

Entwicklung Polysaccharid-basierter Materialien für biomedizinische Anwendungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Pascal Lienig, M. Sc.

2024

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Marie Weinhart

Tag der Promotion: 26.03.2024

Kurzzusammenfassung

Pascal Lienig

Entwicklung neuer Polysaccharid-basierter Hydrogele für biomedizinische Anwendungen

Schlagworte: Hydrogel, Polysaccharid, Dextran, Pullulan, Lentinan, Thiol-Michael-Reaktion

Hydrogele auf Basis natürlicher Polymere bieten aufgrund ihrer Biokompatibilität gute Voraussetzungen für die Anwendung im Bereich der regenerativen Medizin. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigten vielversprechende Ergebnisse im *Tissue Engineering*. Aber auch im Bereich der gezielten Wirkstofffreisetzung sowie in der dreidimensionalen Zellkultivierung zeigen sich Hydrogele als interessante Kandidaten.

Diese Arbeit befasst sich mit der chemischen Modifizierung von verschiedenen Polysacchariden wie Dextran, Pullulan und Lentinan zur Erzeugung biomedizinisch relevanter Hydrogele. Als Vernetzungsmethode wurde die Thiol-Michael-Reaktion ausgewählt. Um aus den Polysacchariden die erforderlichen Akzeptor- und Donator-komponenten herzustellen, wurden diese im ersten Schritt erfolgreich carboxymethyliert. Anschließend erfolgte die Überführung in die Thiol-modifizierten Komponenten. Um den Einfluss der Kettenlänge auf die Eigenschaften der Hydrogele zu untersuchen, wurden Linker verschiedener Längen synthetisiert. Des Weiteren wurden zwei Akzeptorgruppen gewählt. Zum einen wurden die carboxymethylierten Polysaccharide in ihre Maleinimid-Derivate überführt, zum anderen erfolgte eine Derivatisierung zur Vinylsulfon-modifizierten Komponente. Die synthetisierten Komponenten wurden mit Hilfe von volumetrischen und fotometrischen Methoden auf ihre Derivatisierungsgrade sowie NMR-spektroskopisch untersucht. Außerdem erfolgte die Charakterisierung der generierten Hydrogele. Die Hydrogele wurden auf ihre Permeabilität, ihren rheologischen Eigenschaften und ihrem Quellverhalten untersucht. Weiterhin wurden Experimente zum enzymatischen Abbau und Studien zur Zytotoxizität der einzelnen Komponenten sowie zur Einbettung von unterschiedlichen Zellen in ausgewählten Hydrogelkombinationen durchgeführt.

Abstract

Pascal Lienig

Development of new polysaccharide based hydrogels for biomedical applications

Keyword: hydrogel, polysaccharide, dextran, pullulan, lentinan, thiol-Michael-reaction

Hydrogels based on natural polymers offer good prerequisites for application in the field of regenerative medicine due to their biocompatibility. A large number of studies have shown promising results in tissue engineering. But also in the field of targeted drug release as well as in three-dimensional cell cultivation, hydrogels appear to be interesting candidates.

This work deals with the chemical modification of different polysaccharides such as dextran, pullulan and lentinan to generate biomedically relevant hydrogels. The thiol-Michael reaction was chosen as crosslinking method. In order to produce the required acceptor and donor components from the polysaccharides, they were successfully carboxymethylated in the first step. This was followed by conversion to the thiol-modified components. Linkers of different lengths were synthesized to investigate the effect of chain length on the properties of the hydrogels. Furthermore, two acceptor groups were chosen. First, the carboxymethylated polysaccharides were transferred to their maleimide derivatives, and second, derivatization to the vinyl sulfone-modified component was carried out. The synthesized components were analyzed for their degrees of derivatization by volumetric and photometric methods and NMR spectroscopically. Furthermore, the generated hydrogels were characterized. They were investigated for their permeability, rheological properties and swelling behaviour. Furthermore, experiments on enzymatic degradation and studies on the cytotoxicity of the individual components as well as embedding of different cells in selected hydrogel combinations were carried out.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Biopolymere	1
1.2 Hydrogele	9
1.3 Biomedizinische Anwendungen von Hydrogelen	18
2 Zielsetzung	23
3 Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 Chemische Modifizierung der Polysaccharide	25
3.2 Darstellung und Untersuchungen von Hydrogelen	63
4 Zusammenfassung und Ausblick	89
4.1 Zusammenfassung	89
4.2 Ausblick	91
5 Experimenteller Teil	93
5.1 Allgemeines	93
5.2 Versuchsdurchführungen	95
5.3 Analysen	106
6 Literaturverzeichnis	111
7 Anhang	VIII
Danksagungen	XXXIII
Lebenslauf und Publikationsliste	XXXV

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Äq.	Äquivalente
β / β	Beta / Massenkonzentration $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ oder $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
BM	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-maleinimid
BMA	<i>N</i> -Maleinimidbutansäure
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CM	Carboxymethylierungsstufe
cRGDfK	<i>Cyclo</i> (-L-Arginin-Glycin-L-Asparaginsäure-D-Phenylalanin-L-Lysin)
CVS	Cysteaminvinylsulfon
d	Tage / Dublett (NMR)
δ	Phasenwinkel / chemische Verschiebung (NMR)
Δ	Unter Rückfluss erhitzen
<i>D</i>	Dispersitätsfaktor
DIPEA	<i>N,N</i> -Di- <i>iso</i> -propylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure / 3,5-Dinitrosalicylsäure
DS	Derivatisierungsgrad
DTBH	4,4'-Dithiobisbutansäuredihydrazid
DTEH	2,2'-Dithiobisethansäuredihydrazid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTPA	3,3'-Dithiobispropionsäure
DTPH	3,3'-Dithiobispropionsäuredihydrazid
DTT	Dithiotreitol
DVS	Divinylsulfon
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Fl	Fluorescein-modifiziert
γ	Deformation / Amplitude
G'	Speichermodul in Pa
G''	Verlustmodul in Pa
h	Stunde
HCF	Humane Kardiofibroblasten

HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
<i>i</i> PrOH	<i>iso</i> -Propanol
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
LDH	Laktasedehydrogenase
<i>M</i>	Mol·L ⁻¹
<i>m</i>	Probenmenge
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
<i>M</i> _{ME}	Molare Masse der monomeren Einheit
<i>M</i> _n	Zahlenmittel
<i>M</i> _w	Massenmittel
<i>n</i>	Stoffmenge
NG	Nachgebegrenze
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRK	Normal Rat Kidney Epithelial Cells (Ratten Nierenepithelialzellen)
Pa	Pascal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PM	<i>N</i> -(5-Aminopentyl)-maleinimid
ppm	<i>parts per million</i>
<i>R</i> _f	Retentionswert
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>t</i>	Zeit
TBH	4-Thiobutansäurehydrazid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TPA	3-Thioproionsäure-(3-Mercaptoproionsäure)
TPH	3-Thiopropansäurehydrazid
VS	Vinylsulfon
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz

1 Einleitung

In der Natur gibt es eine Vielzahl an Polysacchariden. Die beiden am häufigsten vorkommenden Polysaccharide sind Cellulose und Chitin. Cellulose ist der wichtigste Skelettbestandteil von Pflanzen und Chitin ist für den Aufbau der Panzer von Käfern und Krebstieren verantwortlich.^[1,2] In der heutigen Zeit sind natürliche Polymere wie Polysaccharide von wachsendem Interesse für biomedizinische Anwendungen.^[3] Eingesetzt werden sie z. B. als Ausgangsverbindungen für die Synthese von Hydrogelen.^[4] Hierbei handelt es sich um ein dreidimensionales Netzwerk aus hydrophilen Polymeren. Die Vernetzung der Polymere erfolgt dabei entweder durch physikalische oder kovalente Vernetzungsmethoden.^[5] Eine der ersten kommerziellen Anwendung von Hydrogelen wurde durch die Entwicklung von Kontaktlinsen aus Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) 1960 von WICHTERLE *et al.* beschrieben.^[6] Die heute überwiegend verwendeten weichen Kontaktlinsen bestehen aus Silikonhydrogelen.^[7] Eine sehr große Rolle spielen Hydrogele als künstliche extrazelluläre Matrix in der regenerativen Medizin bzw. dem *Tissue Engineering*.^[8] Hierbei wird z. B. künstliches Gewebe aus entnommenen Zellen gezüchtet, um dieses anschließend zu implantieren.^[9] Polysaccharide eignen sich aufgrund ihrer hohen Dichte an funktionellen Gruppen, die modifiziert werden können um z. B. die Biokompatibilität zu steigern, hervorragend zur Erzeugung dieser extrazellulären Matrix.^[8]

1.1 Biopolymere

Bei Biopolymeren handelt es sich um natürliche Makromoleküle, die innerhalb eines Organismus aus einzelnen Monomeren aufgebaut werden. Zu finden sind sie in Pflanzen und unterschiedlichen Lebewesen wie Bakterien und Pilzen.^[10] Die monomeren Einheiten bestehen z. B. aus Nukleotiden, Aminosäuren oder Zuckern.^[11] Basierend darauf lassen sie sich in die Klassen Polynukleotide, Polypeptide bzw. Proteine sowie Polysaccharide einteilen.

1.1.1 Polynukleotide

Polynukleotide bzw. Nukleinsäuren sind einzigartige Makromoleküle, die in allen Zellen und Viren in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS) zu finden sind. Die DNS liegt hierbei im Zellkern vor und die RNS im Zellplasma.^[12] Auf ihnen sind alle Merkmale eines Lebewesens festgelegt. Außerdem besteht die Funktion der DNS darin, die Anweisungen für die Zellen zu codieren, um unterschiedliche Proteine zu synthetisieren. Es gibt verschiedene Formen der RNS (*m*-RNS, *t*-RNA etc.) die alle notwendig zur Proteinbiosynthese der Zellen sind.^[10,13] Aufgebaut sind diese Polymere aus Nukleosiden, die aus einem Purin- oder Pyrimidinderivat (Stickstoffbase) und einer Desoxyribose bei der DNS, oder einer Ribose bei der RNS bestehen. Die jeweiligen Basen sind *N*-glycosidisch mit der jeweiligen Pentose verknüpft. Die Verknüpfung der Monomere erfolgt über die Ester der *ortho*-Phosphorsäure. Chemisch gesehen handelt es sich also, ähnlich wie das synthetische

Polyethylenterephthalat (PET), um einen Polyester.^[14] Die Verknüpfung erfolgt dabei über das C3- und C5-Atom. Als Basen sind in der DNS Adenin, Thymin, Guanin, und Cytosin zu finden. In der RNS ist Thymin gegen Uracil ausgetauscht. In Abbildung 1.1 sind Ausschnitte einer DNS- sowie RNS-Sequenz gezeigt.

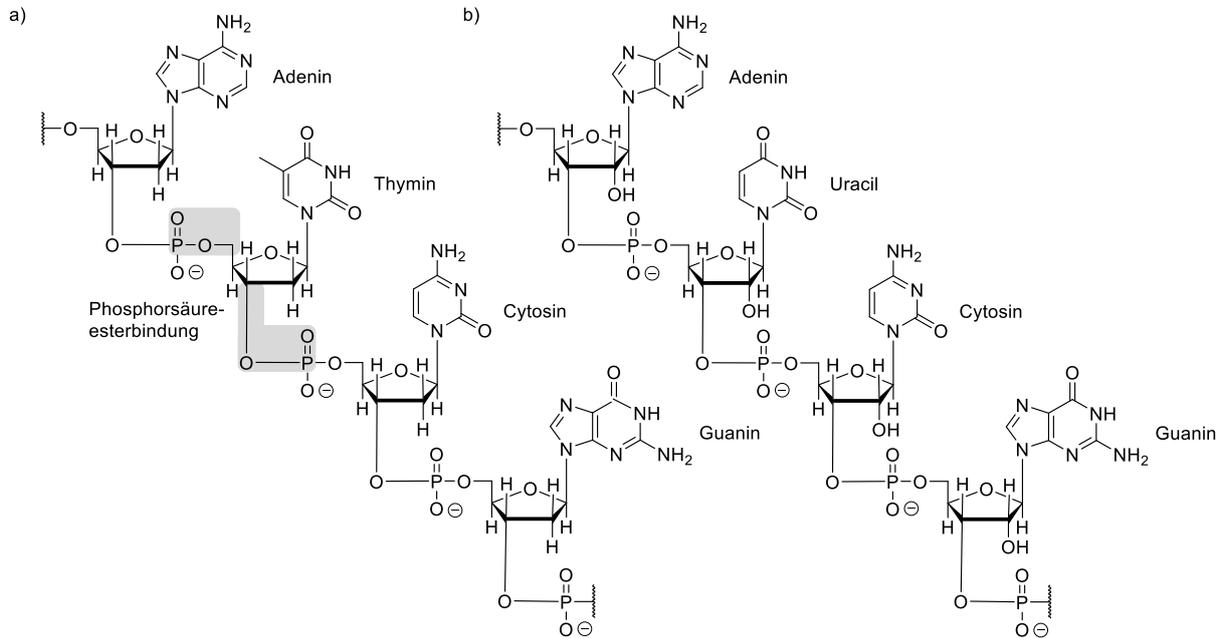


Abbildung 1.1: Ausschnitt aus einer a) DNS-Sequenz bzw. b) einer RNS-Sequenz.

Durch Wasserstoffbrückenbindungen, die sich innerhalb eines Basenpaars zwischen zwei Einzelsträngen ausbilden, kommt es zur Ausbildung einer Doppelhelix. Die Basenpaare liegen dabei im Inneren des Doppelstranges, während die Zucker-Phosphat-Ketten die äußere Spirale bilden.^[14] In Abbildung 1.2 sind die Basenpaare sowie der Doppelstrang schematisch gezeigt.

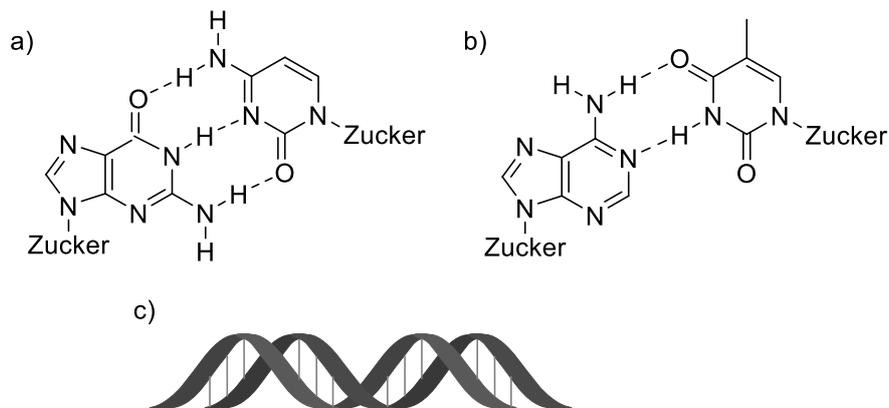


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von a) dem Basenpaar aus Guanin und Cytosin, b) dem Basenpaar aus Adenin und Thymin und b) des Doppelstrangs.

1.1.2 Polypeptide

Polypeptide bestehen aus mehreren unterschiedlichen Aminosäuren, die über 20 bis 50 Peptidbindungen miteinander verknüpft sind.^[10,15] Polypeptide mit mehr als 50 Aminosäuren werden als Proteine bezeichnet. Abhängig von ihrem Aminosäurerest und den daraus resultierenden intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen können unterschiedliche Sekundärstrukturen wie α -Helices und β -Faltblätter angenommen werden. Die α -Helixstruktur entsteht überwiegend durch die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. In dieser Form ist die Peptidkette spiralförmig verdreht. Die β -Faltblattstruktur kommt durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei oder mehreren Polypeptiden zustande. Durch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder der Ausbildung von kovalenten Bindungen wie Disulfiden kommt es zur stärkeren Faltung und damit zur Ausbildung der Tertiärstruktur. Weitere Wechselwirkungen zwischen mehreren Tertiärstrukturen führen schließlich zu Bildung der Quartärstruktur des Polypeptids. Ein Vertreter dieser Polymerklasse ist das Kollagen. Dies ist das am häufigsten in Lebewesen vorkommende Protein, dient als wichtiges Strukturprotein und bildet den fibrillären Anteil der Bindegewebe, Knochen, Sehnen und der Cornea des Auges.^[12,16] Außerdem ist es ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM).^[10] Die Primärstruktur besteht aus den charakteristischen Aminosäuresequenzen bestehend aus Glycin (ca. 33 %) sowie der Iminosäuren Prolin (ca. 12 %) und 3- und 4-Hydroxyprolin (ca. 9.5 %). Den Rest bilden andere Aminosäuren.^[12] Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen formt sich diese Sequenz zu einer α -Helix, die sich wiederum zu einer Tripelhelix windet. Das Besondere hierbei ist, dass sich die drei Einzelstränge jeweils um die eigene Achse winden und nicht, wie oft üblich, alle Stränge um eine gemeinsame Achse. Aus diesen Tripelhelices bilden sich durch enzymatische Vernetzung schließlich als Quartärstruktur kleine Kollagenfasern, die sogenannten Fibrillen.^[17] In Abbildung 1.3 ist der Aufbau von Kollagen gezeigt.

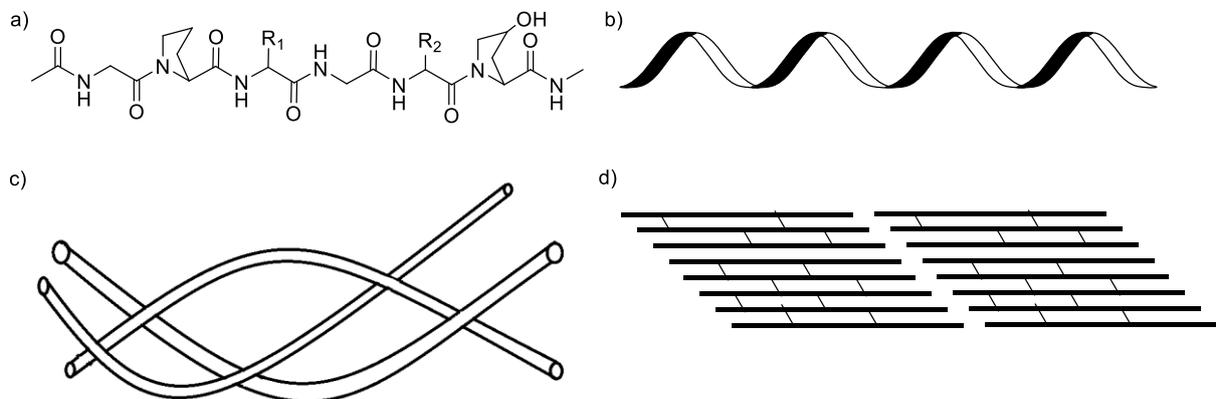


Abbildung 1.3: Aufbau von Kollagen; a) Aminosäuresequenz aus den Aminosäuren Glycin, Prolin und 3-Hydroxyprolin sowie anderen Aminosäuren, b) α -Helix des Kollagens, c) Tripelhelikaler Aufbau der Tertiärstruktur und d) durch enzymatische Vernetzung entstehende Fibrillen.

1.1.3 Polysaccharide

Polysaccharide sind die am häufigsten verbreiteten Biopolymere und können aus erneuerbaren Quellen wie z. B. Algen, Pflanzen und Mikroorganismen wie Pilzen und Bakterien isoliert werden. Bei Pflanzen und Mikroorganismen übernehmen sie die Funktion als Gerüst- und Speichersubstanzen. In tierischen Organismen hingegen werden sie in erster Linie als energieliefernde Substrate verwendet.^[18,19] Die Bausteine, die von großer Bedeutung für die Bildung von Polysacchariden sind, sind die Hexosen D-Glucose (1), D-Mannose (2), D-Galactose (3) und D-Fructose (4). Bei Polysacchariden tierischen Ursprungs kommen zudem noch die stickstoffhaltigen Bausteine Glucosamin (5) und Galactosamin (6) vor.^[19] In Abbildung 1.4 sind einige Bausteine von Polysacchariden gezeigt.

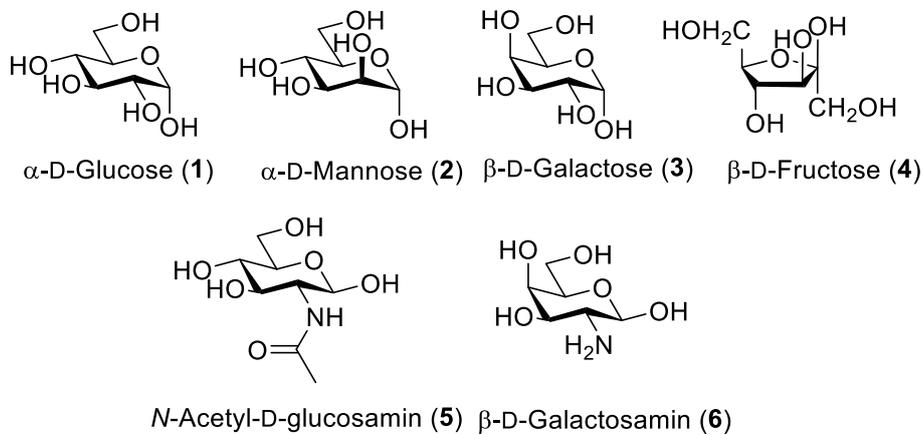


Abbildung 1.4: Ausgewählte monomere Bausteine der Polysaccharide.

Unterteilt werden können sie zudem in Homoglykane und Heteroglykane. Bei den Homoglykanen bestehen die Polysaccharide aus einem monomeren Baustein, wohingegen bei Heteroglykanen unterschiedliche Monomere zu finden sind. Des Weiteren können die Polymere auch in verzweigte und unverzweigte Polysaccharide eingeteilt werden. Bei den unverzweigten Polysacchariden liegen die monomeren Einheiten in einer linearen Kette vor. Bei den verzweigten Polymeren sind Seitenketten mit zum Teil unterschiedlichen Längen enthalten.^[18] In Abbildung 1.5 ist dies graphisch dargestellt.

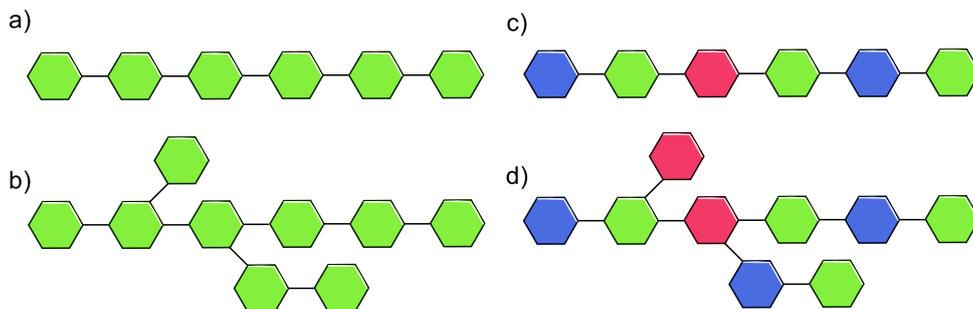


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von a) linearen Homoglykanen, b) verzweigten Homoglykanen, c) linearen Heteroglykanen, d) verzweigten Heteroglykanen.

Verbunden sind die monomeren Einheiten über glycosidische Bindungen. Hierbei ist zu unterscheiden, ob eine α - oder β -O-glycosidische Bindung vorliegt. Bei der α -Konfiguration steht der Substituent des anomeren Zentrums *trans* zum exocyclischen Rest des höchst nummerierten endocyclischen Kohlenstoffatoms. Analog dazu stehen die beiden Reste *cis* in der β -Konfiguration zueinander. Diese Konfigurationen befinden sich in wässrigen Lösungen im Gleichgewicht, wobei die Einstellung dieses Gleichgewichts als Mutarotation bezeichnet wird und experimentell mit Hilfe eines Polarimeters beobachtet werden kann. Dies beruht darauf, dass das α - und β -Anomer unterschiedliche optische Drehwerte besitzen. Wird eine frisch angesetzte Kohlenhydratlösung wie z. B. Glucose (**1**) polarimetrisch untersucht, kann bis zur Einstellung des Gleichgewichts der beiden Anomere eine dynamische Änderung der Drehwerte beobachtet werden.^[20] In Abbildung 1.6 ist das Gleichgewicht der beiden Anomere gezeigt.

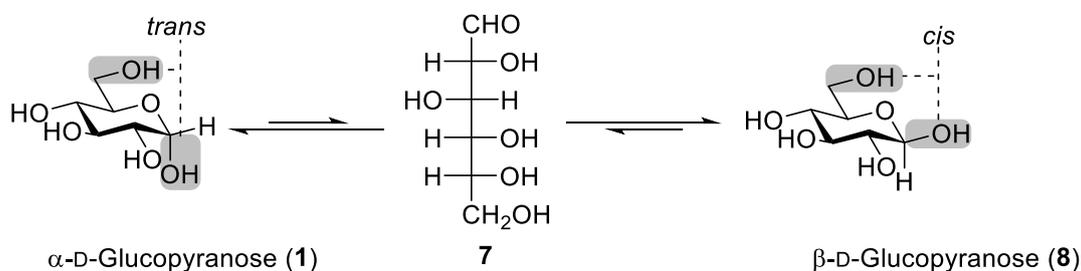


Abbildung 1.6: Mutarotation von α -D-Glucose.

In Polysacchariden findet durch die O-glycosidischen Verknüpfungen keine Änderung der Konfigurationen statt. Im folgenden Abschnitt werden die Polysaccharide erläutert, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.1.3.1 Dextran

Bei Dextran (**9**) handelt es sich um ein exozelluläres bakterielles Polysaccharid, das hauptsächlich aus linearen α -1,6-verbundenen Glucopyranoseeinheiten mit einigen α -1,3-Verzweigungen besteht.^[21] Synthetisiert wird Dextran (**9**) aus Sucrose von Bakterien der Spezies *Leuconostoc* and *Streptococcus* unter Katalyse von Glucansucrasen. Die physikochemischen Eigenschaften sind abhängig vom Molekulargewicht und dem Verzweigungsgrad. Letzteres wird durch die Art der Gewinnung des Polysaccharids beeinflusst.^[22] In Abbildung 1.7 ist ein Ausschnitt des Dextrans (**9**) gezeigt. Es ist bekannt, dass Dextran (**9**) durch, in der Leber und Milz vorkommende α -1-Glucosidasen (Dextranasen) metabolisiert, oder durch vorhandene Bakterien im Verdauungstrakt abgebaut werden kann. Aufgrund der guten Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit wird Dextran seit vielen Jahren im klinischen Bereich verwendet. So dient es z. B. als Blutersatzmittel und Plasmaexpander. Des Weiteren bietet Dextran (**9**) durch die große Anzahl an Hydroxygruppen die Möglichkeit andere funktionelle Gruppen über das Polymer verteilt

einzuführen.^[23,24] Alle diese Eigenschaften machen Dextran (**9**) zu einem geeigneten Kandidaten zur Herstellung von biomedizinisch relevanten Hydrogelen.

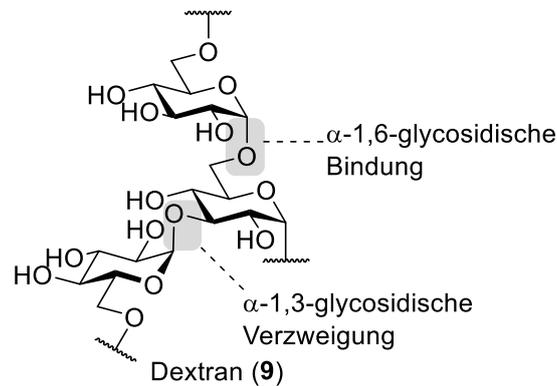


Abbildung 1.7: Struktur von Dextran (**9**) mit dem α -1,6-Rückgrat und der α -1,3-Verzweigung.

1.1.3.2 Pullulan

Pullulan (**10**) ist ein wasserlösliches Polysaccharid, das mikrobiell von den Hefepilzen der Spezies *Aureobasidium pullulans* synthetisiert wird.^[25] Es handelt sich hierbei um ein lineares α -D-Glucan, das aus Maltotrioseeinheiten aufgebaut ist, die über α -1,6-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Innerhalb der Maltotrioseeinheiten verfügen die Glucosemoleküle über α -1,4-glycosidische Verknüpfungen.^[26] In Abbildung 1.8 ist der Aufbau von Pullulan (**10**) gezeigt.

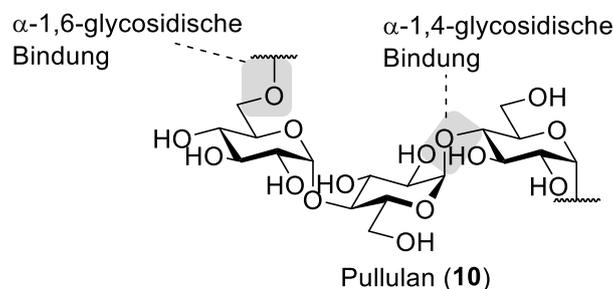


Abbildung 1.8: Struktur von Pullulan (**10**). Hervorgehoben sind die α -1,4-glycosidischen Bindungen der Glucosemoleküle innerhalb der Maltotrioseeinheit sowie die α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen der Maltotrioseeinheiten.

Da Pullulan (**10**) keine zytotoxischen Effekte zeigt, wird es bereits heute für bio-medizinische Anwendungen verwendet. So wird es als Plasmaexpander benutzt um bei hohem Blutverlust den osmotischen Druck der Blutgefäße aufrechtzuerhalten.^[27] Des Weiteren findet es seinen Einsatz als kalorienarmer Lebensmittelzusatz und als Stabilisator.^[28] Zudem zeigt es sich als geeigneter Kandidat als *Drug-Delivery*-System in der Behandlung von Leberkrebs, da Pullulan (**10**) von Leberparenchymzellen über den Asialo-glycoproteinrezeptor endozytiert (aufgenommen) wird.^[29,30] Die Bindung des Polysaccharids an diese spezifischen Rezeptoren wird durch die Stereochemie der Pyranoseringe und der Orientierung der Hydroxygruppen erklärt. Der Übergang von der Sessel- in die Boot-Konformation, die nur für die Pyranoseringe

der α -1,4-glykosidisch Verknüpften Glucose-bausteine möglich ist, scheint bei der Affinität gegenüber der Asialoglycoproteinrezeptoren von großer Bedeutung zu sein.^[31,32] Die gute Biokompatibilität sowie die Möglichkeit zur Derivatisierung der zahlreichen Hydroxygruppen, macht Pullulan (10) zu einem geeigneten Kandidaten zur Erzeugung von biomedizinisch relevanten Hydrogelen.

1.1.3.3 Lentinan

Lentinan (11) ist ein Polysaccharid, das von dem Pilz *Lentinus edodes* (Shiitake) synthetisiert wird. Es ist aufgebaut aus einer Kette aus β -1,3-glycosidisch verknüpften Glucopyranosen. Besonders ist hier, dass pro fünf β -1,3-Glucopyranoseeinheiten zwei β -1,6-glycosidisch verknüpfte Verzweigungen aus D-Glucose vorkommen.^[33] In Abbildung 1.9 ist die Struktur von Lentinan (11) gezeigt.

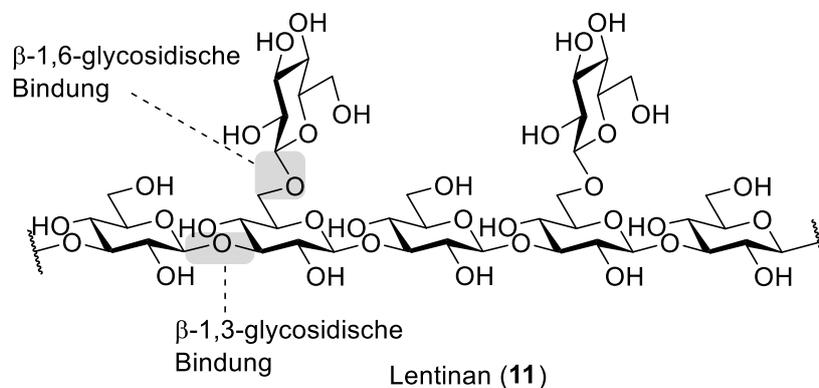


Abbildung 1.9: Struktur von Lentinan (11). Hervorgehoben sind hier die β -1,3- und die β -1,6-glycosidischen Bindungen.

Abhängig vom gewählten Lösungsmittel liegt Lentinan (11) in verschiedenen Konformationen vor. So bilden sich in einer wässrigen Lösung bei 25 °C Tripelhelices, wobei die β -1,6-glycosidisch verknüpften D-Glucoseeinheiten nach außen zeigen.^[33] In Abbildung 1.9 ist Lentinan (11) in seiner Tripelhelixform und in seiner Einzelstrangform gezeigt.

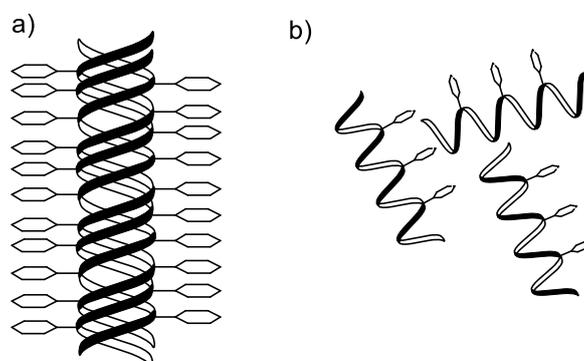


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung von a) Lentinan (11) in seiner tripelhelixen Struktur; b) Lentinan (11) als Einzelstränge.

In DMSO liegt Lentinan (**11**) als Einzelstrang vor, lässt sich jedoch durch wässrige Dialyse zurück in seine tripelhelikale Form überführen.^[33,34] In vielen Studien zeigte Lentinan (**11**) immunmodulierende Eigenschaften, da es unter anderem die Aktivierung von Makrophagen auslöst sowie, durch Bindung an Dectin-1, die dendritischen Zellen aktiviert.^[35] Diese Eigenschaften machen Lentinan (**11**) zu einem interessanten Polysaccharid in der Behandlung von Tumorerkrankungen, wobei es schon heute begleitend zur Chemotherapie eingesetzt wird.^[36,37] Des Weiteren wurden antivirale und antibakterielle Eigenschaften entdeckt.^[38] Diese Eigenschaften machen Lentinan (**11**) ebenfalls zu einem interessanten Kandidaten zur Erzeugung von biomedizinisch relevanten Materialien.

1.1.3.4 Chitosan

Beim Chitosan (**12**) handelt es sich um ein lineares Polysaccharid, das aus 1,4- β -glycosidisch verknüpften Glucosamin- sowie *N*-Acetylglucosamineinheiten besteht. Es handelt sich bei diesem Polysaccharid um partiell deacetyliertes Chitin. Dabei beeinflusst der Deacetylierungsgrad die Löslichkeit des Chitosans (**12**). Erst ab einem Deacetylierungsgrad von etwa 50 % ist das Polysaccharid in verdünnten Säuren löslich. In der Natur kommt Chitosan lediglich in geringen Mengen in den Zellwänden von einigen Pilzen vor, weswegen es hauptsächlich durch enzymatische oder chemische Deacetylierung von Chitin, das überwiegend aus den Schalen von Krebstieren isoliert wird, hergestellt wird.^[39] In Abbildung 1.11 ist die Struktur von Chitosan (**12**) gezeigt.

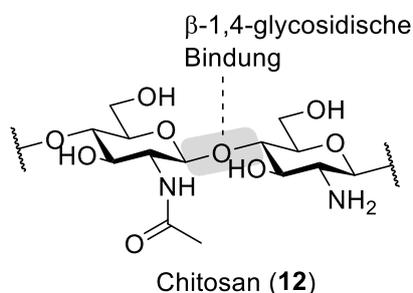


Abbildung 1.11: Struktur von Chitosan (**12**). Hervorgehoben ist hier die β ,1-4-glycosidische Bindung.

Das Löslichkeitsverhalten von Chitosan (**12**) lässt sich durch den Aufbau dieses Heteroglycans erklären. Durch die relativ hohe Anzahl an protonierten Aminogruppen, lässt es sich in sauren Medien (wie z. B. verdünnte HCl oder Essigsäure) lösen, da der pK_s -Wert bei ca. 6.5 liegt. Ab einem pH-Wert über 7 bilden sich zu viele inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amino- und Hydroxygruppen, sodass das Polymer unlöslich wird.^[40] Die hohe Anzahl an Aminogruppen ist dafür verantwortlich, dass Chitosan (**12**) zu den kationischen Polyelektrolyten gehört, wovon es nur wenige in der Natur gibt. Aufgrund der guten Biokompatibilität findet das Polysaccharid z. B. Verwendung als Diätmittel zur Behandlung von Fettleibigkeit. Dies liegt an der Eigenschaft Fett zu binden,

wodurch es vom Körper nicht mehr aufgenommen werden kann. Außerdem wird es in der Kosmetikindustrie, als Wundauflagen sowie als *Drug-Delivery*-Systeme eingesetzt.^[41,42] Diese Eigenschaften machen Chitosan (**12**) zu einem geeigneten Kandidaten zur Erzeugung von biomedizinisch relevanten Hydrogelen.

1.2 Hydrogele

Eines der größten Missverständnisse in den Polymerwissenschaften ist die Verwendung der Bezeichnung „Gel“ anstelle von „Hydrogel“ aber auch anders herum. Bei Gelen handelt es sich um halb feste Materialien, die aus hydrophilen Polymeren bestehen, die in relativ großen Mengen von Flüssigkeiten dispergiert sind. Allerdings können sie eher fest als flüssig erscheinen. Hydrogele bestehen ebenfalls aus hydrophilen Polymeren. Die Polymerstränge sind jedoch miteinander vernetzt, was zur Folge hat, dass sie aufquellen und ihre dreidimensionale Netzwerkstruktur beibehalten ohne sich aufzulösen. Das Wasser wird durch Wechselwirkungen zwischen den hydrophilen Gruppen wie z. B. Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen über die Ausbildung einer Hydrathülle um diese funktionellen Gruppen herum gebunden.^[5,43] Dieses Wasser wird auch „gebundenes“ Wasser genannt, ist ein integraler Bestandteil der Hydrogelstruktur und kann nur durch hohe Temperaturen abgetrennt werden. Daneben gibt es das ‚freie‘ Wasser. Dieses befindet sich überwiegend in der äußeren Schicht des Hydrogels und kann leicht, z. B. durch Zentrifugieren, von diesem abgetrennt werden. Da es sich bei der Bindung von Wasser um einen dynamischen Prozess handelt, lässt sich ebenfalls sogenanntes ‚halbgebundenes‘ Wasser in der Struktur finden. Dieses ist ein Zwischenzustand der anderen beiden Formen.^[44] In Abbildung 1.12 ist das Quellverhalten von Hydrogelen sowie die drei verschiedenen Arten von gebundenem Wasser gezeigt.

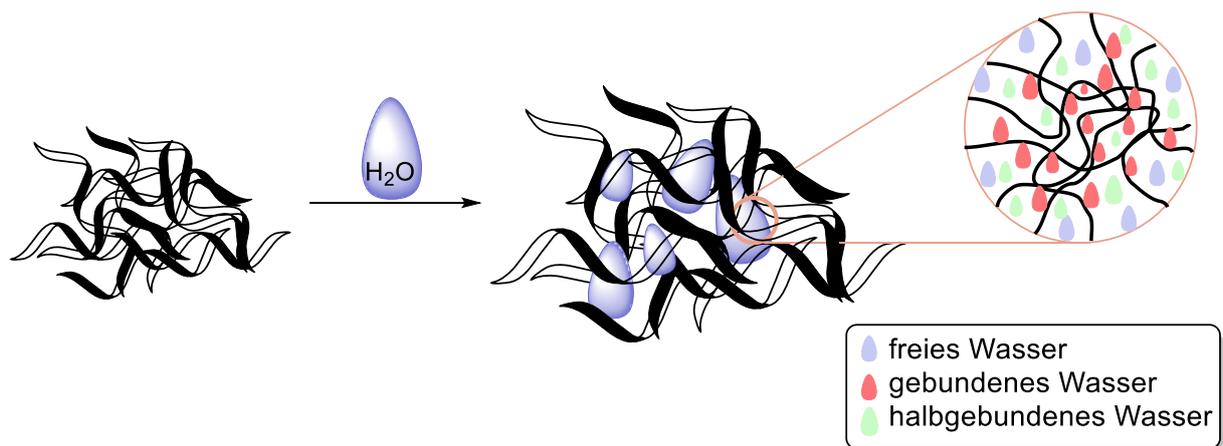


Abbildung 1.12: Veranschaulichung des Quellverhaltens von Hydrogelen in Wasser.

Die physikalischen und biologischen Eigenschaften von Hydrogelen sind abhängig von der Art des Polymers sowie der Art der Vernetzung. Dabei können sie sowohl aus natürlichen, als auch aus synthetischen Polymeren bestehen.^[45,46] Durch die radikalische Polymerisation von

Acrylsäuremonomeren (**13**) wird z. B. das synthetische Polymer Polyacrylsäure (PAA, **14**) gebildet.^[47] Weitere Beispiele für häufig eingesetzte synthetische Polymere sind das durch Polymerisation von Ethylenoxid (**15**) synthetisierte Polyethylenglycol (PEG, **16**) sowie Polylactid (PLA, **17**), das durch die Ringöffnung von Lactid (**18**) gefolgt von ionischer Polymerisation, gebildet wird.^[8,47,48] Zu den natürlichen Polymeren zählen die bereits in Abschnitt 1.1 beschriebenen Strukturen. In Abbildung 1.13 sind die genannten synthetischen Polymere gezeigt.

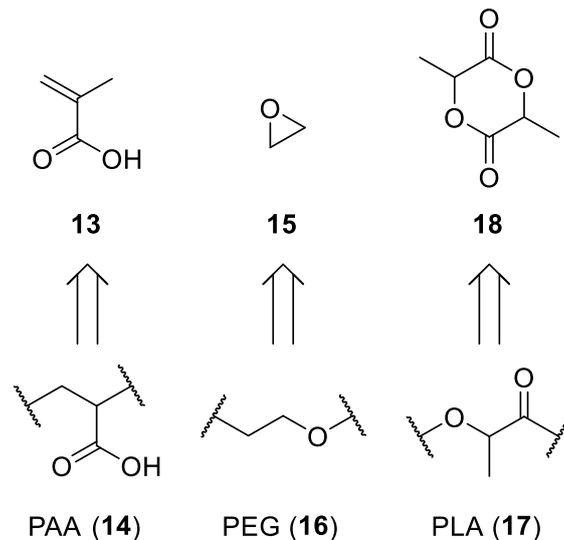


Abbildung 1.13: Synthetische Polymere zur Erzeugung von biomedizinisch relevanten Hydrogelen und ihre Bausteine.

1.2.1 Vernetzungsmethoden zur Erzeugung von Hydrogelen

Die eingesetzte Vernetzungsmethode hat einen großen Einfluss auf die Struktur sowie auf die physikochemischen und die biologischen Eigenschaften der Hydrogele. Dabei kann zwischen physikalischer und chemischer Vernetzung unterschieden werden. Bei der physikalischen Vernetzung beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymersträngen, oder durch andere intermolekulare Wechselwirkungen, wie van-der-Waalskräfte oder ionische Wechselwirkungen. Die chemische Vernetzung erfolgt durch Ausbildung kovalenter Bindungen. Des Weiteren lässt sich die Vernetzung in konvergente und die divergente Vernetzungsstrategien unterteilen. Bei der konvergenten Vernetzungsmethode erfolgt die Vernetzung der funktionalisierten Polymere durch dieselbe funktionelle Gruppe z. B. Hydroxylgruppen durch Glutaraldehyd, oder Carboxylate durch mehrwertige Kationen. Bei der divergenten Vernetzung werden unterschiedliche Polymerstränge mit zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet, die als Donator und Akzeptor fungieren und es somit über eine Click-Reaktion zur Vernetzung kommt. Ein Beispiel hierfür ist die Thiol-Michael-Reaktion

zwischen einem mit Thiol- und einem mit Vinylsulfongruppen ausgestatteten Polymerstrang. Besteht bei der konvergenten Methode die Möglichkeit, zur intramolekularen Reaktion der Vernetzer innerhalb der Polymerkette, wird dies bei der divergenten Methode verhindert.^[8] In Abbildung 1.14 sind diese Arten der Vernetzungen gezeigt.

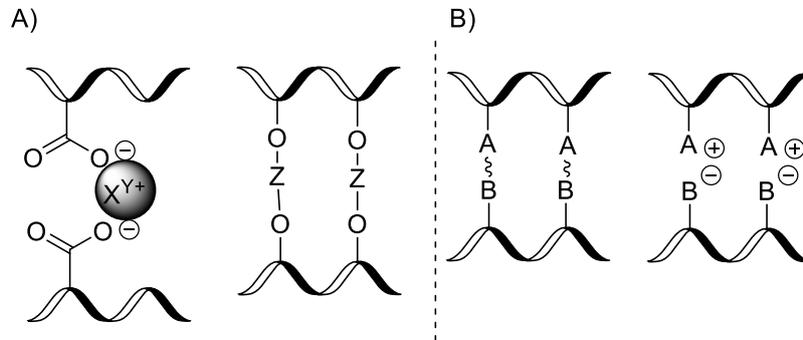


Abbildung 1.14: Vernetzungsmethoden eingeteilt in A) konvergente Vernetzungsmethode und B) divergente Vernetzungsmethode; $\text{X}^{\text{Y}+}$: z. B. Ca^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} ; Z: Linker generiert z. B. aus Glutaraldehyd; A: Akzeptor z. B. Vinylsulfon, Maleinimid, Aldehyd; B: Donator z. B. Thiol, Hydrazid; A^+ : z. B. R-NH_3^+ , R-COO^-

1.2.1.1 Vernetzung über physikalische Wechselwirkungen

Ein Beispiel für die Vernetzung eines Polymers über physikalische Wechselwirkungen ist die Bildung eines Hydrogels aus Polyvinylalkohol (PVA). Dies geschieht über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen. Wobei oftmals die *Freeze-Thaw*-Methode angewendet wird. Hierbei wird eine Lösung aus PVA in Wasser bei -15 °C eingefroren und anschließend auf 5 °C erwärmt. Dieser Vorgang wird drei Mal wiederholt, bis sich schließlich ein stabiles Hydrogel bildet. In Abbildung 1.15 ist der Ablauf der *Freeze-Thaw*-Methode gezeigt. Die Hydroxygruppen der PVA-Polymere bilden mit den Wassermolekülen Wasserstoffbrückenbindungen aus. Durch Einfrieren bilden sich Eiskristalle, die als Vernetzungspunkte zwischen den Polymerketten dienen, da die Polymerketten dichter aneinandergedrückt werden. Durch anschließendes Auftauen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymersträngen und es kommt zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes. Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen kommt es zu mehreren Vernetzungspunkten und schließlich zur Ausbildung eines stabilen Hydrogels.^[49,50]

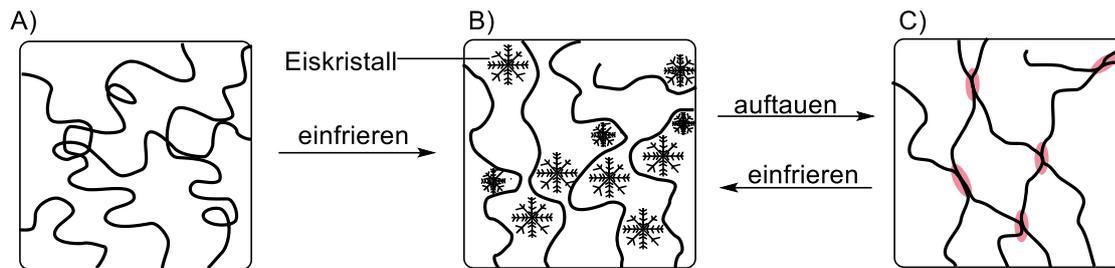


Abbildung 1.15: Schematischer Ablauf der *Freeze-Thaw*-Methode. A) PVA-Lösung; B) eingefrorene PVA-Lösung; C) aufgetautes PVA-Hydrogel, rot hervorgehoben sind die Vernetzungspunkte.

Ein weiteres Beispiel für die physikalische Vernetzung ist die Bildung von Alginate-Hydrogelen, die aufgrund ionischer Wechselwirkungen zustande kommt. Hierbei wechselwirken die im Alginate enthaltenen Carboxylatgruppen mit mehrwertigen Kationen wie z. B. Calciumionen.^[51]

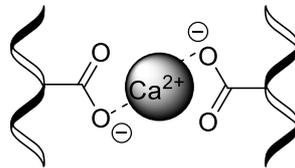
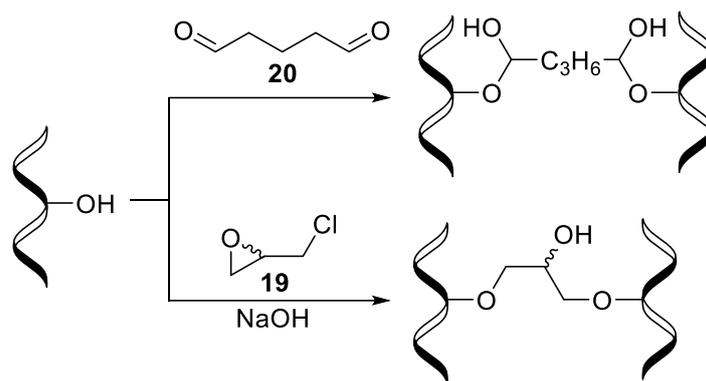


Abbildung 1.16: Ionische Vernetzung von z. B. Alginate über Calciumionen.

Die Vernetzung aufgrund physikalischer Wechselwirkungen ist ein reversibler Vorgang. Dadurch können die Vernetzungen der Polymere durch z. B. Erhöhung der Temperatur, Änderung des pH-Wertes oder Zugabe von Ionen gelöst werden.^[5]

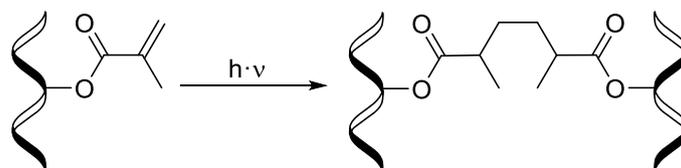
1.2.1.2 Chemische Vernetzung

Bei der chemischen Vernetzung handelt es sich meistens um eine irreversible Methode Polymere zu vernetzen. Im Vergleich zu physikalisch vernetzten Hydrogelen zeigen chemisch vernetzte Hydrogele, die durch kovalente Bindungen miteinander verbunden sind, eine erhöhte Stabilität unter physiologischen Bedingungen, die Möglichkeit den Abbau des Materials durch Erhöhung oder Verringerung der Funktionalisierung zu beeinflussen und bessere mechanische Eigenschaften.^[49] Ein Beispiel für eine konvergente chemische Vernetzungsmethode ist die Vernetzung von Dextran (**9**) durch Zugabe von *epi*-Chlorhydrin (**19**) oder Glutaraldehyd (**20**). Der Nachteil dieser Vernetzungsmethode besteht darin, dass die verwendeten Vernetzer toxisch sind und somit nach der Hydrogelbildung ein Reinigungsschritt angeschlossen werden muss, um nicht reagiertes *epi*-Chlorhydrin (**19**) sowie Glutaraldehyd (**20**) zu entfernen.^[8] In Schema 1.1 ist die Vernetzung über Glutaraldehyd (**20**) und *epi*-Chlorhydrin (**19**) gezeigt.



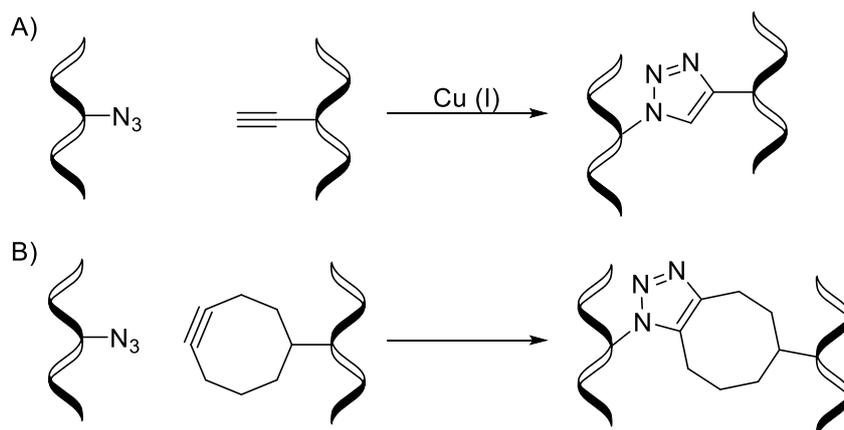
Schema 1.1: Vernetzung von z. B. Dextran (**9**) über Glutaraldehyd (**20**), und *epi*-Chlorhydrin (**19**).

Eine weitere Methode ist die photochemische Vernetzung von Polymeren. Hierfür werden die Polymere mit Methacrylsäureanhydrid modifiziert und anschließend durch Zugabe eines Radikalstarters und anschließende UV-Bestrahlung miteinander vernetzt.^[8] In Schema 1.2 ist die photochemische Vernetzung eines Methacrylat-modifizierten Polymers gezeigt.



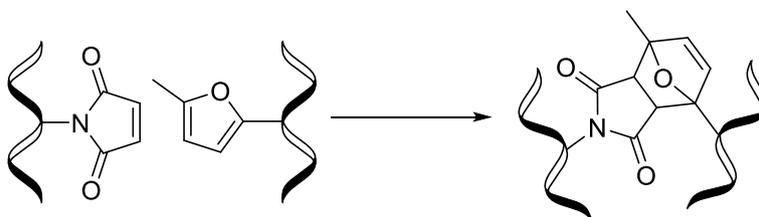
Schema 1.2: Photochemische Vernetzung.

Bei der divergenten Methode zeigt sich der Einsatz von Click-Chemie als geeignete Vernetzungsmethode. Click-Reaktionen haben eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit, hohe Selektivität, einfache Reaktionsbedingungen und fast keine Nebenprodukte.^[52] Ein Beispiel ist die Kupfer(I)-katalysierte Click-Reaktion zwischen einem Alkin und einem Azid. Dabei erfolgt die Vernetzung eines Polymers, das mit einem Alkin ausgestattet ist, mit einem korrespondierenden Azid-modifizierten Polymer über eine Huisgen 1,3-dipolare Cyclo-addition unter Ausbildung eines Triazols. Der Nachteil dieser Methode besteht in der Verwendung des Kupferkatalysators, der durch seine Zytotoxizität den Einsatz der so erzeugten Hydrogele für biomedizinische Anwendungen stark einschränkt. Deswegen wurden andere Kupfer-freie Click-Reaktionen zur Erzeugung von Hydrogelen entwickelt, um eine Vernetzung unter milden, physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.^[52] BERTOZZI *et al.* entwickelte eine Methode, bei der die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Cyclooctin ohne Zugabe eines Kupferkatalysators stattfindet. Die treibende Kraft ist hierbei die hohe Ringspannung des Cyclooctins, sodass die Reaktion ohne Einbuße der Reaktionsgeschwindigkeit abläuft.^[52,53] In Schema 1.3 sind die beiden Varianten der 1,3-dipolaren Cycloaddition gezeigt.



Schema 1.3: A) Beispiel der Kupfer-(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition; B) Beispiel der Kupfer-freien Variante.

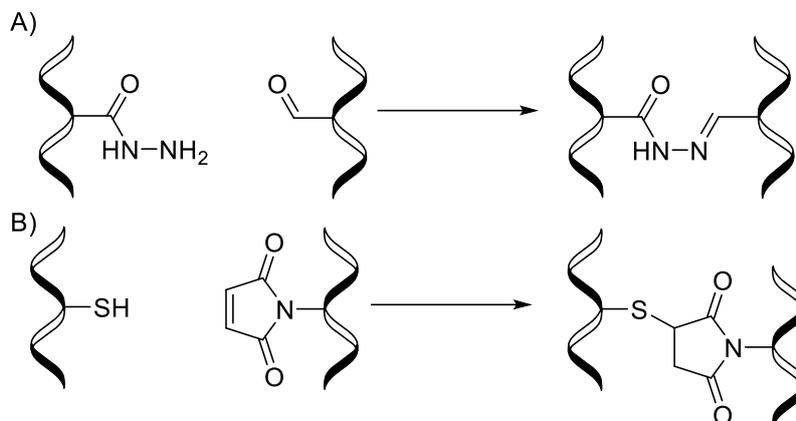
Ein weiteres Beispiel einer Click-Reaktion ist die Vernetzung über eine Diels-Alder-Reaktion. Dabei handelt es sich um eine Cycloaddition eines elektronenreichen Diens mit einem elektronenarmen Dienophil.^[52,54] Ein Beispiel ist die [4+2]-Cycloaddition zwischen Furan-modifizierter Hyaluronsäure und Maleinimid-modifiziertem PEG unter physiologischen Bedingungen. Die so hergestellten Hydrogele wurden erfolgreich in der dreidimensionalen Zellkultivierung eingesetzt und zeigten sich als interessante Kandidaten für weitere biomedizinische Anwendungen wie dem Einsatz als 3D-Matrix im *Tissue Engineering*.^[55] In Schema 1.4 ist die Vernetzung über die Diels-Alder-Reaktion gezeigt.



Schema 1.4: Beispiel für die Vernetzung über die Diels-Alder-Reaktion.

Ein weiteres Beispiel für Metall-freie Click-Reaktionen zur Erzeugung von Hydrogelen ist die Vernetzung über Schiff'sche Basen von z. B. Hydrazid- und Aldehyd-modifizierten Poly-meren. Diese ist in Schema 1.5 gezeigt. Bei der Bildung des Hydrazons handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Diese Eigenschaft sorgt dafür, dass die so hergestellten Hydrogele selbstheilend sind.^[56] Die so hergestellten Gele bieten einen großen Einsatzbereich im biomedizinischen Bereich. So konnte von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* bereits eine Bibliothek aus unterschiedlichen Hydrazid- und Aldehyd-modifizierten Polysacchariden aufgebaut werden. Diese wurden teilweise als dreidimensionale Matrix für kardiales *Tissue Engineering* verwendet, wobei durch Einbetten von Kardiomyozyten erfolgreich Herzmuskelgewebe

gezüchtet wurde.^[57] In Schema 1.5 Fall A ist die Vernetzung durch die Hydrazonebindung gezeigt.



Schema 1.5: A) Vernetzung über eine Hydrazonebindung; B) Vernetzung über die Thiol-Michael Reaktion.

Ein weiteres Beispiel stellt die Thiol-Michael Reaktion dar. Hierbei reagiert ein Thiol mit einem Michael-Akzeptor zu einem Thioether. Dieser besitzt eine höhere Stabilität als die ebenfalls mögliche Verknüpfung über die Ausbildung von Disulfiden. Bei den Disulfiden findet ein unspezifischer Thiol-Disulfid-Austausch statt, wodurch die gewünschte Vernetzung verloren gehen kann.^[58,59] In Schema 1.5 Fall B ist die Thiol-Michael-Reaktion am Beispiel eines Thiols und eines Maleinimids gezeigt. Die Reaktivität des Thiols bzw. des Donators ist abhängig von seinem pK_s -Wert. Je niedriger dieser ist, desto höher ist das Bestreben des Thiols, durch Deprotonierung ein reaktives Thiolat zu bilden.^[59] In Abbildung 1.17 sind einige Donatoren in Abhängigkeit ihrer pK_s -Werte gezeigt.

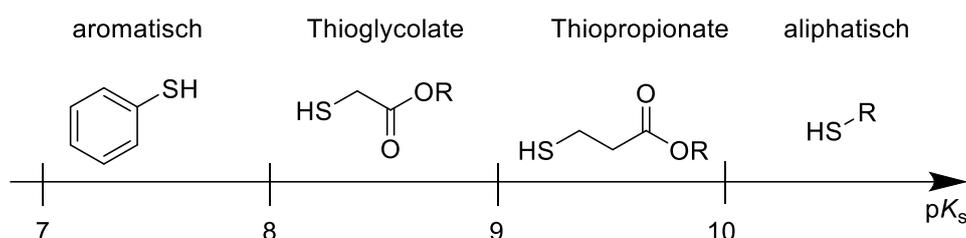


Abbildung 1.17: Thiol-Michael-Donatoren sortiert nach ihren pK_s -Werten.

Auch die Wahl der Akzeptoren beeinflusst den Ablauf der Thiol-Michael-Reaktion. Es lässt sich prinzipiell feststellen, dass je elektronärmer die Doppelbindung ist, desto anfälliger ist sie für eine Michael-Additionsreaktion. So zeigt sich, dass Maleinimide durch die zusätzlich hohe Ringspannung sowie die beiden Carbonylgruppen in *cis*-Konformation, die höchste Reaktivität besitzen. Weitere Akzeptorgruppen sind Vinylsulfone, Acrylate, Acrylamide sowie Methacrylate.^[59] In Abbildung 1.18 sind die genannten Akzeptoren nach steigender Reaktivität gezeigt.

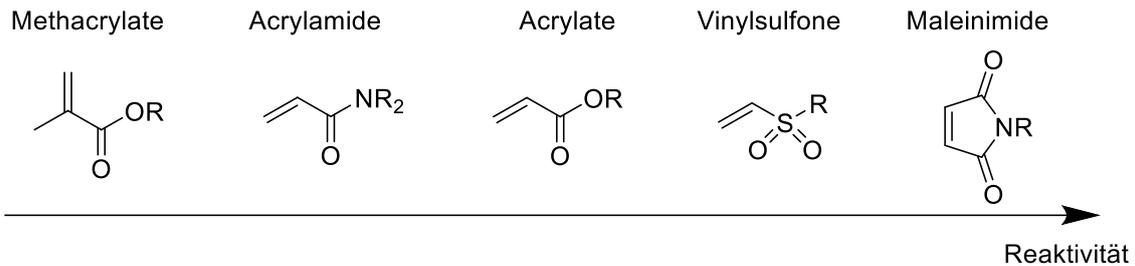


Abbildung 1.18: Auflistung einiger Thiol-Michael-Akzeptoren sortiert nach ihrer Reaktivität.

1.2.2 Rheologische Charakterisierung von Hydrogelen

Um Hydrogele physikalisch zu charakterisieren, werden diese oft rheologischen Messungen unterzogen. Dabei beschreibt die Rheologie die Lehre vom Fließen und der Deformation von Materialien und wird mit Hilfe eines Rheometers untersucht. Die häufigste betrachtete Eigenschaft ist die Viskosität, die das Maß der Zähigkeit eines Stoffes ist. Das Verhalten der Viskosität kann anhand eines Zwei-Plattenmodells modelliert werden. Dabei sind zwei Platten parallel zueinander ausgerichtet und innerhalb des Zwischenraums befindet sich eine Flüssigkeit. Durch Bewegung der Platten wird diese Flüssigkeit geschert.^[60] In Abbildung 1.19 ist das Zwei-Plattenmodell gezeigt.

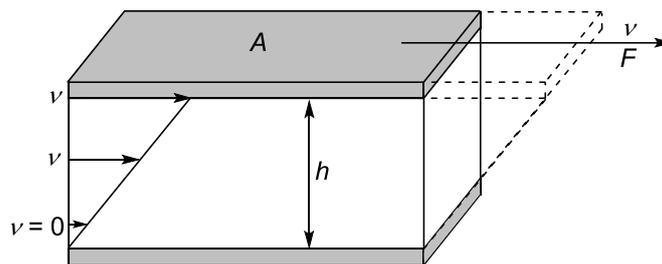


Abbildung 1.19: Schematische Darstellung des Zwei-Plattenmodells.

Die Fläche der Platte wird mit A bezeichnet. Die Geschwindigkeit, in der sich die Platte bewegt, wird durch v beschrieben, h steht für den Plattenabstand und F für die Scherkraft. Da die Scherkraft F von der Größe und des Abstandes der Platten abhängig ist, wird durch Substitution der Kraft durch die Schubspannung τ und der Plattengeschwindigkeit durch die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$, diese Abhängigkeit eliminiert.^[61] Die dazugehörigen Zusammenhänge sind in Formel 1.1 und Formel 1.2 gezeigt. Die Viskosität η wird schließlich durch Formel 1.3 erhalten.

$$\tau = \frac{F}{A} \quad \text{Formel 1.1}$$

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad \text{Formel 1.2}$$

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Formel 1.3

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Rheometer handelt es sich um ein Platten-Plattenrheometer. Dabei befindet sich die Probe zwischen zwei Platten, wobei die obere Platte oszilliert und die untere starr ist. In Abbildung 1.20 ist die Messvorrichtung gezeigt.

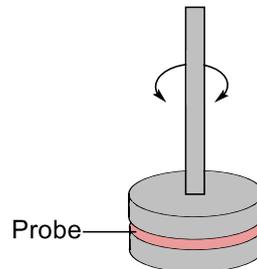


Abbildung 1.20: Für die Messungen verwendete Messvorrichtung.

Die äußere Kraft wird sinusartig angelegt. Durch Messung der Auslenkung bzw. der Deformation der Probe, die aufgrund der äußeren Kraft resultiert, wird ebenfalls eine Sinuskurve erhalten. Diese ist jedoch um den sogenannten Phasenwinkel δ verschoben.^[61] In Abbildung 1.21 ist dieses Verhalten graphisch gezeigt.

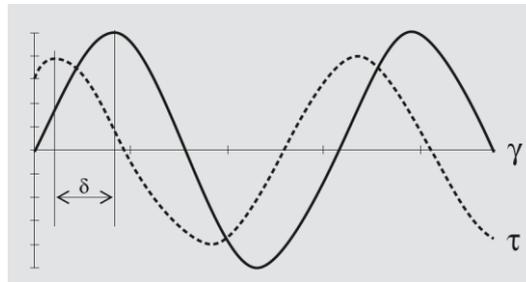


Abbildung 1.21: Auftragung der vorgegebenen Scherdeformation γ und die resultierende Schubspannung τ in Abhängigkeit der Zeit t . Gezeigt ist hier ebenfalls der Phasenwinkel δ .^[61]

Rein elastische Materialien schwingen in Phase, was bedeutet, dass der Phasenwinkel $\delta = 0^\circ$ gilt. Bei viskosen Proben sind die Schubspannung und Scherdeformation um 90° verschoben.^[60] Durch Anwendung des Hookeschen Gesetzes für Oszillationsversuche wird durch Division der Funktion der Schubspannung $\tau(t)$ durch die Funktion der Scherdeformation $\gamma(t)$, das komplexe Schubmodul G^* erhalten.^[61] In Formel 1.4 ist die Berechnung des komplexen Schubmoduls G^* gezeigt.

$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} = G' + iG''$$

Formel 1.4

Des Weiteren kann G^* ebenfalls aus der Summe des Speichermoduls G' und dem Produkt des Verlustmoduls G'' multipliziert mit der imaginären Zahl i erhalten werden. Das Speichermodul G' ist ein Maß für die in der Probe gespeicherte Deformationsenergie während des Scherprozesses. Diese steht nach der Entlastung wieder vollständig zur Verfügung und dient als Triebkraft wieder in die Ausgangsform zu gelangen. Es beschreibt somit das elastische Verhalten einer Probe. Das Verlustmodul G'' gibt die während des Scherprozesses verlorene Deformationsenergie an. Diese wird bei der Änderung der Struktur der Probe aufgebraucht bzw. an die Umgebung abgegeben z. B. wenn eine Probe teilweise oder vollständig fließt. Fließen und auch viskoelastisches Fließen bedeutet, dass Bewegungen zwischen den Molekülen des Probenmaterials auftreten, was zu Reibungskräften zwischen diesen Komponenten führt. Hierbei wird Energie in Form von Reibungswärme frei. Die Energie wird als Verlustmodul G'' bezeichnet und gibt Aufschluss, wie flüssig die Probe ist. Aus dem Quotienten des Verlustmoduls G'' und des Speichermoduls G' lässt sich der Verlust- oder Dämpfungsfaktor $\tan\delta$ bestimmen. Hierüber lässt sich das Verhältnis aus elastischem und viskosem Anteil bestimmen.^[61] In Formel 1.5 ist die zugrundeliegende Formel gezeigt.

