# Synthese biomimetischer Triscatechole für die stabile chemische Immobilisierung auf Metalloberflächen

# Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

# Faiza Khalil

vorgelegt dem Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

# Hamburg

2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

Ι

2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Theato

Tag der Disputation: 19. Juli 2013

#### DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Oktober 2012 am Institut für Organische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen und am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Maison angefertigt. Von September 2010 bis Juli 2011 erfolgte ein interdisziplinärer Forschungsaufenthalt an der Kansas State University in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan H. Bossmann.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Maison für die interessante Themenstellung, die freundliche Betreuung und die vielen hilfreichen und lehrreichen Diskussionen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Stefan H. Bossmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit zur Forschung an einem interessanten Thema und seine fachliche Betreuung bedanken. Desweiteren gebührt ihm und Katharina Bossmann ein großes Dankeschön für die Unterstützung, die Organisation und die familiäre Atmosphäre während meines Aufenthalts in den USA.

Ich danke allen Angestellten des Instituts, die meine Arbeit mit Messungen, Ratschlägen und Organisation unterstützt haben – vor allem den Teams um Frau Dr. Hausmann, Herrn Dr. Röcker, Herrn Dr. Neudert, Herrn Dr. Hackl, Frau Dr. Trusch sowie den Mitarbeitern der Chemikalien- und Geräteausgabe und der Glasbläser- und Feinmechanischen Werkstatt.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Maison möchte ich mich für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte ich Sevgi Arampatzi, die mir während des Studiums und der Promotion mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Dorith Claes und Ella Kriemen möchte ich mich für die schönen Abende an der Uni bedanken (nicht zu vergessen unsere Abendessen). Außerdem danke ich ihnen und Heike Thomanek für die Unterstützung und Motivation während der Endphase meiner Promotion in Hamburg. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Ehemaligen Christian Küchenthal, Falk Wienhold, Miriam Wendland und Nina Deppermann für die freundliche Hilfsbereitschaft bedanken. Allen aktuellen Arbeitsgruppen-Mitgliedern wünsche ich weiterhin viel Erfolg.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Bossmann und der AG Troyer für das freundliche Arbeitsklima bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Hongwang Wang, Ayomi Perera, Mausam Kalita, Dinusha Udukala, Sebastian Wendel, Gayani Abayaweera, Harshi Manawadu, Tej Shrestha, David Villanueva, Pamela Maynez, Leonie Bossmann, Jenny Barriga, Colette Robinson und Siva Balivada. Unseren Kooperationspartnern – der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Janek, Prof. Dr. Smarsly, Prof. Dr. Schnettler (Prof. Dr. Katrin Lips, Dr. Katrin Trinkaus und Olga Dakischew), Prof. Dr. Wöstmann (Gero Winkler und Michael Kohl) und Prof. Dr. Heisig – danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ein herzlicher Dank gilt Alexander Rein, Dr. Markus Rohnke, Michael Schröder, Christoph Weidmann und Alexander Reinhardt für die geduldige und kompetente Beantwortung zahlreicher Fragen.

Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Göttlich, Prof. Dr. Schreiner, Prof. Dr. Aakeröy und Prof. Dr. Hua für den freundschaftlichen Austausch von Chemikalien und Wissen sowie deren Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Melanie Jopp, Christian Torben Seitz und Michael Linden für die gute Zusammenarbeit und ihren Beitrag zu dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Patrick Theato danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die Aufmunterung und den mir in jeglicher Hinsicht eingeräumten Freiraum. Vor allem möchte ich meiner Mama meinen tiefsten Dank aussprechen. Insbesondere schätze ich ihre Unterstützung, Geduld, Motivation und ihren Zuspruch während des Studiums und der Promotion.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
ber.	berechnet
Boc	tert-Butoxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di-tert-Butyldicarbonat
Cbz-	Benzyloxycarbonyl
COSY	correlated spectroscopy
СТАВ	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	N,N-Dicyclohexylurea
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektronenspray-Ionisation
gef.	gefunden
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexa fluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum coherence

IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
KBE	Koloniebildende Einheit
konz.	konzentriert
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
NIR	Nahes Infrarot
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
NHS-OH	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
ppm	parts per million
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
$\mathbf{R}_{f}$	Retentionsfaktor
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAM	self-assembled monolayer
Smp.	Schmelzpunkt
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ToF-SIMS	Time-of-flight-Sekundärionen-Massenspektrometer
Triton B	Benzyltrimethylammoniumhydroxid

## INHALTSVERZEICHNIS

A	Abstract				
1	1 Einleitung				
	1.1	Biofouling – Funktionalisierung von Implantatmaterialien	3		
	1.2	Magnetfeldhyperthermie – Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel	7		
2	Ke	nntnisstand	13		
	2.1	Ankermoleküle	13		
	2.2	Die Natur zum Vorbild: Catechol-Strukturen	14		
	2.3	Catechole als Ankermoleküle	18		
	2.4	Aufbau multivalenter bifunktionaler Systeme	21		
3	Zie	elsetzung	24		
4 Resultate und Diskussion		sultate und Diskussion	26		
	4.1	Synthese der Catechol-Derivate	26		
	4.2	Evaluierung der Catechol-Metall-Bindung	47		
	4.3	Immobilisierung von Catecholen auf Metalloberflächen	57		
	4.4	Antifouling-Assays	62		
5	Zu	Zusammenfassung67			
6	Summary		69		
7	Au	Ausblick71			
8	Ex	Experimenteller Teil7			
	8.1	Chromatographie	72		
	8.2	Analytik	72		
	8.3	Synthesen	81		
	8.4	Darstellung und Funktionalisierung von Metalloberflächen	101		
	8.5	Durchführung der Assays	103		
9	Ge	Sefahrstoffverzeichnis			
1(	) Lit	iteratur			

#### ABSTRACT

Biomedical implants help to improve quality of life. For a successful therapy these devices should have antifouling properties which prevent biofouling and subsequently bacterial infections. Therefore, polymers such as polyethylene glycol (PEG) are attached to implant surfaces *via* anchor groups. As these biomaterials should survive for a long time in human organism these anchor groups need to have a high binding stability in physiological medium.



This work presents the synthesis of trimeric catecholates as anchor groups. Their design is based on natural metal binders such as siderophores and mussel adhesion proteins. The trimerization of the anchor moieties should enhance their binding stability to metal surfaces.

Three catecholate groups (blue) are linked to a scaffold based on a trisalkylmethyl core structure (black). This bifunctional, flexible scaffold enables a tripodal orientation of the anchor groups and simultaneously their separation from coupled effector molecules (green). The resulting surface binders are tested for their stability and binding properties on  $TiO_2$  and stainless steel surfaces. Quantitative IR spectroscopy of coated  $TiO_2$  nanoparticles demonstrates the durable immobilization of the triscatecholates in aqueous buffer solutions, even of acidic pH values. Subsequently, bulk metal surfaces are coated with triscatecholates and characterized by using ToF-SIMS and contact angle measurements. For antifouling assays the triscatecholates are conjugated with PEG (effector molecules) and also immobilized on  $TiO_2$  and stainless steel surfaces. The resulting surface exhibit antifouling properties which are demonstrated in a blood and in a bacterial assay with *Staphylococcus epidermidis*. Besides, these PEG-triscatecholates are non-toxic to bone marrow stem cells. Thus, due to their stability and biocompatibility our triscatecholates may find useful applications in implant medicine.

Keywords: biomimetic - enterobactin - triscatecholates - surface chemistry - antifouling

#### **1 EINLEITUNG**

In der Medizin kommen für therapeutische und diagnostische Zwecke vielfältige Biomaterialien zum Einsatz. Zu den Biomaterialien zählt jeder Werkstoff, der für eine medizinische Behandlung in Kontakt mit menschlichem Gewebe gebracht wird.<sup>1-2</sup> Dazu gehören sowohl Kunststoffe wie Polymere als auch Metalle wie Gold, Titan oder Titanlegierungen.<sup>3</sup> Für eine erfolgreiche Therapie ist es Voraussetzung, dass die Biomaterialien eine hohe Biokompatibilität und eine geringe Toxizität aufweisen. Darüber hinaus sollen sie in der Lage sein, sich aktiv in die Umgebung zu integrieren bzw. gezielt mit ihr zu wechselwirken. Damit die Materialien diesen Anforderungen genügen können, werden ihre Oberflächen mit Hilfe von chemischen Verfahren gezielt modifiziert.<sup>4</sup>

Im Folgenden wird anhand von zwei Beispielen auf die Oberflächenmodifizierung von Biomaterialien – speziell den Metallen – eingegangen: Metalle in der Implantatmedizin (Abschnitt 1.1) und Metalle in der modernen Krebstherapie (Abschnitt 1.2).

In der Implantatmedizin haben sich vor allem Titan und Titanlegierungen aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften und chemischer sowie biologischer Inertheit als Grundstoff etabliert.<sup>5</sup> So werden über 90% aller Zahnimplantate und mehr als 95% aller Knochenimplantate aus Titan hergestellt.<sup>6</sup> Trotz ihrer hohen Bioverträglichkeit besteht die Gefahr einer bakteriellen Infektion. Diese wird durch die Bildung eines bakteriellen Biofilms auf der Implantatoberfläche (Biofouling) ausgelöst.<sup>7-8</sup> Um die Entstehung eines Biofilms zu verhindern, können die Implantatoberflächen mit hydrophilen Polymeren beschichtet werden.<sup>9</sup>

Bei der Krebstherapie werden Metalle in Form von magnetischen Nanopartikeln in der Magnetfeldhyperthermie (Hyperthermie, *griech.* für Überwärmung) eingesetzt.<sup>10</sup> Bei diesem neuen Verfahren werden Nanopartikel, die zuvor in das Tumorgewebe eingebracht wurden, mit Hilfe von magnetischen Wechselfeldern angeregt. Ihre anschließende Relaxation führt dazu, dass die Krebszellen auf Temperaturen bis zu 44 °C aufgeheizt und so geschädigt werden.<sup>11</sup> Für diese Therapie haben sich vor allem Eisenoxid-Nanopartikel mit einer Größe von 10-20 nm aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften etabliert.<sup>12-13</sup> Um die Erfolgsrate der Therapie zu erhöhen, ist eine Beschichtung der Nanoteilchen erforderlich. Dies ermöglicht, dass die Nanopartikel ausschließlich von Tumorzellen aufgenommen werden.<sup>11,14-15</sup>

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass eine gezielte Modifikation von Metalloberflächen (Titan bzw. Eisenoxid) zur Verbesserung der Therapie beitragen kann. Diese wird über die Einführung von bifunktionalen Molekülen erreicht, die die gewünschte Funktionalität tragen (Effektormoleküle) und über sogenannte Ankermoleküle an die Metalloberfläche gebunden werden.<sup>16-17</sup>

#### 1.1 Biofouling – Funktionalisierung von Implantatmaterialien

In Deutschland benötigen jährlich rund 400 000 Menschen ein neues Hüft- oder ein Knieimplantat.<sup>18</sup> Da es jedoch in 1-2% der Eingriffe zu Fremdkörper-assoziierten Infektionen (periprothetische Infektionen) kommt, besteht Handlungsbedarf, sich mit dieser Problematik auseinander zu setzen. Im Folgenden wird daher näher auf die Mechanismen zur Entstehung von Infektionen und den daraus resultierenden Therapieansätzen eingegangen.

Grundlage für die periprothetische Infektion ist das Implantat selbst und ein Wettstreit zwischen den körpereigenen (Abwehr-) Zellen (wie Makrophagen, Osteoblasten sowie Fibroblasten) und den ebenfalls im Blut vorhandenen bakteriellen Infektionserregern (wie *Staphylococcus (epidermides* und *aureus)*<sup>19-21</sup>) um diese neue Besiedlungsoberfläche – Gristina bezeichnete diesen Wettkampf 1987 als "race for the surface".<sup>22</sup>

Wenn ein Implantat im menschlichen Organismus eingesetzt wird, nähern sich die Wirtszellen und die Infektionserreger diesem Fremdkörper und versuchen, dessen Oberfläche auf ihre jeweilige Weise zu kolonisieren. Ob sich nun die Abwehrzellen gegenüber den Bakterien behaupten können oder nicht, hängt von komplexen Mechanismen ab.<sup>23</sup> Schaffen es körpereigene Zellen, die Oberfläche zu besetzen, wird das Implantat integriert und eine bakterielle Infektion erschwert. Das Immunsystem von Patienten ist jedoch unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff derart geschwächt, dass selbst eine sehr geringe Anzahl an Bakterien (etwa 100 Keime) ausreicht, um sich gegen die Abwehrzellen durchzusetzen.<sup>24</sup> Die Keime vermehren sich dann auf der Implantatoberfläche und bilden schließlich auf dieser einen Schutzfilm aus, den sogenannten Biofilm.<sup>7-8</sup> Von hier aus beginnen die Bakterien sich nun in der Umgebung des Implantats zu vermehren, was zu einer Infektion führt. Der Biofilm dient den Infektionserregern als ein Reservoir und ist damit ein essentieller Faktor, um ihr Überleben und ihr Wachstum zu sichern. Um Strategien gegen die Infektionen zu entwickeln, ist es daher sinnvoll, die Entstehung des Biofilms zu verstehen.

#### Entstehung eines bakteriellen Biofilms

Ein Biofilm besteht aus einer Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen (zum Beispiel Bakterien oder Pilzen), die in einer extrazellulären polymeren Matrix (EPS, *engl.* für extracellular polymeric substance) eingebettet sind und sich auf einer Oberfläche ansiedeln. Die EPS ist eine Schleimschicht, die aus Polysacchariden, Proteinen, Glycolipiden, bakterieller DNA und bis zu 99% Wasser besteht.<sup>25-26</sup> Sie wird von den Bakterien selbst produziert und schützt die in dem Biofilm lebenden Bakterien vor dem Immunsystem des Wirts und antimikrobiellen Substanzen.<sup>23,27</sup> Die Ausbildung eines Biofilms kann in sieben Schritte unterteilt werden, welche in Abb. 1-1 dargestellt sind.<sup>7-8,28</sup>



Abb. 1-1: Entstehung eines Biofilms: 1) Adsorption von Plasmaproteinen, 2) reversible und 3) irreversible Bindung von Bakterien auf der Oberfläche, 4) Kommunikation über Quorum Sensing, 5) Bildung einer extrazellulären Polymermatrix, 6) Wachsen des Biofilms durch Nahrungsaufnahme und 7) Besiedelung neuer Oberflächen.

Sobald ein Implantat im menschlichen Organismus eingesetzt wird, beginnen die sich im Blutplasma befindenden Proteine, sich auf der Implantatoberfläche abzusetzen ("conditioning film") (1). Die Entstehung der Proteinschicht ist der entscheidende Schritt für eine Bakterienadhäsion, denn auf dieser Schicht befinden sich Rezeptoren (wie Fibronektin, Fibrinogen oder Thrombozyten), an denen die Bakterien nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip andocken können.<sup>27,29</sup> Die initiale Anlagerung von Bakterien ist reversibel (2). Mit der Zeit lagern sich die Bakterien jedoch irreversibel an die Proteinschicht an (sessile Bakterien) (3). Sessile Bakterien sind in der Lage, sich durch eine auf Pheromonen-basierte Kommunikation ("Quorum Sensing") (4) auf der Implantatoberfläche zu vermehren (proliferieren) und die EPS auszubilden (5).<sup>30-32</sup> Über das Quorum Sensing können weitere Mechanismen ausgelöst werden, die den Erhalt der Bakterienkolonien sichern. So können Bakterien über diese Fähigkeit ihre Populationsdichte koordinieren und Gefahren aus ihrer Umgebung (wie pH-Wertänderung oder Nährstoff- sowie Sauerstoffmangel) erkennen und auf diese mit einer entsprechenden Antwort reagieren.<sup>33</sup> Der gesamte Biofilm wächst stetig, indem die Bakterien

Nahrung wie Blutplättchen aus ihrer Umgebung aufnehmen (6). Von dem ausgereiften Biofilm können sich Anteile passiv durch "sloughing" (Biofilm-Fetzen) oder aktiv durch "Schwärmerzellen" lösen. Diese besiedeln neue Oberflächen, und es kommt dort zur erneuten Ausbildung von Bakterienkolonien (7).<sup>34</sup> Die Verbreitung der Biofilme auf neue Oberflächen wird als Infektion bezeichnet.

Im Folgenden werden drei verschiedene Strategien vorgestellt, mit der die Entstehung eines Biofilms bzw. einer Infektion verhindert werden soll. Diese drei Konzepte greifen in den unterschiedlichen Entstehungsphasen des Biofilms ein.

#### 1.1.1 Strategien zur Bekämpfung von Biofilmen

Die häufigste Behandlungsmethode einer bakteriellen Infektion ist die Antibiotikatherapie (Abb. 1-2 a).



Abb. 1-2: Konzepte zur Bekämpfung eines bakteriellen Biofilms: a) Antibiotikatherapie bei einem ausgereiften Biofilm, b) antibakterielle Beschichtung der Oberfläche und c) Protein-abweisende Oberfläche.

Antibiotika wirken, indem sie unter anderem die Zellwandsynthese der Bakterien hemmen und dadurch ihr Wachstum verhindern.<sup>35</sup> Befinden sich die Bakterien jedoch in einem Biofilm, sind sie deutlich geschützt vor dem Einfluss des Antibiotikums. Studien haben gezeigt, dass Bakterien innerhalb eines Biofilms bis zu 1000-mal schlechter auf Antibiotika ansprechen als Bakterien, die sich im Blutplasma befinden.<sup>36-37</sup> Für dieses Verhalten gibt es im Wesentlichen zwei Gründe. Zum einen ist die Struktur der EPS so aufgebaut, dass Antibiotika die Matrix nicht vollständig durchdringen bzw. nicht in ausreichender Konzentration bis ins Innere des Biofilms gelangen können.<sup>38</sup> Zum anderen tritt in den tiefen Bereichen des Biofilms Sauerstoff- und Nährstoffmangel auf, was zu einem verlangsamten Metabolismus der Bakterien führt.<sup>33,39</sup> Antibiotika wie beispielsweise Penicillin sind jedoch nur bei stoffwechselaktiven Bakterien wirksam.<sup>40</sup> Ein weiterer großer Nachteil von Antibiotika ist, dass Bakterien mit der Zeit Resistenzen gegen diesen Wirkstoff entwickeln können. Dies erreichen sie durch Änderungen ihrer Genexpressionen, mit denen sie besser auf äußere Umstände bzw. Stress, dem sie beispielsweise durch eine Behandlung mit Antibiotika ausgesetzt sind, angepasst sind.<sup>26</sup>

Um zumindest die schützende Wirkung des Biofilms zu unterbinden, werden in einem weiteren Ansatz die Oberflächen der Implantate mit antimikrobiellen Substanzen beschichtet (Abb. 1-2 b). Das Ziel dieser Strategie ist es, die Bakterien unmittelbar nach ihrer Adhäsion auf der Proteinschicht, die sich grundsätzlich auf der Implantatoberfläche ausbildet, in der kritischen postoperativen Phase abzutöten. Dadurch sollen alle Folgeprozesse, die schließlich zur Entstehung des Biofilms führen, von vornherein unterbunden werden.<sup>41</sup> Als antimikrobielle Substanzen werden zum Beispiel Silber,<sup>42</sup> Antikörper<sup>43</sup> oder Enzyme<sup>44</sup> verwendet. Da auch mit dieser Therapie das Problem der Resistenzentwicklung der Bakterien gegenüber dem Antibiotikum weiterhin bestehen bleibt, wird in einem neuen Ansatz versucht, die Ausbildung einer Proteinschicht zu verhindern, so dass den Bakterien die Grundlage genommen wird, um sich an das Implantat anzuhaften und schließlich Infektionen auszulösen (Antifouling-Beschichtung) (Abb. 1-2 c). Proteine binden bevorzugt auf hydrophoben Oberflächen (wie TiO<sub>2</sub>).<sup>9,45-46</sup> Der Grund dafür liegt an ihrem amphiphilen Charakter. Proteine bestehen aus einem hydrophoben Kern und einer hydrophilen Hülle. Bei der Annäherung der Proteine an eine hydrophobe Oberfläche verzerrt sich die Proteinstruktur, so dass der innere hydrophobe Teil des Proteins sich nach außen kehrt und eine Bindung mit der hydrophoben Oberfläche ermöglicht. Daher werden Implantate der neuesten Generation mit hydrophilen Polymeren beschichtet. Das am häufigsten verwendete Polymer für Antifouling-Oberflächen ist das Polyethylenglycol (PEG).<sup>47-49</sup> Desweiteren werden auch Hyaluronsäure,<sup>50</sup> Polysaccharide (Chitosan und Dextran),<sup>51-52</sup> Poly(2-Methyl-2-oxazolin),<sup>53</sup> Poly(Vinylpyrrolidon),<sup>54</sup> nicht-ionische (Polyacrylamid)<sup>55</sup> sowie zwitterionische (Sulfobetaine)<sup>56</sup> Polymere verwendet.

Eine mögliche Erklärung für den Wirkungsmechanismus von Protein-abweisenden Schichten liefern Jeon *et al.*, die PEG-funktionalisierte Oberflächen untersucht haben. Sie nehmen ein Modell an, in dem das Protein als ein Block simuliert wird, der unendlich lang ist und sich dem Substrat parallel annähert. Die PEGs sind lange Ketten, die hydratisiert an die Substratoberfläche gebunden sind (Abb. 1-3).<sup>57-58</sup> Jeon *et al.* postulieren anhand ihres Modells, dass die repulsive Wirkung von PEG auf das Protein auf zwei Ursachen zurückzuführen ist. Zum einen werden die Proteine, die sich einer PEG-Kette annähern, komprimiert, was eine sterische Abstoßung zur Folge hätte. Zum anderen bewirkt die

eingeschränkte Bewegungsfreiheit der zusammengestauchten PEG-Ketten eine Entropiesenkung, welche in der Natur unvorteilhaft ist.



Abb. 1-3: Protein-abweisende Wirkung von PEG bei der Annährung eines Proteins.<sup>58</sup>

Es wurde daher gefolgert, dass die Protein-abweisende Wirkung von PEG umso höher ist, je länger die Ketten sind.<sup>58</sup> Prime und Whitesides *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine hervorragend Protein-abweisende Schicht auch mit kurzkettigen PEG-Einheiten (zwei Ethylenoxid-Einheiten) hergestellt werden kann. Dafür verwendeten sie gemischte SAM (*engl.* für self-assembled monolayers), HS(CH<sub>3</sub>)<sub>11</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)OH und HS(CH<sub>3</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>, die mit Hilfe von Thiolen als Ankermoleküle auf die Oberflächen befestigt wurden. Diese SAM-Ketten wiesen in diesem Fall eine hohe Dichte auf der Substratoberfläche auf, was die Protein-abweisende Wirkung weiter erhöhte.<sup>47,59-60</sup>

#### **1.2** Magnetfeldhyperthermie – Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel

Krebs ist in Deutschland nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Etablierte Therapiemethoden wie die operative Tumorentfernung sowie die Chemo- und Strahlentherapie liefern nur mäßige Erfolge und sind zudem nur begrenzt einsetzbar. Chemotherapeutika beispielsweise können nicht effektiv genug zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen unterscheiden, so dass bei Therapien auch gesunde Zellen abgetötet werden. Zudem führt die wiederholte Anwendung von Chemotherapeutika entwickeln. Eine erhöhte Dosierung dieser Arzneimittel ist daher problematisch.<sup>61-62</sup> Eine neue Therapie, die zur Lösung dieser Probleme beitragen kann, ist die sogenannte Magnetfeldhyperthermie. Diese soll die bisherigen Krebstherapien unterstützend begleiten, so dass beispielsweise die Dosierung der Chemotherapeutika reduziert werden kann.<sup>63-64</sup>

Bei der lokalen Hyperthermie wird die vom Tumor befallene Körperpartie mit Hilfe von elektromagnetischer Strahlung aufgeheizt. Da die Tumorzellen aufgrund ihrer Physiologie empfindlicher für Hitze sind als gesunde Zellen, beginnen sie ab einer Mindesttemperatur von 39 °C abzusterben.<sup>65-66</sup> In der Therapie wird mit Maximaltemperaturen bis 44 °C gearbeitet, da ab dieser Temperatur auch gesunde Zellen beginnen abzusterben.<sup>64</sup>

Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen bezüglich ihres Stoffwechsels, ihrer Gefäßversorgung und ihres schnellen und unkontrollierten Zellwachstums. Infolgedessen haben sie eine chaotische und löchrige Architektur mit inhomogener Durchblutung.<sup>67</sup> Die Physiologie des Tumors führt letztendlich dazu, dass im Vergleich zum gesunden Gewebe Wärme schlechter abtransportiert wird und die Tumorzellen so der toxischen Wirkung der Hitze länger ausgesetzt sind. Ein weiterer Effekt der Wärmetherapie ist, dass auch die Wirksamkeit einer Chemotherapie erhöht wird. Denn zum einen fördert Hitze die Durchblutung des Tumorgewebes, so dass die Aufnahme der Zytostatika gesteigert wird und zum anderen wird durch die erhöhte Temperatur die chemische Reaktion der Chemotherapeutika beschleunigt.<sup>64</sup> Schließlich veranlasst der Hitzestress, dass Tumorzellen sogenannte Hitzestressproteine auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese sollen die Tumorzellen vor der Hitze schützen. Das Immunsystem deutet sie jedoch als körperfremd und greift sie und mit ihnen die Tumorzellen an.<sup>68</sup>

Für die Temperaturerhöhung in der lokalen Hyperthermie werden zum Beispiel Laser, Utraschall, Mikrowellen oder implantierte Elektroden, die mit Kadiowellen angeregt werden, verwendet. Diese Methoden ermöglichen jedoch nur schwer den Zugang zu tiefer liegenden Tumoren. Eine Alternative hierzu, die große Anerkennung erlangt hat, bietet der Einsatz mit beschichteten superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (Magnetfeldhyperthermie). Diese werden in den Körper injiziert und gelangen aufgrund ihrer Funktionalisierung in den Tumor (Tumor Targeting).<sup>65</sup> Von außen wird nun ein hochfrequentes Magnetfeld eingeschaltet, welches die Nanoteilchen anregt. Durch ihre spontane Relaxation (Brown-Relaxation bzw. Néel-Relaxation) wird Energiewärme an die Umgebung abgegeben, so dass Krebszellen auf die gewünschte Temperatur aufgeheizt werden können.<sup>12,65,69</sup>

#### **Exkurs: Superparamagnetismus**

In ferromagnetischen Festkörpern wie Eisen, Cobalt und Nickel treten unterhalb der Curie-Temperatur "kollektive" Wechselwirkungen zwischen den Elektronenspins der unterschiedlichen Atome bzw. Moleküle auf. Aufgrund dieser Wechselwirkungen bilden sich sogenannte "Domänen" im Festkörper aus. Innerhalb einer Domäne sind die Spins der Elektronen parallel zueinander ausgerichtet. Daher weist eine Domäne eine Gesamtmagnetisierung in einer bestimmten Richtung auf. Die Gesamtmagnetisierung des Festkörpers M ist die Summe der Magnetisierung der einzelnen Domänen. Da die Magnetisierung der einzelnen Domänen über den gesamten Festkörper statistisch verteilt ist, ferromagnetische Festkörper nicht magnetisch. erscheint der Wird nun dieser ferromagnetische Stoff in ein äußeres Magnetfeld  $B_a$  gebracht, so richtet sich die Magnetisierung jeder Domäne parallel zum äußeren Feld aus. Der Festkörper erscheint nun magnetisch (Abb. 1-4).



Abb. 1-4: Magnetisierungen der Domänen von Ferromagneten und Nanopartikeln für  $B_a = 0$  bzw.  $B_a \neq 0$ ,  $[B_a:$  äußeres Magnetfeld].

Ferromagnetische Stoffe, deren Durchmesser im Nanobereich liegen (Partikelgröße zwischen 10-20 nm), zeigen ein superparamagnetisches Verhalten. Dieses unterscheidet sich vom ferromagnetischen Verhalten in zwei Merkmalen: Der Domänenstruktur und der Relaxationszeit.

Die Bildung von Domänen wird durch die Energiebilanz zwischen der magnetostatischen Energie, welche proportional zum Volumen des Materials ist, und der Energie der Domänenwand, welche proportional zur Domänengrenzfläche ist, bestimmt. Für Partikel im Nanobereich unterhalb eines kritischen Volumens ist es energetisch ungünstiger, neue Domänen auszubilden. Superparamagnetische Nanoteilchen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einer einzigen Domäne bestehen. Die Magnetisierungen der Nanopartikel sind statistisch verteilt, richten sich aber beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes  $B_a$ augenblicklich aus.

Das zweite Unterscheidungsmerkmal ist die sogenannte Néel-Relaxationszeit. Nanoteilchen richten ihre Magnetisierungen nicht in beliebige Richtungen aus, sondern haben zwei stabile

Vorzugsorientierungen (magnetische Anisotropie), welche antiparallel zueinander sind. Die mittlere Zeit, die die Magnetisierung benötigt, um von einer Vorzugsrichtung zur anderen und wieder zurück zu springen, wird Néel-Relaxationszeit  $\tau_N$  genannt und ist durch die Néel-Brown-Gleichung gegeben (Gleichung 1).

$$\tau_{\rm N} = \tau_0 \, e\left(\frac{K_{eff} \, V}{k_{\rm B} \, \mathrm{T}}\right) \tag{1}$$

 $k_B$  ist die Boltzmann-Konstante,  $K_{eff}$  die Anisotropiekonstante, V das Teilchenvolumen, T die Temperatur und  $\tau_0 \approx 10^{-9}$ . Das Produkt  $K_{eff}$  V ist die Energiebarriere, die überwunden werden muss, um von einer Vorzugsrichtung zur anderen zu springen. Die Néel-Relaxationszeit reicht von einigen Nanosekunden (für Nanoteilchen) bis hin zu einigen Jahren oder länger. Insbesondere ist aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit des Volumens die Relaxationszeit von Bulkmaterialien sehr groß.<sup>12,65,70</sup>

Die kurzen Relaxationszeiten der Nanoteilchen spielen eine wesentliche Rolle bei der Hyperthermie, in der elektromagnetische Energie in Wärme umgewandelt wird.

Nanoteilchen, die keinem magnetischen Feld ausgesetzt sind, nehmen fortwährend thermische Energie aus ihrer Umgebung auf und verändern dadurch ihre Magnetisierungen. Durch spontane Relaxation (Brown-Relaxation und Néel-Relaxation)<sup>12,65,69</sup> springen ihre Magnetisierungen wieder in den ursprünglichen Magnetisierungszustand zurück. Dadurch wird die ursprünglich von der Umgebung aufgenommene Energie wieder an diese abgegeben. Es kommt zu keiner Wärmeentwicklung der Umgebung.

Bei der Hyperthermie werden Nanoteilchen einem Wechselfeld ausgesetzt. Bei kleinen Frequenzen, also wenn die Schwingungsperiode des Magnetfeldes länger ist als die Relaxationszeit der Nanoteilchen, folgt die Magnetisierung der Nanoteilchen exakt dem einwirkenden Magnetfeld. Noch bevor das Magnetfeld sich umorientiert, relaxieren die Nanoteilchen und geben so die Feldenergie in Form von Wärme an die Umgebung ab. Wird die Frequenz des Magnetfeldes weiter erhöht, können die Nanoteilchen schneller Energie an die Umgebung abgeben. Um die Energie des Magnetfeldes vollständig in Wärmeenergie umwandeln zu können, müssen die Nanoteilchen eine Relaxationszeit haben, die immer kürzer ist als die Schwingungsperiode des Magnetfeldes.

Die Quantifizierung der mit Hilfe von superparamagnetischen Nanopartikeln erzeugten Wärme erfolgt über die Spezifische Absorptionsrate (SAR). Diese gibt die Temperaturerhöhung der Nanopartikel in einer bestimmten Zeit an. Dabei beschreibt C die Wärmekapazität der Nanopartikel (Gleichung 2).<sup>65</sup>

$$SAR = C \times \frac{\Delta T}{\Delta t} [W/g]$$
<sup>(2)</sup>

Diese Wärmekapazität ist abhängig von der Partikelgröße, -form und -beschichtung.<sup>71-72</sup> Damit eine geringe Konzentration der eingesetzten Nanopartikel ausreicht, um große Temperaturerhöhungen zu erhalten, muss die Wärmekapazität hoch sein.<sup>12</sup> Eisenoxid und metallisches Eisen besitzen im Gegensatz zu Goldnanopartikeln diese Eigenschaft. Zudem haben sie im Vergleich zu Cobalt und Nickel eine geringe Toxizität.<sup>12,73</sup> Daher haben sich seit ihrer Einführung durch Gilchrist *et al.*<sup>74</sup> und Gordon *et al.*<sup>75</sup> beschichtete Eisenoxid-Partikel im Bereich der Hyperthermie etabliert.<sup>11</sup>

#### 1.2.1 Aktives und passives Tumor Targeting

Wie bereits erwähnt, ist es für die hyperthermische Krebstherapie wichtig, dass die magnetischen Nanopartikel ausschließlich vom Tumorgewebe aufgenommen werden. Dadurch soll verhindert werden, dass das gesunde Gewebe der toxischen Wirkung der Wärme ausgesetzt wird. Für die eigentliche Aufnahme der Nanopartikel ins Tumorgewebe gibt es zwei Mechanismen: das passive und das viel effizientere aktive Targeting.<sup>14</sup> Diese sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Beim passiven Targeting handelt es sich um eine Methode, die unter Ausnutzen des sogenannten EPR-Effekts (EPR, *engl.* für enhanced permeability and retention für "erhöhte Permeabilität und Retention") Teilchen wie beispielsweise Nanopartikel im Tumorgewebe anreichert.<sup>76</sup> Der EPR-Effekt beschreibt das Phänomen, dass im Tumor aufgrund seiner Physiologie Nanoteilchen in das Tumorgewebe eindiffundieren (Permeation), der Abtransport dieser Teilchen aus dem Tumor jedoch erschwert ist (Retention). Da die injizierten Nanoteilchen über den Blutkreislauf in der Blutbahn zirkulieren, müssten sich die meisten Nanoteilchen aufgrund des EPR-Effekts mit der Zeit in das Tumorgewebe einlagern. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Sobald die Nanopartikel ins Blut gelangen, werden sie vom Abwehrsystem als Fremdkörper erkannt und eliminiert.<sup>77-80</sup> Um dies zu verhindern, werden die Partikel mit hydrophilen Polymeren wie beispielsweise kationischen Liposomen bzw. PEG beschichtet.<sup>81-82</sup> Durch diese Funktionalisierung sind Nanopartikel vor den Immunzellen getarnt ("Stealth"-Strategie) und können so lange genug im Blutkreislauf zirkulieren und schließlich in das Tumorgewebe eindiffundieren.<sup>82</sup> Um die Anreicherungsrate der

Nanopartikel im Tumorgewebe weiter zu erhöhen, werden die Nanopartikel mit gezielten Biomolekülen ("targeting ligands") konjugiert, die das Adressieren von Tumorzellen nach dem "magic bullet"-Prinzip von Paul Ehrlich ermöglichen (aktives Targeting).<sup>61</sup> Tumorzellen exprimieren im Vergleich zu gesunden Zellen bestimmte Rezeptoren in höherer Konzentration, sogenannte Zelloberflächenmarker.<sup>83</sup> Ein solcher Tumormarker ist beispielsweise das prostataspezifische Membranantigen (PSMA). Dieser kommt im Vergleich zu gesunden Zellen in einer etwa 10<sup>6</sup>-fach höheren Anzahl auf der Oberfläche von malignanten Prostatakrebszellen vor.<sup>84-85</sup> Durch die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Liganden können diese gezielt an diese Oberflächenmarker und somit den Tumor binden. Als Ligand erweist sich im Fall von Prostatakrebszellen das PSMA-Antigen GPI als sehr nützlich, da es mit einer hohen Affinität an PSMA-Zellen bindet.<sup>86-87</sup>

#### 2 KENNTNISSTAND

#### 2.1 Ankermoleküle

Um Oberflächen gezielt Eigenschaften zu verleihen, werden diese mit bifunktionalen Molekülen beschichtet. Diese bestehen aus drei Einheiten (Abb. 2-1): dem Kopf (grün), dem Spacer (schwarz) und dem Ankermolekül (blau).



