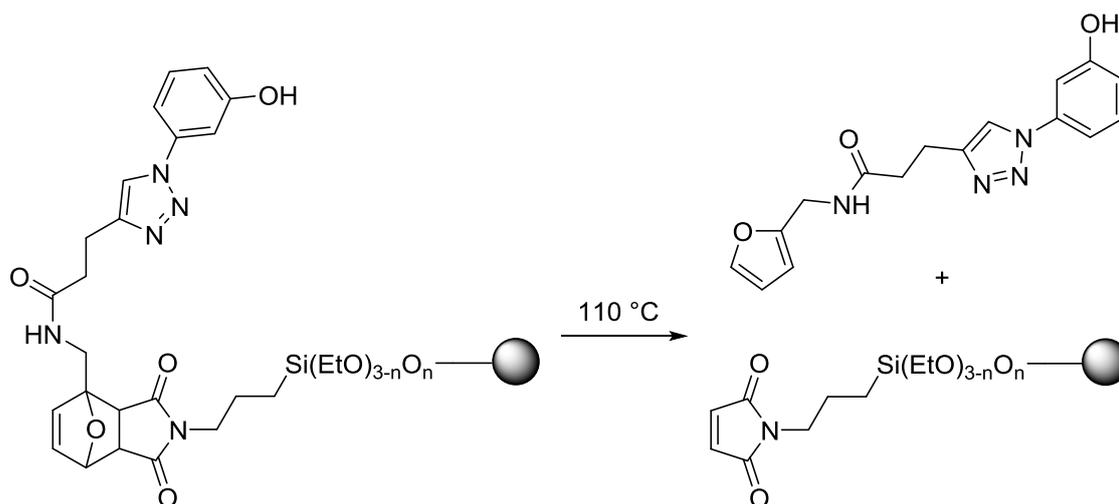
Smp: 185 °C unter Zersetzung.

7.3.52 DIEL-ALDER Cycloaddition an funktionalisierten MAGSILICA® 116 Phenol 162



Es wurden 100 mg MAGSILICA® **116** und 0-9.7 mg (0-31.1 µmol) Phenol **162** vorgelegt und in 1 mL THF/Wasser (1:4) suspendiert. Die Suspension wurde in einem verschlossenen Gefäß für 72 h bei 75 °C erhitzt. Im Anschluss daran wurden die Nanopartikel von außen mit einem Magneten fixiert und aus dem Überstand eine Probe für die Photometrie entnommen, welche durch einen Spritzenfilter (0.45 µm) filtriert wurde. Anschließend wurden die Nanopartikel fünf Mal in THF suspendiert und der Überstand nach Fixierung der Nanopartikel entfernt. Das verbliebene Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

7.3.53 Retro DIEL-ALDER Reaktion an funktionalisierten MAGSILICA®



100 mg MAGSILICA® **163** wurden in 1 mL THF/Wasser (1:4) suspendiert. Die Suspension wurde für 1-4 h in einem verschlossenen Gefäß bei 110 °C erhitzt und anschließend im Eisbad schnell heruntergekühlt. Die Nanopartikel wurden von außen mit einem Magneten fixiert und eine Probe für die Photometrie aus dem Überstand entnommen. Die Probe wurde durch einen Spritzenfilter (0.45 µm) filtriert.

7.4 Durchführung der Photometrischen Untersuchungen

7.4.1 Photometrie mit CDP-Star an PMP-Folien

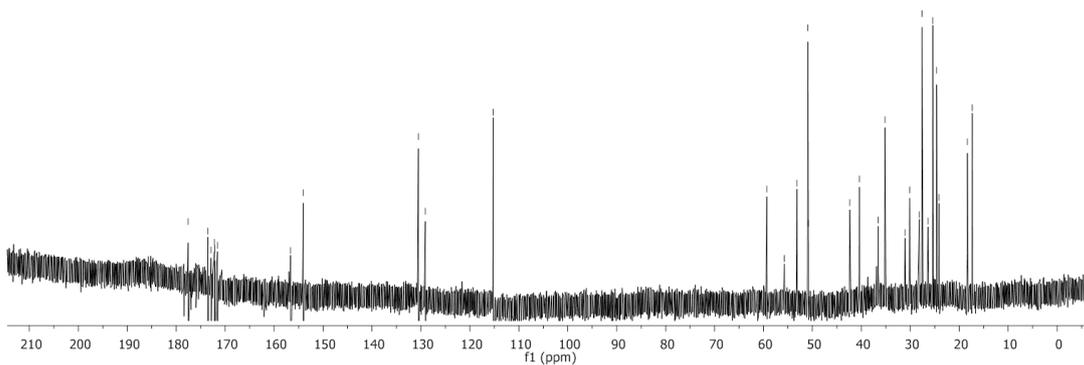
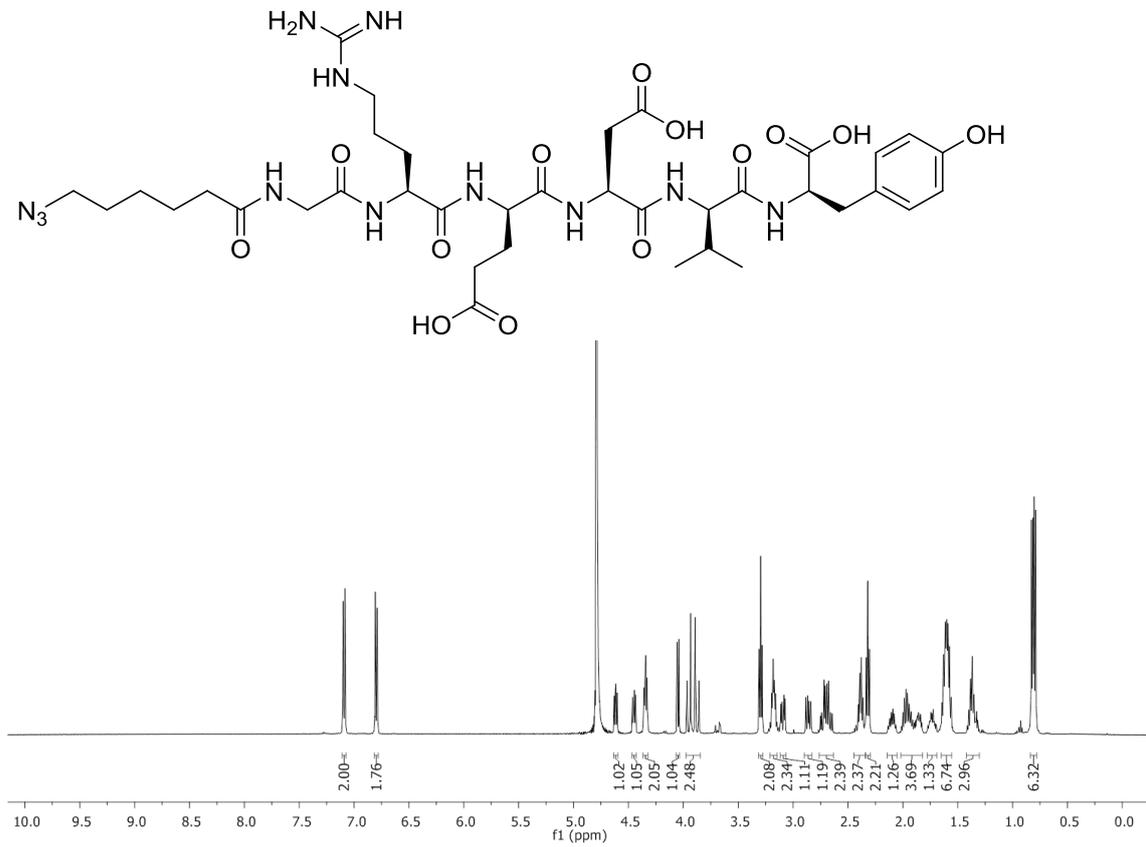
Zunächst wurden aus der Folie fünf Probestücke vom Rand und der Mitte der Folie ausgeschnitten, welche in eine 96-Well-Mikrotiterplatte passen. Die Folien wurden in die Mikrotiterplatte gelegt und mit Waschpuffer (Maleinsäure 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH = 7.5) gewaschen und anschließend getrocknet. Anschließend wurden die Folien 30 min bei RT mit 250 μ L (200 mU/mL in Detektionspuffer – Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH = 9.5) Streptavidin alkalische Phosphatase inkubiert. Anschließend wurde gründlich mit dem Waschpuffer gespült. Die Folien wurden jeweils mit 100 μ L Detektionspuffer und 15 μ L CDP-Star (0.25 mM) versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend mittels ELISA-Photometer durch einen Lumineszenzfilter.