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Formel 1.5}$$

Gilt $\tan\delta = 1$, markiert dieser Punkt, den Übergang vom viskosen in den elastischen Zustand. Dies wird auch als Sol-Gel-Übergang bezeichnet. Hierbei ist $G' = G''$. Ist $\tan\delta > 1$, gilt $G'' > G'$ und die Probe liegt im flüssigen (Sol) Zustand vor. Schließlich liegt ein elastischer bzw. Gel-Zustand vor, wenn $\tan\delta < 1$ und somit $G' > G''$ beträgt.

Über einen Oszillationsamplitudentest, kann der lineare viskoelastische Bereich (LVER) einer Probe ermittelt werden. Hierfür wird die Amplitude bzw. die Deformation bei gleichbleibender Kreisfrequenz, stufenweise erhöht, bis eine Änderung der Signale beobachtet wird. Der Bereich, indem das Speicher- und das Verlustmodul einen nahezu linearen Verlauf besitzen und parallel zur x-Achse verlaufen, wird LVER genannt. Das Ende dieses Bereiches wird Nachgebegrenze genannt und zeichnet sich durch ein Abfallen des Speichermoduls aus. Hier ändert sich die innere Struktur des Materials, es beginnt aber noch nicht zu fließen. Dies geschieht an dem Punkt, an dem $G' = G''$ gilt. Hier ist die innere Struktur der Probe zerstört und sie beginnt zu fließen. Dieser Punkt wird als Fließgrenze bezeichnet. Aus diesem Experiment lässt sich also ermitteln, wie stark eine Probe deformiert werden kann, bis sich die innere Struktur soweit verändert ist, dass die Probe nach Abstellen der angelegten Deformation, nicht mehr in ihren Ausgangszustand gelangen kann.^[62]

1.3 Biomedizinische Anwendungen von Hydrogelen

Hydrogele sind aufgrund ihrer Eigenschaften wie z. B. die Wasseraufnahme, Elastizität und Biokompatibilität von großem Interesse für biomedizinische Anwendungen. Ein bekanntes

Beispiel für den Einsatz von Hydrogelen ist ihr Einsatz als Kontaktlinsen. Des Weiteren dienen sie als *Drug-Delivery-Systeme*, werden als Wundauflagen eingesetzt, oder in der regenerativen Medizin eingesetzt.^[7,63]

1.3.1 Anwendung von Hydrogelen als *Drug-Delivery-System*

Konventionelle Medikation beinhaltet oft eine hohe oder regelmäßige Verabreichung, um einen therapeutischen Effekt zu stimulieren. Dies kann zu schweren Nebenwirkungen bis hin zu Vergiftungen führen. Eine Möglichkeit dies zu umgehen ist der Einsatz von *Drug-Delivery-Systemen*. Dabei erfolgt die Abgabe des Wirkstoffes gezielt am Wirkort, wodurch die Dosierung verringert werden kann, die Wirksamkeit verbessert und Nebenwirkungen minimiert werden.^[64] Hydrogele werden in der heutigen Zeit als *Drug-Delivery-System* in Form von z. B. Zäpfchen oder Implantaten verwendet. So dient im Präparat Cerdivil® ein Hydrogel aus PEG als Matrix für den Wirkstoff Prostaglandin E₂. Dieses wird in Form von Vaginalzäpfchen verabreicht, um den Geburtskanal zu erweitern und somit den Geburtsvorgang erleichtert. Ein weiteres Beispiel ist das Präparat Supprelin® LA. Dabei handelt es sich um ein Hydrogel aus Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) in dem sich der Wirkstoff Histrelinacetat befindet. Dieses System wird subkutan zur Behandlung der frühzeitigen Pubertät von Kindern implantiert.^[7,64]

Die Freisetzung des Medikaments ist dabei abhängig von der Vernetzung bzw. der Größe des Wirkstoffes und der Maschengröße des Hydrogels. Sind die Maschen des Netzwerkes größer als der Wirkstoff, so erfolgt die Freisetzung aufgrund von Diffusion. Kleine Wirkstoffmoleküle können sich frei durch das gesamte Netzwerk bewegen und die Diffusion erfolgt unabhängig der Maschengröße. Ist die Wirkstoffgröße ungefähr so groß wie die Maschengröße, erfolgt die Freisetzung durch sterische Hinderung deutlich langsamer. Es ist möglich die Maschengröße eines Hydrogels zu verringern. Dies geschieht z. B. durch Erhöhung der Polymerkonzentration oder des Vernetzungsgrades.^[64] Hierbei wird durch den Reibungswiderstand zwischen den Polymerketten und den Wirkstoffmolekülen, die Weglänge erhöht und der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum freigesetzt.^[65] Ist die Maschengröße wesentlich kleiner als der Wirkstoff, so wird dieser im Netzwerk immobilisiert. Die Freisetzung kann dann entweder durch Deformation des Hydrogels, durch Vergrößerung der Maschen durch Aufquellen, oder durch den kontrollierten Abbau des Netzwerkes erfolgen.^[64] In Abbildung 1.22 ist die Wirkstofffreisetzung in Abhängigkeit der Maschengröße des Hydrogels schematisch gezeigt. Neben dieser Form der Verabreichung, können Wirkstoffe auch direkt an den Polymersträngen konjugiert sein. Dies erfolgt z. B. über enzymatisch hydrolysierbare Bindungen wie z. B. Ester-, oder Amidbindungen. Die Freisetzung wird hierbei erst nach Spaltung dieser Bindungen erreicht.^[64]

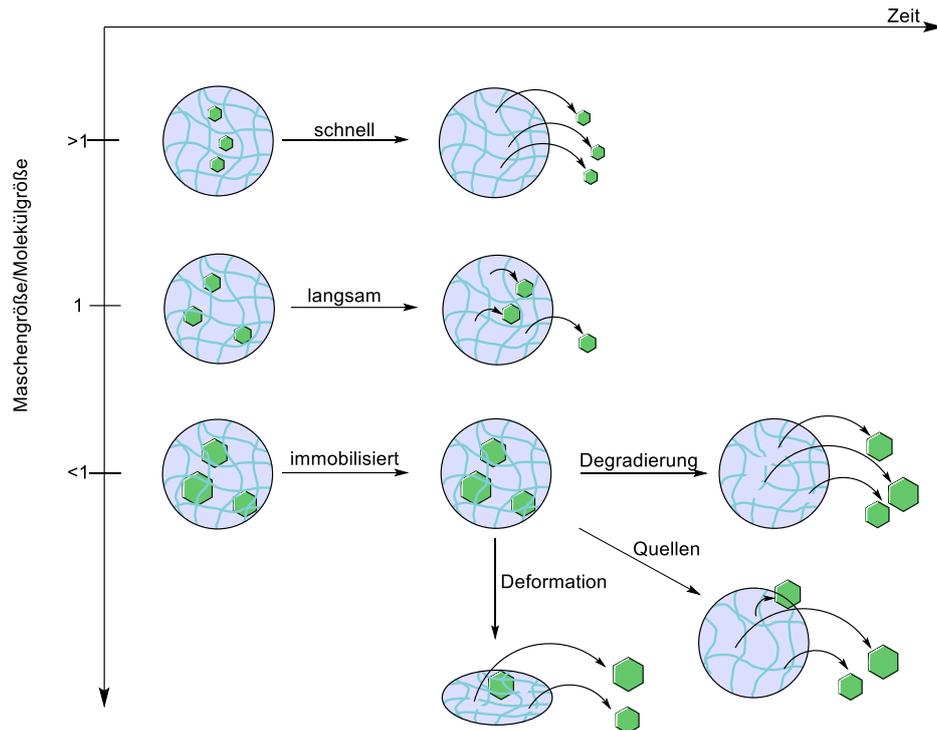


Abbildung 1.22: Wirkstofffreisetzung in Abhängigkeit der Maschengröße.

1.3.2 Anwendung von Hydrogelen im *Tissue Engineering*

Der Mangel an potentiellen Organspendern veranlasst die Forschung auf der ganzen Welt eine Alternative zu finden, um die steigende Nachfrage nach Organen zu bekämpfen. Im Laufe der letzten zwanzig Jahre wurde dafür an der Entwicklung und Integration biokompatibler Materialien für die Geweberegeneration geforscht. Dabei zeigten sich Hydrogele, bestehend aus dreidimensionalen biokompatiblen Polymersubstanzen, die als Gerüst dienen und die Eigenschaften der natürlichen extrazellulären Matrix für das *Tissue Engineering* nachahmen können, als besonders interessant.^[66] Das *Tissue Engineering* umfasst fünf Schritte. Als erstes erfolgt die Gewebeentnahme in Form einer Biopsie. Die entnommenen Zellen werden *in-vitro* kultiviert und anschließend in eine extrazelluläre Matrix überführt. In dieser entwickelt sich das Gewebe, das anschließend dem Patienten transplantiert wird.^[5] Die beschriebene Vorgehensweise ist in Abbildung 1.23 gezeigt.

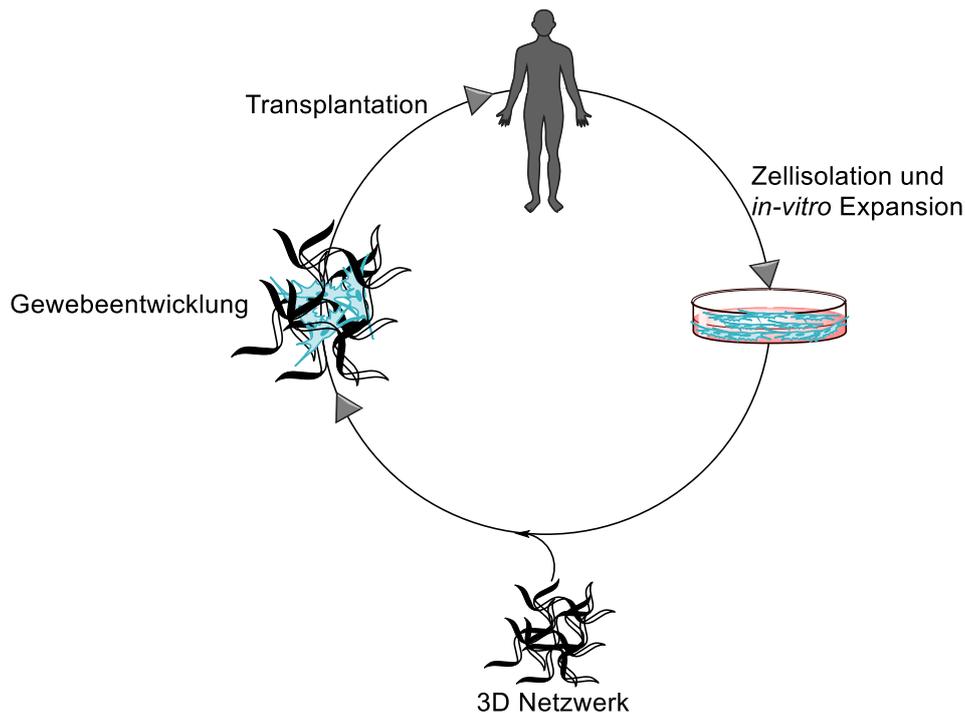


Abbildung 1.23: Allgemeines Vorgehen beim *Tissue Engineering*.

Ein wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung des neuen Gewebes ist die extrazelluläre Matrix. Dabei handelt es sich um ein dreidimensionales Netzwerk, das unter anderem aus fibrillären Proteinen wie Kollagen und/oder Laminin, speziellen Wachstumsfaktoren, Proteoglycanen und Glycosaminglycanen besteht. Die Kombination aus Zellen und Beschaffenheit der extrazellulären Matrix bestimmen was das Gewebe in unserem Körper ausmacht. Zum Beispiel ist sie grundlegend für Knorpel und Knochengewebe. Im Fall des Knorpelgewebes sind die Chondrozyten von einer hoch hydrierten extrazellulären Matrix eingeschlossen, wohingegen sie beim Knochen in einer stark mineralisierten Matrix eingeschlossen sind, was dem Gewebe die typische Steifigkeit verleiht.^[67,68] Ein Beispiel für den Einsatz von Dextran-basierten Hydrogelen zur Erzeugung von kontrahierendem Herzmuskelgewebe wurde von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* berichtet.^[69] Hierbei wurden Hydrogele aus Hydrazid- und Aldehyd-modifiziertem Dextran hergestellt, und in diesen wurden, unter Zusatz von Kollagen, aus humanen pluripotenten Stammzellen generierte Kardiomyozyten eingebettet. Des Weiteren berichteten NORR *et al.* über 3D-gedruckte Blutgefäße und das erste 3D-gedruckte herzförmige Konstrukt.^[70] Dabei wurden Stromazellen aus humanem Bauchfett extrahiert und das zurückgebliebene Kollagen-artige Material diente als eine Art Biotinte bzw. zur Erzeugung von Hydrogelen. Das als Biotinte verwendete Material zeigte eine weiche Struktur bei Raumtemperatur und gelierte zu einem Hydrogel bei einer Temperatur von 37 °C. Die Stromazellen wurden zu iPSCs (induzierten pluripotenten Stammzellen) reprogrammiert, um diese in endotheliale Zellen und Kardiomyozyten zu differenzieren. Die endothelialen Zellen dienten zur Generierung von Blutgefäßen, wohingegen die Kardiomyozyten zur Erzeugung

von Herzmuskelgewebe diente. Die Zellen wurden jeweils separat zu der Biotinte hinzugegeben. Damit das voluminöse Konstrukt nicht zusammenfällt wurde in einem unterstützenden Medium (einem Hydrogel), bestehend aus Alginate, Xanthan und Zellmedium gedruckt. Anschließend gelierte die Biotinte bei 37 °C und das unterstützende Medium konnte durch enzymatischen Abbau entfernt werden.^[70] In Abbildung 1.24 ist der Druckvorgang, sowie die gedruckte dreidimensionale herzartige Struktur gezeigt.

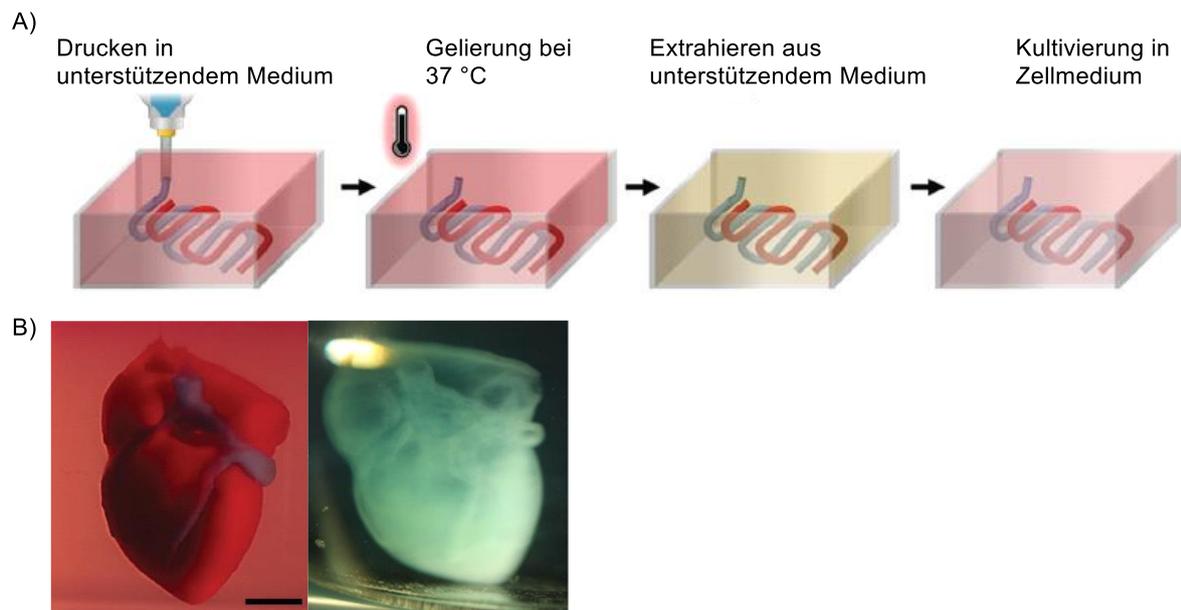
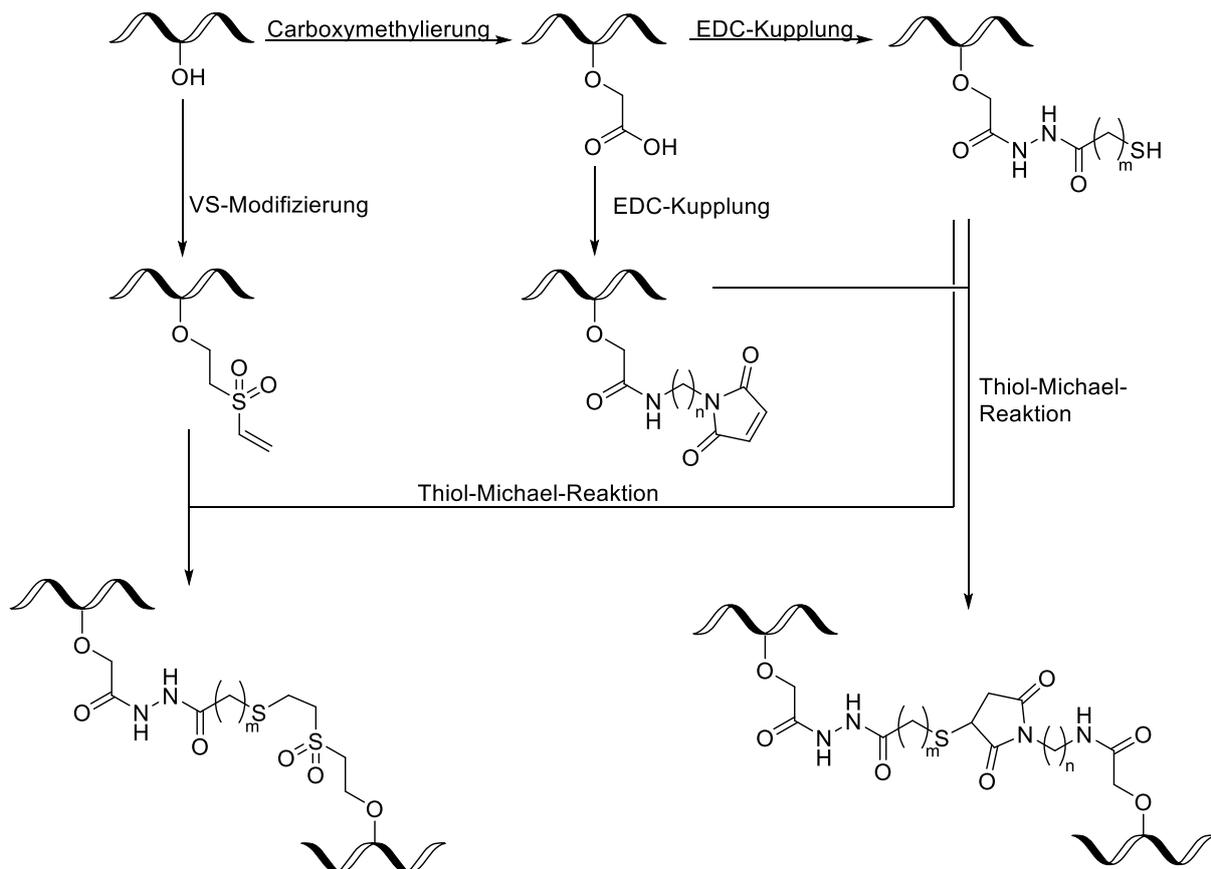


Abbildung 1.24: A) Ablauf des 3D-Drucks; B) dreidimensional gedruckte herzartige Struktur in unterstützendem Medium, links: rot: gefärbte Kardiomyozyten-haltige Biotinte, blau: gefärbte Endothelzellen-haltige Biotinte, rechts: gedruckte herzartige Struktur in PBS.

Es konnte in dieser Studie eine dreidimensionale herzartige vaskuläre Struktur aus körpereigenen Zellen sowie aus einem Hydrogel, das ebenfalls aus körpereigenen Materialien stammt, gedruckt werden, wodurch die so hergestellten Konstrukte eine exzellente Biokompatibilität aufweisen.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, in Anlehnung der Arbeiten von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* und den Vorarbeiten von DR. SAMHITA BANERJEE eine weitere Vernetzungsmethode zur Erzeugung von biomedizinisch relevanten Hydrogelen zu etablieren und diese auf unterschiedliche Polysaccharide anzuwenden.^[63,69] Hierfür sollte die Vernetzung über Thiol-Michael-Reaktion erfolgen. Die hieraus resultierenden Thioether sind wesentlich unempfindlicher gegenüber Hydrolyse als die zuvor etablierten Hydrazone.^[59] Des Weiteren ergibt sich die Möglichkeit, Hydrogele aus direkt im Medium bzw. in PBS gelösten Materialien zu bilden. Bei den vorangegangenen Hydrazon-vernetzten Hydrogelen war dies aufgrund der Interaktion der Aldehydkomponente mit den in Medium und Puffer vorhandenen Phosphaten nicht möglich.^[57] Die ausgewählten Polysaccharide sollten vorerst mit Carboxymethylgruppen versehen werden, um anschließend die entsprechenden Linker ankuppeln zu können. Dabei sollten Linker mit verschiedener Länge verwendet werden und deren Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften untersucht werden. Eine Übersicht der Modifizierung der Polysaccharide ist in Schema 2.1 gezeigt.



Schema 2.1: Übersicht der einzelnen Modifizierungsschritte zur Synthese von Hydrogelen.

Die so synthetisierten Hydrogele sollten hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften wie das Quellverhalten, ihr rheologisches Verhalten sowie ihre Permeabilität untersucht

werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen auf die Zytotoxizität der hergestellten Komponenten und der Hydrogele folgen, um die Eignung der neu synthetisierten Materialien für biomedizinische Anwendungen zu prüfen.

3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Teil der Arbeit werden spezielle Abkürzungen der synthetisierten und untersuchten Verbindungen verwendet. Exemplarisch werden im Folgenden die verschiedenen Abkürzungen der Dextranderivate erklärt. Für carboxymethyliertes Dextran wird die Abkürzung CM für Carboxymethylierung und anschließend die Zahl der Carboxy-methylierungsstufe verwendet. So wird das Dextran, das zwei Carboxymethylierungsreaktionen unterzogen wurde, als Dextran CM2 bezeichnet. Für die Thiopropan-säurehydrazid- bzw. Thiobutansäurehydrazodderivate wird hinter der Carboxymethylierungsstufe jeweils die Abkürzung TPH für Thiopropan-säurehydrazid, bzw. TBH für Thiobutan-säurehydrazid verwendet. Für Cysteaminvinylsulfonderivate wird die Abkürzung CVS und für Vinylsulfonderivate die Abkürzung VS verwendet. Die *N*-(4-Aminobutyl)-maleinimidderivate werden mit dem Kürzel BM und die *N*-(5-Aminopentyl)-maleinimidderivate mit dem Kürzel PM bezeichnet. Des Weiteren wurde nachfolgend zur Veranschaulichung und Vereinfachung lediglich ein α -1,6-glycosidisch verknüpfter Ausschnitt aus der Gesamtstruktur von Dextran (9) und Pullulan (10) gezeigt. In Abbildung 3.1 ist die vereinfachte Strukturformel von Dextran (9) und Pullulan (10) sowie die vereinfachten Strukturformeln von Lentinan (11) und Chitosan (12) gezeigt.

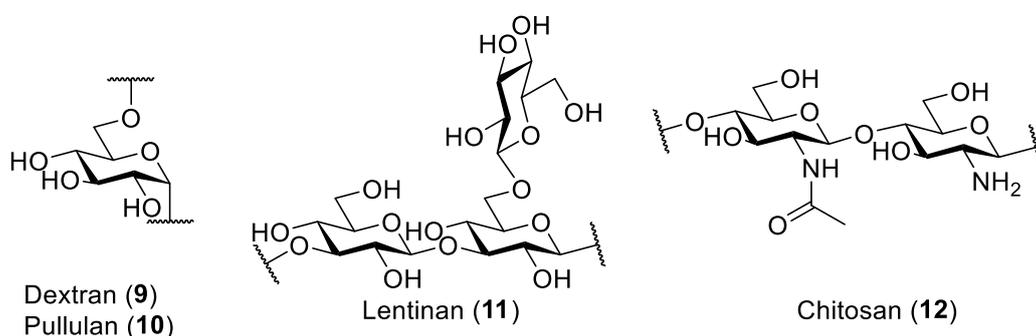


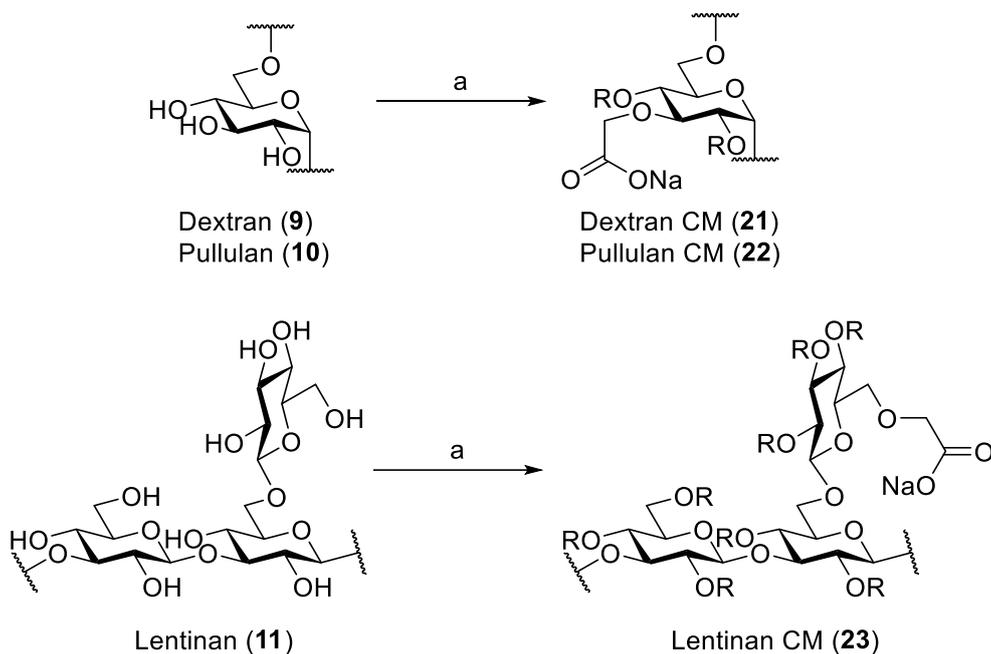
Abbildung 3.1: Vereinfachte Strukturformel für Dextran (9) und Pullulan (10) sowie die Strukturformeln von Lentinan (11) und Chitosan (12).

3.1 Chemische Modifizierung der Polysaccharide

3.1.1 Carboxymethylierung von Dextran (9), Pullulan (10), Lentinan (11) und Chitosan (12)

Um die ausgewählten Polysaccharide in ihre Thiol- bzw. Maleinimidderivate zu überführen, wurden diese im ersten Schritt in ihre korrespondierenden Carboxymethylderivate überführt. Dies erfolgte für die Polysaccharide Dextran (9), Pullulan (10) sowie Lentinan (11) nach den Bedingungen von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* unter stark basischen Bedingungen durch

Reaktion mit 2-Chloressigsäure.^[63] In Schema 3.1 sind die Reaktionsbedingungen für die Carboxymethylierung von Dextran (**9**), Pullulan (**10**) und Lentinan (**11**) gezeigt.



Schema 3.1: Carboxymethylierung von Dextran (**9**), Pullulan (**10**) sowie Lentinan (**11**) (R = CH₂CO₂Na oder H). Reaktionsbedingungen: a) H₂O, NaOH (8 M), ClCH₂CO₂H, 62 °C, 1.5 h.

Um den Substitutionsgrad zu erhöhen, wurden die carboxymethylierten Polysaccharide Dextran CM (**21**) und Pullulan CM (**22**) drei Mal dieser Reaktion unterzogen. Das carboxymethylierte Lentinan CM (**23**) wurde bis zu fünf Mal unter diesen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die so synthetisierten Polysaccharide wurden IR- sowie ¹H NMR-spektroskopisch untersucht. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 3.2 die IR-Spektren von nativem Dextran (**9**) und Lentinan (**11**) im Vergleich zu den korrespondierenden carboxymethylierten Derivaten gezeigt. Es ist in den beiden Spektren der carboxy-methylierten Derivaten eine scharfe, deutliche Bande bei einer Wellenzahl von ca. 1.600 cm⁻¹ zu erkennen. Dieses Signal ist der Carbonylvalenzschwingung in der eingeführten Carboxylatgruppe zuzuordnen.

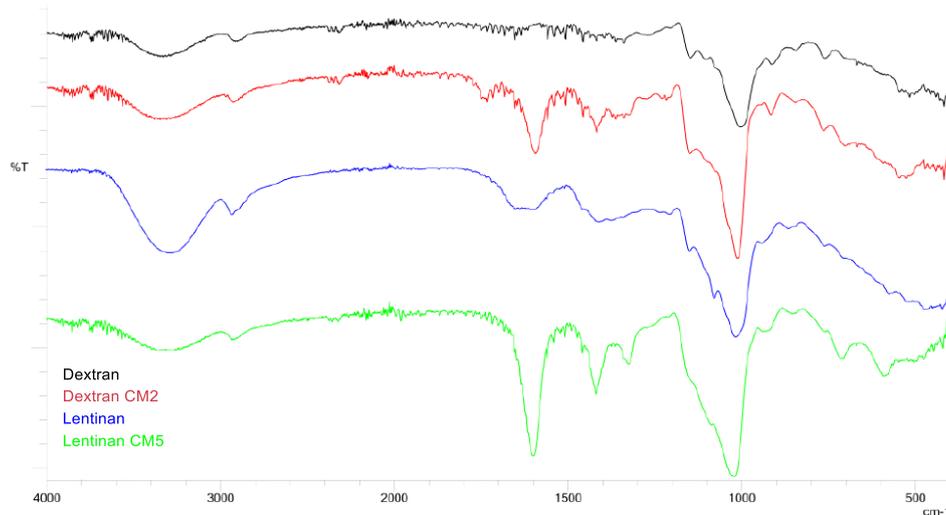


Abbildung 3.2: IR-Spektren von carboxymethyliertem Dextran (**21**) und Lentinan (**23**) im Vergleich zu nativem Dextran (**9**) und Lentinan (**11**).

Auch das in Abbildung 3.3 gezeigte ^1H NMR-Spektrum zeigt, dass die Synthese erfolgreich war. Dies wurde deutlich an dem Signal der eingebrachten Methylengruppe (Signal b) des Carboxymethylrestes.

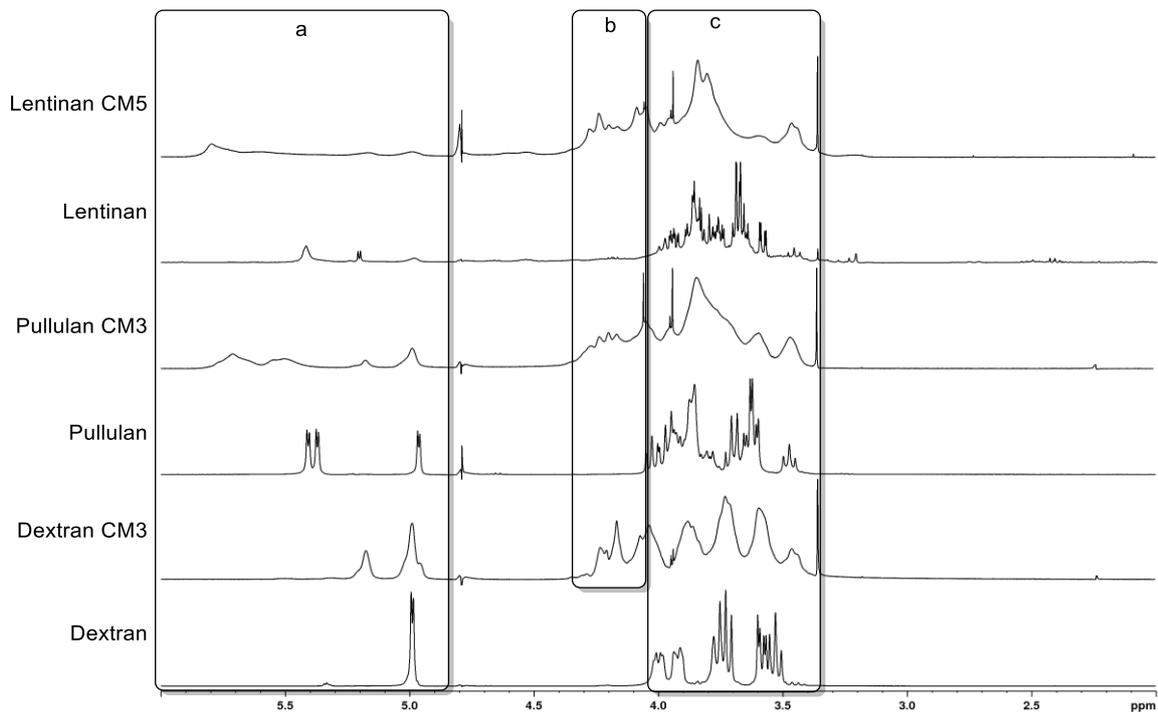
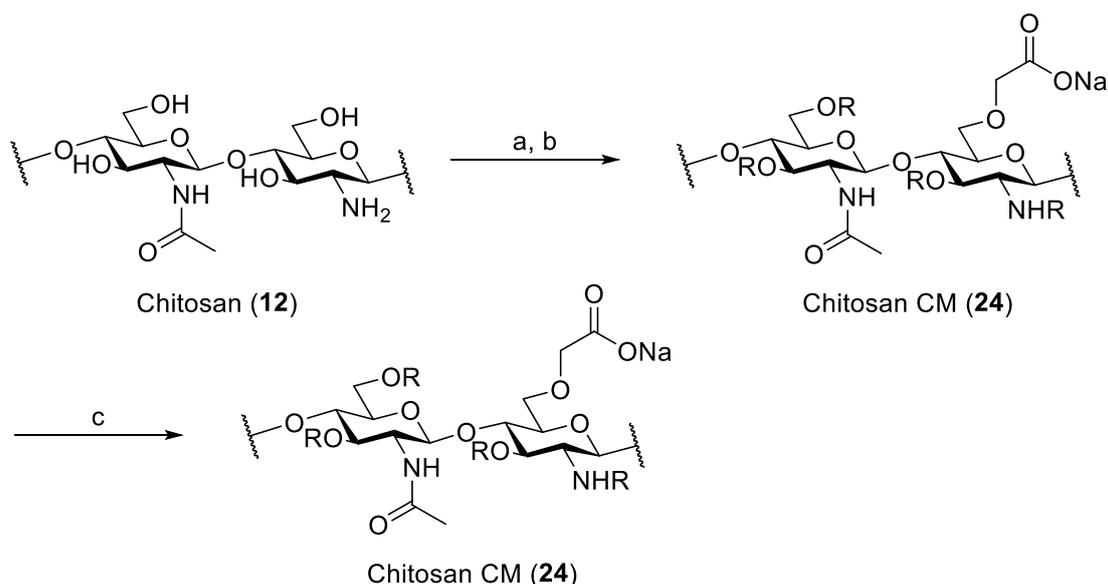


Abbildung 3.3: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von carboxymethyliertem Dextran (**21**), Pullulan (**22**) und Lentinan (**23**) mit nativem Dextran (**9**) Pullulan (**10**) sowie Lentinan (**11**) in D_2O ; a) Region der anomeren Protonen, b) Signal des eingebrachten CH_2 -Restes der Carboxymethylgruppe, c) Protonen des glycosidischen Gerüsts.

Die ^1H NMR-Spektren erlaubten keine quantitative Aussage über den tatsächlichen Substitutionsgrad der carboxymethylierten Polysaccharide **21**, **22** und **23**. Der Grund hierfür liegt in

der Vielzahl an Substitutionsmöglichkeiten im Polysaccharid. Hierdurch resultieren viele unterschiedliche Strukturen des glycosidischen Gerüsts. Dies führt zu Signalverbreiterungen im ^1H NMR-Spektrum.

Aufgrund der Unlöslichkeit von Chitosan (**12**) wurde aufgrund seiner Unlöslichkeit in wässrigem bzw. basischem Medium von PARK *et al.* carboxymethyliert.^[71] Für die O-Carboxymethylierung wurde Chitosan (**12**) in einem Gemisch aus *iso*-Propanol (*i*PrOH), Wasser und NaOH gequollen und durch anschließende langsame Zugabe von 2-Chloressigsäure (in *i*PrOH) in das korrespondierende carboxymethylierte Derivat (**24**) überführt. In Schema 3.2 sind die Reaktionsbedingungen zur Carboxymethylierung von Chitosan (**12**) gezeigt.



Schema 3.2: Carboxymethylierung von Chitosan (**12**) ($\text{R} = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$ oder H). Reaktionsbedingungen: a) *i*PrOH/ H_2O (4:1), NaOH (s), 50°C , 1 h, b) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (in *i*PrOH), 50°C , 4 h, c) H_2O , NaOH (8 M), $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, 62°C , 1,5 h.

Es ist nicht auszuschließen, dass es durch die Carboxymethylierung auch zur Modifizierung des nucleophilen Amins kam, jedoch ist wird im Weiteren exemplarisch die Carboxymethylgruppe an der C6-Stelle gezeigt. Das nach dem ersten Carboxymethylierungsschritt erhaltene Produkt Chitosan CM1 (**24**) war nun durch die eingebrachten Carboxymethylgruppen auch im basischen Milieu löslich. Hierdurch konnte für eine weitere Erhöhung des Derivatisierungsgrads auf das Protokoll von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* zurückgegriffen werden. Auch die so synthetisierten carboxymethylierten Chitosan Derivate (**24**) wurden über IR- sowie ^1H NMR-Spektroskopie charakterisiert. In Abbildung 3.4 ist das IR-Spektrum von carboxymethyliertem Chitosan (**24**) im Vergleich zu nativem Chitosan (**12**) gezeigt. Auch hier ist eine deutliche Bande bei einer Wellenzahl von ca. 1.600 cm^{-1} zu sehen, die der Carbonylvalenzschwingung des eingebrachten Carboxylats zuzuordnen ist.

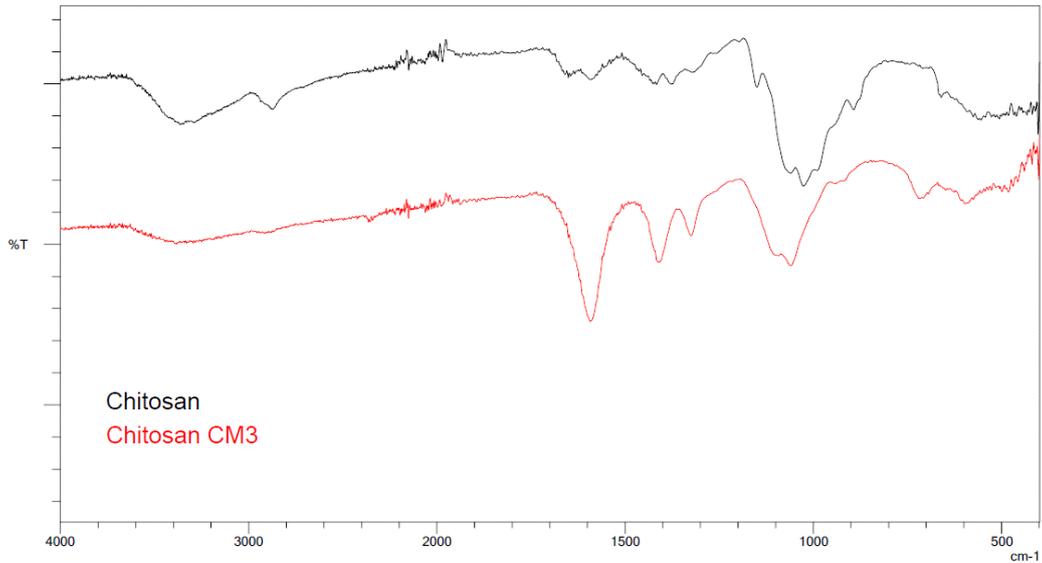


Abbildung 3.4: IR-Spektren von carboxymethyliertem Chitosan (**24**) zu nativem Chitosan (**12**).

Auch der Vergleich der ^1H NMR-Spektren von carboxymethyliertem Chitosan (**24**) und nativem Chitosan (**12**) in Abbildung 3.5 zeigt eine Veränderung der anomeren Protonen, sowie das Signal der eingebrachten Methylengruppe.

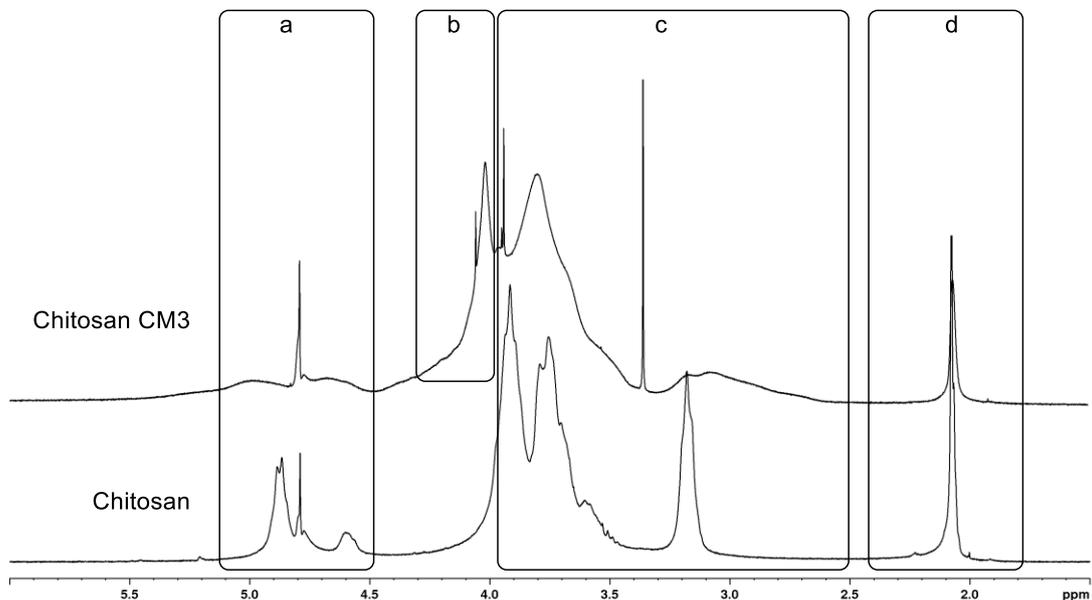


Abbildung 3.5: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von carboxymethyliertem Chitosan (**24**) mit nativem Chitosan (**12**) in D_2O ; a) Region der anomeren Protonen, b) Signal des eingebrachten CH_2 -Restes der Carboxymethylgruppe, c) Protonen des glycosidischen Gerüsts, d) Signal des Acetamidorestes.

Zusätzlich zur spektroskopischen Charakterisierung wurden die erhaltenen carboxymethylierten Polysaccharide mittels Gelpermeationschromatographie charakterisiert. Es sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Carboxymethylierung auf das Molekulargewicht

der Polysaccharide hat. Exemplarisch ist in Abbildung 3.6 das Elugramm von Dextran 500 kDa (**9**) und den carboxymethylierten Derivaten (**21**) gezeigt.

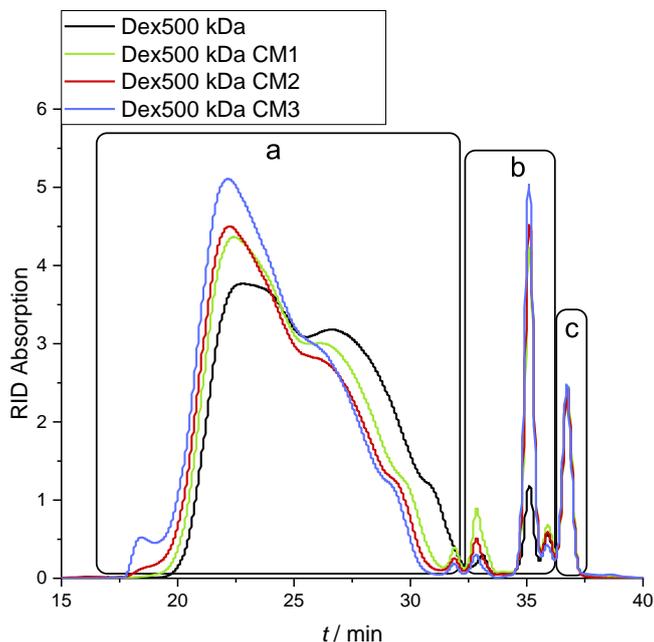


Abbildung 3.6: Elugramm von Dextran 500 kDa (**9**) und den korrespondierenden carboxymethylierten Derivaten. a) Signale der untersuchten Polysaccharide, b) Verunreinigungen, c) interner Standard (Propylenglykol).

Es ist zu erkennen, dass die Elutionszeit t mit steigendem Carboxymethylierungsgrad abnahm. Mit steigendem Molekulargewicht nahm die Elutionszeit t ab. Daraus lässt sich schließen, dass mit steigendem Carboxymethylierungsgrad das Molekulargewicht der Polysaccharide zunimmt. In Tabelle 3.1 sind die Zahlenmittel M_n , die Massenmittel M_w und der Dispersitätsfaktor D der untersuchten Polysaccharide gezeigt. Da die Chitosanlösungen eine zu hohe Viskosität aufwiesen und sich vor der Injektion in den Gelpermeations-chromatograph nicht filtrieren ließen, wurde auf die Untersuchung von Chitosan hier verzichtet, um ein Blockieren des Geräts zu vermeiden. Bei dem carboxymethylierten Dextran 250 kDa Derivaten (**21**) (Eintrag 1 bis 4) ist zu erkennen, dass das Massenmittel M_w bis zur zweiten Carboxymethylierungsstufe zunahm. Ab der dritten Stufe sank es wieder von 3.1×10^3 auf $2.7 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Den Trend der ansteigenden Molmassen mit steigender Carboxymethylierungsstufe bzw. anschließender Abfall war bei allen Polysacchariden zu erkennen. Dieses Verhalten ist durch die stark basischen Bedingungen während der Synthese zurückzuführen, wodurch die Hydrolyse der Polysaccharidketten katalysiert wird.^[72] Die Polydispersität aller untersuchten Proben lagen zwischen 1.5 und 7.7. Das bedeutet, dass es sich hierbei um eine breite Verteilung der Molmassen handelte. Dies kam durch mehrere Faktoren zustande. Es handelt sich bei den verwendeten Polymeren um natürliche Polymere, die im Falle von Dextran (**9**) und Lentinan (**11**) unterschiedlich verzweigt sind. Des Weiteren

kam es durch die chemische Modifizierung zur Änderung der Konformation der Polymere, was sich auf ihre hydrodynamischen Radien und somit auf ihre Massenverteilung auswirkte.

Tabelle 3.1: Molmassenverteilung der carboxymethylierten und nativen Polysaccharide.

Eintrag	Polysaccharid	$M_n / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	D
1	D250 kDa	52.475 ± 595	221.450 ± 27.450	4.2 ± 0.6
2	D250 kDa CM1	92.370 ± 1.540	254.900 ± 3.800	2.7 ± 0.1
3	D250 kDa CM2	81.145 ± 2.115	308.800 ± 7.300	4.1 ± 1.2
4	D250 kDa CM3	69.060 ± 1.010	268.850 ± 850	3.9 ± 0.1
5	D500 kDa	33.080 ± 860	254.750 ± 3.050	7.7 ± 0.1
6	D500 kDa CM1	63.315 ± 55	348.850 ± 4.450	5.5 ± 0.1
7	D500 kDa CM2	79.465 ± 1.355	477.000 ± 28.600	6.0 ± 0.3
8	D500 kDa CM3	97.770 ± 100	687.300 ± 16.100	7.0 ± 0.2
9	Pullulan	111.450 ± 3.550	289.950 ± 2.650	2.6 ± 0.1
10	Pullulan CM1	118.700 ± 2.140	187.400 ± 1.870	1.6 ± 0.0
11	Pullulan CM2	325.300 ± 114.400	544.600 ± 12.420	1.8 ± 0.2
12	Pullulan CM3	211.350 ± 64.350	422.500 ± 15.178	2.0 ± 0.1
13	Lentinan	4.062 ± 40	7.897 ± 86	1.9 ± 0.0
14	Lentinan CM1	8.110 ± 1	14.580 ± 46	1.8 ± 0.0
15	Lentinan CM2	10.210 ± 130	17.730 ± 10	1.7 ± 0.0
16	Lentinan CM3	10.720 ± 250	16.540 ± 76	1.5 ± 0.0
17	Lentinan CM4	10.620 ± 50	17.145 ± 35	1.6 ± 0.0
18	Lentinan CM5	9.699 ± 128	15.370 ± 180	1.6 ± 0.0

Alle diese Charakterisierungsmethoden ließen keine quantitative Aussage über den Derivatisierungsgrad der carboxymethylierten Polysaccharide treffen. Aus vorangegangenen Arbeiten stellte sich eine volumetrische Methode von STOJANOVIĆ *et al.* als geeignetes Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Substitutionsgrades heraus.^[73] Hierfür wurden die modifizierten Polysaccharide durch Zugabe von HCl (6 M) in ihre protonierte Form überführt. Anschließend wurde eine analytische Menge des jeweiligen Derivats mit einem Überschuss an NaOH (0.2 M) versetzt und die überschüssige NaOH wurde durch Titration mit HCl (0.1 M) zurücktitriert. Der Derivatisierungsgrad (DS) wurde mit Hilfe der Formel 3.1 und Formel 3.2 bestimmt.

$$DS = \frac{M_{ME} \cdot n_{COOH}}{m - 58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot n_{COOH}} \quad \text{Formel 3.1}$$

$$n_{COOH} = (V_b - V) \cdot 4c_{HCl} \quad \text{Formel 3.2}$$

Die Variable M_{ME} beschreibt die molare Masse der monomeren Einheit, n_{COOH} die Stoffmenge der Carboxylgruppen und m die eingesetzte Probenmenge in g. Der Faktor $58 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ beschreibt die Massenzunahme der monomeren Einheit pro substituierte Carboxymethylgruppe. Das verbrauchte Volumen der Blindprobe wird durch die Variable V_b ausgedrückt und der Verbrauch an HCl für die untersuchten Proben wird als V bezeichnet. Der Faktor 4 ist das Verhältnis vom Gesamtvolumen zum untersuchten Aliquoten und wird mit der Konzentration der verwendeten HCl c_{HCl} multipliziert. In Abbildung 3.7 sind die ermittelten Derivatisierungsgrade der carboxymethylierten Polysaccharide aufgezeigt.

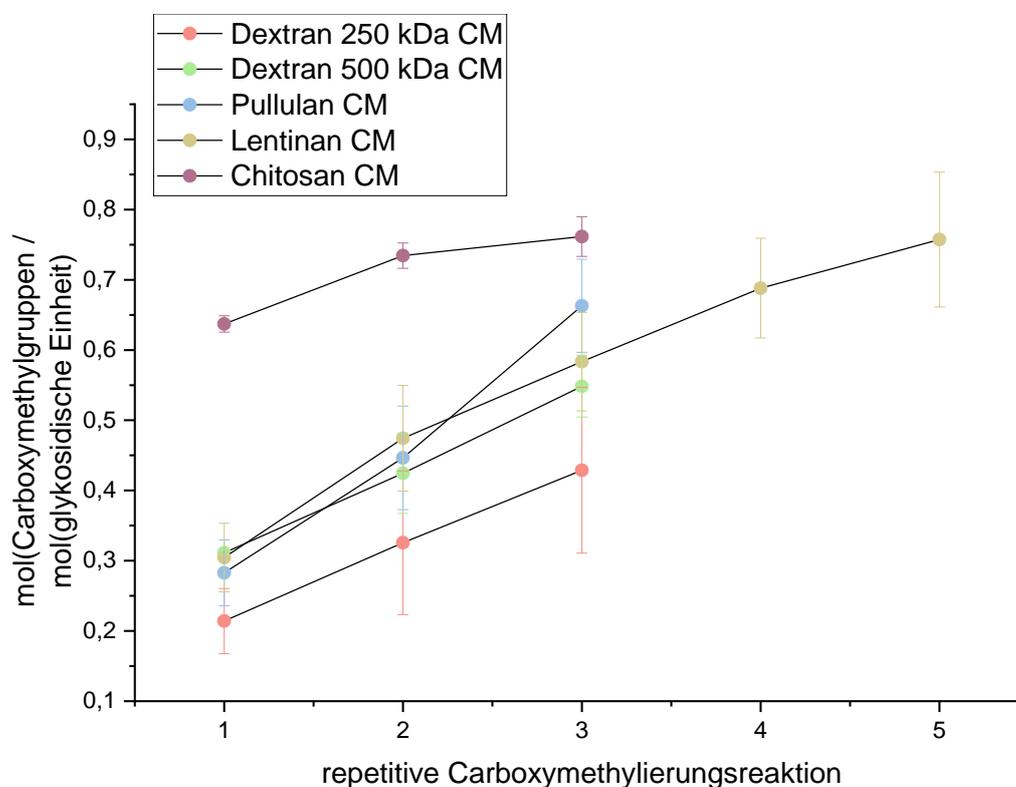


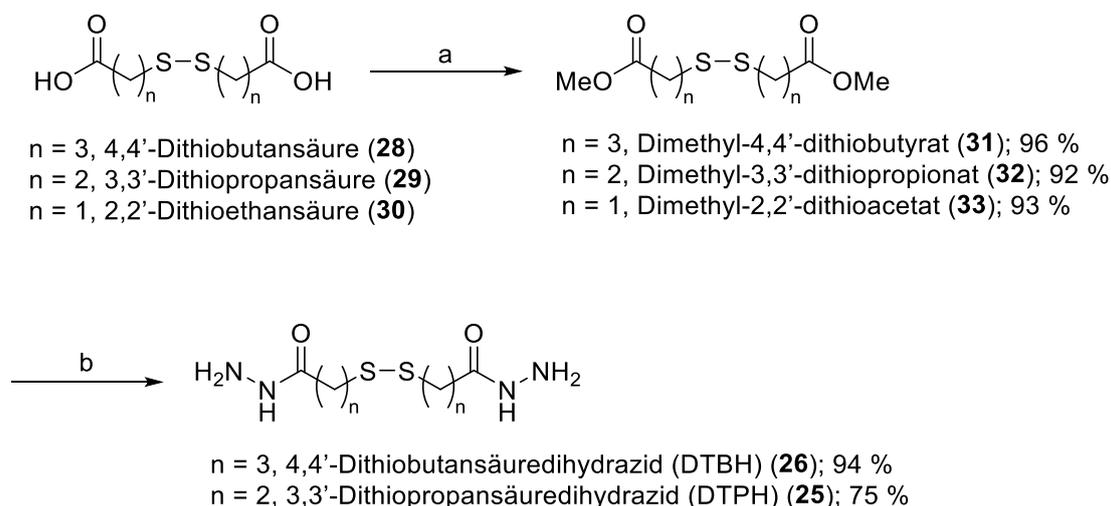
Abbildung 3.7: Volumetrische Bestimmung des Derivatisierungsgrads von Dextran 250 kDa CM (21), Dextran 500 kDa CM (21), Pullulan CM (22), Lentinan CM (23) sowie Chitosan (24) in Abhängigkeit der repetitiven Carboxymethylierungsreaktionen ($n = 3$).

Es ist zu erkennen, dass mit jeder Carboxymethylierungsreaktion der Derivatisierungsgrad der Polysaccharide anstieg. Zudem wurde in vorangegangenen Arbeiten von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* gezeigt, dass sich der Derivatisierungsgrad dem Wert 1 annähert.^[63,74] Dies bedeutet, dass pro glykosidische Einheit eine Carboxymethylgruppe eingeführt wurde. Bei Lentinan (11) und Chitosan (12) erfolgt die Substitution bevorzugt an der C6-Position des Polysaccharids. Da diese Position bei Dextran (9) und Pullulan (9) durch die glykosidische

Bindung bereits besetzt ist, erfolgt hier die Substitution bevorzugt an der C3-Position. Mehrfache Substitutionen sind durch sterische Hinderung erschwert.^[75]

3.1.2 Synthese der Thiol-Michael-Donatorkomponenten

Die carboxymethylierten Polysaccharide sollten über Dithiobiscarbonsäuredihydrazid-Linker funktionalisiert werden. Aus vorangegangenen Arbeiten von Samhita Banerjee wurden einige Polysaccharide bereits erfolgreich mit dem Linker Dithiopropansäuredihydrazid (DTPH) (**25**) modifiziert.^[69] Um das Verhalten der Kettenlänge der verwendeten Linker zu untersuchen, sollten zwei weitere Linker hergestellt werden. Dabei handelte es sich um Dithiobutansäuredihydrazid (DTBH) (**26**) sowie Dithioethansäuredihydrazid (DTEH) (**27**). Verwendet wurde das Protokoll von SHU *et al.*^[76] In Schema 3.3 ist die Synthese der Linker gezeigt.



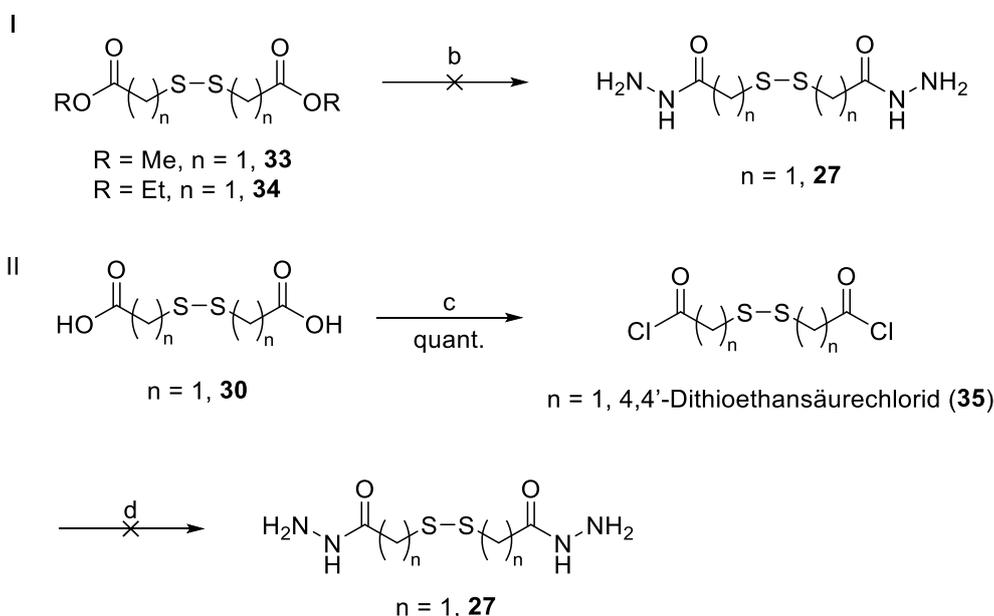
Schema 3.3: Synthese der Linker DTBH (**26**), DTPH (**25**) sowie DTEH (**27**). Reaktionsbedingungen: a) MeOH, H₂SO₄, Δ, 3 h, b) MeOH, N₂H₄·H₂O, RT, 15 h.

Im ersten Schritt wurden die Dicarbonsäuren **28**, **29** und **30** in ihre korrespondierenden Dimethylester **31**, **32** sowie **33** durch Reaktion mit Methanol und H₂SO₄ (cat.) überführt. Dies geschah in einer sehr guten Ausbeute von 93 - 96 %. Anschließend erfolgte die Umesterung in Methanol unter Zugabe von Hydrazinmonohydrat.^[77] Dies lieferte die Linker DTBH (**26**) mit einer sehr guten Ausbeute von 94 % und den Linker DTPH (**25**) mit einer guten Ausbeute von 75 %. Die Synthese von DTEH (**27**) war unter diesen Bedingungen nicht erfolgreich. In Schema 3.4 sind die untersuchten Syntheserouten von DTEH (**27**) gezeigt. Die Synthese von Verbindung **27** sollte durch Variation der Reaktionsbedingungen versucht werden (Schema 3.4, Fall I). Die Bedingungen sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Untersuchte Reaktionsbedingungen zur Synthese von DTEH (**27**).

Eintrag	Edukt	Reaktionsbedingungen b	Ergebnis
1	R = Me, 33	MeOH, N ₂ H ₄ ·H ₂ O, Δ, 15 h	Zersetzung
2	R = Me, 33	MeOH, N ₂ H ₄ ·H ₂ O, Δ, 1 h	Zersetzung
3	R = Me, 33	MeOH, N ₂ H ₄ ·H ₂ O, 40 °C, 15 h	Zersetzung
4	R = Et, 34	EtOH, N ₂ H ₄ ·H ₂ O, RT, 15 h	Zersetzung
5	R = Et, 34	EtOH, N ₂ H ₄ ·H ₂ O, Δ, 15 h	Zersetzung

Unter keinen der oben gezeigten Bedingungen konnte das gewünschte Produkt synthetisiert werden. Es zeigte sich bei allen Versuchen eine Zersetzung zu einem weder in organischen Lösungsmitteln, in Wasser oder unter sauren bzw. basischen Bedingungen lösliches Produkt, weswegen keine NMR-spektroskopische Untersuchung durchgeführt wurden.

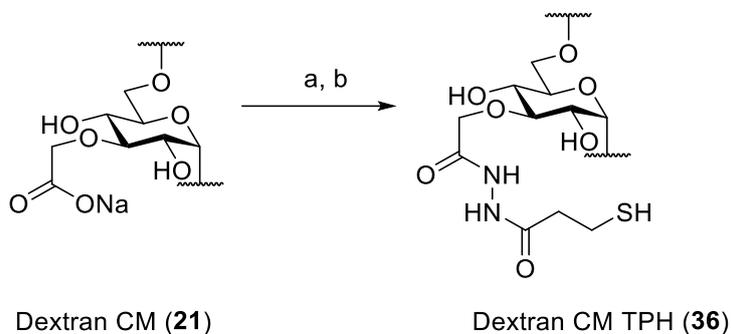


Schema 3.4: Unterschiedliche Ansätze zur Synthese von DTEH (**27**), Reaktionsbedingungen: b) siehe Tabelle 3.2, c) CH₂Cl₂, SOCl₂, *N,N*-Dimethylformamid, RT, 0.5 h, d) Et₃N, N₂H₄·H₂O, 0 °C bis RT, 15 h.

Als nächstes wurde versucht die Dithiobiscarbonsäure **30** in ihr korrespondierendes Säurechlorid **35** zu überführen, was in quantitativer Ausbeute erfolgte.^[78] Anschließend wurde die Kupplung des Hydrazins mit Hilfe von Triethylamin versucht. Auch diese Bedingungen führten zur Zersetzung des Startmaterials und es konnte nicht das gewünschte Produkt **27** isoliert werden. Da parallellaufende Versuche gezeigt haben, dass die Kupplung des DTPHs (**25**) und DTBHs (**26**) an den Polysacchariden optimiert werden mussten, wurde die Synthese des dritten Linkers hier gestoppt.

Die hergestellten Linker **25** und **26** sollten im nächsten Schritt an die Polysaccharide gekoppelt werden. Hierfür wurden die Standardkopplungsbedingungen zur Synthese von Hydrazid-

modifizierten Polysacchariden nach dem Protokoll von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* verwenden.^[63] Diese wurden ebenfalls in Vorarbeiten von Samhita Banerjee verwendet.^[69] Das Reaktionsschema zur Synthese von TPH-modifiziertem Dextran (**36**) ist in Schema 3.5 gezeigt.



Schema 3.5: Synthese von Dextran CM TPH (**36**). Reaktionsbedingungen: a) H₂O, EDC·HCl, HOBT·H₂O, DIPEA, DTPH (**25**), RT, 15 h, b) pH 7, DTT, pH 8.5, RT, 15 h.

Die Reaktion verlief in zwei Schritten. Im Ersten erfolgte die Addition des DTPH-Linkers (**25**) unter Carbodiimid-Kopplung, gefolgt von der Reduktion des Disulfids mittels Dithiotreitol (DTT). Dieser Syntheseweg lieferte jedoch nicht zuverlässig die Thiol-modifizierten Polysaccharide, da es immer wieder zur Disulfidbildung kam. Diese formten sich wahrscheinlich während der Dialyse. Deswegen wurden in den ersten Versuchen unterschiedliche Methoden zur Reinigung untersucht. In Tabelle 3.3 sind die untersuchten Reinigungsmethoden gezeigt.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der getesteten Reinigungsmethoden.

Eintrag	Reinigung	Ergebnis
1	Dialyse	Disulfide
	1. Tag: H ₂ O, NaCl (20 g·L ⁻¹), pH 3.5 2. Tag: H ₂ O, pH 3.5	
2	Dialyse	Disulfide
	1. Tag: H ₂ O (N ₂ -gesättigt), NaCl (20 g·L ⁻¹), pH 3.5 2. Tag: H ₂ O (N ₂ -gesättigt)	
3	Ultrafiltration 1.5 h	Thiole, Kupplungsreagenzien
4	Ultrafiltration 3.5 h	Disulfide

In Eintrag 1 wurde für einen Tag gegen wässrige NaCl-Lösung (20 g·L⁻¹) bei pH 3 dialysiert und anschließend gegen H₂O (pH 3). Diese Aufarbeitung führte immer wieder zu Disulfiden. Um auszuschließen, dass der im Wasser gelöste Sauerstoff für die Oxidation der Thiole

verantwortlich war, wurde in Eintrag 2 das Dialysemedium vor der Verwendung für 3 h mit Stickstoff gesättigt. Auch dies führte nicht zur reproduzierbaren Synthese der freien Thiole. In Abbildung 3.8 ist das ^1H NMR-Spektrum von Dextran CM2 TPH (**36**) im Vergleich zu einem modifiziertem carboxymethyliertem Dextran gezeigt, das über Disulfide verknüpft ist.