Abb. 2-1: Ankermoleküle für die Oberflächenfunktionalisierung basierend auf: A) hydrophoben und B) elektrostatischen Wechselwirkungen, C) Thiol- D) Silanol- E) Carboxy-, F) Phosphonat- und G) Catechol-Gruppen.<sup>88</sup>

Der Kopf – auch Effektormolekül genannt – bestimmt die Eigenschaften der Oberfläche, das heißt ihre Reaktion mit der Umgebung. Der Spacer dient vor allem zur Verknüpfung des Effektormoleküls mit dem Ankermolekül. Das Ankermolekül schließlich bindet das Gesamtmolekül an die Metalloberfläche und ist damit für die Stabilität der Beschichtung verantwortlich.

Für die Beschichtung der Oberfläche stehen diverse chemische und physikalische Verfahren wie das CVD (CVD, engl. für chemical vapor desorption) bzw. PVD (PVD, engl. für pyhsical vapor desorption) zur Verfügung.<sup>16</sup> Eine besonders einfach zu realisierende und zudem kostengünstige Methode ist das sogenannte "dip coating"-Verfahren.<sup>89</sup> Hier wird das zu beschichtende Material in eine Lösung getaucht, in der die bifunktionalen Moleküle enthalten  $(A),^{49,90}$ elektrostatische<sup>91</sup> Über hydrophobe (B) bzw. kovalente (C-G) sind. Wechselwirkungen beginnen die Ankermoleküle spontan auf dem Substrat zu adsorbieren. Mit dem Ziel eine möglichst geringe Oberflächenenergie zu erreichen, organisieren sich die Moleküle zu sogenannten selbstorganisierten Monolagen (SAM, engl. für "self-assembled monolayers"). Diese zeichnen sich durch eine hohe Ordnung und eine definierte Schichtdicke aus.<sup>46,92</sup> Nach einigen Stunden wird das Material aus der Suspension herausgenommen.

Neben der Erforschung von Effektormolekülen, die die Eigenschaften des Materials festlegen, liegt ein weiterer Fokus auf der Erforschung von Ankermolekülen, denn diese sind für die Stabilität der Schicht verantwortlich. Im Vergleich zu Bindungen, die über physikalische Wechselwirkungen (hydrophobe (A) bzw. elektrostatische (B) Wechselwirkungen) zustande kommen (Abb. 2-1), weisen chemische Bindungen (kovalente Wechselwirkungen (C-G)) oft eine höhere Stabilität auf. Beispiele für kovalente Bindungen sind die Immobilisierung von Thiolen (C) auf Edelmetallen wie Goldoberflächen,<sup>16,93-94</sup> die Beschichtung mit Silanolen (D) auf Glasoberflächen<sup>95-97</sup> und die Bindung von Phosphonaten<sup>98-99</sup> (F) bzw. Peptiden<sup>100</sup> auf Metalloxiden wie TiO<sub>2</sub> oder Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, wobei Thiole, Silanole, Phosphonate bzw. Peptide als Ankermoleküle dienen.

Da viele Ankermoleküle nur auf bestimmte Oberflächen binden, ist ihre Auswahl in vielen Fällen beschränkt. So sind beispielsweise Thiole nur für Edelmetalle geeignet. Erkenntnisse, die im Laufe der Zeit aus der Natur gewonnen werden konnten, haben zur Lösung dieses Problems beigetragen. Es wurde festgestellt, dass Klebstoffe, wie sie beispielsweise von Miesmuscheln produziert werden, sich für starke Bindungen an diversen Oberflächen eignen. Diese Klebstoffe weisen einen hohen Anteil an Catechol-Strukturen auf. Die Verwendung von Catecholen (G) als Ankermoleküle hat daher in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit erlangt.<sup>101-103</sup>

#### 2.2 Die Natur zum Vorbild: Catechol-Strukturen

Wie bereits erwähnt, besitzen Catechole eine hohe Affinität zu vielfältigen Materialien, insbesondere zu Metallen bzw. Metalloxiden. Diese Eigenschaft wird von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ausgenutzt. Zwei aus der Literatur bekannte Beispiele hierfür sind die sogenannten Siderophore und die Muscheladhäsionsproteine. In beiden Fällen werden Catechol-Strukturen eingesetzt, um Metalle bzw. Metallionen zu binden.

Eisen ist ein biologisch essentielles Metall, dessen ionisches Pendant beispielsweise für den Sauerstofftransport und die -speicherung benötigt wird. In seiner natürlichen Form liegt es als Eisen(III)-hydroxid-Komplex vor. Aufgrund seines unter physiologischen Bedingungen sehr geringen Löslichkeitsprodukts stehen Mikroorganismen bzw. Pflanzen nur kleine Mengen an Eisenionen zur Verfügung. Um zusätzlich Eisenionen aus der Umgebung zu gewinnen, wurden spezielle Mechanismen entwickelt, die besonders bei Bakterien gut verstanden sind. Bakterien sondern Siderophore an ihre Umgebung ab. Siderophore sind niedermolekulare, wasserlösliche und chelatisierende Verbindungen, die eine hohe Affinität zu Eisen(III)-Ionen besitzen. Durch Komplexierung sind sie in der Lage, Eisen(III) an sich zu binden und dieses in die Zelle zu transportieren. Die Zelle kann sich auf diese Weise mit einer ausreichenden Menge an Eisenionen versorgen.<sup>104</sup>

Einer der bekanntesten Siderophore ist das  $C_3$ -symmetrische Enterobactin, das aus *Escherichia coli* und anderen Enterobakterien isoliert wurde. Die Komplexierung des Enterobactins mit einem M<sup>+</sup>-Ion erfolgt über drei Catechol-Einheiten (Abb. 2-2).



Abb. 2-2: Enterobactin und die Komplexierung eines Metallions.

Dieses besteht aus einem cyclischen Trimer des *N*-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-Serins und stellt somit ein cyclisches Trilacton dar. Die Anbindung des Metallions erfolgt über die Sauerstoffatome der deprotonierten Hydroxylgruppen der Catechol-Einheiten als Tris(chelat)komplex.<sup>105</sup> Dieser Komplex besitzt eine der höchsten Komplexbildungskonstanten (K =  $10^{49}$ ), die in der Literatur bekannt sind.<sup>106</sup> Weitere Beispiele von Siderophoren sind das Pyoverdin und das Anachelin H. Ersteres wird aus *Pseudmonas aeruginosa* und letzteres aus dem Cyanobakterium *Anabaena cylindrica* isoliert.<sup>107-110</sup>

Als zweites Beispiel für die Verwendung von Catecholen in der Natur werden im Folgenden Muscheladhäsionsproteine von Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) behandelt. Die Miesmuschel besitzt Haftfäden (Abb. 2-3 a), die auch Byssusfäden bzw. "Muschelseide" genannt werden und deren Enden durch Haftplaque (Füße) abgeschlossen sind. Mit den Haftplaques wird der direkte Kontakt zur Substratoberfläche hergestellt (Abb. 2-3 b). Sowohl die Byssusfäden als auch die Haftplaques enthalten Adhäsionsproteine. Diese werden *Mytilus edulis foot proteins* (Mefp) genannt und sorgen für eine starke Haftung selbst auf nassen Oberflächen.<sup>111-113</sup>



Abb. 2-3: a) Miesmuschel haftet auf einer Oberfläche, b) ein aus Haftfäden und -plaques bestehendes Muschelseiden-Verankerungssystem und c) Aminosäuresequenz der Mefp-Proteine mit trimerer DOPA-Struktur.<sup>111</sup>

Es wurde festgestellt, dass Mefp-Proteine einen hohen Gehalt der Aminosäure 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (DOPA<sup>a</sup>) aufweisen, welches als Tripeptid vorliegt (Abb. 2-3 c).<sup>114-116</sup> Dabei fällt auf, dass Mefp-3 und Mefp-5, die in den der Substratoberflächen zugewandten Grenzflächen der Haftplaques enthalten sind, die höchsten DOPA-Konzentrationen (bis zu 27%) enthalten (Abb. 2-3 b).<sup>111</sup>

Messersmith *et al.* haben die Bindungsstärke von DOPA auf Metalloberflächen experimentell bestimmt. Anhand rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen konnten sie zeigen, dass die Dissoziationskonstante der DOPA-TiO<sub>2</sub>-Bindung über 800 pN (Piconewton) beträgt – eine der stärksten je gemessenen, reversiblen Wechselwirkungen.<sup>111</sup>

Zusätzlich zu ihrer hohen Affinität zu Metallen besitzen Muscheln die Fähigkeit, sowohl an organischen als auch an anorganischen Materialien gleichermaßen gut zu binden. Der Grund für dieses Phänomen ist, dass die Catechol-Einheiten des DOPA kohäsive und adhäsive Bindungen zu Oberflächen aufbauen können (Abb. 2-4). Dabei werden kohäsive Wechselwirkungen durch die oxidierte Form des DOPA, dem DOPA-Chinon (3), vermittelt. Dieses entsteht durch Oxidation des DOPA in wässrigen und alkalischen Medien.<sup>117</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Bei (L)-DOPA handelt es sich um eine nichtproteinogene  $\alpha$ -Aminosäure, die durch Hydroxylase aus Tyrosin gebildet wird. Bei Menschen ist (L)-DOPA eine Vorläuferverbindung zur Synthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.



Abb. 2-4: DOPA und DOPA-Chinon Wechselwirkungen. (1) Metallkomplexierung, (2) Bindung auf einer Oberfläche, kohäsive (3) und adhäsive Wechselwirkung sowie Proteinvernetzung (5) über Protein-basierte Radikale (4).

DOPA baut adhäsive Wechselwirkungen zu Metallionen (1) bzw. -oberflächen (2) auf. Sowohl DOPA als auch das DOPA-Chinon bilden in Gegenwart von Sauerstoff Radikale aus. Durch die nachfolgende Radikal-Radikal-Kupplung entstehen Protein-Protein-Vernetzungen, welche aufgrund ihrer vernetzten Struktur die Oberfläche der Byssusfäden bzw. der Haftplaques "erhärten". Werden die Protein-Protein-Vernetzungen aufgebaut, sobald die Haftplaques mit einer Oberfläche in Kontakt treten, entsteht eine Haftung.<sup>118-120</sup>

Die Stärke der Protein-Protein-Vernetzung ist für den Härtegrad und die Dehnbarkeit der Byssusfäden bzw. der Haftplaques verantwortlich. Sie wird über die Konzentration der Metallionen – insbesondere der Eisenionen – in der Protein-Protein-Vernetzung beeinflusst. Eisen und DOPA bilden einen stabilen [Fe(dopa)<sub>3</sub>]-Komplex. Die Metall-Protein-Komplexe zeichnen sich durch eine hohe Bruchfestigkeit aus. Außerdem sind die Metall-Protein-Wechselwirkungen reversibel, wodurch das Haftmaterial dehnbar wird.<sup>121-126</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bakterien wie das *E. coli* und marine Organismen wie die Miesmuscheln Catechol-Einheiten verwenden, um Bindungen mit Materialien – insbesondere Eisen – einzugehen. Dabei weist DOPA eine der stärksten je gemessenen Bindungsstärken auf. In beiden Fällen erfolgt die Bindung zu bzw. die Komplexierung von Eisenionen über trimere Catechol-Strukturen.

#### 2.3 Catechole als Ankermoleküle

Die Natur zum Vorbild nehmend, werden in der Forschung Catechole als Ankermoleküle für die Funktionalisierung von Oberflächen bevorzugt verwendet. Eine Auswahl von bifunktionalen Molekülen, die Catechole als Ankermoleküle enthalten, ist in Abb. 2-5 gezeigt.



Abb. 2-5: Verschiedene, auf Catechol-Einheiten basierende Moleküle, die als bifunktionale Ankermoleküle dienen.

Grätzel *et al.* verwendeten Anfang der 1990er als einer der ersten Catechol-Einheiten als Ankermoleküle und leisteten dadurch mit der Entwicklung von farbstoffsensibilisierten Solarzellen Pionierarbeit in der Solartechnik.<sup>127-128</sup> Die farbstoffsensibilisierte Solarzelle – auch Grätzel-Zelle genannt – ist im Vergleich zu den auf Silicium-basierten Solarzellen kostengünstiger und technisch einfacher zu realisieren.<sup>129</sup> Ausschlaggebend für den Erfolg der Grätzel-Zelle war, dass der Farbstoff, der die Elektronen für den Stromfluss liefert, fest an TiO<sub>2</sub>-Halbleiter gebunden werden konnte. Dies konnten Grätzel *et al.* mit der Verknüpfung des Farbstoffs Ru(II)-Polypyridil **1** zum TiO<sub>2</sub> unter Verwendung von Catechol-Ankermolekülen realisieren (Abb. 2-5).<sup>130</sup> Zusätzlich hat der Einsatz von Catecholen gegenüber Carboxyl- bzw. Phosphonat-Ankermolekülen den Vorteil, dass diese durch Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen den HOMO-LUMO-Abstand des Farbstoffs vergrößern, wodurch die Ladungsinjektion in das TiO<sub>2</sub> und somit der Wirkungsgrad der Grätzel-Zelle verbessert wird.<sup>131</sup>

Eines der bekanntesten Vertreter catecholhaltiger Moleküle ist das Dopamin **3**, welches ein wichtiger Neurotransmitter und ein Hormon im menschlichen Organismus ist. Im Volksmund ist es bekannt als das "Glückshormon". Desweiteren wird Dopamin auch als Arzneistoff, beispielsweise zur Behandlung der Parkinson-Krankheit, verwendet.<sup>132</sup>

Abseits der Medizin hat sich Dopamin auch in den Materialwissenschaften etabliert. Es kann zur Funktionalisierung von diversen Oberflächen wie beispielsweise Edelmetallen, Metalloxiden, Silica, Keramiken oder Polymeren verwendet werden.<sup>101</sup> Die Beschichtung erfolgt mit Hilfe des "dip coating"-Verfahrens. Dabei wird das Substrat in eine alkalische, wässrige Dopamin-Lösung eingetaucht und wieder herausgenommen. Die Oberfläche ist dann mit einem Film aus klebendem Polydopamin überzogen.<sup>133</sup> Diese Polydopamin-Schicht kann schließlich weiter funktionalisiert werden.<sup>134</sup>

Liegt jedoch Dopamin **3** in einer wässrigen Lösung vor und ist es über die  $NH_2$ -Gruppe funktionalisiert, so dient es als bifunktionales Molekül (ohne zu polymerisieren) (Abb. 2-6). Dabei stellt die Catechol-Einheit des Dopamins das Ankermolekül dar und die Amin-Funktionalität ermöglicht die Einführung von Effektormolekülen, die die Eigenschaften der Substratoberfläche definieren.



Abb. 2-6: Bifunktionales Catechol-Derivat.

Die Arbeitsgruppe von Gademann *et al.* hat PEG als Effektormolekül verwendet, um TiO<sub>2</sub>-Oberflächen zu funktionalisieren. Als Ankermolekül wurde das Anachelin-Derivat **5** (aus einem cyanobakteriellen Siderophor) eingesetzt (Abb. 2-5). Unter Verwendung von VASE (VASE, *engl.* für variable angle spectroscopic ellipsometer)-Untersuchungen konnten sie zeigen, dass das PEG-konjugierte Derivat **7** eine Protein-abweisende Wirkung aufweist (Abb. 2-7).<sup>135</sup> Mit PEG modifizierte Oberflächen werden als sogenannte Antifouling-Beschichtungen beispielsweise für Implantatmaterialien genutzt (Kapitel 1.1).



Abb. 2-7: PEG-Catechol-Derivate für die Antifouling-Beschichtung.

Messersmith *et al.* haben weiterhin ein mulitvalentes, peptidomimetisches Polymer **9** synthetisiert, das eine Adsorption von Fibroblasten über mehrere Monate verhindern konnte.<sup>136</sup> Die Arbeitsgruppe konnte anhand Ellipsometer-Untersuchungen zeigen, dass eine trimere Präsentation der Catechole die Protein-abweisende Wirkung deutlich beeinflusst. Das multivalente PEG-Catechol **8** hat im Vergleich zu seinem monomeren Analogon eine erhöhte Proteinresistenz gezeigt.<sup>117,137-138</sup> Schließlich haben Saxer *et al.* das Catechol-Derivat Poly(L-Lysine)-g-poly(ethylenglycol) (PLL-g-PEG) **10** hergestellt. In diesem Fall wurde eine erhöhte Bindungsstabilität zu der negativ geladenen TiO<sub>2</sub>-Oberfläche sowohl durch das Ammoniumkation als auch durch die Kupplung des Lysins mit der Catechol-Einheit erreicht.<sup>139</sup>

Neben dem Einsatz von Catecholen im Bereich der medizinischen Implantatologie wurde mit der Verwendung dieser Ankermoleküle in der Nanomedizin ein weiteres Anwendungsgebiet eröffnet. Hier werden diese Moleküle vor allem zur Funktionalisierung von (superpara-) magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln verwendet, die dann unter anderem in der Krebstherapie (Kapitel 1.2) und in der Krebsdiagnostik eingesetzt werden.<sup>140</sup> Bossmann *et al.* haben Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel mit Porphyrinen (Tetrakis-carboxyphenylporphyrin, TCCP) modifiziert und diese im Bereich der Hyperthermie eingesetzt. Die Funktionalisierung erfolgte mit Hilfe von Catechol-Ankermolekülen (Abb. 2-8).



Abb. 2-8: Schematische Darstellung von mit TCPP funktionalisierten Eisen/Eisenoxid-Nanopartikeln.<sup>141</sup>

Porphyrine werden von LDL (low denisty lipid)-Rezeptoren aufgenommen, welche im Vergleich zu gesunden Zellen in einer deutlich größeren Anzahl auf der Oberfläche von Krebszellen vorhanden sind.

In einem Versuch wurden sogenannte B16F10 Maus-Melanoma-Zellen in die oberen Hinterbeine von 20 Mäusen injiziert. Diese Krebszellen sind resistent gegenüber einer Chemotherapie. Nach der Injektion von Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel in die Krebszellen wurden sie mit Hilfe eines Wechselfeldes (Frequenz 366 kHz) auf über 43 °C erhitzt. Dadurch wurde der programmierte Zelltod der Tumorzellen induziert. Nach dieser hyperthermischen Behandlung konnte gezeigt werden, dass sich das Wachstum der sehr aggressiven Tumore um 78% gegenüber der unbehandelten Vergleichsgruppe verlangsamt hat.<sup>141-142</sup>

#### 2.4 Aufbau multivalenter bifunktionaler Systeme

Um Ankergruppen und Effektormoleküle miteinander zu verknüpfen, wird ein zentrales Grundgerüst benötigt. Dieses kann beispielsweise ein höhervalentes Molekül (Proteine,<sup>143</sup> lineare Polymere,<sup>144</sup> Nanopratikel,<sup>113</sup> und Dendrimere<sup>145</sup>) bzw. ein niedervalentes Molekül (Porphyrin (A),<sup>146</sup> die Calixarene (B),<sup>147</sup> das Benzol (C), das Cyclohexan (D), das rigide Adamantan (E) und das flexible "Trisalkylmethyl"-Grundgerüst (F)) sein (Abb. 2-9).



Abb. 2-9: Niedervalente Grundgerüste zur Darstellung multivalenter Liganden.

Wichtige Kriterien für die Auswahl eines Grundgerüsts sind je nach Verwendungszweck ihre Größe, Form, Valenz, Geometrie, Rigidität und Flexibilität.<sup>148</sup> So bieten beispielsweise das Adamantan- und das "Trisalkylmethyl"-Grundgerüst aufgrund ihrer tripodalen Geometrie zusätzlich die Möglichkeit, neben Ankergruppen Effektormoleküle einzuführen, die in die entgegengesetzte Richtung zu den Ankermolekülen gerichtet sind und daher keinen Einfluss auf die Ankermoleküle haben.<sup>149</sup>

Maison *et al.* nutzten Adamantan, um drei GPI **17** Liganden als Ankermoleküle und den NIR-Floureszenzmarker (**13, 14**) bzw. den Radiomarker (**15, 16**) als Effektormolekül miteinander zu verbinden (Abb. 2-10).



Abb. 2-10: Multivalente GPI-Liganden auf Basis eines Adamantan-Grundgerüsts.

GPI **17** bindet mit hoher Affinität an das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA), das in erhöhter Dichte auf malignanten Prostatazellen exprimiert ist und daher einen Tumormarker für Prostatakrebs darstellt.<sup>87</sup> Mit diesen Systemen ist es ihnen gelungen, Moleküle herzustellen, welche aufgrund der Trimerisierung der Ankergruppen mit hoher Affinität (im picomolaren Bereich) an malignante Prostatazellen binden und diese gleichzeitig für eine Diagnose lokalisieren.<sup>149-153</sup>

Neben Adamantan (E) ist das "Trisalkylmethyl"-Grundgerüst (F, Abb. 2-9) von Interesse. Es handelt sich hierbei um ein flexibles Grundgerüst, welches analog zum rigiden Adamantan modular funktionalisiert werden kann. Eine Auswahl von unterschiedlichen Funktionalitäten mit diesem flexiblen Grundgerüst ist in Abb. 2-11 zusammengestellt. Dabei werden die verschiedenen funktionellen Gruppen über ein zentrales Kohlenstoffatom miteinander verknüpft.



Abb. 2-11: Auswahl von unterschiedlichen Funktionalitäten mit dem flexiblen Grundgerüst auf Trisalkylmethyl-Basis.<sup>154</sup>

Die "Trisalkylmethyl"-Baueinheiten werden vor allem für die Synthese von Dendrimeren verwendet.<sup>154-158</sup> Durch Variation der flexiblen Grundgerüste lassen sich Dendrimere unterschiedlicher Größe, Architektur, Dichte und Zahl der Endgruppen einstellen,<sup>159</sup> was sie zu einer vielseitigen Strukturklasse für die Materialforschung und die Biomedizin macht. Anwendungsbeispiele finden sich im Bereich der Wirkstoffreisetzung oder der Katalyse.<sup>160-163</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die flexiblen, bifunktionalen "Trisalkylmethyl"-Grundgerüste genutzt werden können, um drei Ankergruppen und ein Effektormolekül miteinander zu verknüpfen – und so gleichzeitig die Bindung auf Metalloberflächen zu erhöhen und diese gezielt zu modifizieren.

### **3 ZIELSETZUNG**

Biomaterialien werden in der modernen Medizin zur Verbesserung der Lebensqualität von Patienten eingesetzt. Um diese Biomaterialen vor der unerwünschten Bakterienadhäsion (Biofouling) zu schützen bzw. ihre Funktionalität zu gewährleisten, werden ihre Oberflächen gezielt modifiziert. Dabei ist es wichtig, dass diese Beschichtung im physiologischen Medium besonders stabil ist.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, Metalloberflächen mit Hilfe von bifunktionalen trimeren Catechol-Ankermolekülen zu modifizieren und anschließend diese Oberflächen im Hinblick auf ihre Stabilität sowie ihre Biokompatibilität zu untersuchen. Das Design der Catechol-Strukturen orientiert sich dabei an natürlichen Metallbindern wie dem Enterobactin. Als Metalloberflächen dienten TiO<sub>2</sub>-, Edelstahl- und Eisenoxid-Oberflächen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen zunächst tetravalente bifunktionale "Trisalkylmethyl"-Grundgerüste synthetisiert und anschließend mit drei Catechol-Ankergruppen und einem Effektormolekül konjugiert werden. Diese drei Catechol-Einheiten können im Vergleich zu ihren monomeren Anologa zu einer stabileren Beschichtung auf der Metalloberfläche führen (Abb. 3-1).



Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Oberflächenbinder und ihre Immobilisierung durch das "dip coating"-Verfahren.

Für eine größere Substanzbibliothek werden unterschiedliche "Trisalkylmethyl"-Grundgerüste dargestellt, die sich in ihrer Funktionalität, Multivalenz und der Spacerlänge (29, 30, 31 und 32) unterscheiden. Die Funktionalität soll über drei endständige Carboxylgruppen und eine Aminogruppe (29, 30) bzw. über eine Carboxylgruppe und drei Aminogruppe (31, 32) eingeführt werden (Abb. 3-2).



Abb. 3-2: "Trisalkylmethyl"-Grundgerüste für die Darstellung multivalenter Catechol-Derivate.

Anschließend können diese Grundgerüste nach einem Standard-Peptidkupplungsprotokoll mit drei Catechol-Einheiten funktionalisiert werden. Die daraus resultierenden Triscatechole sollen auf Metalloberflächen immobilisiert und hinsichtlich ihrer pH-Stabilität untersucht werden. Im nächsten Schritt sollen diese Oberflächenbinder mit Hilfe von Effektormolekülen (PEG bzw. GPI) für die zwei Anwendungsbereiche der Implantatmedizin bzw. der Hyperthermie modifiziert werden.

Im Bereich der Implantatmedizin werden Biomaterialien mit hydrophilen Polymeren beschichtet, welche die Entstehung von Biofouling verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit soll PEG als Effektormolekül an das Triscatechol konjugiert und anschließend auf TiO<sub>2</sub>- und Edelstahl-Oberflächen immobilisiert werden. Nach der Charakterisierung dieser Oberflächen soll ihre Eignung als Antifouling-Beschichtung überprüft werden. Hierfür sollen geeignete Assays entwickelt werden, die es ermöglichen, die Antifouling-Eigenschaften der Oberflächen bezüglich Blutserum, Zellen und Bakterien zu untersuchen.

Für die Anwendung im Bereich der Hyperthermie sollen in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bossmann an der Kansas State University Eisenoxid-Nanopartikel hergestellt bzw. anschließend modifiziert werden, welche sich durch eine hohe Spezifische Absorptionsrate, Monodispersität sowie Wasserlöslichkeit auszeichnen. Die Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel soll aus einer CTAB/*n*-Butanol/H<sub>2</sub>O/FeCl<sub>3</sub>-Nanoemulsion erfolgen. Im nächsten Schritt soll das GPI, welches eine hohe Affinität zu malignanten Prostatazellen besitzt, als Effektormolekül an das Triscatechol konjugiert und anschließend auf den Nanopartikeln immobilisiert werden. Die daraus resultierenden Nanopartikel können hinsichtlich ihrer spezifischen Aufnahme in Prostatakrebszellen untersucht werden.

Im vorliegenden Kapitel werden die Synthese von Triscatecholen und ihre Immobilisierung auf Metalloberflächen besprochen. Dabei werden zunächst die Synthese der flexiblen Grundgerüste und ihre Funktionalisierung mit Catechol-Einheiten beschrieben (Abschnitt 4.1). Die resultierenden Catechol-Derivate werden auf TiO<sub>2</sub>- bzw. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel immobilisiert und hinsichtlich ihrer pH-Stabilität untersucht (Abschnitt 4.2). Anschließend werden die Triscatechole auf TiO<sub>2</sub>- und Edelstahl-Oberflächen beschichtet und charakterisiert (Abschnitt 4.3). Im letzten Schritt werden die erhaltenen Oberflächen mit Hilfe von Bioassays (Proteine, Zellen und Bakterien) hinsichtlich ihrer Antifouling-Eigenschaften diskutiert (Abschnitt 4.4).

#### 4.1 Synthese der Catechol-Derivate

**RESULTATE UND DISKUSSION** 

4

In diesem Abschnitt wird zunächst auf die Synthese der Grundgerüste, die sich in ihrer terminalen Funktionalität, ihrer Spacerlänge und Multivalenz unterscheiden, eingegangen. Anschließend wird ihre Kupplung mit Catechol-Einheiten (Anker-Gruppen) und Effektormolekülen diskutiert.

#### 4.1.1 Synthese der multivalenten Bausteine

Für die Darstellung multivalenter Grundgerüste **29-32** eignen sich die in Schema 4-1 gezeigten Vorläuferverbindungen **20**, **33**, **22** und **34**.



Schema 4-1: Vorläufer der multivalenten Grundgerüste (29, 30, 31, 32).

Der Triester **20** und das Trinitril **22** sind literaturbekannt und wurden in Anlehnung an die Arbeit von Newkome über eine Michael-Addition dargestellt.<sup>164</sup> Die um eine Ethylengruppe verlängerten Derivate **33** und **34** können analog synthetisiert werden.

#### Synthese der Tricarbonsäure mit funktionalisiertem N-Terminus

Die Vorläuferverbindung **35** kann über das sogenannte "Behera"-Amin **21** dargestellt werden. Die freie NH<sub>2</sub>-Gruppe und die Carboxyl-Gruppen ermöglichen weitere Funktionalisierungen (Schema 4-2).<sup>164</sup>



Schema 4-2: Retrosynthese des Intermediats 35.

Die Synthese des Amins 21, des Intermediats, ist in Schema 4-3 aufgeführt.



Schema 4-3: Darstellung des Amins 21.

An den Michael-Akzeptor *tert*-Butylacrylat **36** wurde  $CH_3NO_2$  addiert. Die Deprotonierung des  $CH_3NO_2$  erfolgte durch die katalytisch eingesetzte Base Triton B. Nach einstündiger Reaktionszeit und Umkristallisation aus EtOH wurden 72% des Nitroesters **20** erhalten.

Die weitere Funktionalisierung erforderte die Umsetzung der NO<sub>2</sub>-Gruppe zum Amin. Die Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe kann generell mit Metall-Katalysatoren wie Platin, Palladium oder Raney-Nickel durchgeführt werden. Allerdings gelingt die Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe hier nur mit der aktivierten Form des Raney-Nickels, dem T1-Raney-Nicklel, in guten Ausbeuten. Die Reaktion ist bereits von Newkome *et al.* erprobt worden.<sup>164</sup>

Raney-Nickel ist ein Katalysator, der aus einer Nickel/Aluminium-Legierung besteht. Durch Herauslösen des Aluminiumanteils mittels starker Basen aus dieser Legierung entsteht ein aktives Nickelpulver mit einer sehr großen Oberfläche (Metallschwamm). Dabei wird Wasserstoff freigesetzt, welcher zur Hydrierung dient.<sup>165-166</sup>

Die Verwendung des *tert*-Butylacrylats **36** ermöglichte die Einführung des basenstabilen *tert*-Butylesters in das Molekül **20**. Auf diese Weise wurde die intramolekulare Bildung des Lactams verlangsamt, da die Reduktion zum Amin unter basischen Bedingungen verläuft (Schema 4-3). Allerdings findet die intramolekulare Cyclisierung bei moderaten Temperaturen dennoch langsam statt.<sup>154</sup> Daher wurde das Amin **21** NMR-spektroskopisch identifiziert und ohne weitere Reinigung umgesetzt. Die Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe zum Amin wurde durch die Verschiebung des quaternären Kohlenstoffatoms im <sup>13</sup>C NMR von 92 ppm ( $CNO_2$ ) nach 52 ppm ( $CNH_2$ ) sichtbar.

Über die freie NH<sub>2</sub>-Gruppe können unterschiedliche Funktionalitäten mittels Standardpeptidchemie eingeführt werden (Schema 4-4).



Schema 4-4: Funktionalisierung des Amins 21.

Das Amin 21 wurde mit Chlorameisensäurebenzylester unter basischen Bedingungen zum Carbamat 38 umgesetzt. Nach zweistündiger Reaktionszeit wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Ausbeute von 64% erhalten. Im weiteren Verlauf der Kupplung, insbesondere unter basischen Bedingungen, erwies sich die Cbz-Schutzgruppe jedoch als ungeeignet. Beim längeren Rühren wurde die Cbz-Schutzgruppe abgespalten, so dass die NH<sub>2</sub>-Gruppe mit der freien Carbonsäure unter Amidbildung cylisierte (37, Schema 4-3). Daher wurde die NH<sub>2</sub>-Gruppe mit Cbz-Glycin gekuppelt. Die Darstellung zum Cbz-Glycin-Derivat 40 gelang nach einer aus der Literatur bekannten ähnlichen Synthese mit einer guten Ausbeute von 80%.<sup>167</sup> Weiterhin wurden die Derivate **42** und **45** dargestellt. Die Einführung der Alkin-Funktionalität ermöglicht eine kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden nach Huisgen.<sup>168</sup> Die Darstellung des Alkins **42** erfolgte über eine DCC-Kupplung von Propiolsäure an das Amin 21 mit einer Ausbeute von 61%.<sup>169</sup> Die Kupplung der NHS-aktivierten Pentinsäure 44 an das Amin 21 ergab das Alkin-Derivat 45 mit 80% Ausbeute. Außerdem wurde an die freie NH2-Gruppe eine Alken-Funktionalität eingeführt, die für Polymerisierungsreaktionen genutzt werden kann. Die Reaktion mit Methacrylchlorid lieferte das Methacrylamid 47 mit einer guten Ausbeute von 81%.<sup>170-171</sup>

Die Umsetzung des Amins 21 erfolgte stets in guten Ausbeuten nach einer problemlosen Aufarbeitung. Die Darstellung von 38, 40, 42, 45 und 47 ist im Gramm-Maßstab durchführbar.