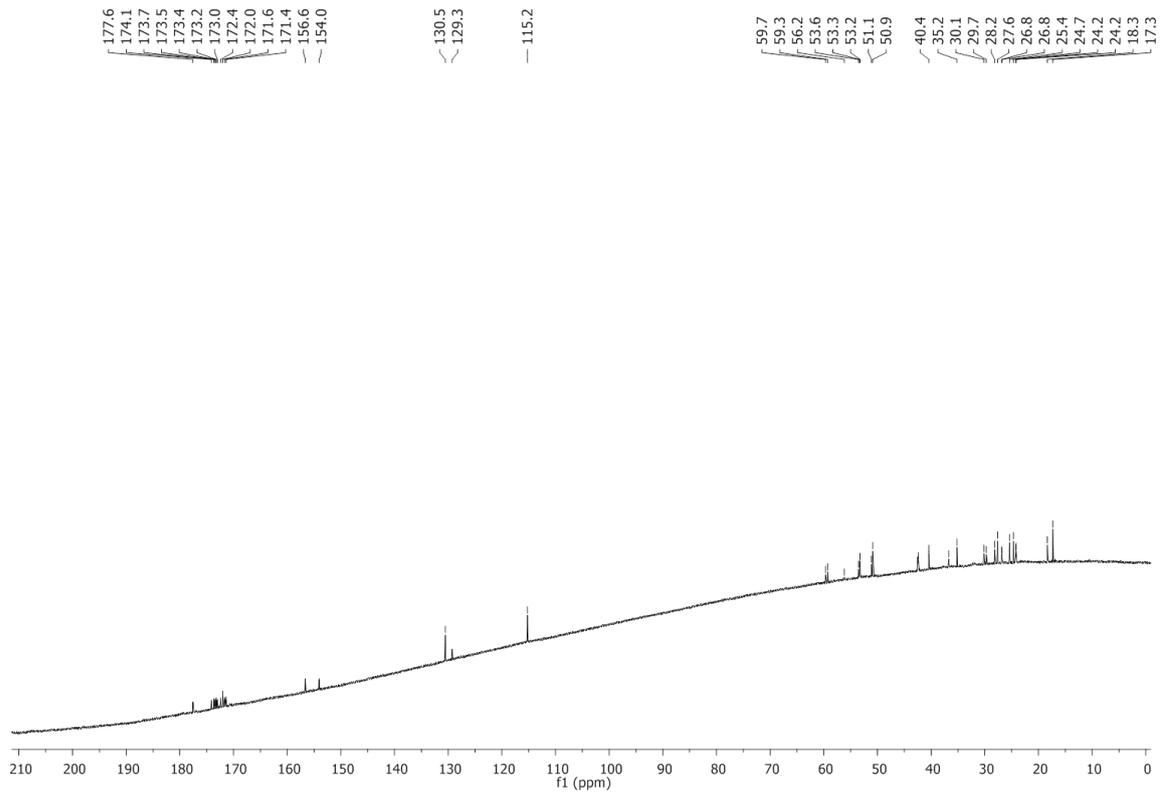
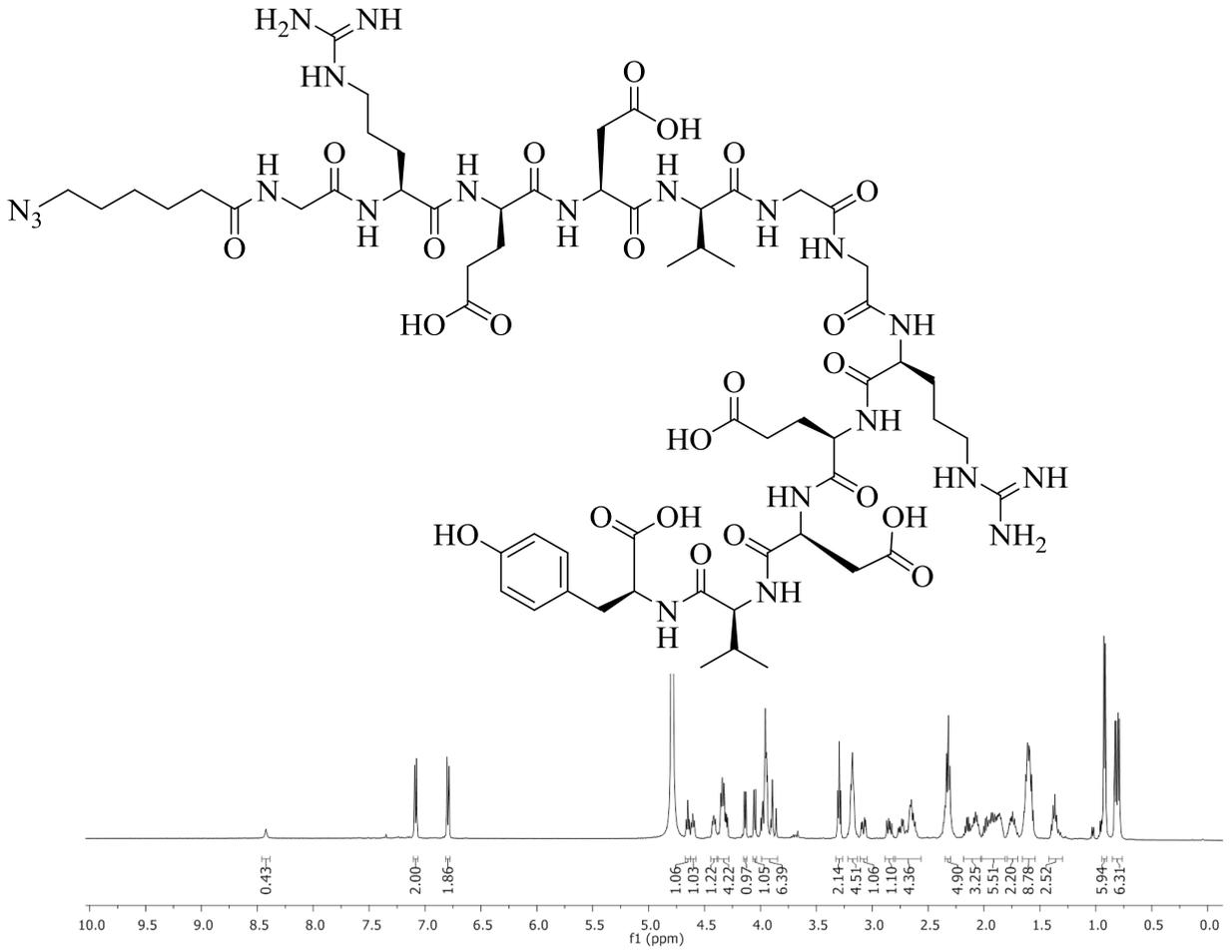
7.4.2 Photometrie zur Bestimmung der Beladung von Nanopartikeln