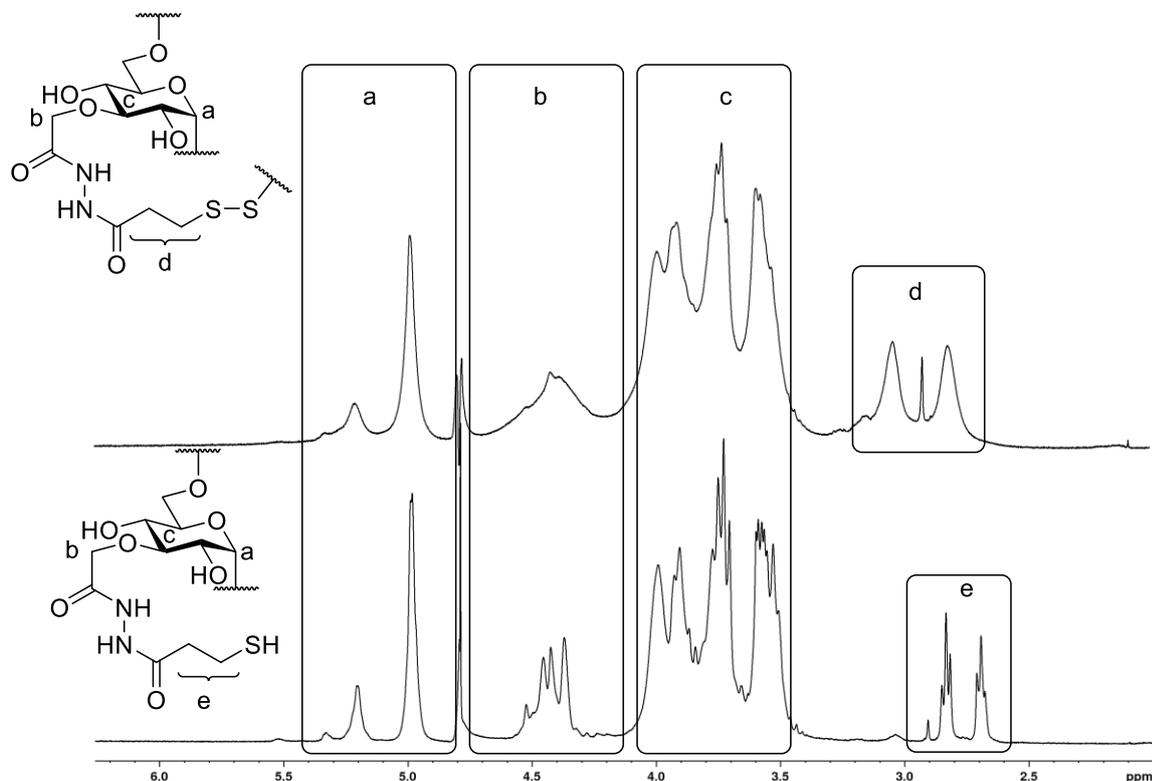
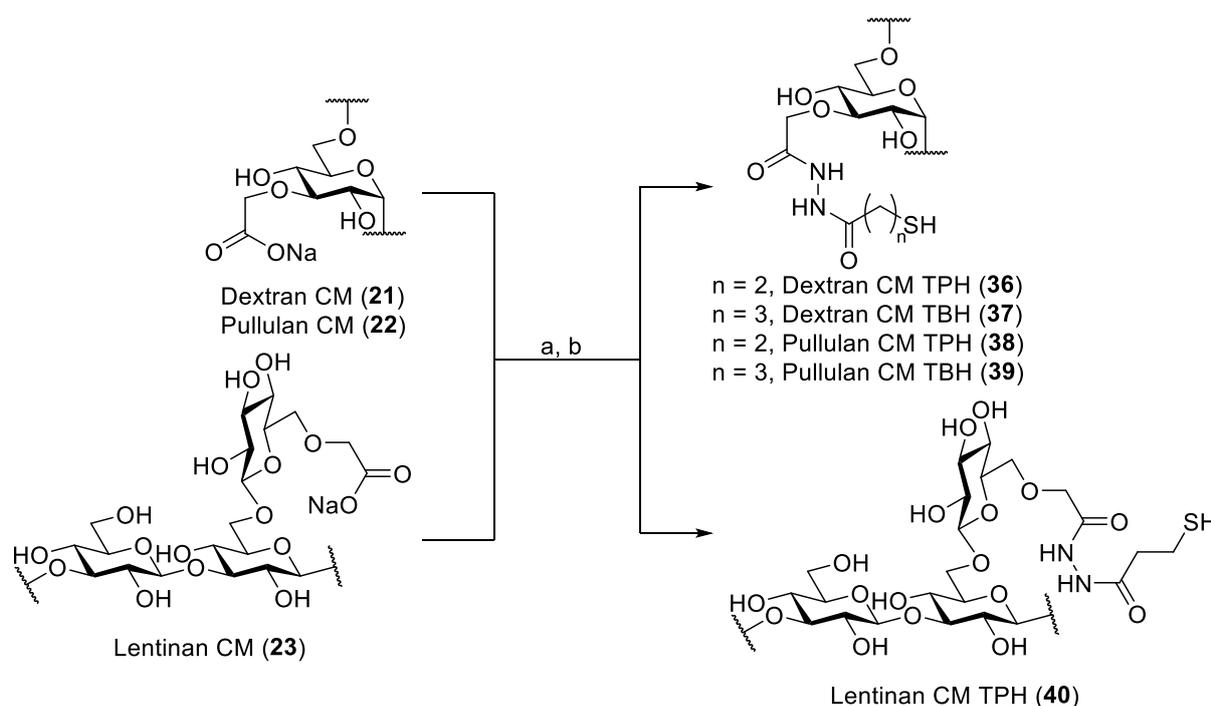


Abbildung 3.8: ^1H NMR-Spektrum von Dextran 250 kDa CM2 TPH (**36**) und dessen korrespondierendem Disulfid in D_2O . a) Region der anomeren Protonen, b) eingebrachter, modifizierter CH_2 -Rest der Carboxymethylgruppe, c) glycosidisches Gerüst, d) Protonen der Methylengruppe des Disulfids, e) Protonen der Methylengruppe des freien Thiols.

Um die Zeit, die zur Aufreinigung benötigt wird zu verkürzen, wurden in Eintrag 3 und 4 die Reaktionslösungen mit Hilfe der Ultrafiltration gereinigt. Nach 1.5 h wurden freie Thiole erhalten, jedoch waren im ^1H NMR-Spektrum deutliche Verunreinigungen durch die Kupplungsreagenzien zu erkennen. Aus diesem Grund wurde die Filtrationszeit im nächsten Versuch auf 3.5 h erhöht. Dies führte jedoch wieder zur Bildung von Disulfiden. Erst eine Modifizierung der Kupplungsbedingungen führte zur reproduzierbaren Synthese von Dextran CM TPH (**36**). Die Darstellung ist in Schema 3.6 gezeigt.



Schema 3.6: Darstellung von TPH und TBH modifiziertem carboxymethyliertem Dextran (**36**, **37**), Pullulan (**38**, **39**) und Lentinan (**40**). Zur Vereinfachung ist hier die Modifizierung einer Hydroxygruppe gezeigt. Reaktionsbedingungen: a) H₂O, MES, EDC·HCl, HOBT·H₂O, DTPH, RT, 15 h, b) pH 7, DTT, pH 8.5, RT, 15 h.

Die in Schema 3.6 gezeigten Reaktionsbedingungen wurden nun zur Modifizierung der carboxymethylierten Polysaccharide aus Kapitel 3.1.1 verwendet. 2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) ist bekannt dafür, dass der pH-Wert während Peptidkupplungen bei einem Wert von 6.5 gehalten wird.^[79] Es zeigte sich, dass die verwendeten Äquivalenten von DTPH (**25**) für jedes Polysaccharid optimiert werden mussten, da bei zu hohen Äquivalenten die Bildung von Disulfiden zwischen den Polymersträngen begünstigt wurden und die Polysaccharide dadurch nicht mehr löslich waren. Die verwendeten Äquivalente zur Herstellung von Dextran CM TPH / TBH (**36**, **37**), Pullulan CM TPH / TBH (**38**, **39**) sowie Lentinan CM TPH (**40**) sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Eingesetzte Äquivalente an DTPH (**25**) und DTBH (**26**) zur Thiol-Modifizierung der Polysaccharide.

Eintrag	Polysaccharid	Äq.(DTPH / DTBH)
1	Dextran 250/500 kDa CM	0.5
2	Pullulan	0.3
3	Lentinan	1.0

Die so synthetisierten TPH-Derivate wurden IR- und ¹H NMR-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 3.9 ist das IR-Spektrum von Dextran 250 kDa CM2 TPH (**36**) im Vergleich zu Dextran 250 kDa CM2 (**21**) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Carbonylvalenzschwingung vom Carboxylat, die beim carboxymethylierten Derivat bei 1.600 cm⁻¹ liegt, bei der TPH-

modifizierten Komponente in einem höheren Bereich von 1.650 cm^{-1} bis 1.700 cm^{-1} verschoben wurde. In diesem Bereich liegen die Amidvalenzschwingungen, woraus auf eine erfolgreiche Modifizierung geschlossen werden konnte.

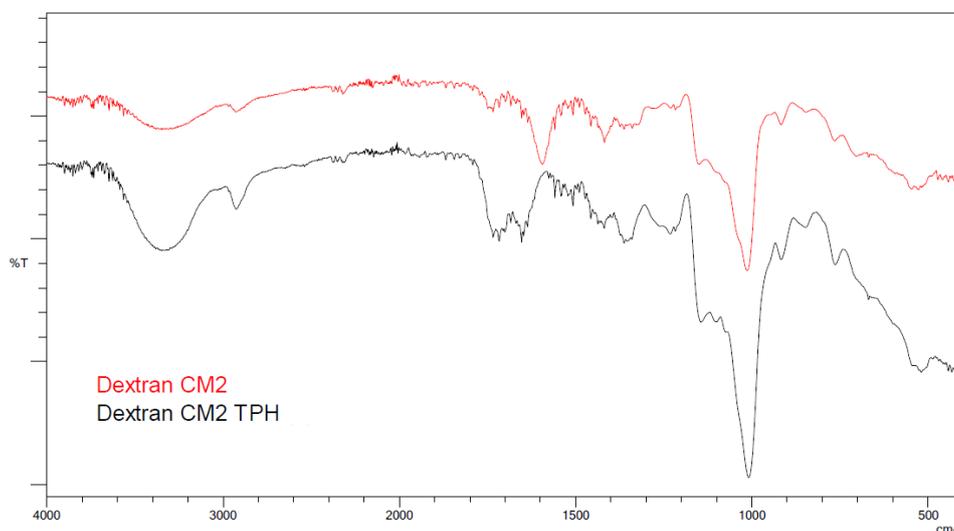


Abbildung 3.9: IR-Spektrum von Dextran 250 kDa CM2 TPH (**36**) im Vergleich zu Dextran 250 kDa CM2 (**21**).

In Abbildung 3.10 sind die ^1H NMR-Spektren der TPH-modifizierten Polysaccharide im Vergleich zu ihren Carboxymethylderivaten gezeigt.

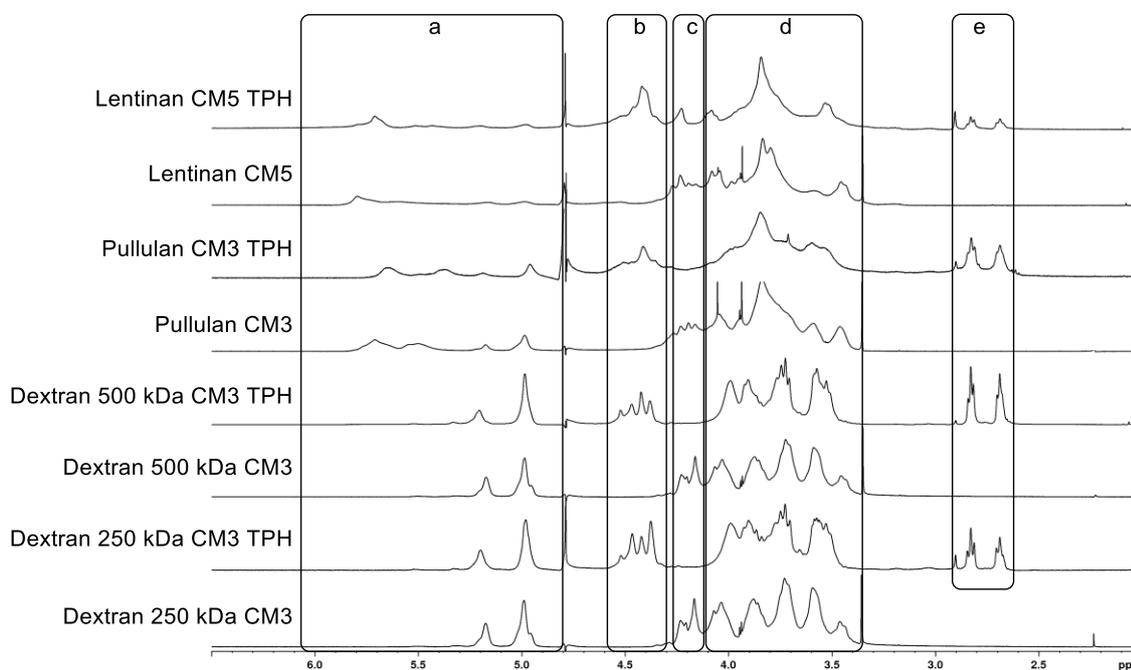
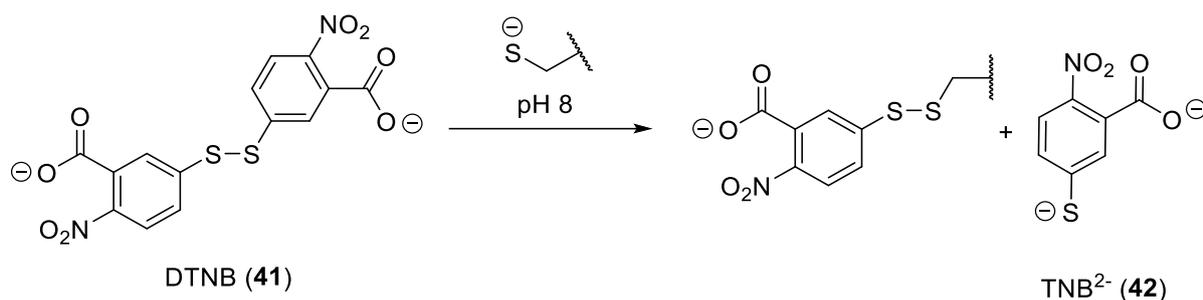


Abbildung 3.10: Vergleich der ^1H NMR-Spektren der TPH-Modifizierten Polysaccharide im Vergleich mit den korrespondierenden nativen Polysaccharide in D_2O . a) Region der anomeren Protonen, b) CH_2 -Rest der modifizierten Carboxymethylgruppe, c) CH_2 -Rest der nicht-modifizierten Carboxymethylgruppe d) Protonen des glycosidischen Gerüsts und e) Protonen der Methylengruppe des freien Thiols.

Es ist zu erkennen, dass bei allen TPH-modifizierten Polysacchariden das Signal der Methylengruppe des Carboxymethylrests tieffeldverschoben von 4.18 zu 4.38 ppm ist. Des Weiteren zeigen die im Bereich von 2.85 bis 2.66 ppm die Signale der Methylengruppe des TPH-Linkers, sodass eine erfolgreiche Kopplung stattgefunden hat. Auch hier konnte aufgrund der Signalverbreiterung keine quantitative Aussage über die erfolgte Derivatisierung getroffen werden. Um den Derivatisierungsgrad zu bestimmen, wurde auf eine photometrische Methode zurückgegriffen. Die Quantifizierung der reaktiven Thiole in den Polysacchariden erfolgte über den Ellman's-Assay.^[80] Die zugrunde liegende Reaktion des Assays ist in Schema 3.7 gezeigt.



Schema 3.7: Schematischer Ablauf des Ellman's-Assay.

Die zu quantifizierenden Thiolate reduzieren die 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (41) (DTNB) zum korrespondierenden Thionitrobenzoat (42), welches eine kräftige gelbe Farbe besitzt.^[80] Da die Freisetzung der Verbindung 42 proportional zur Menge an Thiolaten verläuft, eignete sich diese Methode um den Derivatisierungsgrad der TPH- und TBH-modifizierten Polysaccharide zu quantifizieren. Der Verlauf der Derivatisierungsgrade von Thiol-modifiziertem Dextran (36, 37) sowie Pullulan (38) ist in Abbildung 3.11 zu sehen.

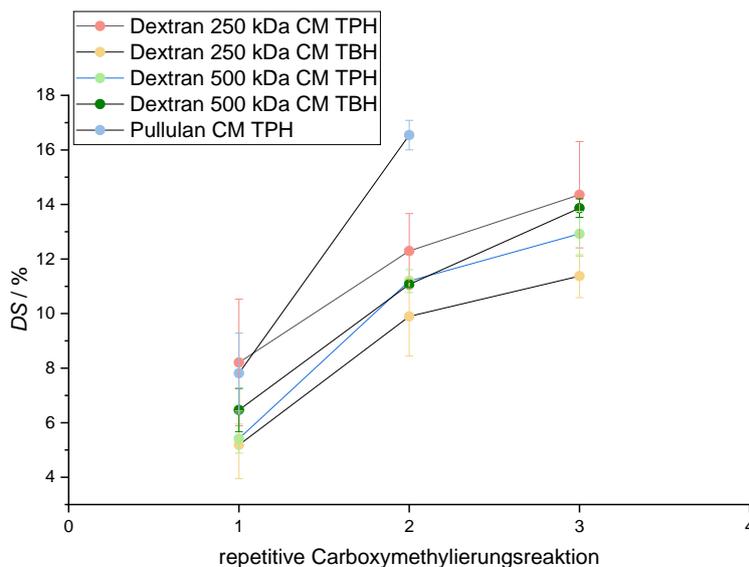


Abbildung 3.11: Verlauf der Derivatisierungsgrade TPH- und TBH-modifizierter Dextrane (36, 37) und TPH-modifiziertem Pullulan (38) in Abhängigkeit der repetitiven Carboxymethylierungsreaktion (n = 3).

Es war für alle Polysaccharide ein deutlicher Anstieg des Derivatisierungsgrades mit zunehmender Carboxymethylierungsreaktion zu erkennen. Der Derivatisierungsgrad von Pullulan CM TPH (**38**) zeigte die stärkste Zunahme (von 7.8 ± 1.5 auf 16.5 ± 0.5 %). Eine Modifizierung von Pullulan CM3 führte zu einem unlöslichen Polymer, weswegen Pullulan (**10**) lediglich bis zur zweiten Carboxymethylierungsstufe derivatisiert wurde. Eine Modifizierung von carboxymethylierten Pullulan (**22**) mit DTBH (**26**) führte ebenfalls zu unlöslichen Polymeren. Dies ist auf eine Überfunktionalisierung kombiniert mit sterischen Aspekten zurückzuführen, die zu einer Vernetzung der Polymerstränge untereinander führte. Verhindert werden konnte dies durch die Zugabe einer kleinen Menge an Reduktionsmitteln wie DTT oder Tris-(2-carboxymethyl)-phosphin (TCEP). Allerdings würde DTT mit seinen beiden ebenfalls enthaltenen Thiolen als Vernetzer bei der Herstellung von Hydrogelen mit Vinylsulfon- oder Maleinimid-modifizierten Polysacchariden fungieren.^[81] Auch TCEP reagiert mit Vinylsulfonen und Maleinimiden, wodurch es zu einer Oxidation der Akzeptorkomponenten kommt und eine Hydrogelbildung anschließend nicht mehr möglich wäre.^[82]

Für die TPH-Modifizierung von Lentinan (**11**) wurden zunächst unterschiedliche Äquivalente an DTPH (**25**) eingesetzt. Ziel war es eine Modifizierung zu erhalten, die hoch genug ist um aus Lentinan CM TPH (**40**) eine geeignete Donatorkomponente zur Darstellung von Hydrogelen zu synthetisieren. In Abbildung 3.12 ist der Verlauf der Derivatisierungsgrade von TPH-modifiziertem Lentinan CM (**40**) in Abhängigkeit der Carboxymethylierungsstufe für verschiedene eingesetzte Äquivalente an DTPH (**25**) gezeigt. Es war zu erkennen, dass die Derivatisierungsgrade aller drei untersuchten Äquivalente den gleichen Verlauf hatten. Sie nahmen bis zur dritten Carboxymethylierungsstufe zu und sanken anschließend wieder. Somit lag der höchste Derivatisierungsgrad, der gemessen wurde bei ca. 13 % für Lentinan CM3 TPH (**40**) mit einem eingesetzten Äquivalent DTPH (**25**). Es ist hierbei zu bemerken, dass durch den Ellman's-Assay lediglich die freien Thiole detektiert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich Disulfide gebildet haben, was sich in einer Verringerung des Derivatisierungsgrades äußern würde. In späteren Gelierversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen konnten keine Hydrogele aus TPH-modifiziertem Lentinan (**40**) generiert werden (siehe Abschnitt 3.2).

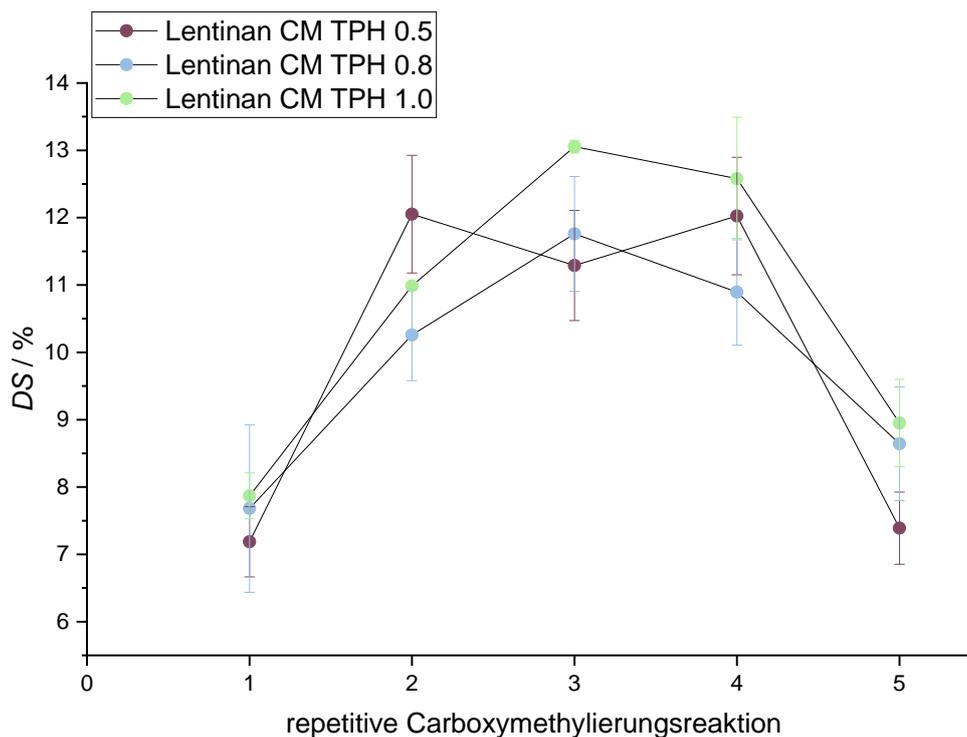
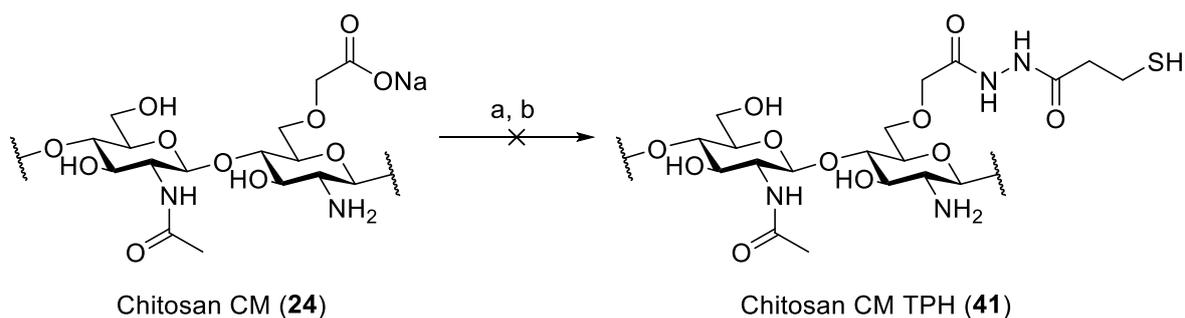


Abbildung 3.12: Verlauf der Derivatisierungsgrade von TPH-modifiziertem Lentinan (**40**) mit unterschiedlich eingesetzter Äquivalenten von DTPH (**25**) in Abhängigkeit der repetitiven Carboxymethylierungsreaktion ($n = 3$).

Die TPH-Modifizierung von carboxymethyliertem Chitosan (**24**) wurde ebenfalls untersucht. In Schema 3.8 ist das Reaktionsschema zu sehen. Die dazugehörigen Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen. Eintrag 1 zeigt die Reaktionsbedingungen, die auch für die Modifizierung von Dextran CM (**21**), Pullulan CM (**22**) sowie Lentinan CM (**23**) verwendet wurden.



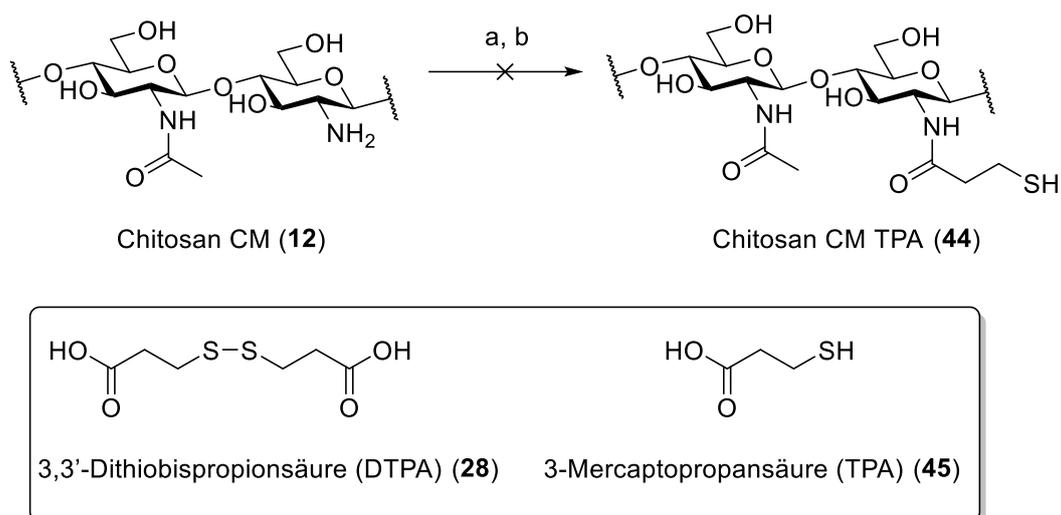
Schema 3.8: Darstellung von TPH-modifiziertem Chitosan (**43**). Bedingungen: siehe Tabelle 3.5.

Während der EDC-Kupplungsbedingungen mit Hilfe von MES kam es zur Bildung eines Präzipitats, das sich während der Reduktion mit DTT wieder auflöste. Jedoch bildete sich während der Dialyse ebenfalls ein Präzipitat. Dieses wurde mittels ^1H NMR-Spektroskopie untersucht, wobei sich herausstellte, dass es sich um das eingesetzte carboxymethylierte Chitosan **24** handelte.

Tabelle 3.5: Untersuchte Reaktionsbedingungen zur TPH-Modifizierung von carboxymethyliertem Chitosan (**24**).

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	a) H ₂ O, MES, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O, DTPH, RT, 15 h	Präzipitation während Schritt a, Auflösen des Präzipitats während Schritt b; Präzipitat während Dialyse.
	b) pH 7, DTT, pH 8.5, RT, 15 h	Schwer lösliches Polymer, NMR zeigte ausschließlich Startmaterial 24
2	a) H ₂ O, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O, DIPEA, DTPH, RT, 15 h	Präzipitation während Schritt a; Auflösen des Präzipitats während Schritt b; Präzipitat während Dialyse.
	b) pH 7, DTT, pH 8.5, RT, 15 h	Schwer lösliches Polymer, NMR zeigte ausschließlich Startmaterial 24

In Eintrag 2 sind die Bedingungen mit Hilfe von DIPEA zu sehen.^[69] Auch hier zeigte sich das gleiche Verhalten wie in Eintrag 1. Bei den getesteten Bedingungen spielte es keine Rolle welcher Carboxymethylierungsgrad das eingesetzte Chitosan (**24**) besaß. So führte die Reaktion mit Chitosan CM3 (**24**) ebenso zur Präzipitation wie die Reaktion mit Chitosan CM1 (**24**). Zurückzuführen ist dieses Verhalten auf die freien Aminogruppen des Chitosans (**12**). Diese sorgen im nativen Polymer durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in neutralem bzw. basischem Milieu dafür, dass es sich, je nach Deacylierungsgrad, nur unter sauren wässrigen Bedingungen (pH < 6.5) löst.^[83] Carboxymethyliertes Chitosan (**24**) löst sich durch die eingebrachten Carboxylgruppen ($pK_a \approx 4.3$) auch unter neutralen Bedingungen.^[84] Allerdings führen die simultan vorliegenden Aminogruppen dazu, dass das carboxymethylierte Chitosan, nahe des isoelektrischen Punkts (pH ≈ 5.5) präzipitiert.^[84] Dies erklärt nun auch die Präzipitation in den Reaktionsschritten a von Eintrag 1 und 2. Hier liegt der pH-Wert bei ca. 5.9. Im Reaktionsschritt b wurde der pH-Wert für die Reduktion auf pH 8.5 erhöht. Dadurch wurde das Polymer wieder in Lösung gebracht, um dann während der Dialyse, die bei einem pH-Wert von 3.5 durchgeführt wurde, zu präzipitieren. Um dieses Verhalten des carboxymethylierten Chitosans (**24**) zu umgehen, wurde versucht, natives Chitosan durch *N*-Substitution in das korrespondierende Thiol-modifizierte Derivat zu überführen.^[85] Die Reaktion ist in Schema 3.9 gezeigt.



Schema 3.9: Darstellung von TPA-modifiziertem Chitosan (**44**). Reaktionsbedingungen: siehe Tabelle 3.6.

Die untersuchten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.6 gezeigt. Eintrag 1 zeigt die bereits für die Modifizierung von Dextran (**21**), Pullulan (**22**) und Lentinan (**23**) etablierte Methode zur Thiol-Modifizierung. Hier wurde jedoch die korrespondierende 3,3'-Dithiobispropionsäure (DTPA) (**28**) anstatt des DTPH (**25**) verwendet. Bei der Reduktion kam es hier zur Präzipitation, was durch den hohen pH-Wert und der Unlöslichkeit von Chitosan (**12**) bei hohen pH-Werten hervorgerufen wurde. Es fand in diesem Schritt keine Modifizierung statt. Es konnte lediglich das eingesetzte Startmaterial isoliert werden. Im Eintrag 2 erfolgte die Kupplung analog zum Eintrag 1. Jedoch wurde hier die Reduktion mit TCEP durchgeführt, um eine Präzipitation während der Reduktion zu vermeiden, da diese unter leicht sauren Bedingungen durchgeführt werden konnte. Auch hier konnte lediglich das Startmaterial zurückgewonnen werden. In Eintrag 3 wurde auf die Methode von ESMAEILZADEH *et al.* zurückgegriffen.^[86] Hierfür wurde Chitosan (**12**) in Wasser bei einem pH Wert von 4.8 gelöst (eingestellt mit HCl 1 M). Anschließend wurden EDC-HCl und DTPA (**28**) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde für 4 h bei 4.8 gehalten. Im Anschluss daran erfolgte die Reduktion mit TCEP. Auch diese Reaktion lieferte nur unmodifiziertes Chitosan (**12**).

Tabelle 3.6: Untersuchte Reaktionsbedingungen zur *N*-TPH-Modifizierung von Chitosan (**12**).

Eintrag	Reaktionsbedingungen	Ergebnis
1	a) H ₂ O, MES, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O, 28 , RT, 15 h b) pH 7.5, DTT, pH 8.5, RT, 15 h	Präzipitation während Schritt b; Startmaterial 12
2	a) H ₂ O, MES, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O, 28 , RT, 15 h b) TCEP, RT, 1 h	Keine Umsetzung; Startmaterial 12
3	a) H ₂ O, HCl (1 M), EDC·HCl, 28 , pH 4.8, RT, 4 h b) TCEP, RT, 1 h	Keine Umsetzung; Startmaterial 12
4	a) DMF, EDC·HCl, NHS, 45 , RT, 15 h b) H ₂ O, Chitosan, RT, 15 h	Keine Umsetzung; Startmaterial 12
5	H ₂ O, EDC·HCl, 45 , Dioxan, pH 5, RT, 48 h	Keine Umsetzung; Startmaterial 12
6	a) EDC·HCl, NHS, H ₂ O, 45 , H ₂ O, 1 h b) Chitosan, PBS, RT, 6 h	Keine Umsetzung; Startmaterial 12

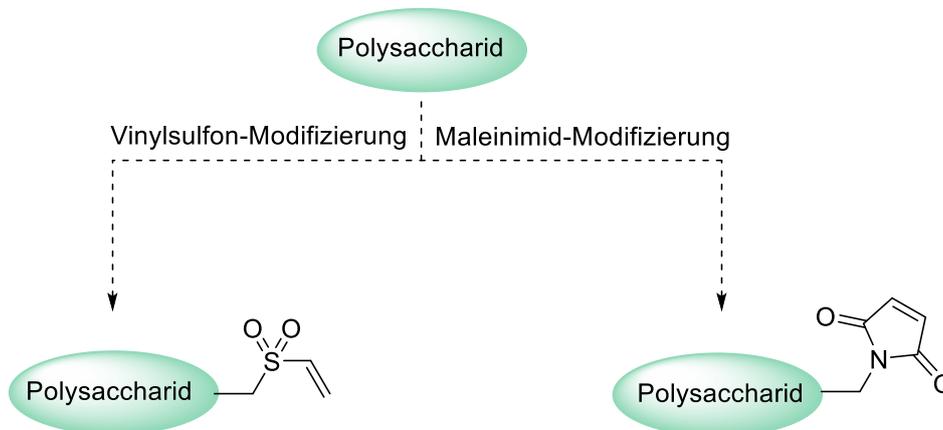
Da die Kupplung des Dimers **28** nicht erfolgreich war, wurde in Eintrag 4 die Substitution von 3-Mercaptopropansäure (TPA) (**45**) versucht. Hierfür wurde die Methode von ZHU *et al.* für die Synthese von thiolierem Chitosan (**44**) verwendet.^[87] Hierfür sollte im ersten Schritt TPA (**45**) in seine Aktivesterform durch Reaktion mit EDC·HCl und HOBt·H₂O gebracht werden. Anschließend wurde die Lösung zu in Wasser gelöstem Chitosan (**12**) (pH 5) gegeben und für 15 h gerührt. Auch unter diesen Bedingungen fand keine Umsetzung des Chitosans (**12**) statt. In Eintrag 5 wurden schließlich die Bedingungen von MILLOTI *et al.* angewandt.^[88] Dazu wurde dem bei pH 5 gelösten Chitosan (**12**) EDC·HCl sowie die in Dioxan gelöste Verbindung **45** zugegeben und für 48 h bei pH 5.0 gerührt. Auch dieser Versuch lieferte unmodifiziertes Chitosan (**12**). In Eintrag 6 sind die Reaktionsbedingungen nach KO *et al.* gezeigt.^[89] Hier wurde Verbindung **45** zusammen mit EDC·HCl und NHS gelöst und anschließend zu einer Lösung aus Chitosan (**12**) in PBS (pH 7.4) gegeben. Auch unter diesen Bedingungen konnte lediglich Chitosan (**12**) isoliert werden.

Aufgrund der bisher aufgetretenen Schwierigkeiten wurde an dieser Stelle die Thiol-Modifizierung von Chitosan (**12**) abgebrochen.

3.1.3 Synthese der Thiol-Michael-Akzeptorkomponenten

Als Thiol-Michael-Akzeptorkomponenten wurden zwei Systeme ausgewählt, die in Schema 3.10 gezeigt sind. Zum einen handelte es sich um Vinylsulfon-modifizierte Polysaccharide und

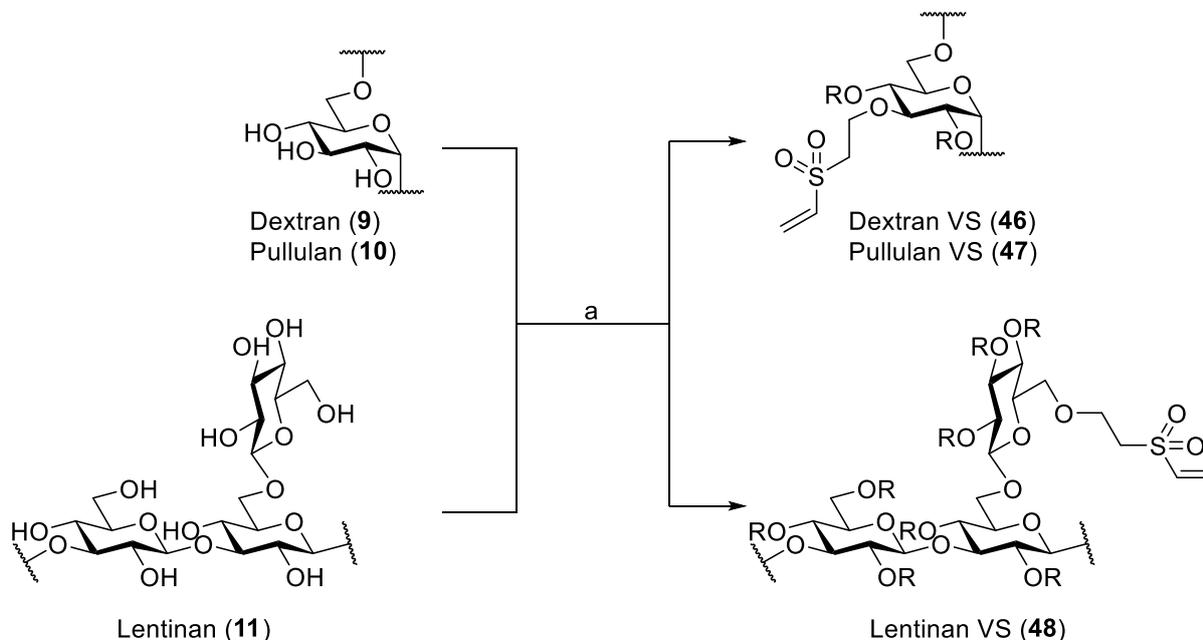
zum anderen um die bereits in Vorarbeiten von Samhita Banerjee untersuchten Maleinimid-modifizierten Polysaccharide.^[69]



Schema 3.10: Schematische Darstellung der Michael-Akzeptor-Komponenten.

3.1.3.1 Vinylsulfon-Modifizierung der Polysaccharide

Die Vinylsulfon-Modifizierung der ausgewählten Polysaccharide erfolgte nach dem Protokoll von YU *et al.*^[81] Hierfür wurde das jeweilige native Polysaccharid **9**, **10** und **11** in wässriger NaOH (0.1 M) gelöst, mit Divinylsulfon (DVS) versetzt und die Reaktion nach einer definierten Reaktionszeit durch Absenken des pH-Wertes beendet. In Schema 3.11 ist der Ablauf der Reaktion gezeigt.



Schema 3.11: Vinylsulfon-Modifizierung von Dextran (**9**), Pullulan (**10**) und Lentinan (**11**) (R = CH₂CH₂SO₂CHCH₂ oder H). Reaktionsbedingungen: a) NaOH (0.1 M), DVS, *t*.

Um den Einfluss der Reaktionszeit t auf den Modifizierungsgrad bzw. die Eigenschaften der synthetisierten Polysaccharide zu untersuchen, wurde die Reaktion zu den Zeitpunkten $t = 1, 2, 2.5, 3$ und 3.5 min gestoppt. Es stellte sich dabei heraus, dass die Vinylsulfon-modifizierten Polysacchariden Dextran 250 kDa VS (**46**) und Dextran 500 kDa VS (**46**), Pullulan VS (**47**) sowie Lentinan VS (**48**) ab einer Reaktionszeit von 3 min anfangen zu präzipitieren. Dies hing mit einer Überfunktionalisierung der Polysaccharide zusammen. Je höher der Substitutionsgrad der Vinylsulfongruppen, desto unpolarer wurde das Polymer bis es schließlich auszufallen begann.^[81] Die synthetisierten Polysaccharide wurden IR- sowie ^1H NMR-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 3.13 ist als Beispiel das IR-Spektrum von Vinylsulfon-modifiziertem Dextran 250 kDa (**46**) im Vergleich zu nativem Dextran 250 kDa (**9**) gezeigt.

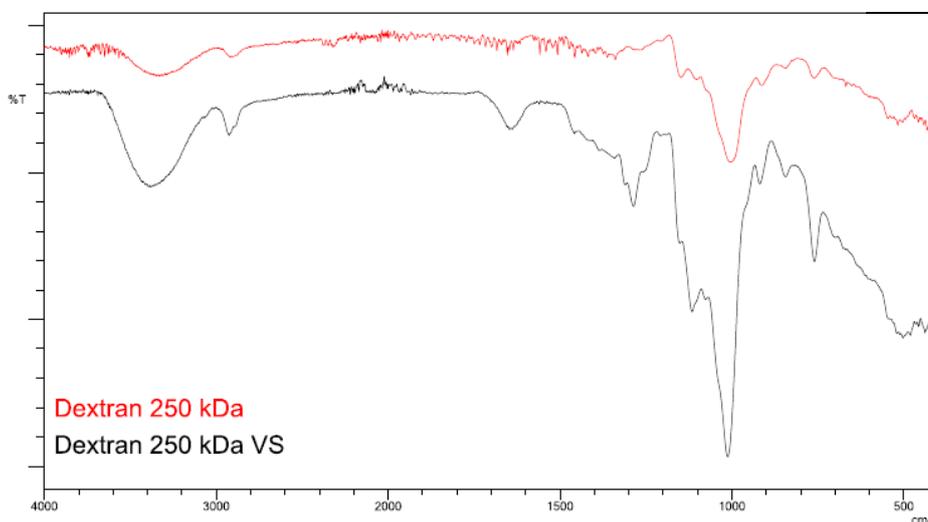


Abbildung 3.13: IR-Spektrum von Dextran 250 kDa VS (**46**) im Vergleich zu nativem Dextran 250 kDa (**9**).

Die deutliche Bande bei ca. 1.300 cm^{-1} wird durch die Streckschwingung der Sulfongruppe hervorgerufen. Die Bande bei der Wellenzahl von ca. 1.650 cm^{-1} ist der Vinylgruppe zuzuordnen. Auch die in Abbildung 3.14 gezeigten ^1H NMR-Spektren der modifizierten Polysaccharide zeigen, dass eine Modifizierung stattgefunden hat. So sind im Bereich von 6.33 bis 7.06 ppm deutlich die vinylogenen Protonen der eingebrachten Vinylsulfongruppen zu erkennen. Auch haben sich die Signale der anomeren Protonen im Bereich von 5.02 bis 5.80 ppm verschoben. Zusätzlich traten neue Signale im Bereich von 4.17 bis 4.33 ppm auf, die den Protonen des eingebrachten Methylenrests des Vinylsulfons zuzuschreiben sind. Allerdings lieferten auch hier die spektroskopischen Daten keine quantitative Aussage über den tatsächlichen Derivatisierungsgrad. Aufgrund dessen wurde eine spektroskopische Methode basierend auf einem indirekten Ellman's-Assay genutzt.^[80]

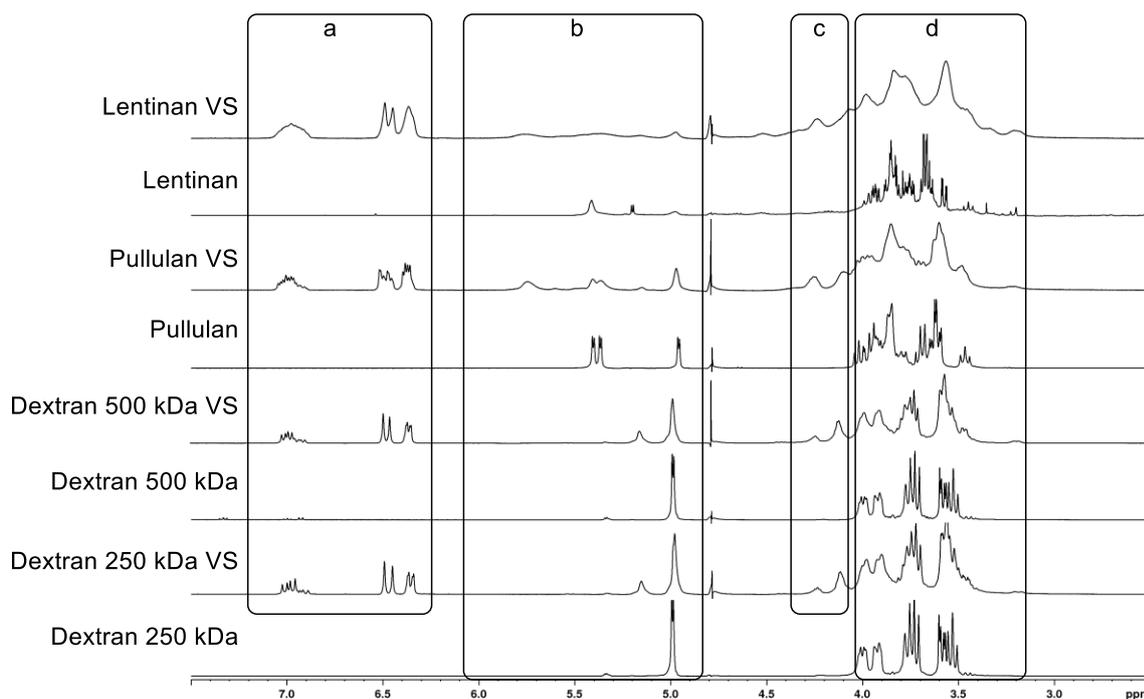
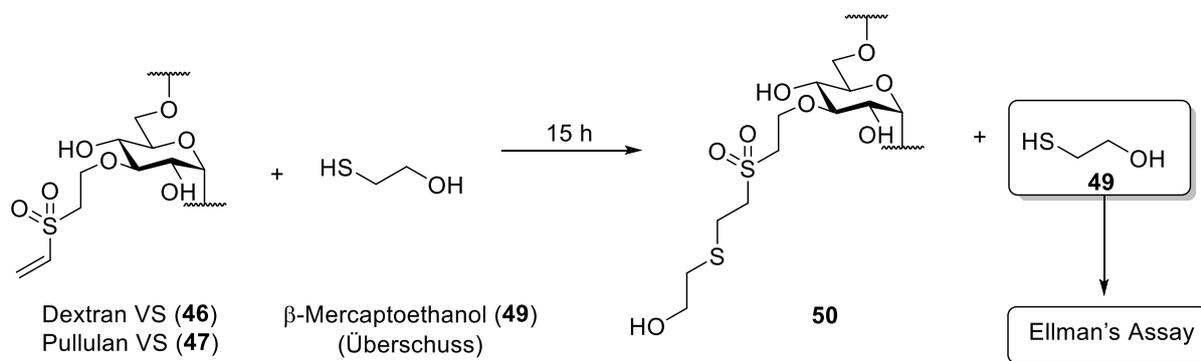


Abbildung 3.14: Vergleich der ^1H NMR-Spektren der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide mit ihren nativen Verbindungen in D_2O . a) Region der vinylogenen Protonen, b) Region der anomeren Protonen, c) eingebrachter CH_2CH_2 -Rest des Vinylsulfons, d) Protonen des glycosidischen Gerüsts.

Hierfür wurden die Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide **46**, **47** und **48** in einer wässrigen Lösung mit einem Überschuss an β -Mercaptoethanol (**49**) (12 mM) unter Luft und Lichtausschluss für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des nicht umgesetzten β -Mercaptoethanols. In Schema 3.12 ist der schematische Ablauf des indirekten Ellman's Assays am Beispiel von Vinylsulfon-modifiziertem Dextran (**46**) gezeigt.



Schema 3.12: Bestimmung des Derivatisierungsgrads Vinylsulfon-modifizierter Polysaccharide über einen indirekten Ellman's-Assay.

Dass unter diesen Bedingungen das β -Mercaptoethanol (**49**) vollständig an die Vinylsulfongruppen konjugiert wurde, konnte ^1H NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Dafür wurde eine Probe von Vinylsulfon-modifiziertem Dextran 250 kDa (**46**) unter den in Schema 3.12 gezeigten Bedingungen umgesetzt, dialysiert und analysiert. Das ^1H NMR-Spektrum ist in Abbildung 3.15 zu sehen.

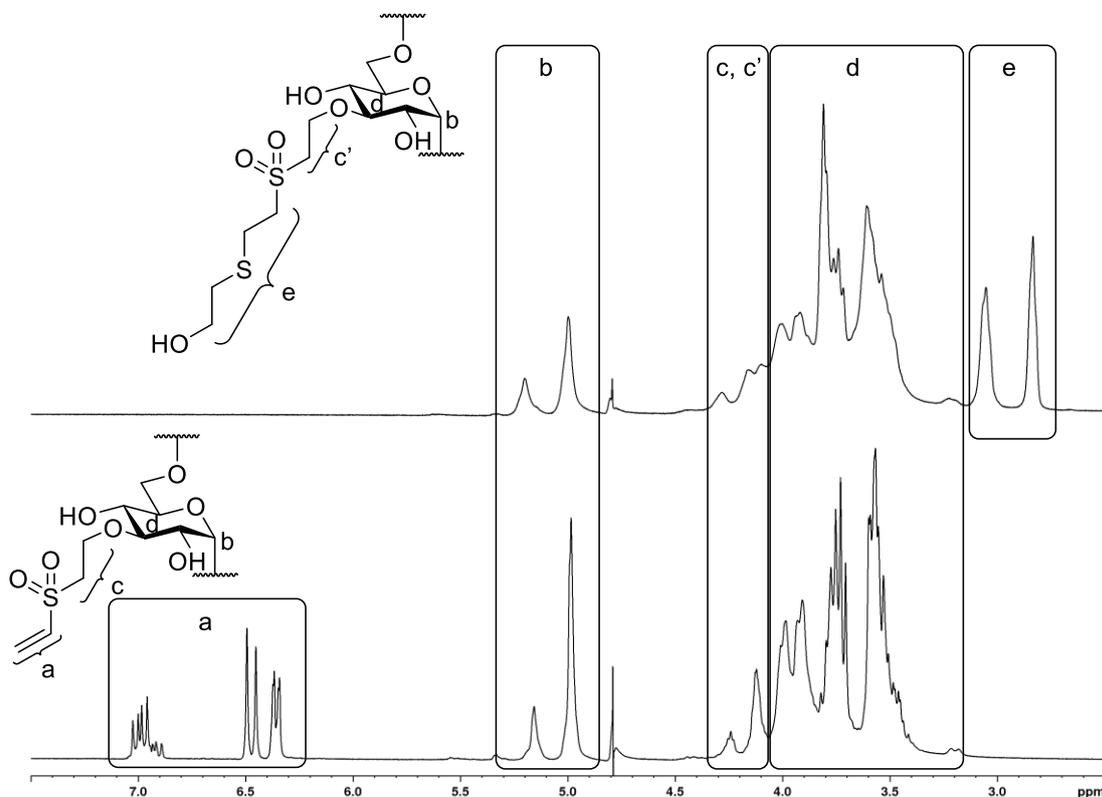


Abbildung 3.15: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von Dextran 250 kDa VS (**46**) und das korrespondierende β -Mercaptoethanol-Konjugat **50** in D_2O . a) vinyloge Protonen, b) Region der anomeren Protonen, c) CH_2CH_2 -Gruppe des Vinylsulfons, d) Protonen des glycosidischen Gerüsts, e) Protonen der Methylengruppe.

Es ist zu sehen, dass die Signale der vinylogenen Protonen verschwanden. Des Weiteren sind im Bereich von 2.78 bis 3.11 ppm zwei Signale zu sehen, die dem Dextran 250 kDa VS- β -Mercaptoethanol-Konjugat zugeordnet werden können. In Abbildung 3.16 sind die Derivatisierungsgrade der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide in Abhängigkeit der Reaktionszeit t gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der Derivatisierungsgrad von Dextran 250 kDa VS (**46**) von 14 %, nach 1 min, auf 42 % nach 3 min anstieg und schließlich auf 54 % nach 3.5 min. Allerdings begann das Polysaccharid bereits nach 3 min an teilweise zu präzipitieren. Ähnlich verhielt es sich mit dem Dextran 500 kDa VS (**46**). Hier stieg der Derivatisierungsgrad von 18 %, nach 1 min, auf 39 % nach 3 min. Bei der Reaktionszeit von 3.5 min war das Polysaccharid bereits vollständig präzipitiert und konnte somit nicht auf seinen Derivatisierungsgrad untersucht werden. Beim Pullulan VS (**47**) stieg der Derivatisierungsgrad von 29 % nach 1 min, auf 51 % nach 2 min und fiel anschließend auf einen Wert von 50 %. Auch hier begann das Polysaccharid bereits nach 2.5 min an zu präzipitieren.

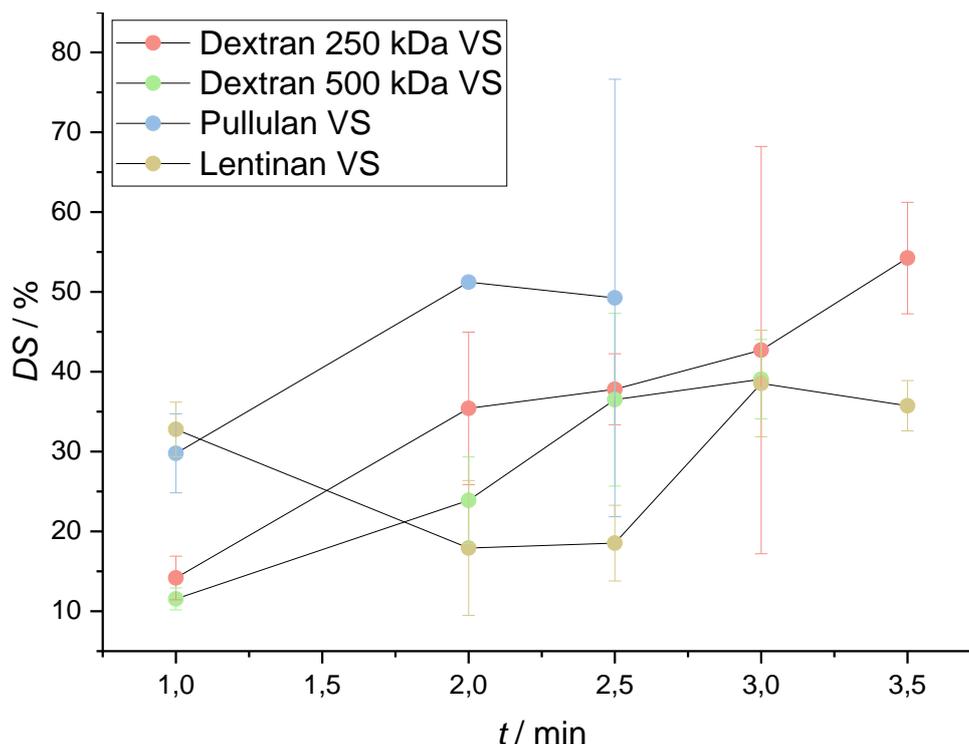


Abbildung 3.16: Verlauf des Derivatisierungsgrades DS der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide in Abhängigkeit der Reaktionszeit t ($n = 3$).

Beim Lentinan VS (**48**) ist zu erkennen, dass der Derivatisierungsgrad bei einer Reaktionszeit zwischen 1 – 2 min von 32 % auf 18 % sank. Anschließend stieg er auf 38 % nach 3 min und fiel nach einer Reaktionszeit von 3.5 min auf 36 %. Auch hier begann das Polysaccharid nach einer Reaktionszeit von 3 min an zu präzipitieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für weitere Synthesen der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide zur Erzeugung von Hydrogelen die Reaktionszeiten ausgewählt, bei der die Polysaccharide während der Reaktion vollständig in Lösung blieben.

Zum Ende dieser Arbeit, zeigte sich, dass die Synthese von Vinylsulfon-modifizierten Polysacchariden nicht mehr reproduzierbar war. Zur Untersuchung dieses Verhaltens, wurden Reaktionen mit neuen Chargen Divinylsulfon durchgeführt, neue Chargen der jeweiligen Polysaccharide verwendet, pH-Messgeräte ausgetauscht, Natronlauge ausgetauscht und ebenfalls die Reaktionen von unterschiedlichen Personen durchführen lassen. Alles ohne Erfolg. Es zeigte sich lediglich eine minimale Vinylsulfonmodifizierung, die nicht ausreichte, um erfolgreich Hydrogele zu generieren. Auch eine Erhöhung der eingesetzten Menge des Divinylsulfons, oder eine Verlängerung der Reaktionszeit brachten keine positiven Resultate. In Abbildung 3.17 ist das ^1H NMR-Spektrum von einem neuen Batch Vinylsulfon-modifiziertem Dextran 250 kDa (**46**), im Vergleich zu einem alten Batch gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale der vinylogenen Protonen des neuen Batchs mit einer Reaktionszeit von 3.5 min, relativ schwach im Vergleich zu denen des Spektrums eines vorherigen Batchs sind.

Damit zeigte sich, dass auch eine Erhöhung der Reaktionszeit zu keiner ausreichenden Modifizierung führte. Aus zeitlichen Gründen wurden hier keine weiteren Nachuntersuchungen durchgeführt, sondern es wurden die Linker auf Basis von Maleinimiden weiter untersucht.

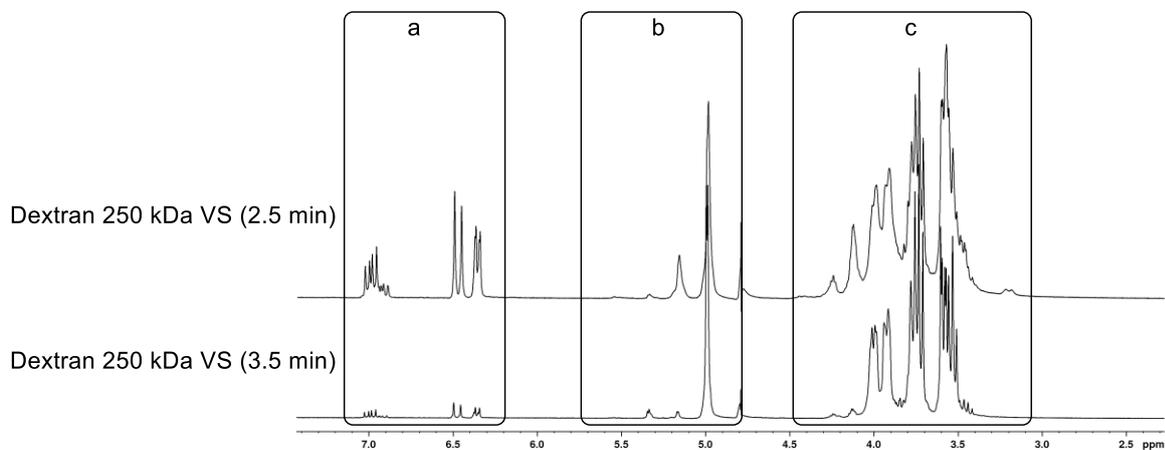
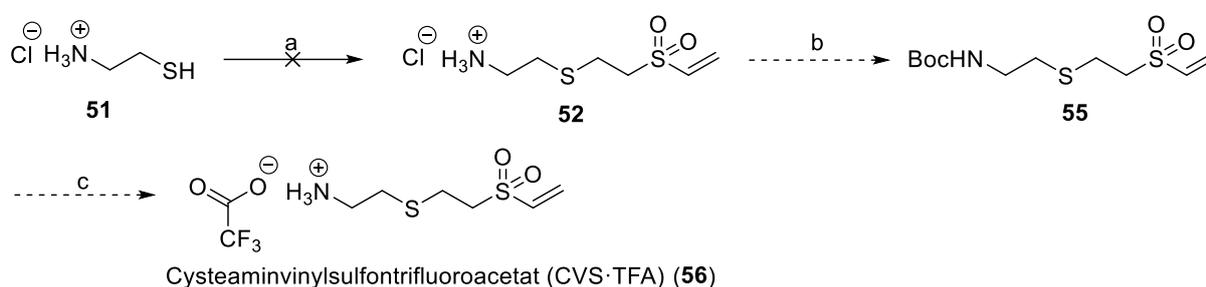


Abbildung 3.17: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von Vinylsulfon-modifiziertem Dextran 250 kDa. (46) Oben: Ursprünglich synthetisiertes Vinylsulfon-modifiziertes Dextran mit einer Reaktionszeit von 2.5 min, unten: Vinylsulfon-modifiziertes Dextran 250 kDa einer Charge, die nicht mehr zur Generierung von Hydrogelen führte. Hier wurde die Reaktionszeit bereits auf 3.5 min erhöht. A) Signale der vinylogenen Protonen, b) Signale der anomeren Protonen, c) Signale der Protonen des glycosidischen Gerüsts.

3.1.3.1.1 Weitere Vinylsulfon-Modifizierung von Polysacchariden

Während der Arbeit wurde auch versucht die Polysaccharide mit einem elongierten Vinylsulfonlinker auszustatten. Hierfür wurde ein modifiziertes Protokoll von HIEMSTRA *et al.* verwendet. Ursprünglich wurde hier über die erfolgreiche Modifizierung von Dextran (9) mit Linkern bestehend aus Vinylsulfonalkansäuren durch Veresterung der Hydroxylgruppen berichtet.^[90,91] In dieser Arbeit bestand die Überlegung den Linker nicht über eine Esterbindung an das Polysaccharid zu kuppeln, sondern über eine Amidbindung. In Schema 3.13 ist der schematische Ablauf der Modifizierung gezeigt. Die Modifizierung verlief hierbei in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde aus Cysteaminhydrochlorid (51) durch Umsetzung mit Divinylsulfon in wässrigem Medium für 4 h der eigentliche Linker 52 hergestellt. Anschließend wurde diese Lösung zu einer Lösung aus dem jeweiligen carboxymethyliertem Polysaccharid und den unten genannten Kupplungsreagenzien gegeben. Unter diesen Bedingungen konnte erfolgreich Cysteaminvinylsulfon-modifiziertes Dextran (53) sowie Pullulan (54) synthetisiert werden.

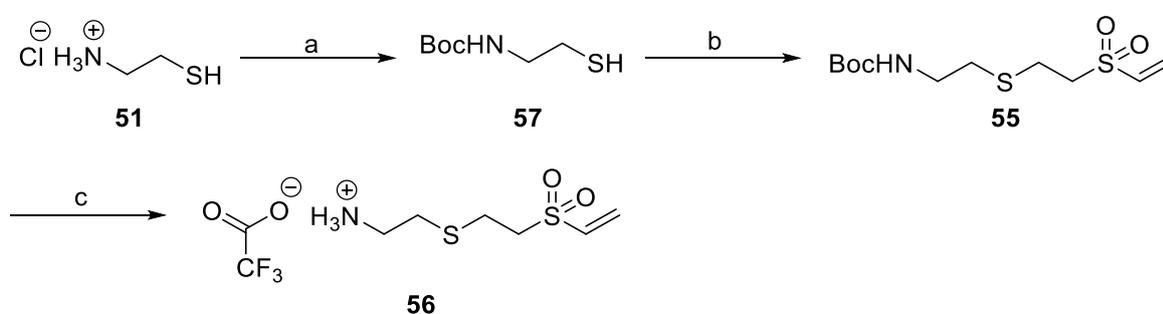
Als nächstes wurde versucht, den Cysteaminvinylsulfon-Linker im größeren Maßstab zu synthetisieren, um mit diesem schließlich die Kupplungsreaktion durchzuführen. Hier wurde im ersten Versuch das Protokoll von ZHOU *et al.* verwendet.^[92] Dabei wurde Cysteaminhydrochlorid (**51**) für 100 h bei 50 °C in Methanol und Divinylsulfon gerührt. Es konnte hierbei jedoch lediglich das Startmaterial **51** isoliert werden. Als nächstes wurde die Synthese von STEWART *et al.* verwendet.^[93] Hierfür wurde Cysteaminhydrochlorid (**51**) in DMSO für 4 h mit Divinylsulfon umgesetzt. Anschließend erfolgte unter *one-pot*-Bedingungen die Zugabe von Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc₂O) und Triethylamin. Anschließendes Entschützen mit Trifluoressigsäure (TFA) sollte das gewünschte Cysteaminvinylsulfon (**56**) in dessen Trifluoroacetat-Form liefern. In Schema 3.14 ist der Ablauf der Reaktion gezeigt.



Schema 3.14: Synthese von Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) nach STEWART *et al.*^[93] Reaktionsbedingungen: a) DMSO, DVS, RT, 4 h, b) Boc₂O, TEA, RT, 24 h, c) CH₂Cl₂, TFA, RT, 24 h.

Bereits beim ersten Schritt der Reaktion zeigte sich nach 4 h keine Bildung des Zwischenprodukts **52**. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 15 h zeigte sowohl dünn-schichtchromatographisch als auch massenspektrometrisch lediglich das Startmaterial **51**. Auch durch anschließendes Umsetzen unter der in b) gezeigten Reaktionsbedingungen konnte lediglich die Ausgangsverbindung **51** isoliert werden.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Wiederholung der Reaktion, wobei die Reaktionsschritte a und b vertauscht wurden. Der dazugehörige Ablauf ist in Schema 3.15 gezeigt.



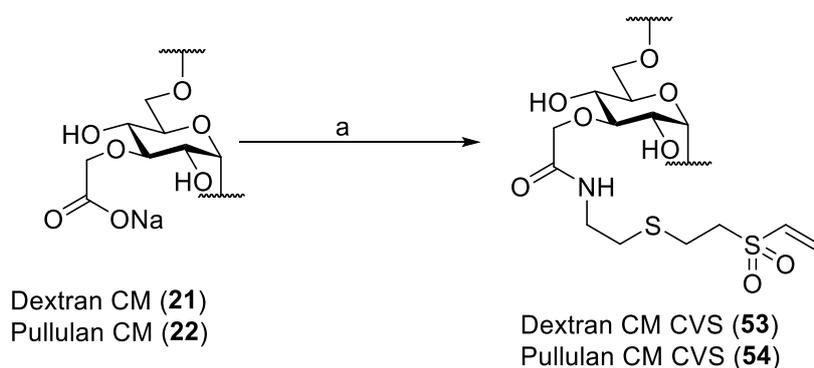
Schema 3.15: Synthese von Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**). Reaktionsbedingungen: a) Siehe Tabelle 3.7, b) siehe Tabelle 3.7, c) CH₂Cl₂, TFA, RT, 24 h.

Die untersuchten Reaktionsbedingungen für die Schritte a und b sind in Tabelle 3.7 gezeigt. In Eintrag 1 wurde die Reaktion unter den Bedingungen analog zum oben gezeigten Schema 3.15 durchgeführt, jedoch wurde die Reihenfolge der Bedingungen a und b getauscht. Es erfolgte im ersten Schritt die Bildung des Boc-geschützten Zwischenprodukts **57**, gefolgt von der Zugabe von Divinylsulfon. Bei dieser *one-pot* Variante wurde lediglich das Boc-geschützte Cysteamin (**57**) isoliert. Als nächstes wurde die Reaktion nicht mehr unter *one-pot*-Bedingungen durchgeführt. Um das Lösungsmittel nach der Boc-Schätzung besser zu entfernen, wurde diese in CH₂Cl₂ durchgeführt. Verbindung **57** wurde in DMF gelöst und Divinylsulfon (gelöst in DMF) hinzuge tropft. Anschließendes Entschützen mit TFA lieferte Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) in einer sehr guten Ausbeute von 96 % über drei Stufen.

Tabelle 3.7: Untersuchung verschiedener Reaktionsbedingungen zur Synthese von Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat.

Eintrag	Reaktionsbedingungen a	Reaktionsbedingungen b	Ergebnis
1	DMSO, TEA, Boc ₂ O, RT, 24 h	DMSO, DVS, RT, 4 h	Isolierung von 57
2	CH ₂ Cl ₂ , TEA, Boc ₂ O, RT, 24 h	DMF, DVS, RT	Verbindung 56

Das hergestellte Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) wurde im nächsten Schritt über EDC-Kupplung an die carboxymethylierten Polysaccharide **21** und **22** gekuppelt. Die Reaktionsbedingungen sind in Schema 3.16 gezeigt. Bei der Synthese von CVS-modifizierten Polysacchariden zeigte sich, dass die pH-Stabilisierung der Reaktionslösung durch MES nicht ausreichte und somit keine erfolgreiche Modifizierung stattfand.



Schema 3.16: Synthese von Cysteaminvinylsulfon (CVS)-modifiziertem Dextran CM (**53**) und Pullulan CM (**54**). Reaktionsbedingungen: a) H₂O, MES, EDC·HCl, HOBT·H₂O, CVS·TFA (**56**), pH 6.1, RT, 3 d.

Durch die Zugabe des Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetats (**56**) zur Reaktionslösung, sank der pH-Wert von pH 6 auf einen pH-Wert von 1.5. Durch Anheben des pH-Wertes auf pH 6.1 durch Zugabe von NaOH (2 M), konnte die Kupplung erfolgreich durchgeführt werden. Der

Derivatisierungsgrad wurde, wie in Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben, über einen indirekten Ellman's-Assay bestimmt. In Abbildung 3.19 ist der Verlauf von CVS-modifiziertem Dextran 250 kDa CM (**53**) gezeigt, wobei drei unterschiedliche Äquivalente CVS-TFA (**56**) verwendet wurden.