Im nächsten Schritt wurden die korrespondierenden freien Carbonsäuren **39**, **41**, **43**, **46** und **47** durch das Entschützen des *tert*-Butylesters im sauren Milieu hergestellt. Die Entfernung des *tert*-Butylesters erfolgte mit TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in quantitativer Ausbeute. Somit standen unterschiedliche Tricarbonsäuren als Vorstufen der gewünschten Trisactechole zur Verfügung (Schema 4-4).

#### Variation der Spacer-Länge

Die Darstellung der Tricarbonsäure **49**, mit im Vergleich zu **35** um eine Ethylengruppe verlängerten Seitenkette, kann über die Intermediate **33** und **50** erfolgen (Schema 4-5).
**RESULTATE UND DISKUSSION** 



Schema 4-5: Retrosynthese der verlängerten Tricarbonsäure 49.

Analog zur Darstellung des *tert*-Butylesters **20** kann der Triester **33** über eine 1,6-Additon aus dem *tert*-Butylester **51** und CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> erhalten werden. Die Einführung des *tert*-Butylesters ist notwendig, um eine Nebenreaktion während der Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe unter basischen Bedingungen zu unterbinden. Da der *tert*-Butylester **51** nicht kommerziell erhältlich ist, kann dieser über das Säurechlorid der ungesättigten Carbonsäure **53** nach einer aus der Literatur bekannten Synthese hergestellt werden (Schema 4-6).<sup>172</sup>



Schema 4-6: Darstellung des ungesättigten tert-Butylesters 51.

Diese Syntheseroute wurde jedoch aufgrund der Reaktionszeit von 72 h und der verhältnismäßig geringen Ausbeute von 35% nicht verfolgt und zunächst der kommerziell erhältliche ungesättigte Methylester **52** als Ausgangsverbindung für die Michael-Addition genutzt (Schema 4-7).



Schema 4-7: Darstellung des Alkins 59.

Analog zum Triester 20 wurde an den Methylester 52 CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> nach einer 1,6-Addition konjugiert. Das Additionsprodukt 54 wurde mit einer Ausbeute von 97% erhalten und musste nicht weiter gereinigt werden. Im nächsten Schritt wurde die Reduktion des Alkens 54 mit 10% Pd auf Aktivkohle in EtOH unter H2-Atmosphäre (1 bar) durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt 55 mit einer Ausbeute von 88% isoliert werden. Für die unter basischen Bedingungen verlaufende Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe ist der Methylester ungeeignet, da dieser nicht basenstabil ist. Daher war die Überführung des Methylesters 55 in den tert-Butylester nötig. Dieser wurde mittels LiOH verseift und die Tricarbonsäure 56 mit einer Ausbeute von 93% erhalten. Die Einführung der tert-Butyl-Schutzgruppe am C-Terminus erfolgte nach einer literaturbekannten Vorschrift.<sup>173</sup> Die mit Boc<sub>2</sub>O in tert-BuOH geschützte Tricarbonsäure 33 konnte in einer Ausbeute von 60% gewonnen werden. Die quantitative Überführung der NO<sub>2</sub>-Gruppe zum Amin 57 konnte sowohl NMR-spektroskopisch als auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Daher wurde das Amin 57 ohne Reinigung zum Alkin 58 umgesetzt. Die Kupplung wurde mit Propiolsäure und DCC als Kupplungsreagenzien in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Lösungsmittel durchgeführt. Die säulenchromatographische Reinigung erwies sich als schwierig, weswegen das gewünschte Produkt 58 nur NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden konnte. Die Abspaltung der tert-Butyl-Schutzgruppe erfolgte mit TFA und die Tricarbonsäure 59 konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Synthese des Alkin-funktionalisierten

Produkts **59** gelang daher über sieben Stufen mit einer Gesamtausbeute von 48%. Die meisten Stufen der Syntheseroute verliefen jedoch mit guten Ausbeuten und sind im Gramm-Maßstab durchführbar. Somit stand die Alkin-Tricarbonsäure **59** als Vorstufe für die gewünschten Triscatechole zur Verfügung.

#### Synthesen der divalenten Derivate

Für die Untersuchung der Multivalenzeffekte wurden neben trivalenten auch ihre divalenten Analoga synthetisiert.

Für die Darstellung des Diesters **60** wurde zunächst eine von Newkome *et al.* bekannte Synthese ausprobiert.<sup>174</sup> Hierbei wurde der *tert*-Butylester **36** auf -78 °C gekühlt und langsam mit EtNO<sub>2</sub> versetzt. Jedoch konnte hier weder das Edukt **36** noch das Produkt **60** isoliert bzw. NMR-spektroskopisch oder massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Daher wurde die Synthese des divalenten Grundgerüsts **60** analog zu **20** mit EtNO<sub>2</sub> bei 70 °C durchgeführt (Schema 4-1).



Schema 4-8: Darstellung der Dicarbonsäure 61.

Das EtNO<sub>2</sub> wurde an den *tert*-Butylester **36** unter Zugabe von Triton als Base addiert. Nach Gefriertrocknung konnte der Diester **60** mit einer Ausbeute von 85% erhalten werden. Die Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe erfolgte unter sauren Bedingungen in 93% Ausbeute. Somit wurde die Dicarbonsäure **61** mit einer Gesamtausbeute von 79% über zwei Stufen hergestellt und ist im Gramm-Maßstab zugänglich.

Die Darstellung der langen Dicarbonsäure 64 erfolgte analog zu der Tricarbonsäure 56 (Schema 4-9).





Die Umsetzung von  $EtNO_2$  mit dem Methylester **52** lieferte den Dimethylester **62** mit einer Ausbeute von 60%. Die anschließende Reduktion und Hydrolyse ergab die Dicarbonsäure **64**. Diese wurde mit einer Gesamtausbeute von 43% über drei Stufen hergestellt und ist im Gramm-Maßstab zugänglich.

## **Darstellung des Triamins**

Das Triamin **66** wurde über das aus dem Literatur bekannten Trinitril **22** dargestellt (Schema 4-10).<sup>175</sup>



Schema 4-10: Darstellung des Amins 66.

Die Synthese des Trinitrils **22** basiert ebenfalls auf einer 1,4-Addition. CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> wird unter Verwendung der Base Triton B an Acrylnitril **65** addiert. Die Reaktion ist sehr temperaturempfindlich. Bei Zugabe des Acrylnitrils zu dem bereits enolisierten CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> sollte die Temperatur nicht über 40 °C steigen. Bei zu hoher Temperatur bildete sich eine dunkelbraune zähflüssige Masse, die nur schwer aufgearbeitet werden konnte. Wurde die Temperatur hingegen auf 30-35 °C gehalten, verlief die Reinigung unproblematisch. In beiden Fällen betrug die Ausbeute jedoch nur 41%. Im nächsten Schritt wurde die Cyano-Gruppe mittels NaBH<sub>4</sub> selektiv reduziert und als Rohprodukt für die anschließende Boc-Schützung eingesetzt.<sup>176</sup> Die anschließende Reduktion der NO<sub>2</sub>-Gruppe ergab das Amin **66** mit einer Ausbeute von 81%.<sup>177</sup> Das Triamin **66** wurde mit einer Gesamtausbeute von 13% über vier Stufen dargestellt und für weitere Funktionalisierungen eingesetzt (Schema 4-11).



Schema 4-11: Synthese der Triamine 67 und 69.

Durch Acylierung von **66** mit Bernsteinsäureanhydrid wurde ein Succinatrest mit einer Ausbeute von 72% eingeführt.<sup>178</sup> Die Carbonsäure **67** wurde in vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 9% erhalten. Die Synthese ist im Gramm-Maßstab durchführbar. Die Einführung einer Alkin-Einheit in das Amin **66** gelang über die Umsetzung mit Propiolsäure. Das Alkin **68** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 30% erhalten werden. Die quantitative Abspaltung der Boc-Schutzgruppe gelang in Gegenwart von TFA. Das Alkin **69** wurde somit mit einer Gesamtausbeute von 4% über vier Stufen erhalten.

## Variation der Spacer-Länge

Die Synthese des um eine Ethylengruppe verlängerten Derivats **71** kann über drei unterschiedliche Syntheserouten erfolgen. Zum einen könnte die erste Syntheseroute analog zur Darstellung des Trinitrils **22** verlaufen (Schema 4-10). Im zweiten Fall könnte das Triamin **71** über die Reduktion eines Triamids **70** dargestellt werden. Die dritte Variante basiert auf der Darstellung des Triamins **71** über ein Triazid **72** (Schema 4-12).



Schema 4-12: Darstellung des langen Triamins 71.

#### Synthese über das ungesättigte Nitril 34

Das Trinitril **34** könnte über eine 1,6-Additon aus dem Nitril **73** und  $CH_3NO_2$  hergestellt werden (Schema 4-13).



Schema 4-13: Retrosynthese des Trinitrils 34.

Das Edukt **73** ist nicht kommerziell erhältlich, kann aber über eine zweistufige palladiumkatalysierte Reaktion dargestellt werden (Schema 4-14).<sup>179</sup>



Schema 4-14: Darstellung des ungesättigten Nitrils 73.

Nach der Umsetzung mit  $Pd(PPh_3)_4$  konnte jedoch nur das Intermediat **75** reisoliert und die Eliminierung zum Olefin **73** nicht beobachtet werden. Da die Synthese aufwendig und die Reinigung des Zwischenprodukts problematisch war, wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

## Darstellung über das Triamid 70

Die Synthese des Triamins **71** kann über eine selektive Reduktion des Amids, welches über die Tricarbonsäure **56** dargestellt werden kann, erfolgen (Schema 4-15).



Schema 4-15: Darstellung des Triamids 70 über die Tricarbonsäure 56.

Die Umsetzung zum Triamid **70** könnte über die Bildung eines Säurechlorids als Zwischenstufe erfolgen. Bei Methode A (Schema 4-15) wurde zunächst die Tricarbonsäure mit Thionylchlorid und einer wässrigen NH<sub>3</sub>-Lösung umgesetzt. Allerdings konnte hier weder das Edukt noch das Produkt isoliert werden. Bei Methode B wurde die Tricarbonsäure mit destillativ gereinigtem Oxalylchlorid versetzt und gasförmiges NH<sub>3</sub> eingeleitet. Trotz wasserfreier Bedingungen konnte das Produkt **70** nicht synthetisiert werden. Die Darstellung über ein Säurechlorid als Zwischenstufe war daher sowohl mit Thionylchlorid als auch mit Oxalylchlorid nicht erfolgreich. In beiden Fällen konnte weder das Produkt noch das Edukt isoliert bzw. NMR-spektroskopisch oder massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

### Darstellung mittels Ammonolyse

Die Reaktion von Ammoniak mit Säurechloriden, Säureanhydriden oder Estern führt zu Säureamiden und wird als Ammonolyse bezeichnet.

In diesem Fall wurde der Methylester **55** in abs. MeOH gelöst und gasförmiges NH<sub>3</sub> in diese Reaktionslösung eingeleitet (Schema 4-16).



Schema 4-16: Amidierung des Methylesters 55.

Der Umsatz dieser Reaktion wurde nach 5 h, 24 h, und 10 d NMR-spektroskopisch kontrolliert. Unabhängig von der Reaktionsdauer war nur ein Teilumsatz des Methylesters **55** zu beobachten. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten das gewünschte Triamid **70** (10%), das Diamid **76** (24%), das Monoamid **77** (7%) und der Methylester **55** (7%) isoliert werden. Das Triamid **70** wurde analog zum Nitril **22** mit BH<sub>3</sub> reduziert und anschließend das Triamin ohne weitere Reinigung Boc-geschützt **78**. Die Reaktion verlief über zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 8%. Die Darstellung des Triamins **78** verlief über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 1% (Schema 4-17).



Schema 4-17: Darstellung des Boc-geschützen Amins 78.

## Darstellung über das Triazid 72

Aufgrund der langen Reaktionsdauer und des unvollständigen Umsatzes der Ammonolyse-Reaktion wurde die Synthese des Triamins **78** über ein Triazid getestet. Die Darstellung des Azids **72** erfolgte ebenfalls ausgehend von der Tricarbonsäure **56**. Die Synthese wurde über ein Mesylat als Zwischenstufe durchgeführt, welches anschließend zum Amin reduziert wurde (Schema 4-18).<sup>180</sup>



Schema 4-18: Darstellung des Boc-geschützten Triamins 78.

Die Umsetzung der Tricarbonsäure **56** zum Trialkohol **79** erfolgte in Gegenwart von BH<sub>3</sub>, welches anschließend mittels Mesylchlorid in ein Mesylat überführt wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Mesylat **80** mit einer Ausbeute von 78% über zwei Stufen erhalten. Die Substitution zum Azid erfolgte mit NaN<sub>3</sub> in DMF als Lösungsmittel. Dieses wurde im Anschluss in Gegenwart von Triphenylphosphin zum Triamin **81** reduziert und ohne weitere Reinigung für die Boc-Schützung eingesetzt. Die Umsetzung zum Tricarbamat **78** konnte erfolgreich über drei Stufen und mit einer Ausbeute von 31% durchgeführt werden. Somit verlief die Umsetzung der Tricarbonsäure **56** zum Tricarbamat **78** insgesamt über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 24%.

Die Darstellung des Triamins **78** über das Triazid **72** im Vergleich zur Ammonolyse-Route beinhaltet zwar eine mehrstufige Reaktionsführung, ist aber mit einer besseren Gesamtausbeute durchzuführen.

## 4.1.2 Synthese von Catechol-Derivaten

Um Multivalenzeffekte zu untersuchen, wurden neben Triscatecholen auch Monocatechole synthetisiert.

#### Monocatechole

Das Alkin-funktionalisierte Dopamin **83** wurde über die Kupplung der NHS-aktivierten Pentinsäure **44** mit Dopamin **3** mit einer Ausbeute von 57% hergestellt.

Das Alkin **83** wurde über zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 41% erhalten (Schema 4-19).



Schema 4-19: Darstellung des Alkin-funktionalisierten Dopamins 83.

Weiterhin wurde das Cbz-geschützte Dopamin **84** synthetisiert (Schema 4-20). Dabei wurde Dopamin **3** mit Chlorameisensäurebenzylester unter basischen Bedingungen zum Carbamat **84** umgesetzt und mit einer Ausbeute von 81% erhalten.



Schema 4-20: Darstellung des Cbz-Dopamins 84.

Weiterhin wurde Dopamin **3** mit Tetraethylenglycol umgesetzt, um die Löslichkeit in H<sub>2</sub>O zu erhöhen. Um die Funktionalisierung selektiv an der freien NH<sub>2</sub>-Gruppe zu gewährleisten, mussten die phenolischen OH-Gruppen geschützt werden (Schema 4-21). Dafür wurde zunächst der *N*-Terminus mittels Boc<sub>2</sub>O (96% Ausbeute) und anschließend die OH-Gruppen mittels BnBr (75% Ausbeute) geschützt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte mit einer 5% igen TFA-Lösung in quantitativer Ausbeute. Das resultierende Amin **85** wurde mit Bernsteinsäureanhydrid mit einer Ausbeute von 27% zum Intermediat **86** umgesetzt. Anschließend wurde die Carbonsäure **86** mit Tetraethylenglycol zu **87** verestert. Die Reaktion gelang mit einer Ausbeute von 20%. Im letzten Schritt erfolgte die quantitative Entfernung der Bn-Schutzgruppen mit 10% Pd auf Aktivkohle in MeOH unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1 bar). Somit wurde das PEG-funktionalisierte Catechol **88** mit einer Gesamtausbeute von 4% über sechs Stufen dargestellt.



Schema 4-21: Darstellung des PEG-Dopamins 88.

## Triscatechole

#### Synthese des Nitro-Triscatechols 90

Um die Kupplung zu optimieren, wurden zunächst Testreaktionen an der einfach zugänglichen Tricarbonsäure **89** durchgeführt. Diese wurde durch saure Spaltung des Triesters **20** mit einer guten Ausbeute von 90% erhalten.<sup>164</sup> Die Synthese des Triscatechols **90** erfolgte durch Kupplung von Dopamin mit Tricarbonsäure **89** (Schema 4-22).



Schema 4-22: Darstellung des Nitro-Triscatechols 90.

Für die Umsetzung der Tricarbonsäure **89** mit Dopamin wurden verschiedene Kupplungsreagenzien (DCC/HOBt, HBTU, Säurechlorid, EDC/HOBt) getestet. Als bestes Kupplungsreagenz erwies sich EDC/HOBt. Nach einer Reaktionszeit von 3 d erfolgte die wässrige Aufarbeitung unter sauren Bedingungen, um EDC wässrig extrahieren zu können. Die NMR-spektroskopische Analyse zeigte, dass das Produkt mit HOBt verunreinigt war. Daher wurde versucht, HOBt aus dem Reaktionsgemisch herauszulösen. Zu diesem Zweck wurde die Löslichkeit von HOBt in unterschiedlichen Lösungsmitteln (EtOAc, THF, CH<sub>3</sub>CN, Et<sub>2</sub>O, DMF, H<sub>2</sub>O) untersucht. Et<sub>2</sub>O erwies sich in diesem Fall als das am besten geeignete. Das Rohprodukt wurde nach Gefriertrocknung mit Hilfe einer Soxhletapparatur mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Nach 24 h wurde das Filterpapier, in dem sich das Triscatechol **90** als Rückstand befand, in MeOH eingelegt. Nach Entfernen des Lösungsmittels gelang die Isolierung des Produkts mit einer guten Ausbeute von 65%. Insgesamt verlief die Darstellung des Triscatechols **90** über zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 59% und ist im Gramm-Maßstab durchführbar. Nach Optimierung der Kupplungsmethode wurden weitere Triscatechol-Derivate auf analoge Weise synthetisiert.

#### Synthese des Amin-Triscatechols 92

Die Cbz-geschützte Tricarbonsäure **39** wurde gewählt, weil das freie Amin durch die hydrogenolytische Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe mit 10% Pd auf Aktivkohle leicht zugänglich ist. Auf diese Weise kann das Amin in Folgereaktionen funktionalisiert werden. Die Herstellung des Cbz-Triscatechols **92** ist in Schema 4-23 dargestellt.



Schema 4-23: Darstellung des Amin-Triscatechols 92.

Die Kupplung der Cbz-Tricarbonsäure **39** mit Dopamin lieferte nach 3 d ein Gemisch aus einem ein-, zwei- und dreifach gekuppelten Produkt, wie die NMR-Kontrolle ergab. Durch eine weitere Zugabe der Kupplungsreagenzien sowie des Dopamins konnte das dreifach gekuppelte Produkt erhalten werden. Die anschließende Hydrierung des Carbamats **91** mit 10% Pd auf Aktivkohle in MeOH unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1 bar) lieferte das Amin **92** in quantitativer Ausbeute. Die Synthese des Triscatechols **92** gelang somit über sechs Stufen mit einer Gesamtausbeute von etwa 11%. Bei starkem Überschuss von Base oder zu langem Rühren unter basischen Bedingungen wurde ein Nebenprodukt, das Lactam **93**, erhalten. Dieses entsteht durch intramolekulare Cyclisierung nach der Abspaltung der basenlabilen Cbz-Schutzgruppe. Aus diesem Grund ist diese Schutzgruppe nicht geeignet und die Syntheseroute wurde verworfen.

### Synthese des Alkin-substituierten Triscatechols 94

Die Darstellung des Alkins 94 erfolgte analog zum Nitro-Triscatechol 90 (Schema 4-24).



Schema 4-24: Darstellung des Alkin-Triscatechols 94.

Die Kupplung wurde mit den Kupplungsreagenz EDC/HOBt sowie der Base  $Et_3N$  durchgeführt. Hier wurde erneut HOBt durch Extraktion mittels  $Et_2O$  entfernt und das Produkt **94** über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 2% erhalten.

## Synthese des Alkin-substituierten Triscatechols 95

Die Synthese des Alkin-Triscatechols 95 erfolgte analog zu 90 (Schema 4-25).



Schema 4-25: Darstellung des Alkin-Triscatechols 95.

Die Kupplung wurde erneut mit den Kupplungsreagenzien EDC/HOBt unter Zugabe von Et<sub>3</sub>N als Base durchgeführt. HOBt wurde durch Extraktion mittels Et<sub>2</sub>O entfernt und das Alkin-Triscatechol **95** über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 7% erhalten.

### Synthese des Nitro-Triscatechols 96

Aufgrund der hohen Polarität und der mäßigen Ausbeuten bzw. der problematischen Reinigung und Isolierung sollte Benzyl-geschütztes Dopamin **85** hergestellt werden. Auf diese Weise sollte die Extraktion aus der wässrigen Phase und somit die Ausbeute verbessert werden. Die Kupplung fand analog zum Nitro-Triscatechol **90** unter Standardbedingungen statt (Schema 4-26).



Schema 4-26: Darstellung des Benzyl-geschützten Triscatechols 96.

Die Kupplung wurde mit den Kupplungsreagenzien EDC/HOBt und unter Verwendung von Et<sub>3</sub>N als Base durchgeführt. Jedoch konnte hiernach nur ein Gemisch aus einem ein-, zweiund dreifach gekuppelten Produkt erhalten werden. Die Isolierung des gewünschten Produkts **96** aus dem komplexen Substanzgemisch gelang jedoch auch nach einer säulenchromatographischen Reinigung nicht.

## Synthese des Cbz-Glycin-Triscatechols 97

Der Vorteil bei der Darstellung von Cbz-Glycin-Triscatechol **97** ist, dass mittels hydrogenolytischer Spaltung sowohl die Cbz- als auch die Benzyl-Schutzgruppe in einem Schritt abgespalten werden können (Schema 4-27).



Schema 4-27: Darstellung des Benzyl-geschützten Triscatechols 97.

Die Kupplung wurde mit den Kupplungsreagenzien EDC/HOBt sowie der Base Et<sub>3</sub>N durchgeführt. Das Produkt konnte zwar massenspektrometrisch detektiert werden, jedoch gelang die Isolierung von **97** aus dem komplexen Substanzgemisch auch nach einer säulenchromatographischen Reinigung nicht.

## Synthese des Alkin-substituierten Triscatechols 98

Die Synthese des um eine Ethylengruppe verlängerten Triscatechols **98** erfolgte analog zum Triscatechol **90** (Schema 4-28).



Schema 4-28: Darstellung des Triscatechols 98.

Die Kupplung wurde mit den Kupplungsreagenzien EDC/HOBt sowie der Base  $Et_3N$  durchgeführt. Auch hier konnte das Produkt **98** nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden, die Isolierung nach einer säulenchromatographischen Reinigung gelang allerdings nicht.

## Synthese des Alkin-substituierten Triscatechols 99

Die Synthese des Alkin-Triscatechols **99** wurde analog zu den Triscatecholen **90**, **94** und **95** über Peptid-Kupplung durchgeführt (Schema 4-29).



Schema 4-29: Darstellung des Triscatechols 99.

Die Kupplung wurde mit den Kupplungsreagenzien EDC/HOBt sowie der Base  $Et_3N$  durchgeführt. Jedoch konnte hiernach weder Edukt **69** noch Produkt **99** im Massenspektrum detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Synthese der verschiedenen Triscatechole zwar einfach durchzuführen war, allerdings gestaltete sich ihre Reinigung problematisch. Im Folgenden wurde daher das Alkin-Triscatechol **95** aufgrund seiner einfachen Zugänglichkeit für die weitere Versuchsdurchführung verwendet.

## 4.1.3 Huisgen-Cycloaddition

Der besondere Fokus in der vorliegenden Doktorarbeit ist die Beschichtung von Metalloberflächen. Hierfür werden effiziente Syntheserouten gesucht, die die Funktionalisierung sowie die Aufarbeitung erleichtern. In den letzten Jahren hat die 1,3-Huisgen-Cycloaddition, die sogenannte "Klick-Reaktion",<sup>181-189</sup> ein besonderes Interesse in den Materialwissenschaften<sup>190</sup> erlangt. Diese Reaktion kennzeichnet sich durch hohe Ausbeuten, hohe Chemoselektivitäten, leichte Aufarbeitung und vor allem durch hohe Toleranz gegenüber vielen funktionellen Gruppen aus. Die Huisgen-Cycloaddition basiert auf einer kupferkatalysierten Kupplung von Alkinen mit Aziden in H<sub>2</sub>O bei RT.<sup>191-194</sup>

Die Reaktion hat sich bereits für die Modifizierung von Oberflächen etabliert. So bieten bereits beschichtete Oberflächen mit Azid- oder Alkin-funktionalisierten Liganden eine sehr wandlungsfähige Plattform für nachfolgende Modifizierungen. Es wurden zum Beispiel planare Oberflächen aus Gold<sup>169,195</sup> oder Titan<sup>196</sup> über selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) mittels Triazolverknüpfungen funktionalisiert und unter anderem für Antifouling-Anwendungen eingesetzt.<sup>197</sup> Im Nanometerbereich werden beispielsweise anorganische Nanopartikel (wie Maghemitpartikel)<sup>198</sup> auf diese Weise mit PEG beschichtet, die ihre Stabilität und somit ihre Zirkulationszeit im physiologischen Medium erhöhen.<sup>82</sup> Daher ist diese Methode für die von uns geplante Funktionalisierung von Metalloberflächen sehr gut geeignet.

## Testkupplungen für Huisgen-Cycloaddition

Zunächst wurden einfach zugängliche Edukte **102** und **103** hergestellt, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren (Schema 4-30). Die Kupplung von Amino-Adamantan **100** mit Propiolsäure wurde mit dem Kupplungsreagenz DCC in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Lösungsmittel durchgeführt. Es wurden 30% Ausbeute des Adamantan-Alkins **102** erhalten. Die Substitution des Benzylbromids **101** mit NaN<sub>3</sub> lieferte das Azid **103**. Die beiden synthetisierten Edukte wurden nach einem von Sharpless etablierten Protokoll in Gegenwart von Natriumascorbat und Cu(II) umgesetzt.<sup>193</sup> Im nächsten Schritt erfolgte die Trennung des Kupfers mittels Filtration über Celite. Das Produkt **104** wurde NMR-spektroskopisch nachgewiesen. Diese Reaktionsbedingungen wurden für weitere Huisgen-Cycloadditionen verwendet.



Schema 4-30: Darstellung des Triazols 104 unter "Klick"-Bedingungen.

#### Synthese von PEG-Triscatechol 106

Um Metalloberflächen bzw. Implantatmaterialien Antifouling-Eigenschaften zu verleihen, wurde PEG an das Alkin-Triscatechol **95** konjugiert (Kapitel 1.1).

Die Synthese des Zielmoleküls **106** erfolgte über eine Klick-Reaktion von PEG-Azid(M = 5000 Da) **105** mit dem Alkin-Triscatechol **95**. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wurde das Reaktionsgemisch durch Filtration über Celite von Kupfersalzen befreit (Schema 4-31). Das Produkt **106** konnte mit einer Ausbeute von 96% isoliert werden.



Schema 4-31: Darstellung des PEG-Triscatechols 106.

## Synthese von GPI-Triscatechol 112

Zur Verwendung in Hyperthermie soll PSMA-spezifisches GPI **17** mit dem Alkin-Triscatechol **94** über die 1,3-Huisgen-Cycloaddition verknüpft werden (Kapitel 1.2). Dafür ist die Überführung des GPI **17** in ein Azid-Derivat notwendig. Dies kann ein Azid-Linker **109** ermöglichen (Schema 4-32).



Schema 4-32: Darstellung des Azid-Linkers 109.

Im ersten Schritt wurde 3-Brompropionsäure **107** mit NaN<sub>3</sub> in das Azid **108** überführt und anschließend zum Aktivester **109** umgesetzt.<sup>199</sup> Die Darstellung des Azids **109** erfolgte somit über zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 15%. Im nächsten Schritt wurde GPI **17** aus **110**<sup>b</sup> gewonnen (Schema 4-33).



Schema 4-33: Darstellung des GPI-Azids 111.

Dafür wurde **110** in halbkonzentrierter HCl unter Rückfluss erhitzt. Nach Waschen mit Et<sub>2</sub>O wurde die wässrige Lösung unter Vakuum eingeengt und das entschützte Derivat **17** in quantitativer Ausbeute erhalten.<sup>200-201</sup> Die anschließende Kupplung des GPI mit dem zuvor aktivierten Azid-Linker **109** lieferte das gewünschte Produkt **111** in quantitativer Ausbeute, welches massenspektrometrisch detektiert wurde.

Im nächsten Schritt wurde das GPI-Azid **111** mit dem Alkin-Triscatechol **94** mittels 1,3-Huisgen-Cycloadditon umgesetzt (Schema 4-34).

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Das geschützte GPI **110** wurde freundlicherweise von Dr. Christian H. Küchenthal zur Verfügung gestellt.



Schema 4-34: Darstellung des GPI-Triscatechols 112.

Das GPI-Triscatechol **112** konnte allerdings nicht massenspektrometrisch identifiziert werden. Vermutlich bildete sich ein Komplex aus GPI und Cu(II)-Ionen, wodurch diese nicht mehr für die Klick-Reaktion zur Verfügung standen.

# 4.2 Evaluierung der Catechol-Metall-Bindung

Im Folgenden wird zunächst die Funktionalisierung von TiO<sub>2</sub> mit den monomeren bzw. trimeren Catechol-Derivaten diskutiert und anschließend hinsichtlich ihrer pH-Stabilität untersucht. Danach soll überprüft werden, inwiefern die Catechole Eisenoxid-Nanopartikel vor Agglomeration in einer wässrigen Lösung schützen können.

## 4.2.1 Catechol-TiO<sub>2</sub>-System

Nach erfolgreicher Synthese wurden monomere und trimere Catechol-Derivate auf Metalloberflächen immobilisiert und anschließend hinsichtlich ihrer pH-Stabilität untersucht. Die Stabilität ist besonders bei niedrigen pH-Werten wichtig, da diese vor allem bei Entzündungen bzw. im Tumorgewebe vorliegen (pH-Wert zwischen 6.50-7.20; zum Vergleich pH-Wert von Blut: 7.35-7.45). Im Vergleich zu den monomeren Catecholen sollten die trimeren Catechol-Derivate eine höhere Bindungsstabilität auf Metalloberflächen aufweisen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (P25) als Modellsystem (aufgrund der einfachen Analytik mittels IR-Spektroskopie) gewählt. TiO<sub>2</sub> existiert in drei Modifikationen: Rutil, Anatas und Brookit. Rutil ist die häufigste Form des TiO<sub>2</sub> bei Bulk-Materialien, während TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel meistens die Anatas-Struktur einnehmen. Die Rutil(110)-Oberfläche gehört zu den am besten charakterisierten Übergangsmetall-Oxidoberflächen (Abb. 4-1).



Abb. 4-1: Schematische Darstellung der Rutil (110)-Oberfläche. a) O-Atom, das zwei Ti-Atome über eine Brückenbindung miteinander verknüpft, b) koplanares O-Atom, c) 5-fach-koordiniertes und d) 6-fach-koordiniertes Ti-Atom.<sup>202-203</sup>

Die Oberfläche des TiO<sub>2</sub> im Ultrahochvakuum besteht aus Sauerstoffatomen, die zwei Ti-Atome über eine Brückenbindung miteinander verknüpfen (a), koplanaren Sauerstoffatomen (b) sowie aus Ti-Atomen, die entsprechend (c) 5-fach- und (d) 6-fach-koordiniert sind. Die 5-fach-koordinierten Ti-Atome kommen nur auf der Grenzfläche vor und sind koordinativ ungesättigt.<sup>203</sup> Unter Standardbedingungen werden diese Koordinationslücken mit H<sub>2</sub>O-Molekülen aufgefüllt. Dadurch ist die Oberfläche im Wesentlichen mit OH-Gruppen bedeckt (Abb. 4-2).<sup>204</sup> Unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4) ist die TiO<sub>2</sub>-Oberlfäche negativ geladen (isoelektrischer Punkt<sup>c</sup> (TiO<sub>2</sub>) = 5-6).<sup>205</sup> Die chemische Verbindung erfolgt über das 5-fach-koordinierte Ti-Atom.



Abb. 4-2: Schematische Darstellung der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche in Gegenwart von H<sub>2</sub>O.

Der Bindungsmechanismus von Catecholen auf TiO<sub>2</sub>-Oberflächen und TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurde bereits mit unterschiedlichen Methoden untersucht.<sup>206-210</sup> Allerdings ist dieser bislang nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass die Bindung von Catecholen auf einer TiO<sub>2</sub>-Oberfläche analog zu der Komplexierung von Ti(IV)-Ionen durch Catechole erfolgt. Dabei wird das O-Atom, das sich auf der Oberfläche der TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel befindet, durch die O-Atome der deprotonierten Catechole in einer Kondensationsreaktion substituiert

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Der pH-Wert, bei dem die Oberfläche neutral ist, wird als isoelektrischer Punkt definiert – die Protonierung und Deprotonierung läuft gleich schnell ab.

(Abb. 4-3).<sup>211-212</sup> Dieser Mechanismus konnte von Messersmith *et al.* experimentell auf TiO<sub>2</sub>-Oberflächen nachgewiesen werden.<sup>137</sup>



Abb. 4-3: Komplexierung der hydroxylierten TiO<sub>2</sub>-Oberfläche durch Catechol.<sup>207</sup>

Catechole können weiterhin über eine einzähnige oder eine zweizähnige Bindung an einer TiO<sub>2</sub>-Oberfläche binden.<sup>209,213-215</sup>

## Evaluierung der Bindungsstabilität auf TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel

Für den pH-Stabilitätsassay wurde das monomere Catechol **84** und das trimere Catechol **90** auf TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (P25) beschichtet (Abb. 4-4).