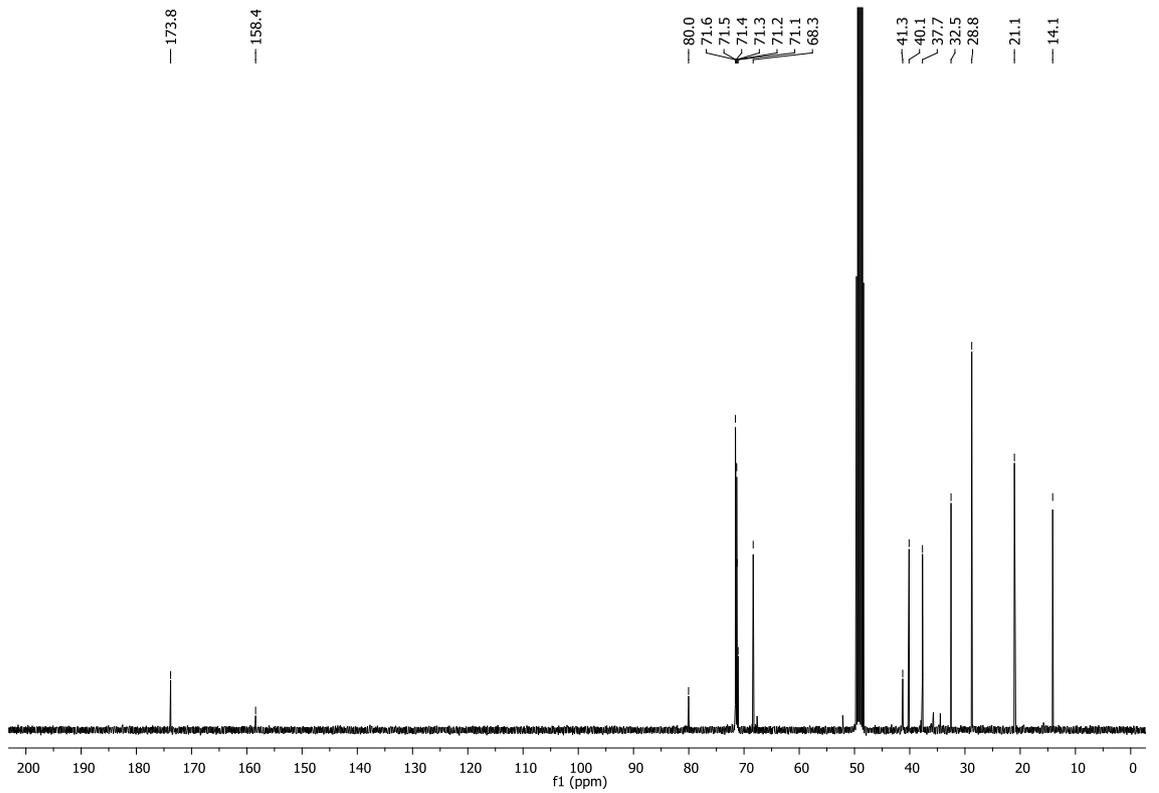
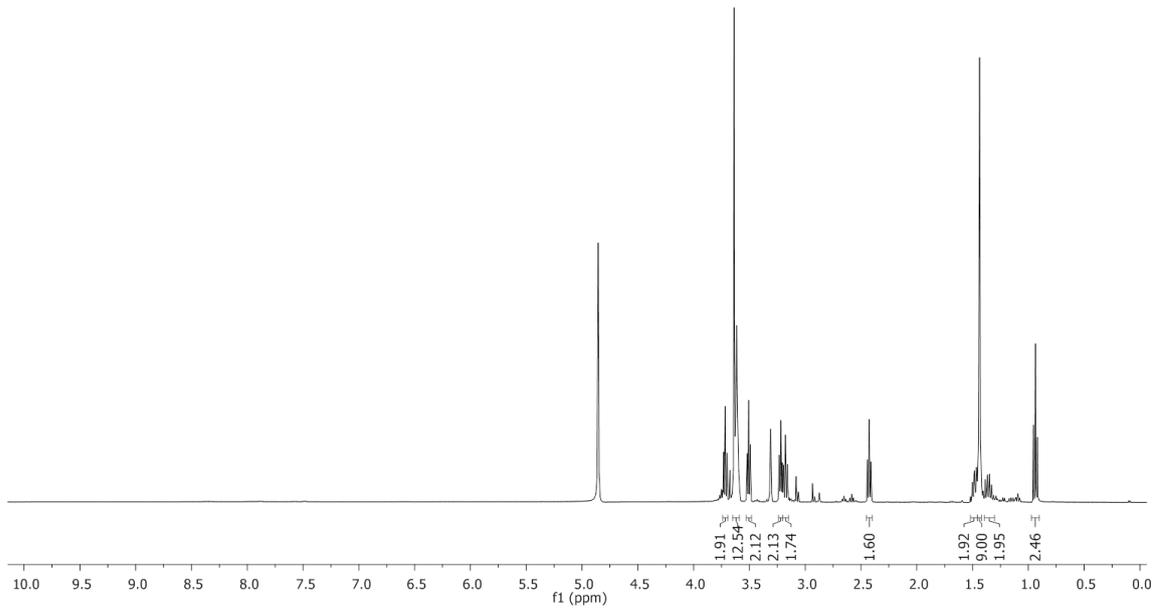
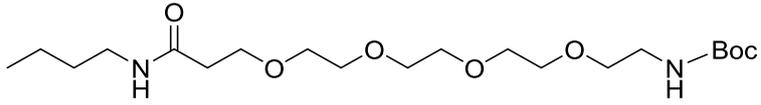
Zunächst wurden 350 μ L Tris-Puffer (0.25 mM, pH = 10) vorgelegt und mit je 50 μ L gefilterte Probe aus der Reaktion und 4-Aminoantipyren (1.0 mM in Wasser) versetzt. Zum Schluss wurde die Lösung mit 50 μ L Kaliumhexacyanoferrat(III) (3.0 mM in Wasser) versetzt und kräftig geschüttelt. Für eine Kalibrierreihe wurde mit den entsprechenden Konzentrationen (0.1-0.6 mM) des Phenols **162** ebenso verfahren. Die rötlich verfärbten Proben wurden danach unverzüglich bei einer Wellenlänge von 500 nm vermessen.