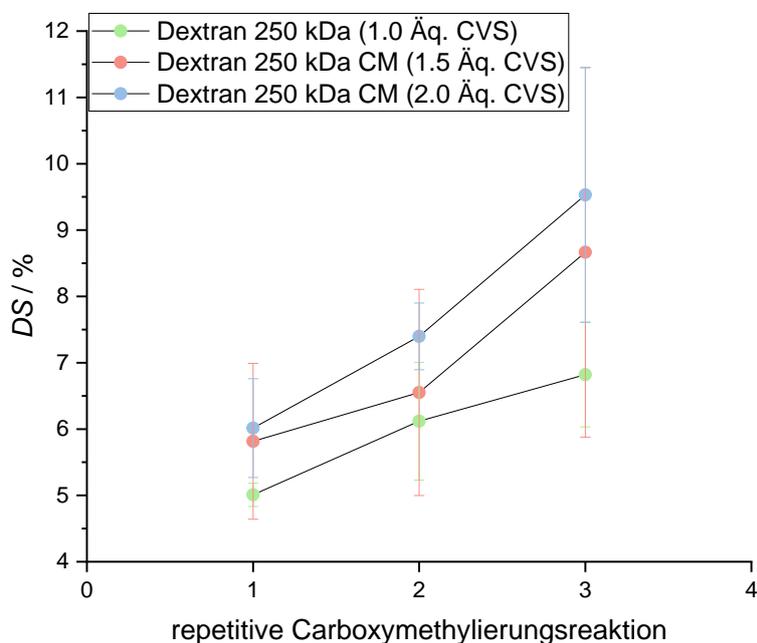


Abbildung 3.19: Verlauf der Derivatisierungsgerade (*DS*) von Cysteaminvinylsulfon-modifiziertem Dextran 250 kDa CM (**51**) mit unterschiedlich eingesetzter Äquivalenten an CVS-TFA (**56**) in Abhängigkeit der repetitiven Carboxymethylierungsreaktion ($n = 3$).

Es ist zu erkennen, dass für alle drei Graphen der Derivatisierungsgrad (*DS*) mit steigender Carboxymethylierungsreaktion zunimmt. Es ist auch zu erkennen, dass die Derivatisierungsgrade der modifizierten Polysaccharide, bei denen für die Modifizierung 2.0 Äq. CVS-TFA (**56**) verwendet wurden, größer waren, als die, bei denen 1.5 bzw. 1.0 Äq. verwendet wurden.

3.1.3.2 Maleinimid-Modifizierung der Polysaccharide

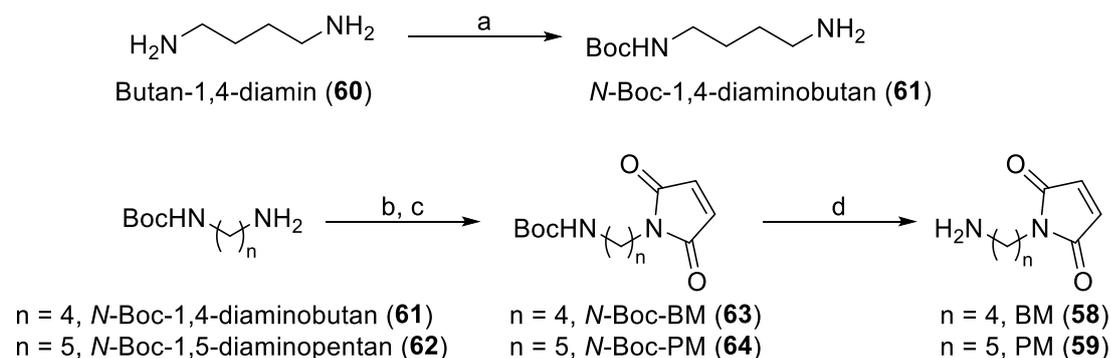
Neben den Vinylsulfon-modifizierten Polysacchariden wurden die in der Arbeit von Samhita Banerjee verwendeten Linker *N*-(4-Aminobutyl)-maleinimid (BM) (**58**) und *N*-(5-Aminopentyl)-maleinimid (PM) (**59**) eingesetzt und die Modifizierung optimiert. Da bekannt ist, dass die Länge der Alkylketten in *N*-Aminoalkylmaleinimiden Einfluss auf das Hydrolysegleichgewicht des Thiosuccinimids hat und dadurch dessen Stabilität beeinflusst, sollte das Verhalten der unterschiedlich langen Alkylketten auf die physikochemischen Eigenschaften der synthetisierten Hydrogele untersucht werden.^[94,95] Die verwendeten Maleinimide BM (**58**) und PM (**59**) sind in Abbildung 3.20 gezeigt.



N-(4-Aminobutyl)-maleinimid (BM) (**58**) *N*-(5-Aminopentyl)-maleinimid (PM) (**59**)

Abbildung 3.20: Verwendete Linker zur Maleinimid-Modifizierung.

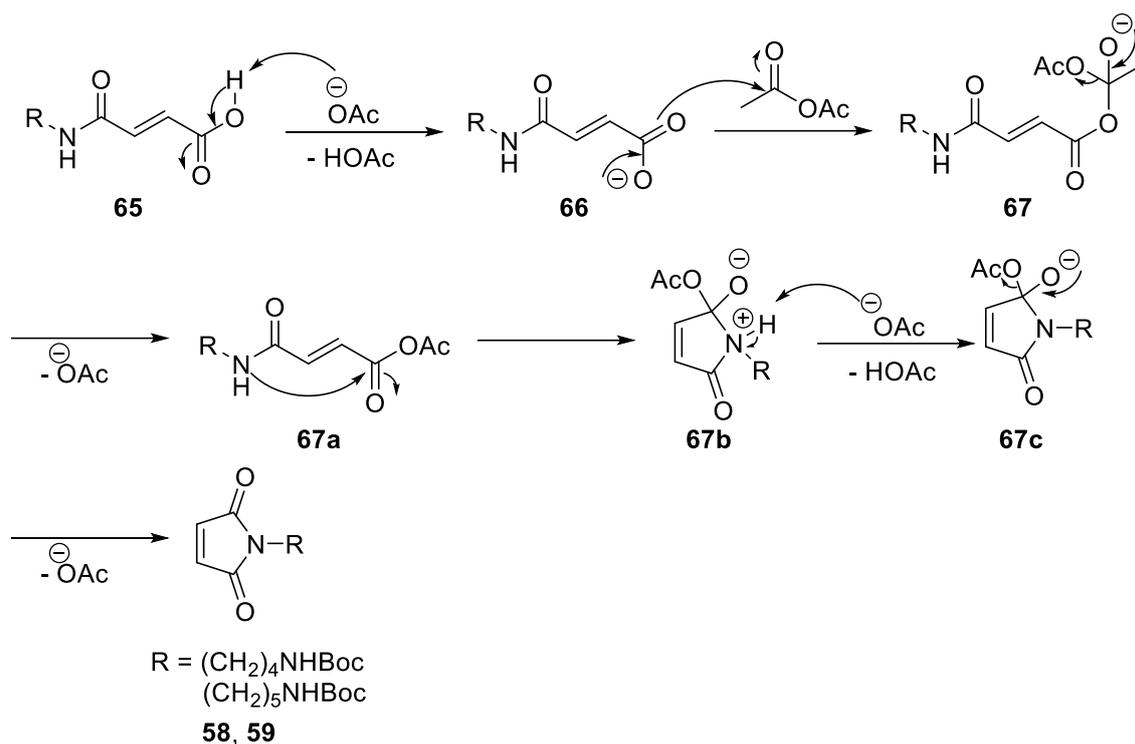
Der erste Schritt bestand aus der Synthese der oben gezeigten Linker. Das Reaktionsschema ist in Schema 3.17 gezeigt. Die Synthese für das BM (**58**) startete mit der Mono-Boc-Schützung von Butan-1,4-diamin (**59**) nach dem Protokoll von KRAPCHO *et al.*^[96] Als nächstes erfolgte die Synthese der Maleinimide nach dem Protokoll von HORSTMANN *et al.*^[97] Hierfür wurde Maleinsäureanhydrid entweder mit dem synthetisierten *N*-Boc-1,4-diaminobutan (**61**) oder dem kommerziell erworbene *N*-Boc-1,5-diaminopentan (**62**) unter Ringöffnung umgesetzt. Anschließend erfolgte der Ringschluss unter Ausbildung des Maleinimids **63** bzw. **64**.



Schema 3.17: Synthese von BM (**58**) und PM (**59**). Reaktionsbedingungen: a) 1,4-Dioxan, Boc₂O, RT, 15 h, b) CH₂Cl₂, Maleinsäureanhydrid, 0 °C bis RT, 15 h, c) Essigsäureanhydrid, NaOAc, 110 °C, 3 h, d) Anisol, TFA, RT, 1 h.

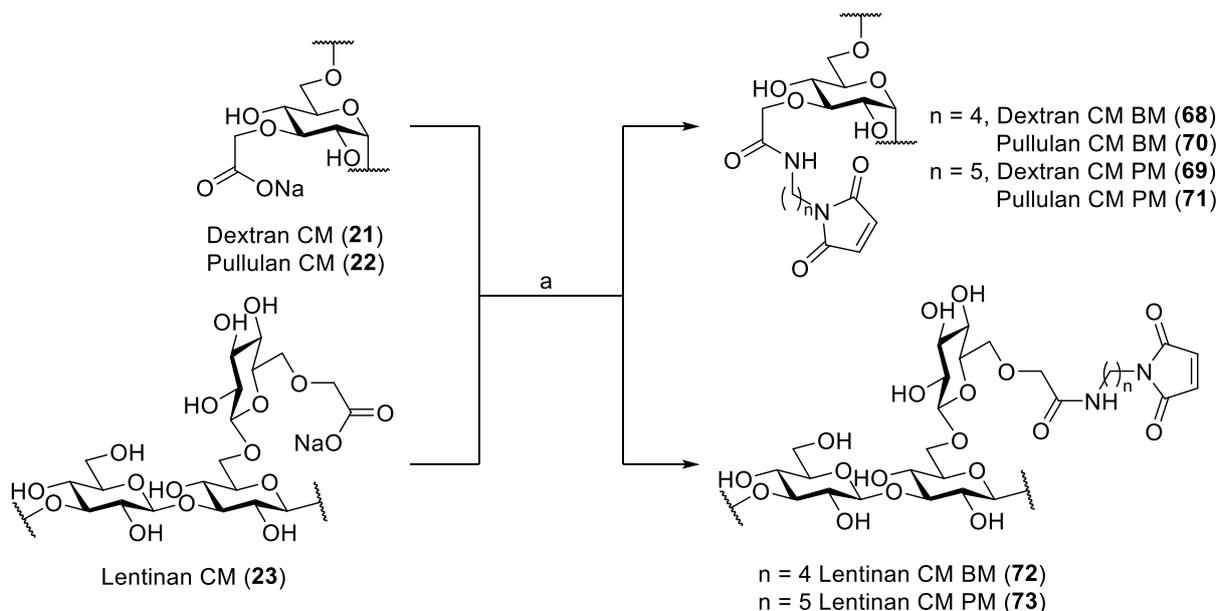
Der Mechanismus des Ringschluss ist in Schema 3.18 gezeigt. Im ersten Schritt erfolgte die Deprotonierung der Maleamidsäure **65** durch das Acetat. Anschließend erfolgt der nucleophile Angriff des Carboxylats **66** an das Ac₂O, gefolgt von einer E1cb-Eliminierung eines Acetations zum Maleamidsäureethylester **67**. Der intramolekulare nucleophile Angriff des sekundären Amins an das Carbonylkohlenstoffatom des Esters mit anschließender Deprotonierung des Amins sowie eine weitere E1cb-Eliminierung eines Acetations lieferte schließlich das Boc-geschützte Maleinimid **58** und **59**.^[98]

Im letzten Schritt d erfolgte die Entschützung des Amins mittels TFA, wobei Anisol als Lösungsmittel zum Abfangen des entstehenden Kations verwendet wurde.



Schema 3.18: Mechanismus des Ringschlusses zur Bildung des Maleinimids.

Die so erhaltenen Maleinimide sollten im nächsten Schritt an die carboxymethylierten Polysaccharide über EDC-Kupplungsbedingungen angebracht werden. Zur Kupplung der Maleinimide **58** und **59** wurde das Protokoll von Samhita Banerjee verwendet. Hierfür wurde die EDC-Kupplung in MES-Puffer durchgeführt. Außerdem wurde *N*-Hydroxy-succinimid (NHS) verwendet. Diese Modifizierung der von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* entwickelten Kupplungsbedingungen wurde durchgeführt, da ansonsten eine zu geringe Modifizierung der Polysaccharide stattfand.^[63,69,79] Das Reaktionsschema und die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Schema 3.19 gezeigt.



Schema 3.19: Synthese von Maleinimid-modifiziertem Dextran (68, 69), Pullulan (70, 71) und Lentinan (72, 73).
Reaktionsbedingungen: a) H₂O, MES, EDC·HCl, NHS, BM (56) oder PM (57), RT, 3 d.

In Abbildung 3.21 finden sich die ¹H NMR-Spektren von Maleinimid-modifiziertem Dextran (68, 69) sowie Pullulan (70, 71) im Vergleich zu ihren carboxymethylierten Derivaten 21 und 22. Anhand des bei ca. 6.86 ppm auftretenden Signals, das den Protonen des Maleinimids zuzuordnen ist, wurde hierdurch eine erfolgreiche Modifizierung bestätigt. Bei der Synthese von Maleinimid-modifiziertem Pullulan (70, 71) zeigte sich bei höherer Modifizierung ein schweres Löslichkeitsverhalten, sodass bei Pullulan lediglich die Carboxymethylierungsstufe 1 zur Hydrogelbildung genutzt werden konnte. Problematisch war hier jedoch die zu schnelle Gelierung, wodurch keine homogene Durchmischung erzielt werden konnte. Aufgrund dessen wurde Maleinimid-modifiziertes Pullulan (70, 71) nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

In späteren Versuchen zur Gelierung für biologische Untersuchungen zeigte sich, dass sich unter den Bedingungen für Zellversuche (2 w%, Lösen in DPBS/Medium 1:1) keine Gele bilden ließen. Es wurde herausgefunden, dass die Pufferkapazität des DPBS/Medium-Gemischs nicht ausreichte, den pH-Wert auf einen Wert von 7.4 zu bringen. Daher wurde der pH-Wert der Maleinimidderivate nach der Dialyse auf pH 6.1 eingestellt und anschließend lyophilisiert.

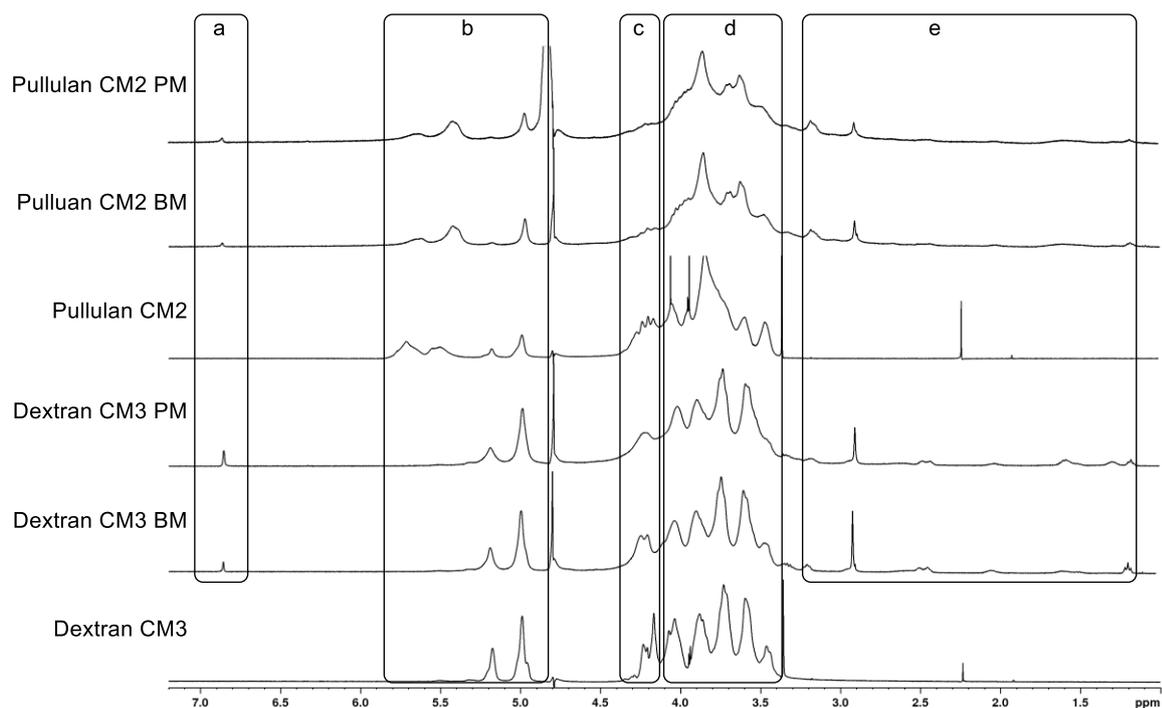
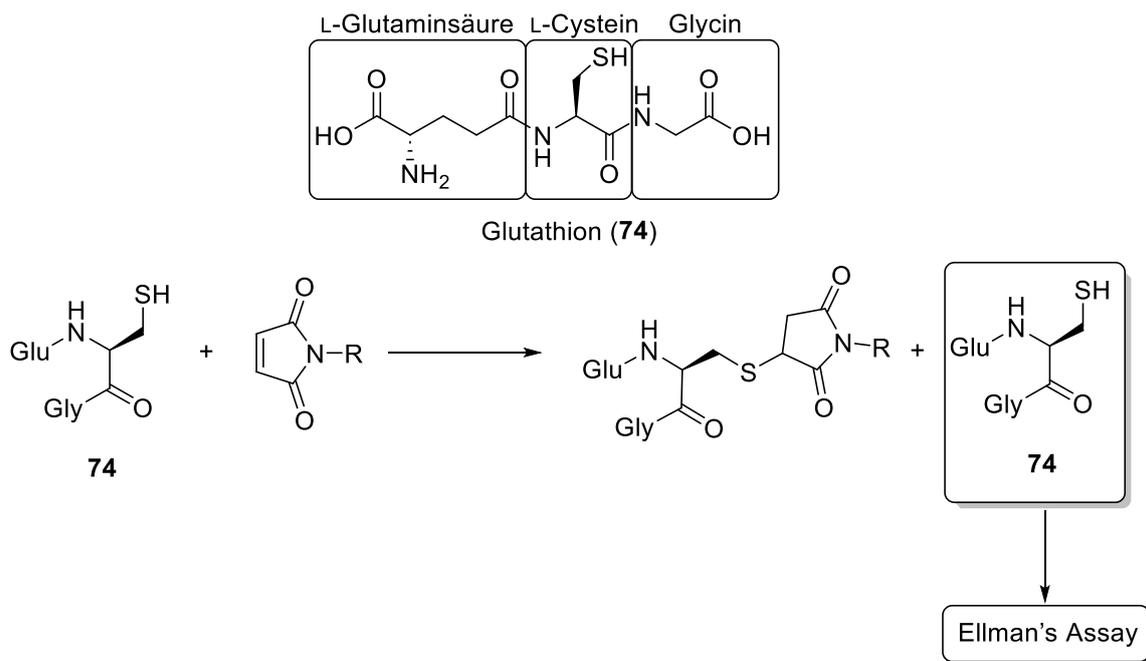


Abbildung 3.21: Vergleich der ^1H NMR-Spektren der Maleinimid-modifizierten Polysaccharide **68**, **69**, **70** und **71** mit ihren carboxymethylierten Derivaten **21**, **22** in D_2O . a) Signal der Protonen des Maleinimids, b) Signale der anomeren Protonen, c) Signale der Protonen der Methylengruppe des Essigsäurerestes, d) Signale der Protonen des glycosidischen Gerüsts, e) Signale der Protonen der eingebrachten Alkylkette.

Die synthetisierten Maleinimidderivate wurden zur Quantifizierung der Funktionalisierung einem Ellman's-Assay unterzogen, ähnlich zu dem in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen indirekten Ellman's-Assay. Hierfür wurde jedoch Glutathion (**74**) als zu konjugierenden Analyten verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Tripeptid bestehend aus L-Glutaminsäure, L-Cystein sowie Glycin. Eine Besonderheit des Peptids ist, dass die Aminosäure L-Glutaminsäure und L-Cystein durch die an der γ -Position befindlichen Carboxylgruppe der Glutaminsäure verbunden sind und nicht, wie sonst oft üblich bei Peptiden, über die Carboxylgruppe an der α -Position.^[99] In Schema 3.20 ist der schematische Ablauf des Ellman's-Assays gezeigt.



Schema 3.20: Bestimmung des Substitutionsgrades der Maleinimid-modifizierten Polysaccharide über einen indirekten Ellman's-Assay unter Verwendung von Glutathion (**74**). R = (CH₂)₄NHCOOCH₂-Polysaccharid, oder (CH₂)₅NHCOOCH₂-Polysaccharid, Glu = CO(CH₂)₂CH(NH₂)CO₂H, Gly = NHCH₂CO₂H.

Die ermittelten Werte für Maleinimid-modifiziertes Dextran 250 kDa und Dextran 500 kDa (**68**, **69**) sind in Abbildung 3.22 gezeigt.

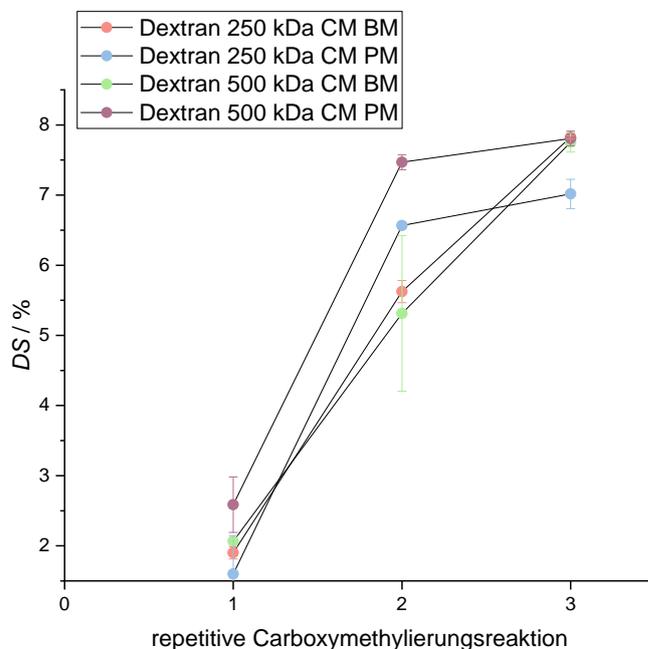


Abbildung 3.22: Auftragung des Substitutionsgrades *DS* von Maleinimid-modifiziertem carboxymethylierten Dextran 250 kDa sowie Dextran 500 kDa (**68**, **69**) in Abhängigkeit der Anzahl der Carboxymethylierungsreaktion ($n = 3$).

Es ist zu erkennen, dass die Derivatisierungsgrade der Maleinimid-modifizierten Polysaccharide mit zunehmender Carboxymethylierungsreaktion zunahm. Für Dextran 250 kDa CM BM stieg der Derivatisierungsgrad von $1.9 \pm 0.08 \%$ auf $7.8 \pm 0.02 \%$. Die Funktionalisierung der korrespondierenden PM-Derivate stieg von $1.6 \pm 0.55 \%$ auf $7.0 \pm 0.21 \%$. Derselbe Trend war auch bei den Maleinimid-modifizierten Dextran 500 kDa-Derivaten zu sehen.

Auch Lentinan wurde erfolgreich in die korrespondierende Maleinimid-Derivate **72** und **73** überführt, wobei lediglich Lentinan CM3 BM (**72**) und Lentinan CM3 PM (**73**) erfolgreich zur Hydrogelbildung eingesetzt werden konnten. Dazu wurde jedoch die Menge an BM (**58**) bzw. PM (**59**) von 0.5 Äq. auf 1.5 Äq. erhöht. Dennoch war es nicht möglich, den Derivatisierungsgrad der so modifizierten Lentinanderivate zu bestimmen, da die Konjugation des Glutathions (**74**) an das Maleinimid-modifizierte Lentinan zur Präzipitation des gesamten Konjugats führte. In Abbildung 3.23 sind die ^1H NMR-Spektren von Maleinimid-modifiziertem Lentinan (**72**, **73**) im Vergleich zum carboxymethylierten Lentinan (**23**) gezeigt.

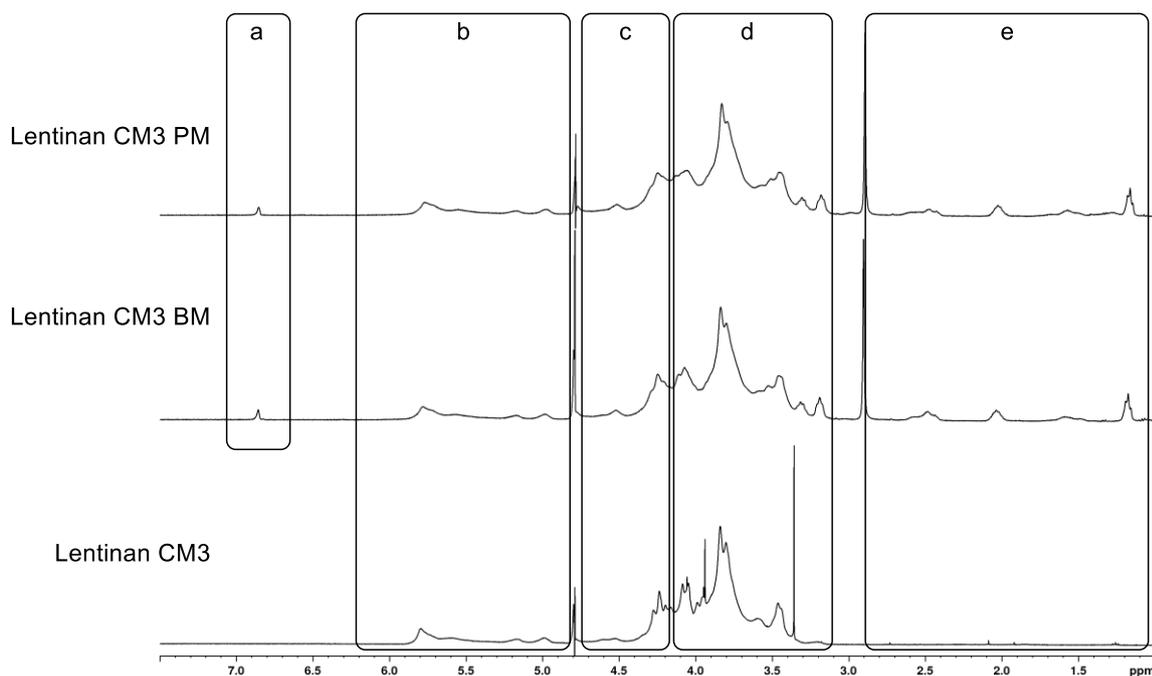
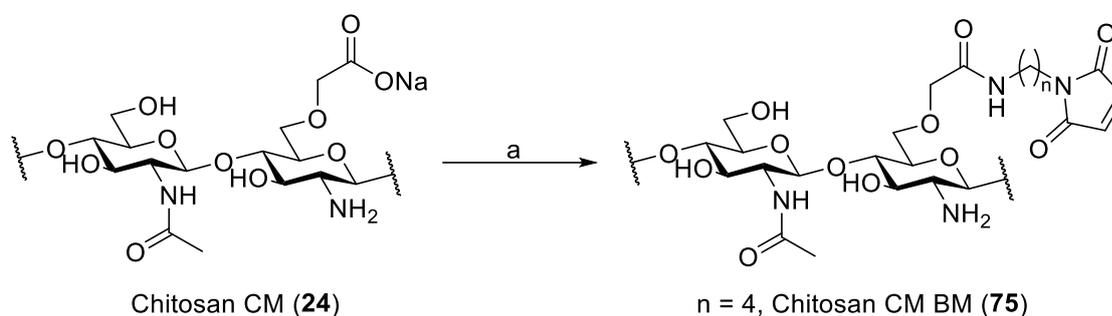


Abbildung 3.23: Vergleich der ^1H NMR-Spektren von BM- und PM-modifiziertem carboxymethylierten Lentinan (**72**, **73**) und carboxymethyliertem Lentinan (**23**) in D_2O . a) Signal der Protonen des Maleinimids, b) Signale der anomeren Protonen, c) Signale der Protonen der Methylengruppe des Essigsäurerestes, d) Signale der Protonen des glycosidischen Gerüsts, e) Signale der Protonen der eingebrachten Alkylkette.

Als weiteres Polysaccharid wurde versucht Chitosan (**12**) in seine Maleinimid-Derivate zu überführen. Hierfür wurde carboxymethyliertes Chitosan (**24**) unter den in Schema 3.21 gezeigten Bedingungen umgesetzt.



Schema 3.21: Maleinimid-Modifizierung von carboxymethyliertem Chitosan (**24**). Reaktionsbedingungen: a) H₂O, MES, EDC-HCl, NHS, BM (**58**), RT, 3 d

Lediglich Chitosan, das zwei bzw. drei Mal carboxymethyliert wurde, wurde erfolgreich modifiziert. Allerdings zeigten die synthetisierten Maleinimiderivate ein schweres Löslichkeitsverhalten, wobei nach vollständigem Auflösen eine hoch viskose Lösung entstand, was während der Analytik sowie in den späteren Gelierversuchen Schwierigkeiten während des Pipettierens bereitete. Aufgrund der hohen Viskosität der Lösungen war es nicht möglich den Derivatisierungsgrad von Maleinimid-modifiziertem Chitosan (**75**) zu ermitteln, da die Lösungen schwer zu pipettieren waren und zudem bei der keine validen Daten ermittelt werden konnten. Dennoch zeigt das in Abbildung 3.24 gezeigte ¹H NMR-Spektrum vom Maleinimid-modifizierten Chitosan (**75**) im Vergleich zu carboxymethyliertem Chitosan (**24**), dass die Funktionalisierung erfolgreich war.

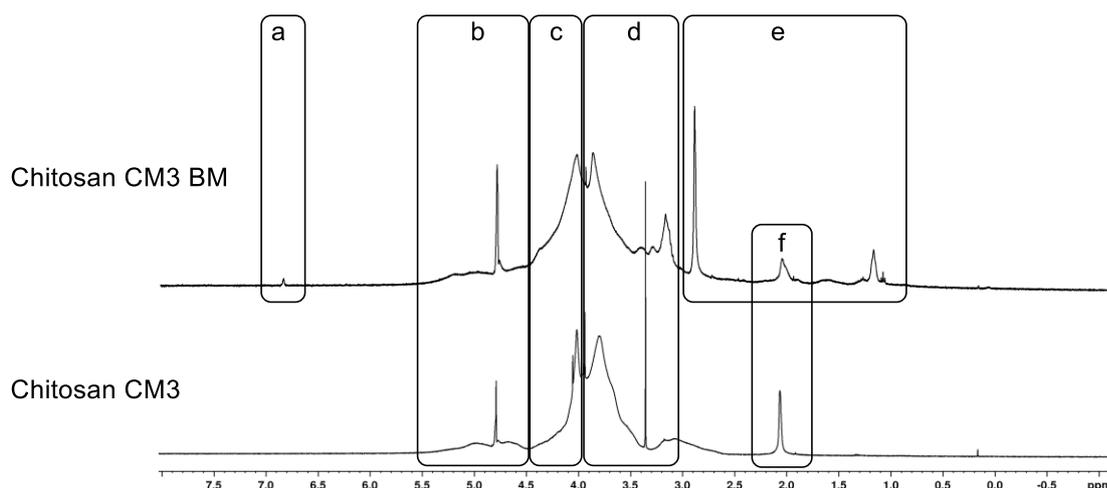
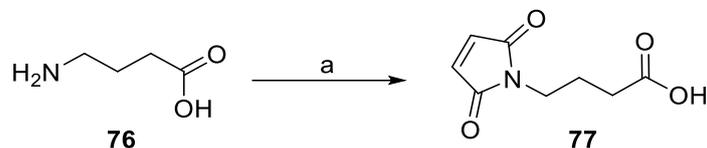


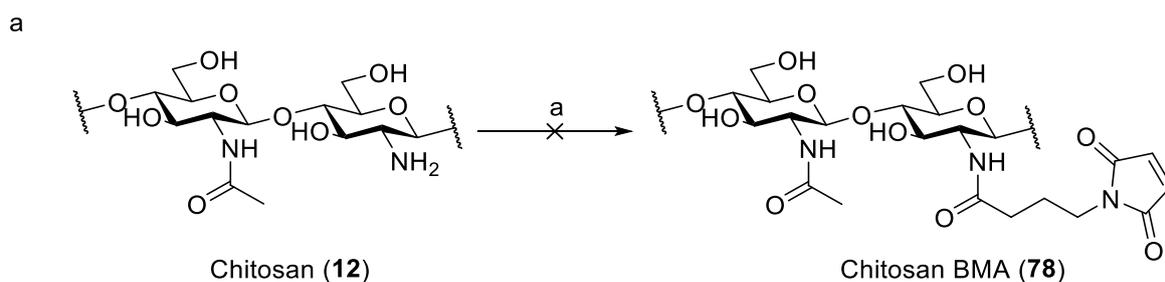
Abbildung 3.24: Vergleich der ¹H NMR-Spektren von Maleinimid-modifiziertem und carboxymethyliertem Chitosan (**75**) mit carboxymethyliertem Chitosan (**24**) in D₂O. a) Signal der Protonen des Maleinimids, b) Signale der anomeren Protonen, c) Signale der Protonen der Methylengruppe des Essigsäurerestes, d) Signale der Protonen des glycosidischen Gerüsts, e) Signale der Protonen der eingebrachten Alkylkette, f) Signal der Protonen der Acetylgruppe.

Des Weiteren wurde versucht, auch hier das Maleinimid durch *N*-Substitution direkt an natives Chitosan zu koppeln. Dafür wurde *N*-(3-Carboxypropyl)-maleinimid (**77**) als Linker durch Umsetzung von 4-Aminobutansäure (**76**) mit Maleinsäureanhydrid synthetisiert.^[100] Das Reaktionsschema und die dazugehörigen Bedingungen finden sich in Schema 3.22.



Schema 3.22: Darstellung von *N*-(3-Carboxypropyl)-maleinimid (**77**). Reaktionsbedingungen: a) AcOH, Maleinsäureanhydrid, Δ , 2 h.

Im nächsten Schritt sollte der hergestellte Linker an das native Chitosan (**12**) gekuppelt werden. Hierfür wurde das Protokoll von MATSUMOTO *et al.* verwendet.^[101] Das Reaktionsschema und die originalen Reaktionsbedingungen sowie alternative Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 3.25 gezeigt.



b

Eintrag	Reaktionsbedingungen a	Ergebnis
1	a) Chitosan, H ₂ O, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O, RT, 24 h b) BMA (77) in DMSO, 24 h	Keine Modifizierung
2	a) BMA (77), DMSO, EDC·HCl, HOBt·H ₂ O RT, 24 h b) Chitosan, H ₂ O, 24 h	Keine Modifizierung
3	a) BMA (77), DMSO, EDC·HCl, NHS, RT, 24 h b) Chitosan, H ₂ O, RT, 24 h	Keine Modifizierung
4	a) BMA (77), DMSO, EDC·HCl, NHS, RT, 24 h b) Chitosan, H ₂ O, MES, RT, 24 h	Keine Modifizierung
5	c) BMA (77), DMF, EDC·HCl, NHS, RT, 24 h a) Chitosan, H ₂ O, MES, RT, 24 h	Erhaltenes Produkt nach Lyophilisieren nicht löslich

Abbildung 3.25: a) Reaktionsschema zur Darstellung von *N*-Maleinimid-modifiziertem Chitosan (**78**); b) untersuchte Reaktionsbedingungen.

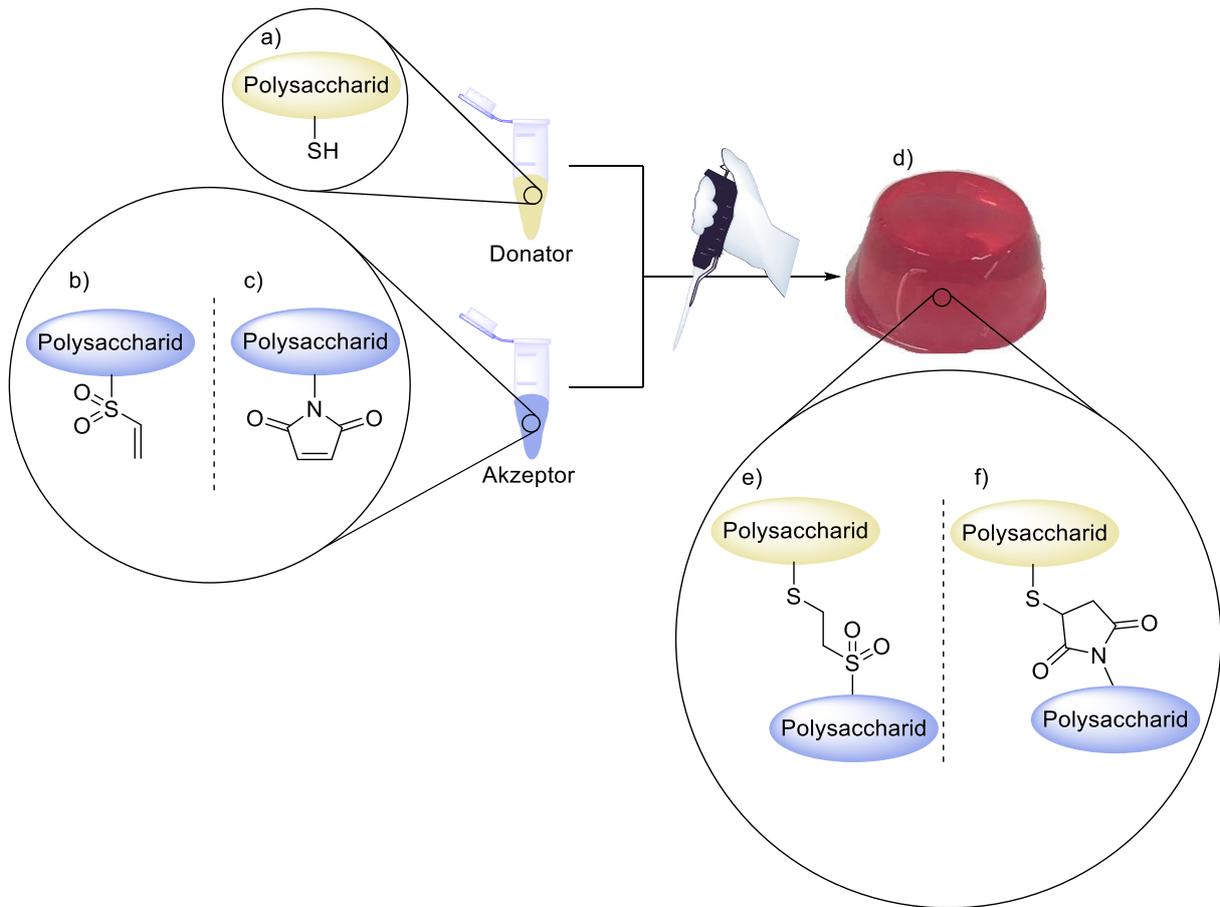
Unter den von MATSUMOTO *et al.* beschriebenen Bedingungen in Eintrag 1, konnte kein Maleinimid-modifiziertes Chitosan (**78**) isoliert werden. Es wurde lediglich natives Chitosan

isoliert. Auch durch den Austausch der Reaktionsbedingungen in Eintrag 2 konnte keine Produktbildung beobachtet werden. In Eintrag 3 wurde statt HOBt·H₂O auf NHS zurückgegriffen. Aber auch hier zeigte sich keine Funktionalisierung des Chitosans (**12**). Auch durch die Zugabe von MES zur pH-Stabilisierung in Eintrag 4 konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Der Austausch von DMSO durch DMF in Eintrag 5 führte nach Lyophilisieren zu einem Produkt, das weder in H₂O, noch in organischen Lösungsmitteln löslich war. Ab hier wurde die Modifizierung von Chitosan gestoppt.

3.2 Darstellung und Untersuchungen von Hydrogelen

Für die Darstellung von Hydrogelen wurde die von DAHLMANN *et al.* berichtete Durchführung verwendet.^[102] Abweichend hiervon wurden die synthetisierten Polysaccharide nicht in Wasser gelöst, sondern in Phosphatpuffer bei einem physiologischen pH Wert von 7.4.^[81] Die Konzentrationen betragen bei den Dextran-basierten Hydrogelen jeweils 2 w% je Komponente. Bei den Chitosan-basierten Hydrogelen 3 w% je Komponente und bei den Lentinan-basierten je 4 w%. Diese Konzentrationen beschreiben die minimalen Konzentrationen, die zur Erzeugung von Hydrogelen notwendig sind. Zur Erzeugung von Hydrogelen wurden jeweils die gleichen Volumina der Donator- und Akzeptorkomponente miteinander vermischt. Die Gelbildung trat innerhalb von wenigen Minuten für die Vinylsulfon-basierten Hydrogele sowie innerhalb von Sekunden für die Maleinimid-basierten Hydrogele ein. Die Vernetzung erfolgte unter Bildung der jeweils korrespondierenden Thioether. Für Hydrogele, die in Zellversuchen verwendet wurden, wurden die einzelnen Komponenten in einem Gemisch (1:1) aus DPBS und dem für die jeweiligen Zellen spezifischen Medium gelöst. In Abbildung 3.26 A) ist die Synthese von Hydrogelen schematisch gezeigt. Es wurden verschiedene Hydrogelkombinationen aus den jeweiligen Polysacchariden (Dextran 250 kDa, Dextran 500 kDa, Pullulan, Lentinan und Chitosan) hergestellt, wobei das Augenmerk darauf gerichtet war, die Hydrogele auf ihre physikochemischen Eigenschaften sowie Biokompatibilität zu untersuchen. Einige der Hydrogelkombinationen führten zu einer zu raschen Gelierung, weswegen keine homogene Durchmischung möglich war (besonders Pullulan-basierte Hydrogele, sowie einige Maleinimidkombinationen). Andere zeigten eine zu langsame Gelierung, die auch nicht durch Erhöhung der eingesetzten Konzentration zu verändern war (CVS-modifizierte Polysaccharide). Hier dauerte die Gelierung mehrere Stunden, was z. B. für eine dreidimensional Kultivierung von Zellen von großem Nachteil ist, da die Zellen vor der Gelbildung sedimentieren würden. Aus diesen Gründen wurde die Herstellung und Untersuchung von Hydrogelen auf bestimmte Polysaccharide beschränkt. In der Tabelle B in Abbildung 3.26 sind alle erfolgreich modifizierten Polysaccharide gezeigt, wobei die eingerahmten für weitere physikochemische und biologische Untersuchungen verwendet wurden.

A)



B)

Donator	Akzeptor Vinylsulfon	Akzeptor Maleinimid
Dextran 250 kDa CM TPH	Dextran 250 kDa VS	Dextran 250 kDa CM BM
Dextran 250 kDa CM TBH	Dextran 500 kDa VS	Dextran 250 kDa CM PM
Dextran 500 kDa CM TPH	Lentinan VS	Lentinan CM BM
Dextran 500 kDa CM TBH	Dextran 250 kDa CVS	Lentinan CM PM
Pullulan CM TPH		Chitosan CM BM
Lentinan CM TPH		Dextran 500 kDa CM BM
		Dextran 500 kDa CM PM

Abbildung 3.26: A) Darstellung von Hydrogelen. a) Thiol-modifiziertes Polysaccharid, b) Vinylsulfon-modifiziertes Polysaccharid, c) Maleinimid-modifiziertes Polysaccharid, d) gebildetes Hydrogel, bestehend aus Dextran 250 kDa CM2 TPH + Dextran 250 kDa VS gelöst in DPBS und Medium (1:1), e) Thioether aus Vinylsulfon, f) Succinimid-Thioether aus Maleinimid. B) Tabelle der erfolgreich modifizierten Polysaccharide. Eingerahmt sind die Polysaccharide, die für weitere physikochemische sowie biologische Untersuchungen der erzeugten Hydrogele verwendet wurden.

Beim TPH-modifizierten Lentinan (**40**) zeigte sich trotz erfolgreicher Modifizierung keine Hydrogelbildung mit Vinylsulfon-modifiziertem Dextran (**46**) oder Vinylsulfon-modifiziertem

Lentinan (**48**). Es wurden Gelierversuche in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Getestet wurde neben dem Phosphatpuffer (pH 7.4), ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8.1, da der pH-Wert die Anzahl an Thiolationen für die Thiol-Michael Reaktion beeinflusst. So liegen bei einem pH Wert von 8.1 mehr reaktive Thiolationen vor, als bei einem niedrigeren pH-Wert.^[103] Die Verwendung eines HEPES-Puffers wurde untersucht, wobei auch hier die Gelierung ausblieb. Auch eine Erhöhung von 4 auf 6 w% führte zu keiner Gelierung. ZHANG *et al.* berichtete über die Aufhebung der Tripelhelixstruktur mit Hilfe von DMSO.^[34] Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Struktur des Lentinans (**11**) und der ausbleibenden Gelbildung zu untersuchen, wurde das TPH-modifizierte Lentinan in DMSO gelöst und mit in Phosphatpuffer (pH 7.4) gelöster Vinylsulfon-Komponente gemischt. Auch hier blieb eine Gelbildung aus. Ebenfalls keine Gelbildung wurde durch Mischen der Donator- und Akzeptorkomponenten erzielt, die jeweils in DMSO gelöst waren. Somit wurde in dieser Arbeit Lentinan CM TPH (**40**) zwar erfolgreich synthetisiert, konnte jedoch nicht zur Erzeugung von Hydrogelen verwendet werden.

3.2.1 Untersuchungen zur Wasseraufnahme der Hydrogele

Zur Untersuchung der Wasseraufnahme der einzelnen Hydrogele wurde die Methode des *Swellings* angewandt.^[74] Diese Methode besteht aus fünf Schritten und ist graphisch in Schema 3.23 gezeigt.



Schema 3.23: Schematischer Ablauf der *Swelling*-Methode zur Bestimmung der Wasseraufnahme der Hydrogele.

Als erstes wurden Hydrogele hergestellt und lyophilisiert. Anschließend wurden diese in Wasser für drei Tage quellen gelassen. Hierbei wurde jeden Tag das Wasser gewechselt. Am letzten Tag wurden die gequollenen Gele gewogen (Wägen a), lyophilisiert und anschließend wieder gewogen (Wägen b). Mit den beiden erhaltenen Gewichten der Hydrogele konnte mit Hilfe von Formel 3.3 die Wasseraufnahme als ein Vielfaches des Trockengewichts des Hydrogels bestimmt werden.

$$\text{Wasseraufnahme} = \frac{\text{Wägen } b}{\text{Wägen } a} \quad \text{Formel 3.3}$$

In Abbildung 3.27 A ist die Wasseraufnahme von Vinylsulfon-basierten Hydrogelen in Form einer *Heatmap* gezeigt.

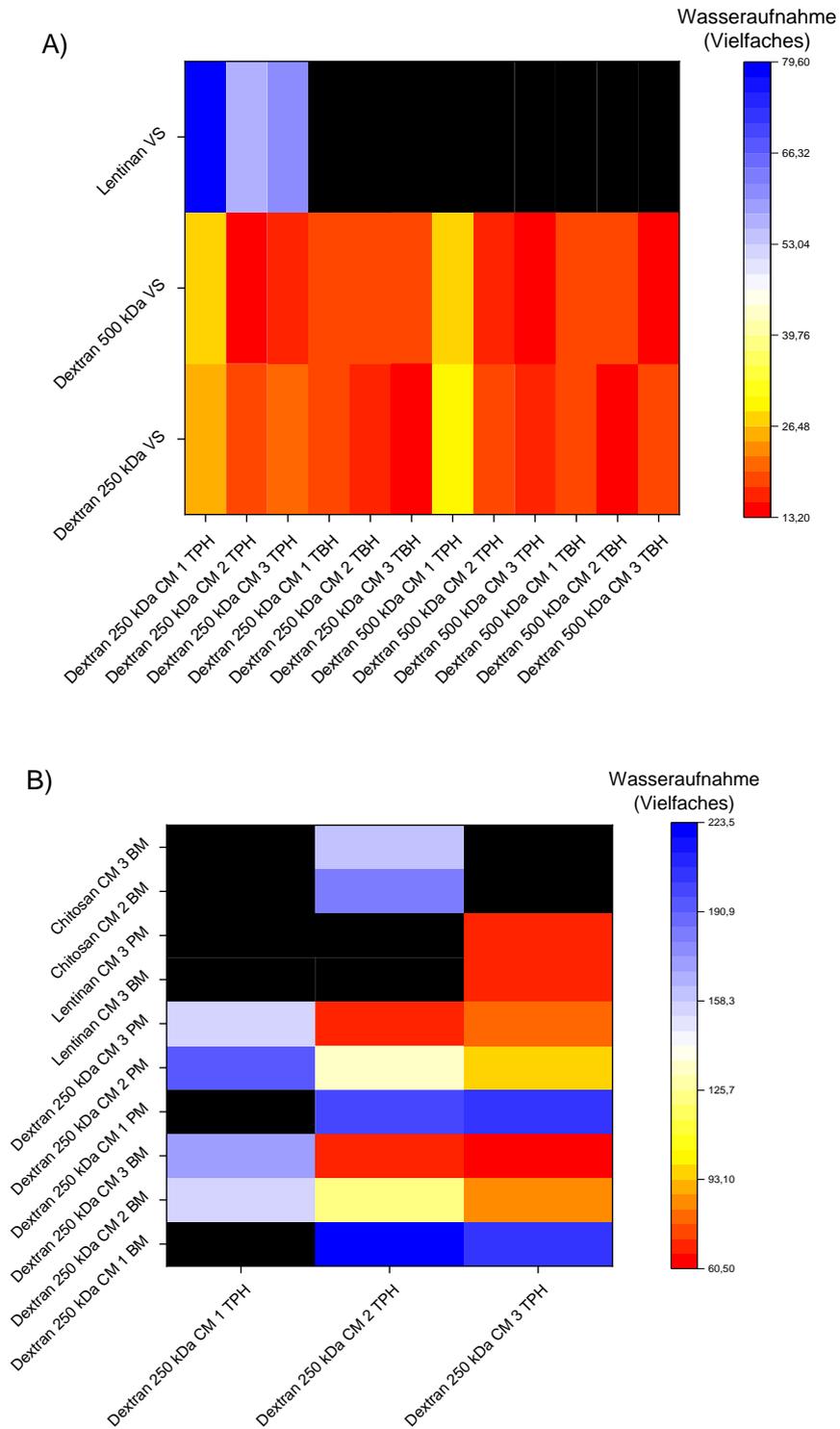


Abbildung 3.27: Heatmap zur Veranschaulichung der Wasseraufnahme von A) Vinylsulfon-basierten Hydrogelen und B) Maleinimid-basierten Hydrogelen, jeweils angegeben als Vielfaches des Trockengewichts ($n = 3$).

Es ist zu erkennen, dass die Wasseraufnahme mit steigender Carboxymethylierungsstufe abnahm. So sank die Wasseraufnahme der Kombinationen Dextran 250 kDa CM TPH + Dextran 250 kDa vom 26-fachen auf das 22-fache. Bei den Kombinationen aus Dextran 250 kDa CM TPH + Dextran 500 kDa VS fiel die Aufnahme vom 28-fachen auf einen Wert von 18 mit steigender Carboxymethylierungsstufe. Die korrespondierenden Hydrogele aus Dextran 500 kDa zeigten dasselbe Verhalten. Auch hier fiel die Wasseraufnahme von 31 auf einen Wert von 17 für die Kombinationen aus Dextran 500 kDa CM TPH + Dextran 500 kDa VS. Auch die Kombinationen aus Dextran 500 kDa TPH + Dextran 250 kDa VS zeigten eine Abnahme der Wasseraufnahme vom 27-fachen auf einen Wert von 13. Bei den TBH-Komponenten zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Hier zeigte sich eine Wasser-aufnahme zwischen dem 18- und 15-fachen für Hydrogele bestehend aus Dextran 250 kDa TBH + Dextran 250 VS bzw. zwischen dem 19- und 18-fachen für Gele aus Dextran 250 kDa TBH + Dextran 500 kDa VS. Dasselbe war für die Dextran 500 kDa Gele zu sehen. Dieses Verhalten lässt darauf schließen, dass die Wasseraufnahme mit steigender Funktionalisierung und damit zusammenhängender steigender Vernetzung sank. In Abbildung 3.27 B ist die *Heatmap* zur Veranschaulichung der Wasseraufnahme von Hydrogelen gezeigt, die durch die Ausbildung eines Succinimid-Thioeters synthetisiert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Maleinimid-basierten Hydrogele deutlich mehr Wasser aufnehmen konnten, als die Vinylsulfon-basierten Hydrogele. Dieses Verhalten kann durch den relativ geringen Derivatisierungsgrad der Maleinimid-modifizierten Polysaccharide im Vergleich zu dem Derivatisierungsgrad der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide erklärt werden. So wurden die Maleinimid-derivatisierten Dextrane zwischen 2.5 und 7.5 % funktionalisiert. Dextran 250 kDa VS (46) besaß einen Funktionalisierungsgrad von ca. 45 %. Dies hatte zur Folge, dass bei den Maleinimid-modifizierten Polysacchariden mehr hydrophile Gruppen wie Hydroxyl- und Carboxylgruppen, zur Absorption von Wassermolekülen zur Verfügung standen als bei den hoch funktionalisierten Vinylsulfonderivaten.^[104] Die Wasseraufnahme der Hydrogele lag zwischen dem 60 und 223-fachen des Trockengewichts. Auch hier zeigte sich dasselbe Verhalten wie bei den Vinylsulfon-basierten Hydrogelen. Mit steigender Carboxymethylierungsstufe bzw. Funktionalisierung, sank die Wasseraufnahme. Dabei war dieses Verhalten sowohl bei den Hydrogelen zu beobachten, bei denen die Donatorkomponente (z. B. Dextran 250 kDa CM2 TPH) konstant bleibt und die Akzeptorkomponente in ihrer Carboxymethylierungsstufe und somit in ihrer Funktionalisierung variierte, als auch anders herum. Es ist außerdem zu beobachten, dass die PM- und BM-Derivate sich leicht in ihrer Wasseraufnahme unterschieden. So nahmen die Hydrogele, in denen als das PM-Derivat als Akzeptor vorhanden war, etwas weniger Wasser auf, als Hydrogele mit den BM-Derivaten. Bei der Kombination von z. B. Dextran 250 kDa CM2 TPH + Dextran 250 kDa CM BM lagen die Wasseraufnahmen mit steigender Carboxymethylierungsreaktion bei Werten

von 223 – 71. Beim korrespondierendem PM-Derivat lagen die Werte der Wasseraufnahme im Bereich des 200 – 69-fachen.

3.2.2 Rheologische Untersuchungen ausgewählter Hydrogele

Der theoretische Hintergrund der Rheologie wurde bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben. Es wurden verschiedene Kombinationen untersucht, wobei das Augenmerk auf den Oszillationszeittest sowie dem Oszillationsamplitudentest gelegt wurde. Über den Oszillationszeittest ließ sich die Steifheit des polymerisierten Hydrogels bestimmen. Des Weiteren konnte der Gelierprozess durch Aufnahme des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' in Abhängigkeit der Zeit t verfolgt werden und somit eine Aussage zum Sol-Gel-Übergang bzw. der Gelierzeit getroffen werden. In Abbildung 3.28 ist exemplarisch der Verlauf des Speichermoduls und des Verlustmoduls einer Probe während eines Oszillationszeittest gezeigt.

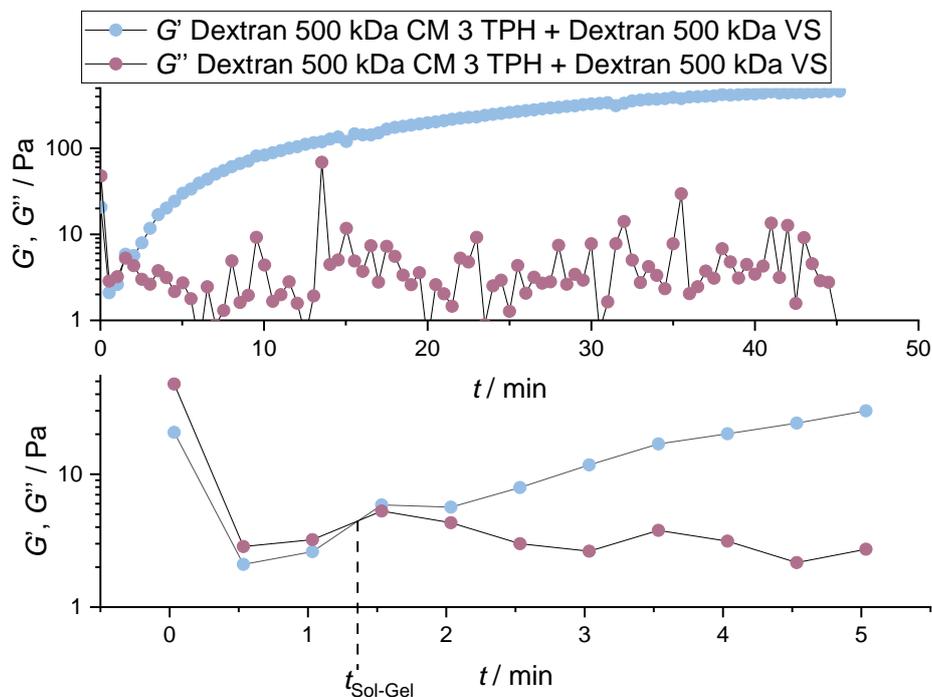


Abbildung 3.28: Auftragung des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' in Abhängigkeit der Zeit t eines Gels bestehend aus Dextran 500 kDa CM3 TPH + Dextran 500 kDa VS.

Im oberen Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass das Speichermodul G' anfangs unterhalb des Verlustmoduls G'' verlief. Im Verlauf der Zeit stieg das Speichermodul G' jedoch an und schnitt die Kurve des Verlustmoduls G'' , die einen abnehmenden Verlauf aufwies. Dieser Schnittpunkt markierte den Sol-Gel-Übergang und der dort liegende Zeitpunkt wird als $t_{\text{Sol-Gel}}$ bezeichnet. Ab diesem Zeitpunkt überwiegt der elastische Teil der Probe, die ab diesem Zeitpunkt zu einem Hydrogel wurde.^[105] Zur Veranschaulichung ist der Sol-Gel-Übergang im

unteren Teil der Abbildung gezeigt. In Tabelle 3.8 sind die ermittelten Gelierzeiten ($t_{\text{Sol-Gel}}$) sowie die Speichermodule G' nach 45 min aller untersuchten Hydrogele gezeigt.

Tabelle 3.8: Ermittelte Gelierzeiten ($t_{\text{Sol-Gel}}$) und Speichermodule (G') der untersuchten Hydrogele ($n = 3$). Die Konzentration betrug bei den Dextran-basierten Gelen jeweils 2 w% pro Komponente. Bei Hydrogelen, die Lentinan als Akzeptorkomponente enthielten, betrug die Konzentration jeweils 4 w%.

Eintrag	Donator	Akzeptor	$t_{\text{sol-gel}} / \text{min}$	$G'_{45 \text{ min}} / \text{Pa}$
1	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Dextran 250 kDa VS	2.7 ± 1.0	114 ± 17
2	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa VS	1.9 ± 0.2	256 ± 35
3	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Dextran 250 kDa VS	1.7 ± 0.5	477 ± 45
4	Dextran 500 kDa CM1 TPH	Dextran 500 kDa VS	4.5 ± 1.1	112 ± 19
5	Dextran 500 kDa CM2 TPH	Dextran 500 kDa VS	1.4 ± 0.2	313 ± 32
6	Dextran 500 kDa CM3 TPH	Dextran 500 kDa VS	1.2 ± 0.5	459 ± 134
7	Dextran 250 kDa CM1 TBH	Dextran 250 kDa VS	11.5 ± 2.7	85 ± 35
8	Dextran 250 kDa CM2 TBH	Dextran 250 kDa VS	4.9 ± 1.2	155 ± 26
9	Dextran 250 kDa CM3 TBH	Dextran 250 kDa VS	3.2 ± 0.9	186 ± 32
10	Dextran 500 kDa CM1 TBH	Dextran 500 kDa VS	6.7 ± 1.9	154 ± 48
11	Dextran 500 kDa CM2 TBH	Dextran 500 kDa VS	1.8 ± 0.5	248 ± 62
12	Dextran 500 kDa CM3 TBH	Dextran 500 kDa VS	0.7 ± 0.4	372 ± 95
13	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan VS	7.1 ± 2.2	68 ± 15
14	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan VS	3.3 ± 2.5	145 ± 63
15	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan VS	3.9 ± 0.5	911 ± 156
16	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan CM3 BM	0.2 ± 0.03	17 ± 4
17	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan CM3 BM	0.2 ± 0.05	147 ± 80
18	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan CM3 BM	0.1 ± 0.05	243 ± 78
19	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa CM3 BM	0.17 ± 0.03	113 ± 17
20	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa CM3 PM	0.22 ± 0.02	77 ± 21

In den Einträgen 1 bis 3 ist zu erkennen, dass die Sol-Gel-Übergänge mit steigender Carboxymylierungsreaktion und damit einhergehendem steigenden Derivatisierungsgrad früher stattfanden. So sank $t_{\text{Sol-Gel}}$ von 2.7 auf 1.7 min. Gleichzeitig stieg das Speichermodul G' mit steigender Carboxymylierungsreaktion. So stieg es z. B. von 114 Pa in Eintrag 1 auf 477 Pa in Eintrag 3. Dieses Verhalten zeigte sehr gut den Zusammenhang vom Derivatisierungsgrad der Komponenten und der Steifheit der Hydrogele. Durch einen höheren Derivatisierungsgrad der Komponenten stehen mehr funktionelle Gruppen für die Vernetzung

zur Verfügung, was sich durch eine größere Steifigkeit bemerkbar machte. Gleichzeitig sank dadurch die Zeit bis zu Gelbildung. Dieses Verhalten ist bei allen getesteten Kombinationen zu beobachten. Die TBH-Derivate (Eintrag 7 – 12) zeigten ein niedrigeres Speichermodul als die korrespondierenden TPH-Derivate (Eintrag 1 – 6). Dies kann mit den in Kapitel 1.2.1.2 beschriebenen unterschiedlichen Reaktivitäten der Thiole erklärt werden. So nahm die Bildung von Thiolationen unter dem hier vorliegenden pH-Wert mit steigendem aliphatischen Anteil ab.^[59] Dies hatte zur Folge, dass weniger Thiolate mit den Vinylsulfongruppen reagierten und somit eine, im Vergleich zu den TPH-basierten Hydrogelen, niedrige Steifigkeit erreicht wurde. Bei den untersuchten Maleinimid-basierten Hydrogelen (Eintrag 16 – 20) zeigte sich derselbe Trend. Besonders auffällig sind die relativ niedrigen Werte für den Sol-Gel-Übergang. Die Gelierung trat bereits innerhalb weniger Sekunden ein. Dies ist in Übereinstimmung mit der in Kapitel 1.2.1.2 bereits erwähnten hohen Reaktivität der Maleinimide.^[59] Über den Oszillationsamplitudentest ließ sich der in Kapitel 1.2.2 beschriebene lineare viskoelastische Bereich (LVER) bestimmen. Außerdem konnte dadurch untersucht werden, ab welcher Deformation das Hydrogel zerstört wird. In Abbildung 3.29 ist exemplarisch der Verlauf des Verlust- sowie Speichermoduls in Abhängigkeit der Deformation einer Probe gezeigt.

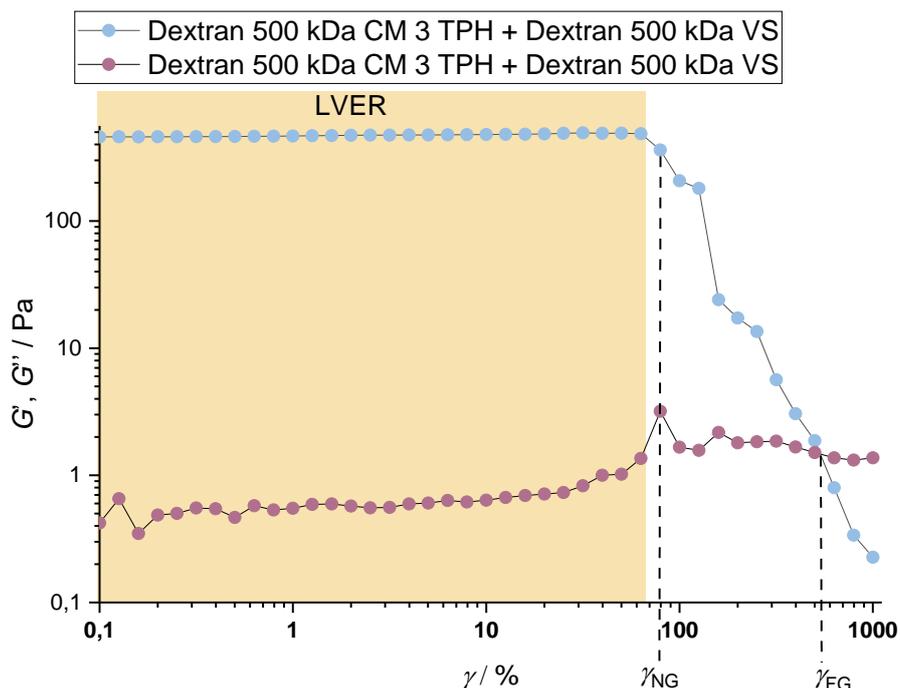


Abbildung 3.29: Auftragung des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' in Abhängigkeit der Deformation γ eines Gels bestehend aus Dextran 500 kDa CM3 TPH + Dextran 500 kDa VS. Farblich hinterlegt ist der lineare viskoelastische Bereich (LVER). Markiert ist zudem die Nachgebegrenze (γ_{NG}) sowie Fließgrenze (γ_{FG}).

In der oben gezeigten Abbildung ist der lineare viskoelastische Bereich der Probe gut durch die zur Amplitude γ nahezu parallel verlaufenden Speicher- und Verlustmodule (G' und G'') zu

erkennen. Die Nachgebegrenze lag bei einer Amplitude von 80 %. An diesem Punkt änderte sich die innere Struktur, jedoch ist diese Änderung reversibel. Schließlich lag die Fließgrenze bei einer Amplitude von 302 %, wodurch an diesem Punkt die innere Struktur des Gels irreversibel zerstört wurde. In Tabelle 3.1 sind die Nachgebe- (γ_{NG}) sowie Fließgrenzen (γ_{FG}) der untersuchten Gele gezeigt.

Tabelle 3.9: Ermittelte Nachgebe- (γ_{NG}) und Fließgrenzen (γ_{FG}) der untersuchten Hydrogele ($n = 3$). Die Konzentration betrug bei den Dextran-basierten Gelen jeweils 2 w% pro Komponente. Bei Hydrogelen, die Lentinan als Akzeptorkomponente enthielten, betrug die Konzentration jeweils 4 w%.

Eintrag	Donator	Akzeptor	$\gamma_{NG} / \%$	$\gamma_{FG} / \%$
1	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Dextran 250 kDa VS	125	501
2	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa VS	100	399
3	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Dextran 250 kDa VS	80	318
4	Dextran 500 kDa CM1 TPH	Dextran 500 kDa VS	159	501
5	Dextran 500 kDa CM2 TPH	Dextran 500 kDa VS	100	444
6	Dextran 500 kDa CM3 TPH	Dextran 500 kDa VS	80	319
7	Dextran 250 kDa CM1 TBH	Dextran 250 kDa VS	138	798
8	Dextran 250 kDa CM2 TBH	Dextran 250 kDa VS	100	631
9	Dextran 250 kDa CM3 TBH	Dextran 250 kDa VS	80	631
10	Dextran 500 kDa CM1 TBH	Dextran 500 kDa VS	157	796
11	Dextran 500 kDa CM2 TBH	Dextran 500 kDa VS	100	796
12	Dextran 500 kDa CM3 TBH	Dextran 500 kDa VS	80	502
13	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan VS	199	797
14	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan VS	159	400
15	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan VS	50	315
16	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan CM3 BM	129	799
17	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan CM3 BM	251	503
18	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa CM3 BM	500	199
19	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa CM3 PM	397	159

In den Einträgen 1 bis 3 lässt sich der Trend erkennen, dass mit steigender Carboxymylierungsreaktion die Werte der Nachgebe- sowie Fließgrenzen sanken. Werden die ermittelten Werte der Speichermodul betrachtet, lässt sich dieses Verhalten erklären. Ein hohes Speichermodul beschreibt eine hohe Steifheit des Hydrogels. Dadurch ist das Material weniger elastisch, als ein Gel mit einem niedrigeren Speichermoduls. Durch diese Steifheit

hält das Gel wesentlich weniger Deformation stand, als das elastischere Gel. Dieses Verhalten ist bei allen untersuchten Gelen zu beobachten.