Abb. 4-4: Die für den Stabilitätsassay verwendeten Catechol-Derivate.

Zur Immobilisierung wurden die beiden Catechol-Derivate jeweils in einer MOPS-Puffer-Lösung bei pH = 10 gelöst und mit TiO<sub>2</sub>-Nanopatikeln versetzt. Nach einer Immobilisierungszeit von 14 h wurden die TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel gewaschen, getrocknet und mittels IR-Spektroskopie charakterisiert. Das IR-Spektrum der beschichteten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wird am Beispiel von NO<sub>2</sub>-Catechol **90** diskutiert (Abb. 4-5).

50

Abb. 4-5: IR-Spektrum von a) TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (P25), b) Nitro-Triscatechol **90** und c) TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln (P25) funktionalisiert mit Nitro-Triscatechol **90**.

Das IR-Spektrum zeigt unbeschichtete  $TiO_2$ -Nanopartikel (a), das Nitro-Catechol **90** (b) und mit Nitro-Catechol **90** beschichtete  $TiO_2$ -Nanopartikel (c). Die charakteristische Carbonyl-Bande in den Spektren a) und b) zeigen eine erfolgreiche Beschichtung mit **90**.

Anschließend wurden die Catechol-beladenen Nanopartikel in Lösungen mit leicht alkalischen bis leicht sauren pH-Werten gerührt. Dabei wurden sowohl die monomerbeschichteten **84** als auch die trimer-beschichteten **90** Nanopartikel jeweils in fünf PBS-Puffer-Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten (7.75, 7.45, 7.09, 6.45 und 6.08) versetzt. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei RT und unter Lichtausschluss. Danach wurden die beschichteten Nanopartikel gewaschen und so von ungebundenem Catechol befreit.

Die Restbeladung der Catechol-Derivate auf den TiO<sub>2</sub>-Nanopartikeln wurde mittels quantitativer IR-Spektroskopie ermittelt. Dafür wurde eine für das Molekül charakteristische Bande gewählt und integriert. Bei den Triscatecholen **90** wurde die Carbonyl-Bande als Quantifizierungsmarker ausgewählt. Dabei wurde die Beladung vor der Behandlung in PBS-Puffer-Lösungen auf 100% festgelegt. Weitere Beladungen sind relativ zur Ausgangsbeladung angegeben. In Abb. 4-6 ist die pH-Abhängigkeit der beschichteten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel nach Auswertung der quantitativen IR-Spektroskopie gezeigt.



Abb. 4-6: Quantitative IR-spektroskopische Bestimmung der Catechol-(**84** und **90**)-Beladung in Abhängigkeit von pH-Werten.

Bei einem pH-Wert von 6.1 verbleiben über 90% der tripodalen Catechol-Derivate **90** auf der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche, während sich unter identischen Bedingungen 40% der monomeren Catechol-Derivate **84** von der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche ablösen.

Dieses Experiment zeigt somit, dass das Triscatechol-Derivat eine höhere Bindungsstabilität im physiologischen und im leicht sauren Medium hat als sein monomeres Analogon.

## 4.2.2 Eisenoxid-Nanopartikel – Darstellung und Stabilität

Magnetische Nanopartikel wurden bereits aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Materialien wie zum Beispiel Eisenoxide, reine Metalle (Fe und Co),<sup>12</sup> spinellartige Ferromagneten<sup>216</sup> sowie Legierungen hergestellt.<sup>217-218</sup> Unter diesen Materialien haben vor allem die Eisenoxide Magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) und Maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) aufgrund ihrer guten Magnetisierung und ihrer hohen Biokompatibilität großes Interesse im biomedizinischen Bereich erlangt.<sup>12</sup>

Für die Darstellung von Eisenoxid-Nanopartikeln stehen diverse Verfahren zur Verfügung. Beispiele sind die Mikroemulsionsmethode,<sup>219</sup> der Sol-Gel-Prozess,<sup>220</sup> die Mitfällung,<sup>221</sup> die Hydrothermalsynthese<sup>222</sup> oder die thermische Zersetzung.<sup>223</sup> Dabei sind vor allem die nasschemischen Verfahren wie die Mitfällung und die Mikroemulsion aufgrund ihrer einfachen Durchführung sehr beliebt.<sup>69</sup>

Bei der Mitfällungsmethode werden die Eisenoxide aus Fe(II)- und Fe(III)-Salzlösungen in Gegenwart einer Base in Inertgasatmosphäre bei RT hergestellt. Die Eigenschaften der entstandenen magnetischen Nanopartikeln hängen stark vom verwendeten Salz, dem Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>-Verhältnis, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Mediums ab. Sind die Reaktionsbedingungen einmal festgelegt, ist die Qualität der magnetischen Nanopartikeln vollständig reproduzierbar. Die Steuerung der Partikelgröße und das Erreichen einer engen Größenverteilung ist allerdings schwierig.<sup>221</sup>

Bei der Mikroemulsionsmethode hingegen findet die Synthese der Nanopartikel in Gegenwart amphiphiler Verbindungen statt. Bei der Wasser-in-Tensid-Mikroemulsion ist die wässrige Phase in Form eines Nanotropfens dispergiert und ist dabei von einer Monoschicht aus Tensidmolekülen umgeben.<sup>224</sup> Der Durchmesser dieses Nanotropfens liegt typischerweise im Bereich zwischen 1-50 nm. Seine Größe wird durch das Molverhältnis von Wasser zu Tensid bestimmt. Durch Mischung zweier identischer Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen, die die gewünschten Reaktanden enthalten, kollidieren, koaleszieren und zerfallen die Tröpfchen und bilden einen Niederschlag innerhalb der Micelle. Nach der Zugabe von Aceton bzw. Ethanol zu dieser Mikroemulsion kann dieser Niederschlag durch Zentrifugieren aus der Mischung extrahiert werden. In diesem Sinne kann eine Mikroemulsion als Nanoreaktor für die Bildung von Nanopartikeln verstanden werden. Die Teilchengröße und -form kann unter Umständen sehr variieren.<sup>69</sup>

Die Darstellung von (superpara-)magnetischen Nanopartikeln gestaltet sich als schwierig, da Nanopartikel dazu neigen, in Lösungen zu agglomerieren. Durch das Zusammenlagern verlieren die Nanopartikel ihre (superpara-)magnetischen Eigenschaften.<sup>69</sup> Eine Suspension, in der die gelösten Teilchen agglomerieren, gilt als instabil. Um die Stabilität der Suspension über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, werden die Nanopartikel mit einer Schicht überzogen, die sie vor Oxidation (durch Sauerstoff), Erosion (durch Säuren und Basen) und Agglomeration schützt. Diese Schutzschicht kann beispielsweise aus Polymeren,<sup>82,225</sup> Tensiden,<sup>226</sup> Edelmetallen,<sup>227-229</sup> Metalloxiden,<sup>219</sup> Silicaten,<sup>230</sup> Kohlenstoff<sup>231</sup> oder Biomolekülen<sup>232</sup> bestehen.<sup>233</sup> Die Stabilität der Suspension basiert auf elektronischer oder sterischer Wechselwirkung. Für die sterische Repulsion werden die Nanoteilchen mit einer Polymerschicht überzogen, die über Ankermoleküle an die Nanopartikel-Oberfläche gebunden werden. Die Polymerschicht verhindert, dass sich die Teilchen einander nähern können. Als Ankermoleküle stehen hier beispielsweise Silane, <sup>234</sup> Phosphonate,<sup>235</sup> Thiole<sup>94</sup> oder Catechole<sup>140,236</sup> zur Verfügung.

#### Synthese von Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Eisen-Eisenoxid-Nanopartikel nach einem von Bossmann *et al.* etablierten Verfahren synthetisiert. Die Darstellung der Eisen-Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte aus einer Nanoemulsion. Hierbei wurde zunächst Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, ein kationisches Tensid) mit *n*-Butanol (dem Co-Tensid) bei konstanter Temperatur (25 °C) versetzt. Im Anschluss wurde eine wässrige FeCl<sub>3</sub>-Lösung (2 M) zugegeben und für 20 min gerührt. Durch die Zugabe einer wässrigen NH<sub>4</sub>OH-Lösung wurde das Eisenoxid als rotbrauner Niederschlag gefällt. Dieser wurde anschließend mit H<sub>2</sub>O und EtOH mittels Zentrifuge gewaschen, sowie unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre getrocknet (Abb. 4-7).



Abb. 4-7: Darstellung von Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel.

Die Charakterisierung dieser Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) (Abschnitt 8.2.11). Bei dieser Methode wird das Licht eines Lasers, das an Nanopartikeln gestreut wird, analysiert. Anhand der Streuung wird der hydrodynamische Durchmesser der Nanoteilchen ermittelt (Abb. 4-8).



Abb. 4-8: a) DLS-Spektrum und b) TEM-Aufnahme von Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln.

Die synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel weisen einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 298 ( $\pm 0.8$ ) nm auf. Der grün markierte Balken zeigt zusätzlich, dass die meisten Nanopartikel einen Durchmesser von etwa 120 nm haben. Die Polydispersität mit einem Wert von 0.269 liegt in einem Bereich, der für viele Anwendungen ausreichend ist.

Da die DLS-Analyse lediglich den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel angibt, sollte ihre tatsächliche Größe über die Transmissonselektronenmikroskopie (TEM) (Abschnitt 8.2.14) bestimmt werden. Bei diesem Verfahren werden die Nanopartikel mit Hilfe von Elektronenstrahlen abgebildet. Dabei werden Verbindungen mit höherer Ordnungszahl als dunkle Punkte angezeigt.

Die TEM-Aufnahmen lassen stabförmige Eisenoxidteilchen (dunkle Punkte) erkennen, die einen Partikeldurchmesser von etwa 50 nm haben. Diese sind von einer Tensidschicht aus CTAB umgeben (helle Umrandung) (Abb. 4-8).

Im nächsten Schritt wurden Nanopartikel mit einem Eisenkern und einer Eisenoxid-Schale hergestellt. Metallisches Eisen hat eine höhere Magnetisierung bzw. Spezifische Absorptionsrate (SAR) und ist somit für die Hyperthermie besser geeignet.<sup>73</sup> Die Synthese der Eisenoxid-Nanoteilchen erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren. Anschließend wurden diese Nanoteilchen mittels NaBH<sub>4</sub> reduziert (

Abb. 4-9).



Abb. 4-9: Darstellung von Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln.

Der rotbraune Niederschlag färbte sich während der Reduktion schwarz, der auf Anwesenheit von metallischem Eisen(0) hinweist. Die anschließende Eisenoxid-Schicht entstand bei der Aufarbeitung mit EtOH. Die Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel wurden ebenfalls mit Hilfe von DLS und TEM charakterisiert (Abb. 4-10).



Abb. 4-10: a) DLS-Spektrum und b) TEM-Aufnahme von Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln.

Diese Eisen/Eisenoxid-Nanopartikel weisen einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 332.2 (±0.7) nm auf. Der grün markierte Balken zeigt, dass die meisten Nanopartikel einen Durchmesser von etwa 216 nm haben. Die Polydispersität mit einem Wert von 0.246 liegt in einem guten Bereich. Die TEM-Aufnahmen lassen runde Eisenoxidteilchen (dunkle Punkte) erkennen, die einen Partikeldurchmesser von etwa 5 nm haben (Abb. 4-10).

Wie bereits erwähnt, ist es für die Hyperthermie wichtig, dass mit geringen Mengen an Eisen eine hohe Temperatur erreicht wird. Daher wurde die SAR der beiden Eisenoxid-Spezies ermittelt, um ihr Potential für die auf Hyperthermie basierten Behandlungen zu überprüfen. Hierfür wurde die Temperaturänderung der jeweiligen Eisenlösung, die durch ein Wechselfeld (Frequenz (366 kHz); Amplitude (5 kA/m)) innerhalb von 5 min verursacht wurde, aufgenommen und der SAR-Wert mit Hilfe von Gleichung (1) (SAR = C  $\Delta T/\Delta t$ ) berechnet. Anschließend wurde der Anteil des in H<sub>2</sub>O löslichen Eisens von Eisenoxid bzw. Eisen/Eisenoxid mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) (Abschnitt 8.2.13) ermittelt. Diese Methode dient zur quantitativen Bestimmung von Elementen in einer Lösung (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Daten der Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> und Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel im Vergleich: hydrodynamischer Durchmesser (d), Polydispersität (PD), spezifische Absorptionsrate (SAR) und (c) Eisengehalt in diesen Nanopartikeln.

Nanopartikel	d [nm]	PD	SAR [W/g]	Löslichkeit (Fe) in H <sub>2</sub> O [mg/mL]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	298.9 (±0.8)	0.269	181	0.58
Fe/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	332.2 (±0.7)	0.246	279	0.29

Wie in Tabelle 4-1 zu sehen ist, ist der lösliche Anteil an Eisen bei der Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Spezies mit einem Wert von 0.29 mg/mL um die Hälfte kleiner als in der oxidierten Form. Ihr SAR-Wert ist hingegen mit 279 W/g um den Faktor 1.5 größer. Das heißt, dass mit einer geringeren Menge Eisen/Eisenoxid-Nanopartikel ein besserer Temperaturanstieg erreicht werden kann als mit Eisenoxid-Nanopartikeln.

### Stabilitätsuntersuchungen von funktionalisierten Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern Catechole die Agglomeration der oxidischen Nanopartikel unterdrücken können. Hierfür wurden die magnetischen Nanopartikel unmittelbar nach ihrer Synthese mit den unterschiedlichen Catechol-Derivaten **83**, **88** und **94** beschichtet und zunächst mittels DLS analysiert (Tabelle 4-2).



Tabelle 4-2: Daten der Catechol- beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel im Vergleich: hydrodynamischer Durchmesser (d), Polydispersität (PD) und Zetapotential ( $\zeta$ ).

Nanopartikel	d [nm]	PD	ζ [mV]
Fe/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	395.4 (±0.8)	0.184	-32.6 (±0.6)
$Fe/Fe_3O_4 + 83$	202.8 (±0.5)	0.132	-38.9 (±0.8)
$Fe/Fe_3O_4 + 88$	255.1 (±0.7)	0.249	-39.6 (±0.9)
$Fe/Fe_{3}O_{4} + 94$	298.5 (±0.4)	0.175	-41.8 (±0.3)

Die unbeschichteten Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel weisen den größten hydrodynamischen Durchmesser (395 nm) auf, was auf ihre bereits eingesetzte Agglomeration hinweist. Genaue Aussagen über die Stabilität einer Suspension lassen sich anhand des Zetapotentials der Nanopartikel treffen. Das Zetapotential ist das elektrische Potential eines bewegten Partikels in einer Suspension (Abschnitt 8.2.12). Ist der Betrag des Zetapotential größer als 30 mV bzw. kleiner als -30 mV, dann findet keine Agglomeration der Nanopartikel statt und die Suspension gilt als stabil. Es gilt: je höher der Betrag des Zetapotentials ist, desto stabiler ist die Suspension.

Suspensionen bestehend aus Catechol-beschichteten  $Fe/Fe_3O_4$ -Nanopartikeln **94** wiesen eine höhere Stabilität (-41.8 mV) auf als Suspensionen mit unbeschichteten Nanopartikeln. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen dem trimeren und dem monomeren Catechol-Derivat festgestellt werden, da das Zetapotential beider Derivate im gleichen Bereich lag.

Dennoch wurden die Nanopartikel in einer 1 M PBS-Puffer-Lösung (pH = 7) für Langzeitstudien aufbewahrt. Nach 14 d sollten diese Nanopartikel erneut im Hinblick auf ihr Agglomerationsverhalten überprüft werden, um erste Tendenzen feststellen zu können. Aufgrund der Schwierigkeiten, die Nanopartikel in Lösung zu bringen, konnten jedoch keine weiteren Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden.

Resümierend lässt sich sagen, dass Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel hergestellt wurden, die sich durch eine hohe Spezifische Absorptionsrate auszeichnen und daher prinzipiell für die Hyperthermie geeignet sind. Allerdings gab es Probleme hinsichtlich der Löslichkeit der Nanopartikel, so dass weitere Experimente durchgeführt werden müssen.

Die Löslichkeit der Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel könnte durch die Verwendung von organischen Reduktionsmitteln wie zu Beispiel N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> anstatt NaBH<sub>4</sub> erhöht werden. Es ist in der Literatur bekannt, dass Borate sich an Eisenoxid-Oberflächen anlagern und zu unerwünschten Nebenreaktionen (Löslichkeitserniedrigung) führen können.<sup>237</sup>

# 4.3 Immobilisierung von Catecholen auf Metalloberflächen

Im Folgenden wird die Funktionalisierung von planaren TiO<sub>2</sub>-Oberflächen mit Catechol-Derivaten, sowie ihre Charakterisierung vorgestellt. Im Anschluss werden Oberflächen diskutiert, die mit PEG-Triscatecholen modifiziert wurden.

## 4.3.1 Beschichtung mit Catechol-Derivaten

Da die synthetisierten Catechol-Derivate auf  $TiO_2$ -Nanopartikeln hohe pH-Stabilitäten aufwiesen (Abschnitt 4.2.1), wurden diese zur Immobilisierung von Bulk-Materialien eingesetzt. Die Funktionalisierung dieser Oberflächen erfolgte nach dem "dip coating"-Verfahren (Abschnitt 2.1).<sup>89,238</sup>

Zunächst wurden die zu beschichtenden TiO<sub>2</sub>-Oberflächen mit MeOH und H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Ein Teil dieser Oberflächen wurde anschließend in eine basische Catechol-Lösung eingetaucht. Diese bestand aus den entsprechenden Catecholen (**3**, **90** und **94**), die in einer MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10) gelöst waren (Abb. 4-11). Als Referenz wurde ein Teil der ursprünglichen TiO<sub>2</sub>-Oberflächen nur in eine MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10) getaucht.



Abb. 4-11: Catechol-Derivate zur Funktionalisierung von TiO<sub>2</sub>-Oberflächen.

Nach einer Inkubationszeit von 14 h wurden die Substrate herausgezogen, erneut gewaschen und getrocknet. Die Charakterisierung der behandelten Oberflächen erfolgte mittels Kontaktwinkel-Bestimmung (Abschnitt 8.2.7) (Tabelle 4-3).

Catechol	$\Theta$ (TiO <sub>2</sub> ) [°]	$\Theta$ (TiO <sub>2</sub> +MOPS) [°]	$\Theta$ (TiO <sub>2</sub> +MOPS+Catechol) [°]
3	30.9 (±2.0)	7.6 (±1.0)	10.7 (±1.6)
90	32.3 (±1.5)	5.8 (±0.8)	22.9 (±2.5)
94	27.9 (±1.8)	8.2 (±1.1)	18.5 (±1.7)

Tabelle 4-3: Kontaktwinkeldaten der mit den Catechol-Derivaten 3, 90 und 94 beladenen TiO<sub>2</sub>-Oberflächen.

Die Größe des Kontaktwinkels hängt von der Wechselwirkung zwischen einem Wassertropfen und der beschichteten Oberfläche ab. Je geringer diese Wechselwirkung ist, desto größer wird der Kontaktwinkel. Daraus können Eigenschaften der Oberfläche wie beispielweise ihre Polarität ermittelt werden. Mit wachsendem Kontaktwinkel (im Fall von  $H_2O$ ) sinkt die Polarität der Oberfläche.

Die Kontaktwinkel der unbehandelten Oberflächen liegen in einem Bereich von etwa  $30^{\circ}$ . Oberflächen, die mit einer reinen MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10) behandelt wurden, besitzen eine höhere Polarität. Ihr Kontaktwinkel liegt in einem kleineren Bereich von etwa 7°. Weiterhin beeinflussen die unterschiedlichen Funktionalitäten (Amin-, Nitro- und Alkin-Einheit) der jeweiligen Catechol-Lösungen **3**, **90** und **94** den Kontaktwinkel. Oberflächen, die mit Dopamin **3** beschichtet wurden, besitzen gemäß Literatur eine hohe Polarität  $(\Theta = 10.7^{\circ})$ .<sup>133</sup> Das freie Amin beim Dopamin hat gegenüber der NO<sub>2</sub>-Gruppe in **90**  $(\Theta = 22.9^{\circ})$  oder der Alkin-Gruppe in **94** ( $\Theta = 18.5^{\circ}$ ) eine stärkere Wechselwirkung mit H<sub>2</sub>O. Anhand dieser Charakterisierung ist deutlich zu erkennen, dass die Beschichtung der Catechol-Derivate auf TiO<sub>2</sub> erfolgreich stattgefunden hat.

Während mit Hilfe der Kontaktwinkel-Bestimmung die Polarität der Oberfläche bestimmt wurde, wurde mittels Time-of-light-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) (Abschnitt 8.2.8) die Materialzusammensetzung der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche analysiert.

Für die ToF-SIMS-Messung wurden TiO<sub>2</sub>-Träger, die mit dem NO<sub>2</sub>-Triscatechol **90** beschichtet waren, verwendet. Hierfür war eine Referenzprobe notwendig, um Verunreinigungen aus der Luft und aus den verwendeten Lösungsmitteln anhand eines Differenzspektrums auszuschließen. Die Oberflächen wurden jeweils im positiven und im negativen Modus vermessen und anschließend die Oberflächenbeladung und das Fragmentierungsmuster abgelesen. Da ToF-SIMS eine destruktive Methode ist, sind im Spektrum auch Ti-haltige Fragmente zu sehen. Die Ergebnisse der ToF-SIMS-Messung zeigen eine eindeutige Beschichtung der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche mit Dopamin **3**. In den Differenzspektren waren im Positiv-Modus charakteristische Signale der Beschichtung mit Dopamin zu sehen:  $[C_8H_9NO_2]^+$ ,  $[TiC_8H_9NO_2]^+$  und  $[Ti_2C_8H_9NO_2]^+$ . Beim trimeren Catechol **90** war es allerdings nicht möglich, das Molekülion zu sehen, da es eine relativ große Masse (m/z = 628.7 u) besitzt. In den Differenzspektren ist aber ein charakteristisches Fragment von  $NO_2^-$  im Negativ-Modus zu sehen (m/z = 45.99 u), was die Beschichtung der TiO<sub>2</sub>-Träger mit **90** bestätigt (Abb. 4-12).



Abb. 4-12: ToF-SI Massenspektrum von Triscatechol **90** auf einer TiO<sub>2</sub>-Oberfläche. Das Spektrum zeigt das charakteristische Massensignal bei m/z = 45.99 u für NO<sub>2</sub><sup>-</sup> im Negativ-Modus.

### 4.3.2 Beschichtung mit PEG-Triscatecholen

Nach erfolgreicher Beschichtung mit unterschiedlichen Catechol-Derivaten wurden im nächsten Schritt PEG-Triscatechole auf TiO<sub>2</sub>- und Edelstahl-Träger aufgebracht. Vor dem Hintergrund der Antifouling-Anwendung ist eine hohe PEG-Dichte erforderlich.

Die Funktionalisierung der Substrate erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise nach dem "dip coating"-Verfahren und unter "cloud point"-Bedingungen.<sup>238</sup> Letztere sorgt dafür, dass die Oberflächen mit einer hohen PEG-Dichte funktionalisiert werden. PEG ist aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Etherwasserstoff und Wassermolekülen unbegrenzt in H<sub>2</sub>O löslich, wobei jede monomere (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)-Einheit von Wassermolekülen umgeben ist. Aufgrund der Solvatisierung stoßen sich die PEG-Einheiten gegenseitig ab und verhindern, dass andere PEG-Moleküle in Kontakt mit der Substratoberfläche kommen. Bei der Zugabe von Salzen wird die Löslichkeit der PEG-Moleküle herabgesetzt. Die Löslichkeitserniedrigung findet dabei bei einer bestimmten kritischen Lösungstemperatur und bei einem bestimmten Verhältnis von PEG/H<sub>2</sub>O statt, die stets für das System charakteristisch ist. Diese Phasenübergangstemperatur wird als Trübungspunkt (cloud point) bezeichnet. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit besitzen die PEG-Ketten eine verringerte Solvatisierung. Daraus resultieren reduzierte Kettenabstoßungen und daraus eine dichtere Packung der PEG-Ketten während der Beschichtung auf der Substratoberfläche. Der Prozess der Dehydratisierung ist reversibel. In einem physiologischen

**RESULTATE UND DISKUSSION** 

Puffer wie HEPES werden die PEG-Ketten nach der Beschichtung rehydriert und es resultiert eine maximale PEG-Kettendichte auf der Substratoberfläche.

Sechs Oberflächen wurden gewaschen, mittels Druckluft getrocknet und der Kontaktwinkel gemessen. Der Kontaktwinkel lag bei allen sechs Oberflächen bei etwa 40°. Drei dieser Träger wurden mit einer reinen MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10) und die anderen drei mit der PEG-Triscatechol **106**+MOPS-Lösung behandelt. Nach dem Waschen und Trocknen wurden die Oberflächen charakterisiert. In Tabelle 4-4 sind jeweils die Mittelwerte der Kontaktwinkelergebnisse und in Abb. 4-13 die Bilder der H<sub>2</sub>O-Tropfen der behandelten TiO<sub>2</sub>-Träger zusammengefasst.

Catechol	Θ (TiO <sub>2</sub> ) [°]	$\Theta$ (TiO <sub>2</sub> +MOPS) [°]	$\Theta$ (TiO <sub>2</sub> +MOPS+Catechol) [°]
106	38.6 (±1.0)	20.5 (±2.4)	55.0 (±1.6)

Tabelle 4-4: Kontaktwinkeldaten des mit PEG-Triscatechol 106 beschichteten TiO2-Träger.

Abb. 4-13: Kontaktwinkel-Bilder von A) nicht beschichtetem TiO<sub>2</sub>: Kontaktwinkel  $\Theta = 38.6^{\circ}$ , B) TiO<sub>2</sub> nach Behandlung mit MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10): Kontaktwinkel  $\Theta = 20.5^{\circ}$ , C) TiO<sub>2</sub> beschichtet mit PEG-Triscatechol **106** in MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10): Kontaktwinkel  $\Theta = 55.0^{\circ}$ .

Die Kontaktwinkel der unbehandelten Oberflächen liegen in einem Bereich von  $38^{\circ}$ . Oberflächen, die mit einer reinen MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10) behandelt wurden, besitzen einen höhere Polarität, da ihr Kontaktwinkel in einem kleineren Bereich von etwa 20.5° liegt. Weiterhin weisen Oberflächen, die mit der PEG-Lösung behandelt wurden, eine niedrigere Polarität im Gegensatz zu den unbehandelten Oberflächen auf. Ihr Kontaktwinkel liegt bei 55°. Aufgrund dieser veränderten Benetzbarkeit lässt sich schließen, dass eine erfolgreiche Beschichtung der Oberflächen mit dem PEG-Triscatechol **106** stattgefunden hat.

## 4.4 Antifouling-Assays

Einer der Aspekte der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung der synthetisierten PEG-Triscatechole hinsichtlich ihrer Antifouling-Eigenschaften und ihrer Toxizität. Antifouling-Assays wurden mit PEG-beschichteten TiO<sub>2</sub>- und Edelstahloberflächen in unterschiedlichen biologischen Systemen (Proteinen, Zellen und Bakterien) durchgeführt.

## 4.4.1 Blutserum-Assay

Der erste Assay wurde mit menschlichem Blut durchgeführt. Die mit PEG-Triscatechol **106** beschichteten TiO<sub>2</sub>-Träger wurden in einer HEPES-Puffer-Lösung (pH = 7) eingelegt und anschließend für 1 h im Blut bei 37 °C inkubiert. Danach wurden diese mit einer PBS-Puffer-Lösung (pH = 7) gewaschen und im letzten Schritt mit Acridinorange gefärbt. Dieser Farbstoff ermöglicht es, die zellulären Bestandteile mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Es interkaliert<sup>d</sup> in die DNA und der daraus resultierende DNA-Farbstoff-Komplex emittiert Licht einer Wellenlänge von 526 nm bis 630 nm, wodurch die Moleküle unter dem Mikroskop grün fluoreszieren. Der Vorteil dieses Farbstoffs liegt darin, dass es außerhalb des Absorptionsbereichs von TiO<sub>2</sub> (Wellenlängen im Bereich von 325 bis 550 nm) emittiert.

In Abb. 4-14 sind repräsentative Ausschnitte von unbeschichteten und PEG-beschichteten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen gezeigt. Auf den beschichteten Oberflächen (Abb. 4-14 2 b) wurde eine deutlich geringe Anlagerung von Biomolekülen bzw. Proteinen im Vergleich zur unbeschichteten Oberfläche (Abb. 4-14 2 a) beobachtet.

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup> Interkalation beschreibt die reversible Einlagerung von Ionen, Atomen oder Molekülen in chemischen Verbindungen. In Zusammenhang mit der DNA handelt es sich um eine Interkalation, wenn sich planare Moleküle in die Doppelhelix der DNA zwischen benachbarten Basenpaaren einschieben.



Abb. 4-14: Antifouling-Assay mit PEG-Triscatechol **106**. Schematische Darstellung der unbeschichteten (1 a) und beschichteten  $TiO_2$ -Oberfläche (1 b) sowie fluoreszenzmikroskopische Detektion von Acridinorange-gefärbten Biomolekülen (2 a und 2 b) bei einer Vergrößerung von 5.

## 4.4.2 Zelladhäsion

Im nächsten Schritt wurde anhand eines Zellassays untersucht, ob PEG-Triscatechole eine Zelladhäsion unterbinden können. In diesem Zusammenhang wurden diese Moleküle ebenfalls hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht.

Der Zell- bzw. der Toxizitätsassay wurde mit Stammzellen durchgeführt, die während eines chirurgischen Eingriffs als Knochenbohrmehl gesammelt wurden. Stammzellen sind Vorläuferzellen, aus denen sich im Laufe der embryonalen Entwicklung spezialisierte Zelltypen mit speziellen Eigenschaften ausdifferenzieren. Aufgrund ihres enormen Wachstums- und Differenzierungspotentials dienen sie der lebenslangen Erneuerung von Organen und Geweben.

Dieses Experiment wurde mit  $TiO_2$ -Trägern durchgeführt, die auf Glas aufgebracht wurden. Dies hatte den Vorteil, dass diese mit einem Durchlichtmikroskop analysiert werden konnten. Die TiO<sub>2</sub>-Träger wurden nach ihrer Beschichtung mit PEG-Triscatechol **106** ebenfalls in einer HEPES-Puffer-Lösung (pH = 7) eingelegt und anschließend mit Knochenmehlzellen (192 000 Zellen/2 mL Medium) beschichtet. Die Zellen wurden einen Monat lang beobachtet. In Abb. 4-15 sind repräsentative Ausschnitte der PEG-beschichteten (untere Hälfte) und der unbeschichteten (obere Hälfte) Oberflächen nach 21 d (a), 26 d (b) und 33 d (c) gezeigt.



Abb. 4-15: Zellassay mit PEG-Triscatechol **106**. Zeitlicher Verlauf der Zelladhäsion. Aufnahmen nach a) 21 d, b) 26 d und c) 33 d bei einer Vergrößerung von 10.

In den Mikroskopie-Aufnahmen ist zu sehen, dass Zellen nur auf unbeschichteten Teilen oder Bereichen der Oberflächen wachsen. Die Zellen haben eine spindelförmige Struktur. Dies ist ein Zeichen für das Vorliegen gesunder Zellen. Zunächst breiten sich die Zellen auf der ganzen Oberfläche aus (a), ziehen sich aber anschließend auf den unbeschichteten Teil zurück (b). Somit ist der Antifouling-Effekt der PEG-Derivate bestätigt. Besonders interessant ist das vermehrte Wachstum der Zellen im oberen Drittel der Substratoberfläche (c). Nach etwa 20 d ist die Grenze des unbeschichteten und des beschichteten Bereichs klar zu sehen. Weiterhin wurden die Zellen nach 21 d mit Wachstumsfaktoren versetzt, damit diese sich osteogen ("knochenbildend") differenzieren konnten. Am Tag 31 ist ebenfalls die Ausbildung von Mineral zu sehen. Dies könnte vorteilhaft für mögliche Anwendungen der Substanzen in der Implantatmedizin sein und ein gutes Einwachsen der beschichteten Implantate ermöglichen. Schließlich konnte auch keine cytotoxische Wirkung der PEG-Beschichtung auf die Zellen nachgewiesen werden, da vereinzelt gesunde Zellen auf den PEG-beschichteten Bereichen der TiO<sub>2</sub>-Träger zu erkennen sind.

### 4.4.3 Bakterien-Assay

Wie bereits erwähnt, können Bakterien nach dem Einsetzen von Implantaten in den menschlichen Körper diese besiedeln und einen Biofilm ausbilden, wodurch es zu einer Implantat-assoziierten Infektion kommt. Daher sollte im letzten Assay überprüft werden, inwiefern PEG-Triscatechole eine Bakterienadhäsion unterbinden können. Für den Bakterien-Assay wurden *Staphylococcus epidermidis* gewählt. Dabei handelt es sich um ein grampositives Bakterium, das zur Normalflora der menschlichen Haut gehört. Daher ist es auch in der Lage, eine Vielzahl von Implantatmaterialien wie insbesondere Kunststoffoberflächen,

Katheter oder Prothesen zu besiedeln und ist somit hauptverantwortlich für Implantatassoziierte Infektionen.<sup>20-21</sup>

Für den Bakterien-Assay war es wichtig, mit Vorversuchen die Wachstumsbedingungen und die Kultivierungszeit der Bakterien zu bestimmen. Das Bakterienwachstum wird in vier Phasen unterteilt. In der Verzögerungsphase (lag phase) passen sich die Bakterien ihrer Umgebung bzw. dem Nährmedium an. Nach der Anpassung ihres Stoffwechsels geht die Bakterienkultur in die Phase des exponentiellen Wachstums über. In der darauf folgenden stationären Phase stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein, in dem die Zellenanzahl konstant bleibt. Das heißt, die Anzahl der absterbenden und durch Zellteilung hinzukommenden Bakterien ist gleich groß. Nach dem Verbrauch der Nährstoffe setzt die vierte Phase, die Absterbephase, ein. Daher wurden für die Adhäsionsexperimente Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. In dieser Phase liegt der größte Anteil der Zellen lebendig vor.

Die Bakterienkonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) der Kultur ermittelt. Da bei dieser Methode nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann, wurde daher die Anzahl von lebenden Zellen zusätzlich mit der Auszählmethode (Koloniebildende Einheit, KBE) ermittelt (Abschnitt 8.5.5).