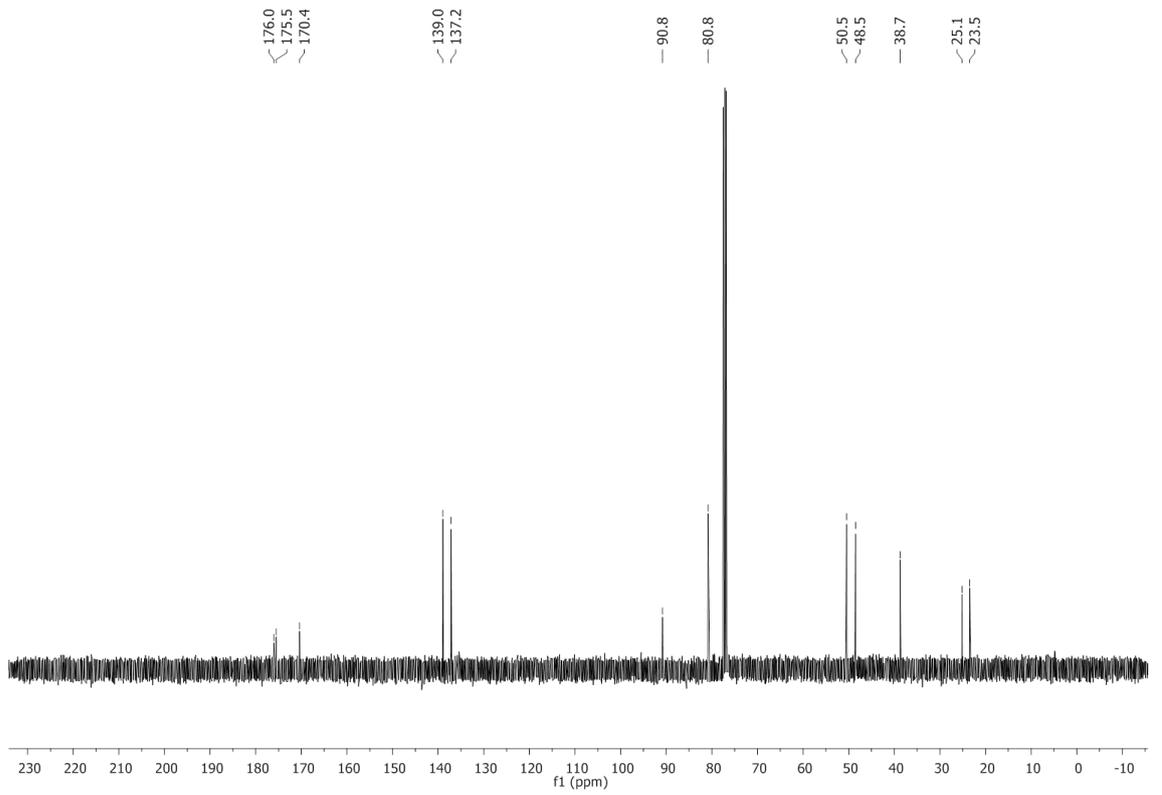
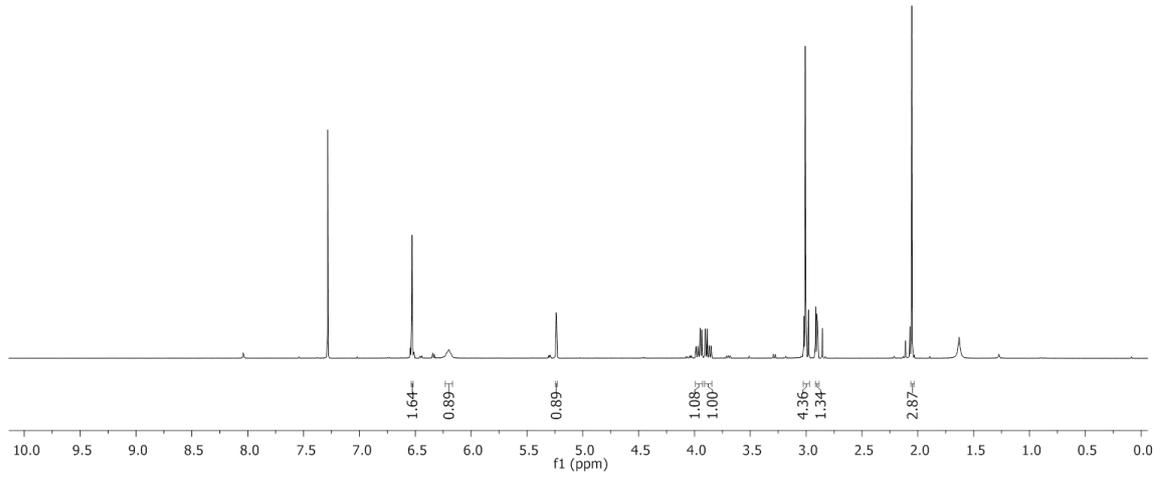
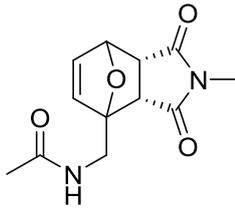
8. Anhang