3.2.3 Untersuchung der Permeabilität ausgesuchter Hydrogele

Für biomedizinische Anwendungen von Hydrogelen ist die Permeation von Sauerstoff und Nährstoffen wie z. B. Glucose, durch das Hydrogel zu den eingebetteten Zellen von großer Bedeutung.^[106] Die Permeation wird durch einen Gradienten des chemischen Potentials der Penetrationsstoffe (z. B. Glucose) angetrieben. Dieser wird beispielsweise durch eine Konzentrationsdifferenz zwischen den beiden Seiten des Gels verursacht.^[107] Zur Untersuchung der Permeabilität der Hydrogele wurden vertikale FranzTM-Diffusionszellen verwendet. In Abbildung 3.30 ist der Versuchsaufbau gezeigt. Zwischen der Donator- und Akzeptorkammer wurde eine Membran eingeführt und anschließend das Hydrogel in die Donatorkammer platziert. Als durch das Hydrogel diffundierende Molekül wurde α -D-Glucose (10 M) gewählt. Es wurden Proben nach 2, 6, 12, 24 und 48 h über den Probenarm aus der Akzeptorkammer entnommen. Ein Versuchsaufbau, in dem sich nur die Membran befand, diente als Referenz.

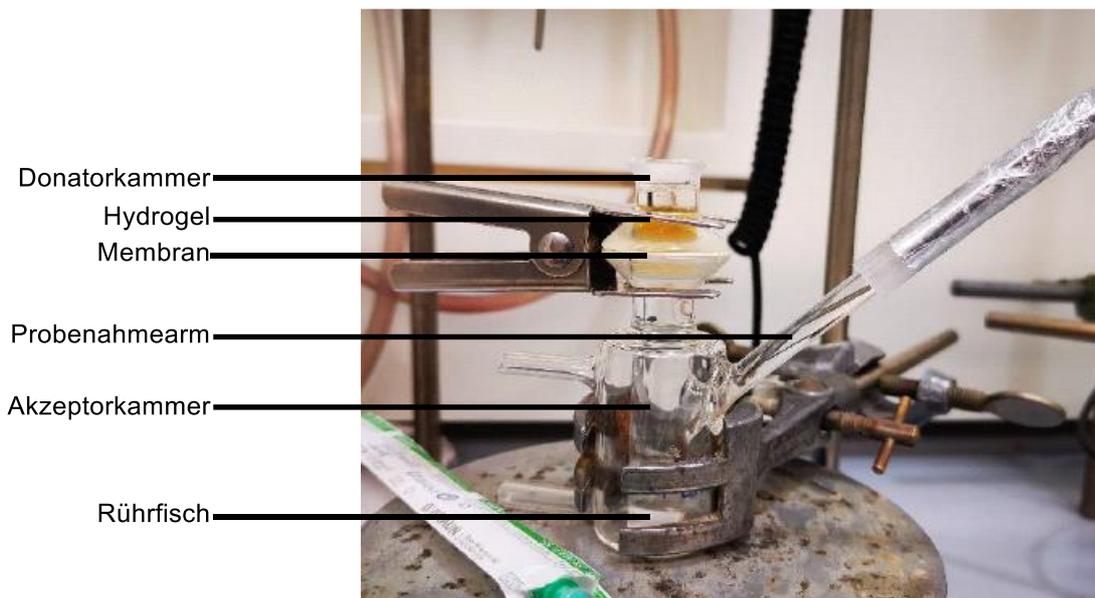
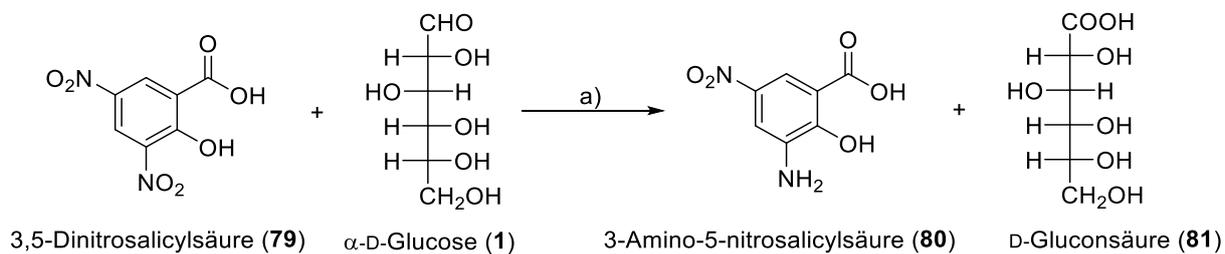


Abbildung 3.30: Aufbau einer FranzTM-Diffusionszelle zur Untersuchung der Permeabilität.

Um die Menge der Glucose, die durch das Hydrogel aus der Donatorkammer in die Akzeptorkammer diffundiert zu bestimmen, wurde der Gehalt an Glucose durch einen DNS-Assay ermittelt.^[108] Im Jahr 1921 entwickelte SUMNER *et al.* eine Methode zur Glucosegehalt im Urin von Diabetikern. Hierfür eignete sich Dinitrosalicylsäure (DNS) da es zum Nachweis reduzierender Zucker verwendet wird.^[109,110] Bei reduzierenden Zuckern handelt es sich um Kohlenhydrate, die eine Carbonylgruppe in der Fischerprojektion besitzen.^[111] Diese sind in

der Lage unter basischen Bedingungen Oxidationsmittel zu reduzieren, wobei sie selbst oxidiert werden. In Schema 3.24 ist der Ablauf der Redoxreaktion gezeigt.



Schema 3.24: Reduktion von DNS (79) zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (80) durch α -D-Glucose (81). Reaktionsbedingungen a) 100 °C, 5 min.

Die orange-farbene 3,5-Dinitrosalicylsäure (79) wird durch die α -D-Glucose (1) zur roten 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (80) reduziert, die bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm spektroskopisch quantifiziert werden kann. Der Verlauf der Glucosekonzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist in Abbildung 3.31 gezeigt. In den Graphen A bis E ist zu erkennen, dass alle Konzentrationsverläufe der untersuchten Hydrogele weit unterhalb des Referenzverlaufs lagen. Dieses Verhalten ist zu erwarten gewesen, da die Glucose zusätzlich zur Membran auch durch das Hydrogel diffundieren muss. In den ersten Stunden des Experiments war lediglich ein sehr flacher Anstieg der Glucosekonzentration zu beobachten und die Konzentrationen lagen alle in einem ähnlichen Bereich. Jedoch war im Verlauf des Experimentes zu erkennen, dass die Konzentrationen stark anstiegen. Dabei war besonders auffällig, dass die Kurven der jeweiligen Hydrogele in keinem kausalen Zusammenhang mit der Anzahl der Carboxymethylierungsreaktionen standen. So würde erwartet werden, dass die Kurve von z. B. dem Hydrogel Dextran 250 kDa CM3 TPH + Dextran 250 kDa VS unter der Kurve von Dextran 250 kDa CM1 TPH + Dextran 250 kDa VS liegen würde. Ähnlich, jedoch reziprok, zu den Speichermodulen und den dazugehörigen Carboxymethylierungsreaktionen. Ein höherer Derivatisierungs- bzw. Vernetzungsgrad würde zu einer größeren Steifigkeit bzw. einem größeren Speichermodul G' führen, was zu einem größeren Vernetzungsgrad führen würde und damit zu einer geringeren Permeabilität. Dieses Verhalten war hier jedoch nicht zu beobachten. Bei der Penetration eines Moleküls durch eine Matrix kommen mehrere Faktoren zum Tragen. So spielt zum einen die Größe und Chemie des Soluts (hier Glucose) eine Rolle.^[107] Glucose ist durch seine fünf Hydroxygruppen ein hochfunktionalisiertes Molekül. Nun liegt im Hydrogel ebenfalls, abhängig vom Derivatisierungsgrad, eine hohe Anzahl an Hydroxygruppen (höher, je niedriger die Carboxymethylierungsstufe bzw. die Vinylsulfonfunktionalisierung) und Carboxylgruppen (höher, je niedriger der Derivatisierungsgrad an Maleinimid bzw. TPH/TPH) vor.

Ergebnisse und Diskussion

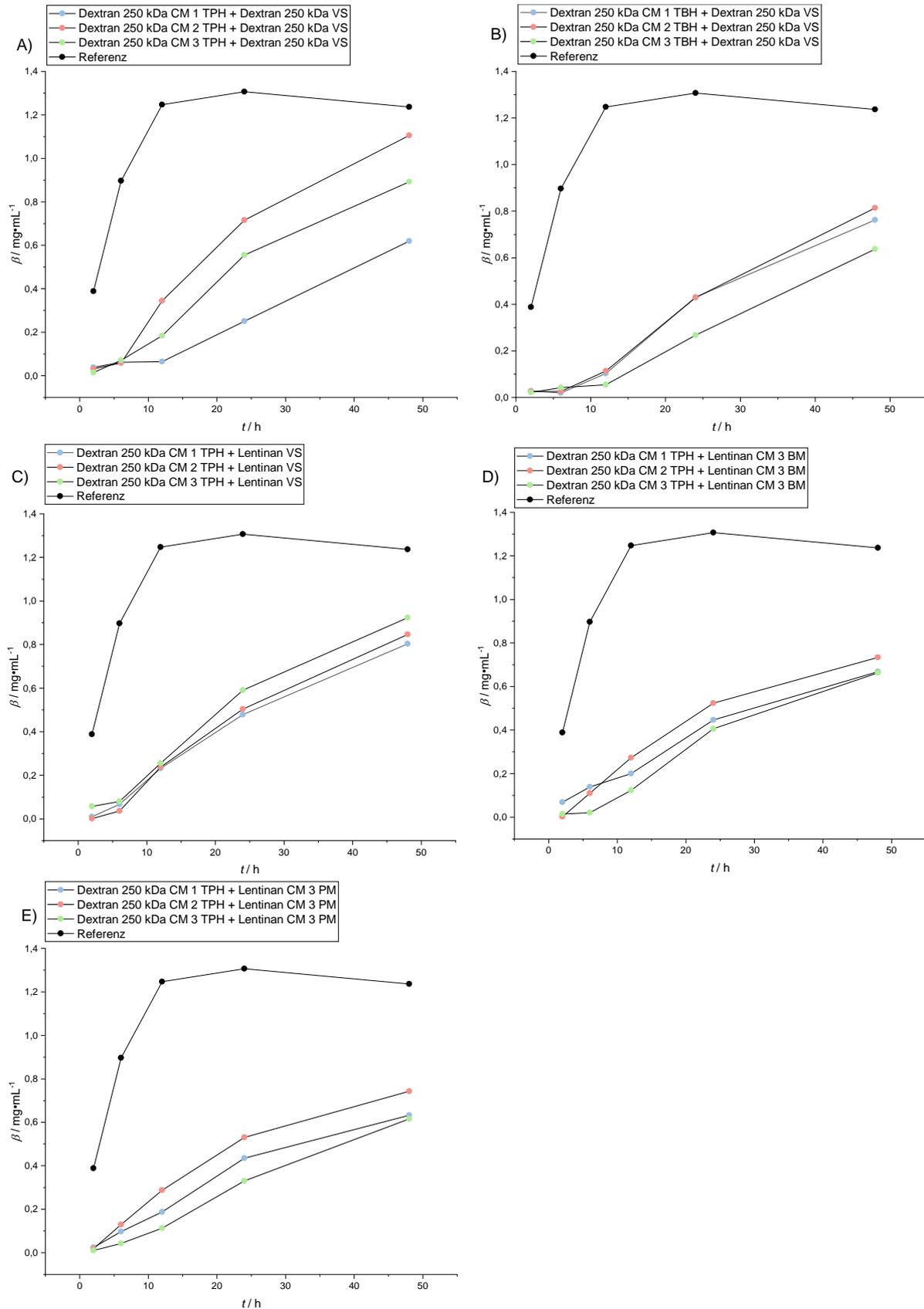


Abbildung 3.31: Verlauf der Glucosekonzentration β unterschiedlicher Hydrogele in Abhängigkeit der Zeit t .

Mit diesen funktionellen Gruppen wechselwirkt die Glucose, was sowohl die Diffusion generell als auch die Permeationsgeschwindigkeit beeinflusst. Des Weiteren liegt bei den hier

erzeugten Hydrogelen eine amorphe Struktur vor. Das bedeutet, dass die Anzahl und Größe der Poren von Gel zu Gel variiert.^[112] In Abbildung 3.32 ist die Diffusion von Glucose durch ein Hydrogel schematisch gezeigt.

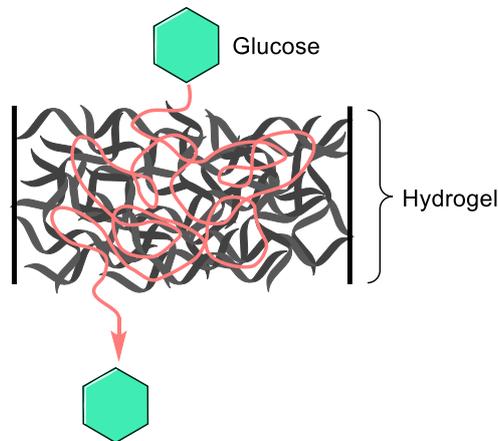


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung der Diffusion von Glucose durch ein Hydrogel.

Durch das Zusammenspiel aus der Beschaffenheit der Gele und des Penetrationsstoffes können diese Ergebnisse erklärt werden. Dies wird auch beim Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten der untersuchten Gele deutlich und wurde mit Hilfe der Formel 3.4 berechnet.^[113]

$$t = -\left(\frac{V}{2A}\right) \cdot \ln\left(\frac{2c_t}{c_0}\right) \quad \text{Formel 3.4}$$

Dabei beschreibt t die Zeit in h, V das Volumen der FranzTM-Zelle und A die Permeationsfläche. Die Variable c_t gibt die Konzentration der Glucose in der Akzeptorzelle zum Zeitpunkt t an und c_0 die Anfangskonzentration der Glucose in der Donatorzelle. Über eine lineare Regression (Excel: RGP) wurde die jeweilige Regressionsgerade bestimmt und über ihre Steigung m schließlich der Permeabilitätskoeffizient P . Die ermittelten Permeabilitätskoeffizienten sind in Tabelle 3.10 gezeigt. In den Einträgen 2 bis 4 sind die jeweiligen Permeabilitätskoeffizienten der Hydrogele bestehend aus Dextran 250 kDa CM1-3 TPH + Dextran 250 kDa VS gezeigt. Den höchsten Wert hatte hier die Kombination aus der zweiten Carboxymethylierungsreaktion ($6.04 \pm 0.35 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), gefolgt von der höchsten Carboxymethylierungsstufe und schließlich die Niedrigste. Auch bei den TBH-Derivaten zeigte sich dieses Verhalten (Einträge 5 – 7). Hier zeigte die Kombination aus Dextran 250 kDa CM2 TBH + Dextran 250 kDa VS den höchsten Permeabilitätskoeffizienten mit einem Wert von $3.99 \pm 0.27 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ auf. Bei den Maleinimid-Derivaten (Einträge 11-16) zeigte sich ebenfalls dieser Verlauf. Lediglich bei den Hydrogelen, bestehend aus Dextran 250 kDa CM1-3 TPH + Lentinan VS, zeigte sich eine Abnahme der Permeabilitätskoeffizienten mit steigender Carboxymethylierungsreaktion von $5.12 \pm 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ für das Hydrogel

bestehend aus der CM3-Komponente auf $4.16 \pm 0.16 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ für das Hydrogel bestehend aus der CM1-Komponente.

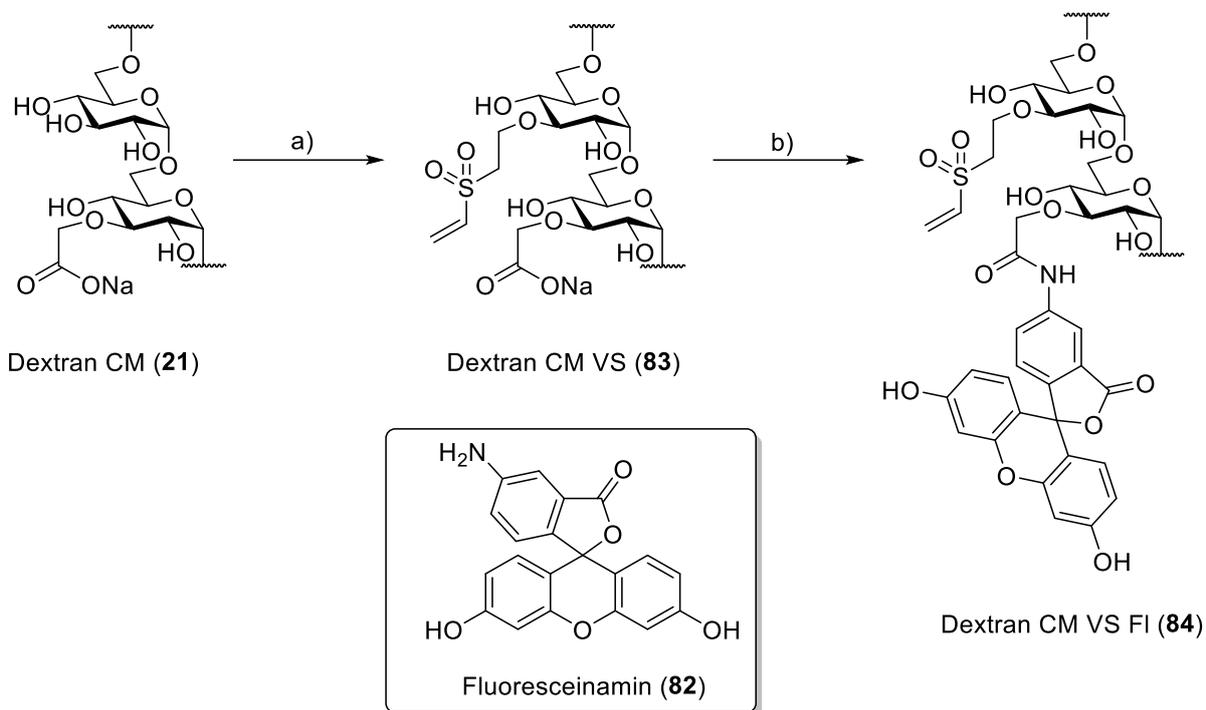
Tabelle 3.10: Ermittelte Permeabilitätskoeffizienten P der untersuchten Hydrogele. Die Konzentration betrug bei den Dextran-basierten Gelen jeweils 2 w% pro Komponente. Bei Hydrogelen, die Lentinan als Akzeptorkomponente enthielten betrug die Konzentration jeweils 4 w%.

Eintrag	Donator	Akzeptor	$P / 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$
1	Referenz		9.35 ± 0.17
2	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Dextran 250 kDa VS	2.84 ± 0.23
3	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Dextran 250 kDa VS	6.04 ± 0.35
4	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Dextran 250 kDa VS	4.65 ± 0.25
5	Dextran 250 kDa CM1 TBH	Dextran 250 kDa VS	3.77 ± 0.27
6	Dextran 250 kDa CM2 TBH	Dextran 250 kDa VS	3.99 ± 0.27
7	Dextran 250 kDa CM3 TBH	Dextran 250 kDa VS	2.92 ± 0.25
8	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan VS	4.16 ± 0.16
9	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan VS	4.38 ± 0.22
10	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan VS	5.12 ± 0.25
11	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan CM3 BM	356 ± 0.23
12	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan CM3 BM	4.02 ± 0.32
13	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan CM3 BM	3.33 ± 0.22
14	Dextran 250 kDa CM1 TPH	Lentinan CM3 PM	3.36 ± 0.21
15	Dextran 250 kDa CM2 TPH	Lentinan CM3 PM	4.10 ± 0.33
16	Dextran 250 kDa CM3 TPH	Lentinan CM3 PM	3.00 ± 0.13

3.2.4 Untersuchung des enzymatischen Abbaus ausgewählter Hydrogele

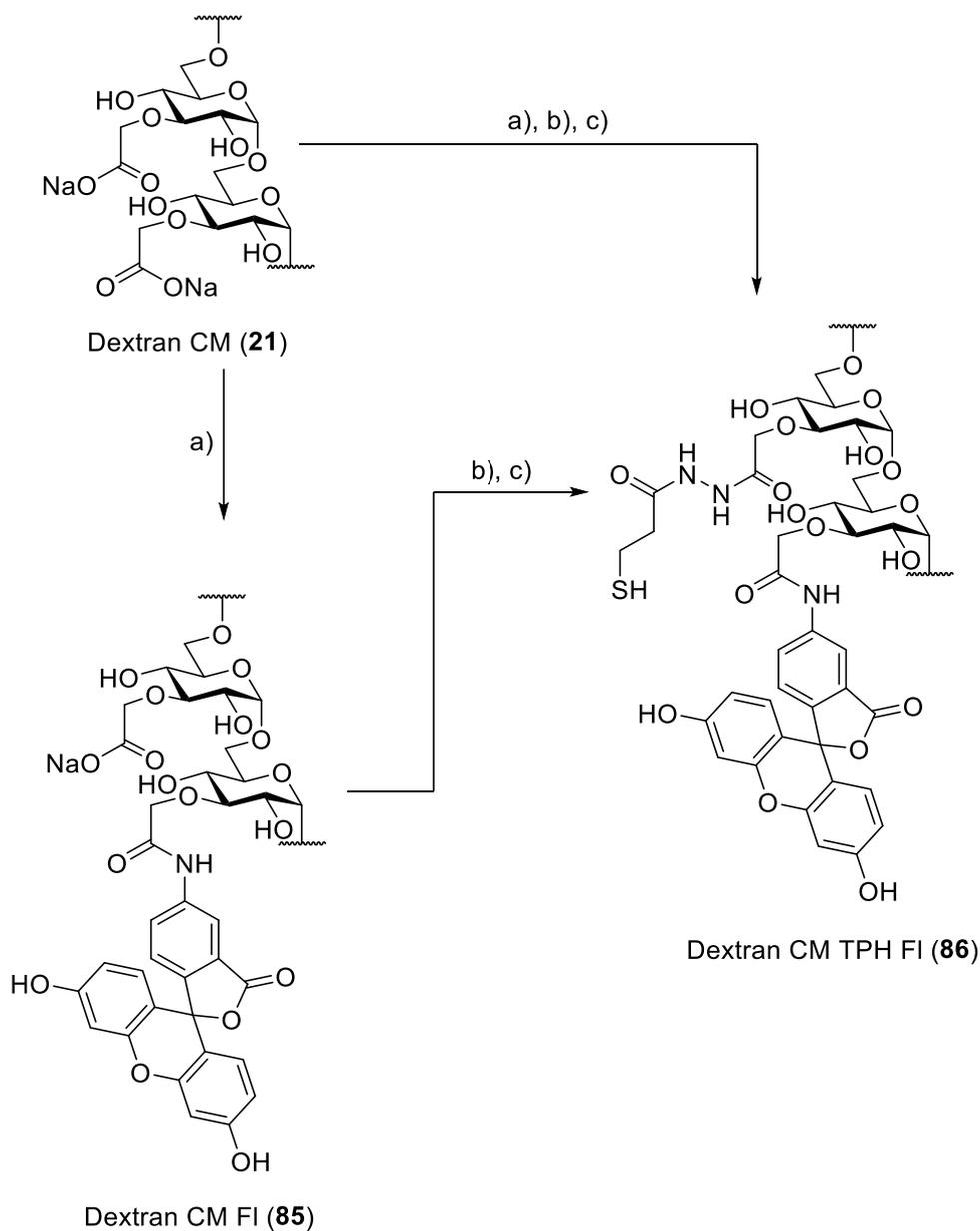
Die im oberen Abschnitt erfolgreich synthetisierten Hydrogele, bestehend aus Dextran CM TPH + Dextran VS sowie die Lentinanderivate (**48**, **72**, **73**), sollten im Folgenden auf ihre enzymatische Abbaubarkeit untersucht werden. MEYVIS & VAN TOMME *et al.* berichteten über den Einsatz von Dextran-basierten Hydrogelen als *Drug Delivery*-System zur Freisetzung von verschiedenen Proteinen.^[21,114] Um die Freisetzung einer kovalent gebundenen Verbindung im Hydrogel zu untersuchen und damit einhergehend den enzymatischen Abbau, wurden die verwendeten Komponenten mit Fluoresceinamin (**82**) modifiziert. Dieses Molekül kann im späteren Verlauf fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert werden. Die so modifizierten Hydrogele wurden im Anschluss in Anlehnung der Methode von BOURNE *et al.* mit Hilfe von Dextranase degradiert.^[115] Die Degradation erfolgte hierbei durch die zufällige Hydrolyse der α -1,6-glycosidischen Bindungen des Dextrans unter Freisetzung von Isomaltooligosaccharide unterschiedlichster Größen.^[116] Zur Untersuchung der Hydrogele bestehend aus Dextran CM

TPH + Dextran VS wurde die Akzeptorkomponente mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinamin (**82**) markiert. Der Reaktionsverlauf ist in Schema 3.25 zu sehen.



Schema 3.25: Darstellung von fluoreszenzmarkiertem Dextran CM VS FI (**84**). Reaktionsbedingungen: a) NaOH (0.1 M), DVS, 2.5 min, b) H₂O, EDC·HCl, DIPEA, HOBT·H₂O, **82**, 15 h, RT.

Zur Untersuchung der Hydrogele bestehend aus Dextran CM TPH + Lentinan VS bzw. Lentinan VS bzw. Lentinan BM / PM wurde Dextran CM TPH (**36**) in das Fluorescein-modifizierte Derivat überführt. Dafür wurde im ersten Schritt an carboxymyliertes Dextran (**21**) Fluoresceinamin (**82**) gekoppelt. Anschließend wurde dialysiert und lyophilisiert. Das erhaltene Produkt wurde anschließend unter den etablierten Kopplungsbedingungen TPH-modifiziert. Die gesamte Synthese dauerte bis zum Erhalt des gewünschten Produkts zwei Wochen. Aus diesem Grund wurde eine *one pot*-Variante entwickelt. Hierbei erfolgten alle Reaktionsschritte nacheinander, womit die Synthesedauer von zwei auf eine Woche reduziert werden konnte. Die Reaktionsbedingungen sind in Schema 3.26 gezeigt. Es wurde jeweils eine der zur Gelbildung nötigen Komponenten mit Fluoresceinamin (**82**) ausgestattet. Dies hat den Grund, dass ansonsten die Fluoresceinaminkonzentration zu hoch wäre und weitere Verdünnungen vor der Messung vorgenommen werden müssten. Die Hydrogele wurden in Eppendorfgläsern gebildet und anschließend mit einer Lösung aus Dextranase in Citratpuffer (pH 5.6) überschichtet und bei 37 °C inkubiert.



Schema 3.26: Darstellung von fluoreszenzmarkiertem Dextran CM TPH FI (86) als *one pot*-Synthese und als konvergente Synthese. Reaktionsbedingungen: a) H₂O, EDC·HCl, DIPEA, HOBT·H₂O, **82**, 15 h, RT; b) MES, EDC·HCl, HOBT·H₂O, DTPH, 15 h, RT; c) pH 7.5, DTT, pH 8.5, 15 h, RT.

Es wurden Aliquote nach 0.5, 3, 5 sowie 24 h genommen und anschließend fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Der Ablauf des enzymatischen Abbaus ist in Abbildung 3.33 Abschnitt B gezeigt. Im Abschnitt A der Abbildung ist ein Fluoresceinamin-modifiziertes Hydrogel unter Tageslicht und UV-Licht gezeigt.

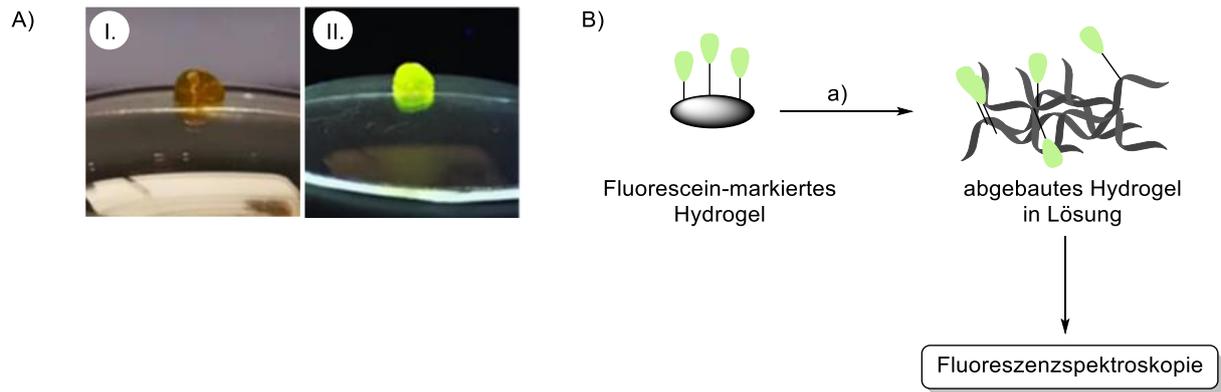


Abbildung 3.33: A) Hydrogel bestehend aus Fluorescein-modifiziertem Dextran 250 kDa CM2 TPH FI + Lentinan VS unter Tageslicht (Fall I.) und unter UV-Licht (Fall II.), B) Degradation von Fluoreszenzmarkierten Hydrogelen. Reaktionsbedingungen a) Citratpuffer (pH 5.6), Dextranase, 37 °C.

Als Referenz wurde die entsprechende Fluoresceinamin-modifizierte Komponente mit dem gleichen Volumen an Puffer (pH 7.5) verdünnt, mit Dextranaselösung versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.34 gezeigt.

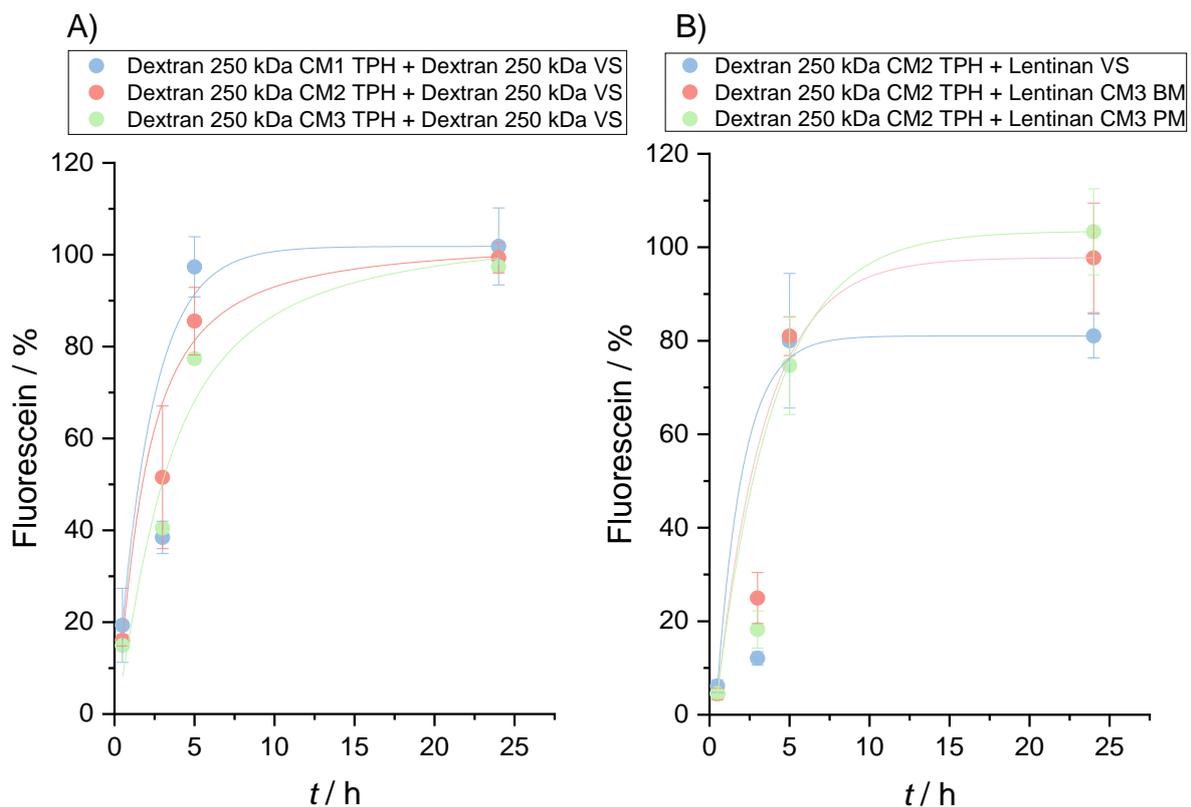


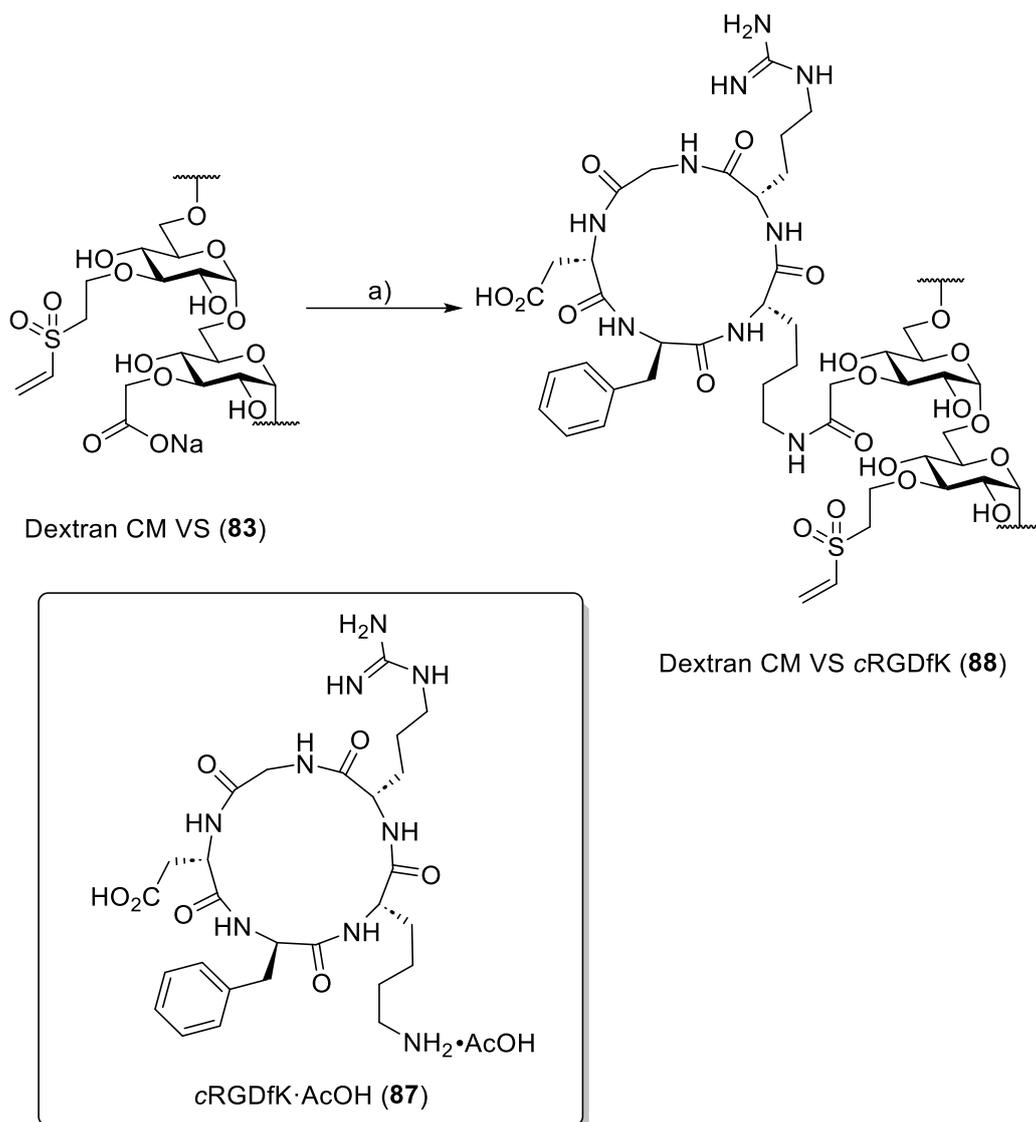
Abbildung 3.34: Auftragung des Fluoresceingehalts in Abhängigkeit der Zeit t . A) Für die Kombinationen aus Dextran 250 kDa CM TPH + Dextran 250 kDa VS; B) für die Kombinationen aus Dextran 250 kDa CM2 TPH und Lentinan VS sowie Lentinan CM3 BM und PM.

Bei den Hydrogelen, bei denen sowohl die Akzeptor- als auch die Donatorkomponente aus Dextran 250 kDa bestand, war zu erkennen, dass mit steigender Funktionalisierung der

Donatorkomponente die enzymatische Abbaubarkeit abnahm (Abbildung 3.34, Abschnitt A). So zeigten die Hydrogele bei denen Dextran 250 kDa CM1 TPH die Donatorkomponenten waren, den schnellsten und bei den Gelen aus Dextran 250 kDa CM3 TPH den langsamsten Verlauf des Abbaus bzw. der Freisetzung des Fluoresceinamins. Dieses Verhalten ist damit zu erklären, dass die Konformation des Dextrans durch die Modifizierung an den glycosidischen Einheiten verändert wird, sodass es nicht mehr perfekt in die aktive Tasche der Dextranase passte und es somit nicht zu einer schnellen Hydrolyse der α -1,6-glycosidischen Bindungen kommen konnte.^[117] Bei den Hydrogelen, bei denen die Akzeptorkomponente aus Lentinan bestand (Abbildung 3.34, Abschnitt B) war ein annähernd vollständiger Abbau des Gels bei den Kombinationen aus der Dextran 250 kDa CM2 TPH + Lentinan CM3 PM und BM zu erkennen. Bei der Kombination, bei der Vinylsulfon-modifiziertes Lentinan als Akzeptor eingesetzt wurde, wurde nach 24 h lediglich 80 % des Fluoresceinamins freigesetzt. Dies ließ sich dadurch erklären, dass die Vernetzung des Vinylsulfonblends wesentlich höher war als bei den Maleinimiderivaten. Dadurch ließen sich die Gele nicht vollständig abbauen. Außerdem ist zu sagen, dass die Dextranase α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Lentinan besitzt diese Bindungen nicht. Dies führte ebenfalls dazu, dass die Gele langsamer und nicht vollständig abgebaut wurden. Jedoch konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass diese Hydrogele biodegradierbar sind und ebenfalls als *Drug Delivery*-System genutzt werden könnten.

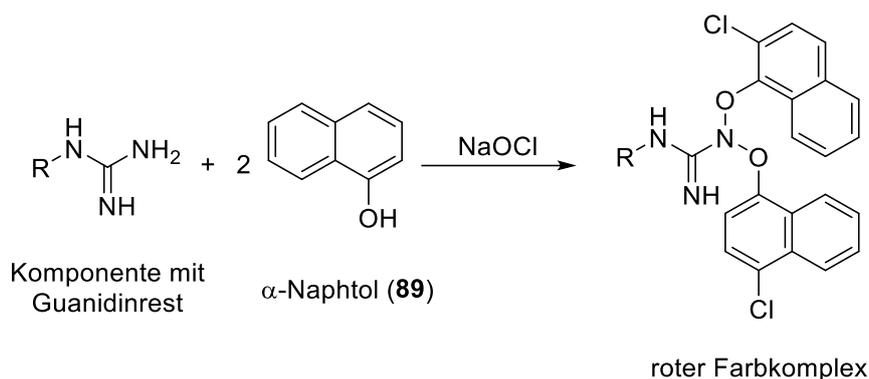
3.2.5 Untersuchungen zur Biokompatibilität

Zur Untersuchung der Biokompatibilität sollten zum einen die Hydrogele und zum anderen die einzelnen Komponenten auf ihre Zytotoxizität untersucht werden. Des Weiteren wurden einige Vinylsulfonkomponenten mit dem zyklischen Pentapeptid cRGDfK (**87**) modifiziert. Die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) bindet an die an der Zelloberfläche befindlichen $\alpha_v\beta_3$ - sowie $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, wodurch die Zelladhäsion und die Bildung von Zellviabilitätsfaktoren gefördert werden.^[118] Es zeigte sich, dass die zyklische Form der RGD-Sequenz durch ihren räumlich weitaus weniger flexiblen Aufbau die Interaktion mit den Integrinen begünstigt.^[119] Der Reaktionsablauf dafür ist in Schema 3.27 gezeigt. Für die Modifizierung wurde Vinylsulfon-modifiziertes carboxymethyliertes Dextran (**83**) unter EDC-Kupplungsbedingungen mit cRGDfK·AcOH (**87**) zur Reaktion gebracht. Das zyklische Pentapeptid **87** wurde in Vorarbeiten im großen Maßstab in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.^[119]



Schema 3.27: Darstellung von cRGDfK-modifiziertem Dextran CM VS (**88**). Reaktionsbedingungen: a) H₂O, MES, EDC·HCl, NHS, cRGDfK·AcOH (**87**), 15 h, RT.

Aufgrund der sehr geringen Mengen cRGDfK·AcOH (**87**) die zur Modifizierung verwendet wurden, konnte die Derivatisierung im ¹H NMR-Spektrum nicht quantifiziert sowie identifiziert werden. Zur Veranschaulichung wurde eine Charge Dextran mit der zehnfachen Menge des Peptids **87** umgesetzt (Spektrum in Anhang). Zur Quantifizierung der RGD-Sequenz wurde eine Methode von WEBER *et al.* verwendet.^[120] Grundlage hierfür war die Sakaguchi-Reaktion, die zum Nachweis von Guanidinstrukturen in Arginin entwickelt wurde.^[121] Dieser beruht auf der Reaktion zwischen einem Guanidinrest mit α-Naphtol (**89**) mit Hilfe von Natriumhypochlorit unter basischen Bedingungen. Das Produkt dieser Reaktion ist ein roter Farbkomplex, der photometrisch (λ = 515 nm) quantifiziert werden konnte. In Abbildung 3.35 ist der Ablauf der Sakaguchi-Reaktion sowie die Ergebnisse der photometrischen RGD-Bestimmung gezeigt.

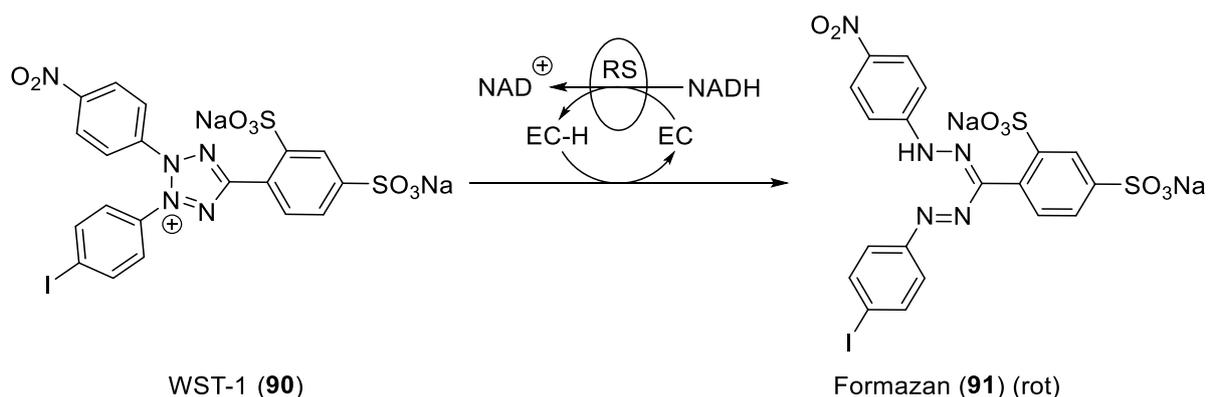


Eintrag	Probe	DS / 10^{-3} %
1	Dextran 250 kDa CM1 VS RGD	1.6 \pm 0.04
2	Dextran 500 kDa CM 1 VS RGD	2.3 \pm 0.02

Abbildung 3.35: Vermuteter Ablauf der Sakaguchi-Reaktion zum Nachweis von Guanidiningruppen und Ergebnisse der photometrischen RGD-Bestimmung (n = 3).

Es ist zu erkennen, dass der Grad der Modifizierung sehr niedrig ist. Dies liegt an der geringen Menge an cRGDFK-AcOH (**87**) (4.5 μ mol) die für die Derivatisierung verwendet wurde.

Mit den so zusätzlich hergestellten RGD-modifizierten Akzeptoren wurden im Anschluss Zellversuche durchgeführt. Die Zytotoxizität der einzelnen Komponenten wurde mit Hilfe eines WST-1-Assays bestimmt. Das Funktionsprinzip ist in Schema 3.28 gezeigt. Dieser basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoniumsalz (**90**) durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase vitaler Zellen zum roten Formazan **91**.^[122,123] Somit ist die Menge des roten Formazans proportional zu der Anzahl intakter Zellen.



Schema 3.28: Funktionsweise des WST-1-Assays. RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktasesystem, EC = Reagenz für Elektronenkopplung.

Es wurden HEK 293t-Zellen für die Dauer von einer Stunde mit den Einzelkomponenten inkubiert und anschließend die Zellviabilität über den WST-1-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 gezeigt.

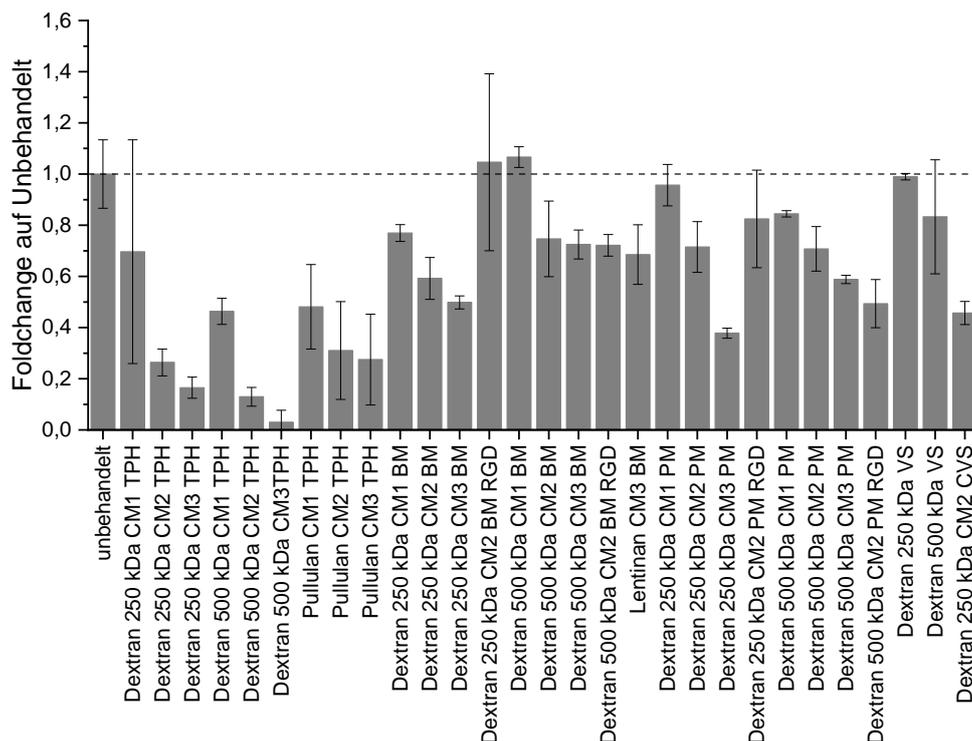
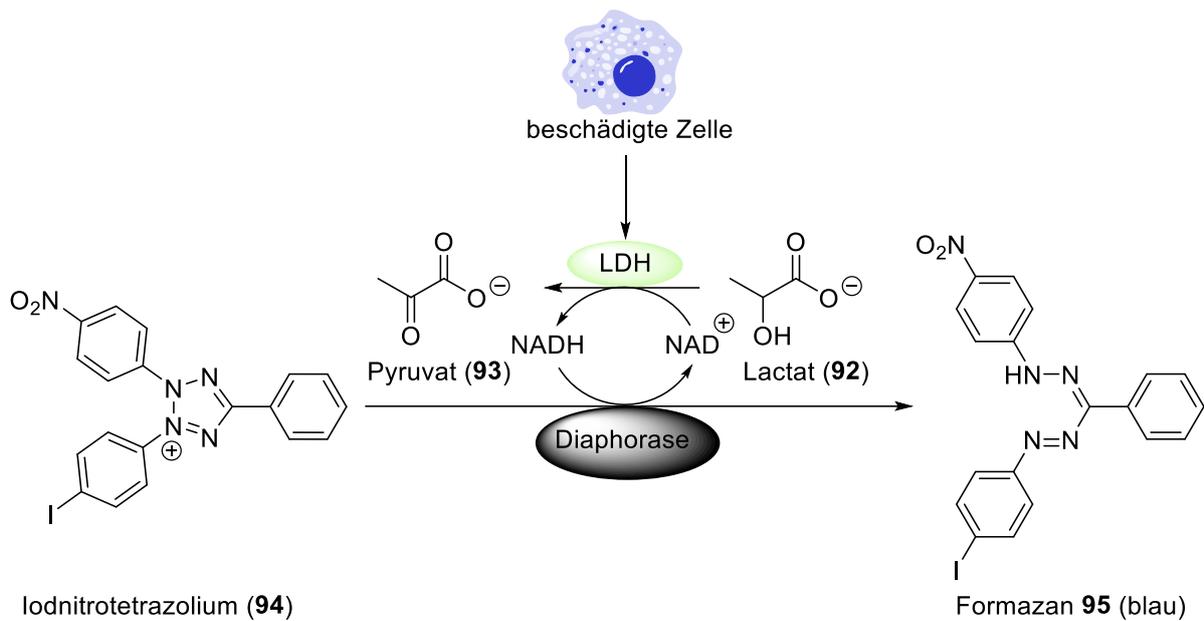


Abbildung 3.36: Cytotoxizität der einzelnen Komponenten nach 1 h Inkubation via WST-1-Assay (HEK 293t, n = 3).

Es wurde festgestellt, dass alle Komponenten eine gewisse Zytotoxizität aufwiesen. Es ist zudem zu erkennen, dass die Zytotoxizität der Donatorkomponenten wesentlich größer war, als die der Akzeptorkomponenten. Dabei ist anzumerken, dass die Zellen, die später in die Hydrogele eingebettet werden, den Einzelkomponenten nicht für einen langen Zeitraum ausgesetzt sind. Grund hierfür ist, dass die Gelbildung sofort nach dem Durchmischen der beiden Komponenten beginnt, und somit die funktionellen Gruppen, die wahrscheinlich für die Zytotoxizität verantwortlich sind, allmählich abreagieren.

Im nächsten Schritt wurden Zellen in einige Hydrogelkombinationen eingebettet. Hierfür wurde im ersten Versuch NRK-Zellen mit Hydrogelen auf Dextran-Basis zusammengeführt und für 1 d inkubiert. Bei der Zelllinie handelt es sich um Zellen aus den Nieren von Ratten der Gattung *Rattus norvegicus*. Anschließend wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität ein Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays ist in Schema 3.29 gezeigt. Beschädigte Zellen setzen das Enzym LDH frei. Dieses oxidiert das im Assay-Mix vorliegende Lactat (92) zum Pyruvat (93) indem der Co-Faktor NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Durch das NADH und der Diaphorase wird das Iodnitrotetrazolium (94) nun in das Formazan 95 reduziert, das aufgrund seiner blauen Farbe photometrisch bestimmt werden kann.^[124,125]



Schema 3.29: Funktionsweise des LDH-Assays.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.37 gezeigt. In der Abbildung ist ein leichter Anstieg der LDH-Konzentration für alle Hydrogele zu sehen. Dieser ist jedoch relativ gering im Vergleich zum Wert der Lysis. Außerdem waren in den untersuchten Hydrogelen noch keine RGD-Sequenzen zur Erhöhung der Biokompatibilität enthalten, sodass den Zellen keine Adhäsionsfaktoren zur Verfügung gestellt wurde.

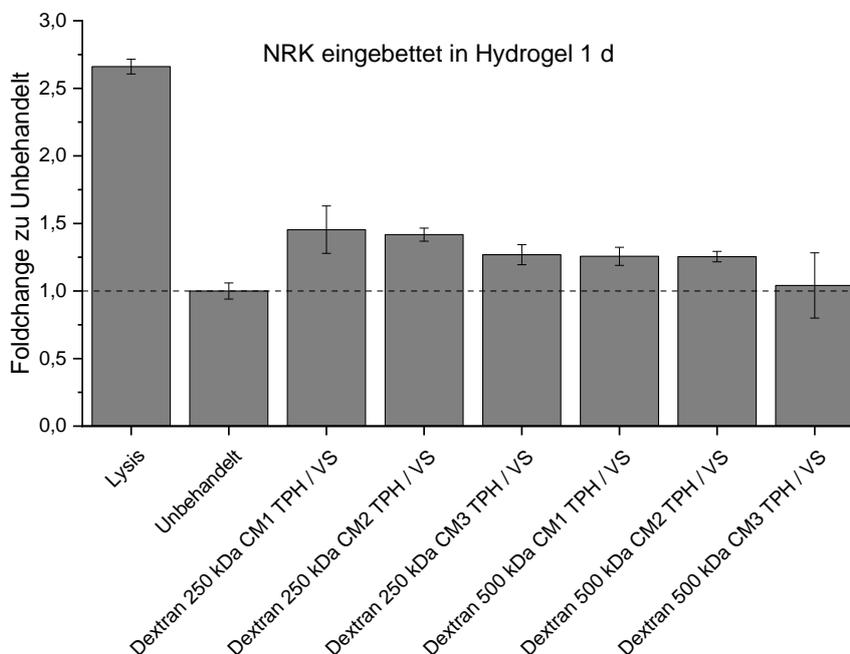


Abbildung 3.37: Ergebnisse des LDH-Assays für NRK-Zellen, eingebettet in Hydrogelen für 1 d (n = 3).

Da die Hydrogele später im besten Fall in der humanen Medizin Anwendung finden sollen, wurde in den nächsten Versuchen der Einfluss der Hydrogele auf HCFs (*human cardiac*

fibroblasts) untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Kardiofibroblasten, die aus den Ventrikeln des Herzens isoliert wurden. Um zu untersuchen, ob eine Kultivierung der Zellen in den Hydrogelen möglich wäre, wurden die Zellen für insgesamt 3 d in den Hydrogelen inkubiert. Es wurden LDH-Assays nach 1 d und nach 3 d durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Hydrogele teilweise einen geringen zytotoxischen Effekt auf die HCFs hatten. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Hydrogele, bei denen die Akzeptorkomponente das zyklische RGD-Peptid trugen wesentlich besser mit den Zellen kompatibel sind, als diejenigen, die dieses Peptid nicht besaßen.

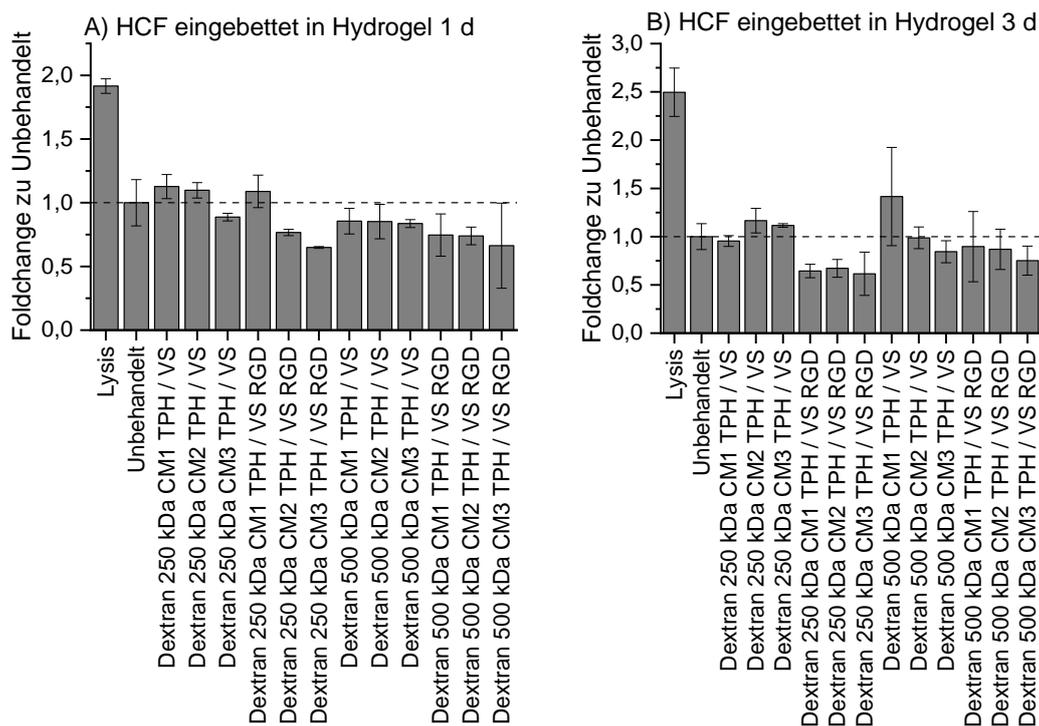


Abbildung 3.38: Ergebnisse des LDH-Assays für HCFs eingebettet in Hydrogelen für A) 1 d und B) 3 d (n = 3).

Um einen Eindruck der Morphologie zu bekommen und das Verhältnis von lebenden und toten Zellen abschätzen zu können, wurden die Konstrukte einer lebend/Tod-Färbung unterzogen. Für die Färbung von lebendigen Zellen wurden die Zellen mit Calcein-AM angefärbt. Dabei handelt es sich um den Farbstoff Calcein (96) in seiner Acetoxymethylester (AM)-Form (97). Dieses lipophile Molekül wird rasch von Zellen ins Zytosol aufgenommen, und wird durch die intrazellulären Esterasen zum Calcein (96) hydrolysiert wo es mit vorhandenen Calcium- und Eisenionen einen grün fluoreszierenden Komplex bildet.^[126] Die toten Zellen wurden mit Hilfe des Farbstoffes Propidiumiodid (98) gefärbt. Hierbei wird die Eigenschaft zunutze gemacht, dass dieses Molekül lediglich Zellen mit beschädigter Zellwand passieren kann. Somit werden nur tote Zellen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff gefärbt. In Abbildung 3.39 sind das Prinzip der Calcein-AM-Färbung (A) und der Farbstoff Propidiumiodid (98) (B) gezeigt.

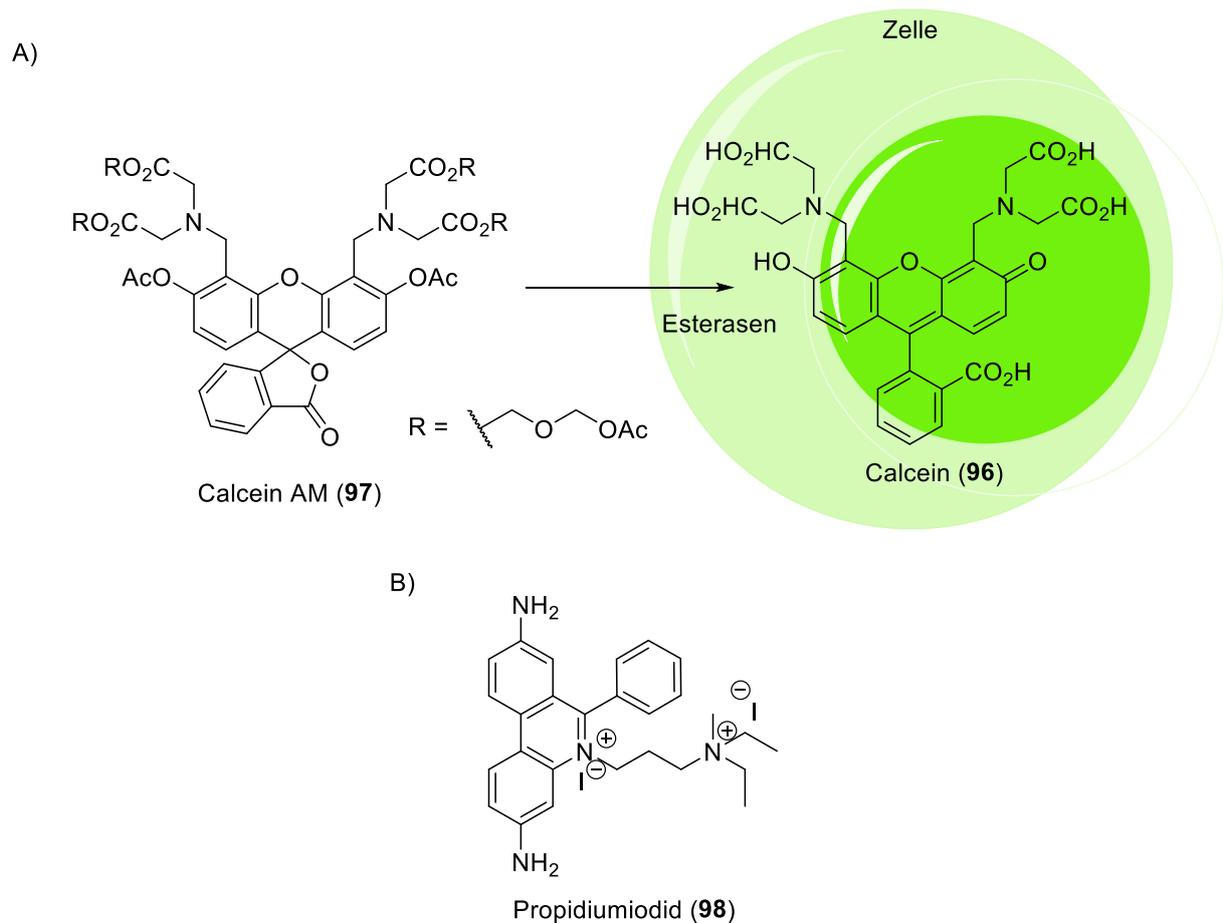


Abbildung 3.39: A) Schematisch Darstellung der Calcein-AM-Färbung und B) Propidiumiodid (98).

Die so gefärbten eingebetteten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse einiger Hydrogele sind in Abbildung 3.40 gezeigt.

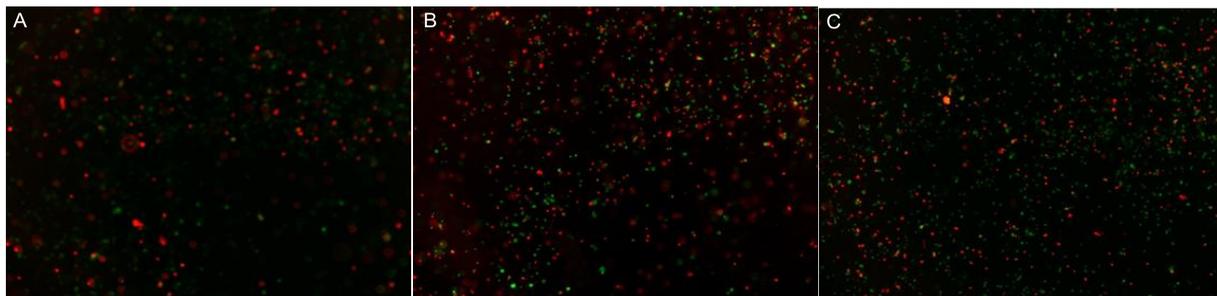


Abbildung 3.40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HCFs eingebettet in Hydrogelen nach 1 d. A) Dextran 500 kDa CM2 TPH / VS, B) Dextran 500 kDa CM3 TPH / VS, C) Dextran 500 kDa CM3 TPH / VS RGD.

Es ist zu erkennen, dass ein Großteil der Zellen in den Hydrogelen rot fluoreszierte und nur wenige grün fluoreszierende Zellen zu sehen waren. Das bedeutet, dass ein Großteil der HCFs bereits nach einem Tag gestorben sind. Dieser Beobachtung kann unterschiedliche Gründe zugewiesen werden. Zum einen könnte das Material, also das Hydrogel selber einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausüben, zum anderen können es sein, dass die Zellen nicht für dreidimensionale Zellkultivierung geeignet waren. Auffällig war zudem, dass auch das

eingebraachte RGD-Motiv keinen positiven Effekt auf die Viabilität der Zellen hat. Die relativ positiven Ergebnisse des LDH-Assays nach einem und nach drei Tagen und die relativ negativen Ergebnisse der lebend/Tod-Färbung ließen sich wahrscheinlich auf die Halbwertszeit von LDH im Zellmedium zurückführen. Diese beträgt nämlich ca. 9 h.^[124] Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine weitere Zelllinie getestet. Dabei handelte es sich um die robustere Linie HEK-293t. Diese stammt aus humanen embryonalen Nierenzellen. Da die Synthese der Vinylsulfon-Komponenten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr erfolgreich möglich war, wurden neben zwei verbliebenen Kombinationen auf Vinylsulfonbasis auch einige Maleinimidkomponenten untersucht. In Abbildung 3.41 sind die Ergebnisse des LDH-Assays für die HEK-293t-Zellen gezeigt.

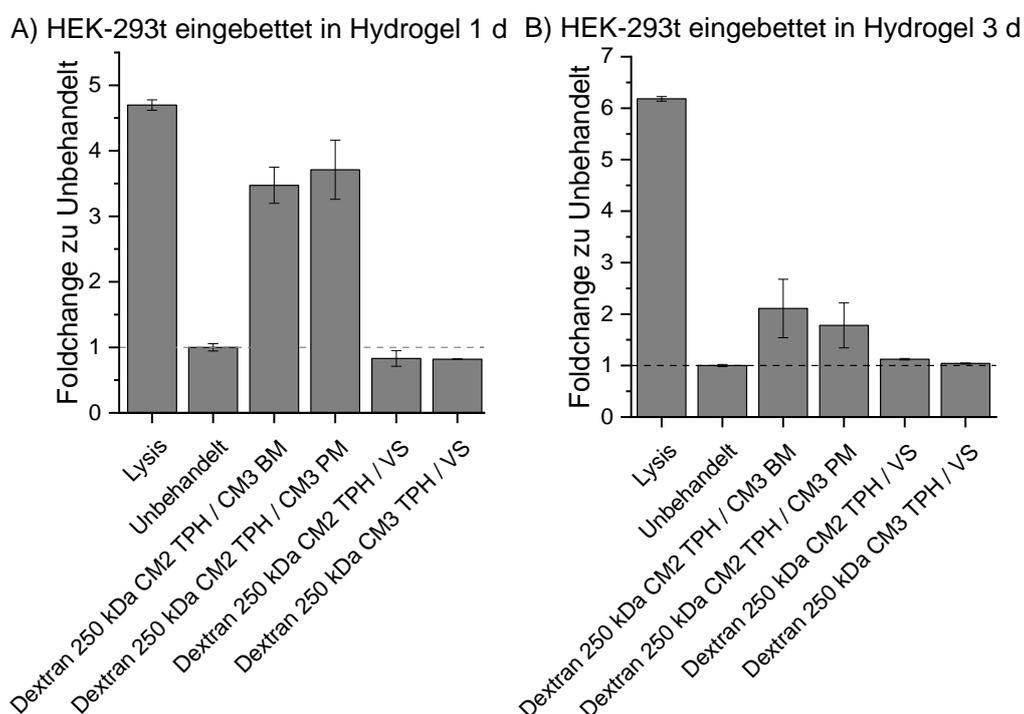


Abbildung 3.41: Ergebnisse des LDH-Assays für HEK-293t-Zellen eingebettet in Hydrogelen für A) 1 d und B) 3 d ($n = 3$).

Es ist zu erkennen, dass die Maleinimid-basierten Hydrogele einen relativ hohen zytotoxischen Effekt auf die Zellen hatten. Im Gegensatz dazu hatten die Vinylsulfon-basierten Hydrogele nach einem Tag gar keinen und nach drei Tagen lediglich einen leichten zytotoxischen Effekt auf die Zellen. Auch hier wurde eine Lebend/Tod-Färbung nach einem und nach drei Tagen durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 3.42 gezeigt.