Für den Antifouling-Versuch wurden die Bakterienzellen bei einer OD von 0.177 (entspricht der aus dem Vorversuch errechneten Zellenanzahl von  $5.2 \times 10^7$  KBE/mL) geerntet und die KBE/mL der Bakterienkultur ermittelt. Die tatsächlich eingesetzte Bakterienanzahl lag somit bei  $4.5 \times 10^7$  KBE/mL.

Edelstahl-Oberflächen, die unter anderem als Implantatmaterial verwendet werden, wurden mit PEG-Triscatechol **106** beschichtet, mit einer PBS-Puffer-Lösung (pH = 7) gewaschen und für 1 h mit der Bakteriensuspension inkubiert. Anschließend wurden diese erneut gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Danach wurden die Edelstahl-Oberflächen für 30 Sekunden auf LB-Agarplatten<sup>e</sup> gelegt und wieder entfernt. Auf diese Weise wurden die Bakterien von den Edelstahl-Oberflächen auf die Agarplatten übertragen. Dieser Prozess wird als "Abklatsch" bezeichnet. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert, damit die dort vorhandenen Bakterien wachsen konnten. Einzelne Bakterien bilden Kolonien, die mit

<sup>&</sup>lt;sup>e</sup> LB (*engl.* für *lysogeny broth*) ist ein Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (Bakterienkultur). Dieses Nährmedium enthält unter anderem Hefeextrakt, Trypton und Natriumchlorid.
bloßem Auge zu sehen sind. In Abb. 4-16 sind die Agarplatten der unbeschichteten und mit PEG-beschichteten Edelstahl-Oberflächen gezeigt. Beim Vergleich ist zu erkennen, dass die mit dem PEG-Triscatechol **106** funktionalisierten Oberflächen die Adhäsion von Bakterien gut unterbinden.



Abb. 4-16: Agarplatten nach "Abklatsch" der unbeschichteten (a, b, und c) und der beschichteten (d, e und f) Edelstahloberflächen.

Insgesamt konnte in den drei Bioassays gezeigt werden, dass die mit PEG-Triscatecholen beschichteten Oberflächen erfolgreich die Proteinadsorption sowie Zellen-, und Bakterienadhäsion unterbinden können. Da auf den beschichteten Bereichen der Substrate lebende Zellen zu finden waren, kann zusätzlich geschlussgefolgert werden, dass die Oberflächenbinder nicht toxisch sind.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

Um Biomaterialien wie beispielsweise  $TiO_2$  bzw. Edelstahl für Implantate vor Biofouling zu schützen, werden ihre Oberflächen mit hydrophilen Polymeren modifiziert. Da diese Biomaterialien eine lange Zeit im menschlichen Organismus verbleiben, sollte insbesondere eine stabile Verankerung dieser Polymere auf dem Substrat gewährleistet sein.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese bifunktionaler trimerer Catechole (Ankergruppen), die mit PEG (Effektormolekül), welches sich durch seine hohen Antifouling-Eigenschaften kennzeichnet, konjugiert werden. Die trimeren Catechole sollen eine dauerhafte und stabile Immobilisierung von PEG auf Metalloberflächen ermöglichen.

Die Syntheseroute beginnt mit der Darstellung des Triscatechols **95** durch die Umsetzung des literaturbekannten Amins **21** (Abb. 5-1). Die Kupplung mit Dopamin **3** und EDC/HOBt als Kupplungsreagenzien lieferte das Triscatechol **95** in drei Stufen (Ausbeute 23%).



Abb. 5-1: Darstellung des Triscatechols 95.

Dieses Triscatechol **95** wurde hinsichtlich seiner Bindungsstabilität im leicht sauren pH-Bereich untersucht. Solche pH-Werte sind insbesondere im entzündeten Gewebe zu finden. Für dieses Experiment wurden  $TiO_2$ -Nanopartikel (P25) verwendet, die mit trimeren Catechol- und zum Vergleich mit monomeren Catechol-Derivaten beschichtet wurden. Die Auswertung mittels quantitativer IR-Spektroskopie ergab, dass trimere Catechol-Derivate im Gegensatz zu ihren monomeren Analoga selbst bei niedrigen pH-Werten (bis zu pH = 6.1) mit hoher Beladung haften bleiben.

Aufgrund dieser hohen Stabilität wurden im nächsten Schritt Triscatechole auf planare Oberflächen immobilisiert. Die Beschichtung erfolgte mittels "dip coating"-Verfahren und unter "cloud point"-Bedingungen. Ihre erfolgreiche Immobilisierung konnte mit Hilfe Kontaktwinkel-Bestimmungen und ToF-SIMS-Messungen demonstriert werden. Für Antifouling-Assays wurde PEG(M = 5000 Da)-Azid **105** an das Triscatechol **95** über eine1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition konjugiert. Das resultierende PEG-Triscatechol **106** wurde anschließend auf TiO<sub>2</sub>- und Edelstahl-Oberflächen immobilisiert und hinsichtlich der Antifouling-Eigenschaften gegenüber von Proteinen, Zellen und Bakterien untersucht (Abb. 5-2).



Abb. 5-2: Das synthetisierte PEG-Triscatechol 106, welches für Antifouling-Experimente verwendet wurde.

Es wurden sowohl mit PEG-beschichtete als auch unbeschichtete Träger (Referenz) mit menschlichem Blut inkubiert. Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine deutlich verringerte Anlagerung von Proteinen auf den PEG-beschichteten Trägern festgestellt werden. Die Zellkulturexperimente wurden mit Knochenmehlzellen durchgeführt und die TiO<sub>2</sub>-Träger mittels Lichtmikroskopie charakterisiert. Nach einer Inkubationzeit von einem Monat waren nur wenige Zellen auf den PEG-beschichten Oberflächen zu sehen. Das Zellwachstum auf den unbeschichteten benachbarten Bereichen wurde jedoch nicht beeinträchtigt, was darauf hinweist, dass das PEG-Triscatechol 106 gegenüber Knochenmarkszellen nicht toxisch ist. Der dritte Assay wurde mit Bakterien (S. epidermidis) durchgeführt, da vor allem diese für "Fremdkörper-assoziierte"-Infektionen verantwortlich sind. Die PEG-beschichteten konnten Träger erfolgreich eine Bakterienadhäsion unterbinden.

Es ist gelungen, ein Konzept für die Darstellung bifunktionaler Triscatechole zu entwickeln, die eine dauerhafte Immobilisierung von Effektormolekülen wie PEG auf Metalloberflächen ermöglichen. Diese zeichnen sich zusätzlich durch ihre hohen Antifouling-Eigenschaften sowie eine geringe Toxizität aus.

# **6 SUMMARY**

In order to prevent biofouling on biomaterials such as  $TiO_2$  and stainless steel implants, they can be coated with hydrophilic polymers. Since these biomaterials should survive for a long time *in vivo*, their stable anchorage must be guaranteed in physiological media.

This project presents the synthesis of trimeric catechol derivatives (anchor groups) which are conjugated to PEG (effector molecules). Latter ones are well-known for their antifouling properties. These trimeric catechol moieties should allow a stable immobilization of PEG on metal surfaces.

The synthesis of triscatecholate **95** was realized through the conjugation of dopamine **3** to the literature known amine **21** *via* standard peptide coupling techniques. The product **95** was obtained in three steps with an overall yield of 23% (Figure 6-1).



Figure 6-1: Synthesis of triscatecholate 95.

The binding stability of the obtained catecholate moieties was tested at slightly acidic pH values (found in inflamed tissues). For this experiment, TiO<sub>2</sub> nanoparticles (P25) were coated with monomeric and trimeric catecholate derivatives, respectively. Their evaluation by quantitative IR spectroscopy showed that in comparison to their monomeric analoga 90% of the trimeric catecholate derivatives remained on TiO<sub>2</sub> nanoparticles, even at pH = 6.1.

The triscatecholate derivatives were immobilized on bulk material by using a dip coating procedure at cloud point conditions. Their successful immobilization was demonstrated with contact angle and ToF-SIMS measurements.

Antifouling assays were performed with PEG(M = 5000 Da)-triscatecholate **106**. This compound was obtained by the conjugation of PEG-N<sub>3</sub> **105** to the alkyne-triscatecholate **95** *via* Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. The resulting product was immobilized on TiO<sub>2</sub> and

stainless steel surfaces and was used for antifouling experiments in protein, cell and bacteria assays (Figure 6-2).



Figure 6-2: PEG-triscatecholate 106 used for the antifouling experiments.

For the protein assay, PEG-coated and uncoated surfaces were incubated with fresh human blood. Fluorescence microscopy showed a significantly reduced adsorption of proteins on PEG-coated surfaces. The cell experiment was performed with bone marrow stem cells and the surfaces were characterized with light microscopy. After one month, there were only a few healthy cells on PEG-coated surfaces, reflecting their antifouling properties. Since cell growth on the neighbouring uncoated areas was not impaired, it is likely that PEG-triscatecholates are non-toxic to bone marrow cells. The third assay was performed with skin colonizing bacteria (*S. epidermidis*), which are mainly responsible for "foreign body-associated" infections. Again, the PEG-coated surface could successfully prevent the bacterial adhesion.

To sum up, trimeric catecholates have been successfully synthesized and have been used as anchor groups for the durable immobilization of PEG (effector molecule) on metal surfaces. The resulting surfaces have good antifouling properties and are non-toxic to human cells.

# 7 AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein PEG-Triscatechol-Derivat hergestellt werden, welches eine hohe pH-Stabilität und gute Antifouling-Eigenschaften gegenüber Proteinen, Zellen und Bakterien besitzt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sind weitere ergänzende Experimente notwendig, um *in vivo*-Anwendungen der Catechole zu verbessern. Dazu gehören insbesondere Untersuchungen der Triscatechole im Hinblick auf ihre enzymatische und chemische Stabilität.

Ein bekanntes Problem elektronenreicher Catechole ist deren relativ leichte Oxidation zu Chinonen und ihren Folgeprodukten.<sup>239</sup> Daher wäre es interessant, die in dieser Arbeit verwendeten Dopamin-Derivate durch elektronenärmere Catechole zu ersetzen und diese hinsichtlich ihrer Bindungsstabilität zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese bifunktionaler Grundgerüste, die modular sind. Daher ermöglichen sie den Zugriff auf eine große Auswahl verschiedener Effektormoleküle und Liganden. So könnten zum Beispiel Phosphonat-Ankergruppen anstatt Catecholen an die Grundgerüste konjugiert werden und somit die Immobilisierung auf Apatit-Oberflächen ermöglichen.<sup>240</sup> Dies könnte im Bereich des Bone-Engineerings von Bedeutung sein. Als Effektormoleküle könnten außerdem RGD-Peptidsequenzen (Arg-Gly-Asp-Proteinsequenz) als Zelladhäsionsmoleküle eingeführt werden, die die Osseointegration von Implantaten verbessern könnten.<sup>241</sup>

# 8 **EXPERIMENTELLER TEIL**

Alle Reaktionen wurden, sofern erforderlich, mit N<sub>2</sub> als Schutzgas unter Verwendung der Schlenktechnik in abs. Lösungsmitteln durchgeführt. Die getrockneten Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden gewonnen. Die eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics, Sigma Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Lancaster oder Fluka käuflich erworben. Die Qualität entsprach entweder "zur Synthese" oder "*per analysis*". Sofern nicht angegeben, erfolgte keine weitere Reinigung dieser Chemikalien.

### 8.1 Chromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung der Produkte erfolgte entweder isokratisch oder mit einem Gradienten. Dabei wurde der Anteil des polaren Lösungsmittels nach einem Säulenvolumen jeweils verdoppelt. Alle Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden destilliert. Als Trennmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 60-200  $\mu$ m der Firma J. T. Baker oder Kieselgel 60 der Firma Macherey-Nagel mit einer Korngröße von 40-63  $\mu$ m verwendet. Die Bestimmung des R<sub>f</sub>-Wertes erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub>, Schichtdicke: 0.2 mm). Für die Visualisierung der Spots wurden folgende Reagenzien verwendet: Cersulfat (5 g Ammoniummolybdat, 0.1 g Cersulfat, 90 mL H<sub>2</sub>O und 10 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Ninhydrin (0.2% Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-1,3-indandion) in *n*-BuOH), Vanillin (0.6 g Vanillin, 50 mL EtOH, 60 mL H<sub>2</sub>O, 8 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Molybdatophosphorsäure (2.5 g Molybdatophosphorsäure, 50 mL EtOH) und UV-Licht (254 nm und 366 nm).

### 8.2 Analytik

### 8.2.1 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktmessgerät der Firma Büchi (SMP-20) nach DR. TOTTOLI bestimmt und sind nicht korrigiert.

#### 8.2.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem Avance II 200 MHz "Microbay" (AV 200), Avance II 400 MHz WB (AV 400) oder Avance III 600 MHz (AV 600) der Firma Bruker Biospin GmbH bei RT mit TMS als internen Standard aufgenommen. Zur vollständigen Charakterisierung neuer Substanzen wurden zweidimensionale NMR-Messungen vorgenommen (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC, HMQC und NOESY). Die chemischen Verschiebungen sind als  $\delta$ -Werte in ppm angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten dienten die Abkürzungen s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Qunitett, m = Multiplett und br = breit. Die Kopplungen sind mit dem Symbol *J* gekennzeichnet und in Hz angegeben. Die Auswertung erfolgte in allen Fällen nach erster Ordnung.

Die Kalibrierung erfolgte anhand nicht deuterierter Lösungsmittelsignale nach Literaturwerten.<sup>242</sup>

Die für die Auswertung der NMR-Spektren vorgenommene und daher im Syntheseteil angegebene Nummerierung entspricht teilweise nicht der IUPAC-Empfehlung und stimmt in diesen Fällen nicht mit der Namensgebung überein.

### 8.2.3 Infrarot-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem IF S25 der Firma Bruker Optics, Ettlingen (Messbereich: 7000-400 cm<sup>-1</sup>, max. Auflösung: 2 cm<sup>-1</sup>).

#### Experimente mit Nanopartikeln

Die Nanopartikel wurden vor jeder Messung gefriergetrocknet, um störende Banden von  $H_2O$  durch Feuchtigkeit zu vermeiden. Die beschichteten Nanopartikel (4 mg) wurden mit KBr (200 mg) in Form eines Presslings im Bereich von 4000–400 cm<sup>-1</sup> mit 200 Scans vermessen. Die Auswertung des Spektrums erfolgte mit der Integrationsmethode B der Opus-Software. Dafür wurden die Catechol-Nanopartikel-Spektren zunächst auf 1 mg Substanz geeicht und die Grenzen der charakteristischen Banden der Catechol-Verbindungen festgelegt. Mit Hilfe der Software wurde eine Grundlinie als Tangente entlang der beiden niedrigen Punkte der zu untersuchenden Absorptionsbande angelegt und diese integriert.

#### 8.2.4 Massenspektrometrie

ESI-Massenspektren zur Reaktionskontrolle wurden mit einem Finnigan LCQ-DUO (Thermo Finnigan) und die HR-Massenspektren mit einem MicroToF (Bruker Daltonik) gemessen. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektronenspray und die Spektren wurden mit der Software DataAnalysis nachbearbeitet.

### 8.2.5 Elementaranalyse

Die elementaranalytischen Untersuchungen wurden an einem C/H/N-Analysator Carlo Erba 1106 durchgeführt. Das Abwiegen der Substanzen erfolgte unter Verwendung einer Mettler Toledo UMX-2.

#### 8.2.6 pH-Wert-Bestimmung

Die pH-Werte wurden mit einem Mettler Toledo FE20/FG2-Gerät ermittelt.

#### 8.2.7 Kontaktwinkel-Messung

Mit Hilfe von Kontaktwinkel-Messungen lassen sich Oberflächen hinsichtlich ihrer Benetzbarkeit charakterisieren. Dabei ist der Kontaktwinkel definiert als der Winkel, den eine Tangente am Tropfen im Drei-Phasen-Punkt mit der Oberfläche bildet (Abb. 8-1).<sup>243</sup>



Abb. 8-1: Kontaktwinkel auf einer Festkörperoberfläche. Anmerkung:  $\sigma_l$  (Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit-Gas),  $\sigma_s$  (Grenzflächenspannung zwischen Festkörper-Gas),  $\sigma_{sl}$  (Grenzflächenspannung zwischen Festkörper-Flüssigkeit).

Frei fallende Flüssigkeitstropfen nehmen die Form von Kugeln an. Die Ursache dafür ist die Oberflächenspannung. Diese entspricht der potentiellen Energie auf der Tropfenoberfläche und ist somit proportional zur dieser. Um die potentielle Energie möglichst zu verringern, versucht der Tropfen eine Minimalfläche auszubilden, was letztlich mit der Kugelform erreicht wird. Wird ein Tropfen auf eine Oberfläche abgelegt, kommt es zu einem Zusammenspiel zwischen Kohäsion und Adhäsion. Die Kohäsion beschreibt die Bindungskräfte zwischen den Atomen bzw. Molekülen innerhalb eines Stoffes, während die Adhäsion die Bindungskräfte zwischen den Teilchen zweier unterschiedlicher Grenzflächen charakterisiert. Die Kohäsion bzw. Adhäsion wirken sich direkt auf die Oberflächenspannungen zwischen den am Drei-Phasen-Punkt beteiligten Stoffen aus und beeinflussen dadurch die Form des Tropfens und schließlich die Größe des Kontaktwinkels. Dieser Zusammenhang wird durch die Young'sche Gleichung wiedergegeben (Gleichung 3).

$$\cos \Theta = \frac{\sigma_{s} - \sigma_{sl}}{\sigma_{l}}$$
(3)

Für Kontaktwinkel  $\alpha < 90^{\circ}$  gilt eine Oberfläche eines Festkörpers als gut benetzbar bezüglich H<sub>2</sub>O, für Kontaktwinkel  $\alpha > 90^{\circ}$  als schlecht benetzbar bezüglich H<sub>2</sub>O.

### Experiment

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit einem Kontaktwinkelgoniometer DSM 10 klm (Fa. Krüss GmbH Hamburg) durchgeführt.

Es wurde mit der sogenannten "sessile drop"-Methode gearbeitet. Die zu untersuchende Probe befand sich auf einem höhenverstellbaren Probentisch, auf dem die Probenoberfläche in die optische Achse des Systems justiert werden konnte. Mit Hilfe einer computergesteuerten Spritze wurde die Testflüssigkeit (H<sub>2</sub>O) in Form eines Tropfens (Volumen 2  $\mu$ L) mit einer Geschwindigkeit von 1  $\mu$ L/s abgesetzt. Die Beobachtung der Tropfenform erfolgte im Gegenlicht über eine CCD(charge coupled device)-Kamera. Diese war mit einem PC verbunden, über den die Bildaufnahme erfolgte. Die Kontaktwinkel wurden anhand der Einzelbilder mit der "Drop Shape Analysis" Software (Version 1.9) errechnet.

#### 8.2.8 Time-of-flight-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS)

Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) liefert Informationen über die molekulare Zusammensetzung der obersten Atomlage einer Probenoberfläche. Die Probe wird mit einem Primärionenstrahl mit einer Energie zwischen 0.25-30 kV beschossen. Dieser Primärionenstrahl besteht aus atomaren bzw. molekularen Ionen (Cs<sup>+</sup>, O<sup>2+</sup>, Ar<sup>+</sup>, Ga<sup>+</sup>) oder Cluster-Ionen (Au<sup>nz+</sup>, Bi<sup>nz+</sup>). Die Primärionen treffen auf die Probenoberfläche und lösen nach einer Stoßkaskade Sekundärteilchen aus der Probe heraus. Dieser Prozess wird als "Sputtern" bezeichnet (Abb. 8-2).



Abb. 8-2: Schematische Darstellung des Sputternprozesses. Primärionen treffen auf eine Oberfläche und lösen Sekundärionen aus der Probe heraus.

Ein Teil der herausgelösten Teilchen ist ionisiert. Dieser wird mit Hilfe eines elektrischen Feldes beschleunigt und durchläuft eine Driftstrecke mit einer bestimmten Geschwindigkeit. Diese hängt von der Masse der jeweiligen Teilchen ab. Leichte Teilchen passieren die Driftstrecke schneller als schwere Teilchen. Da die Detektion zeitaufgelöst ist, kann den Detektionszeiten direkt eine Masse und somit ein Element zugeordnet werden. Mit dieser Methode können auch mehrere Elemente bzw. Moleküle in einem Durchlauf bestimmt werden. Die Primärionen besitzen abhängig von ihrer Beschleunigungsenergie eine Eindringtiefe in die Probenoberfläche im sub-Nanometer-Bereich. Dies führt zu einer Zerstörung der ersten Atomlagen der Probenoberfläche. Es handelt sich somit um eine destruktive Analysemethode. Um eine reibungs- und kollisionsfreie Driftstrecke zu ermöglichen, wird im Ultrahochvakuum gearbeitet.<sup>244</sup>

#### Experiment

Es wurde ein Gerät der Firma Ion-ToF Münster vom Typ ToF-SIMS5 verwendet.

### 8.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX41 mit dem Filter 5 (Blue excitation U-MW1B2) verwendet. Bei der Fluoreszenz-Lampe handelt es sich um eine Queck-silberlampe (Olympus U-RFL-T).

#### 8.2.10 Durchlichtmikroskopie

Es wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leica verwendet.

#### 8.2.11 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung ist eine Methode, mit der die Größe von Partikeln in Lösungen ermittelt werden kann. Dazu wird die Suspension mit einem Laserlicht bestrahlt, welches an den Teilchen in der Lösung gestreut wird. Die resultierende Streulichtintensität wird anschließend mit Hilfe eines Detektors erfasst. Da die Partikel gemäß der Brown'schen Molekularbewegung ständig in der Lösung diffundieren, fluktuiert die gemessene Intensität des gestreuten Laserstrahls mit der Zeit. Dabei verändert sich diese Streulichtintensität umso schneller, je schneller sich die Teilchen in der Lösung bewegen. Die Teilchen wiederum bewegen sich umso schneller in der Flüssigkeit, je kleiner sie sind. Auch die Temperatur Tund die Viskosität der Lösung  $\eta$  tragen zur Beweglichkeit der Teilchen in Lösung bei. Ein Maß für die Beweglichkeit von Teilchen in Flüssigkeiten ist der Diffusionskoeffizient D. Die Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten, der Temperatur und Viskosität der Lösung sowie die Partikelgröße wird in der Stokes-Einstein-Gleichung zusammengefasst (Gleichung 4).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$
(4)

 $[D = Diffusionskoeffizient; k = Boltzmann-Konstante; T = absolute Temperatur; \eta = dynamische Viskosität der Flüssigkeit; r = hydrodynamischer Partikelradius.]$ 

Gemäß dieser Beziehung steigt die Diffusion von Teilchen in einer Lösung, wenn die Temperatur steigt bzw. die Viskosität der Lösung sinkt oder die Teilchengröße kleiner wird. Der Diffusionskoeffizient wird über die zeitliche Abhängigkeit der Streulichtintensität bestimmt, und bei bekannter Temperatur und Viskosität der Lösung kann schließlich der sogenannte hydrodynamische Radius der Teilchen *r* berechnet werden. Der hydrodynamische Radius beschreibt den effektiven Radius der Teilchen, die sich in einer Lösung bewegen. Teilchen in einer Lösung sind von Solvatmolekülen umgeben, die ebenfalls Einfluss auf die Diffusion der Teilchen haben. Daher entspricht der über die Stokes-Einstein-Gleichung berechnete Radius von Teilchen in Lösung einem effektiven Radius.

#### Experiment

Es wurde das Gerät Brookhaven 90 PULS Instrument verwendet und mit einem Detektorwinkel von 90° gearbeitet.

Die Nanopartikel wurden in einer 1 M PBS-Puffer-Lösung (pH = 7.4) gelöst und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach einigen Minuten wurde die überstehende Lösung für die

Messung mittels einer Pipette entnommen und in eine UV/Vis-Plastikküvette überführt. Die Messdauer betrug jeweils 3 min, und das Ergebnis wurde aus drei Messungen ermittelt. Eine genaue Konzentrationsangabe konnte hier nicht vorgenommen werden.

### 8.2.12 Zetapotential

Das Zetapotential  $\zeta$  ist das elektrische Potential an der Grenzfläche der sogenannten Diffusen Schicht eines bewegten Ions in einer Suspension (Abb. 8-3). Mit Hilfe des Zetapotentials können Aussagen über die Stabilität der Suspension gemacht werden.

Wird ein geladenes Teilchen in eine Elektrolytlösung gebracht, nähern sich Ionen entgegengesetzter Ladung dem Teilchen und schirmen das ursprüngliche Potential des Teilchens ab. Die Ionen bilden eine elektrochemische Doppelschicht um dieses Teilchen aus. Die Doppelschicht besteht aus einer inneren Region (Stern-Schicht), in der die Ionen fest an das Teilchen gebunden sind, und einer äußeren Region, in der die Ionen nur noch diffus bzw. locker mit dem Teilchen wechselwirken. Das Potential an der Grenzfläche der Diffusen Schicht (Abschergrenze) wird als Zetapotential  $\zeta$  bezeichnet.



Abb. 8-3: Schematische Darstellung des Zetapotentials.

Ist das Teilchen in Ruhe, so ist das Zetapotential Null, da die Ladung des Teilchens durch die Ladung der umliegenden Ionen kompensiert wird und das Teilchen dadurch aus großer Entfernung elektrisch neutral erscheint. Da das Teilchen aber aufgrund der Brown'schen Bewegung ständig in Bewegung ist, werden die Ionen in der Diffusen Schicht vom Partikel abgeschert, so dass das Teilchen nicht mehr elektrisch neutral erscheint und ein Zetapotential aufbaut.

Die Größe des Zetapotentials gibt Auskunft über die Stabilität einer Suspension. Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet die DLVO-Theorie. In dieser Theorie wird angenommen, dass die repulsiven elektrostatischen Kräfte der Doppelschicht sowie die attraktiven van der Waals Kräfte der Teilchen den größten Beitrag in den Wechselwirkungen zwischen den Teilchen in der Lösung haben. Daher wird postuliert, dass es eine Energiebarriere gibt, die von den Teilchen überwindet werden muss, damit diese zusammen adhärieren können. Sind die repulsiven elektrostatischen Kräfte und somit das Zetapotential der Teilchen groß, kann die Energiebarriere nicht überwunden werden und die Teilchen agglomerieren nicht. Die Suspension ist dann stabil. Generell gilt eine Suspension als stabil, wenn die darin gelösten Teilchen ein Zetapotential größer als +30 mV bzw. kleiner als -30 mV haben. Das Zetapotential wird am stärksten von einer pH-Änderung beeinflusst, da dies das Adsorptionsverhalten der gelösten Ionen verändert, und muss immer mit angegeben werden.

Für die Messung des Zetapotentials wird in der Suspension ein elektrisches Feld *E* angelegt. Die Teilchen und Ionen werden in Richtung der entsprechenden Elektroden beschleunigt. Aufgrund der Viskosität der Lösung werden diese jedoch abgebremst. Bei Gleichgewicht der beiden Kräfte bewegen sich die Teilchen dann mit einer konstanten Geschwindigkeit *v*. Die Geschwindigkeit der Teilchen hängt von der Stärke des elektrischen Feldes *E*, der dielektrischen Konstante des Mediums  $\varepsilon$ , der Viskosität des Mediums  $\eta$  und dem Zetapotential der Teilchen  $\zeta$  ab. Dieser Zusammenhang wird in der Henry-Gleichung (5) dargestellt.

$$U_{e} = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$
(5)

 $[U_e = elektrophoretische Mobilität; \epsilon = Dielektrizitätskonstante; \zeta = Zetapotential; f(ka) = Henry-Konstante;$  $\eta = dynamische Viskosität der Flüssigkeit]$ 

 $U_e$  ist die elektrophoretische Mobilität ( $U_e = v/E$ ) und f(*ka*) die Henry-Funktion. Diese nimmt für ein Zetapotential in Lösungen mit sehr kleinen Elektrolyt-Konzentrationen den Wert 1.5 (Smoluchowski-Approximation) und für ein Zetapotential in nicht-polaren Lösungen den Wert 1.0 (Hückel-Approximation) an.

#### Experiment

Es wurde mit dem Gerät Brookhaven 90 PULS Instrument bei einem Detektorwinkel von 90° gearbeitet. Die Durchführung folgte analog zu der Dynamischen Lichtstreuung. Das jeweilige Ergebnis wurde aus zehn Messungen gemittelt.

### 8.2.13 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Bei der ICP-OES handelt es sich um eine analytisch-chemische Methode der Atomspektroskopie. Sie ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse von vielen Elementen. Durch Wärmezufuhr einer Anregungsquelle werden die Valenzelektronen der verdampften Atome angeregt und auf ein energetisch höheres Niveau gehoben. Bei der Relaxation in den Grundzustand wird die vorher aufgenommene thermische Energie als Lichtenergie abgegeben. Die Atome emittieren dabei ihr elementspezifisches Spektrum. Die häufigste Anregungsquelle ist Plasma. Als Plasma wird ein ionisiertes Gas bezeichnet, das aus Atomen und Molekülen sowie aus Ionen und Elektronen besteht. Die ICP-OES beruht auf der Verwendung eines sehr heißen Ar-Plasmas (10000-12000 K) zur Anregung der optischen Emission der zu analysierenden Elemente.

#### Experiment

Die Experimente wurden an einem Varian 720-ES, ICP Optische-Emission-Spektrometer durchgeführt.

Als Kalibrierlösung diente eine Lösung mit einer Eisen-Konzentration von 10-50 ppm in 1000 ppm H<sub>2</sub>O. Die zu untersuchenden Nanopartikel (20 mg) wurden mit einer Mikrowaage abgewogen, mit konz. HCl (3 mL) versetzt, für 12 h stehen gelassen und anschließend filtriert. Danach wurden die jeweiligen Nanopartikel-Lösungen in 4 M HCl verdünnt und mittels ICP vermessen. Die Absorptionswellenlänge für Eisen beträgt 260.94 nm. Anhand der zuvor erstellten Kalibrierlösung wurden die Konzentrationen der jeweiligen Proben bestimmt.

### 8.2.14 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen. Dabei werden Elektronen an der zu untersuchenden Probe unelastisch und elastisch gestreut. Die Probenteile und Atome mit höherer Ordnungszahl werden stärker gestreut und es entstehen Bilder mit verschiedenen Kontrasten. Mit der TEM können Oberflächen sowie die Größe und Form von Nanopartikeln bestimmt werden.

#### Experiment

Die TEM-Bilder wurden mit einem Philips CM-200 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV aufgenommen. Für alle Proben wurden Kohle-Lochfilm-Kupfergrids verwendet.

Die Nanopartikel wurden in absolutem THF (5 mL) gelöst und im Ultraschallbad behandelt. Ein Tropfen der überstehenden Lösung wurde auf 300-mesh Kupfergrid gegeben, das präparierte Grid an der Luft getrocknet und anschließend vermessen.

#### 8.2.15 Spezifische Absorptionsrate (SAR)

Die Spezifische Absorptionsrate ist ein Maß für die Absorption von elektromagnetischen Feldern eines Stoffes wie beispielsweise von magnetischen Nanopartikeln, die sich im biologischen Gewebe befinden. Die Absorption elektromagnetischer Feldenergie führt zu einer Erwärmung des Gewebes. SAR gibt die Temperaturerhöhung mit der Zeit und unter Berücksichtigung der Wärmekapazität der Nanopartikel im biologischen Gewebe an.

### Experiment

Die Nanopartikel (2 mg) wurden in destilliertem  $H_2O$  (2 mL) gelöst und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde anschließend 5 min lang mittels einer Induktionsvorrichtung (5 kA/m Feldamplitude, Frequenz 366 kHz) geheizt und dabei die Temperaturänderung aufgezeichnet.

### 8.2.16 Photometer

Die Optische Dichte der Bakteriensuspenion wurde mit einem UV/Vis-Spektrophotometer der Firma Agilent Technologies (Cary 100 UV/Vis) gemessen.

### 8.3 Synthesen

#### 8.3.1 Synthesen bereits bekannter Substanzen

Folgende Substanzen wurden nach in der Literatur beschriebenen Vorschriften dargestellt:

Nitro-Triester 20,<sup>164</sup> Amin-Triester 21,<sup>164</sup> Trinitril 22,<sup>175</sup> Cbz-Glycin-Tricarbonsäure 41,<sup>167</sup> Boc-Triamin 66,<sup>177</sup> Bn-Dopamin 85,<sup>245</sup> Bn-Dopamin-Carbonsäure 86,<sup>245</sup> Bn-Dopamin-Tetraethylenglycol 87,<sup>245</sup> Dopamin-Tetraethylenglycol 88,<sup>245</sup> PEG-Azid 105,<sup>205</sup> Azid-Propansäure 108,<sup>199</sup> Azid-Propansäure-NHS 109.<sup>199</sup>

### 8.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

### Michael-Addition (AAV 1)

CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (1 Äquivalent) und Triton B (0.1 Äquivalent einer 40%igen Lösung in MeOH) wurden in Dioxan vorgelegt und auf 65-70 °C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde der betreffende Michael-Akzeptor (3.2 Äquivalent) bei einer Temperatur von 70–80 °C langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde erneut Triton B (0.2 Äquivalent) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei 70–75 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit CHCl<sub>3</sub> aufgenommen, einmal mit 10%iger, wässriger HCl-Lösung und dreimal mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

### NO<sub>2</sub>-Reduktion (AAV 2)

### Aktivierung des T1-Raney-Nickels

In einem 500 mL-Dreihalskolben, der mit einem Rückflusskühler versehen war, wurde eine 10% ige, wässrige NaOH-Lösung (30 mL) vorgelegt. Die "Nickel/Aluminium-Legierung für Raney-Nickel (50%)" (3 g) wurde portionsweise zu dieser alkalischen Lösung zugegeben, so dass diese gerade nicht überschäumte. Danach wurde diese Reaktionsmischung 1 h unter Rückfluss erhitzt. Der aktivierte Katalysator setzte sich dabei als "Metallschwamm" auf dem Boden ab, so dass die überstehende Lösung dekantiert werden konnte. Der Rückstand wurde danach einmal mit  $H_2O$  und ein weiteres Mal mit EtOH unter Durchschütteln und Dekantieren gewaschen.