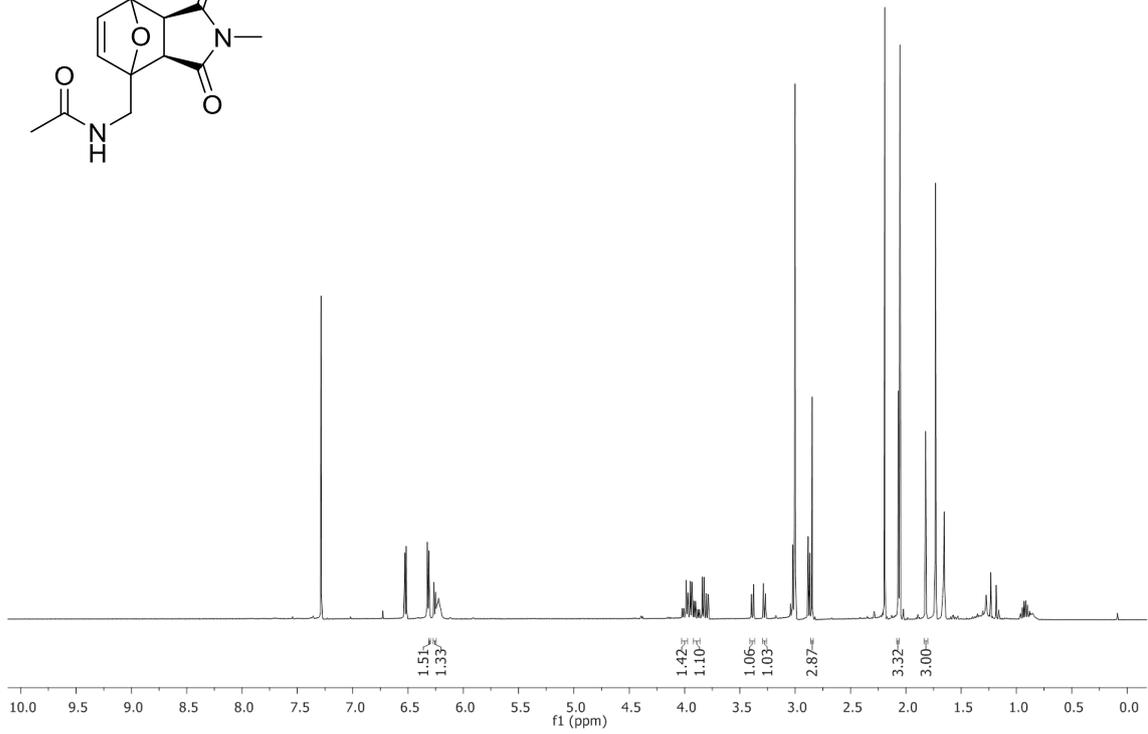
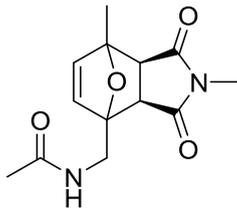
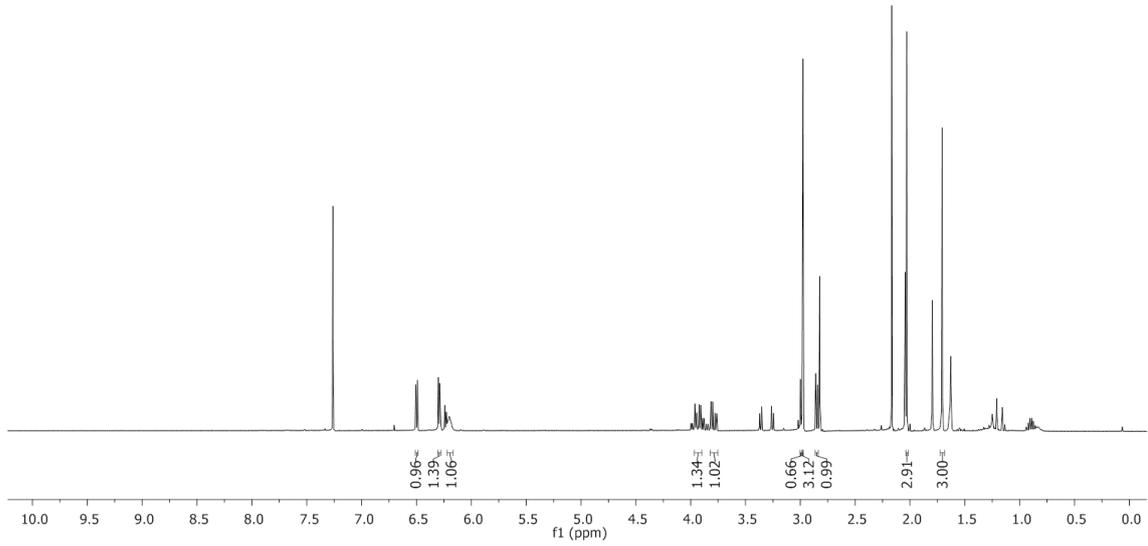
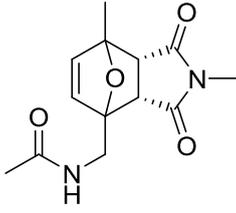
8.1 Spektren