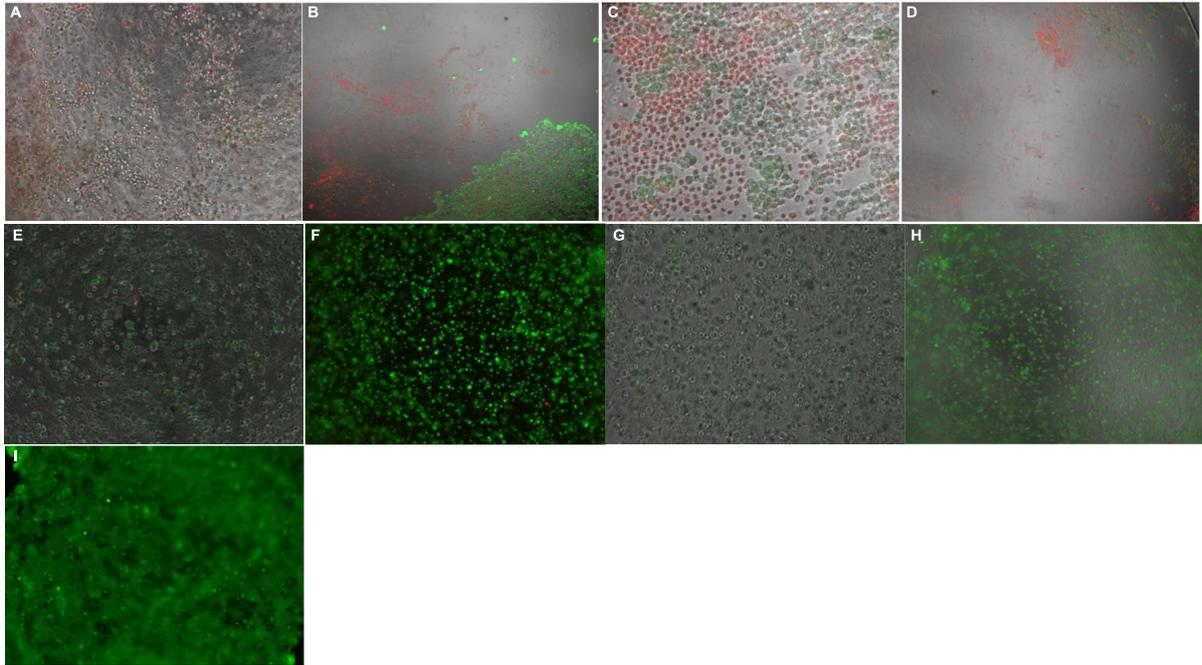


Abbildung 3.42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK-293t-Zellen eingebettet in Hydrogelen. A) Dextran 250 kDa CM2 TPH / CM3 BM 1 d, B) Dextran 250 kDa CM2 TPH / CM3 BM 3 d, C) Dextran 250 kDa CM2 TPH / CM3 PM 1 d, D) Dextran 250 kDa CM2 TPH / CM3 PM 3 d, E) Dextran 250 kDa CM2 TPH / VS 1 d, F) Dextran 250 kDa CM2 TPH / VS 3 d, G) Dextran 250 kDa CM3 TPH / VS 1 d, H) Dextran 250 kDa CM3 TPH / VS 3 d, I) unbehandelte HEK-293t-Zellen.

Den durch den LDH-Assay angegebenen zytotoxischen Effekt der Hydrogele auf Maleinimid-basis ließ sich anhand der Aufnahmen A – D bestätigen. Es waren deutlich mehr rot-fluoreszierende Zellen erkennbar als grüne. Außerdem sind in Abbildungen B und D Zellaggregate zu sehen. Diese zum Teil inhomogene Verteilung der Zellen wurde durch die rasche Gelierung hervorgerufen. Bei den Vinylsulfon-basierten Hydrogelen (E – H) war eine homogene Verteilung der Zellen zu erkennen. Außerdem wurde auch hier das Ergebnis des LDH-Assay bestätigt. Es zeigen sich deutlich mehr grün- als rot-fluoreszierende Zellen. Auch nach drei Tagen waren so gut wie gar keine toten Zellen zu sehen. Die sphärische Form der Zellen ließ sich auf das Fehlen von Adhäsionsfaktoren zurückführen. Da diese fehlten, blieben die Zellen in einer kugelförmigen Form und es fand keine interzellulären Interaktionen der Zellen statt, da es in dem Polysaccharidgerüst keine z. B. RGD-Sequenzen zur Interaktion mit den zellulären Integrinen gibt. Jedoch ist für diese Zelllinie damit gezeigt, dass sie über mindestens drei Tage mit Vinylsulfon-basierten Hydrogelen ohne jegliche Adhäsionsfaktoren kompatibel waren.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Polysaccharid-basierte Hydrogele für biomedizinische Anwendungen zu entwickeln. Des Weiteren sollte die Vernetzung über ein Zweikomponentensystem über eine Thiol-Michael-Reaktion erfolgen.

Dafür wurden die Polysaccharide Dextran (**9**), Pullulan (**10**), Lentinan (**11**) und Chitosan (**12**) im ersten Schritt erfolgreich in ihre carboxymethylierten Derivate nach der etablierten Methode von KIRSCHNING & DRÄGER *et al.* überführt. Anschließend erfolgte die Modifizierung dieser Polysaccharide mit DTPH (**25**) bzw. DTBH (**26**), um aus ihnen die erforderlichen Donatorkomponenten für die Thiol-Michael-Reaktion zu generieren. Nach der Optimierung der Kupplungsbedingungen erfolgte die erfolgreiche TPH-/TBH-Modifizierung bei den beiden Polysacchariden Dextran CM (**21**) sowie Pullulan CM (**22**). Zwar wurde auch Lentinan (**23**) in das korrespondierende TPH-Derivat **40** überführt, jedoch blieb eine erfolgreiche Hydrogelbildung aus. Es erfolgte die Charakterisierung über IR- und ¹H NMR-Spektroskopie sowie die Quantifizierung des Derivatisierungsgrades mit Hilfe des Ellman's-Assays.

Zur Herstellung der Akzeptorkomponenten sollten die Polysaccharide mit Vinylsulfon-Gruppen sowie Maleinimiden ausgestattet werden. Die Vinylsulfonmodifizierung wurde erfolgreich für die Polysaccharide Dextran (**9**), Pullulan (**10**) und Lentinan (**11**) durchgeführt. Nach spektroskopischer Untersuchung wurde der Derivatisierungsgrad der modifizierten Komponenten über einen indirekten Ellman's-Assay bestimmt. Zudem wurde mit Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) ein weiterer Vinylsulfon-Linker in die Bibliothek mit aufgenommen. Dieser konnte durch die Optimierung einer bestehenden Synthese in dieser Arbeit im größeren Maßstab erfolgreich synthetisiert werden. Allerdings ergab sich bei der Verwendung dieser CVS-modifizierten Polysaccharide eine für die Einbettung von Zellen zu lange Zeit zur Gelbildung. Leider war eine erfolgreiche Vinylsulfonmodifizierung zum Ende dieser Arbeit nicht mehr möglich, weswegen anschließend die Maleinimid-modifizierten Polysaccharide mit eingebunden wurden. Diese wurden in der Arbeit von Samhita Banerjee angefangen und wurden hier fortgeführt und optimiert. Somit konnten die Polysaccharide Dextran (**9**), Pullulan (**10**), Lentinan (**11**) und Chitosan (**12**) erfolgreich in ihre Maleinimidderivate Dextran CM BM / PM (**68, 69**), Pullulan CM BM / PM (**70, 71**) Lentinan CM BM / PM (**72, 73**) sowie Chitosan CM BM (**75**) überführt werden. Auch hier erfolgte die Charakterisierung spektroskopisch sowie die Bestimmung des Derivatisierungsgrades über einen indirekten Ellman's-Assay.

Außerdem konnten an einigen Polysacchariden kleine Moleküle, wie Fluorescein (**82**) sowie das zyklische Pentapeptid cRGDfK (**87**) gekoppelt werden. In Abbildung 4.1 sind die

modifizierten Polysaccharide aufgezeigt, die erfolgreich zur Bildung von Hydrogelen verwendet werden konnten.

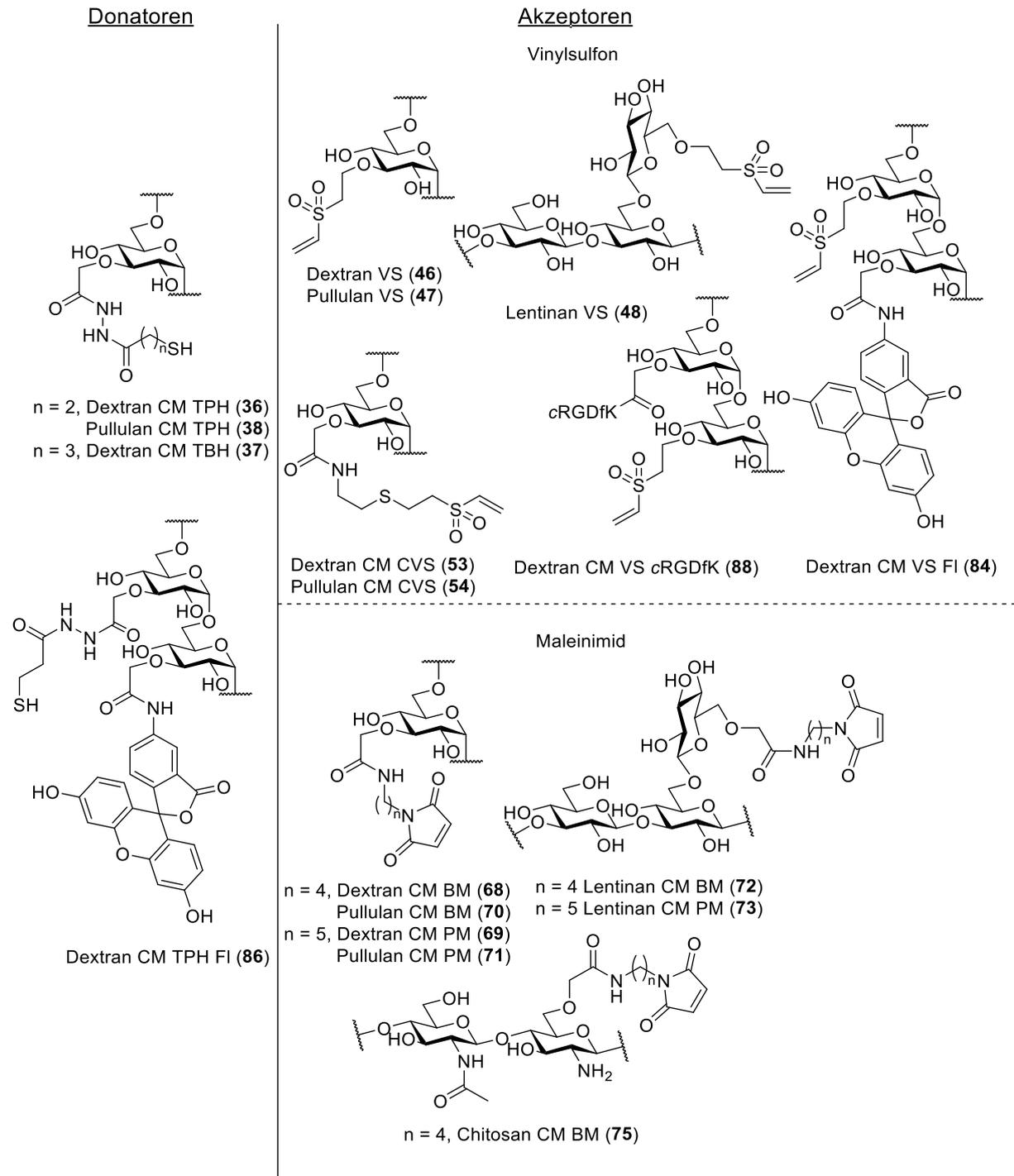


Abbildung 4.1: Modifizierte Polysaccharide, die erfolgreich zur Synthese von Hydrogelen verwendet wurden.

Aus diesem Pool verschiedener Akzeptor- und Donorkomponenten mit unterschiedlichen Derivatisierungsgraden konnten erfolgreich Hydrogele gebildet werden, die auf ihre physikochemischen sowie z. T. biologischen Eigenschaften untersucht wurden. Es wurde die Wasseraufnahme der synthetisierten Hydrogele untersucht und ein Zusammenhang zwischen Funktionalisierungsgrad und Wasseraufnahme festgestellt. Außerdem zeigte sich ebenso ein

Zusammenhang der Funktionalisierung und den rheologischen Eigenschaften der Hydrogele. So konnte festgestellt werden, dass mit steigender Funktionalisierung die Wasseraufnahme und die Zeit zur Gelbildung sank, aber die Steifigkeit bzw. das Speichermodul stieg. Des Weiteren wurde die Permeabilität einiger Hydrogele mit Hilfe von FranzTM-Diffusionszellen untersucht. Hierbei konnte kein Zusammenhang der Funktionalisierungsgrade und der Permeationskoeffizienten erkannt werden. Vielmehr konnte hier gezeigt werden, dass die Penetration von Glucose durch die Hydrogele generell möglich war. In weiteren Versuchen wurde die Biodegradierbarkeit einiger Dextran-basierter Hydrogele mit Hilfe von Dextranase untersucht. So konnte hier demonstriert werden, dass ein Zusammenhang der Abbaubarkeit und dem Funktionalisierungsgrad vorlag. Außerdem wurde bewiesen, dass auch Hydrogelblends aus Dextran CM TPH (36) und Lentinan VS (48) bzw. Lentinan CM BM / PM (72, 73) über Dextranase abgebaut werden konnten.

In biologischen Versuchen wurde festgestellt, dass alle Komponenten eine gewisse Zytotoxizität auf die untersuchten Zellen ausübten. Wobei nach erfolgter Gelbildung die für diesen Effekt verantwortlichen funktionellen Gruppen nicht mehr vorhanden waren. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Hydrogele eine geringe Zytotoxizität auf eingebettete NRK-Zellen hatten. Zudem wurde durch lebend/Tod-Färbung erkannt, dass für die Einbettung von HCFs die untersuchten Hydrogele nicht geeignet waren. Es konnte jedoch untersucht werden, dass eine Kultivierung von HEK-293t-Zellen in Vinylsulfon-basierten Hydrogelen über einen Zeitraum von drei Tagen möglich war. Die Maleinimid-basierten Hydrogele zeigten einen starken zytotoxischen Effekt auf die untersuchten Zellen.

4.2 Ausblick

Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen, sollte die Vinylsulfon-Modifizierung weiterhin untersucht werden, um wieder erfolgreich Vinylsulfon-modifizierte Derivate zu synthetisieren. Mit diesen sollten im Hinblick auf die erzielten biologischen Untersuchungen mit den HEK-293t-Zellen weitere biologische Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen sollte eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum als drei Tage untersucht werden und zum anderen der Einfluss von RGD-Sequenzen auf die Zellkultivierung studiert werden. In Anlehnung an die Arbeiten von Samhita Banerjee und Nick Dibbert, sollten Versuche zur Zytotoxizität mit Kardiomyozyten und anschließend Studien zur Gewebebildung mit diesen durchgeführt werden. Außerdem sollte die Cysteaminvinylsulfon-Modifizierung weiterhin optimiert werden, sodass eine Gelbildung in einem kürzeren Zeitraum möglich ist. Diese Hydrogele sollten im Anschluss ebenfalls auf ihre physikochemischen sowie biologischen Eigenschaften untersucht werden. Zudem sollte diese Vernetzungsmethode auf andere Polysaccharide ausgeweitet werden. So sollte diese Art der Modifizierung auch auf Hyaluronsäure übertragen werden. Dieses, in der humanen ECM vorhandene Polysaccharid,

zeigt eine sehr gute Biokompatibilität und wird heute schon in der regenerativen Medizin genutzt, weswegen es ein interessanter Kandidat zur Erzeugung eines weiteren biomedizinisch relevanten Hydrogels ist.

Des Weiteren sollte der Anwendungsbereich ausgeweitet werden. So könnten z. B. die relativ schnell gelierenden Hydrogele, bei denen keine homogene Durchmischung mit Hilfe einer Pipette möglich gewesen ist, für einen 3D-Drucksystem nützlich sein, bei dem die beiden Komponenten durch zwei getrennte Düsen zusammengeführt werden. Hierbei wäre eine schnelle Gelierung nötig.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

Alle Reaktionen mit feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in zuvor ausgeheizten Reaktionskolben unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zum Rühren wurden Magnet-rührplatten verwendet. Zudem beziehen sich die angegebenen Temperaturen auf die Temperatur des Ölbad. Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma Aldrich, Merck, TCI, oder Alfa Aesar bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Der LDH-Assay wurde von der Firma Promega und das zur Lebendfärbung verwendete Calcein AM von Invitrogen™ eBioscience™ bezogen. Die HCFs und das Fibroblast Growth Medium 3 (10 % FCS + Insulin + FGF) wurden von der Firma Promocell bezogen. Die HEK-293t wurden von Sigma Aldrich bezogen. Das Zellmedium Gibco Medium (DMEM) wurde von der Firma Thermo Fisher erworben.

Säulenchromatographie

Es wurde Kieselgel der Firma Merck (Korngröße: 40-63 µm Durchmesser) verwendet. Außerdem wurde unter leichtem Überdruck (Flash-Chromatographie) gearbeitet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Eluenten sind angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Erkennung wurden eine UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und ein Kaliumpermanganat-Tauchreagenz verwendet.

Gelpermeationschromatographie

Zur Messung wurde das Gerät der Firma Agilent Technologies mit einem RI-Detektor verwendet. Das Gerät wurde mit dem ReadyCal-Kit Pullulan high (M_w 2.040.000 – 180 Da) der Firma PSS Polymers kalibriert. Die Trennsäulen PSS SUPREMA analytical 100 und 3000 Å (Partikelgröße 10 µm) wurden mit dem Eluenten aus reinst H_2O , NaN_3 (0.02 %) und NaNO_3 (0.01 M) mit einer Flussrate von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ betrieben. Als interner Standard diente Ethylenglykol. Die Auswertung erfolgte mit der Software PSS WinGPC UniChrom.

Polysaccharide

Alle Dextrane wurden von der Firma Alfa Aesar bezogen. Pullulan wurde von TCI bezogen. Lentinan und Chitosan wurden von der Firma CarboSynth bezogen.

Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung der wässrigen Polysaccharid-Lösungen wurden die Proben mit flüssigem

Stickstoff eingefroren und anschließend durch die Anlage Alpha 2-4 der Firma Christ bei einem Druck von 0.25 mbar lyophilisiert.

Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit dem Gerät ASC400 der Firma Bruker aufgenommen, wobei das verwendete Lösungsmittel jeweils angegeben ist. Bei Messungen der Polysaccharide in D_2O wurde mit Wasserunterdrückung gemessen. Die Kalibrierung erfolgte über den Restprotonengehalt des jeweils angegebenen Lösungsmittels. Zur Auswertung wurde das Computerprogramm TopSpin herangezogen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm und die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die folgenden Abkürzungen gelten für die Signalmultiplizität: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Die Messungen wurden mit dem Gerät Micromass LCT der Firma Waters mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Dabei erfolgte die Injektion im Loop-Modus. Als Alternative konnte ein Micromass Q-TOF Premier Massenspektrometer, das mit einer Aquity Ultraperformance LC Anlage (Firma Waters) verbunden war, verwendet werden. Die Ionisierung erfolgte durch Elektronenspray-Ionisation (ESI). Es sind jeweils die kalkulierten und die gefundenen Massen angegeben.

FranzTM-Diffusionszellen

Es wurden vertikale FranzTM-Diffusionszellen von PermeGear (Abmessungen: 11.28 mm, 8 mL Volumen, 1 cm² Fläche) verwendet.

Rheometer

Rheologische Messungen wurden am Oszillations-Rheometer MCR302 der Firma Anton Paar durchgeführt. Die eingestellten Parameter der jeweiligen Messungen sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Eingestellte Parameter für die verschiedenen Messexperimente.

Parameter	Oszillationszeittest	Oszillationsamplitudentest	Oszillationsfrequenztest
γ / %	0.1	0.1-1.000	0.1
f / Hz	1	1	1-1.000
F_N / N	0	0	0
T / °C	37	37	37
Spaltabstand / mm	0.5	0.5	0.5

Dialyse

Die Dialyse der wässrigen Reaktionslösungen wurde in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa der Firma Membra-Cel™ durchgeführt. Als Gefäße wurden Bechergläser mit einem Volumen von 5 L verwendet, wobei die Dialyse unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur stattfand.

Titration

Für die Titrations zur Bestimmung der Substitutionsgrade der Carboxymethylierung sowie der Oxidierung wurde der Titrator TitrolLine® der Firma SI Analytics® verwendet.

Fluoreszenzmikroskop

Für das Lebend / Tod *Imaging* wurde das Fluoreszenzmikroskop BZ-X810 der Firma Keyence verwendet. Die Konstrukte wurden durch die Kanäle FITC/488 (grün) und TexasRed/570 (rot) untersucht.

Multiplate Reader

Zur Auswertung des WST-1 sowie LDH-Assays wurde der Multiplate Reader Synergy HAT der Firma BioTek verwendet.

Titration

Für die Titrations zur Bestimmung der Substitutionsgrade der Carboxymethylierung sowie der Oxidation wurde der Titrator TitrolLine® der Firma SI Analytics® verwendet.

LC-MS

Zur Überprüfung des Reaktionsverlaufs wurde eine LC-MS vom Modell Waters 2695 der Firma alliance® verwendet.

UV-vis- und Fluoreszenzspektrometer

Für Untersuchungen am Photometer wurde das UV-vis-Spektrometer 8453 der Firma Agilent verwendet. Zur Quantifizierung des Fluoresceins wurde der BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader der Firma Agilent verwendet.

5.2 Versuchsdurchführungen

Allgemeine Vorschrift zur Carboxymethylierung von Dextran (9), Pullulan (10), Len-tinan (11) und Chitosan CM1 (24)^[63]

Zu einer Lösung aus dem jeweiligen Polysaccharid (10.0 g, 1.0 Äq.) und deionisiertem Wasser (150 mL) wurden unter Rühren wässrige NaOH (8 M, 50 mL) und Chloressigsäure (20 g, 211 mmol, 3.4 Äq.) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1.5 h bei einer Temperatur von 62 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit wässriger HCl (6 M) neutralisiert und über einen Tropftrichter unter kräftigem Rühren in Methanol (ca. 800 mL)

getropft. Der Feststoff wurde über einen Büchnertrichter filtriert und für 15 h im Vakuumtrockenschrank (15 mbar, 40 °C) getrocknet. Es wurde das jeweilige carboxymethylierte Polysaccharid (11.6 g) als weißer Feststoff erhalten.

Um einen höheren Substitutionsgrad zu erhalten, wurde das einfach carboxymethylierte Polysaccharid bis zu fünf Mal dieser Prozedur unterzogen.

Carboxymethylierung von Chitosan (12)^[71]

Chitosan (**12**) (10.0 g, 62 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem Gemisch aus deionisiertem Wasser und *i*PrOH (1:4, 100 mL) suspendiert. Unter kräftigem Rühren wurde NaOH (13.5 g, 337 mmol, 5.40 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei 50 °C quellen gelassen. Anschließend wurde 2-Chloressigsäure (15.0 g, 158 mmol, 2.50 Äq.) in *i*PrOH (20 mL) innerhalb von 30 min hinzugegeben und das Gemisch für 4 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser-Methanol-Gemisch (200 mL, 70 % MeOH) beendet. Der Feststoff wurde über einen Büchnertrichter filtriert und mehrere Male mit einem Wasser-Methanol-Gemisch (70 % MeOH) gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff in deionisiertem Wasser (150 mL) gelöst, mit wässriger HCl (6 M) neutralisiert und unter kräftigem Rühren in Methanol (ca. 800 mL) getropft. Der entstandene Feststoff wurde über einen Büchnertrichter filtriert und für 15 h im Vakuumtrockenschrank (15 mbar, 40 °C) getrocknet. Es wurde carboxymethyliertes Chitosan (**24**) (11.4 g) als weißer Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Thiol-Modifizierung

Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Polysaccharid (100 mg, 1.00 Äq.) in H₂O (10 mL) wurden nacheinander MES (8.00 Äq.), EDC·HCl (1.50 Äq.) und HOBT·H₂O (1.10 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der entsprechende Linker (DTPH (**25**) oder DTBH (**26**) 0.50 Äq. für Pullulan und 0.50 Äq. für Dextran) hinzugegeben und das Gemisch für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 7 (NaOH 2.0 M) wurde DTT (5.00 Äq.) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde auf 8.5 eingestellt und das Gemisch für weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Einstellen des pH-Wertes auf pH 3.5 beendet, die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt, für einen Tag gegen NaCl-Lösung bei pH 3.5 dialysiert (3 × 20 g·L⁻¹) und einen Tag gegen Wasser bei pH 3.5 dialysiert. Nach Lyophilisierung wurde das Produkt (90 mg) als weißer watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Vinylsulfonmodifizierung von Polysacchariden^[81]

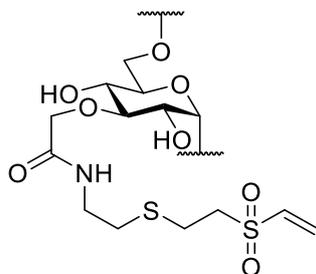
Zu einer Lösung des jeweiligen Polysaccharids (200 mg, 1.0 Äq.) in NaOH (0.1 M, 10 mL) wurde unter starkem Rühren bei Raumtemperatur Divinylsulfon (5 Äq.) hinzugefügt. Nach 2.5 min wurde die Reaktion durch Einstellen des pH-Wertes auf pH 5 beendet und die Lösung

für drei Tage gegen Wasser (pH 5) dialysiert. Nach Lyophilisierung wurde das Produkt (195 mg) als weißer watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung Maleinimid-modifizierter Polysaccharide

Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Polysaccharid (200 mg, 1.00 Äq.) in deionisiertem Wasser (100 mL) wurden nacheinander MES (2.00 Äq.), EDC·HCl (2.50 Äq.), NHS (2.00 Äq.) und der jeweilige Maleinimid-Linker (2.00 Äq. für Lentinan, 0.60 Äq. für Dextran) zugegeben. Die Lösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde für zwei Tage gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \times \beta = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf einen Wert von 6.1 eingestellt und nach Lyophilisation wurde das Produkt (190 mg) als watteartiger Feststoff erhalten.

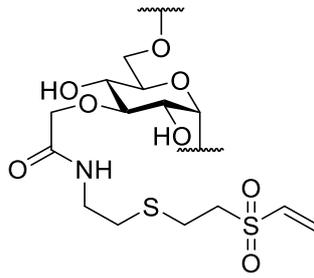
Vorschrift zur Herstellung Cysteaminvinylsulfon-modifizierter Polysaccharide



Dextran CM CVS (**53**)
Pullulan CM CVS (**54**)

Zu einer Lösung aus Cysteaminhydrochlorid (**51**) (70.0 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in H₂O (50 mL) wurde unter kräftigem Rühren Divinylsulfon (1.24 mL, 12.4 mmol, 20.0 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Dieses Reaktionsgemisch wurde anschließend zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Polysaccharid **21**, **22** (100 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in H₂O (50 mL), MES (488 mg, 5.00 mmol, 4.00 Äq.), EDC·HCl (178 mg, 0.93 mmol, 1.50 Äq.) und NHS (93.0 mg, 0.80 mmol, 1.30 Äq.) gegeben. Das Gemisch wurde für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde für zwei Tage gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \times \beta = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das Produkt **53**, **54** (91.0 mg) als watteartiger Feststoff erhalten.

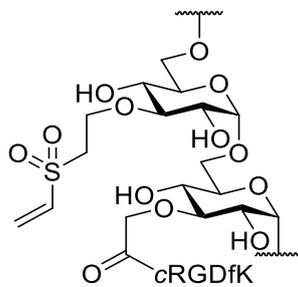
Vorschrift zur Herstellung Cysteaminvinylsulfon-modifizierter Polysaccharide mit CVS-TFA (56)



Dextran CM CVS (**53**)
Pulluan CM CVS (**54**)

Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Polysaccharid **21**, **22** (100 mg, 1.00 Äq.) in H₂O (50 mL) wurden nacheinander MES (976 mg, 5.00 mmol, 8.00 Äq.), EDC·HCl (178 mg, 0.927 mmol, 1.50 Äq.) und HOBt·H₂O (92 mg, 0.681 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) (382 mg, 1.234 mmol, 2 Äq.) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde auf pH 6.1 eingestellt (NaOH, 2 M) und das Gemisch für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde für zwei Tage gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \times \beta = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das Produkt **53**, **54** (93 mg) als watteartiger Feststoff erhalten.

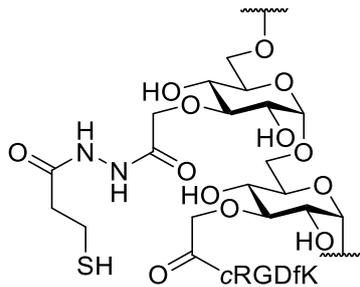
Vorschrift zur Herstellung cRGDfK- und Vinylsulfon-modifizierter Polysaccharide



88

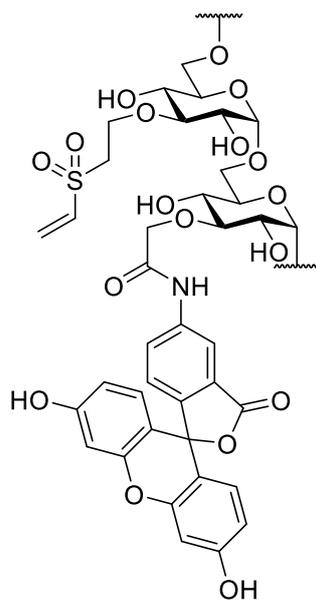
Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem und Vinylsulfon-modifiziertem Polysaccharid **83** (100 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in destilliertem Wasser (50 mg) wurden MES (244 mg, 1.25 mmol, 2.00 Äq.), EDC·HCl (131 mg, 0.68 mmol, 1.10 Äq.) und NHS (71.0 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde cRGDfK·AcOH (3.00 mg, 4.50 µmol, 0.007 Äq.) hinzugefügt und das Gemisch für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung einen Tag gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Dabei wurde täglich drei Mal die Dialyselösung gewechselt. Nach Lyophilisation wurde cRGDfK-modifiziertes Polysaccharid (**88**) (90.0 mg) als weißer, watteartiger Feststoff erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung cRGDfK- und Thiol-modifizierter Polysaccharide



Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Polysaccharid **21** (100 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in destilliertem Wasser (10 mL) wurden nacheinander EDC-HCl (25.0 mg, 0.13 mmol, 0.21 Äq.), HOBt-H₂O (18.0 mg, 0.12 mmol, 0.19 Äq.) und DIPEA (60.0 µL, 0.34 mmol, 0.56 Äq.) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. cRDGfK-AcOH (3.00 mg, 4.50 µmol, 0.01 Äq.) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden nacheinander MES (976 mg, 5.00 mmol, 8.00 Äq.), EDC-HCl (178 mg, 0.93 mmol, 1.50 Äq.) und HOBt-H₂O (92.0 mg, 0.68 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde DTPH (**25**) (73.0 mg, 0.31 mmol, 0.50 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 7 (NaOH 2.0 M) wurde DTT (477 mg, 3.90 mmol, 5.00 Äq.) hinzugefügt. Der pH-Wert wurde auf 8.5 eingestellt und das Gemisch für weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Einstellen des pH-Wertes auf pH 3.5 beendet. Es wurde für einen Tag gegen NaCl-Lösung bei pH 3.5 dialysiert (3 × 20 g·L⁻¹) und einen Tag gegen Wasser bei pH 3.5 dialysiert. Nach Lyophilisierung wurde das Produkt (92.0 mg) als weißer, watteartiger Feststoff erhalten.

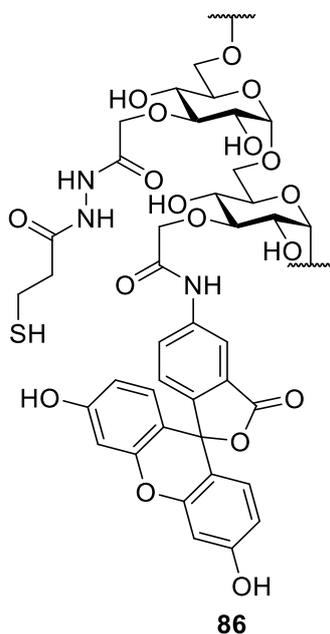
Vorschrift zur Herstellung Fluorescein- und Vinylsulfon-modifizierter Polysaccharide



84

Zu einer Lösung aus Vinylsulfon-modifizierten carboxymethyliertem Polysaccharid **83** (100 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in deionisiertem Wasser (50 mL) wurde nacheinander EDC·HCl (8.30 mg, 0.04 mmol, 0.07 Äq.), HOBt·H₂O (5.70 mg, 0.04 mmol, 0.06 Äq.) und DIPEA (20.0 µL, 0.11 mmol, 0.19 Äq.) gegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Fluoresceinamin (**82**) (3.00 mg, 9.00 µmol, 0.01 Äq.) hinzugegeben und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung einen Tag gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sowie zwei Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das Fluorescein-modifizierte Polysaccharid (**84**) (80.0 mg) als gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

Vorschrift zur Herstellung Fluorescein- und Thiol-modifizierter Polysacchariden

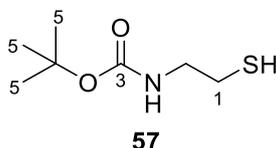


Zu einer Lösung aus carboxymethyliertem Dextran 250 kDa (**21**) (100 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) in deionisiertem Wasser (10 mL) wurde nacheinander EDC·HCl (8.30 mg, 0.04 mmol, 0.07 Äq.), HOBt·H₂O (5.70 mg, 0.04 mmol, 0.06 Äq.) und DIPEA (20.0 µL, 0.11 mmol, 0.19 Äq.) gegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Fluoresceinamin (**82**) (3.00 mg, 0.01 mmol, 0.01 Äq.) hinzugegeben und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden nacheinander MES (976 mg, 5.00 mmol, 8.00 Äq.), EDC·HCl (178 mg, 0.93 mmol, 1.50 Äq.) und HOBt·H₂O (95.0 mg, 0.62 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde DTPH (**25**) (73.0 mg, 0.31 mmol, 0.50 Äq.) hinzugegeben und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der pH-Wert mit NaOH (2 M) auf pH 7 eingestellt und DTT (477 mg, 3.90 mmol, 5.00 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde auf pH 8.5 eingestellt und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung mit HCl (1 M) auf pH 3.5 eingestellt und einen Tag gegen NaCl-Lösung ($3 \times \beta = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 3.5) sowie einen Tag gegen deionisiertes Wasser (pH 3.5) dialysiert. Dabei wurde täglich drei Mal die Dialyselösung gewechselt. Nach

Lyophilisation wurde Fluorescein-modifiziertes Dextran 250 kDa CM2 TPH (**86**) (93.0 mg) als gelber, watteartiger Feststoff erhalten.

Synthese von Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**)

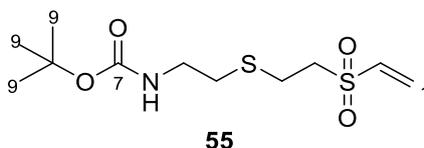
1. Stufe: Synthese von *N*-Boc-cysteamin (**57**)



Zu einer Lösung aus Cysteaminhydrochlorid (**51**) (5.0 g, 44 mmol, 1.10 Äq.) in CH₂Cl₂ (50 mL) wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (9.3 mL, 40 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben und das Gemisch auf 0 °C runtergekühlt. Anschließend wurde Triethylamin (6.3 mL, 45 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 15 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit HCl (0.5 M) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde *N*-Boc-cysteamin (**57**) (6.9 g, 39 mmol, 98 %) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.97 (s, 1H, *N*Hoc), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-2), 2.47 (m, 2H, H-1), 2.31 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, SH), 1.37 (s, 9H, H-5) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 155.5 (C-3), 77.7 (C-4), 43.5 (C-2), 28.2 (C-5), 23.7 (C-1) ppm; HRMS (ESI-MS) berechnet für [M+Na⁺] 200.0721, gefunden 200.0723; *R*_f(PE/EtOAc = 3:2) 0.81.

2. Stufe: Synthese von *N*-Boc-cysteaminvinylsulfon (**55**)

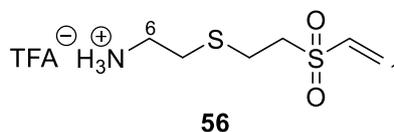


Zu einer Lösung aus Divinylsulfon (2.80 mL, 27.9 mmol, 5.00 Äq.) in Dimethylformamid (27 mL) wurde eine Lösung aus *N*-Boc-Cysteamin (**57**) (0.95 mL, 5.60 mmol, 1.00 Äq.) in Dimethylformamid (27 mL) über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde über Dünnschichtchromatographie (PE/EtOAc, 3:2) verfolgt. Das Reaktionsgemisch wurde mit H₂O verdünnt und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit wässriger LiCl-Lösung, anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde

säulenchromatographisch (PE/EtOAc, 3:1) aufgereinigt. Es wurde *N*-Boc-Cysteaminvinylsulfon (**55**) (1.63 g, 5.50 mmol, 98 %) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.00 (dd, *J* = 16.6, 10.0 Hz, 1H, -CH=CH₂), 6.92 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, -NH₂Boc), 6.29 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, -CH=CH_α), 6.27 (d, *J* = 9.8 Hz, -CH=H_β), 3.39 (m, 2H, H-6), 3.07 (m, 2H, H-3), 2.74 (m, 2H, H-5), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-4), 1.98 (s, 9H, H-9) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.5 (C-7), 136.6 (C-2), 130.4 (C-1), 77.7 (C-8), 53.1 (C-3), 31.0 (C-5), 28.2 (C-9), 23.2 (C-4) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 318.0810, gefunden 318.0804; *R*_f(PE/EtOAc = 3:2) = 0.32.

3. Stufe: Synthese von Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**)

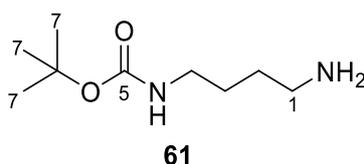


Zu einer Lösung aus *N*-Boc-Cysteaminvinylsulfon (**55**) (1.63 g, 5.50 mmol, 1.00 Äq.) in CH₂Cl₂ (77 mL) wurde bei 0 °C langsam Trifluoressigsäure (4.49 mL, 58.3 mmol, 10.6 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und das Reaktionsgemisch für 15 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde Cysteaminvinylsulfontrifluoroacetat (**56**) in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.86 (s, 3H, -NH₃⁺), 7.00 (dd, *J* = 16.6, 10 Hz, 1H, -CH=CH₂), 6.30 (d, *J* = 5.6 Hz, -CH=CH_α), 6.27 (d, *J* = 12.2 Hz, -CH=CH_β), 3.43 (m, 2H, H-3), 2.99 (m, 2H, H-6), 2.78 (m, 4H, H-4, H-5) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 137.1 (C-2), 130.9 (C-1), 53.3 (C-3), 38.5 (C-6), 28.6 (C-5), 23.5 (C-4) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 196.0466, gefunden 196.0461.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[93]

Synthese von *N*-Boc-diaminobutan (**61**)



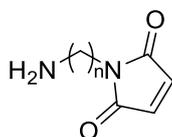
Zu in 1,4-Dioxan (45 mL) gelöstem 1,4-Diaminobutan (**60**) (18 ml, 182 mmol, 7.70 Äq.), wurde Boc₂O (5.10 mL, 23.6 mmol, 1.00 Äq.) in 1,4-Dioxan (45 mL) über 2 h bei Raumtemperatur zugetropft. Anschließend wurde für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der zurückgebliebene Feststoff in H₂O

aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit CH_2Cl_2 (4 × 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen sowie über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und *N*-Boc-diaminobutan (**61**) (3.97 g, 21.1 mmol, 95%) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.78 (bs, 1H, -*NH*Boc), 3.07 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-4), 2.66 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-1), 1.45 (m, 4H, H-2, H-3), 1.38 (s, 9H, H-7), 1.18 (s, 2H, - NH_2) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3) δ 156.1 (C-5), 79.0 (C-6), 41.9 (C-1), 40.5 (C-4), 30.9 (C-2), 28.5 (C-7), 27.5 (C-3) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 189.1603, gefunden 189.1600.

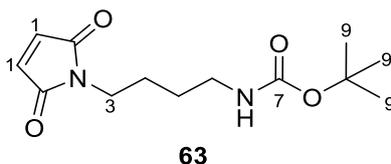
Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[96]

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von *N*-Amin-Maleinimiden



Eine Lösung aus Maleinsäureanhydrid (2.00 g, 20.2 mmol, 1.00 Äq.) in CH_2Cl_2 (30 mL) wurde zu einer Lösung des eisgekühlten Boc-geschützten Diaminderivats (1 Äq.) in CH_2Cl_2 (24 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und in Essigsäureanhydrid (30 mL) suspendiert. Natriumacetat (1.65 g, 20.2 mmol, 1.00 Äq.) wurde zugegeben und das erhaltene Reaktionsgemisch für 3 h bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wurde mehrmals mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung, Wasser sowie gesättigter NaCl Lösung gewaschen, anschließend über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel aufgebracht und mittels einer Säulenchromatographie (PE/EtOAc 4:1) gereinigt. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten. Die Entschützung wurde durch Umsetzung mit Anisol (2.50 Äq.) und TFA (4.00 Äq.) für 1 h bei Raumtemperatur vorgenommen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde aus Hexan und EtOAc umkristallisiert.

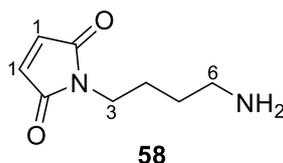
tert-Butyl (4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butyl)carbammat (**63**)



Das Produkt **63** (3.27 mg, 12.2 mmol, 60 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.00 (s, 2H, H-1), 6.76 (bs, 1H, -NH), 3.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-3), 2.91-2.86 (m, 2H, H-6), 1.49-1.42 (m, 2H, H-4), 1.32-1.26 (m, 2H, H-5), 1.36 (s, 9H, H-9) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.1 (C-2), 155.6 (C-7), 134.4 (C-1), 77.3 (C-6), 36.8 (C-3), 28.2 (C-9), 26.7 (C-5), 25.4 (C-4) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 291.1321, gefunden 291.1327.

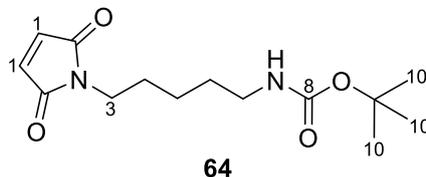
4-Aminobutyl-pyrrol-2,5-dion (**58**)



Das Produkt **58** (1.95 mg, 11.59 mmol, 95 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.08 (s, 2H, H-1), 7.70 (bs, 2H, -NH₂), 3.42 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, H-3), 2.79-2.77 (m, 2H, H-6), 1.58-1.43 (m, 4H, H-4, H-5) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 176.1 (C-2), 135.0 (C-1), 38.9 (C-6), 37.0 (C-3), 25.5 (C-5), 24.9 (C-4) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 169.0977, gefunden 169.0978.

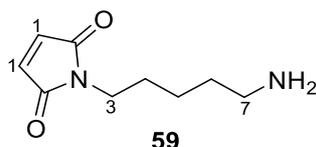
tert-Butyl (5-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)pentyl)carbammat (**64**)



Das Produkt **64** (3.87 mg, 13.72 mmol, 68 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.99 (s, 2H, H-1), 6.74 (bs, 1H, -NH), 3.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-3), 2.89-2.84 (m, 2H, H-5), 1.52-1.42 (m, 2H, H-4), 1.31-1.20 (m, 2H, H-5), 1.37 (s, 9H, H-10) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.1 (C-2), 154.6 (C-8), 133.4 (C-1), 76.3 (C-9), 53.9 (C-7), 36.0 (C-3), 28.0 (s, C-10), 27.3 (C-6) 26.7 (C-4), 22.4 (C-5) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 305.1477, gefunden 305.1476.

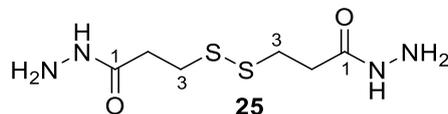
5-Aminopentyl-pyrrol-2,5-dion (**59**)



Das Produkt **59** (1.79 mg, 9.83 mmol, 72 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.02 (s, 2H, H-1), 7.70 (bs, 2H, -NH₂), 3.39 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, H-3), 2.76-2.75 (m, 2H, H-6), 1.56-1.46 (m, 2H, H-5), 1.29-1.21 (m, 2H, H-6) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 171.1 (C-2), 134.5 (C-1), 38.6 (C-7), 36.9 (C-3), 27.5 (C-4) 26.5 (C-6), 22.9 (C-5) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+H⁺] 183.1134, gefunden 183.1137.

Synthese von Dithiodipropionsäuredihydrazid (**25**)

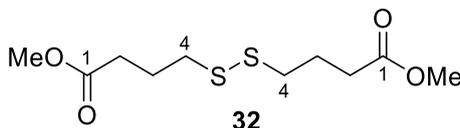


3,3'-Dithiodipropionsäuremethylester (**31**) (1.64 mL, 8.40 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Methanol (50 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit Hydrazinmonohydrat (2.48 mL, 50.0 mmol, 6.00 Äq.) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Methanol (10 mL), Wasser (2 mL) sowie Methanol (5 mL) gewaschen. Nach Umkristallisation aus Methanol wurde Dithiodipropionsäuredihydrazid (**25**) (1.50 g, 6.30 mmol, 75 %) wurde als weißer kristalliner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.06 (s, 2H, -NH-), 4.20 (s, 4H, -NH₂), 2.89 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, H-3), 2.41 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz, H-2) ppm; **¹³C-NMR** (100M Hz, DMSO-d₆) δ 169.5 (C-1), 33.8 (C-3), 33.2 (s, C-2) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+H⁺] 261.0456, gefunden 261.0456.

Synthese von Dithiobutansäuredihydrazid (**26**)

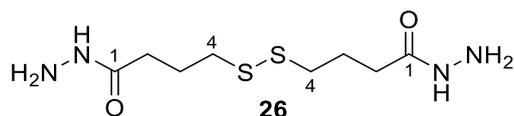
1. Stufe: Synthese von Dimethyl-4,4'-dithiobutyrat (**32**)



Zu einer Lösung aus 4,4'-Dithiobutansäure (**29**) (2.00 g, 8.40 mmol, 1.00 Äq.) in Methanol (42 mL) wurde konzentrierte Schwefelsäure (1 mL) gegeben und das Gemisch für 3 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit CH₂Cl₂ (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es wurde Dimethyl-4,4'- dithiobutyrat (**32**) (2.15 g, 8.10 mmol, 96 %) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.68 (s, 6H, -OMe), 2.71 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz, H-4), 2.44 (t, 4H, *J* = 7.3 Hz, H-2), 2.02 (m, 4H, H-3) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 173.5 (C-1), 51.8 (-OMe), 37.9 (C-4), 32.5 (C-2), 24.3 (C-3) ppm; **HRMS (ESI-MS)** berechnet für [M+Na⁺] 289.0544, gefunden 289.0531.

2. Stufe: Synthese von Dithiobutansäuredihydrazid (**26**)



Hydrazinmonohydrat (2.50 mL, 47.8 mmol, 6.00 Äq.) wurde zu einer Lösung aus Dimethyl-4,4'-dithiobutyrat (**32**) (2.15 g, 8.10 mmol, 1.00 Äq.) in Methanol (49 mL) gegeben und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Umkristallisation aus Methanol wurde Dithiobutansäuredihydrazid (**26**) (2.02 g, 7.60 mmol, 94 %) als weißer Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.98 (s, 2H, -NH-), 4.18 (s, 4H, -NH₂), 2.68 (t, 4H, *J* = 7.22 Hz, H-4), 2.12 (t, 4H, *J* = 7.36 Hz, H-2), 1.86 (m, 4H, H-3) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 170.9 (C-1), 37.3 (C-4), 31.9 (C-2), 24.7 (C-3) ppm; HRMS (ESI-MS) berechnet für [M+H⁺] 267.0949, gefunden 267.0943.

5.3 Analysen

Bestimmung des Substitutionsgrades der carboxymethylierten Polysaccharide^[73]

Zur Bestimmung des Substitutionsgrades des carboxymethylierten Polysaccharids wurde dieses (1 g) in Aceton dispergiert. Anschließend wurde wässrige HCl (6 M, 3 mL) hinzugegeben und die Dispersion für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wurde über eine Fritte filtriert, mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (80 w%, bezogen auf Methanol) und Aceton gewaschen und im Vakuumtrockenschrank (15 mbar, 40 °C) über Nacht getrocknet. Das Polysaccharid (0.5 g) wurde in deionisiertem Wasser (50 mL) und NaOH-Maßlösung (0.2 M, 20 mL) gelöst, in einen Messkolben überführt und auf 100 mL aufgefüllt. Drei Aliquote dieser Lösung (je 25 mL) wurden mit deionisiertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt und das überschüssige Natriumhydroxid gegen HCl-Maßlösung (0.1 M) bis zum Äquivalenzpunkt zurücktitriert.

Bestimmung des Substitutionsgrades der Thiol-modifizierten Polysaccharide

Für die Thiol-Bestimmung wurde der Ellman's-Assay durchgeführt. Das entsprechende Polysaccharid ($\beta = 2\text{-}5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde in Natriumphosphatpuffer (pH 8.0) gelöst und je 100 μL dieser Lösung mit Natriumphosphatpuffer (1 mL) verdünnt. Zu der Lösung wurde Ellman's Reagenz (20 μL , DTNB $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Natriumphosphatpuffer) gegeben und für 15 min. unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Proben photometrisch ($\lambda = 412 \text{ nm}$) vermessen. Für die Kalibrierreihe wurde L-Cysteinhydrochlorid (0.25 – 1.50 mM) verwendet.

Bestimmung des Substitutionsgrades der Vinylsulfon-modifizierten Polysaccharide

Das Vinylsulfon-modifizierte Polysaccharid (2 mg) wurde in einer β -Mercaptoethanol-Lösung (1 mL, 12 mM in Wasser) gelöst und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde von dieser Lösung 100 μ L mit Natriumphosphatpuffer (900 μ L, pH 8.0) verdünnt und der Ellman's-Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt. Als Kalibrierreihe diente β -Mercaptoethanol (0.1 – 1.1 mM).

Bestimmung des Substitutionsgrades der Maleinimid-modifizierten Polysaccharide

Das Maleinimid-modifizierte Polysaccharid (10 mg) wurde in einer Glutathion-Lösung (1 mL, 2 mM) gelöst und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit dieser Lösung wurde der Ellman's-Assay durchgeführt. Als Kalibrierreihe wurde Glutathion (0.25 – 2.0 mM) verwendet.

Bestimmung der Permeabilität

Die Akzeptorzelle der FranzTM-Diffusionszelle wurde mit deionisiertem Wasser befüllt und mit einem Dialyseschlauch blasenfrei abgedeckt. Danach wurde die Donorzelle aufgesetzt und mit einer Edelstahlklemme befestigt. Die jeweiligen Komponenten wurden in Phosphatpuffer (pH 7.4) gelöst (2 oder 4 w%) und jeweils 200 μ L dieser Lösungen in der Donorzelle blasenfrei vermischt. Nach einer Gelierzeit von 45 min. wurde das Hydrogel in der Donorzelle mit einer α -D-(+)-Glucose-Lösung (1 mL, 10 mg·mL⁻¹) überschichtet und der Aufbau bei Raumtemperatur gerührt (600 U·min⁻¹). Es wurden Aliquote (0.5 mL) nach $t = 2, 6, 12, 24, 48$ h entnommen, wobei die Zelle jeweils mit deionisiertem Wasser wieder auf 8 mL aufgefüllt wurde. Die Proben wurden mittels DNS-Assay analysiert. Als Referenz wurde der Aufbau nur mit Dialyseschlauch durchgeführt.

Glukosebestimmung

Zur Glukosebestimmung wurde ein DNS-Assay verwendet. Die entsprechende Probe (83 μ L) wurde in einem Eppendorfgefäß mit DNS-Reagenz (83 μ L) vermischt und bei 100 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße im Eisbad gekühlt und mit eiskaltem Wasser (834 μ L) verdünnt. Die Proben wurden daraufhin photometrisch ($\lambda = 540$ nm) vermessen. Als Kalibrierreihe diente α -D-(+)-Glucose ($\beta = 0.125 - 3.0$ mg·mL⁻¹).

Herstellung des DNS-Reagenzes

Dinitrosalicylsäure (1 g) wurden in destilliertem Wasser (50 mL) bei 80 °C gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde NaOH (2 M, 20 mL) und Kalium-Natriumtartrat-4H₂O (30 g) hinzugegeben.

Swelling

Es wurden Hydrogele aus je 100 μ l (2 oder 4 w%) Lösung der jeweiligen Komponente gebildet. Dies wurden lyophilisiert und danach gewogen. Anschließend wurden die Hydrogele mit

Wasser bedeckt (je 1 mL) und für drei Tage quellen gelassen. Dabei wurde jeden Tag das Wasser gewechselt. Danach wurde das überschüssige Wasser entfernt und die gequollenen Hydrogele gewogen (Wägen a). Nach erneuter Lyophilisation wurden die Hydrogele erneut gewogen (Wägen b).

Enzymatischer Abbau Dextran-haltiger Hydrogele

Es wurden Hydrogele (100 μL) aus den jeweiligen Komponenten (50 μL , 2 oder 4 w% in Phosphatpuffer pH 7.4) hergestellt. Dabei handelte es sich bei mindestens einer der Komponenten um Fluorescein-modifiziertes Dextran. Nach einer Gelierzeit von 45 min. wurden die Hydrogele mit Dextranase-Lösung (500 μL , 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Citratpuffer pH 5.6) überschichtet und bei 37 °C inkubiert. Es wurden Aliquote (50 μL) nach $t = 0.5, 3, 5, 24$ h entnommen, mit Citratpuffer (1:1 - 1:63, Analyt:Puffer) verdünnt und fluoreszenzphotometrisch ($\lambda = 528$ nm) vermessen. Als Blindprobe diente ein Gemisch aus Phosphatpuffer (100 μL) und Dextranase-Lösung (500 μL , 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Citratpuffer pH 5.6). Als Referenz wurde die Fluorescein-modifizierte Komponente (50 μL , 2 oder 4 w% in Phosphatpuffer pH 7.4) mit Phosphatpuffer (50 μL) verdünnt, mit Dextranase-Lösung (500 μL , 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Citratpuffer pH 5.6) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C ebenfalls vermessen.

cRGDfK Bestimmung nach Sakaguchi Reaktion

Zur cRGDfK-Bestimmung wurden die jeweiligen modifizierten Proben (500 μL , 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in destilliertem Wasser gelöst und in einem Eisbad gekühlt. Anschließend wurde Lösung A (125 μL), zur Lösung B (125 μL) hinzugegeben, die Lösung gut gemischt und anschließend wurde Lösung C (100 μL) hinzugegeben und das Gemisch genau 1 min. „gevortext“. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lösung D (100 μL) gestoppt und die Proben bis zur Messung auf Eis gelagert. Alle Lösungen waren stets eisgekühlt. Die Proben wurden photometrisch ($\lambda = 515$ nm) vermessen wobei eine Kalibriergerade aus cRGDfK·AcOH (0.025 – 2.0 nM) angefertigt wurde.

Reagenzien:

Lösung A: wässrige Lösung aus NaOH (10 w%) und Thymin (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Lösung B: 10 mL wässrige Lösung aus α -Naphthol (4 mg)

Lösung C: frisch hergestellte wässrige NaOCl-Lösung (1 %)

Lösung D: wässrige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (2 %)

Zellkultivierung

Zur Einbettung der Zellen wurden die Polysaccharide in einem Gemisch aus dem jeweiligen Zellmedium und DPBS (1:1) gelöst ($\beta = 25$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). In einer 96-Well-Platte wurde die Zellsuspension (entsprechend der Anzahl der Zellen) vorgelegt und durch Zugabe von Zellmedium auf ein Volumen von 10 μL aufgefüllt. Anschließend wurde die Akzeptorkomponente (20 μL) hinzugegeben und das Gemisch nach Zugabe der

entsprechenden Donatorkomponente (20 μL) durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette durchmischt. Die Gelierung erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Hydrogele mit dem entsprechenden Medium überschichtet und für 1 bzw. 3 d bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Für die Untersuchung der Zytotoxizität der einzelnen Komponenten wurden 24 h vor der Durchführung des Assays die zu untersuchenden Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die entsprechenden Zellen und deren Anzahl ist in Tabelle 5.2 gezeigt.

Tabelle 5.2: Anzahl der ausgesäten Zellen.

	HCF		HEK	
	Zytotox / Einbettung 1 d	Einbettung 3 d	Zytotox / Einbettung 1 d	Einbettung 3 d
Medium	Fibroblast Growth Medium 3 +10 % FCS, Insulin, FGF		DMEM	
Anzahl	20.000	10.000	25.000	25.000

WST-1 Assay

Zur Untersuchung der Einzelkomponenten wurden die vorher ausgesäten Zellen aus dem Inkubator genommen und das Zellmedium entfernt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen (20 – 40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in einem Gemisch aus DPBS und dem entsprechenden Medium (1:1) gelöst. Diese Lösungen wurden zu den Zellen hinzugegeben (jeweils 100 μL) und die Zellen für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit Medium gewaschen. Nach Zugabe von Zellmedium (100 μL) und WST-1 Reagenz (10 μL) wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 1.5 h erfolgte die Messung am Multiplate Reader bei den Wellenlängen $\lambda = 450$ und 630 nm. Als Referenz dienen unbehandelte Zellen.

LDH Assay

Die Durchführung erfolgte analog zu dem Protokoll CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay der Firma Promega. Zu einer Flasche des Substrat Mix wurde der Assaypuffer (12 mL) gegeben und bei Raumtemperatur geschüttelt, bis sich alles gelöst hat.

In eine 96-Well-Platte wurden jeweils 50 μL des über den zu untersuchenden Hydrogelen befindlichen Überstands pipettiert. Nach Zugabe von dem CytoTox 96[®]-Reagenz (50 μL) wurden die Proben für 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Multiplate Reader bei $\lambda = 490$ nm untersucht. Als

Referenzen dienten nicht eingebettete Zellen (unbehandelt) sowie eine Lysiskontrolle. Hierfür wurden unbehandelte Zellen mit der 10X Lysis-Lösung (10 μL) 45 min bei 37 °C inkubiert.

Lebend/Tod-Färbung

Für die Herstellung der Calcein AM-Stammlösung (1 mM) wurde der Inhalt eines Calcein AM-Vials in 50.3 μL DMSO gelöst. Anschließend wurde 1 μL der Lösung mit DPBS (4 mL) verdünnt. Diese Lösung sollte innerhalb von 2 h benutzt werden. Die Stammlösung ist bei Lagerung bei -20 °C über mehrere Monate stabil. Die PI-Stammlösung (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde durch Lösen von PI (2 mg) in DPBS (1 mL) hergestellt. Anschließend wurden hiervon 40 μL mit DPBS (4 mL) verdünnt.

Bei den Zell-ladenen Hydrogelen wurde das Medium abgenommen und die Konstrukte für 15 min bei 37 °C mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde das DPBS abgenommen und Calcein AM-Lösung (je 100 μL) zu jedem Well hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Abnahme der Calcein AM-Lösung wurde PI-Lösung (je 100 μL) zu jedem Well hinzugegeben und die Konstrukte für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Gele zwei Mal für jeweils 15 min bei 37 °C mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte das *Imaging* am Fluoreszenzmikroskop.

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angew Chem Int Ed Engl*, DOI 10.1002/anie.200460587 **2005**, *44*, 3358–3393, "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material".
- [2] N. A. Zainol Abidin, F. Kormin, N. A. Zainol Abidin, N. A. F. Mohamed Anuar, M. F. Abu Bakar, *Int J Mol Sci*, DOI 10.3390/ijms21144978 **2020**, *21*, "The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources".
- [3] B. Farasati Far, M. R. Naimi-Jamal, M. Safaei, K. Zarei, M. Moradi, H. Yazdani Nezhad, *Polymers (Basel)*, DOI 10.3390/polym14245432 **2022**, *14*, "A Review on Biomedical Application of Polysaccharide-Based Hydrogels with a Focus on Drug Delivery Systems".
- [4] D. Pasqui, M. de Cagna, R. Barbucci, *Polymers (Basel)*, DOI 10.3390/polym4031517 **2012**, *4*, 1517–1534, "Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties".
- [5] I. M. El-Sherbiny, M. H. Yacoub, *Glob Cardiol Sci Pract*, DOI 10.5339/gcsp.2013.38 **2013**, *2013*, 316–342, "Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges".
- [6] O. Wichterle, D. Lím, *Nature*, DOI 10.1038/185117a0 **1960**, *185*, 117–118, "Hydrophilic Gels for Biological Use".
- [7] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, *European Polymer Journal*, DOI 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024 **2015**, *65*, 252–267, "Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products".
- [8] A. Kirschning, N. Dibbert, G. Dräger, *Chemistry*, DOI 10.1002/chem.201701906 **2018**, *24*, 1231–1240, "Chemical Functionalization of Polysaccharides-Towards Biocompatible Hydrogels for Biomedical Applications".
- [9] G. Camci-Unal, N. Annabi, M. R. Dokmeci, R. Liao, A. Khademhosseini, *NPG Asia Mater*, DOI 10.1038/am.2014.19 **2014**, *6*, e99-e99, "Hydrogels for cardiac tissue engineering".
- [10] A. Mahmood, D. Patel, B. Hickson, J. DesRochers, X. Hu, *Int J Mol Sci*, DOI 10.3390/ijms23031415 **2022**, *23*, "Recent Progress in Biopolymer-Based Hydrogel Materials for Biomedical Applications".
- [11] M. Hassan, J. Bai, D.-Q. Dou, *Egypt. J. Chem.*, DOI 10.21608/ejchem.2019.6967.1580 **2019**, *0*, 0, "Biopolymers; Definition, Classification and Applications".
- [12] G. Eber, *Biopolymere*, Springer, Berlin, **1980**.
- [13] O. Ableitner, *Einführung in die Molekularbiologie*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, **2014**.
- [14] H. P. Latscha, H. A. Klein, *Chemie für Mediziner*, Springer, Berlin, **1980**.

- [15] S. Mondal, S. Das, A. K. Nandi, *Soft Matter*, DOI 10.1039/c9sm02127b **2020**, *16*, 1404–1454, "A review on recent advances in polymer and peptide hydrogels".
- [16] P. Kulkarni, M. Maniya, *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, DOI 10.26479/2020.0603.02 **2020**, *6*, 11–20, "Utilization of Fish Collagen in Pharmaceutical and Biomedical Industries: Waste to Wealth Creation".
- [17] T. Walimbe, A. Panitch, *Bioengineering*, DOI 10.3390/bioengineering7040156 **2020**, *7*, "Best of Both Hydrogel Worlds: Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels".
- [18] A. S. A. Mohammed, M. Naveed, N. Jost, *J Polym Environ*, DOI 10.1007/s10924-021-02052-2 **2021**, *29*, 2359–2371, "Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities)".
- [19] G. Franz, *Polysaccharide*, Springer, Berlin, **1991**.
- [20] J. Vogel, G. Westphal, C. Pippig, *Nahrung*, DOI 10.1002/food.19880320716 **1988**, *32*, 709–714, "Mutarotation von D-Glucose in Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu".
- [21] S. R. van Tomme, W. E. Hennink, *Expert Rev Med Devices*, DOI 10.1586/17434440.4.2.147 **2007**, *4*, 147–164, "Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications".
- [22] L. Casettari, G. Bonacucina, G. A. Morris, D. R. Perinelli, P. Lucaioli, M. Cespi, G. F. Palmieri, *Powder Technology*, DOI 10.1016/j.powtec.2014.12.030 **2015**, *273*, 125–132, "Dextran and its potential use as tablet excipient".
- [23] R. Mehvar, *Journal of Controlled Release*, DOI 10.1016/S0168-3659(00)00302-3 **2000**, *69*, 1–25, "Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents".
- [24] R. Wang, P. J. Dijkstra, M. Karperien in *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*, pp. 307–319.
- [25] R. S. Singh, N. Kaur, J. F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers*, DOI 10.1016/j.carbpol.2015.01.032 **2015**, *123*, 190–207, "Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting".
- [26] X. Wei, G.-L. Liu, S.-L. Jia, Z. Chi, Z. Hu, Z.-M. Chi, *Carbohydrate Polymers*, DOI 10.1016/j.carbpol.2020.117076 **2021**, *251*, 117076, "Pullulan biosynthesis and its regulation in *Aureobasidium* spp".
- [27] R. S. Singh, N. Kaur, M. Hassan, J. F. Kennedy, *Int J Biol Macromol*, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.227 **2021**, *166*, 694–706, "Pullulan in biomedical research and development - A review".

- [28] M.-B. Coltelli, S. Danti, K. de Clerck, A. Lazzeri, P. Morganti, *J Funct Biomater*, DOI 10.3390/jfb11010020 **2020**, *11*, "Pullulan for Advanced Sustainable Body- and Skin-Contact Applications".
- [29] X.-C. Yang, Y.-L. Niu, N.-N. Zhao, C. Mao, F.-J. Xu, *Biomaterials*, DOI 10.1016/j.biomaterials.2014.01.036 **2014**, *35*, 3873–3884, "A biocleavable pullulan-based vector via ATRP for liver cell-targeting gene delivery".
- [30] Y. Kaneo, T. Tanaka, T. Nakano, *Journal of Controlled Release*, DOI 10.1016/S0168-3659(00)00368-0 **2001**, *70*, 365–373, "Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats".
- [31] K. I. Shingel, *Carbohydr Res*, DOI 10.1016/j.carres.2003.10.034 **2004**, *339*, 447–460, "Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan".
- [32] P. Marszalek, Y.-P. Pang, H. Li, *roceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 7894–7898, "Atomic levers control pyranose ring conformations".
- [33] Y. Zhang, S. Li, X. Wang, L. Zhang, P. C. Cheung, *Food Hydrocolloids*, DOI 10.1016/j.foodhyd.2010.02.001 **2011**, *25*, 196–206, "Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities".
- [34] L. Zhang, X. Li, Q. Zhou, X. Zhang, R. Chen, *Polym J*, DOI 10.1295/polymj.34.443 **2002**, *34*, 443–449, "Transition from Triple Helix to Coil of Lentinan in Solution Measured by SEC, Viscometry, and ¹³C NMR".
- [35] L. Vannucci, P. Sima, V. Vetvicka, J. Krizan, *American Journal of Immunology*, DOI 10.3844/ajisp.2017.50.61 **2017**, *13*, 50–61, "Lentinan Properties in Anticancer Therapy: A Review on the Last 12-Year Literature".
- [36] M. Oka, S. Hazama, M. Suzuki, F. Wang, K. Wadamori, *International Journal of Immunopharmacology*, DOI 10.1016/0192-0561(95)00115-8 **1996**, *18*, 211–216, "In-Vitro and In-Vivo Analysis of Human Leukocyte binding by the Antitumor Polysaccharide, Lentinan".
- [37] Y. Zhang, M. Zhang, Y. Jiang, X. Li, Y. He, P. Zeng, Z. Guo, Y. Chang, H. Luo, Y. Liu et al., *J Cancer Res Clin Oncol*, DOI 10.1007/s00432-018-2718-1 **2018**, *144*, 2177–2186, "Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: a review of 12 years clinical studies in China".
- [38] P.S. Bisen, R.K. Baghel, B.S. Sanodiya, G.S. Thakur, G.B.K.S. Prasad, *Current Medicinal Chemistry*, DOI 10.2174/092986710791698495 **2010**, *17*, 2419–2430, "Lentinus edodes: A Macrofungus with Pharmacological Activities".
- [39] O. Türk, *Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, **2014**.