Anmerkung: Aktiviertes Nickel wurde unmittelbar vor der Verwendung hergestellt, da durch Lagerung ein starker Aktivitätsabfall eintritt. Der Katalysator wurde unmittelbar nach der Reaktion in konz. HCl aufgelöst und entsorgt. **Vorsicht:** Das trockene, aktive T1-Raney-Nickel ist selbstentzündlich.

#### Reduktion

Die NO<sub>2</sub>-Verbindungen (4 g) wurden in abs. EtOH (20 mL) gelöst, in einen Autoklaven überführt und anschließend mit 1 Äquivalent des hergestellten T1-Raney-Nickels (3 g) versetzt. Die Hydrierung wurde 3 d bei RT unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (60 bar) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### Hydrierung (AAV 3)

Die zu hydrierende Substanz wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in abs. MeOH gelöst und mit einer katalytischen Menge von Pd/C (5-10 mol%) versetzt. Die Suspension wurde entgast und bis zur vollständigen Reaktion unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### Hydrolyse mit TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (AAV 4)

Die betreffende Verbindung wurde in einem Gemisch aus TFA und  $CH_2Cl_2$  (5-10 ml je 0.1 mmol Substanz) gelöst und bis zur vollständigen Umsetzung bei RT gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Zur vollständigen Entfernung der Säurereste wurde die Reaktionsmischung fünfmal mit dest.  $CH_2Cl_2$  coevaporiert.

### Verseifung mit LiOH (AAV 5)

Der Methylester (1 Äquivalent) wurde in Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1) gelöst, mit LiOH · H<sub>2</sub>O (je 2 Äquivalent pro Methylester) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in wässriger 1 M NaOH-Lösung aufgenommen und dreimal mit EtOAc gewaschen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit wässriger 1 M HCl-Lösung auf pH = 1 angesäuert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

### Peptidkupplung mit DCC/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (AAV 6)

Das Amin (1 Äquivalent) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und unter Eiskühlung mit der Carbonsäure (1.3 Äquivalent) und DCC (1.3 Äquivalent) versetzt und danach 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das ausgefallene DCU abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter, wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit

gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und anschließend einmal mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

### Peptidkupplung mit Dopamin (AAV 7)

Die Carbonsäure (1 Äquivalent) wurde unter  $N_2$ -Atmosphäre in abs. DMF gelöst und unter Eiskühlung mit EDC (1.3 Äquivalent pro Carbonsäure), HOBt (1.3 Äquivalent pro Carbonsäure) und Et<sub>3</sub>N (1.3 Äquivalent pro Carbonsäure) versetzt. Nach 10 min Rühren wurde eine Lösung aus Dopaminhydrochlorid (1.3 Äquivalent pro Carbonsäure) und Et<sub>3</sub>N (1.3 Äquivalent pro Amin) in DMF zu der Reaktionslösung getropft und 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter, wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und einmal mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde gefriergetrocknet und der daraus resultierende Feststoff mittels Soxhlet-Extraktion mit Et<sub>2</sub>O von überschüssigem HOBt befreit. Nach 48 h konnte das Produkt in Form eines farblosen Feststoffs isoliert werden, der in Spuren HOBt enthielt.

### 8.3.3 Synthese flexibler multivalenter Grundgerüste

#### Cbz-Triester 38

Das Amin **21** (3.0 g, 7.2 mmol) wurde in Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1) bei RT gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit NaHCO<sub>3</sub> (0.70 g, 8.3 mmol) versetzt. Anschließend wurde bei 0 °C Cbz-Cl (1.4 g, 1.2 mL, 8.3 mmol) über 10 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde erst 2 h bei 0 °C und dann 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde viermal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit wässriger



1 M HCl gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. Das Cbz-geschützte Amin **38** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 64% (2.5 g, 4.6 mmol); **Smp.:** 100 °C;  $R_f = 0.42$  (Petrolether/EtOAc, 8.5:1.5; Cersulfat); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.37-7.30 (m, 5H, 10-H, 11-H, 12-H), 5.04 (s, 2H, 8-H), 4.83 (s, 1H, NH), 2.20 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 3-H), 1.91 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2-H), 1.43 (s, 27H, 6-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 172.7 (C4), 154.3 (C7), 136.7 (C9), 128.6 (C10),

128.2 (C11), 128.1 (C12), 80.7 (C5), 66.3 (C8), 56.7 (C1), 30.2 (C3), 29.8 (C2), 28.2 (C6); **IR (KBr):**  $v [cm^{-1}] = 3348$ , 1726, 757; **HRMS (ESI):** m/z ber. für C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 572.3194, gef. 572.3195; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>8</sub> (%): C, 65.55; H, 8.62; N, 2.55. Gef. (%): C, 65.63; H, 8.65; N, 2.55.

#### Cbz-Tricarbonsäure 39

Die Darstellung der Tricarbonsäure **39** erfolgte nach **AAV 4** aus dem Triester **38** (2.0 g, 3.6 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Das Rohprodukt wurde danach in EtOAc und wässriger 1 M HCl aufgenommen, dreimal mit wässriger 1 M HCl gewaschen und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Tricarbonsäure **39** in Form eines farblosen Feststoffs



erhalten. **Ausbeute:** 92% (1.3 g, 3.3 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.32-7.29 (m, 5H, 8-H, 9-H, 10-H), 4.98 (s, 2H, 6-H), 2.12 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 3-H), 1.79 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 8. Hz, 2-H); <sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.5 (C4), 154.3 (C5), 137.5 (C7), 128.4 (C8), 127.7 (C9), 127.5 (C10), 64.7 (C6), 55.8 (C1), 29.2 (C3), 28.1 (C2); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3433, 1712, 697; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 404.1316, gef. 404.1326.

### Cbz-Glycin-Triester **40**<sup>167</sup>

Die Darstellung des Triesters **40** erfolgte nach **AAV 6** durch Kupplung des Amins **21** (3.85 g, 9.13 mmol) mit Cbz-Glycin (2.22 g, 10.6 mmol) und DCC (2.19 g, 10.6 mmol) als Kupplungsreagenz in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). Der Cbz-Glycin-Triester **40** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 80% (4.51 g, 7.43 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.35-7.34 (m, 5H, 12-H, 13-H, 14-H), 5.12 (s, 2H, 10-H), 3.78 (s, 2H, 8-H), 2.19 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 3-H), 1.95 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, 2-H), 1.43 (s, 27H, 6-H); <sup>13</sup>C **NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 172.3 (C4), 168.2 (C7), 156.6 (C9), 136.3 (C11), 128.7 (C12),





128.3 (C13), 128.2 (C14), 80.9 (C5), 67.3 (C10), 57.8 (C1), 45.1 (C8), 30.1 (C3), 29.8 (C2), 28.2 (C6); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3299, 2978, 1725, 1660, 1532, 757, 705; **HRMS** (ESI): m/z ber. für  $C_{32}H_{50}N_2O_9$  [M+Na]<sup>+</sup> 629.3409, gef. 629.3405; **CHN-Analyse:** ber. für  $C_{32}H_{50}N_2O_9$  (%): C, 63.34; H, 8.31; N, 4.62. Gef. (%): C, 63.29; H, 8.33; N, 4.75.

### Alkin-Triester 42<sup>169</sup>

Die Darstellung des Alkin-Triesters 42 erfolgte nach AAV 6 durch Kupplung des Amins 21 (3.6 g, 8.7 mmol) mit Propiolsäure (0.73 g, 10 mmol) und DCC (2.2 g, 10 mmol) als Kupplungsreagenz in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 1:1) gereinigt und der Alkin-Triester 42 in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Ausbeute: 61% (2.5 g, 5.3 mmol); **Smp.:** 139 °C;  $R_f = 0.47$  (Petrolether/EtOAc, 2:1; Molybdatophosphor-



säure); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.38 (s, 1H, NH), 2.69 (s, 1H, 9-H), 2.23 (t, 6H,  ${}^{3}J = 7.8$  Hz, 3-H), 1.98 (t, 6H,  ${}^{3}J = 7.8$  Hz, 2-H), 1.43 (s, 27H, 6-H);  ${}^{13}C$  NMR  $(100 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ :  $\delta$  (ppm) = 172.7 (C4), 151.3 (C7), 81.0 (C5), 78.0 (C9), 71.8 (C8), 59.0 (C1), 30.0 (C3), 29.8 (C2), 28.2 (C6); **IR** (**KBr**):  $v [cm^{-1}] = 3260, 1724, 1539, 1154;$  **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 490.2775, gef. 490.2781; CHN-Analyse: ber. für C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub> (%): C, 64.22; H, 8.84; N, 3.00. Gef. (%): C, 64.44; H, 8.84; N, 3.01.

## Alkin-Tricarbonsäure 43<sup>169</sup>

Die Darstellung der Tricarbonsäure 43 erfolgte nach AAV 4 aus dem Triester 42 (0.500 g, 1.67 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Die Tricarbonsäure 43 wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, welcher ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde. Ausbeute: quantitativ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): нό  $\delta$  (ppm) = 3.48 (s, 1H, 7-H), 2.29-2.25 (m, 6H, 3-H), 2.03-1.99 (m, 6H, 2-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 175.2 (C4), 154.0 (C5), 78.5 (C7), 71.4 (C6), 59.9 (C1), 30.2 (C3), 29.1 (C2); HRMS (ESI): m/z ber. für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 322.0897, gef. 322.0905.



### Alkin-Triester 45

Pentinsäure 82 (1.14 g, 11.6 mmol) wurde in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) gelöst, mit NHS-OH (1.30 g, 11.6 mmol) und EDC (1.80 g, 11.6 mmol) als Kupplungsreagenz versetzt und für 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Amin 21 (3.7 g, 8.9 mmol) und Et<sub>3</sub>N (1.63 mL, 11.6 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben und für 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, dreimal mit wässriger 1 M HCl gewaschen und die



 $\mathrm{C}_{27}\mathrm{H}_{45}\mathrm{NO}_{7}$ M = 495.6 g/mol

vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 2:1) gereinigt und der Alkin-Triester **45** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 80% (3.52 g, 7.10 mmol); **Smp.:** 125 °C;  $R_f = 0.34$  (Petrolether/EtOAc, 2:1; Molybdatophosphorsäure); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.49 (dt, 2H, <sup>4</sup>*J* = 2.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 9-H), 2.32 (t, 2H, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 8-H), 2.24 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 3-H), 2.00 (t, 1H, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 11-H), 1.97 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 2-H), 1.43 (s, 27H, 6-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.5 (C4), 170.4 (C7), 83.3 (C10), 80.8 (C5), 69.6 (C11), 57.8 (C1), 36.3 (C8), 30.0 (C2), 29.9 (C3), 28.2 (C6), 15.2 (C9); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3365, 2979, 1720, 1679, 1534, 1154; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 518.3088, gef. 518.3066; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub> (%): C, 64.43; H, 9.15; N, 2.83. Gef. (%): C, 65.47; H, 9.15; N, 2.89.

### Alkin-Tricarbonsäure 46

Die Darstellung der Tricarbonsäure **46** erfolgte nach **AAV 4** aus dem Triester **45** (0.850 g, 1.73 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Die Tricarbonsäure **46** wurde als farbloser Feststoff erhalten. **Ausbeute:** quantitativ; <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.45-2.42 (m, 2H, 7-H), 2.39-2.37 (m, 2H, 6-H), 2.28-2.23 (m, 6H, 3-H), 2.25 (t, 1H, <sup>4</sup>J = 2.5 Hz, 9-H), 2.05-2.00 (m, 6H, 2-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 177.1 (C4), 173.6 (C5), 83.8 (C8), 70.4 (C9), 58.7 (C1), 36.6 (C6), 30.4 (C2), 29.2 (C3), 15.8 (C7); **HRMS** 



(ESI): m/z ber. für  $C_{15}H_{21}NO_7$  [M+Na]<sup>+</sup> 350.1211 gef. 350.1213; **CHN-Analyse:** ber. für  $C_{15}H_{21}NO_7$  (%): C, 55.04; H, 6.47; N, 4.28. Gef. (%): C, 54.78; H, 6.50; N, 4.27.

### Alken-Triester 47

Die Darstellung des Alken-Triesters **47** erfolgte durch die Reaktion des Amins **21** (3.7 g, 8.9 mmol) mit Methacrylolylchlorid (1.0 mL, 8.9 mmol) und Et<sub>3</sub>N (3.0 mL, 22 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 1:1) gereinigt und der Alken-Triester **47** in Form eines farblosen Feststoffs isoliert. **Ausbeute:** 81% (3.5 g, 7.2 mmol); **Smp.:** 98 °C;  $R_f = 0.5$  (Petrolether/EtOAc, 2:1;  $C_{26}H_{45}NO_7 M = 483.6 \text{ g/mol}$ Molybdatophosphorsäure); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.62 (s, 1H, 9-H), 5.23 (s, 1H, 9-H), 2.23 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 2-H), 2.01 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 3-H), 1.97 (s, 3H, 10-H), 1.42 (s, 27H, 6-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.0 (C4), 168.1 (C7), 141.0 (C8), 119.1 (C9), 80.8 (C5), 57.5 (C1), 30.1 (C3), 29.9 (C2), 28.2 (C6), 18.9 (C10); **HRMS**  (ESI): m/z ber. für C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 506.3088, gef. 506.3098; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub> (%): C, 64.57; H, 9.38; N, 2.90. Gef. (%): C, 63.54; H, 9.24; N, 3.09.

#### Alken-Tricarbonsäure 48

Die Darstellung der Tricarbonsäure **48** erfolgte nach **AAV 4** aus dem Triester **47** (0.5 g, 1 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Die Tricarbonsäure **48** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, welcher ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde. **Ausbeute:** quantitativ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.55 (s, 1H, 8-H), 5.27 (s, 1H, 8-H), 2.14-2.08 (m, 6H, 2-H), 1.90-1.87 (m, 6H, 3-H), 1.81 (s, 3H, 7-H).



### Methylester 54

Die Darstellung des Methylesters **54** erfolgte nach **AAV 1** durch die Reaktion von CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (4.3 g, 3.8 mL, 70 mmol) mit Methyl-1,3butadien-1-carboxylat **52** (24 g, 25 mL, 0.22 mol) in Gegenwart von Triton B (1.8 mL) in Dioxan (130 mL). Der Methylester **54** wurde in Form eines gelben Öls erhalten. **Ausbeute:** 92% (28 g, 70 mmol);  $R_f = 0.35$  (Petrolether/EtOAc, 3:2; Cersulfat); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,



CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.69 (quin, 3H, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 4-H), 5.38 (quin, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 3-H), 3.68 (s, 9H, 7-H), 3.05 (d, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 5-H), 2.62 (d, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2-H); <sup>13</sup>**C** NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 171.9 (C6), 128.3 (C3), 126.5 (C4), 93.3 (C1), 50.0 (C7), 38.5 (C5), 37.9 (C2); **IR** (**KBr**): v [cm<sup>-1</sup>] = 2955, 1738, 1669, 1539; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 420.1629, gef. 420.1613; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub> (%): C, 57.42; H, 6.85; N, 3.52. Gef. (%): C, 57.96; H, 6.94; N, 3.30.

### Methylester 55

Die Darstellung des Methylesters 55 erfolgte nach AAV 3 aus dem Alken 54 (27.5 g, 69.2 mmol) in EtOH (300 mL). Das hydrierte Produkt 55 wurde nach 48 h in Form eines braunen Öls erhalten. Ausbeute: 96% (27.4 g, 67.9 mmol). 1.0 g (2.5 mmol) wurden für die Elementaranalyse säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 3:2) gereinigt. Der Methylester 55 wurde als farbloses Öl erhalten.



Ausbeute: 88% (0.90 g, 2.2 mmol);  $R_f = 0.47$  (Petrolether/EtOAc, 3:2; Vanillin); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.65 (s, 9H, 7-H), 2.30 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 5-H), 1.89-1.85 (m,

6H, 2-H), 1.62 (quin, 6H,  ${}^{3}J = 7.6$  Hz, 4-H), 1.23-1.17 (m, 6H, 3-H);  ${}^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ :  $\delta$  (ppm) = 173.8 (C6), 94.3 (C1), 51.7 (C7), 35.2 (C5), 33.7 (C2), 24.9 (C4), 23.3 (C3); **IR (KBr):**  $v [cm^{-1}] = 2953$ , 1738, 1536; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 426.2098, gef. 426.2106; CHN-Analyse: ber. für C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>8</sub> (%): C, 56.61; H, 8.33; N, 3.38. Gef. (%): C, 56.56; H, 8.24; N, 3.47.

### Nitro-Tricarbonsäure 56

Die Darstellung der Tricarbonsäure 56 erfolgte nach AAV 5 aus dem NO<sub>2</sub> Methylester 55 (10 g, 25 mmol) durch Verseifung mit LiOH  $\cdot$  H<sub>2</sub>O (5.3 g, 0.13 mol) in Dioxan/H<sub>2</sub>O (100 mL). Die Tricarbonsäure 56 НÓ wurde in Form eines gelben Feststoffs erhalten. Ausbeute: 80% (8.3 g, НÓ 23 mmol); **Smp.:** 116 °C; <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 2.04 (t,  $\mathrm{C_{16}H_{27}NO_8}$ M = 361.4 g/mol 6H,  ${}^{3}J = 7.6$  Hz, 5-H), 1.82-1.78 (m, 6H, 2-H), 1.41 (quin, 6H,  ${}^{3}J =$ 7.5 Hz, 4-H), 1.10-1.02 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 183.5 (C6), 96.3 (C1), 37.2 (C5), 34.6 (C2), 25.8 (C4), 22.8 (C3); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 2957, 1717, 1535; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 384.1629, gef. 384.1619; CHN-Analyse: ber. für C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub> (%): C, 53.18; H, 7.53; N, 3.88. Gef. (%): C, 52.13; H, 7.55; N, 3.43.

### Nitro-Triester 33

Die Tricarbonsäure 56 (7.30 g, 20.2 mmol) wurde unter  $N_2$ -Atmosphäre in abs. tert-BuOH (100 mL) gelöst. Anschließend wurden Boc<sub>2</sub>O (18.4 g, 84.3 mmol) und DMAP (0.745 g, 6.10 mmol) zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der gelbe Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit gesättigter, wässriger NaHCO3-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet

und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 5:1) gereinigt und der tert-Butylester 33 in Form eines farblosen Öls erhalten. Ausbeute: 60% (6.41 g, 12.1 mmol);  $R_f = 0.43$  (Petrolether/EtOAc, 6:1; Molybdatophosphorsäure); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.16 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 5-H). 1.85-1.81 (m, 6H, 2-H), 1.54 (t, 6H,  ${}^{3}J$  = 7.6 Hz, 4-H), 1.39 (s, 27H, 8-H), 1.16-1.14 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 172.6 (C6), 94.4 (C1), 80.3 (C7), 35.2 (C5), 34.3 (C2), 28.1 (C8), 25.1 (C4), 23.2 (C3); **IR** (**KBr**):  $v [cm^{-1}] = 2935$ , 1729, 1537, 1154;

òн

C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>8</sub>

M = 529.7 g/mol

**HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 552.3507, gef. 552.3506; **CHN-Analyse:** ber. für (%): C, 63.49; H, 9.70; N, 2.64. Gef. (%): C, 63.33; H, 9.96; N, 2.31.

#### Amino-Triester 57

Die Darstellung des Amins **57** erfolgte nach **AAV 2** aus der NO<sub>2</sub>-Verbindung **33** (1.0 g, 1.9 mmol) in EtOH (20 mL) als Lösungsmittel. Das Amin **57** wurde in Form eines braunen Öls (0.90 g) als Rohprodukt erhalten, welches ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde. <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.14 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.4 H, 5-H), 1.47-1.46 (m, 6H, 4-H), 1.37 (s, 27H, 8-H), 1.25-1.18 (m, 12H, 2-H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):



δ (ppm) = 173.0 (C6), 79.9 (C7), 53.5 (C1), 39.5 (C5), 35.5 (C2), 28.1 (C8), 25.7 (C4), 22.9 (C3); **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>28</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 500.3946, gef. 500.3958.

### Alkin-Triester 58

Die Darstellung des Alkin-Triesters **58** erfolgte nach **AAV 6** durch Umsetzung des Amins **57** (0.90 g, 1.8 mmol) mit Propiolsäure (0.25 g, 0.36 mmol) und DCC (0.74 g, 0.36 mmol) als Kupplungsreagenz in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 15:1) gereinigt. Der Alkin-Triester **58** wurde in Form eines gelben Öls erhalten, welcher ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde. **Ausbeute:** quantitativ;



<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 2.65 (s, 1H, 11-H), 2.18-2.16 (m, 6H, 5-H), 1.64-1.62 (m, 6H, 4-H), 1.54-1.52 (m, 6H, 2-H), 1.39 (s, 27H, 8-H), 1.25-1.23 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173.0 (C6), 150.9 (C9), 80.1 (C7), 78.1 (C10), 71.1 (C11), 60.1 (C1), 35.5 (C2), 35.4 (C5), 28.4 (C8), 25.5 (C4), 22.6 (C3); **MS** (ES): m/z (%) = 574.4 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.

#### Diester 60

Die Darstellung des Diesters **60** erfolgte nach **AAV 1** durch die Reaktion des EtNO<sub>2</sub> (1.5 g, 20 mmol) mit *tert*-Butylacrylat **36** (5.1 g, 40 mmol) in Gegenwart von Triton B (0.6 mL) in Dioxan (5 mL). Der Diester **60** wurde nach Gefriertrocknung in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 85% (5.60 g, 16.8 mmol); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):



δ (ppm) = 2.35-2.06 (m, 8H, 2-H, 3-H), 1.52 (s, 3H, 7-H), 1.43 (m, 18H, 6-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 171.3 (C4), 89.9 (C1), 81.1 (C5), 34.3 (C3), 30.1 (C2), 28.1 (C7), 21.7 (C6); **IR** (**KBr**): v [cm<sup>-1</sup>] = 3002, 2982, 1724, 1534; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 354.1887, gef. 354.1875; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> (%): C, 57.99; H, 8.82; N, 4.23. Gef. (%): C, 57.56; H, 8.88; N, 4.00.

### Dicarbonsäure 61

Die Darstellung der Dicarbonsäure **61** erfolgte nach **AAV 4** durch die Entschützung des Diesters **60** (5.60 g, 16.9 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Das so erhaltene Rohprodukt wurde in 1 M wässriger NaOH aufgenommen und dreimal mit EtOAc gewaschen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 1 M HCl auf pH = 1 angesäuert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Dicarbonsäure **61** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 93% (3.40 g, 15.7 mmol); **Smp.:** 113 °C; <sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.50-2.17 (m, 8H, 2-H, 3-H), 1.58 (s, 3H, 5-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 176.9 (C4), 90.7 (C1), 33.4 (C3), 28.6 (C2), 21.0 (C5); **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 242.0635, gef. 242.0635.

#### Dimethylester 62

Die Darstellung des Diesters **62** erfolgte nach **AAV 1** durch die Reaktion von  $EtNO_2$  (0.70 g, 9.0 mmol) mit Methyl-1,3-butadien-1carboxylat **52** (2.0 g, 18 mmol) in Gegenwart von Triton B (0.6 mL) in Dioxan (20 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 5.5:4.5) gereinigt. Der Diester **62** wurde in Form



eines farblosen Öls erhalten. **Ausbeute:** 60% (1.6 g, 5.4 mmol);  $R_f = 0.49$  (Petrolether/EtOAc, 3:2; Cersulfat); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.71-5.64 (m, 2H, 4-H), 5.45-5.37 (m, 2H, 3-H), 3.67 (s, 6H, 7-H), 3.05 (d, 4H, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 5-H), 2.73-2.50 (m, 4H, 2-H), 1.50 (s, 3H, 8-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 171.8 (C6), 128.0 (C4), 126.6 (C3), 90.6 (C1), 51.9 (C7), 42.0 (C2), 37.6 (C5), 22.1 (C8); **IR (Film):** v [cm<sup>-1</sup>] = 2954, 1739, 1659, 1538; **HRMS** (ES): m/z ber. für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 322.1261, gef. 322.1241; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> (%): C, 56.18; H, 7.07; N, 4.68. Gef. (%): C, 56.16; H, 7.23; N, 4.43.

### Dimethylester 63

Die Darstellung des Dimethylesters **63** erfolgte nach **AAV 3** aus dem Alken **62** (1.4 g, 5.7 mmol) in EtOH (20 mL). Das hydrierte Produkt **63** wurde in Form eines farblosen Öls erhalten. **Ausbeute:** 77% (1.3 g, 4.4 mmol);  $R_f = 0.45$  (Petrolether/EtOAc, 3:2; Cersulfat); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.65 (s, 6H, 7-H), 2.29 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 5-H), 2.01-1.93 (m, 4H, 2-H), 1.80-1.72 (m, 4H, 4-H), 1.61 (quin, 4H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 3-H), 1.49 (s, 3H, 8-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 173.7 (C6), 91.2 (C1), 51.6 (C7), 39.3 (C2), 33.6 (C5), 24.7 (C4), 23.4 (C3), 21.8 (C8); **IR (Film):** v [cm<sup>-1</sup>] = 2953, 1732, 1537; **HRMS** (ES): m/z ber. für C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> = 326.1574, gef. 326.1572; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub> (%): C, 55.43; H, 8.31; N, 4.62. Gef. C, 55.39; H, 8.31; N, 4.10.

### Dicarbonsäure 64

Die Darstellung der Dicarbonsäure **64** erfolgte nach **AAV 5** durch Verseifung des Methylesters **63** (1.1 g, 3.5 mmol) mit LiOH · H<sub>2</sub>O (0.50 g, 21 mmol) in Dioxan/H<sub>2</sub>O (100 mL). Die Dicarbonsäure **64** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 93% (0.90 g, 3.3 mmol); **Smp.:** 62 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) =



1.97 (t, 4H,  ${}^{3}J = 7.4$  Hz, 5-H), 1.84-1.64 (m, 4H, 2-H), 1.38-1.31 (m, 4H, 4-H), 1.34 (s, 3H, 7-H), 0.19-1.91 (m, 4H, 3-H);  ${}^{13}$ **C NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 178.3 (C6), 93.1 (C1), 38.7 (C2), 37.1 (C5), 26.1 (C4), 25.6 (C3), 21.1 (C7); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 2953, 1732, 1537; **HRMS** (ES): m/z ber. für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup> = 298.1261, gef. 298.1257; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> (%): C, 52.35; H, 7.69; N, 5.09. Gef. (%): C, 52.07; H, 7.71; N, 4.05.

# Trinitril **22**<sup>175</sup>

 $CH_3NO_2$  (12 mL, 0.22 mol) wurde in Dioxan (60 mL) gelöst und nach Zugabe von Triton B (1 mL) auf 10 °C gekühlt. Unter Eiskühlung wurde Acrylnitril **65** (30 mL, 0.45 mol) langsam bei einer Temperatur von 30-35 °C zugetropft. Anschließend wurde die gelbe Reaktionslösung 24 h bei RT stehen gelassen. Danach wurde die Reaktionslösung mit  $CH_2Cl_2$  (60 mL)



versetzt und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde aus EtOH umkristallisiert und das Nitril **22** in Form farbloser Nadeln erhalten. **Ausbeute:** 41% (15 g, 70 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 2.59-2.55 (m, 6H, 3-H), 2.33-2.29

(m, 6 H, 2-H); <sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 119.5 (C4), 91.0 (C1), 29.3 (C2), 11.6 (C3).

#### Amino-Carbonsäure 67

Das Amin **66** (0.22 g, 0.44 mmol) und Bernsteinsäureanhydrid (70 mg, 0.66 mmol) wurden in Pyridin (20 mL) gelöst und 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und zweimal mit 10%iger, wässriger HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die Amino-Carbonsäure 67 wurde in Form eines gelben Feststoffs



M = 602.8 g/mol

erhalten. **Ausbeute:** 72% (0.19 g, 0.32 mmol); **Smp.:** 122 °C; <sup>1</sup>**H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.05 (s, 6H, 4-H), 2.65-2.63 (t, 2H, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, 9-H), 2.42-2.14 (t, 2H, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 10-H), 1.63-1.59 (m, 6H, 3-H), 1.42 (s, 33H, 2-H; 7-H); <sup>13</sup>**C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 175.9 (C11), 171.7 (C8), 158.4 (C5), 79.5 (C6), 58.6 (C1), 40.8 (C4), 38.8 (C2), 32.1 (C10), 30.5 (C9), 28.6 (C7), 23.9 (C3); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3352, 1694, 1530, 117; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>29</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 625.3783, gef. 625.3780; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>29</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (%): C, 57.79; H, 9.03; N, 9.30. Gef. (%): C, 56.85; H, 9.00; N, 7.86.

#### Alkin-Triamin 68

Die Darstellung des Alkin-Triamin **68** erfolgte nach **AAV 6** durch Kupplung des Amins **66** (1.00 g, 1.99 mmol) mit Propiolsäure (0.278 g, 3.98 mmol) und DCC (0.821 g, 3.98 mmol) als Kupplungsreagenz in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Petrolether/EtOAc, 1:1) gereinigt und das Alkin-Triamin **68** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 30% (0.340 g, 0.610 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz,



M = 554.7 g/mol

CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.68 (s, 1H, N*H*), 4.70 (s, 3H, N*H*), 3.08-3.07 (m, 6H, 4-H), 2.71 (s, 1H, 10-H), 1.66-1.64 (m, 6H, 2-H), 1.42 (s, 33H, 3-H, 7-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 156.2 (C5), 151.2 (C8), 79.3 (C6), 77.9 (C9), 71.8 (C10), 56.9 (C1), 40.6 (C4), 32.2 (C2), 28.5 (C3), 23.8 (C7); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3365, 2105, 1694, 1530, 1171; **MS** (ES): m/z (%) = 577.4 (100) [M+Na]<sup>+</sup>; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (%): C, 60.63; H, 9.09; N, 10.10. Gef. (%): C, 58.94; H, 8.71; N, 10.01.

#### Alkin-Triamin 69

Die Darstellung des Triamins 69 erfolgte nach AAV 4 aus dem Boc-Amin 68 (0.05 g, 0.09 mmol) in TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:3). Das Triamin 69 wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, welcher ohne Reinigung weiter umgesetzt  $H_2N$ ΝH<sub>2</sub> wurde. Ausbeute: quantitativ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) =  $H_2N$ 3.56 (s, 1H, 7-H), 2.91 (t, 6H, 4-H), 1.79-1.75 (m, 6H, 2-H), 1.66-1.63 (m,  $C_{13}H_{26}N_4O$ M = 254.4 g/mol 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 154.2 (C5), 78.6 (C7), 74.9 (C6), 60.3 (C1), 40.8 (C4), 32.3 (C2), 22.4 (C3); **MS** (ES): m/z (%) = 255.1 (100)  $[M+H]^{+}$ .

#### Ammonolyse

Es wurde eine Apparatur, bestehend aus einem Dreihalskolben mit NH<sub>3</sub>-Druckgasflasche, Sicherheitsflasche, Fritte und Blasenzähler aufgebaut.

Der Methylester 55 (1.5 g, 3.7 mmol) wurde in abs. MeOH (15 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde unter Rühren NH<sub>3</sub> eingeleitet und bei RT gerührt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 10 d wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt mit einem Gemisch aus Tri-, Di- und Monoamid wurde säulenchromatographisch gereinigt. Das Monoamid 77 wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9.5:0.5), das Diamid 76 mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1) und das Triamid 70 mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8:2) eluiert.

### Monoamid 77

Ausbeute: 7% (0.10 g, 0.25 mmol);  $R_f = 0.34$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9.5:0.5; Cersulfat); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 5.72 (s, 2H, NH), 3.65 (s, 6H, 7'-H), 2.30 (t, 4H,  ${}^{3}J = 7.3$  Hz, 5'-H), 2.22 (t, 2H, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 5-H) 1.89-1.85 (m, 6H, 2-H, 2'-H), 1.66-1.57 (m, 6H, 4-H, 4'-H), 1.23-1.18 (m, 6H, 3-H, 3'-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 175.2 (C6), 173.9 (C6'), 94.4 (C1), 51.7 (C7'), 35.2 (C5), 35.1 (C5'), 33.65 (C2, C2'), 25.2 (C4, C4'), 23.2 (C3, C3'); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 3447, 1734, 1534; **MS** (ESI): m/z (%) = 389.2 (100)  $[M+H]^+$ ; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (%): C,

55.65; H, 8.30; N, 7.21. Gef. (%): C, 54.74; H, 8.42; N, 6.92.



### Diamid 76

Ausbeute: 24% (0.32 g, 0.91 mmol);  $R_f = 0.30$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1; Cersulfat); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.25 (s, 2H, NH), 6.70 (s, 2H, NH), 3.57 (s, 3H, 7'-H), 2.33 (t, 2H,  ${}^{3}J = 7.3$  Hz, 5'-H), 2.03 (t, 4H,  ${}^{3}J$  = 7.20 Hz, 5-H) 1.84-1.80 (m, 6H, 2-H, 2'-H), 1.50-1.45 (m, 6H, 4-H, 4'-H), 1.11-1.09 (m, 6H, 3-H, 3'-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.1 (C6), 173.2 (C6'), 94.6 (C1), 51.3

JH.  $H_2N$ C17H31N3O6 M = 373.4 g/mol

(C7'), 34.7 (C5), 32.9 (C5'), 25.1 (C2, C2'), 24.4 (C4, C4'), 22.7 (C3, C3'); IR (KBr):  $v [cm^{-1}] = 3363, 1737, 1535;$  **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 374.2286, gef. 374.2269; CHN-Analyse: ber. für C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (%): C, 54.68; H, 9.37; N, 11.25. Gef. (%): C, 54.42; H, 8.35; N, 10.73.