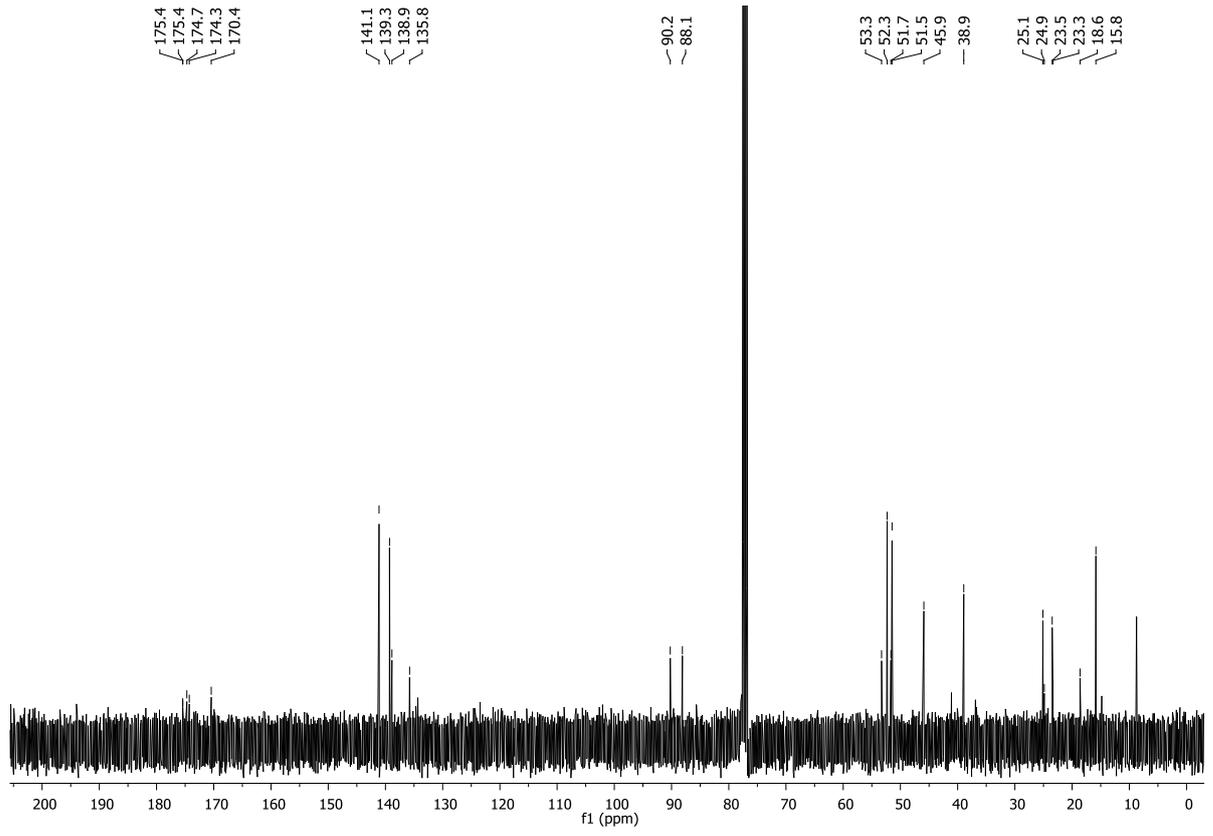


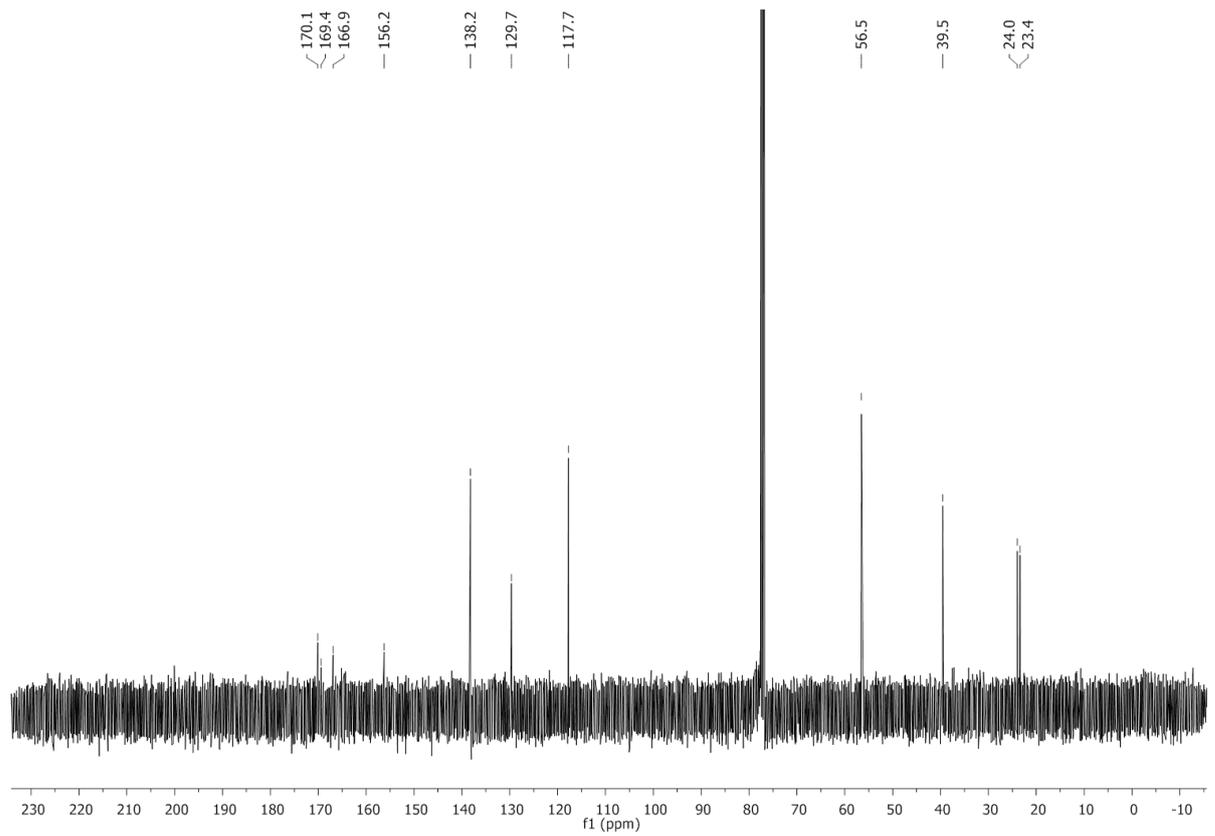
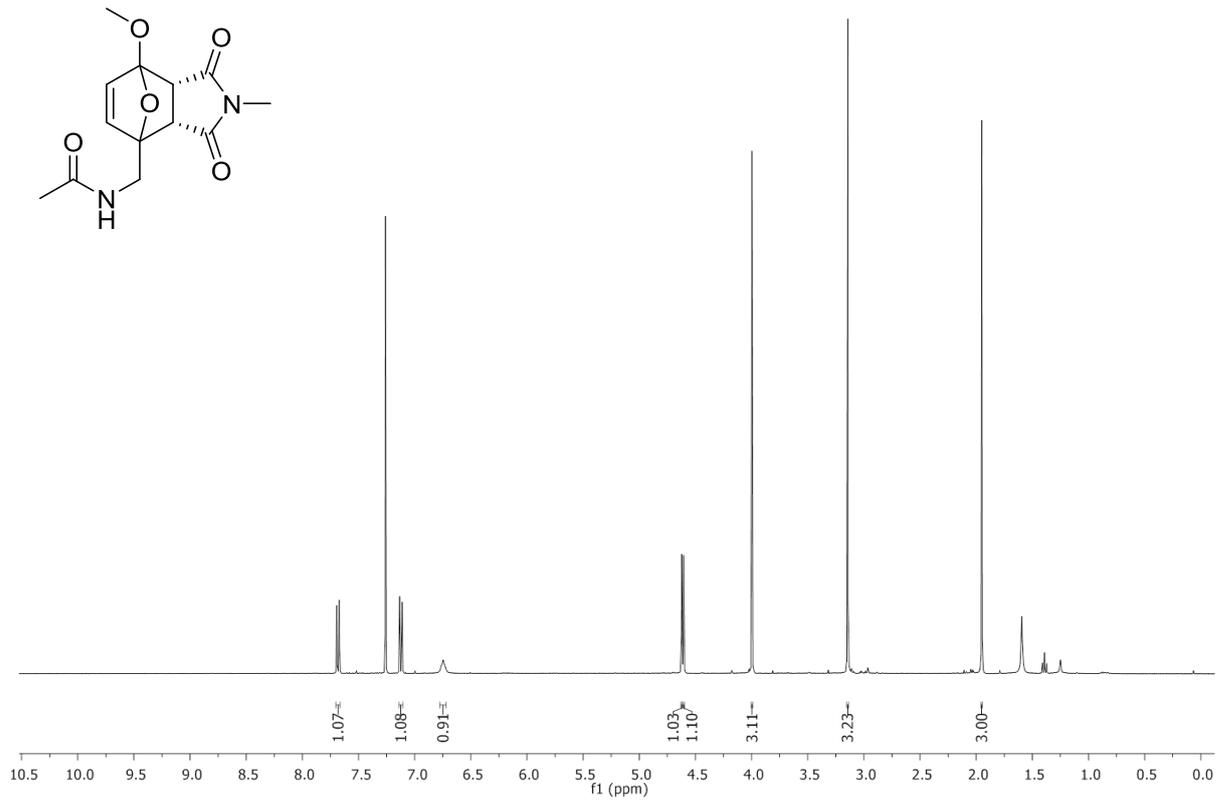