- [40] K. Kulka, A. Sionkowska, *Molecules*, DOI 10.3390/molecules28041817 **2023**, *28*, "Chitosan Based Materials in Cosmetic Applications: A Review".
- [41] P. S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, N. S. Kumar, *Int J Biol Macromol*, DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113 **2020**, *150*, 1072–1083, "Chitosan as an environment friendly biomaterial - a review on recent modifications and applications".
- [42] N. Desai, D. Rana, S. Salave, R. Gupta, P. Patel, B. Karunakaran, A. Sharma, J. Giri, D. Benival, N. Kommineni, *Pharmaceutics*, DOI 10.3390/pharmaceutics15041313 **2023**, *15*, "Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications".
- [43] Y. W. F. Lam, S.-M. Huang, S. D. Hall (Eds.) *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Vol. 162, Taylor & Francis, New York, **2007**.
- [44] R. M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano, *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Springer New York, New York, NY, **2010**.
- [45] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, *Biomaterials*, DOI 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045 **2015**, *73*, 254–271, "Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels".
- [46] P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, *Research focus*, DOI 10.1016/S1359-6446(02)02255-9 **2002**, *10*, 569–579, "Hydrogels: form controlled release to pH-responsive drug delivery".
- [47] L. S. Peixoto, F. M. Silva, M. A. L. Niemeyer, G. Espinosa, P. A. Melo, M. Nele, J. C. Pinto, *Macromol. Symp.*, DOI 10.1002/masy.200651118 **2006**, *243*, 190–199, "Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) Particles with Spherical Morphology and Core-Shell Structure and its Use in Vascular Embolization".
- [48] R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia, S. N. Upadhyay, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, DOI 10.1080/15321790500304148 **2005**, *45*, 325–349, "Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review".
- [49] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, J. Wang, *Biomater Sci*, DOI 10.1039/c8bm01246f **2019**, *7*, 843–855, "Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels".
- [50] W. X. Waresindo, H. R. Luthfianti, Aan Priyanto, D. A. Hapidin, D. Edikresnha, A. H. Aimon, T. Suciati, K. Khairurrijal, *Mater. Res. Express*, DOI 10.1088/2053-1591/acb98e **2023**, *10*, 24003, "Freeze–thaw hydrogel fabrication method: basic principles, synthesis parameters, properties, and biomedical applications".
- [51] W.-P. Voo, C.-W. Ooi, A. Islam, B.-T. Tey, E.-S. Chan, *European Polymer Journal*, DOI 10.1016/j.eurpolymj.2015.12.029 **2016**, *75*, 343–353, "Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour".
- [52] X. Li, Y. Xiong, *ACS Omega*, DOI 10.1021/acsomega.2c03931 **2022**, *7*, 36918–36928, "Application of "Click" Chemistry in Biomedical Hydrogels".

- [53] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J Am Chem Soc*, DOI 10.1021/ja044996f **2004**, *126*, 15046–15047, "A strain-promoted 3 + 2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems".
- [54] L. A. Pérez, R. Hernández, J. M. Alonso, R. Pérez-González, V. Sáez-Martínez, *Biomedicines*, DOI 10.3390/biomedicines9091113 **2021**, *9*, "Hyaluronic Acid Hydrogels Crosslinked in Physiological Conditions: Synthesis and Biomedical Applications".
- [55] L. J. Smith, S. M. Taimoory, R. Y. Tam, A. E. G. Baker, N. Bintah Mohammad, J. F. Trant, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/acs.biomac.7b01715 **2018**, *19*, 926–935, "Diels–Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation".
- [56] P. K. Sharma, S. Taneja, Y. Singh, *ACS Appl Mater Interfaces*, DOI 10.1021/acsami.8b07310 **2018**, *10*, 30936–30945, "Hydrazone-Linkage-Based Self-Healing and Injectable Xanthan-Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Controlled Drug Release and 3D Cell Culture".
- [57] S. Banerjee, M. Szepes, N. Dibbert, J.-C. Rios-Camacho, A. Kirschning, I. Gruh, G. Dräger, *Carbohydrate Polymers*, DOI 10.1016/j.carbpol.2021.117924 **2021**, *262*, 117924, "Dextran-based scaffolds for in-situ hydrogelation: Use for next generation of bioartificial cardiac tissues".
- [58] B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long, *Progress in Polymer Science*, DOI 10.1016/j.progpolymsci.2006.03.001 **2006**, *31*, 487–531, "Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies".
- [59] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mater.*, DOI 10.1021/cm402180t **2014**, *26*, 724–744, "The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry".
- [60] T. Mezger, *Applied Rheology. With Joe Flow on Rheology Road*, Anton Paar GmbH, Graz, **2021**.
- [61] B. Hochstein (Ed.) *Rheologische Grundlagen und Relevanz in der kosmetischen Industrie*.
- [62] Å. Öhrlund, *JCDSA*, DOI 10.4236/jcdsa.2018.82008 **2018**, *08*, 47–54, "Evaluation of Rheometry Amplitude Sweep Cross-Over Point as an Index of Flexibility for HA Fillers".
- [63] N. Dibbert, A. Krause, J.-C. Rios-Camacho, I. Gruh, A. Kirschning, G. Dräger, *Chemistry*, DOI 10.1002/chem.201603748 **2016**, *22*, 18777–18786, "A Synthetic Toolbox for the In Situ Formation of Functionalized Homo- and Heteropolysaccharide-Based Hydrogel Libraries".
- [64] J. Li, D. J. Mooney, *Nat Rev Mater*, DOI 10.1038/natrevmats.2016.71 **2016**, *1*, "Designing hydrogels for controlled drug delivery".

- [65] B. Amsden, *Macromolecules*, DOI 10.1021/ma980765f **1998**, *31*, 8382–8395, "Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models".
- [66] S. Mantha, S. Pillai, P. Khayambashi, A. Upadhyay, Y. Zhang, O. Tao, H. M. Pham, S. D. Tran, *Materials (Basel)*, DOI 10.3390/ma12203323 **2019**, *12*, "Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine".
- [67] H. Fernandes, L. Moroni, C. van Blitterswijk, J. de Boer, *J. Mater. Chem.*, DOI 10.1039/b822177d **2009**, *19*, 5474, "Extracellular matrix and tissue engineering applications".
- [68] W. P. Daley, S. B. Peters, M. Larsen, *J Cell Sci*, DOI 10.1242/jcs.006064 **2008**, *121*, 255–264, "Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine".
- [69] S. Banerjee, *Genehmigte Dissertation*, Medizinische Hochschule, Leibniz Universität, Hannover, **2019**.
- [70] N. Noor, A. Shapira, R. Edri, I. Gal, L. Wertheim, T. Dvir, *Adv Sci (Weinh)*, DOI 10.1002/advs.201900344 **2019**, *6*, 1900344, "3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts".
- [71] X.-G. Chen, H.-J. Park, *Carbohydrate Polymers*, DOI 10.1016/S0144-8617(03)00051-1 **2003**, *53*, 355–359, "Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions".
- [72] S. Kunjalukkal Padmanabhan, L. Lamanna, M. Friuli, A. Sannino, C. Demitri, A. Licciulli, *Molecules*, DOI 10.3390/molecules28020829 **2023**, *28*, "Carboxymethylcellulose-Based Hydrogel Obtained from Bacterial Cellulose".
- [73] Z. Stojanovi, K. Jeremi, S. Jovanovi, M. D. Lechner, *Starch - Stärke (STARCHE - STÄRKE)*, DOI 10.1002/star.200400342 **2005**, *57*, 79–83, "A Comparison of Some Methods for the Determination of the Degree of Substitution of Carboxymethyl Starch".
- [74] N. Dibbert, *Genehmigte Dissertation*, Leibniz Universität, Hannover, **2017**.
- [75] A. H. Haines in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, **1976**, pp. 11–109.
- [76] X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M. C. Roberts, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/bm025603c **2002**, *3*, 1304–1311, "Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels".
- [77] S. Woodard, K. Jerome, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2011**, 132–137, "Combinatorial Synthesis of 3,5-Dimethylene Substituted 1,2,4-Triazoles".
- [78] W. Wu, L. Zhu, Y. Yanqing, W. Hu, Hui, Zhang, Hui, C. Dong, EP3950677A4.
- [79] D. Sehgal, I. Vijay, *Analytical Biochemistry* **1994**, *218*, 87–91, "A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation".
- [80] G. Ellmann, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, DOI 10.1016/0003-9861(59)90090-6 **1959**, *882*, 70–77, "Tissue Sulfhydryl Groups".

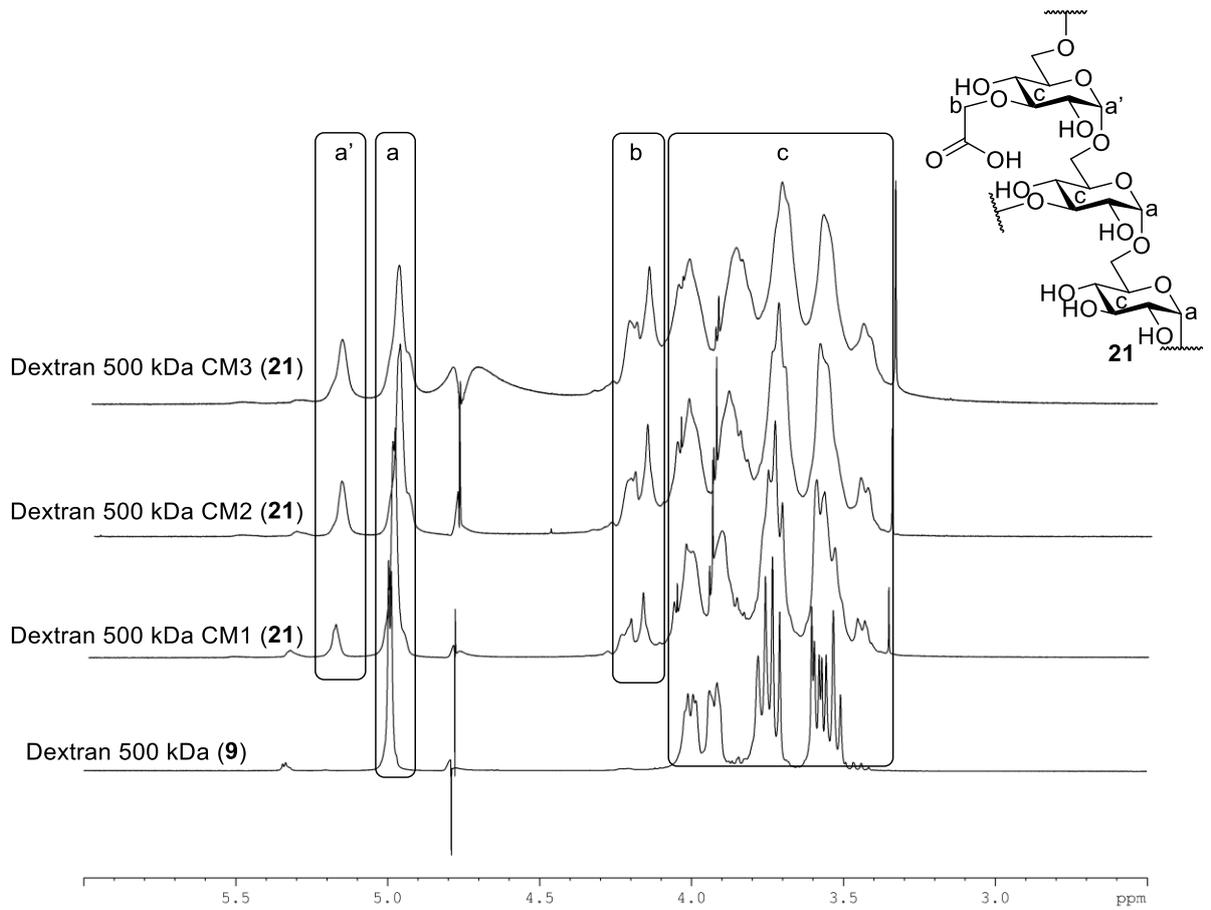
- [81] Y. Yu, Y. Chau, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/bm2014476 **2012**, *13*, 937–942, "One-step "click" method for generating vinyl sulfone groups on hydroxyl-containing water-soluble polymers".
- [82] T. Kantner, B. Alkhawaja, A. G. Watts, *ACS Omega*, DOI 10.1021/acsomega.7b01094 **2017**, *2*, 5785–5791, "In Situ Quenching of Trialkylphosphine Reducing Agents Using Water-Soluble PEG-Azides Improves Maleimide Conjugation to Proteins".
- [83] I. Aranaz, A. R. Alcántara, M. C. Civera, C. Arias, B. Elorza, A. Heras Caballero, N. Acosta, *Polymers (Basel)*, DOI 10.3390/polym13193256 **2021**, *13*, "Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications".
- [84] S. Kalliola, E. Repo, V. Srivastava, F. Zhao, J. P. Heiskanen, J. A. Sirviö, H. Liimatainen, M. Sillanpää, *Langmuir*, DOI 10.1021/acs.langmuir.7b03959 **2018**, *34*, 2800–2806, "Carboxymethyl Chitosan and Its Hydrophobically Modified Derivative as pH-Switchable Emulsifiers".
- [85] C. Federer, M. Kurpiers, A. Bernkop-Schnürch, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/acs.biomac.0c00663 **2021**, *22*, 24–56, "Thiolated Chitosans: A Multi-talented Class of Polymers for Various Applications".
- [86] P. Esmaeilzadeh, A. Köwitsch, F. Heyroth, G. Schmidt, S. Fischer, K. Richter, T. Groth, *Carbohydrate Polymers*, DOI 10.1016/j.carbpol.2016.10.088 **2017**, *157*, 1205–1214, "Synthesis of thiolated polysaccharides for formation of polyelectrolyte multilayers with improved cellular adhesion".
- [87] X. Zhu, S. Tang, L. Wang, X. Liang, F. Meng, Y. Hong, Z. Xu, *Molecular Vision* **2012**, *18*, 1979–1982, "Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery".
- [88] G. Millotti, C. Samberger, E. Fröhlich, D. Sakloetsakun, A. Bernkop-Schnürch, *J. Mater. Chem.*, DOI 10.1039/b916528b **2010**, *20*, 2432, "Chitosan-4-mercaptobenzoic acid: synthesis and characterization of a novel thiolated chitosan".
- [89] E.-B. Ko, H.-Y. Cho, T.-H. Kim, C.-H. Yea, J.-W. Choi, *Colloids Surf B Biointerfaces*, DOI 10.1016/j.colsurfb.2013.08.016 **2013**, *112*, 387–392, "Cell chip with a thiolated chitosan self-assembled monolayer to detect the effects of anticancer drugs on breast normal and cancer cells".
- [90] C. Hiemstra, L. J. van der Aa, Z. Zhong, P. J. Dijkstra, J. Feijen, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/bm061191m **2007**, *8*, 1548–1556, "Rapidly in situ-forming degradable hydrogels from dextran thiols through Michael addition".
- [91] C. Hiemstra, L. J. van der Aa, Z. Zhong, P. J. Dijkstra, J. Feijen, *Macromolecules*, DOI 10.1021/ma062468d **2007**, *40*, 1165–1173, "Novel in Situ Forming, Degradable Dextran Hydrogels by Michael Addition Chemistry: Synthesis, Rheology, and Degradation".

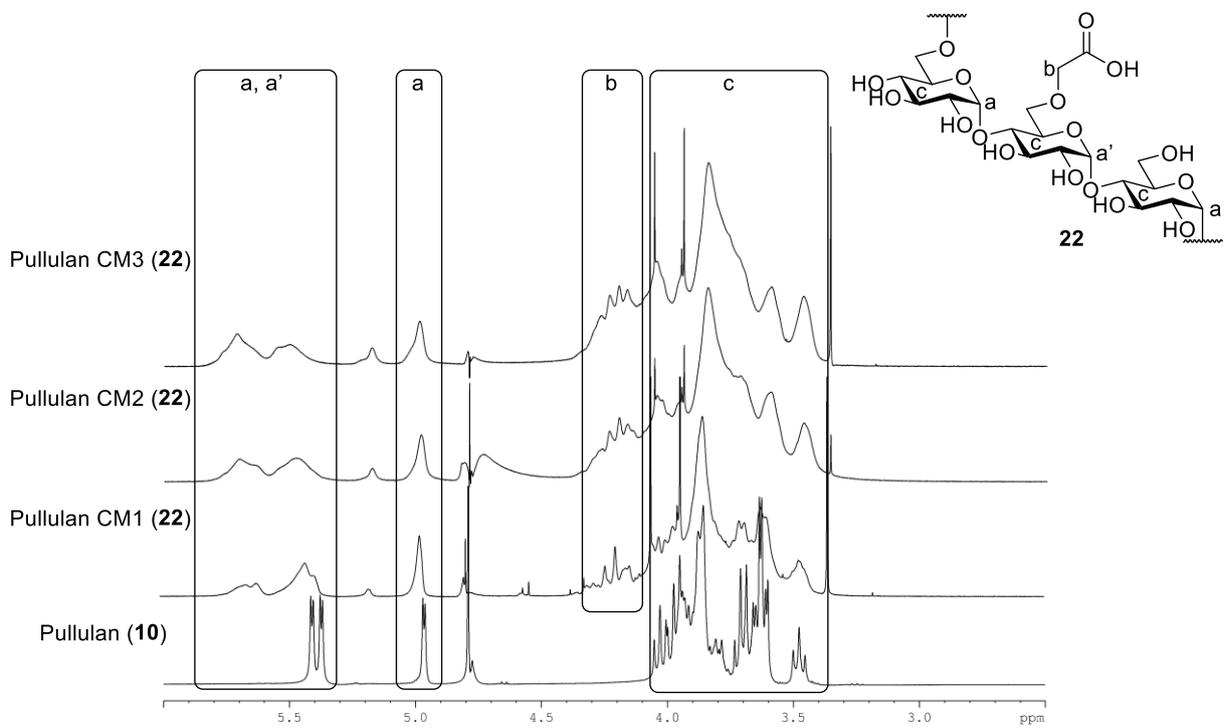
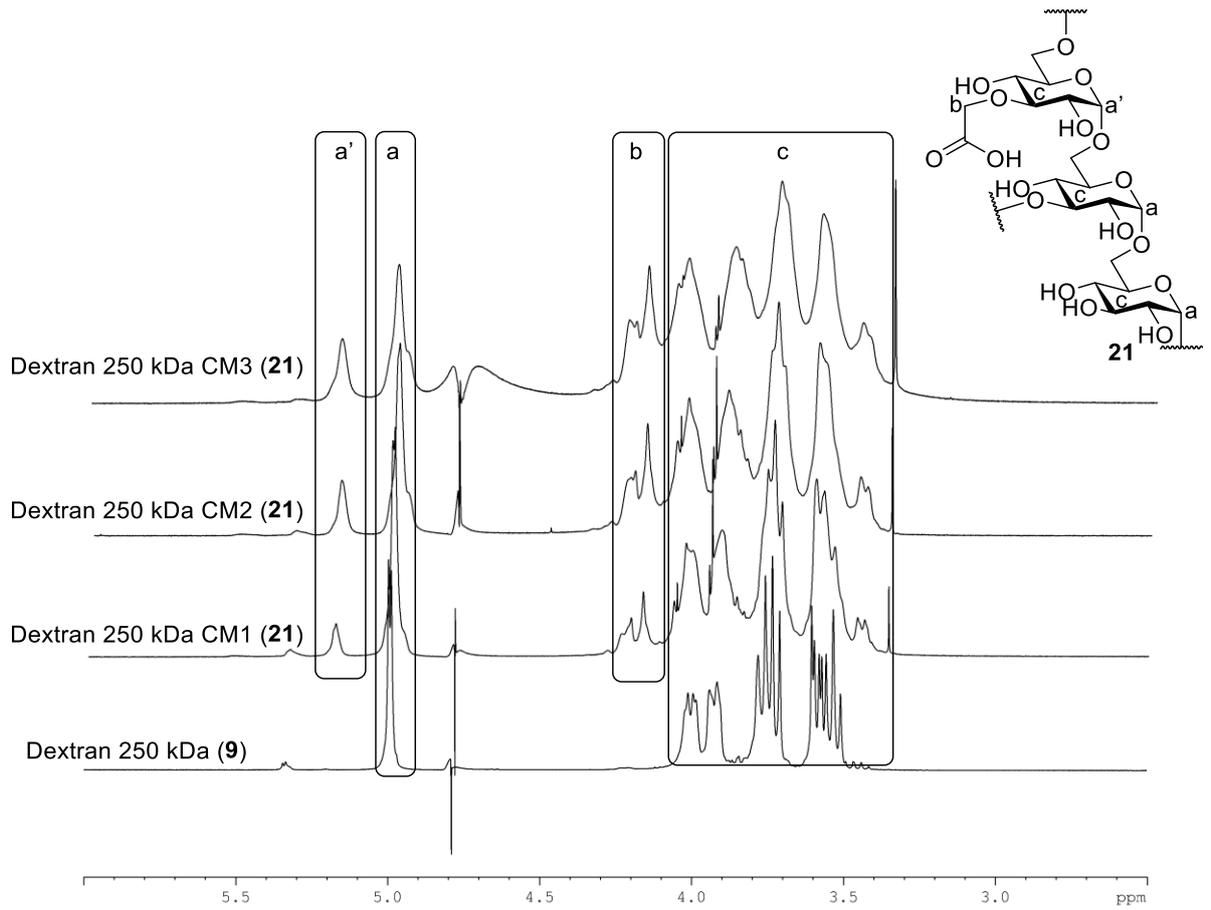
- [92] J. Zhou, P. Chen, C. Deng, F. Meng, R. Cheng, Z. Zhong, *Macromolecules*, DOI 10.1021/ma4014669 **2013**, *46*, 6723–6730, "A Simple and Versatile Synthetic Strategy to Functional Polypeptides via Vinyl Sulfone-Substituted L-Cysteine N - Carboxyanhydride".
- [93] S. A. Stewart, M. B. Coulson, C. Zhou, N. A. D. Burke, H. D. H. Stöver, *Soft Matter*, DOI 10.1039/c8sm01066h **2018**, *14*, 8317–8324, "Synthetic hydrogels formed by thiol-ene crosslinking of vinyl sulfone-functional poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) with α,ω -dithio-polyethyleneglycol".
- [94] R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li et al., *Nat Biotechnol*, DOI 10.1038/nbt.2968 **2014**, *32*, 1059–1062, "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates".
- [95] S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, *Bioconjug Chem*, DOI 10.1021/bc5005262 **2015**, *26*, 145–152, "Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates".
- [96] A. P. Krapcho, C. S. Kuell, *Synthetic Communications*, DOI 10.1080/00397919008053205 **1990**, *20*, 2559–2564, "Mono-Protected Diamines. N-tert-Butoxycarbonyl- α,ω -Alkanediamines from α,ω -Alkanediamines".
- [97] B. Horstmann, M. Korbus, T. Friedmann, C. Wolff, C. M. Thiele, F.-J. Meyer-Almes, *Bioorg Chem*, DOI 10.1016/j.bioorg.2014.10.004 **2014**, *57*, 155–161, "Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase".
- [98] Kricheldorf (Ed.) *Advances in Polymer Science. Progress in Polyimide Chemistry I*, Springer, Berlin, **1999**.
- [99] G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner, *J Nutr*, DOI 10.1093/jn/134.3.489 **2004**, *134*, 489–492, "Glutathione metabolism and its implications for health".
- [100] Z. Yongxin, Y. Qingliang, H. Yuanyuan, X. Linyao, G. Shun, WO2019127607, **2017**.
- [101] M. Matsumoto, W. Udomsinprasert, P. Laengsee, S. Honsawek, K. Patarakul, S. Chirachanchai, *Macromol Rapid Commun*, DOI 10.1002/marc.201600257 **2016**, *37*, 1618–1622, "A Water-Based Chitosan-Maleimide Precursor for Bioconjugation: An Example of a Rapid Pathway for an In Situ Injectible Adhesive Gel".
- [102] J. Dahlmann, A. Krause, L. Möller, G. Kensah, M. Möwes, A. Diekmann, U. Martin, A. Kirschning, I. Gruh, G. Dräger, *Biomaterials*, DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.10.008 **2013**, *34*, 940–951, "Fully defined in situ cross-linkable alginate and hyaluronic acid hydrogels for myocardial tissue engineering".

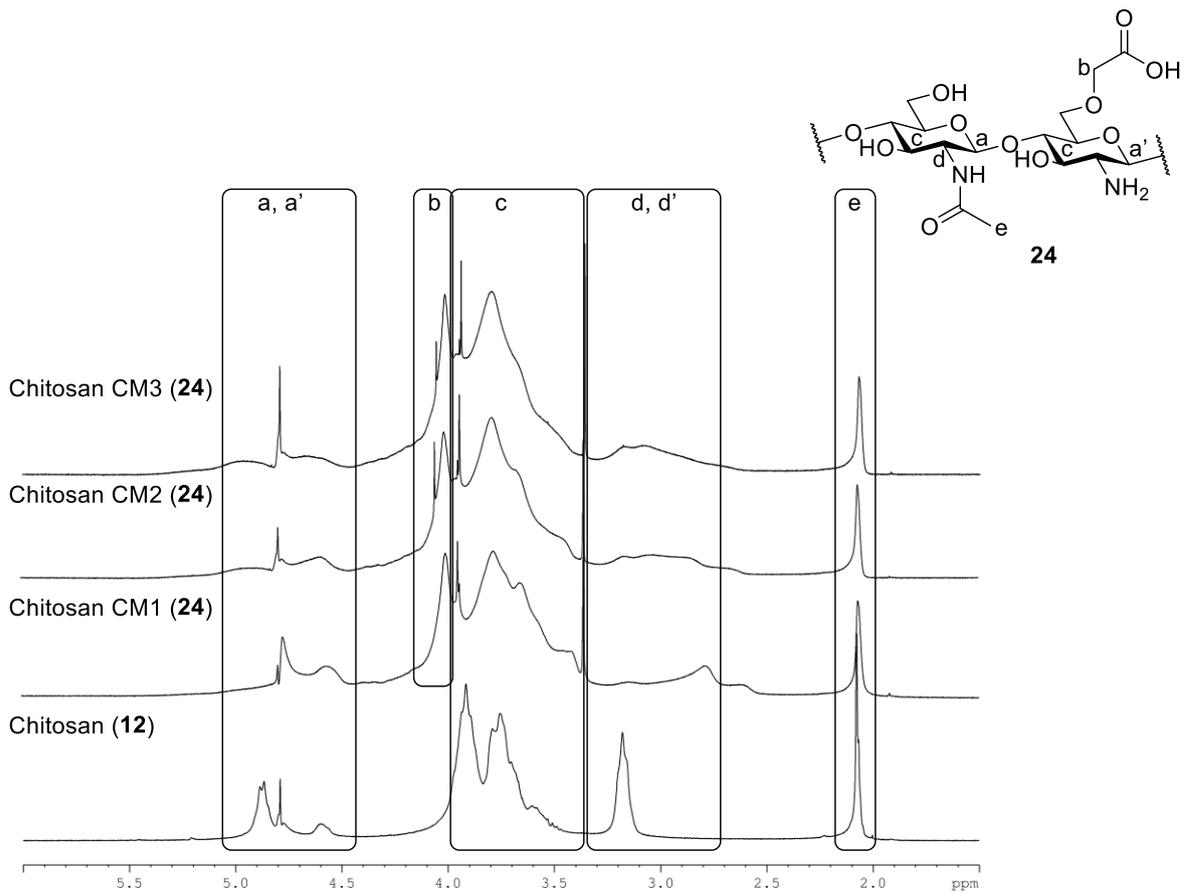
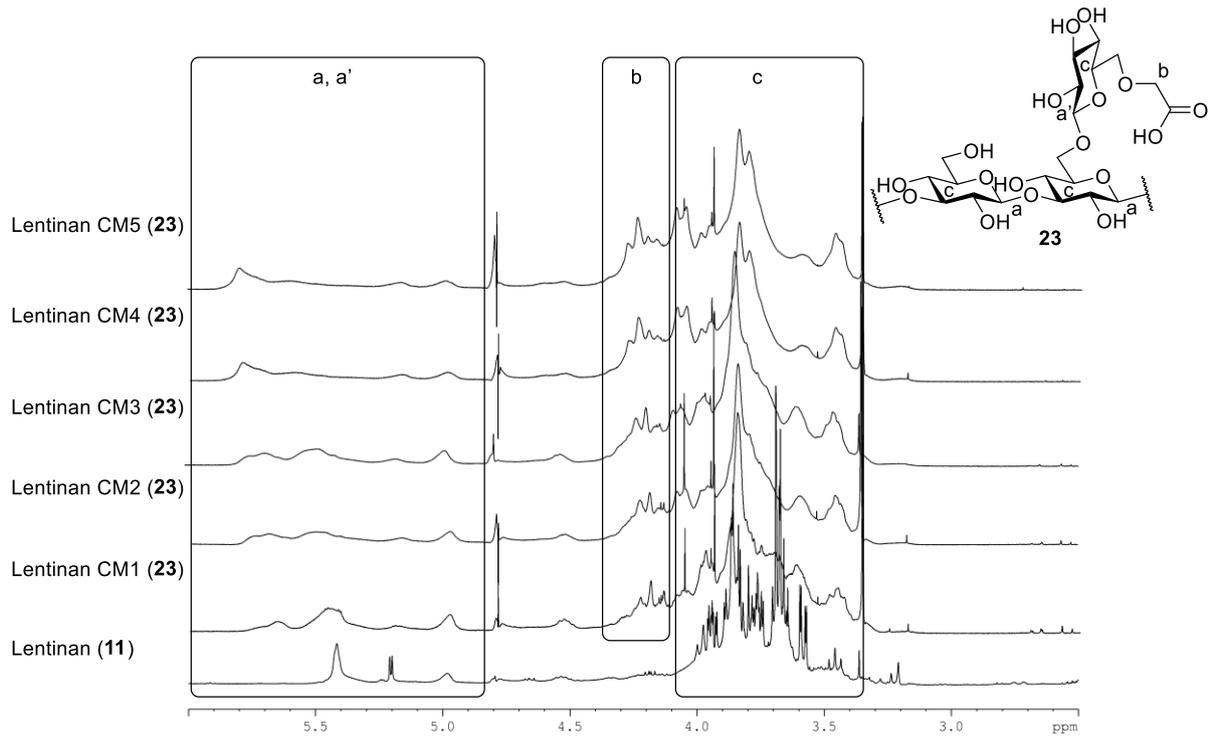
- [103] Z. Q. Liu, Z. Wei, X. L. Zhu, G. Y. Huang, F. Xu, J. H. Yang, Y. Osada, M. Zrínyi, J. H. Li, Y. M. Chen, *Colloids Surf B Biointerfaces*, DOI 10.1016/j.colsurfb.2015.02.005 **2015**, 128, 140–148, "Dextran-based hydrogel formed by thiol-Michael addition reaction for 3D cell encapsulation".
- [104] E. M. Ahmed, *J Adv Res*, DOI 10.1016/j.jare.2013.07.006 **2015**, 6, 105–121, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review".
- [105] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, F. A. Morrison, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, DOI 10.1002/jbm.b.33088 **2014**, 102, 1063–1073, "A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies".
- [106] L. Figueiredo, R. Pace, C. D'Arros, G. Réthoré, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, *J Tissue Eng Regen Med*, DOI 10.1002/term.2656 **2018**, 12, 1238–1246, "Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine".
- [107] M. Kanduč, W. K. Kim, R. Roa, J. Dzubiella, *ACS Nano*, DOI 10.1021/acsnano.0c06319 **2021**, 15, 614–624, "How the Shape and Chemistry of Molecular Penetrants Control Responsive Hydrogel Permeability".
- [108] C. Gonçalves, R. M. Rodriguez-Jasso, N. Gomes, J. A. Teixeira, I. Belo, *Anal. Methods*, DOI 10.1039/c0ay00525h **2010**, 2, 2046, "Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates".
- [109] J. B. Sumner, V. A. Graham, *Journal of Biological Chemistry*, DOI 10.1016/S0021-9258(18)86093-8 **1921**, 47, 5–9, "DINITROSALICYLIC ACID: A REAGENT FOR THE ESTIMATION OF SUGAR IN NORMAL AND DIABETIC URINE".
- [110] J. B. Sumner, C. V. Noback, *Journal of Biological Chemistry*, DOI 10.1016/S0021-9258(18)85062-1 **1924**, 62, 287–290, "THE ESTIMATION OF SUGAR IN DIABETIC URINE, USING DINITROSALICYLIC ACID".
- [111] R. F. Tester, J. Karkalas (Eds.) *Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Carbohydrates: Classification and Properties*, Academic Press, **2003**.
- [112] F. Müller-Plathe, *The Journal of Chemical Physics*, DOI 10.1063/1.459788 **1991**, 94, 3192–3199, "Diffusion of penetrants in amorphous polymers: A molecular dynamics study".
- [113] H. He, X. Cao, L. J. Lee, *J Control Release*, DOI 10.1016/j.jconrel.2003.12.004 **2004**, 95, 391–402, "Design of a novel hydrogel-based intelligent system for controlled drug release".
- [114] T. Meyvis, S. de Smedt, B. Stubbe, W. Hennink, J. Demeester, *Pharmaceutical Research*, DOI 10.1023/a:1013038716373 **2001**, 18, 1593–1599, "On the Release of Proteins from Degrading Dextran Methacrylate Hydrogels and the Correlation with the Rheologic Properties of the Hydrogels".

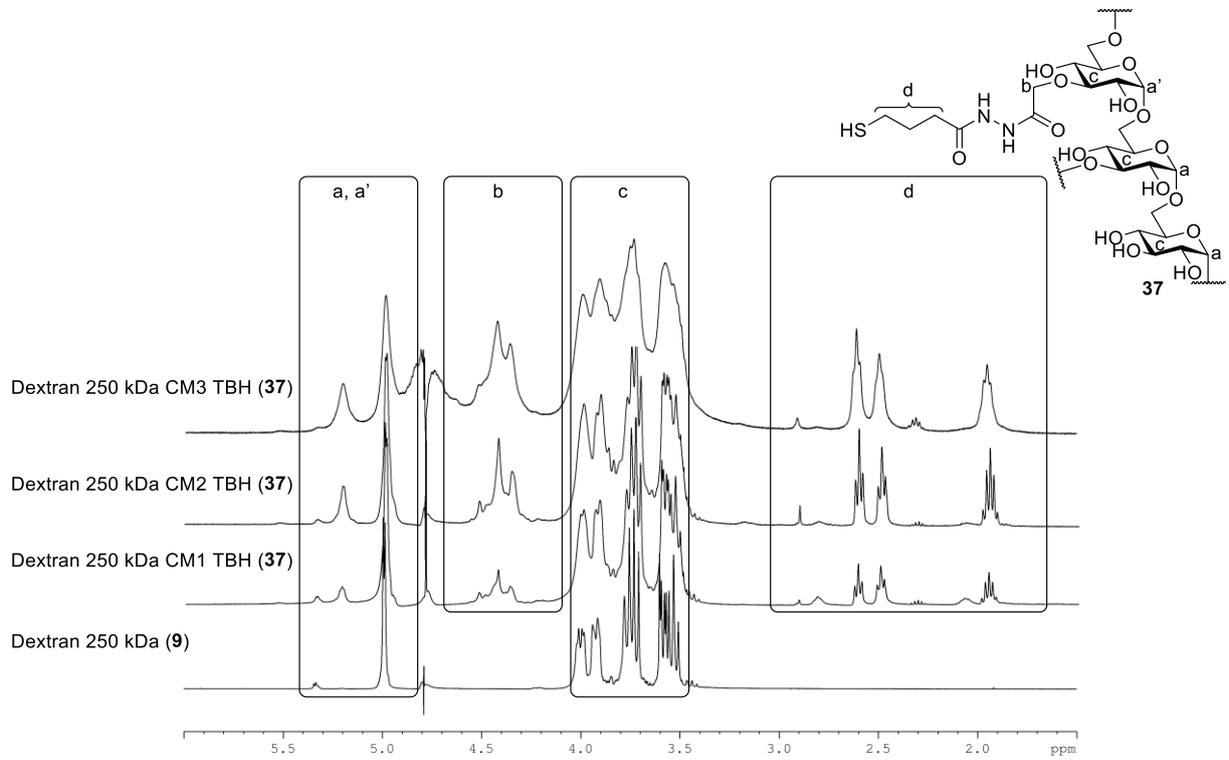
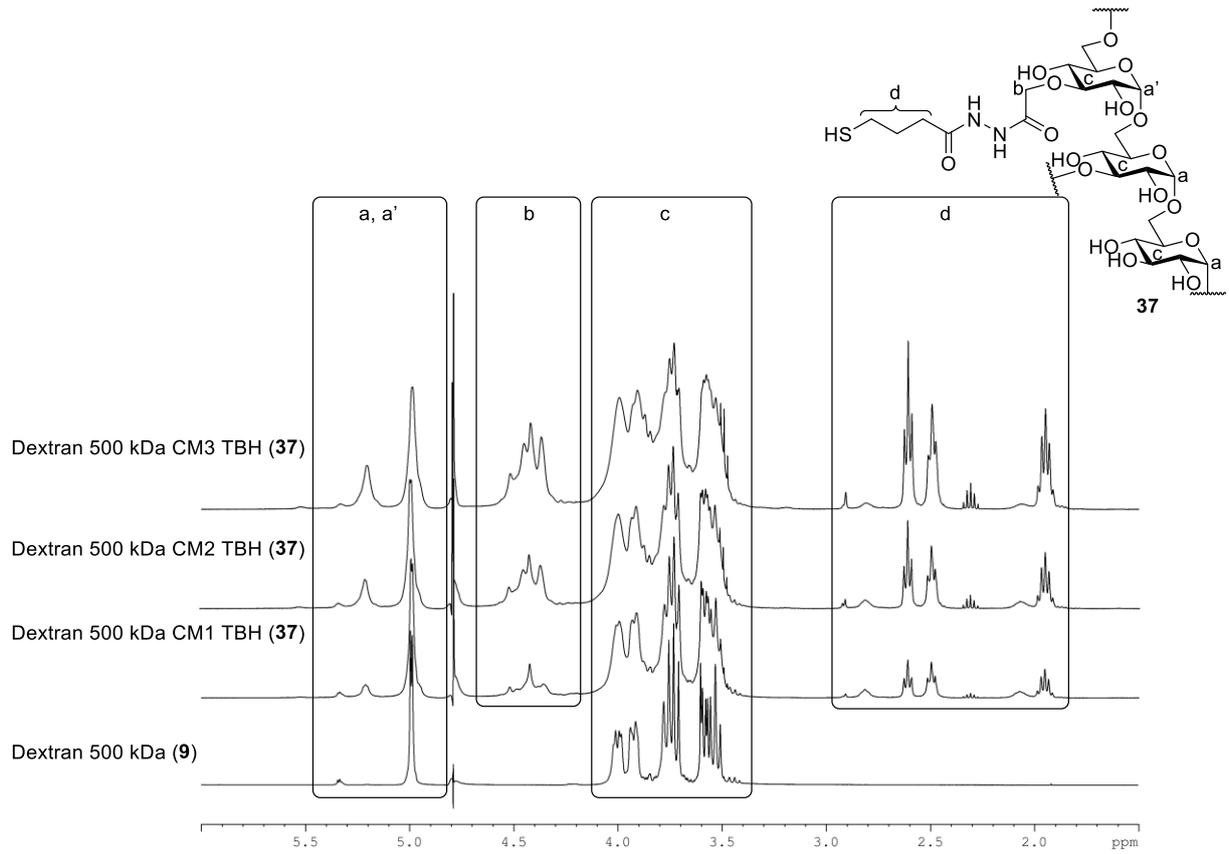
- [115] E. J. Bourne, D. H. Hutson, H. Weigel, *Biochem J*, DOI 10.1042/bj0850158 **1962**, *85*, 158–163, "Studies on dextrans and dextranases. 2. The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis".
- [116] N. Barzkar, O. Babich, R. Das, S. Sukhikh, S. Tamadoni Jahromi, M. Sohail, *Molecules*, DOI 10.3390/molecules27175533 **2022**, *27*, "Marine Bacterial Dextranases: Fundamentals and Applications".
- [117] O. Franssen, R. D. van Ooijen, D. de Boer, R. A. A. Maes, W. E. Hennink, *Macromolecules*, DOI 10.1021/ma981759m **1999**, *32*, 2896–2902, "Enzymatic Degradation of Cross-Linked Dextrans".
- [118] H. P. Sondermeijer, P. Witkowski, T. Seki, A. van der Laarse, S. Itescu, M. A. Hardy, *Tissue Eng Part A*, DOI 10.1089/ten.TEA.2017.0221 **2018**, *24*, 740–751, "RGDfK-Peptide Modified Alginate Scaffold for Cell Transplantation and Cardiac Neovascularization".
- [119] J. Palacek, G. Dräger, A. Kirschning, *Synthesis*, DOI 10.1055/s-0030-1258396 **2011**, *4*, 653–661, "A Practical Large-Scale Synthesis of cyclic RGD Pentapeptides Suitable for Further Functionalization through "Click" Chemistry".
- [120] C. J. Weber, *Journal of Biological Chemistry*, DOI 10.1016/S0021-9258(18)76920-2 **1930**, *86*, 217–222, "A Modification of Sakaguchi's Reaction for the Quantitative Determination of Arginine".
- [121] S. Sakaguchi, *The Journal of Biochemistry*, DOI 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128359 **1925**, *5*, 25–31, "Über eine neue Farbenreaktion von Protein und Arginin".
- [122] Roche, "Cell Proliferation Reagent WST-1. Colorimetric assay for the nonradioactive quantification of cell proliferation, cell viability, and cytotoxicity".
- [123] P. Ngamwongsatit, P. P. Banada, W. Panbangred, A. K. Bhunia, *J Microbiol Methods*, DOI 10.1016/j.mimet.2008.03.002 **2008**, *73*, 211–215, "WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line".
- [124] P. Corporation, "CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay".
- [125] M. Ogris, D. Oupicky, *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery*, Humana Press, Totowa, NJ, **2013**.
- [126] D. Bratosin, L. Mitrofan, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, *Cytometry A*, DOI 10.1002/cyto.a.20152 **2005**, *66*, 78–84, "Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging".

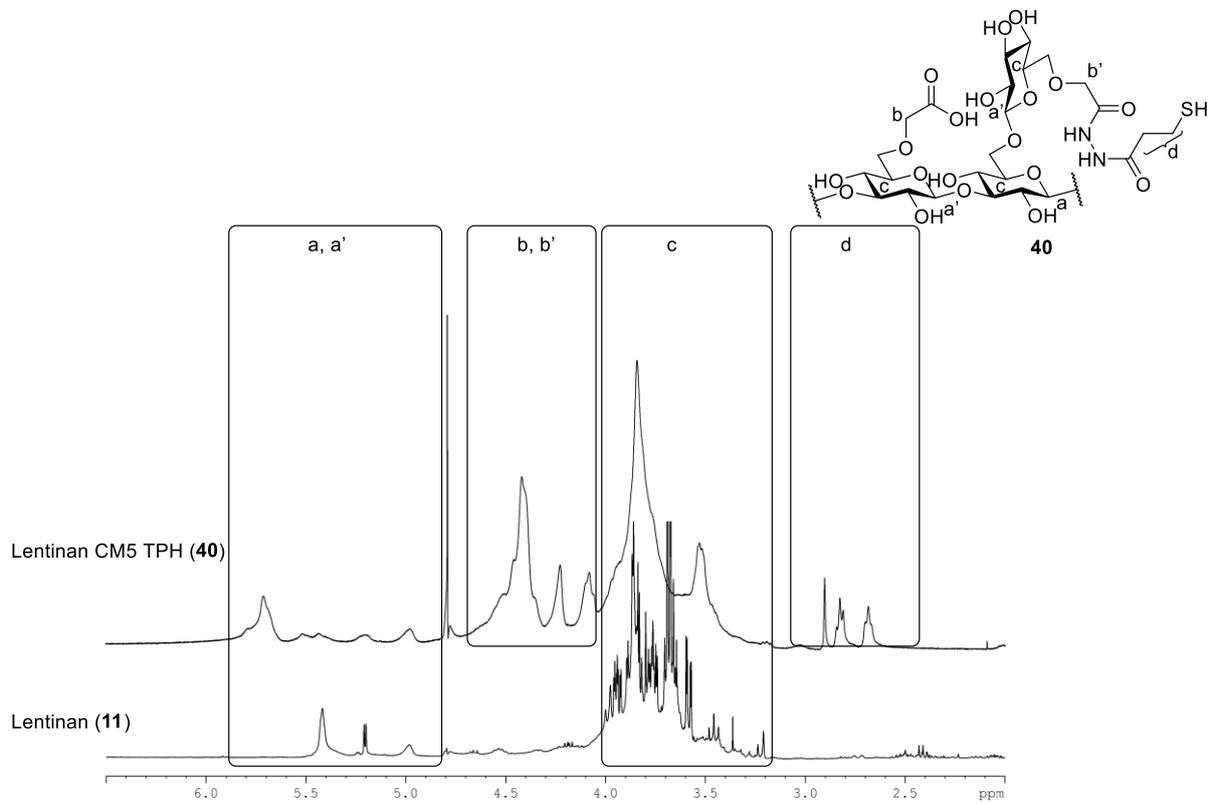
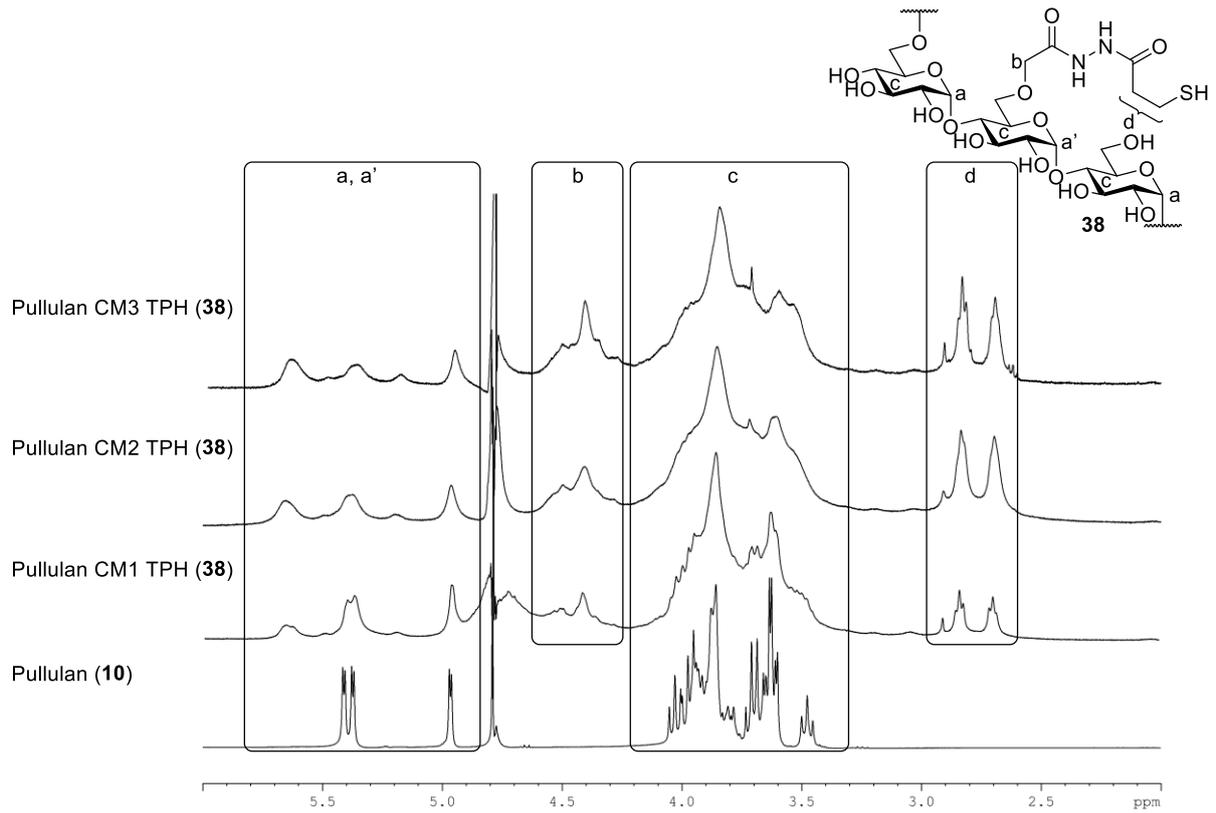
7 Anhang

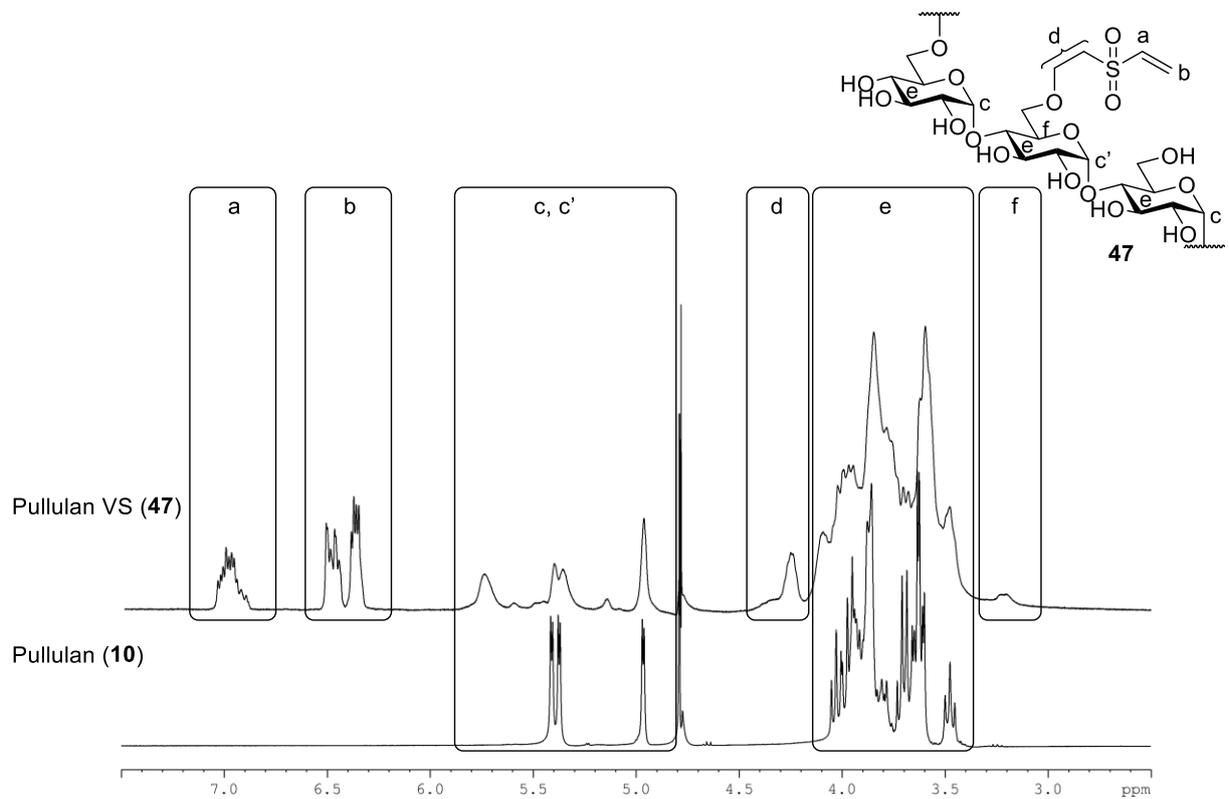
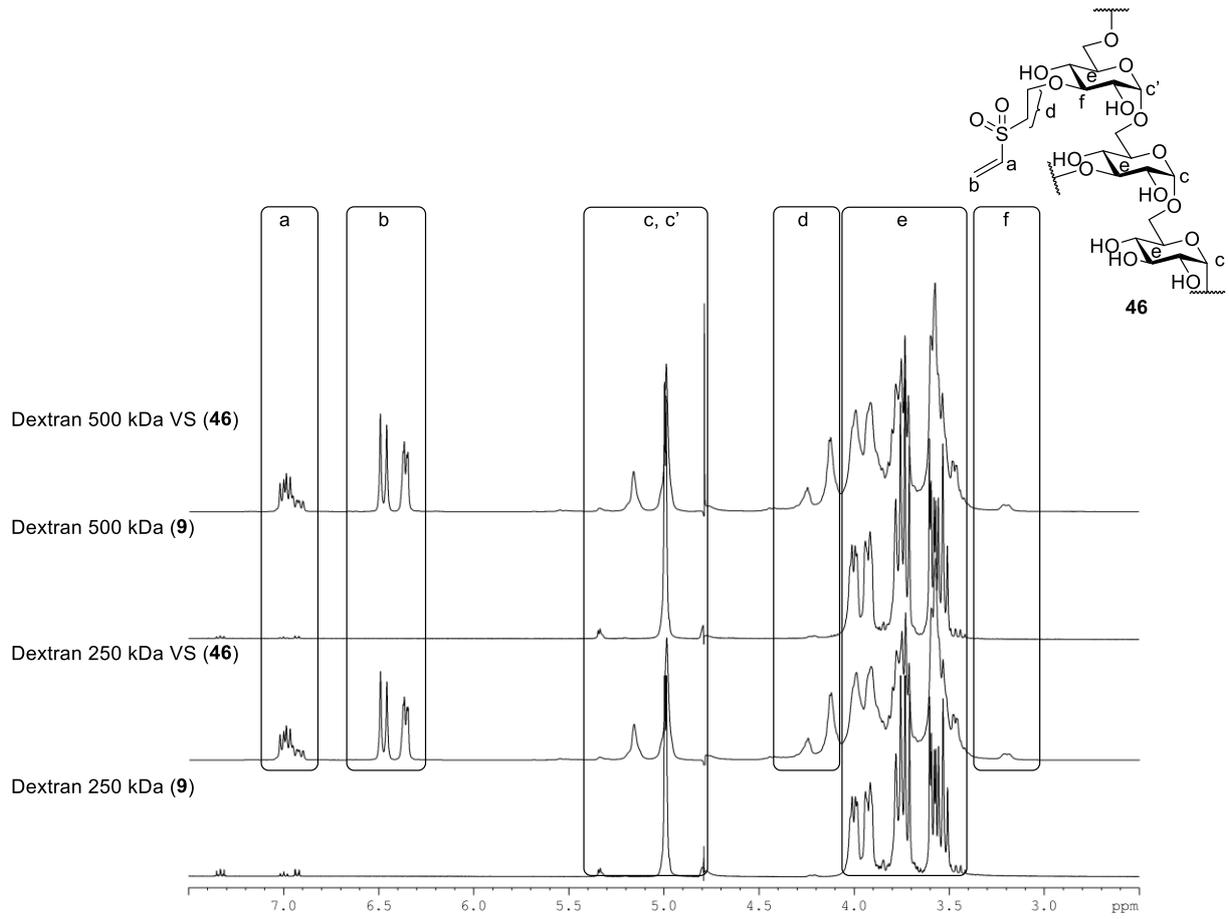


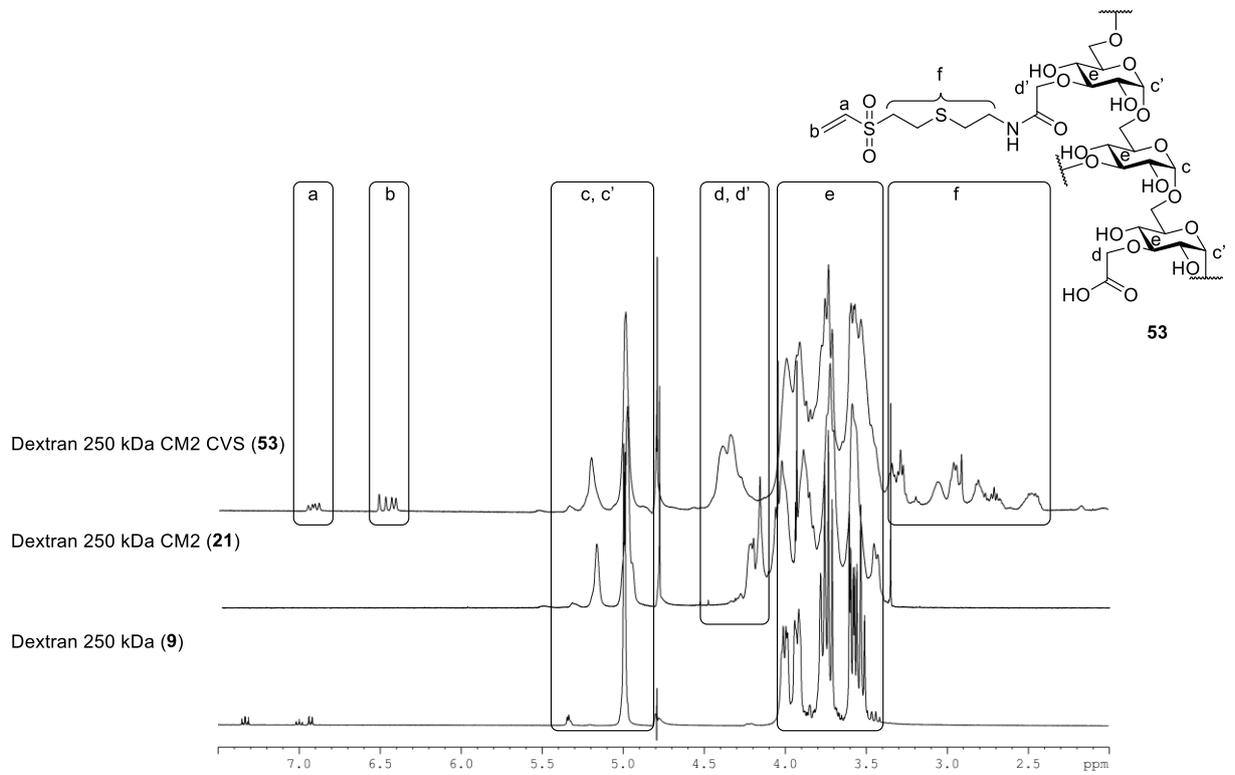
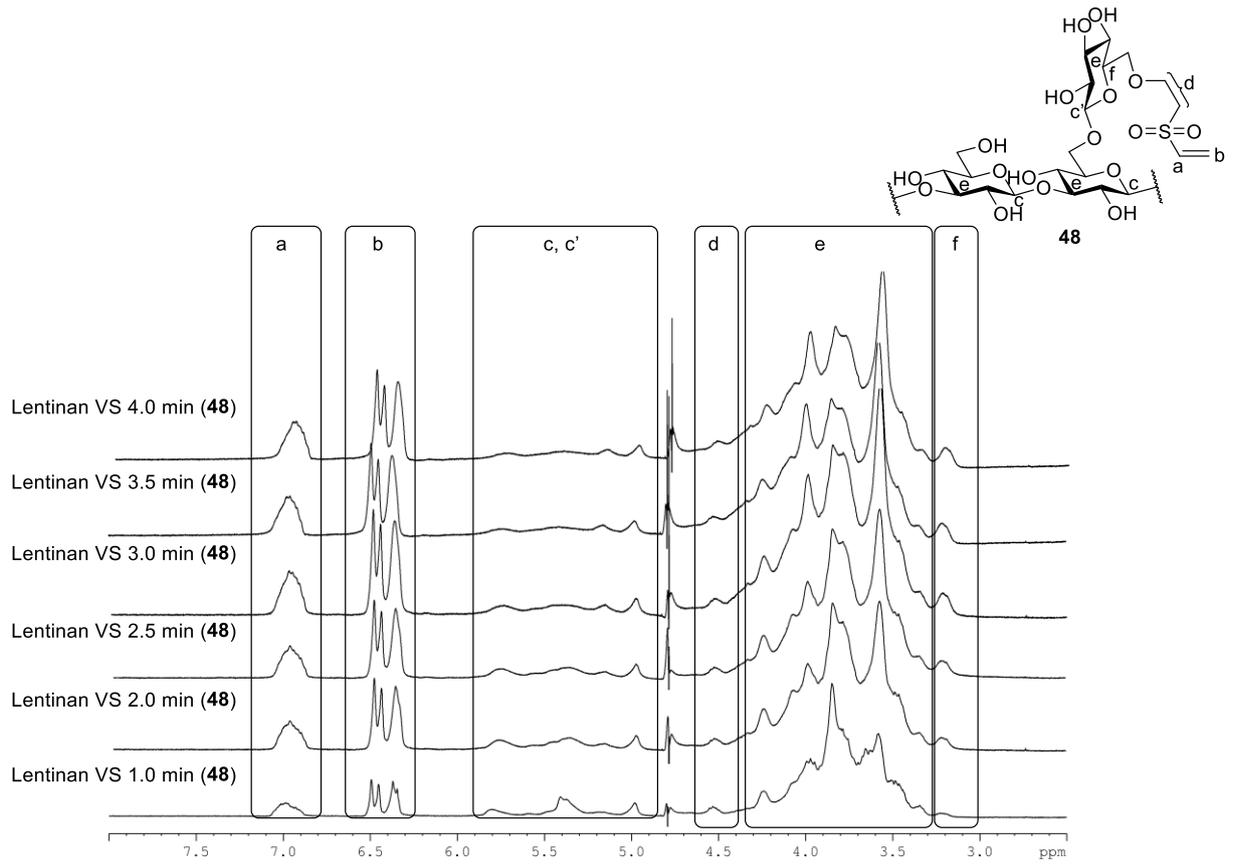


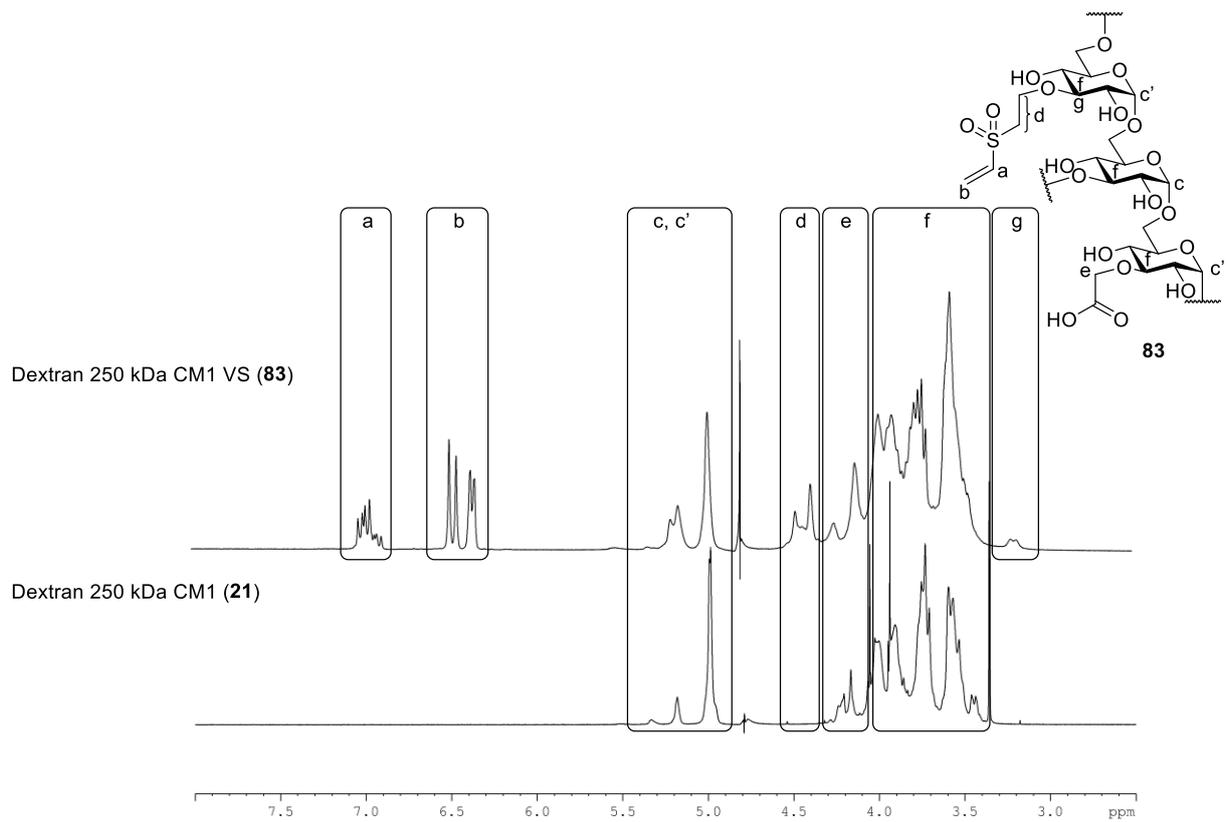
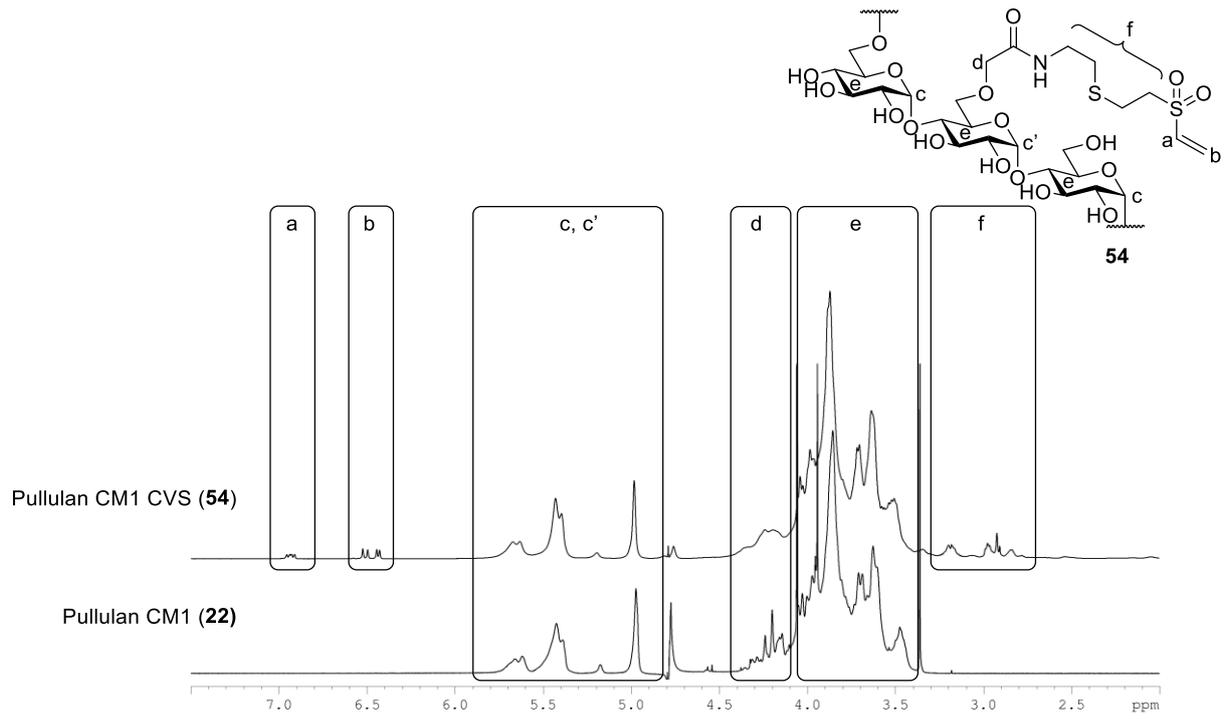