### Triamid 70

**Ausbeute:** 10% (0.15 g, 0.39 mmol); **Smp.:** 169 °C;  $R_f = 0.47$ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 4:1; Cersulfat); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.24 (s, 3H, NH), 6.71 (s, 3H, NH), 2.03 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 5-H), 1.83-1.80 (m, 6H, 2-H), 1.47 (quin, 6H,  ${}^{3}J = 7.4$  Hz, 4-H), 1.11-1.10 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.1 (C6), 94.6 (C1), 34.7 (C5), 28.6 (C2), 25.0 (C4), 22.7 (C3); **IR (KBr):**  $v [cm^{-1}] = 2953$ , 1738, 1536; **HRMS** (ESI): m/z ber. für  $C_{16}H_{30}N_4O_5 [M+Na]^+$ 



381.2108, gef. 381.2107; CHN-Analyse: ber. für C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> (%): C, 53.61, H, 8.44; N, 15.63. Gef. (%): C, 49.90, H, 7.99; N, 15.63.

#### Nitro-Triamin 81

Das Triamid 70 (0.10 g, 0.28 mmol) wurde in abs. THF (5 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter Eiskühlung 1 M BH<sub>3</sub> · THF-Lösung (1 mL) zugetropft. Danach wurde die Reaktionslösung 16 h unter Rückfluss erhitzt, auf 15 °C gekühlt und mit H2O (5 mL) hydrolysiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in konz. HCl und H<sub>2</sub>O gelöst und 1 h bei RT gerührt. Die



Reaktionslösung wurde dann dreimal mit EtOAc gewaschen und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Es wurde ein Gemisch aus Produkt 81 und anorganischen Salzen isoliert, welches als Rohprodukt (0.13 g) weiter umgesetzt wurde. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.97-2.95 (m, 6H, 6-H), 1.97-1.94 (m, 6H, 2-H), 1.67-1.63 (m, 6H, 5-H), 1.39-1.36 (m, 6H, 4-H), 1.25-1.20 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>**C NMR** (150 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 96.1 (C1), 39.4 (C6), 34.6 (C2), 27.8 (C5), 26.5 (C4), 22.6 (C3).

#### Boc-Triamin 78

Das Rohprodukt des Triamins **81** (0.13 g) wurde in MeOH (5 mL) gelöst und mit Et<sub>3</sub>N versetzt (pH = 8). Anschließend wurden (0.20 g, 0.90 mmol) Boc<sub>2</sub>O, eine Spatelspitze DMAP zugegeben und die Reaktionslösung 24 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan/EtOAc,





zwei Stufen in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. **Ausbeute:** 8% (15 mg, 0.020 mmol);  $R_f = 0.48$  (Cyclohexan/EtOAc, 3:2; Ninhydrin); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3.09 (s, 6H, 6-H), 1.87-1.83 (m, 6H, 5-H), 1.49-1.47 (m, 27H, 9-H, 2-H), 1.33-1.27 (m, 6H, 4-H), 1.20-1.14 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 156.2 (C7), 94.7 (C1), 79.3 (C8), 40.5 (C6), 35.5 (C2), 30.0 (C5), 28.6 (C9), 27.1 (C4), 23.5 (C3); MS (ESI): m/z (%) = 639.5 (100) [M+Na]<sup>+</sup>.

### Triol 79

Die Tricarbonsäure **56** (1.65 g, 4.57 mmol) wurde in abs. THF (4.1 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter Eiskühlung 1 M BH<sub>3</sub> · THF-Lösung (1 mL) zugetropft. Anschließend wurde 30 min bei 0 °C und danach 2 h bei RT gerührt. Der ausfallende Feststoff wurde mit H<sub>2</sub>O (45 mL) hydrolysiert und anschließend mit gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es



wurde ein Gemisch aus Produkt **79** und anorganischen Salzen isoliert, welches als Rohprodukt (4.57 g) weiter umgesetzt wurde. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 3.47 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 6-H), 1.85 (t, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2-H), 1.44 (quin, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 5-H), 1.24 (quin, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 4-H), 1.11 (quin, 6H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) = 96.5 (C1), 61.6 (C6), 34.9 (C5), 30.9 (C2), 25.1 (C4), 22.7 (C3); HRMS (ES): m/z ber. für C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 342.2251, gef. 342.2257.

### Trismesylat 80

Das Rohprodukt des Trialkohols **79** (4.5 g) wurde in  $CH_2Cl_2$  (100 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Et<sub>3</sub>N (2.9 mL, 21 mmol) und Methansulfonylchlorid (1.6 g, 21 mmol) wurde die Lösung 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das



Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EtOAc/Hexan, 3:1) gereinigt. Das Trismesylat **80** wurde über zwei Stufen in Form eines gelben Öls erhalten. **Ausbeute:** 78% (1.9 g, 3.6 mmol);  $R_f = 0.25$  (EtOAc/Hexan, 3:1; Molybdatophosphorsäure); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 4.20 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 6-H), 3.01 (s, 9H, 7-H), 1.90-1.88 (m, 6H, 2-H), 1.71 (quin, 6H, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 5-H), 1.46-1.35 (m, 6H, 4-H), 1.24-1.19 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 94.3 (C1), 69.7 (C6), 37.4 (C7), 35.3 (C2), 28.8 (C5), 25.5 (C4), 23.1 (C3); **IR (KBr):** v [cm<sup>-1</sup>] = 1533, 1351, 1174; **HRMS** (ES): m/z ber. für C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>11</sub>S<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 576.1577, gef. 576.1567; **CHN-Analyse:** ber. für C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>11</sub>S<sub>3</sub> (%): C, 41.21; H, 2.53; N, 7.10. Gef. (%): C, 40.83; H, 2.09; N, 7.35.

### Triazid 72

Das Trismesylat **80** (1.9 g, 3.6 mmol) wurde unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in abs. DMF (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von NaN<sub>3</sub> (3.2 g, 50 mmol) wurde die Lösung 3.5 h bei 60 °C unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde ein Teil des Lösungsmittels im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde mit H<sub>2</sub>O und EtOAc aufgenommen und dreimal mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden



über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum, allerdings nicht bis zur Trockene eingeengt. Es wurde ein gelbes Öl (0.90 g) erhalten, welches ohne Reinigung weiter eingesetzt wurde. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3.15 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 6-H), 1.80-1.74 (m, 6H, 2-H), 1.48 (quin, 6H, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 5-H), 1.26 (quin, 6H, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 4-H), 1.14-1.11 (m, 6H, 3-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 94.2 (C1), 51.1 (C6), 35.2 (C5), 28.5 (C2), 26.7 (C4), 23.2 (C3).

#### 8.3.4 Synthese von Catechol-Derivaten

### Monocatechol 83

Pentinsäure 82 (1.50 g, 15.3 mmol) wurde in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) gelöst, mit NHS-OH (2.29 g, 19.9 mmol) und EDC (3.80 g, 19.9 mmol) als Kupplungsreagenz versetzt und für 12 h bei RT  $C_{13}H_{15}NO_3$ gerührt. Anschließend wurde das Intermediat durch Säure-Base-M = 233.3 g/mol Extraktion gereinigt und in Form eines farblosen Feststoffs isoliert. Ausbeute: 94% (2.80 g, 14.4 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 8.40 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz), 2.82 (s, 4H), 2.60 (dt, 2H,  ${}^{4}J = 2.6$  Hz,  ${}^{3}J = 7.0$  Hz), 2.04 (t, 1H,  ${}^{4}J = 2.6$  Hz);  ${}^{13}C$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 169.0, 167.1, 81.0, 70.1, 30.4, 25.7, 14.2. Das Intermediat 44 (0.31 g, 1.6 mmol) wurde in DMF (20 mL) gelöst, mit Dopaminhydrochlorid (0.34 g, 1.8 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.13 mL, 1.8 mmol) versetzt und für 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde danach im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc und wässriger 1 M HCl aufgenommen, dreimal mit wässriger 1 M HCl gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Monocatechol 83 wurde als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 57% (0.21 g, 0.91 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 8.4 (br, 2H, OH), 6.62 (d, 1H,  ${}^{3}J = 8.0$  Hz, 10-H), 6.56 (d, 1H,  ${}^{4}J = 2.0$  Hz, 13-H), 6.43 (dd, 1H,  ${}^{4}J = 2.0$  Hz,  ${}^{3}J = 8.0$ Hz, 9-H), 3.19-3.14 (m, 2H, 6-H), 2.74 (t, 1H,  ${}^{4}J = 2.4$  Hz, 5-H), 2.52-2.38 (m, 2H, 7-H), 2.36-2.32 (m, 2H, 2-H), 2.26-2.22 (m, 2H, 3-H). Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>198</sup>

#### Nitro-Triscatechol 90

Die Darstellung des Nitro-Triscatechols **90** erfolgte nach **AAV 7** durch Kupplung der Tricarbonsäure **89** (0.10 g, 0.36 mmol) mit Dopaminhydrochlorid (0.31 g, 1.6 mmol), EDC (0.31 g, 1.6 mmol) und HOBt (0.22 g, 1.6 mmol) als Kupplungsreagenzien und Et<sub>3</sub>N (0.94 mL, 6.8 mmol) in DMF (10 mL). Das Produkt **90** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, der Spuren von HOBt enthielt. **Ausbeute:** 65% (0.16 g,



0.23 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.68 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 9-H), 6.63 (d, 3H, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 12-H), 6.50 (dd, 3H, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz, 8-H), 3.34-3.30 (m, 12H, 5-H, 6-H), 2.16-2.09 (m, 12H, 2-H, 3-H); <sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 174.1

(C4), 146.2 (C11), 144.7 (C10), 132.0 (C7), 121.1 (C12), 117.0 (C9), 116.4 (C8), 94.1 (C1), 42.2 (C5), 35.8 (C3), 32.3 (C6), 31.2 (C2); **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 705.2742, gef. 705.2743.

Cbz-Triscatechol 91

Die Darstellung des Cbz-Triscatechols 91 erfolgte nach AAV 7 durch Kupplung der Tricarbonsäure 39 (0.20 g, 0.52 mmol) mit Dopaminhydrochlorid (0.26 g, 1.7 mmol), EDC (0.33 g, 1.7 mmol) und HOBt (0.23 g, 1.7 mmol) als Kupplungsreagenzien und Et<sub>3</sub>N (1.4 mL, 10 mmol) in DMF (10 mL). Das Produkt 91 wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, der Spuren von HOBt enthielt. Ausbeute: 34% (0.14 g,



0.18 mmol); <sup>1</sup>**H** NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7.35-7.30 (m, 5H, 16-H, 17-H, 18-H), 6.62 (d, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 9-H), 6.57 (s, 3H, 12-H), 6.42 (d, 3H, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 8-H), 5.00 (s, 2H, 14-H), 3.41-3.36 (m, 6H, 5-H), 3.15-3.14 (m, 6H, 6-H), 2.00 (br, 6H, 3-H), 1.78 (br, 6H, 2-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 172.0 (C4), 156.4 (C13), 145.1 (C11), 143.5 (C10), 137.4 (C15), 130.3 (C7), 128.4 (C16), 127.7 (C17), 127.5 (C18), 119.2 (C12), 115.9 (C9), 115.5 (C8), 64.9 (C14), 56.2 (C1), 40.7 (C5), 34.8 (C3), 30.4 (C6), 29.7 (C2); HRMS (ESI): m/z ber. für C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 809.3368, gef. 809.3374.

### Amino-Triscatechol 92

Die Darstellung des Amins **92** erfolgte nach **AAV 3** aus dem Rohprodukt **91** (0.035 g, 0.044 mmol) in MeOH (10 mL). Das Amin **92** wurde in Form eines braunen Öls als Rohprodukt erhalten, welches ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde. **Ausbeute:** quantitativ; <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.76 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 9-H), 6.70 (s, 3H, 12-H), 6.56 (d, 3H, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 8-H), 3.50-3.48 (m, 12H, 5-H, 6-H),



2.21-2.19 (m, 6H, 3-H), 1.67-1.65 (m, 6H, 2-H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 172.1 (C4), 145.0 (C11), 143.5 (C10), 130.2 (C7), 119.1 (C12), 115.9 (C9), 115.4 (C8), 48.6 (C1), 40.6 (C5), 34.6 (C3), 34.0 (C6), 29.7 (C2); HRMS (ESI): m/z ber. für C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 653.3181, gef. 653.3196.

#### Alkin-Triscatechol 94

Die Darstellung des Alkin-Triscatechols **94** erfolgte nach **AAV 7** durch Kupplung der Tricarbonsäure **43** (0.32 g, 1.1 mmol) mit Dopaminhydrochlorid (0.65 g, 4.3 mmol), EDC (0.60 g, 4.3 mmol) und HOBt (0.58 g, 4.3 mmol) als Kupplungsreagenzien und Et<sub>3</sub>N (2.4 mL, 17 mmol) in DMF (10 mL). Das Alkin-Triscatechol **94** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, der in Spuren HOBt enthielt. **Ausbeute:** 8% (0.060 g, 0.090 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm)



= 6.68 (d, 3H,  ${}^{3}J$  = 7.9 Hz, 9-H), 6.64 (s, 3H, 12-H), 6.52 (d, 3H,  ${}^{3}J$  = 7.9 Hz, 8-H), 3.51 (s, 1H, 15-H), 3.39-3.34 (m, 6H, 6-H), 2.63 (t, 6H,  ${}^{3}J$  = 7.1 Hz, 5-H), 2.13-2.09 (m, 6H, 3-H), 1.94-1.92 (m, 6H, 2-H);  ${}^{13}C$  NMR (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 175.5 (C4), 154.3 (C13), 146.2 (C11), 144.8 (C10), 130.2 (C12), 121.1 (C8), 117.0 (C9), 116.4 (C7), 74.6 (C15), 71.3 (C14), 60.3 (C1), 42.4 (C5), 35.8 (C6), 31.5 (C3), 31.2 (C2); HRMS (ESI): m/z ber. für C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 727.2950, gef. 727.2961.

### Alkin-Triscatechol 95

Die Darstellung des Alkin-Triscatechols **95** erfolgte nach **AAV 7** aus der Tricarbonsäure **46** (0.10 g, 0.30 mmol), Dopaminhydrochlorid (0.65 g, 4.3 mmol), EDC (0.18 g, 1.2 mmol) und HOBt (0.15 mg, 1.2 mmol) als Kupplungsreagenzien und Et<sub>3</sub>N (0.16 mL, 1.2 mmol) in DMF (10 mL). Das Alkin-Triscatechol **95** wurde in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, der in Spuren HOBt enthielt. **Ausbeute:** 23% (0.051 g, 0.070 mmol); <sup>1</sup>**H NMR** (400



MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 6.62 (d, 3H, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, 9-H), 6.64 (s, 3H, 12-H), 6.41 (dd, 3H, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, 8-H), 3.16-3.11 (m, 6H, 6-H), 2.73 (t, 1H, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 17-H), 2.49-2.47 (m, 6H, 5-H), 2.37-2.32 (m, 2H, 15-H), 2.28-2.27 (m, 2H, 14-H), 2.00-1.96 (m, 6H, 3-H), 1.81-1.77 (m, 6H, 2-H); <sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  (ppm) = 171.9 (C4), 169.8 (C13), 145.0 (C11), 143.5 (C10), 130.3 (C12), 119.2 (C8), 115.9 (C9), 115.5 (C7), 83.9 (C16), 71.3 (C17), 56.8 (C1), 40.6 (C5), 34.9 (C14), 34.7 (C6), 30.1 (C3), 29.6 (C2), 14.5 (C15); **HRMS** (ESI): m/z ber. für C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 755.3263, gef. 755.3257.

#### PEG-Triscatechol 106

95 (1 Äquivalent), PEG-Azid Das Alkin 105 (1 Äquivalent), Natriumascorbat (10 mol%) und CuSO<sub>4</sub> (10 mol%) wurden in H<sub>2</sub>O/tert-BuOH (1:1) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 12 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde PEG-Triscatechol 106 erhalten, welches mittels MALDI-ToF-Analyse nachgewiesen wurde. **Maldi-ToF-MS** m/z (%): 5790.8 (90) [M+H]<sup>+</sup>.



#### 8.4 Darstellung und Funktionalisierung von Metalloberflächen

#### 8.4.1 Herstellung von TiO<sub>2</sub>-Trägern auf Siliciumwafern

Für die Darstellung von TiO<sub>2</sub>-Filmen wurden Siliciumwafer (100 orientierte Si-Einkristalle) mit einer Größe von 2.5×2.5 cm<sup>2</sup> verwendet (Abb. 8-4 a). Diese wurden in eine TiCl<sub>4</sub>-Lösung eingetaucht und langsam wieder herausgeholt (b).



c) Calcinierung

Abb. 8-4: Darstellung der TiO<sub>2</sub>-Träger. a) Siliciumwafer, b) Eintauchen in eine TiCl<sub>4</sub>-Lösung und c) Calcinierung der beschichteten Siliciumwafer.

Die so beschichteten Oberflächen wurden anschließend calciniert (c). Hierbei wurden diese zunächst von 80 °C auf 300 °C innerhalb von 4 h geheizt. Danach erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 600 °C innerhalb von 4 h. Diese Temperatur wurde für 1 min gehalten und anschließend die calcinierten TiO2-Träger wieder langsam auf RT gekühlt. Es wurde eine TiO<sub>2</sub>-Schicht auf den Siliciumwafern erhalten, die etwa 100 nm dick war.

101
#### 8.4.2 Herstellung von TiO<sub>2</sub>-Oberflächen auf Glas

Die Herstellung von TiO<sub>2</sub>-Galsoberflächen erfolgte analog zu den TiO<sub>2</sub>-Siliciumwafern.

#### 8.4.3 Darstellung von Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln

Zu einem Gemisch aus CTAB (2.4 g), *n*-Octan (10 mL) und *n*-Butanol (1 mL) wurde bei einer Temperatur von 23 °C eine wässrige FeCl<sub>3</sub>-Lösung (2 mL, 0.2 M) zugegeben. Nach 5 min Rühren entstand eine klare, gelbe, zähflüssige Lösung. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde eine wässrige NH<sub>4</sub>OH–Lösung (0.5 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Der resultierende braune Niederschlag wurde 20 min gerührt, anschließend abwechselnd mit EtOH und H<sub>2</sub>O (3 ×) mittels Zentrifugieren (16000 rpm) gewaschen und unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Es wurden dabei 35 mg an Eisenoxid-Nanopartikeln erhalten.

#### 8.4.4 Darstellung von Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln

Zu einem Gemisch aus CTAB (2.4 g), *n*-Octan (10 mL) und *n*-Butanol (1 mL) wurde bei einer Temperatur von 23 °C eine wässrige FeCl<sub>3</sub>-Lösung (2 mL, 0.2 M) zugegeben. Nach 5 min Rühren entstand eine klare, gelbe, zähflüssige Lösung. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde eine wässrige NH<sub>4</sub>OH–Lösung (0.5 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Dabei fiel ein brauner Niederschlag aus, zu dem nach 20 min NaBH<sub>4</sub> (0.8 M in EtOH, 2 mL) zugegeben wurde. Der resultierende schwarze Niederschlag wurde 15 min gerührt, anschließend abwechselnd mit EtOH und H<sub>2</sub>O (3 ×) mittels Zentrifugieren (16000 rpm) gewaschen und unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Es wurden dabei 30 mg an Eisen/Eisenoxid-Nanopartikeln erhalten.

#### 8.4.5 Funktionalisierung von Nanopartikeln

Die jeweiligen Catechol-Derivate (5 Massenäquivalent) wurden in einer MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10, 30 mL) und MeOH (10 mL) gelöst und mit Nanopartikeln (1 Massenäquivalent) versetzt. Die Beschichtung erfolgte für 12 h unter Lichtausschluss im Ultraschallbad. Anschließend wurden diese Nanopartikel abwechselnd mit MeOH und H<sub>2</sub>O (3 ×) mittels Zentrifugieren gewaschen. Die resultierenden, beschichteten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel wurden gefriergetrocknet und mittels IR-Spektroskopie charakterisiert.

#### 8.4.6 Funktionalisierung von größeren Oberflächen

Die TiO<sub>2</sub>-Träger wurden zunächst mit H<sub>2</sub>O und MeOH gewaschen, mittels Druckluft getrocknet und mit Hilfe eines Kontaktwinkelmessgeräts analysiert. Im nächsten Schritt wurden die (einheitlichen) reinen TiO<sub>2</sub>-Träger in eine Lösung des betreffenden Catechols (5-10 mg), welches in einer MOPS-Puffer-Lösung (pH = 10, 10 mL) und MeOH (1 mL) gelöst war, eingetaucht. Diese catecholhaltige Reaktionslösung wurde danach für 14 h bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurden die beschichteten Träger mit MeOH und H<sub>2</sub>O gewaschen und mittels Druckluft getrocknet.

Die Edelstahl-Oberflächen wurden 2 min lang mit Peroxomonoschwefelsäure ("Piranha"-Lösung,  $H_2SO_4$ : $H_2O_2$ , 1:3) behandelt und danach mit  $H_2O$  und MeOH gewaschen. Die Beschichtung erfolgte analog zu den TiO<sub>2</sub>-Trägern.

#### 8.5 Durchführung der Assays

#### 8.5.1 Puffer-Lösungen

Folgende Puffer-Lösungen wurden vor jeder Versuchsdurchführung hergestellt: 4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS-Puffer, 0.1 M MOPS, 0.6 M NaCl, 0.6 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); Phosphate buffered saline (PBS-Puffer, 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES-Puffer, 0.1 M HEPES). Die Puffer-Lösungen wurden anschließend mit 1 M HCl oder 1 M NaOH-Lösung auf den gewünschten pH-Wert gebracht.

#### 8.5.2 Stabilitätsassay

Es wurden fünf PBS-Puffer-Lösungen mit den pH-Werten von 7.50, 7.45, 7.09, 6.45 und 6.00 hergestellt. In diesen Puffer-Lösungen wurden die mit Catechol-Derivaten beschichteten TiO<sub>2</sub>-Nanopartikel (10 mg) mit Hilfe von MeOH (1 mL) suspendiert und für 30 min bei RT und unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurden diese Nanopartikel abwechselnd mit MeOH und H<sub>2</sub>O (3 ×) gewaschen und gefriergetrocknet, sowie mittels quantitativer IR-Spektroskopie analysiert.

#### 8.5.3 Blutserum-Assay

Die beschichteten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen wurden 2 h in einer HEPES-Puffer-Lösung (pH = 7.4) gerührt und anschließend mit frischem, menschlichem Blut (3 mL, stabilisiert mit EDTA) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die TiO<sub>2</sub>-Träger mit einer PBS-Puffer-Lösung (pH = 7) vorsichtig gewaschen und für eine fluoreszenzmikroskopische Detektion mit Acridinorange (0.1% w/V) überschichtet. Nach 10 min wurden diese erneut mit einer PBS-Puffer-Lösung (pH = 7) gewaschen, mittels Druckluft getrocknet und analysiert.

#### 8.5.4 Zell-Assay

In Übereinstimmung mit den örtlichen ethischen Zustimmungen wurde das Bohrmehl von Stammzellen von zwei erwachsenen, männlichen Patienten im Alter von 64 bzw. 75 Jahren während einer Operation des Oberschenkels geerntet. Beide Patienten hatten keine Sekundärkrankheiten oder sonstige Verletzungen. Das Bohr- bzw. Knochenmehl wurde in einem F12K Medium, welches 20% FKS (fetales Kälberserum, PAA, Österreich), 0.05 U/mL Penicillin und 0.05 µm/mL Streptomycin enthielt, in Gegenwart von 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gezüchtet. Anwachsende, von den Knochen abgeleitete, Stammzellen wurden gesammelt und geimpft (20000 Zellen/cm<sup>2</sup>), um sie für Adhäsionsexperimente verwenden zu können. Dabei wurde das Medium zweimal in der Woche gewechselt. Nach einer Woche wurde das F12K Medium durch ein osteogendifferenzierendes -,,knochenbildendes" - Medium ersetzt. Dieses enthält 10% FCS, 0.1 µM Dexamethason, 0.05 µM Ascorbinsäure-2-Phosphat, 10 mM Glycerolphosphat (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden einen Monat lang unter diesen Bedingungen kultiviert und mit einem Durchlichtmikroskop zweimal in der Woche untersucht.

Das Experiment wurde mit TiO<sub>2</sub>-Oberflächen, die auf Glas aufgebracht waren, durchgeführt. Diese wurden zunächst für 30 min in 70% igem EtOH eingelegt, um sie so zu sterilisieren. Anschließend wurden die TiO<sub>2</sub>-Träger mit der Zellsuspension überschichtet und die Zellen auf ihre einheitliche Verteilung mit einem Durchlichtmikroskop untersucht. Die Oberflächen wurden in einem Brutschrank bei 36 °C inkubiert, wo die Zellen proliferierten. Das Zellverhalten auf den TiO<sub>2</sub>-Oberflächen wurde in regelmäßigen Abständen mit einem Durchlichtmikroskop untersucht.

#### 8.5.5 Bakterien-Assay

Vor der Durchführung des Antifouling-Experiments wurde der Zeitpunkt ermittelt, in dem die Bakterien sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. In dieser Phase liegt eine maximale Anzahl an lebenden Bakterien vor, die in ihrem Verhalten weitestgehend homogen sind. Die Bakterienanzahl wurde mit Hilfe der Optischen Dichte (OD) und der Auszählmethode (Koloniebildenden Einheit, KBE) ermittelt.

Es wurde ein *Staphylococcus epidermides* Stamm (GK2278; Stamm DSM20044) verwendet, der in einer Glycerinkultur bei -80 °C aufbewahrt wurde.

#### Vorversuch

Zunächst wurde ein mit LB-Medium (3 mL) befülltes, steriles Reaktionsgefäß mit einer Kolonie des Stammes *S. epiderimidis* von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm im Schüttler inkubiert. Von dieser Übernachtkultur (ÜNK) wurden 3 mL entnommen und in ein 100 mL LB-Medium, der Versuchskultur, überführt (Abb. 8-5). Die Versuchskultur war zuvor auf 37 °C vorgewärmt worden.



Abb. 8-5: Herstellung der Versuchskultur von S. epidermidis in LB-Medium.

Die Versuchskultur wurde bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert und das Bakterienwachstum anhand OD-Messung bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Photometer verfolgt. Die Messung erfolgte erst nach 1 h, da sich die Bakterien zuvor in der Anpassungsphase befanden. Die OD<sub>550</sub>-Werte dieser Versuchskultur zu den Entnahmezeitpunkten sind in Tabelle 8-1 zusammengefasst. In Abb. 8-6 sind die OD<sub>550</sub>-Werte der *S. epidermidis*-Versuchskultur gegen die Zeit aufgetragen.

Zeit [h]	OD	logOD
1.0	0.0495	-1.3054
1.5	0.0781	-1.1073
2.0	0.1382	-0.8595
2.5	0.2302	-0.6379
3.0	0.3499	-0.4561
3.5	0.4257	-0.3709
4.0	0.5001	-0.3009
4.5	0.5701	-0.2440

Tabelle 8-1: OD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.



Abb. 8-6: OD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

Um die Wachstumsrate dieser Bakterien zu bestimmen, wurden die OD<sub>550</sub>-Werte logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 8-7). In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass der Graph linear ansteigt, wobei die Steigung in zwei Abschnitten unterteilt werden kann. Im ersten Abschnitt (t = 1-2.5 h) steigt der Graph stärker an als im zweiten Abschnitt (t = 2.5-4.5 h). Das heißt, dass die Bakterien im ersten Zeitabschnitt eine höhere Teilungsrate haben als im zweiten Abschnitt – sie befinden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. Im

zweiten Abschnitt, ab t = 4.0, zeigt der Graph einen Übergang in die stationäre Phase – es liegt ein dynamisches Gleichgewicht vor.



Abb. 8-7: logOD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

Weiterhin wurde das Bakterienwachstum mit Hilfe der KBE-Bestimmung verfolgt, da mittels der OD die lebenden Zellen von den toten Zellen nicht unterschieden werden können. Hierbei wurden parallel zu den OD-Entnahmezeitpunkten ebenfalls alle 30 min 500  $\mu$ L aus der Versuchskultur entnommen und in 4.5 mL sterile, physiologische Kochsalzlösung übertragen. Aus jeder Probe wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen erstellt:  $(10^{-2} \text{ bis } 10^{-8})$ . Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 500  $\mu$ L der höher konzentrierten Verdünnung zu 4.5 mL isotonischer NaCl-Lösung in ein steriles Röhrchen überführt. Vor dem erneuten Verdünnen wurde das Röhrchen gut durchgemischt. Nach Erstellen der Verdünnungsreihe wurden jeweils 50  $\mu$ L der einzelnen Verdünnungsstufen auf je ein Viertel einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Die KBE pro Milliliter wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des aufgetragenen Volumens berechnet (Gleichung 6). Die KBE pro Milliliter ist in Tabelle 8-2 angegeben.

$$\frac{\text{KBE}}{\text{mL}} = \frac{\text{Koloniezahl}}{\text{Verdünnungsstufe} \times 0.05 \text{ mL}}$$
(6)

Zeit [h]	KBE/mL	logKBE
1.0	7720000	6.9
1.5	15800000	7.2
2.0	45100000	7.7
2.5	77100000	7.9
3.0	108000000	8.0
3.5	160000000	8.2
4.0	231000000	8.4
4.5	344000000	8.5

Tabelle 8-2: KBE-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

In Abb. 8-8 sind die KBE-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur gegen die Zeit aufgetragen.



Abb. 8-8: Anzahl der Kolonien in Abhängigkeit von der Zeit.

Um die Wachstumsrate dieser Bakterien zu bestimmen, wurden die KBE-Werte logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 8-9).



Abb. 8-9: logKBE-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Auswertung der logKBE-Graphen zeigt ebenfalls, dass die Bakterien sich in den ersten zwei Stunden (t = 1-2 h) in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und ab t = 4.0 h in die stationäre Phase übergehen.

Die doppelt-logarithmische Auftragung der OD gegen die KBE zeigt einen lineraren Verlauf des Graphen (Abb. 8-10).



Abb. 8-10: logOD-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der logKBE.

Für das Adhäsionexperiment mit *S. epidermidis* wurde ihr Wachstumsverhalten über die  $OD_{550}$ -Messung und KBE/mL ermittelt. Beide Methoden zeigen, dass die Bakterien in den ersten zwei Stunden eine sehr hohe Teilungsrate haben. Dies ist der optimale Zeitpunkt, um die Bakterien für das Experiment zu ernten. Mit Hilfe dieser Vorversuche konnte zudem festgestellt werden, dass die Zellen bei einer OD von 0.15 geernetet werden sollten, welche einer errechneten KBE/mL von  $4 \times 10^7$  entspricht.

### Bakterienwachstum für den Assay

Die ÜNK-Kultur wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet. Aus dieser ÜNK wurde 1 mL in das LB-Medium gegeben und bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Das Bakterienwachstum dieser Versuchskultur wurde aufgrund der Vorversuche nur 2.8 h verfolgt. Es hatte sich zuvor gezeigt, dass die Bakterien in diesem Zeitraum eine hohe Teilungsrate aufweisen. Die OD<sub>550</sub>-Werte dieser Versuchskultur zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten sind in Tabelle 8-3 zusammengefasst. In Abb. 8-11 sind die OD<sub>550</sub>-Werte der *S. epidermidis*-Versuchskultur gegen die Zeit aufgetragen.

Zeit [h]	Optische Dichte	log OD
0.0	0.0185	-1.7328
1.2	0.0297	-1.5272
1.9	0.0673	-1.1720
2.4	0.1301	-0.8857
2.7	0.1777	-0.7503

Tabelle 8-3: OD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.



Abb. 8-11: OD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

Um die Wachstumsrate dieser Bakterien zu bestimmen, wurden die  $OD_{550}$ -Werte logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 8-12).



Abb. 8-12: logOD<sub>550</sub>-Werte der S. epidermidis-Versuchskultur in Abhängigkeit von der Zeit.

In dieser Darstellung zeigt der Graph einen linearen Verlauf, das heißt, dass die Bakterien sich in diesem gemessenen Zeitraum (t = 1.2-2.7 h) in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Bakterien wurden daher bei einer  $OD_{550}$  von 0.177 (entspricht der aus dem Vorversuch errechneten Bakterienzahl von  $5.2 \times 10^7$  KBE/mL) geerntet.

Es wurden 5 mL dieser Bakterienkultur in ein Falcongefäß (5 min, 5000 g, RT) überführt, zentrifugiert und erneut in einer frischen PBS-Puffer-Lösung (pH = 7, 50 mL) suspendiert. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:10 der ÜNK. Von dieser Konzentration erfolgte ebenfalls eine KBE-Bestimmung wie in der oben beschriebenen Vorgehensweise. Die tatsächliche KBE/mL der eingesetzten Bakterienkultur wurde ebenfalls durch Auszählen der Kolonien ermittelt. Für das Adhäsionsexperiment wurden somit  $4.5 \times 10^7$  KBE/mL verwendet.