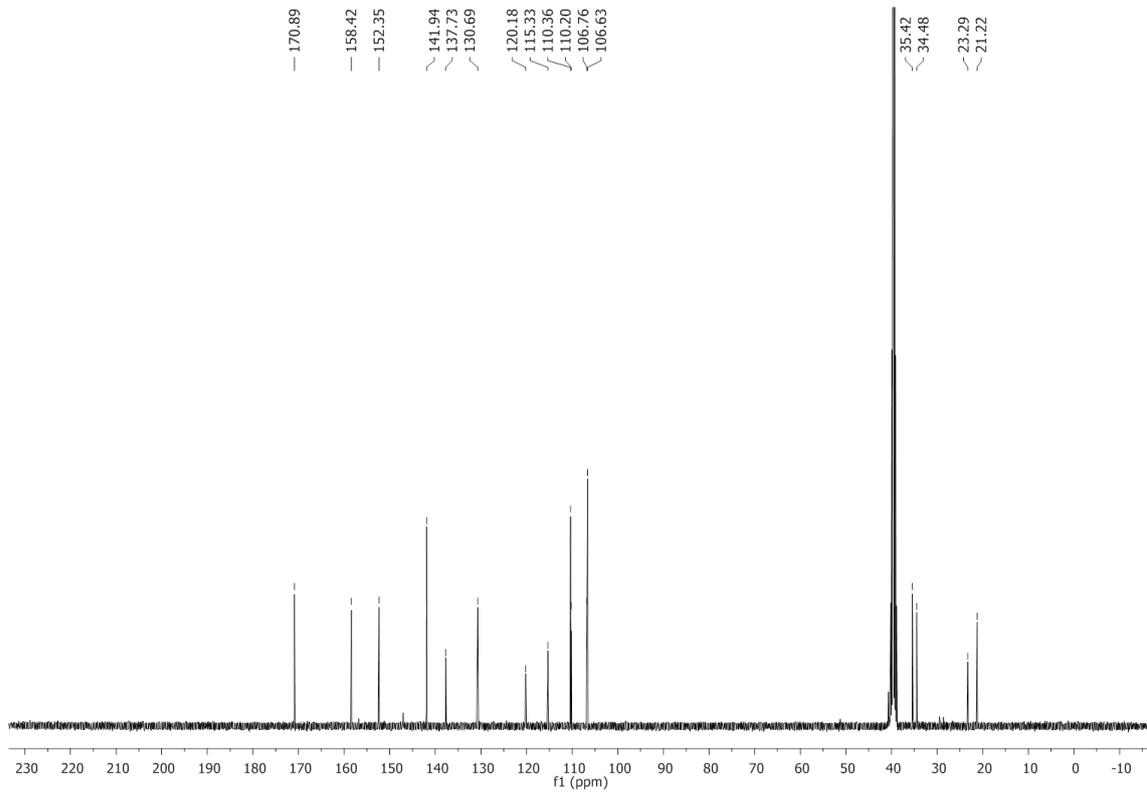
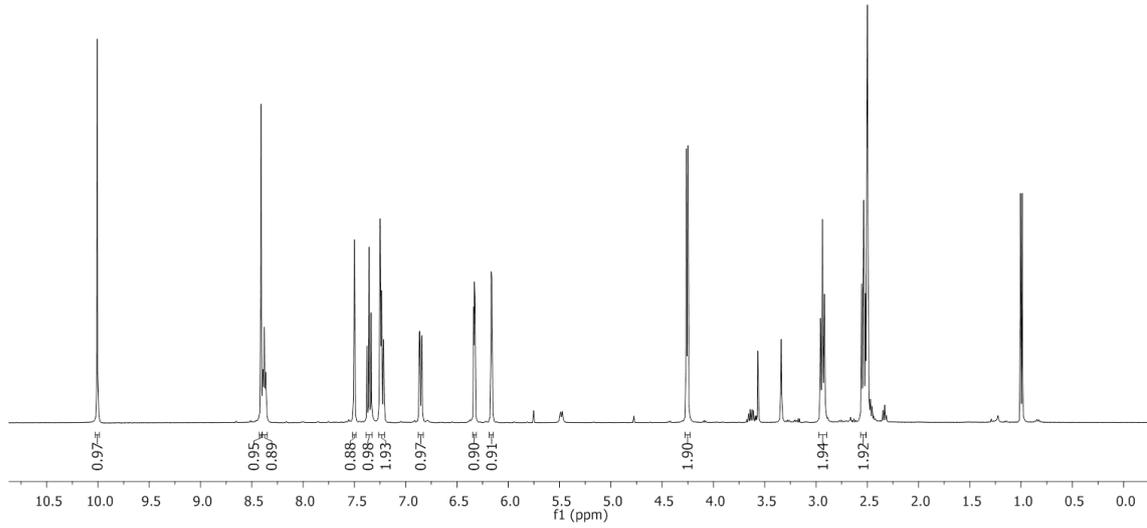
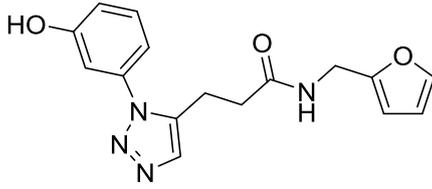






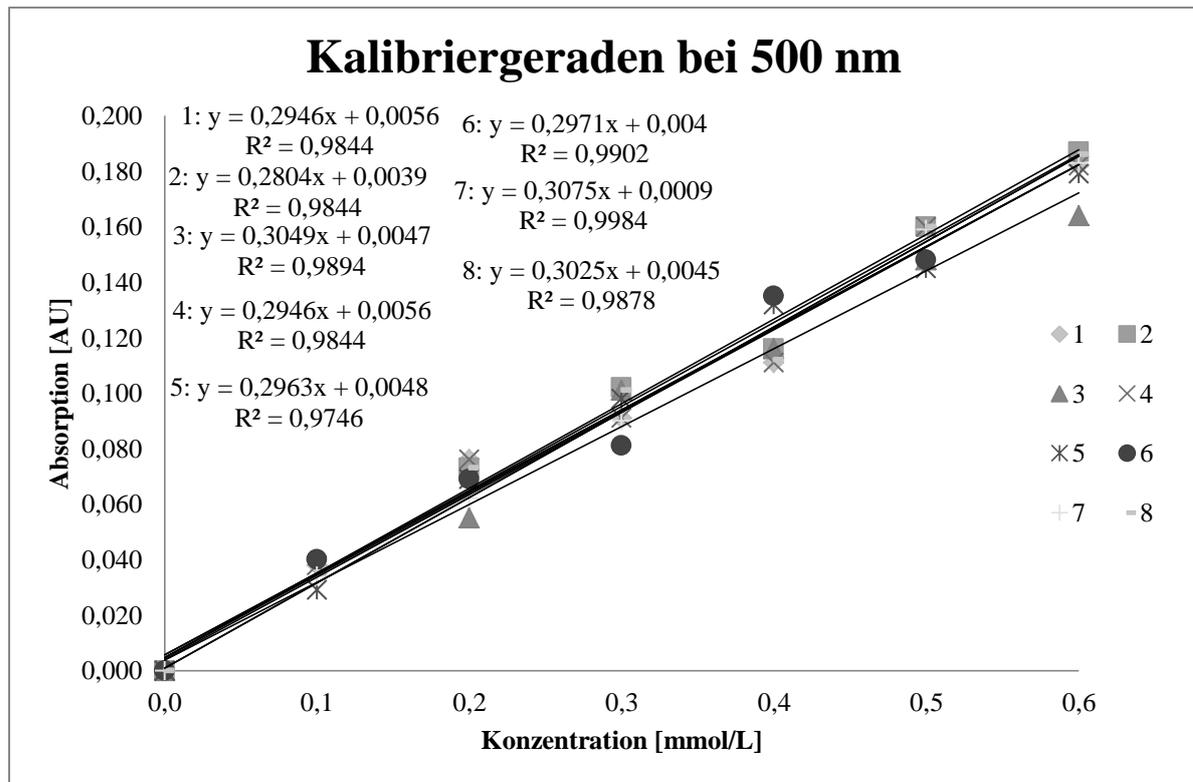






8.2 Messdaten und Kalibrierreihen

Messung	1		2		3	
	Konzentration [mmol/L]	Absorption	Konzentration [mmol/L]	Absorption	Konzentration [mmol/L]	Absorption
	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000
	0,1	0,038	0,2	0,073	0,2	0,055
	0,2	0,076	0,3	0,102	0,3	0,101
	0,3	0,091	0,4	0,116	0,4	0,116
	0,4	0,111	0,5	0,16	0,5	0,148
	0,5	0,160	0,6	0,187	0,6	0,164
	0,6	0,182				
Messung	4		5		6	
	Konzentration [mmol/L]	Absorption	Konzentration [mmol/L]	Absorption	Konzentration [mmol/L]	Absorption
	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000
	0,1	0,038	0,1	0,029	0,1	0,040
	0,2	0,076	0,2	0,069	0,2	0,069
	0,3	0,091	0,3	0,098	0,3	0,081
	0,4	0,111	0,4	0,132	0,4	0,135
	0,5	0,160	0,5	0,145	0,5	0,148
	0,6	0,182	0,6	0,179	0,6	0,159
Messung	7		8			
	Konzentration [mmol/L]	Absorption	Konzentration [mmol/L]	Absorption		
	0,0	0,000	0,0	0,000		
	0,1	0,034	0,1	0,035		
	0,2	0,062	0,2	0,073		
	0,3	0,090	0,3	0,101		
	0,4	0,080	0,4	0,112		
	0,5	0,159	0,5	0,160		
	0,6	0,183	0,6	0,186		



Gleichung zu Bestimmung des Vertrauensbereiches nach Fieller:¹¹⁴

$$VB = \frac{s_y}{b} \cdot t(f, p) \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{x - \bar{x}}{Q_{xx}}}$$

Wobei: s_y = Reststandardabweichung

b = Steigung der linearen Regression

$t(f, p)$ = statistische Konstanz für gegebene Randbedingungen (2.015)

$f = (N-2)$ entspricht den Freiheitsgraden

p = Messwertungenauigkeit (0.95)

N = Anzahl der Kalibrierpunkte

n = Anzahl der Messungen

x = Messdaten

Q_{xx} = Quersummen der Messdaten

Mein erster Dank gilt meinen beiden Doktorvätern Prof. Dr. Andreas Kirschning und Dr. Gerald Dräger. Ich möchte für die Unterstützung und die Freiheiten innerhalb dieses spannenden, fordernden und vielseitigen Themas danken. Dafür, dass beide jederzeit mit einem offenen Ohr für verschiedenste Probleme zu Verfügung standen, bedanke ich mich. Insbesondere Dr. Gerald Dräger möchte ich für die Hilfsbereitschaft, vor allen Dingen bei technischen Problemen, danken.

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Jonas Ammermann, Franziska Gille, Mona Oltmanns, Katja Seidel, Maik Siebke und Michael Wolling danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern der spektroskopischen und massenanalytischen Abteilung, Dr. Jörg Fohrer, Dr. Edgar Hofer, Dagmar Körtje, Monika Rettstadt, Roswitha Reichel und Anne Schulz.

Dem Sekretariat möchte ich für die Hilfe und die Abwicklung von vielfältigen Aufgaben danken. Kristina Struckmeier, Monika Griese und Christine Bartzko möchte ich dabei für die fröhliche und herzliche Atmosphäre danken.

Ich danke allen Kollegen aus den Foschungsklustern REBIRTH und Biofarbrication for NIFE, Dr. Sabrina Schmeckeber, Dr. Michael Pflaum, Dr. Bettina Wiegmann, Dr. Andreas Winkel, Dr. Sabrina Schlie-Wolter, Dr. Elena Fadeeva, Dr. Johanna Walter und Vivian Keller. Nur durch eure Hilfe sind die Ergebnisse der letzten Jahre und einige neue Projekte zustande gekommen.

Besonderer Dank gilt dem Arbeitskreis Kirschning, für die tolle Arbeitsatmosphäre, auch auf der Baustelle, die intensiven Diskussionen und den Aktivitäten außerhalb des Labors. Speziell zu erwähnen für die Mitarbeit an Projekten und Unterstützung, sind hierbei Jonas Ammermann, Bastian Dieter, Jan Hartwig, Dr. Lukas Kupracz, Dr. Lena Mancuso, Mona Oltmanns und Katja Seidel. In diesem Sinne möchte ich mich auch für die tolle Vorarbeit und die herzliche Aufnahme in die Gruppe und ins Labor bei Dr. Lena Möller und Dr. Andreas Krause bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Karthiga Kanthasamy für die Hilfe bei den XPS-Messungen, Dr. Tetyana Melnyk für die Hilfe bei den EDX-Messungen und REM-Aufnahmen, sowie Dr. Alexander Knospe für die Unterstützung mit der Plasmaanlage danken.

Ich möchte mich bei allen Studenten, die von mir betreut wurden, bedanken. Nicht nur ich konnte euch etwas in den verschiedenen Praktika beibringen, sondern ihr habt mich in meiner persönlichen Entwicklung und der Art und Weise wie ich betreuen möchte unheimlich vorangebracht.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie, die mich nicht nur in der Zeit der Promotion unterstützt hat, sondern mir schon in den Jahren davor immer eine Hilfe und Unterstützung gewesen ist. Der Rückhalt von eurer Seite bedeutet mir sehr viel.

Lebenslauf

Jessica Buchholz,

geboren am 02.04.1984 in Bremervörde

Beruflicher Werdegang

Januar 2012 – Februar 2016

Promotionsstudium an der Gottfried Wilhelm von Leibniz Universität Hannover
 „Chemische Funktionalisierung von Oberflächen von biomedizinischen Materialien
 für die regenerative Therapie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Kirschning
 und Dr. Gerald Dräger

- Zusammenarbeit mit der **Medizinischen Hochschule Hannover, Laser Zentrum Hannover e.V. und Plasmatrete GmbH**
- Entwicklung biokompatibler Oberflächen
- Synthese und Ligation von Signalfaktoren
- Organisieren von Praktika
- Betreuung von Bachelor- und Masterstudenten

September 2009 – Dezember 2011

Mitarbeiterin in der Olfaktometrie, LUFA Nord-West, Institut für Bodenkunde
 Mitarbeiterin in der Olfaktometrie, LUFA Nord-West, Institut für Bodenkunde

- Sensorische Untersuchung von Gasproben und Rastermessungen

Juni 2006 – September 2006

August 2007 – Oktober 2007

Chemielaborantin in der Chloralkalielektrolyse, DOW Deutschland GmbH & Co
 OHG, Stade

- Nasschemische Analyse von Prozess- und Produktproben
- Produktfreigaben
- Qualitätssicherung

September 2003 – Juni 2006

Ausbildung zur Chemielaborantin, DOW Deutschland GmbH & Co OHG, Stade

- Analyse von Proben im Bereich der Produktion von Polymeren, chlorierten Alkanen, Natronlauge/Chlorgas

Studium

Oktober 2009 – Dezember 2011

Masterstudium an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
Abschlussarbeit: „Herstellung von neuen Liganden für katalytische Hydroaminierungs- und Hydroaminoalkylierungsreaktionen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Sven Doye

Oktober 2006 – September 2009

Bachelorstudium an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Abschlussarbeit: „Versuche zur titankatalysierten intramolekularen Hydroaminoalkylierung von Alkenen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Sven Doye

Schulbildung

August 2000 – Juli 2003

Fachgymnasium Wirtschaft, Johann-Heinrich-von-Thünen Schule

Publikationen, Poster und Vorträge

G. Dräger, J. Buchholz, B. Wiegmann **2012** *Beilstein TV*.

L. Mancuso, T. Knobloch, J. Buchholz, J. Hartwig, L. Möller, K. Seidel, W. Collisi, F. Sasse, A. Kirschning **2014** *Chem. Eur. J.* 20, 17541-17551.

J. Buchholz, L. Möller, C. Hess, b. Wiegmann, A. Kirschning, G. Dräger *TERMIS 2013*, **Juni 2013**, Istanbul.

J. Buchholz *BSRT Symposium 2013*, **Dezember 2013**, Berlin.

J. Buchholz *Winterfeldt-Preis 2014*, **Juni 2014**, Hannover.

J. Buchholz, G. Dräger, A. Kirschning, L. Möller, C. Hess, M. Pflaum, S. Schmeckeber, B. Wiegmann, A. Winkel, M. Stiesch, V. Keller *ESB 2014*, **September 2014**, Liverpool.