#### 9 **GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS**

Stoff	Gefahren -symbol	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	Gefahr	225-319-336	210-233-305+351+338
Acetonitril	Gefahr	225-332-302-312-319	210-305+351+338- 403+235
Acridinorange	-	-	-
Acrylnitril	Gefahr	225-350-331-311-301- 335-315-318-317-411	201-210-233-280- 302+352-305+351+338- 309-310-403+235
Aminoadamantan	Achtung	302	-
Ammoniak (g)	Gefahr	280-221-331-314-400	377-303+361+353+315 304+340+315- 305+351+338+315
Ammoniumhydroxid	Gefahr	314-400	273-280-305+351+338- 309+310
Ammoniummolybdat	Achtung	315-319-335	261-305+351 + 338
Benzylamin	Gefahr	314-302-312	280-305+351+338-310
Benzylbromid	Achtung	319-335-315	305+351+338-302+352
Benzyloxycarbonyl- chlorid	Gefahr	314-410	273-501
Benzyltrimethyl- ammoniumhydroxid (Triton B, 40% in MeOH)	Gefahr	225-301+311+331-314- 370	210-260-280-301+310- 305+351+338-310
Bernsteinsäure- anhydrid	Achtung	302-319-335	305+351+338
Boran	Gefahr	225-260-302-315-318-335	210-223-231+232-261- 370+378-422
<i>n</i> -Butanol	Gefahr	226-302-318-315-335-336	280-302+352- 305+351+338-313
<i>tert</i> -Butanol	Gefahr	225-332-319-335	210-305+351+338- 403+233
<i>tert</i> -Butylacrylat	Gefahr	225-302-312-315-317- 332-335-411	210-261-273-280
<i>n</i> -Butyllithium	Gefahr	225-250-304-314-336-	210-222-231-261-273-422

		361-373-411	
3-Brompropionsäure	Gefahr	260-301+310- 303+361+353	305+351+338-405-501
Celite	Achtung	373	260-314-501
Cer(IV)sulfat	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Cetyltrimethyl- ammoniumbromid	Gefahr	302-315-318-335-400	261-273-280- 305+351+338
Chloroform	Achtung	302-315-351-373	302+352-314
Cyclohexan	Gefahr	225-304-315-336-410	210-240-273-301+310- 331-403+235
Dichlormethan	Achtung	351	281-308+313
Diethylether	Gefahr	224-302-336	210-240-403+235
3,4-Dihydroxybenzoe- säure	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Dimethylformamid	Gefahr	360D-226-332-312-319	201-302+352- 305+351+338-308+313
Dimethylsulfoxid	Achtung	277	-
Dinatriumhydrogen- phosphat	-	-	-
1,4-Dioxan	Gefahr	225-351-319-335	210-261-281- 305+351+338
Dicyclohexyl- carbodiimid	Gefahr	311-302-318-317	280-305+351+338
4-(Dimethylamino)-	Gefahr	310-301-315-319	302+352-305+351+338
Di- <i>tert</i> - Butyldicarbonat	Gefahr	226-330-315-319-317	210-280-309-310- 304+340-305+351+338- 302+352
Dopaminhydrochlorid	Achtung	302-400	273
Eisen(III)chlorid	Gefahr	302-315-318-290	280-302+352- 305+351+338-313
Ethylacetat	Gefahr	225-319-336	210-240-305+351+338
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> '-(3- dimethylamino- propyl)carbodiimid	Gefahr	314	280-305+351+338-310
Formaldehyd	Gefahr	351-331-311-301-314-317	301+310-303+361+353- 305+351+338-320-361- 405-501

N-Cbz-Glycin	-	-	-
1-Hydroxybenzo- triazol	Gefahr	203	370+380-501
2-(4-(2-	-	-	-
Hydroxyethyl)-1-			
piperazinyl)-			
ethansulfonsäure			
/v-Hydroxysuccinimid	-	-	-
Kaliumbromid	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Kaliumcarbonat	Achtung	315-319-335	302+352-305+351+338
Kaliumchlorid	-	-	-
Kaliumhydrogen- carbonat	-	-	-
Kaliumdihydrogen-	-	-	-
phosphat			
Kaliumhydrogensulfat	Gefahr	314-335	280-301+330+331- 305+351+338-309-310
Kaliumsulfat	-	-	-
Kupfersulfat	Achtung	302-319-315-410	273-305+351+338- 302+352
Lithiumhydroxid	Gefahr	301+331-314	261-280-305+351+338- 301+310
Methacrylolylchlorid	Gefahr	300-310-315-318-330	260-264-280-284- 302+350-305+351+338
Methanol	Gefahr	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
Mesylchlorid	Gefahr	300-310-315-318-330	260-264-280-284- 302+350-305+351+338
Methyl-1,3-butadien-	Achtung	226-315-319-335	261-305+351+338
Nitroethan	Gefahr	226-332-302	262-210
Nitromethan	Achtung	226-302	210
Molybdatophosphor-	Gefahr	272-314	220-280-305+351+338-
säure			310
4-Morpholinopropan- sulfonsäure	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Ninhydrin	Achtung	302-315-319-335	261-305+351+338
Natriumazid	Gefahr	300-400-410	273-309-310
Natriumascorbat	-	-	-
Natriumborhydrid	Gefahr	260-301-311-314	280-301+330+331- 302+352-305+351+338-

			402+404
Natriumhydrogen- carbonat	-	-	-
Natriumsulfat	-	-	-
Oxalylchlorid	Gefahr	331-335-314	309+310-304+340- 301+330+331
5-10mol% Palladium/Aktivkohle	-	-	-
Pentinsäure	Gefahr	314	280-305+351+338-310
Petrolether 50-70	Gefahr	225-304-315-336-361- 373-411	210-261-273-281- 301+310-331
Propiolsäure	Gefahr	226-301-314-335	280-301+330+331- 305+351+338-304+340
Pyridin	Gefahr	225-332-312-302	210-233-302+352
Raney-Nickel	Gefahr	228-317-351	210-280
Salzsäure (konz.)	Gefahr	314-335	260-301+330+331- 303+361+353-305 +351+338-405-501
Schwefelsäure (konz.)	Gefahr	314	280-301+330+331-309- 310-305+351+338
Thionylchlorid	Gefahr	332-302-314	280-305+351+338-310
Tetraethylenglycol	-	-	-
Tetrahydrofuran	Gefahr	225-319-335-351	210-233-243- 305+351+338
Titanchlorid	Gefahr	250-314	222-231-280- 305+351+338-310-422
Titandioxid- Nanopartikel (P25)	-	-	-
Triethylamin	Gefahr	225-331-311-302-314	210-280-303+361+353- 305+351+338-310-312
Trifluoressigsäure	Gefahr	332-314-412	271-273-301+330+331- 305+351+338-309+310
Triphenylphosphin	Achtung	302-317-413	262-273-280-302+352
Vanillin	Achtung	302	264-301+312-330-501
Wasserstoff	Gefahr	220-280	210-377-381-403
Wasserstoffperoxid	Gefahr	271-332-302-314	220-261-280- 305+351+338-310

# **10** LITERATUR

- (1) Huebsch, N.; Mooney, D. J. *Nature* **2009**, *462*, 426.
- (2) Hench, L. *Science* **1980**, *208*, 826.
- Variola, F.; Vetrone, F.; Richert, L.; Jedrzejowski, P.; Yi, J. H.; Zalzal, S.; Clair, S.;
  Sarkissian, A.; Perepichka, D. F.; Wuest, J. D.; Rosei, F.; Nanci, A. Small 2009, 5, 996.
- (4) Meyers, S. R.; Grinstaff, M. W. Chem. Rev. 2012, 112, 1615.
- (5) Balazic, M.; Kopac, J.; Jackson, M. J.; Ahmed, W. Int. J. Nano Biomat. 2007, 1, 3.
- (6) http://www.welt.de/gesundheit/article8315256/So-gefaehrlich-koennen-Titan-Implantate-sein.html (08.04.2013).
- (7) Bryers, J. D. Biotechnol. Bioeng. 2008, 100, 1.
- (8) Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; Marrie, T. J. *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 435.
- (9) Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. Adv. Mater. 2011, 23, 690.
- (10) Falk, M. H.; Issels, R. D. Int. J. Hyperther. 2001, 17, 1.
- (11) Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. J. Biosci. Bioeng. 2005, 100, 1.
- (12) Huber, D. L. Small **2005**, *1*, 482.
- (13) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fahling, H.; Felix, R. J. Magn. Magn. Mater. **1999**, 201, 413.
- (14) Cho, K. J.; Wang, X.; Nie, S. M.; Chen, Z.; Shin, D. M. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310.
- (15) Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Angew. Chem. Int. Edit. 2009, 48, 872.
- (16) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103.
- (17) Blaszykowski, C.; Sheikh, S.; Thompson, M. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 5599.
- (18) http://www.dradio.de/dkultur/sendungen/wissenschaft/1904328/ (08.04.2013).
- (19) Fey, P. D. Curr. Opin. Microbiol. 2010, 13, 610.
- (20) Otto, M. Nat. Rev. Microbiol. 2009, 7, 555.
- (21) Boles, B. R.; Horswill, A. R. Trends Microbiol. 2011, 19, 449.
- (22) Gristina, A. G. Science 1987, 237, 1588.
- (23) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Science 1999, 284, 1318.
- (24) Zimmerli, W.; Lew, P. D.; Waldvogel, F. A. J. Clin. Invest. 1984, 73, 1191.
- (25) Sutherland, I. W. Trends Microbiol. 2001, 9, 222.

- (26) Flemming, H. C.; Wingender, J. Nat. Rev. Microbiol. 2010, 8, 623.
- (27) Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Nat. Rev. Microbiol. 2004, 2, 95.
- (28) O'Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. Annu. Rev. Microbiol. 2000, 54, 49.
- (29) Patti, J. M.; Allen, B. L.; McGavin, M. J.; Hook, M. Annu. Rev. Microbiol. **1994**, 48, 585.
- (30) Camilli, A.; Bassler, B. L. *Science* **2006**, *311*, 1113.
- (31) Davies, D. G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P. *Science* **1998**, 280, 295.
- (32) Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Annu. Rev. Microbiol. 2002, 56, 187.
- (33) Stewart, P. S.; Franklin, M. J. Nat. Rev. Microbiol. 2008, 6, 199.
- (34) McDougald, D.; Rice, S. A.; Barraud, N.; Steinberg, P. D.; Kjelleberg, S. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 39.
- (35) Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. Nat. Rev. Microbiol. 2010, 8, 423.
- (36) Stewart, P. S. Int. J. Med. Microbiol. 2002, 292, 107.
- (37) Stewart, P. S.; Costerton, J. W. Lancet 2001, 358, 135.
- (38) Davies, D. Nat. Rev. Drug Discov. 2003, 2, 114.
- (39) Lewis, K. Nat. Rev. Microbiol. 2007, 5, 48.
- (40) Tuomanen, E.; Cozens, R.; Tosch, W.; Zak, O.; Tomasz, A. J. Gen. Microbiol. 1986, 132, 1297.
- (41) Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. Chem. Soc. Rev. 2006, 35, 780.
- (42) Sambhy, V.; MacBride, M. M.; Peterson, B. R.; Sen, A. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 9798.
- (43) Grainger, D. W. Expert Opin. Biol. Ther. 2004, 4, 1029.
- (44) Luckarift, H. R.; Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Spain, J. C. Small 2006, 2, 640.
- (45) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 10714.
- (46) Rana, D.; Matsuura, T. Chem. Rev. 2010, 110, 2448.
- (47) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. Science 1991, 252, 1164.
- (48) Bearinger, J. P.; Terrettaz, S.; Michel, R.; Tirelli, N.; Vogel, H.; Textor, M.; Hubbell, J. A. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 259.
- (49) Amiji, M.; Park, K. J. Biomat. Sci.-Polym. Ed. 1993, 4, 217.
- (50) Morra, M.; Cassineli, C. J. Biomat. Sci.-Polym. Ed. 1999, 10, 1107.
- (51) Holland, N. B.; Ruegsegger, M.; Marchant, R. E. Langmuir 1998, 14, 2790.
- (52) Perrino, C.; Lee, S.; Choi, S. W.; Maruyama, A.; Spencer, N. D. *Langmuir* **2008**, *24*, 8850.
- (53) Konradi, R.; Pidhatika, B.; Muhlebach, A.; Textort, M. Langmuir 2008, 24, 613.

- (54) Rovira-Bru, M.; Giralt, F.; Cohen, Y. J. Colloid Interf. Sci. 2001, 235, 70.
- (55) Cringus-Fundeanu, I.; Luijten, J.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J.; Schouten, A. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 5120.
- (56) Zhang, Z.; Chao, T.; Chen, S. F.; Jiang, S. Y. *Langmuir* **2006**, *22*, 10072.
- (57) Jeon, S. I.; Andrade, J. D. J. Colloid Interf. Sci. 1991, 142, 159.
- (58) Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; Degennes, P. G. *J. Colloid Interf. Sci.* **1991**, *142*, 149.
- (59) Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Liang, M. N.; Meluleni, G.; Pier, G.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 6336.
- (60) Szleifer, I. Biophys. J. 1997, 72, 595.
- (61) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Nat. Rev. Cancer 2008, 8, 473.
- (62) Hambley, T. W. Cancer Res. 2009, 69, 1259.
- (63) Cherukuri, P.; Glazer, E. S.; Curleya, S. A. Adv. Drug Deliver. Rev. 2010, 62, 339.
- (64) Issels, R. D. Eur. J. Cancer 2008, 44, 2546.
- (65) Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. J. Mater. Chem. 2004, 14, 2161.
- (66) Jordan, A.; Scholz, R.; Maier-Hauff, K.; Johannsen, M.; Wust, P.; Nadobny, J.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Deger, S.; Loening, S.; Lanksch, W.; Felix, R. J. Magn. Magn. Mater. 2001, 225, 118.
- (67) Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 249.
- (68) Milani, V.; Noessner, E.; Ghose, S.; Kuppner, M.; Ahrens, B.; Scharner, A.; Gastpar, R.; Issels, R. D. Int. J. Hyperther. 2002, 18, 563.
- (69) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Angew. Chem. Int. Edit. 2007, 46, 1222.
- (70) Goya, G. F.; Grazu, V.; Ibarra, M. R. Curr. Nanosci. 2008, 4, 1.
- (71) de la Presa, P.; Luengo, Y.; Multigner, M.; Costo, R.; Morales, M. P.; Rivero, G.; Hernando, A. J. Phys. Chem. C 2012, 116, 25602.
- (72) Liu, X. L.; Fan, H. M.; Yi, J. B.; Yang, Y.; Choo, E. S. G.; Xue, J. M.; Di Fan, D.; Ding, J. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8235.
- (73) Hergt, R.; Dutz, S.; Muller, R.; Zeisberger, M. J. Phys.-Condens. Mat. 2006, 18, S2919.
- (74) Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrott, J. C.; Taylor, C. B. Ann. Surg. 1957, 146, 596.
- (75) Gordon, R. T.; Hines, J. R.; Gordon, D. Med. Hypotheses 1979, 5, 83.
- (76) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. J. Control. Release 2000, 65, 271.
- (77) Fenoglio, I.; Fubini, B.; Ghibaudi, E. M.; Turci, F. Adv. Drug Deliver. Rev. 2011, 63, 1186.
- (78) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 2780.

- (79) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H. B.; Emili, A.; Chan, W. C. W. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 2139.
- (80) Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
- (81) Shinkai, M.; Yanase, M.; Suzuki, M.; Honda, H.; Wakabayashi, T.; Yoshida, J.; Kobayashi, T. J. Magn. Magn. Mater. **1999**, 194, 176.
- (82) Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. Angew. Chem. Int. Edit. 2011, 50, 1980.
- (83) Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Nat. Rev. Cancer 2005, 5, 65.
- (84) Heston, W. D. W. Urol.-Ausg. A **1996**, 35, 400.
- (85) Schulke, N.; Varlamova, O. A.; Donovan, G. P.; Ma, D. S.; Gardner, J. P.; Morrissey, D. M.; Arrigale, R. R.; Zhan, C. C.; Chodera, A. J.; Surowitz, K. G.; Maddon, P. J.; Heston, W. D. W.; Olson, W. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 12590.
- (86) Zhou, J.; Neale, J. H.; Pomper, M. G.; Kozikowski, A. P. Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4, 1015.
- (87) Israeli, R. S.; Powell, C. T.; Corr, J. G.; Fair, W. R.; Heston, W. D. W. Cancer Res. 1994, 54, 1807.
- (88) Gillich, T. Dissertation, Zürich, 2012.
- (89) Wach, J. Y.; Malisova, B.; Bonazzi, S.; Tosatti, S.; Textor, M.; Zürcher, S.; Gademann, K. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 10579.
- (90) Norde, W.; Gage, D. *Langmuir* **2004**, *20*, 4162.
- (91) Kenausis, G. L.; Voros, J.; Elbert, D. L.; Huang, N. P.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3298.
- (92) Ulman, A. Chem. Rev. 1996, 96, 1533.
- (93) Troughton, E. B.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G.; Allara, D. L.; Porter, M. D. *Langmuir* 1988, 4, 365.
- (94) Daniel, M. C.; Astruc, D. Chem. Rev. 2004, 104, 293.
- (95) Chaudhury, M. K.; Whitesides, G. M. Science 1992, 255, 1230.
- (96) Basabe-Desmonts, L.; Beld, J.; Zimmerman, R. S.; Hernando, J.; Mela, P.; Garcia-Parajo, M. F.; van Hulst, N. F.; van den Berg, A.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7293.
- (97) Marcinko, S.; Fadeev, A. Y. Langmuir 2004, 20, 2270.
- (98) Tosatti, S.; Michel, R.; Textor, M.; Spencer, N. D. Langmuir 2002, 18, 3537.
- (99) Spori, D. M.; Venkataraman, N. V.; Tosatti, S. G. P.; Durmaz, F.; Spencer, N. D.; Zürcher, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 8053.
- (100) Schwemmer, T.; Baumgartner, J.; Faivre, D.; Borner, H. G. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 2385.
- (101) Ye, Q.; Zhou, F.; Liu, W. M. Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 4244.

- (102) Brubaker, C. E.; Messersmith, P. B. Langmuir 2012, 28, 2200.
- (103) Sedo, J.; Saiz-Poseu, J.; Busque, F.; Ruiz-Molina, D. Adv. Mater. 2013, 25, 653.
- (104) Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. BioMetals 2002, 15, 325.
- (105) Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 3584.
- (106) Loomis, L. D.; Raymond, K. N. Inorg. Chem. 1991, 30, 906.
- (107) Upritchard, H. G.; Yang, J.; Bremer, P. J.; Lamont, I. L.; McQuillan, A. J. *Langmuir* **2007**, *23*, 7189.
- (108) McWhirter, M. J.; Bremer, P. J.; Lamont, I. L.; McQuillan, A. J. *Langmuir* **2003**, *19*, 3575.
- (109) Gademann, K.; Bethuel, Y. Org. Lett. 2004, 6, 4707.
- (110) Gademann, K.; Bethuel, Y. Angew. Chem. Int. Edit. 2004, 43, 3327.
- (111) Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 12999.
- (112) Silverman, H. G.; Roberto, F. F. Mar. Biotechnol. 2007, 9, 661.
- (113) Lee, D. E.; Koo, H.; Sun, I. C.; Ryu, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656.
- (114) Waite, J. H.; Tanzer, M. L. Science 1981, 212, 1038.
- (115) Waite, J. H. Int. J. Adhes. Adhes. 1987, 7, 9.
- (116) Waite, J. H. J. Biol. Chem. 1983, 258, 2911.
- (117) Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B. *Mater. Today* **2005**, *8*, 38.
- (118) Sever, M. J.; Weisser, J. T.; Monahan, J.; Srinivasan, S.; Wilker, J. J. Angew. Chem. Int. Edit. 2004, 43, 448.
- (119) Deming, T. J. Curr. Opin. Chem. Biol. 1999, 3, 100.
- (120) Yu, M. E.; Hwang, J. Y.; Deming, T. J. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 5825.
- (121) Harrington, M. J.; Masic, A.; Holten-Andersen, N.; Waite, J. H.; Fratzl, P. *Science* **2010**, *328*, 216.
- (122) Wilker, J. J. Angew. Chem. Int. Edit. 2010, 49, 8076.
- (123) Messersmith, P. B. Science 2010, 328, 180.
- (124) Holten-Andersen, N.; Fantner, G. E.; Hohlbauch, S.; Waite, J. H.; Zok, F. W. Nat. Mater. 2007, 6, 669.
- (125) Holten-Andersen, N.; Mates, T. E.; Toprak, M. S.; Stucky, G. D.; Zok, F. W.; Waite, J. H. *Langmuir* 2009, 25, 3323.
- (126) Lee, B. P.; Messersmith, P. B.; Israelachvili, J. N.; Waite, J. H. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 99.
- (127) Oregan, B.; Grätzel, M. Nature 1991, 353, 737.

- (128) Hagfeldt, A.; Boschloo, G.; Sun, L. C.; Kloo, L.; Pettersson, H. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6595.
- (129) Bach, U.; Daeneke, T. Angew. Chem. Int. Edit. 2012, 51, 10451.
- (130) Rice, C. R.; Ward, M. D.; Nazeeruddin, M. K.; Grätzel, M. New J. Chem. 2000, 24, 651.
- (131) Duncan, W. R.; Prezhdo, O. V. Annu. Rev. Phys. Chem. 2007, 58, 143.
- (132) Zhang, A.; Neumeyer, J. L.; Baldessarini, R. J. Chem. Rev. 2007, 107, 274.
- (133) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Science 2007, 318, 426.
- (134) Waite, J. H. Nat. Mater. 2008, 7, 8.
- (135) Zürcher, S.; Wackerlin, D.; Bethuel, Y.; Malisova, B.; Textor, M.; Tosatti, S.; Gademann, K. J. Am. Chem. Soc. **2006**, *128*, 1064.
- (136) Statz, A. R.; Meagher, R. J.; Barron, A. E.; Messersmith, P. B. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 7972.
- (137) Dalsin, J. L.; Lin, L. J.; Tosatti, S.; Voros, J.; Textor, M.; Messersmith, P. B. *Langmuir* **2005**, *21*, 640.
- (138) Lee, B. P.; Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1038.
- (139) Saxer, S.; Portmann, C.; Tosatti, S.; Gademann, K.; Zürcher, S.; Textor, M. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1050.
- (140) Xu, C. J.; Xu, K. M.; Gu, H. W.; Zheng, R. K.; Liu, H.; Zhang, X. X.; Guo, Z. H.; Xu, B. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 9938.
- (141) Balivada, S.; Rachakatla, R. S.; Wang, H. W.; Samarakoon, T. N.; Dani, R. K.; Pyle, M.; Kroh, F. O.; Walker, B.; Leaym, X.; Koper, O. B.; Tamura, M.; Chikan, V.; Bossmann, S. H.; Troyer, D. L. *BMC Cancer* 2010, *10*.
- (142) Rachakatla, R. S.; Balivada, S.; Seo, G. M.; Myers, C. B.; Wang, H. W.; Samarakoon, T. N.; Dani, R.; Pyle, M.; Kroh, F. O.; Walker, B.; Leaym, X. X.; Koper, O. B.; Chikan, V.; Bossmann, S. H.; Tamura, M.; Troyer, D. L. ACS Nano 2010, 4, 7093.
- (143) Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksch, B.; Dernedde, J.; Graf, C.; Knapp, E.-W.; Haag, R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2012**, *51*, 10472.
- (144) Wu, K. S.; Liu, J. H.; Johnson, R. N.; Yang, J. Y.; Kopecek, J. Angew. Chem. Int. Edit. 2010, 49, 1451.
- (145) Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Chem. Soc. Rev. 2004, 33, 43.
- (146) Zhou, H. C.; Baldini, L.; Hong, J.; Wilson, A. J.; Hamilton, A. D. J. Am. Chem. Soc. **2006**, *128*, 2421.
- (147) Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. Chem. Soc. Rev. 2007, 36, 254.
- (148) Martos, V.; Castreno, P.; Valero, J.; de Mendoza, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 698.
- (149) Pannier, N.; Maison, W. Eur. J. Org. Chem. 2008, 1278.
- (150) Nasr, K.; Pannier, N.; Frangioni, J. V.; Maison, W. J. Org. Chem. 2008, 73, 1056.

- (151) Maison, W.; Frangioni, J. V.; Pannier, N. Org. Lett. 2004, 6, 4567.
- (152) Misra, P.; Humblet, V.; Pannier, N.; Maison, W.; Frangioni, J. V. J. Nucl. Med. 2007, 48, 1379.
- (153) Humblet, V.; Misra, P.; Bhushan, K. R.; Nasr, K.; Ko, Y. S.; Tsukamoto, T.; Pannier, N.; Frangioni, J. V.; Maison, W. J. Med. Chem. **2009**, *52*, 544.
- (154) Newkome, G. R.; Shreiner, C. Chem. Rev. 2010, 110, 6338.
- (155) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. Synthesis 1978, 1978, 155.
- (156) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- (157) Bosman, A. W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. Chem. Rev. 1999, 99, 1665.
- (158) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 7638.
- (159) Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. Polymer 2008, 49, 1.
- (160) Heidecke, C. D.; Lindhorst, T. K. Chem.-Eur. J. 2007, 13, 9056.
- (161) Haag, R.; Kratz, F. Angew. Chem. Int. Edit. 2006, 45, 1198.
- (162) Medina, S. H.; El-Sayed, M. E. H. Chem. Rev. 2009, 109, 3141.
- (163) Twyman, L. J.; King, A. S. H.; Martin, I. K. Chem. Soc. Rev. 2002, 31, 69.
- (164) Newkome, G. R.; Behera, R. K.; Moorefield, C. N.; Baker, G. R. J. Org. Chem. **1991**, 56, 7162.
- (165) Schröter, R. Angew. Chem. 1941, 54, 229.
- (166) Dominguez, X.; Lopez, I. C.; Franco, R. J. Org. Chem. 1961, 26, 1625.
- (167) Ballut, S.; Makky, A.; Loock, B.; Michel, J. P.; Maillard, P.; Rosilio, V. Chem. Commun. 2009, 224.
- (168) Huisgen, R. Angew. Chem. Int. Edit. 1963, 2, 565.
- (169) Kleinert, M.; Winkler, T.; Terfort, A.; Lindhorst, T. K. Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 2118.
- (170) Newkome, G. R.; Kotta, K. K.; Moorefield, C. N. J. Org. Chem. 2005, 70, 4893.
- (171) Zhou, T.; Le Kong, X.; Liu, Z. D.; Liu, D. Y.; Hider, R. C. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1372.
- (172) Idoux, J. P.; Ghane, H. J. Chem. Eng. Data 1979, 24, 157.
- (173) Takeda, K.; Akiyama, A.; Nakamura, H.; Takizawa, S.; Mizuno, Y.; Takayanagi, H.; Harigaya, Y. *Synthesis* **1994**, 1063.
- (174) Newkome, G. R.; He, E.; Godinez, L. A.; Baker, G. R. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 9993.
- (175) Bruson, H. A.; Riener, T. W. J. Am. Chem. Soc. 1943, 65, 23.
- (176) Brown, H. C.; Rao, B. C. S. J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 681.

- (177) Young, J. K.; Baker, G. R.; Newkome, G. R.; Morris, K. F.; Johnson, C. S. *Macromolecules* **1994**, *27*, 3464.
- (178) Goyal, P.; Yoon, K.; Weck, M. Chem.-Eur. J. 2007, 13, 8801.
- (179) Braun, M.; Mroß, S.; Schwarz, I. Synthesis **1998**, 1998, 83.
- (180) Quibell, M.; Benn, A.; Flinn, N.; Monk, T.; Ramjee, M.; Ray, P.; Wang, Y. K.; Watts, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 609.
- (181) Hawker, C. J.; Wooley, K. L. Science 2005, 309, 1200.
- (182) Lutz, J.-F. Angew. Chem. Int. Edit. 2007, 46, 1018.
- (183) Astruc, D.; Liang, L. Y.; Rapakousiou, A.; Ruiz, J. Acc. Chem. Res. 2012, 45, 630.
- (184) Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Chem. Rev. 2009, 109, 4207.
- (185) Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Angew. Chem. Int. Edit. 2011, 50, 8794.
- (186) Hein, C. D.; Liu, X. M.; Wang, D. Pharm. Res. 2008, 25, 2216.
- (187) Beal, D. M.; Jones, L. H. Angew. Chem. Int. Edit. 2012, 51, 6320.
- (188) Sun, E. Y.; Josephson, L.; Weissleder, R. Mol. Imaging 2006, 5, 122.
- (189) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. Chem. Soc. Rev. 2007, 36, 1249.
- (190) Binder, W. H.; Kluger, C. Curr. Org. Chem. 2006, 10, 1791.
- (191) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Edit. 2002, 41, 2596.
- (192) Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. J. Org. Chem. 2002, 67, 3057.
- (193) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Angew. Chem. Int. Edit. 2001, 40, 2004.
- (194) Meldal, M.; Tornoe, C. W. Chem. Rev. 2008, 108, 2952.
- (195) Siegers, C.; Biesalski, M.; Haag, R. Chem.-Eur. J. 2004, 10, 2831.
- (196) Watson, M. A.; Lyskawa, J.; Zobrist, C.; Fournier, D.; Jimenez, M.; Traisnel, M.; Gengembre, L.; Woisel, P. *Langmuir* 2010, 26, 15920.
- (197) Devaraj, N. K.; Miller, G. P.; Ebina, W.; Kakaradov, B.; Collman, J. P.; Kool, E. T.; Chidsey, C. E. D. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 8600.
- (198) Goldmann, A. S.; Schodel, C.; Walther, A.; Yuan, J. Y.; Loos, K.; Muller, A. H. E. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1608.
- (199) Grandjean, C.; Boutonnier, A.; Guerreiro, C.; Fournier, J. M.; Mulard, L. A. J. Org. *Chem.* **2005**, *70*, 7123.
- (200) Küchenthal, C. H.; Maison, W. ChemBioChem 2010, 11, 1052.
- (201) Küchenthal, C. H.; Migenda, J.; Polednia, M.; Maison, W. Amino Acids 2010, 39, 443.
- (202) Pang, C. L.; Lindsay, R.; Thornton, G. Chem. Soc. Rev. 2008, 37, 2328.
- (203) Ramamoorthy, M.; King-Smith, R. D.; Vanderbilt, D. Phys. Rev. B 1994, 49, 7709.
- (204) Sun, C. H.; Liu, L. M.; Selloni, A.; Lu, G. Q.; Smith, S. C. J. Mater. Chem. 2010, 20, 10319.

- (205) Malisova, B.; Tosatti, S.; Textor, M.; Gademann, K.; Zürcher, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 4018.
- (206) Lana-Villarreal, T.; Rodes, A.; Perez, J. M.; Gomez, R. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 12601.
- (207) Moser, J.; Punchihewa, S.; Infelta, P. P.; Grätzel, M. Langmuir 1991, 7, 3012.
- (208) Rajh, T.; Chen, L. X.; Lukas, K.; Liu, T.; Thurnauer, M. C.; Tiede, D. M. J. Phys. Chem. B 2002, 106, 10543.
- (209) Li, S. C.; Wang, J. G.; Jacobson, P.; Gong, X. Q.; Selloni, A.; Diebold, U. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 980.
- (210) Terranova, U.; Bowler, D. R. J. Phys. Chem. C 2010, 114, 6491.
- (211) Borgias, B. A.; Cooper, S. R.; Koh, Y. B.; Raymond, K. N. Inorg. Chem. 1984, 23, 1009.
- (212) Macyk, W.; Szaciłowski, K.; Stochel, G.; Buchalska, M.; Kuncewicz, J.; Łabuz, P. Coord. Chem. Rev. 2010, 254, 2687.
- (213) Thomas, A. G.; Syres, K. L. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 4207.
- (214) Chen, Q.; Jia, Y. Y.; Liu, S. B.; Mogilevsky, G.; Kleinhammes, A.; Wu, Y. J. Phys. Chem. C 2008, 112, 17331.
- (215) Rodenstein, M.; Zürcher, S.; Tosatti, S. G. P.; Spencer, N. D. Langmuir 2010, 26, 16211.
- (216) Chen, Q.; Rondinone, A. J.; Chakoumakos, B. C.; Zhang, Z. J. J. Magn. Magn. Mater. **1999**, 194, 1.
- (217) Shevchenko, E. V.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 11480.
- (218) Carpenter, E. E.; Sims, J. A.; Wienmann, J. A.; Zhou, W. L.; O'Connor, C. J. J. Appl. *Phys.* **2000**, *87*, 5615.
- (219) Zhang, G. D.; Liao, Y. F.; Baker, I. Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl. 2010, 30, 92.
- (220) Albornoz, C.; Jacobo, S. E. J. Magn. Magn. Mater. 2006, 305, 12.
- (221) Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 17, 1247.
- (222) Wang, X.; Zhuang, J.; Peng, Q.; Li, Y. *Nature* **2005**, *437*, 121.
- (223) Peng, S.; Wang, C.; Xie, J.; Sun, S. H. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 10676.
- (224) Dwars, T.; Paetzold, E.; Oehme, G. Angew. Chem. Int. Edit. 2005, 44, 7174.
- (225) Bautista, M. C.; Bomati-Miguel, O.; Morales, M. D.; Serna, C. J.; Veintemillas-Verdaguer, S. J. Magn. Magn. Mater. 2005, 293, 20.
- (226) Dresco, P. A.; Zaitsev, V. S.; Gambino, R. J.; Chu, B. Langmuir 1999, 15, 1945.
- (227) Sobal, N. S.; Hilgendorff, M.; Mohwald, H.; Giersig, M.; Spasova, M.; Radetic, T.; Farle, M. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 621.
- (228) Chen, M.; Yamamuro, S.; Farrell, D.; Majetich, S. A. J. Appl. Phys. 2003, 93, 7551.

- (229) Palchoudhury, S.; Xu, Y. L.; Goodwin, J.; Bao, Y. P. J. Mater. Chem. 2011, 21, 3966.
- (230) Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T. Angew. Chem. Int. Edit. 2008, 47, 8438.
- (231) Lu, A. H.; Li, W. C.; Matoussevitch, N.; Spliethoff, B.; Bonnemann, H.; Schüth, F. *Chem. Commun.* 2005, 98.
- (232) Katz, E.; Willner, I. Angew. Chem. Int. Edit. 2004, 43, 6042.
- (233) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064.
- (234) Georgelin, T.; Bombard, S.; Siaugue, J. M.; Cabuil, V. Angew. Chem. Int. Edit. 2010, 49, 8897.
- (235) Tromsdorf, U. I.; Bruns, O. T.; Salmen, S. C.; Beisiegel, U.; Weller, H. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4434.
- (236) Amstad, E.; Zürcher, S.; Mashaghi, A.; Wong, J. Y.; Textor, M.; Reimhult, E. *Small* **2009**, *5*, 1334.
- (237) Glavee, G. N.; Klabunde, K. J.; Sorensen, C. M.; Hadjipanayis, G. C. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 28.
- (238) Kingshott, P.; Thissen, H.; Griesser, H. J. Biomaterials 2002, 23, 2043.
- (239) Rodgers, K. J.; Dean, R. T. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000, 32, 945.
- (240) Queffélec, C.; Petit, M.; Janvier, P.; Knight, D. A.; Bujoli, B. Chem. Rev. 2012, 112, 3777.
- (241) Ferris, D. M.; Moodie, G. D.; Dimond, P. M.; Gioranni, C. W. D.; Ehrlich, M. G.; Valentini, R. F. *Biomaterials* 1999, 20, 2323.
- (242) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. J. Org. Chem. 1997, 62, 7512.
- (243) Schwuger, M. J. *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1996**.
- (244) De Souza, R. A.; Martin, M. Bunsen Magazin 2006, 8.
- (245) Wang, H. Thesis, Kansas State University, 2009.

# **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

# "Synthese biomimetischer Triscatechole für die stabile

## chemische Immobilisierung von Metalloberflächen"

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt und die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den\_\_\_\_\_

Unterschrift