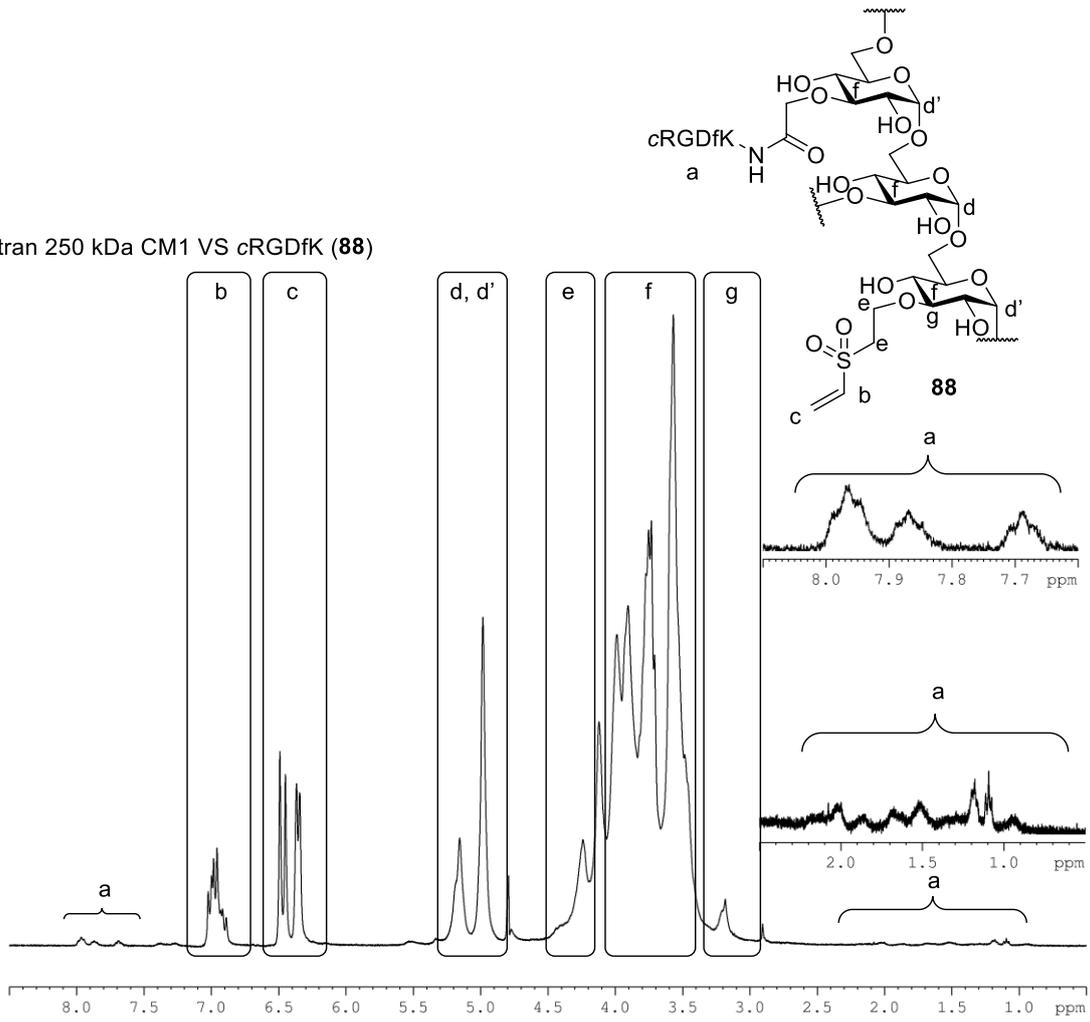


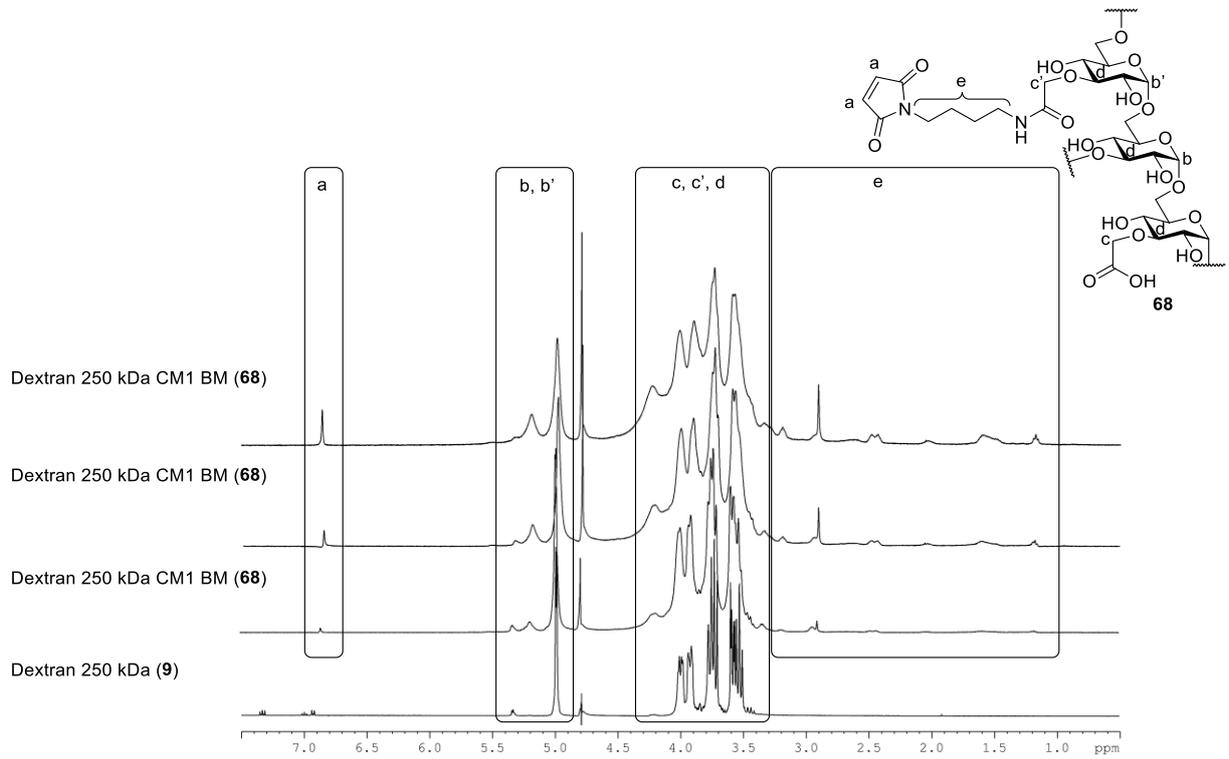
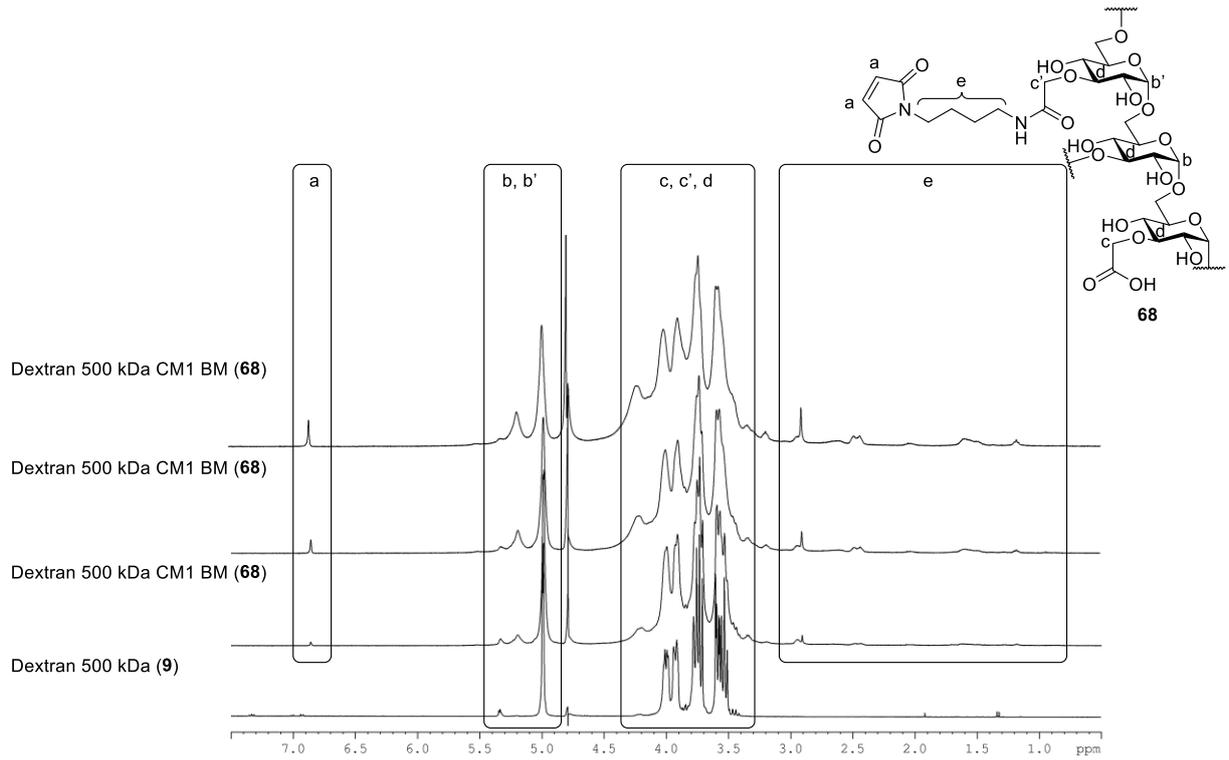


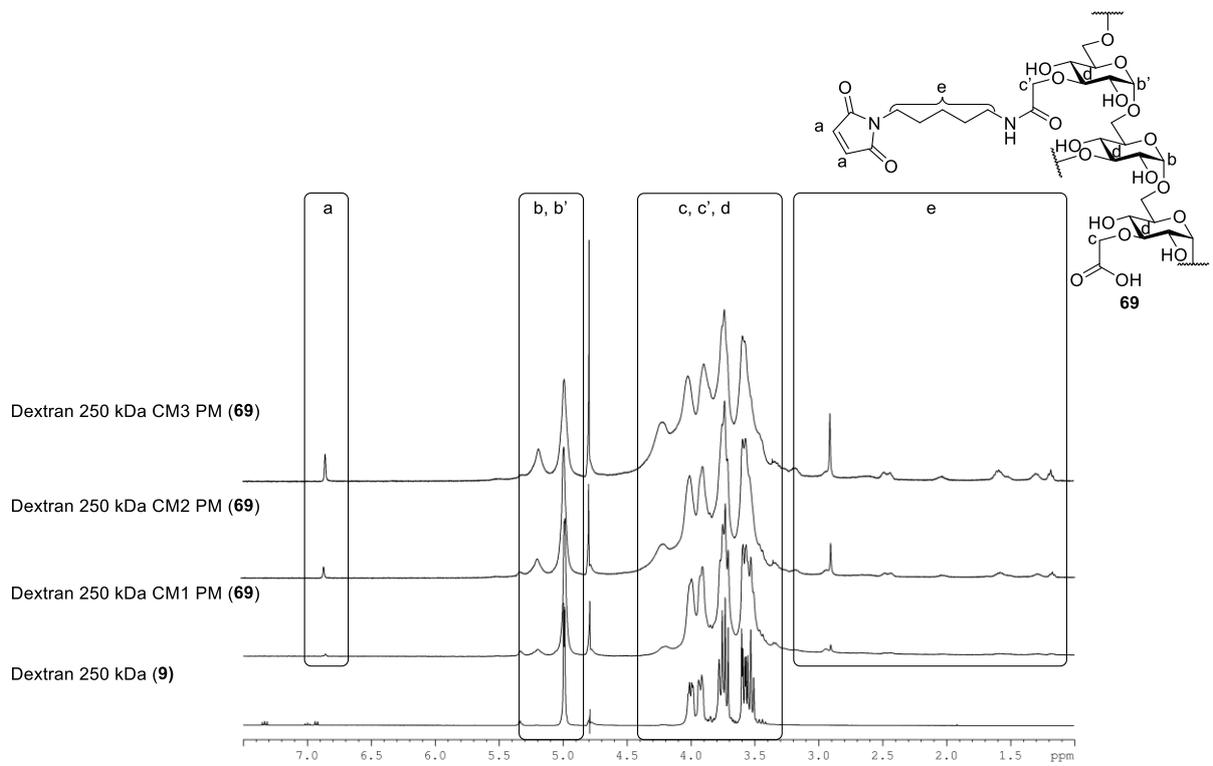
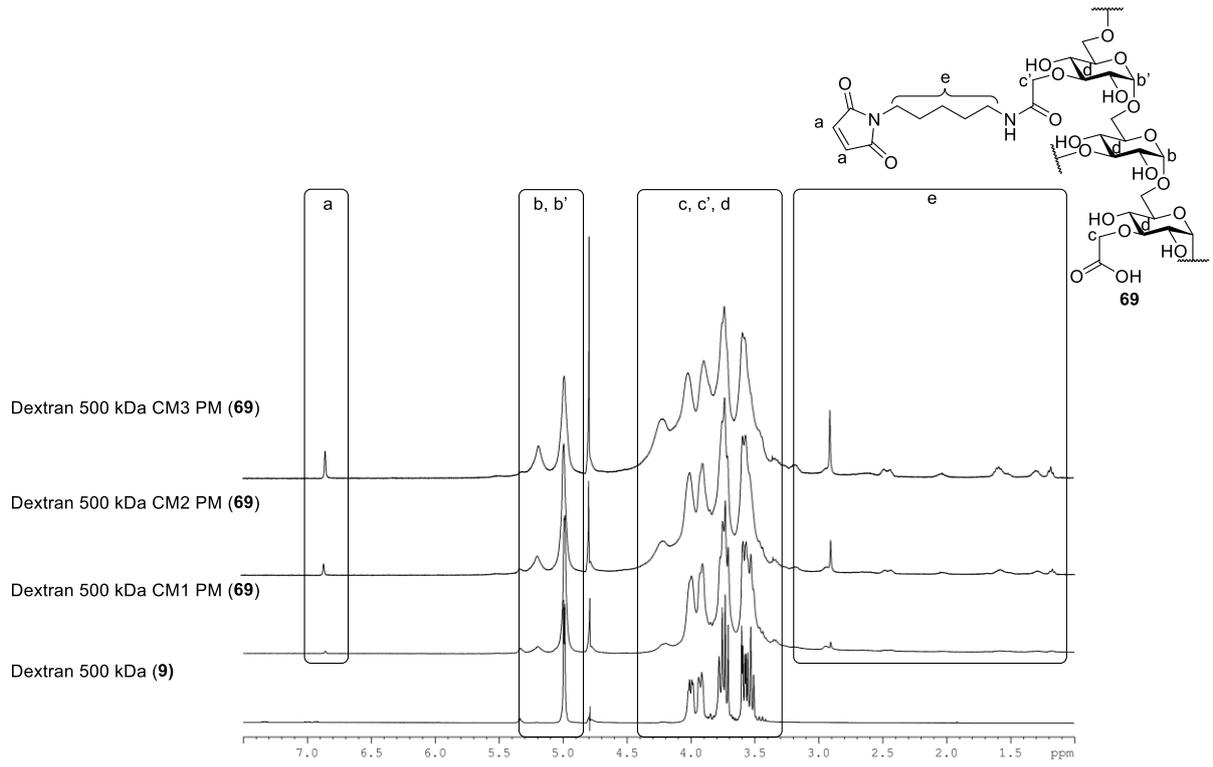


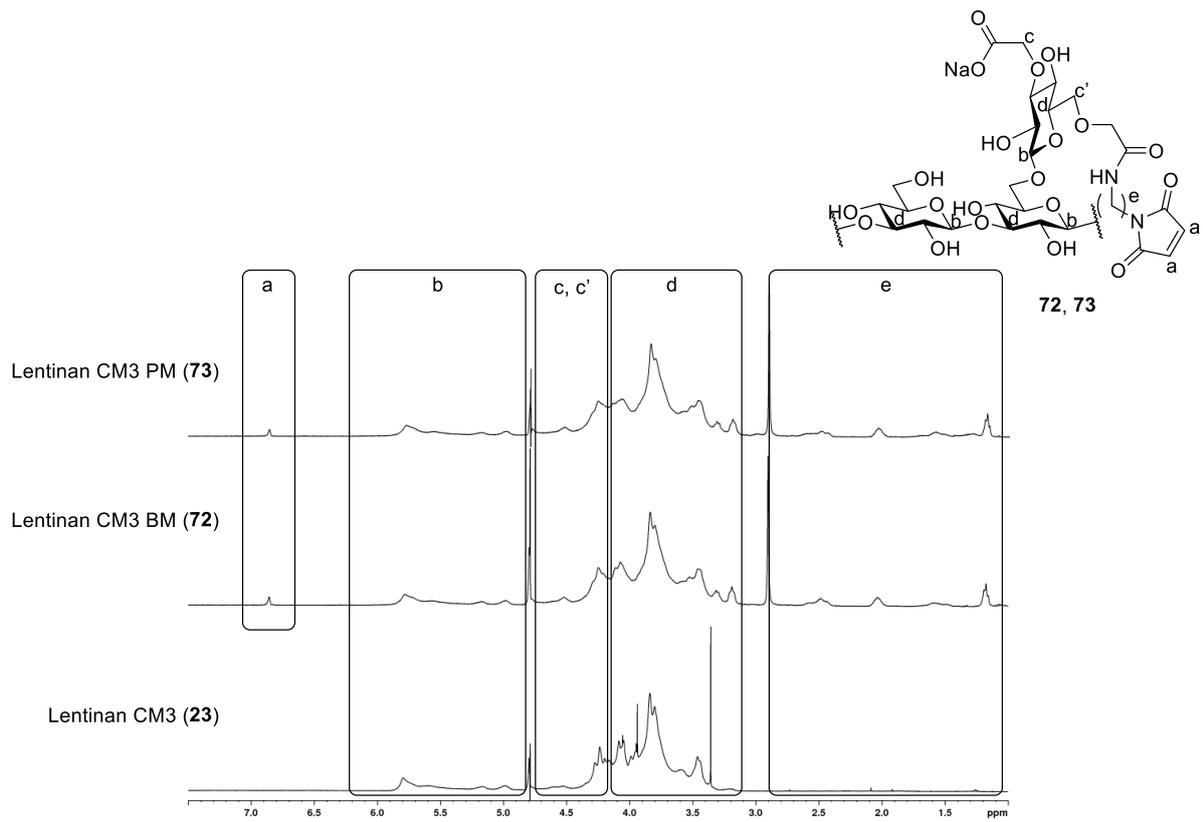
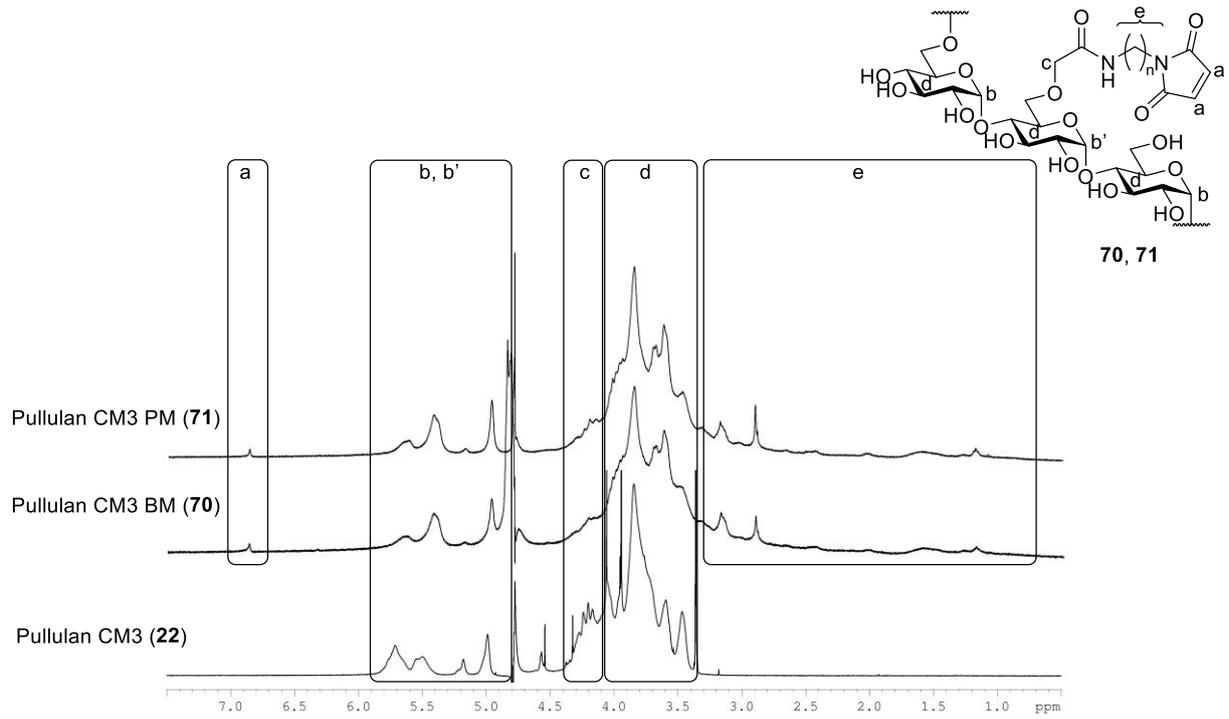


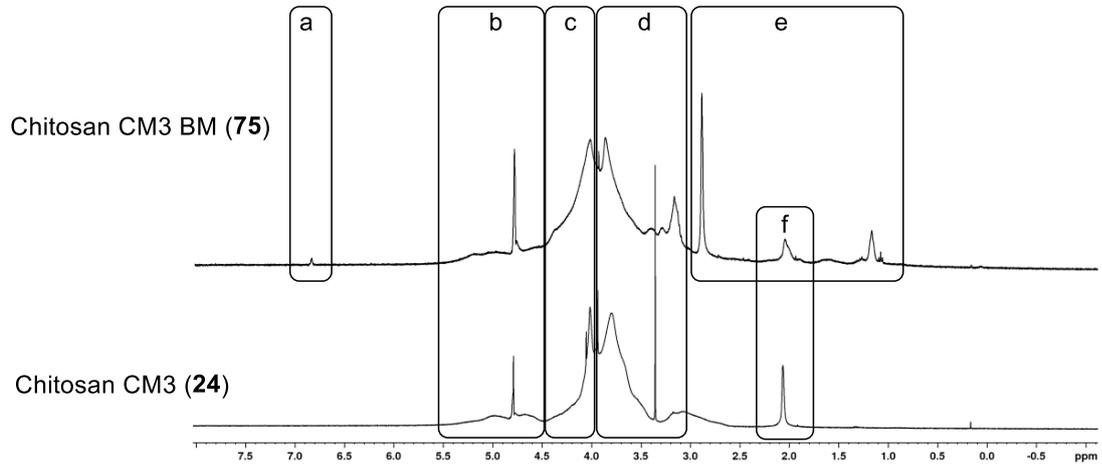
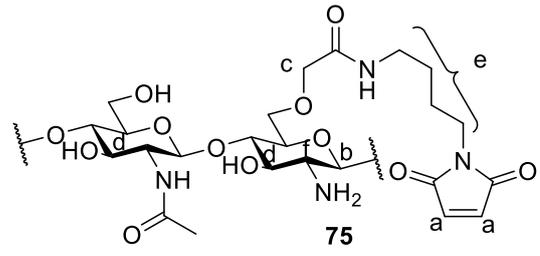
Dextran 250 kDa CM1 VS cRGDfK (88)

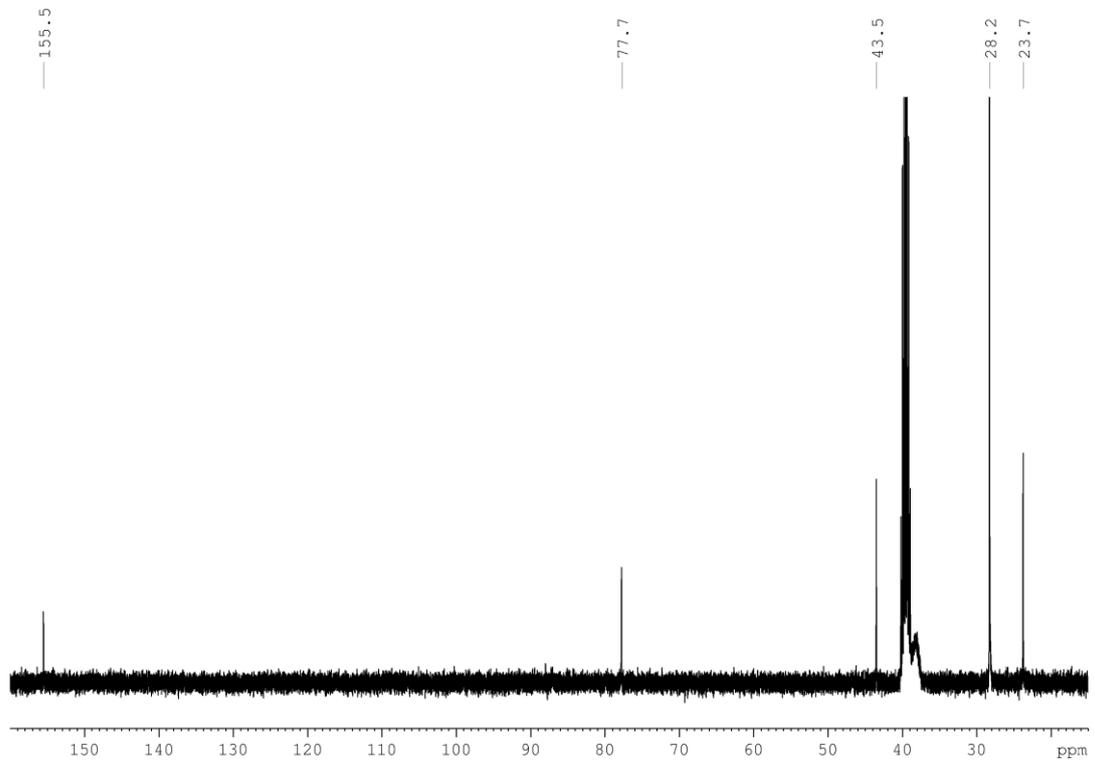
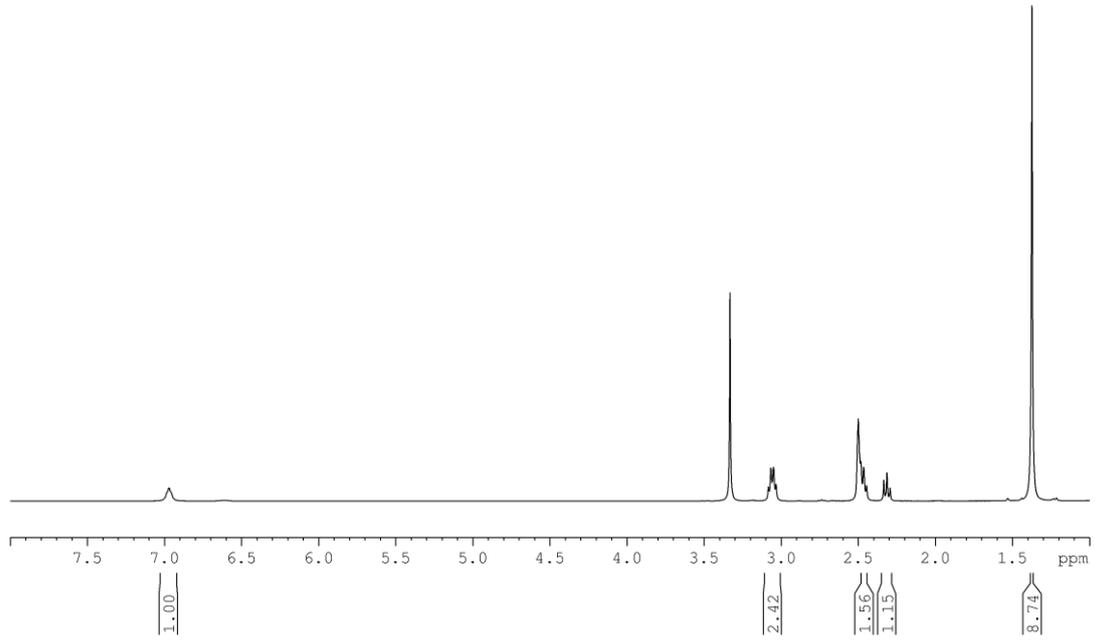
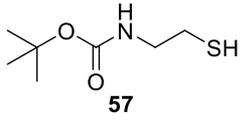


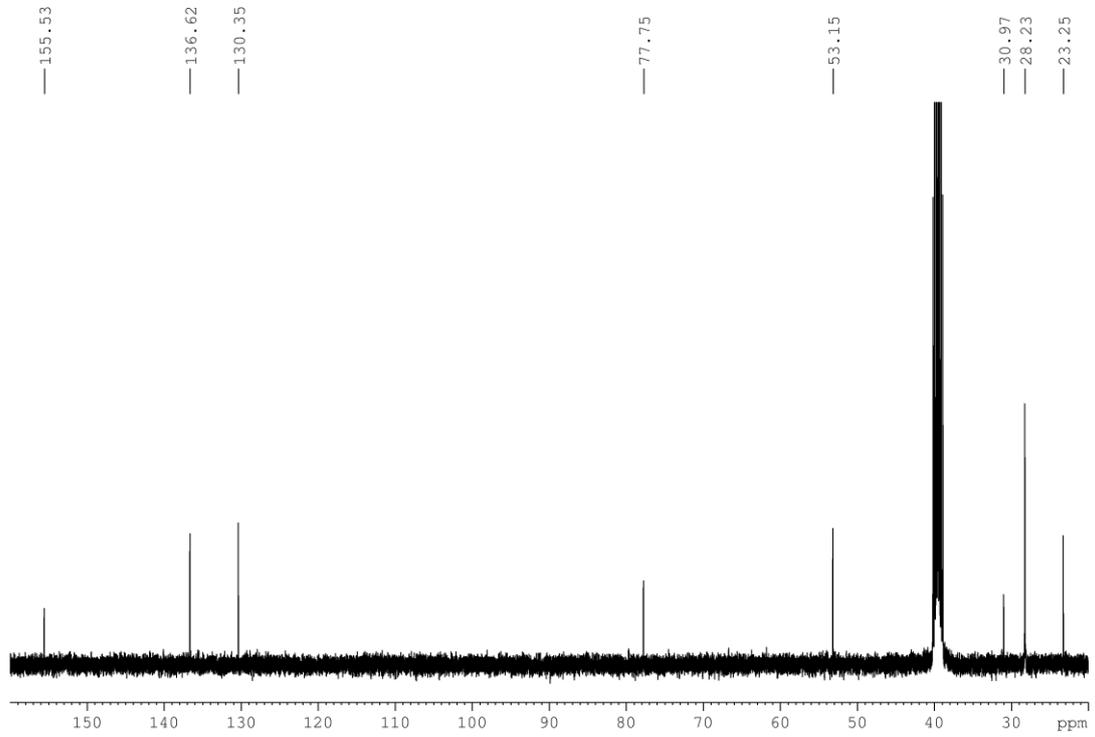
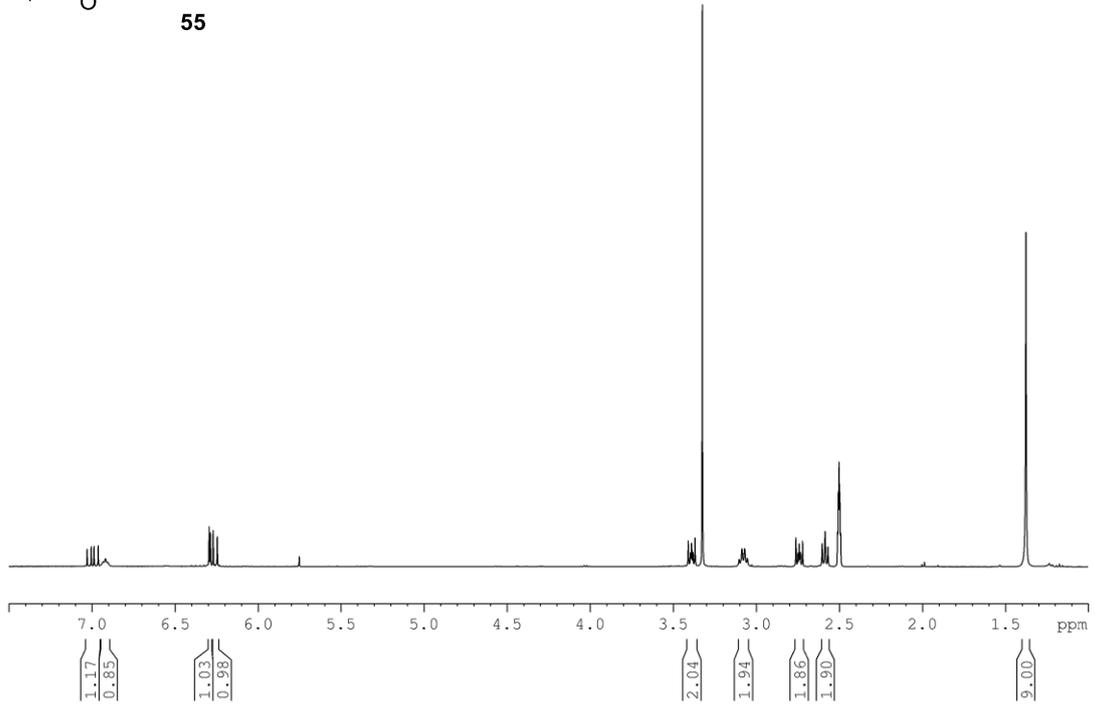
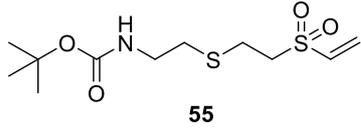


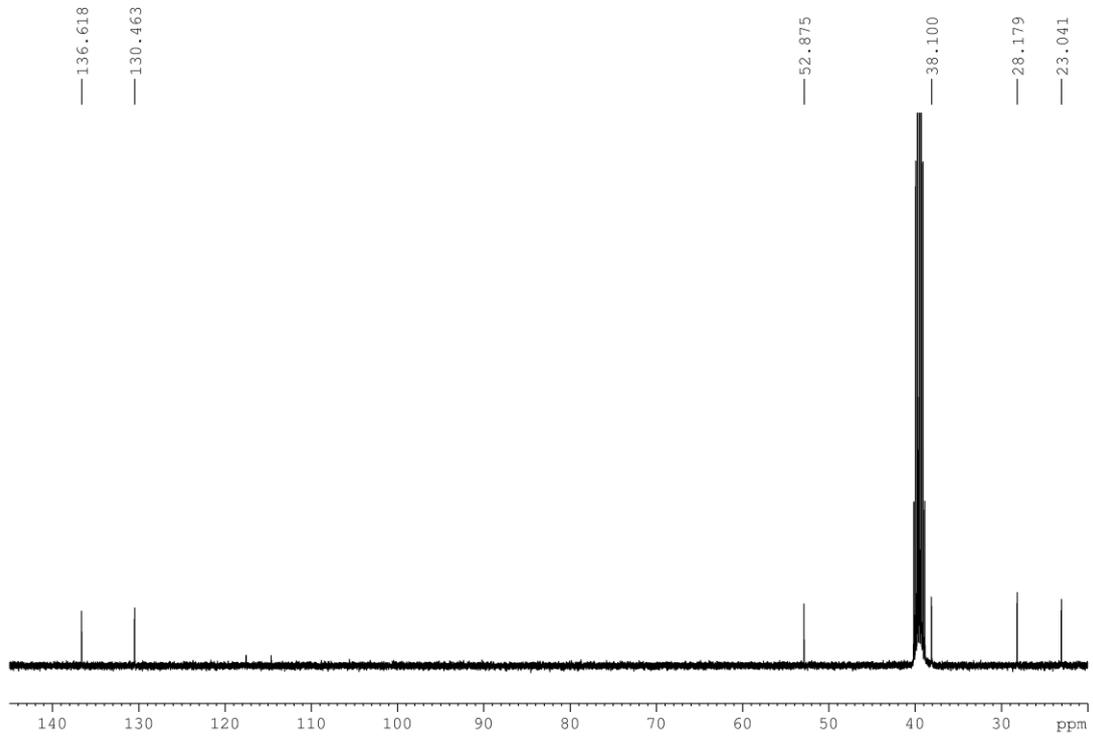
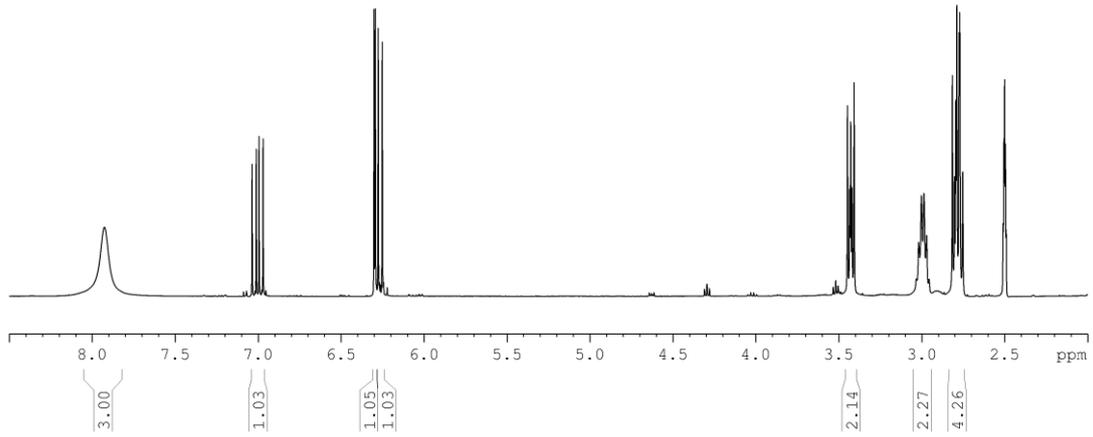
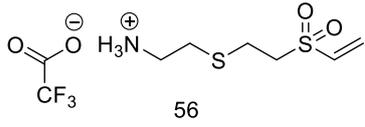


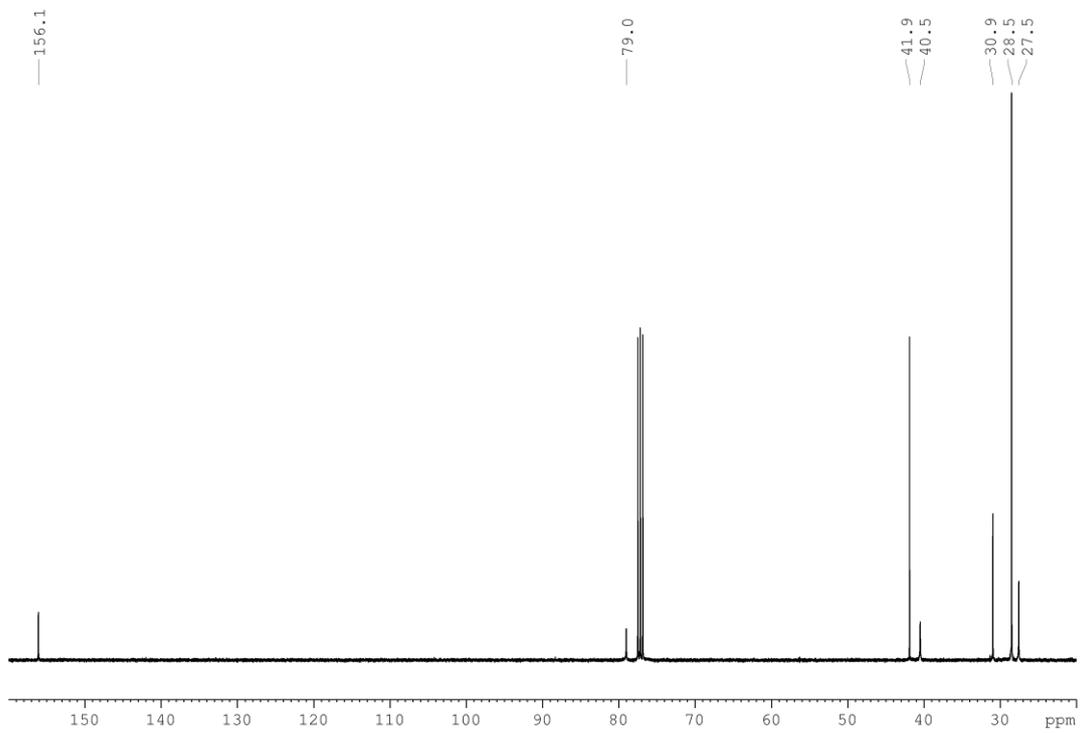
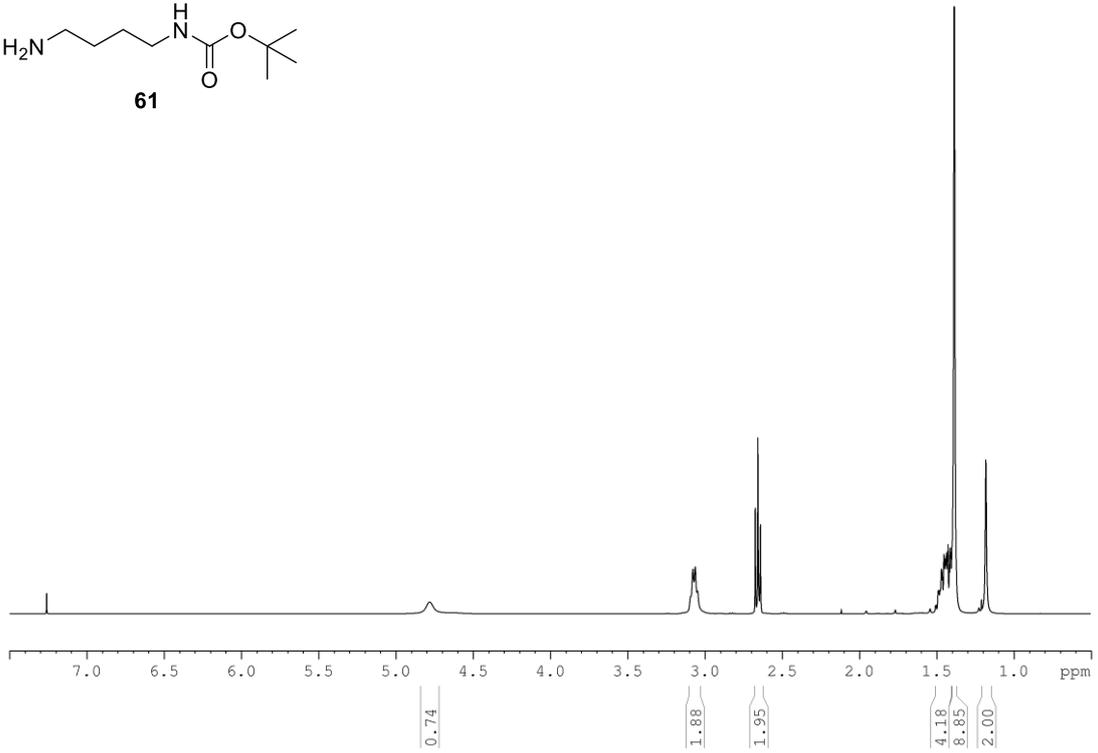
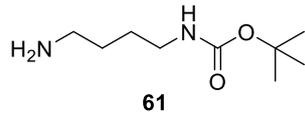


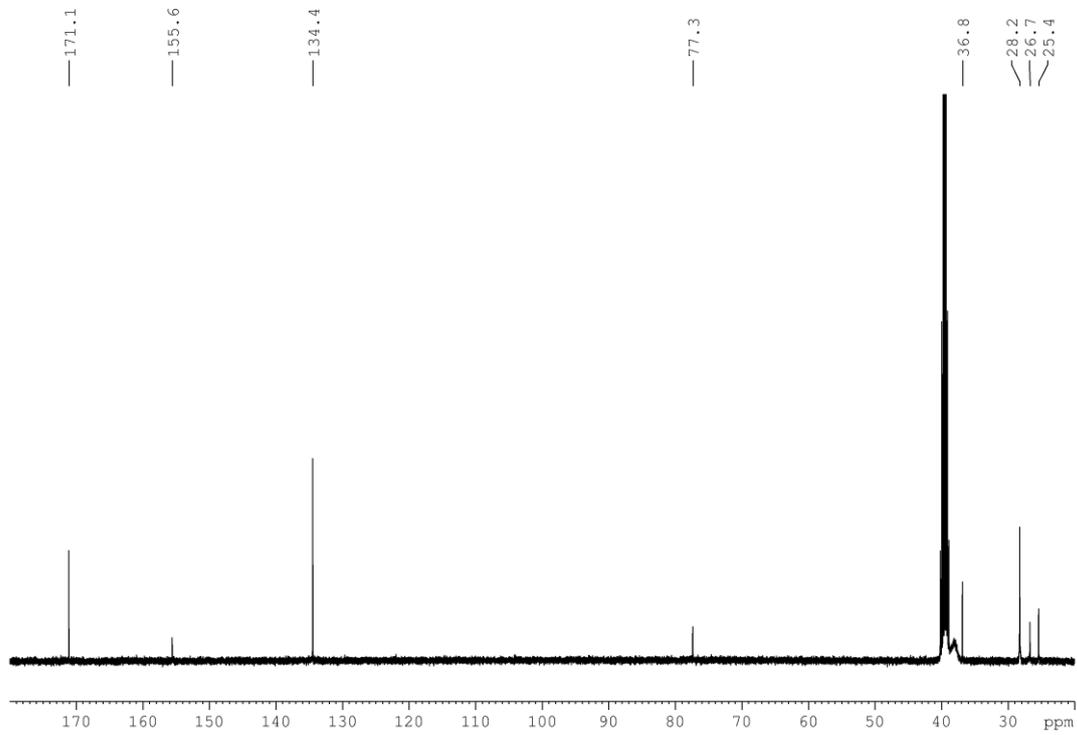
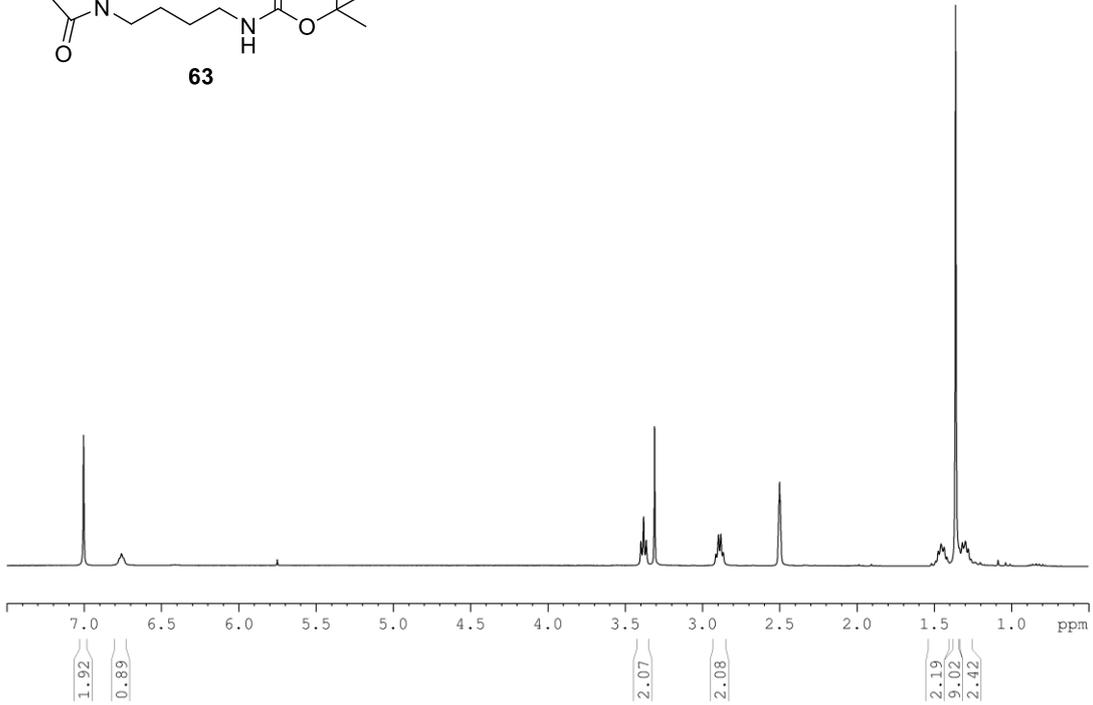
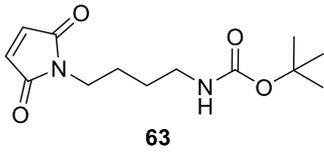


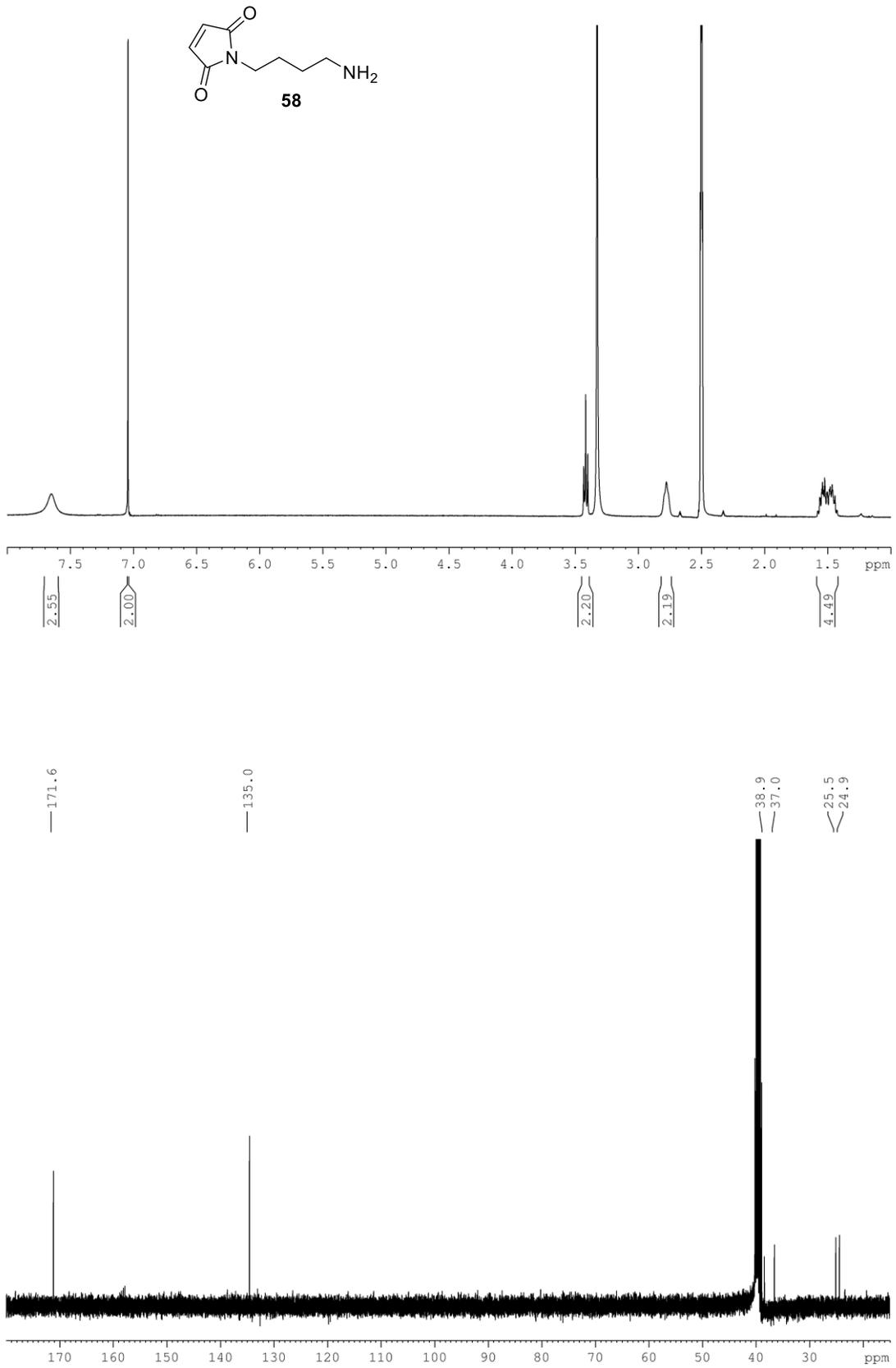


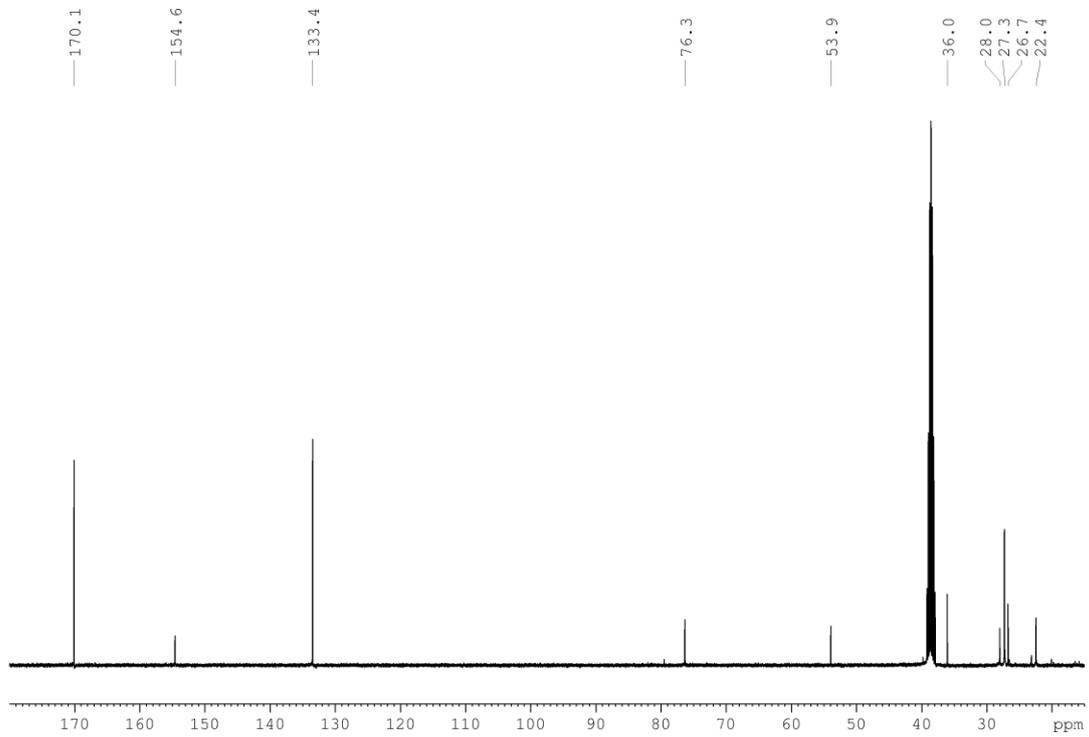
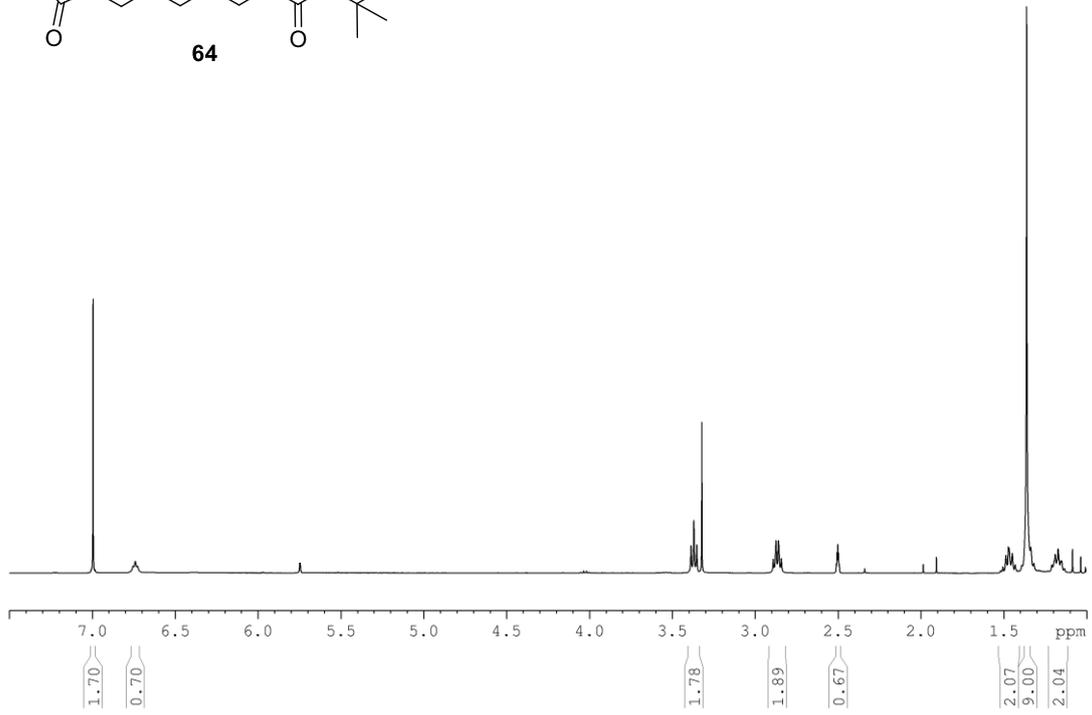
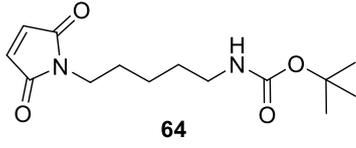


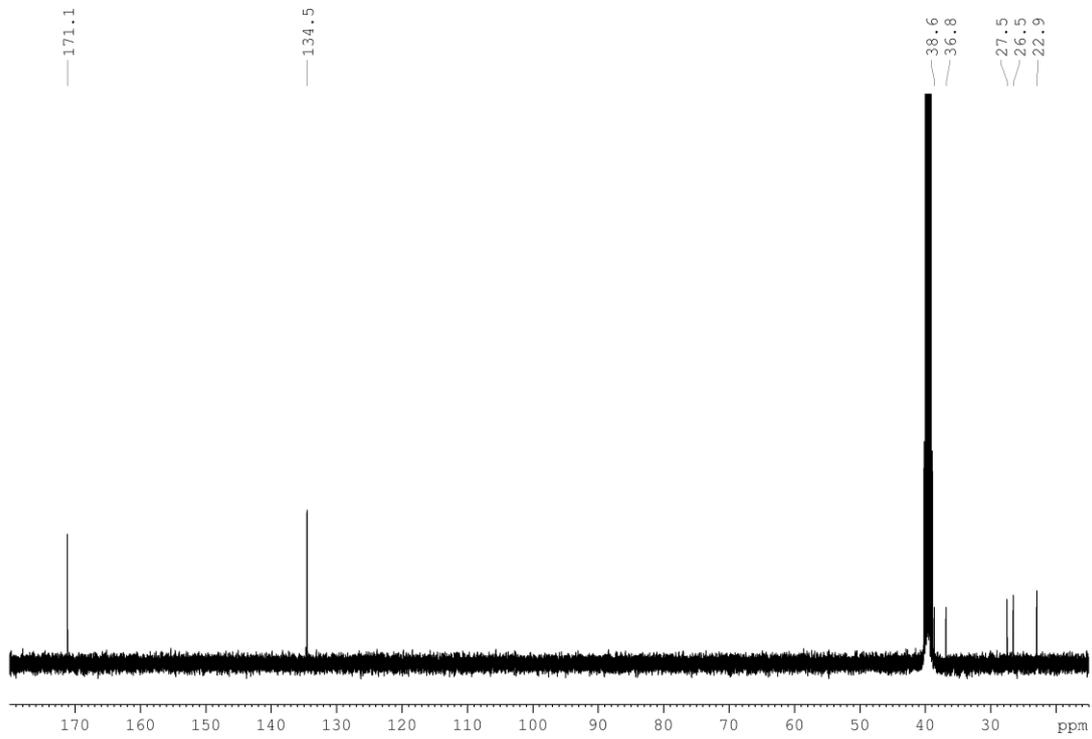
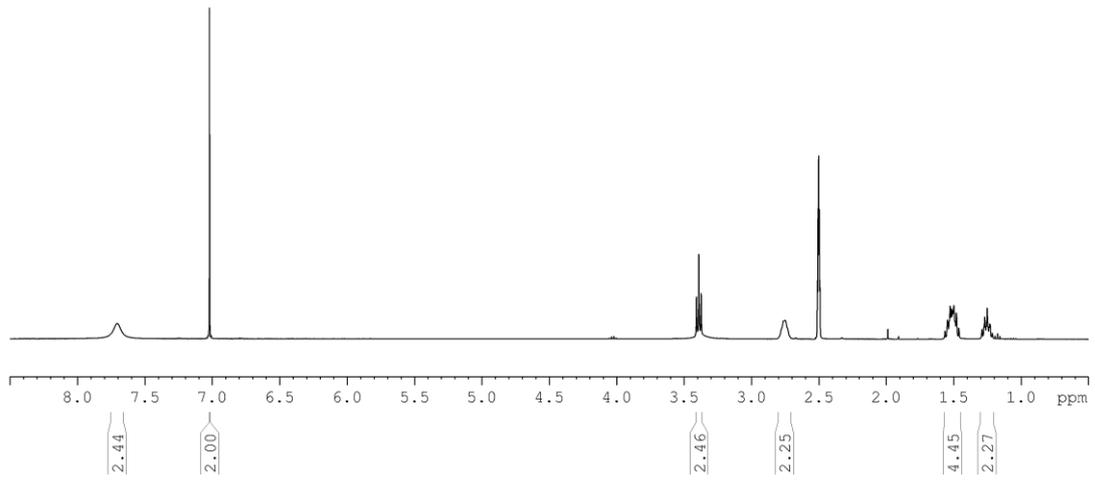
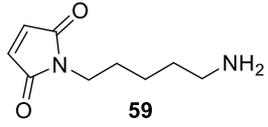


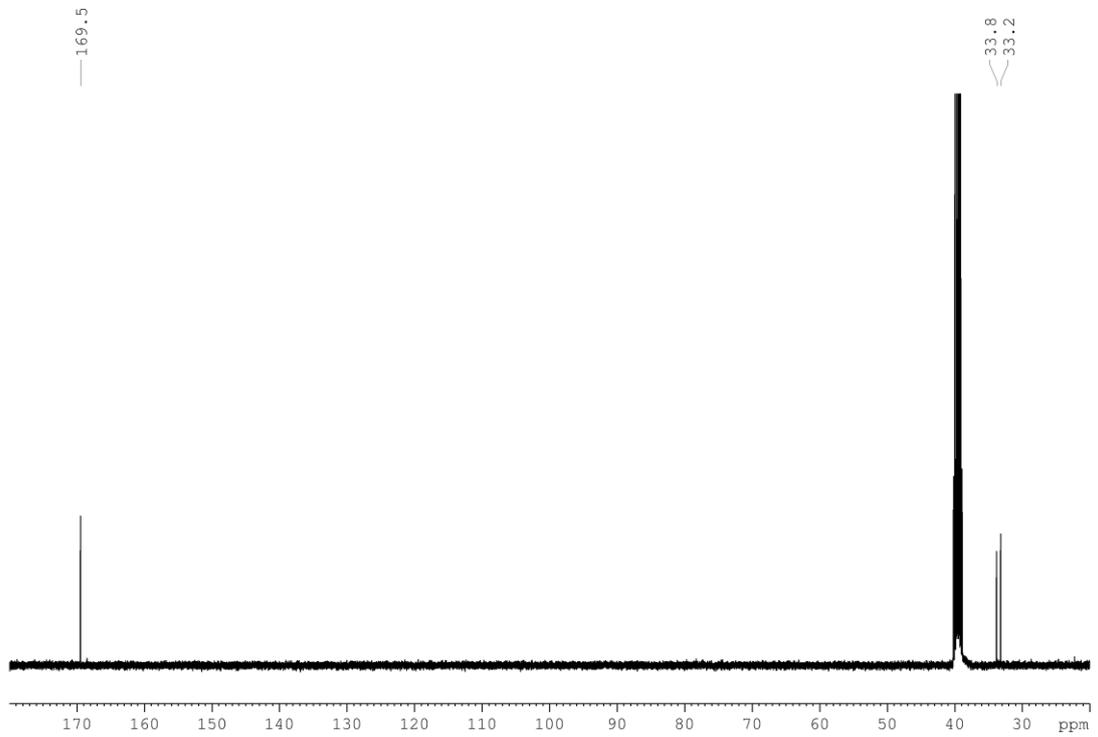
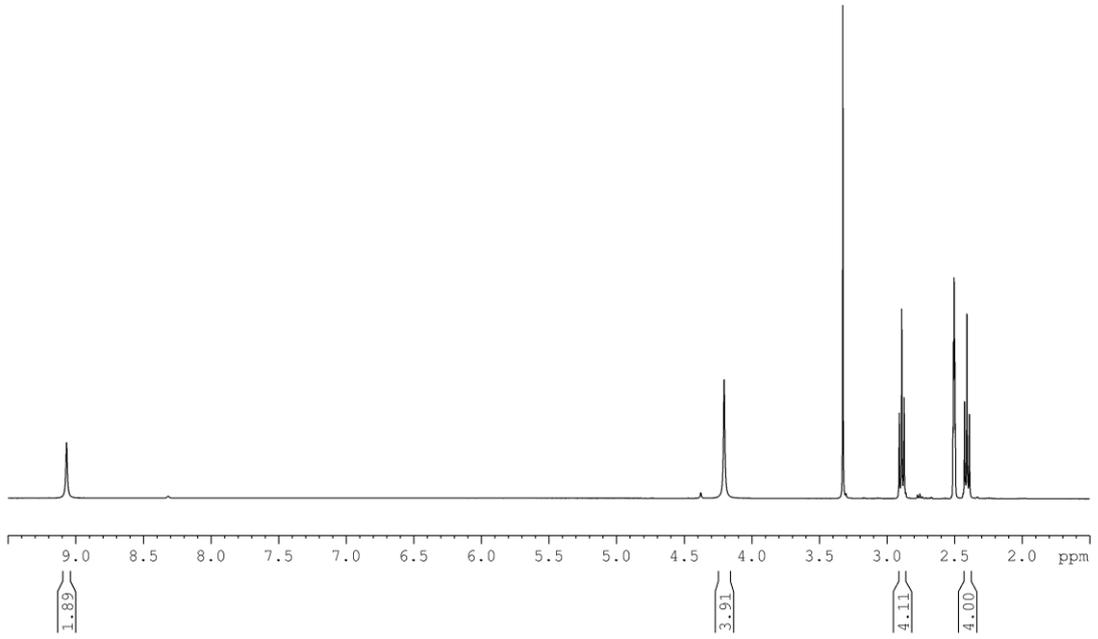
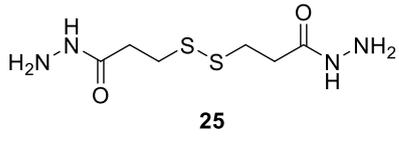


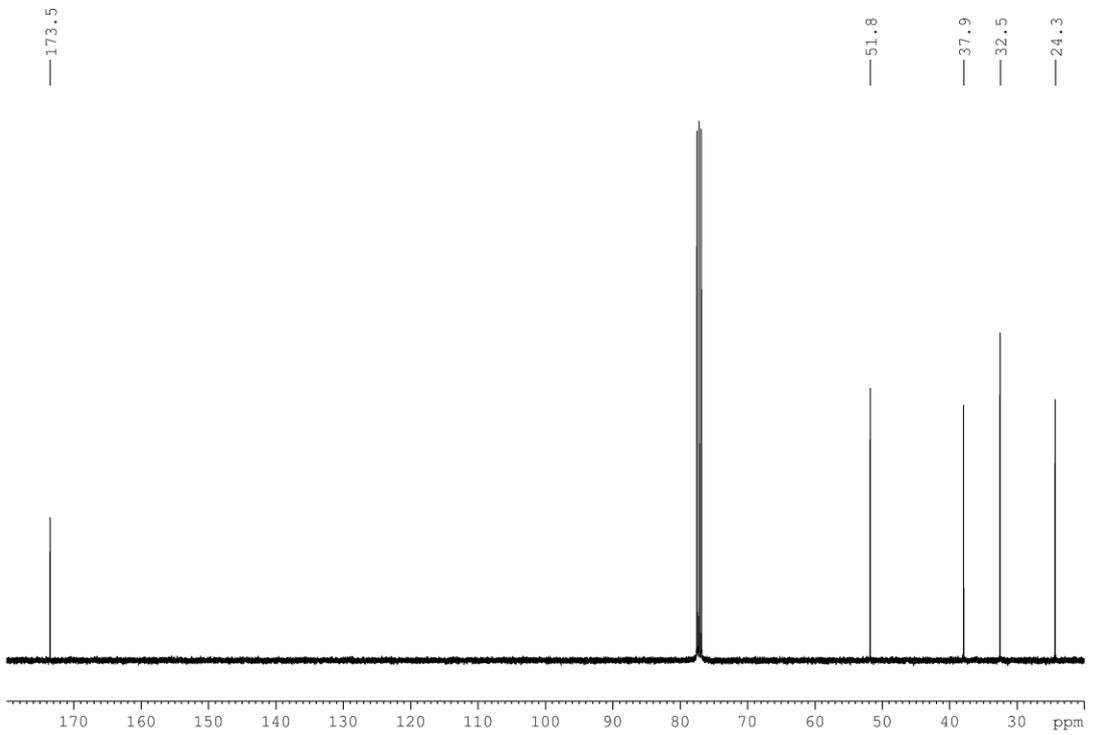
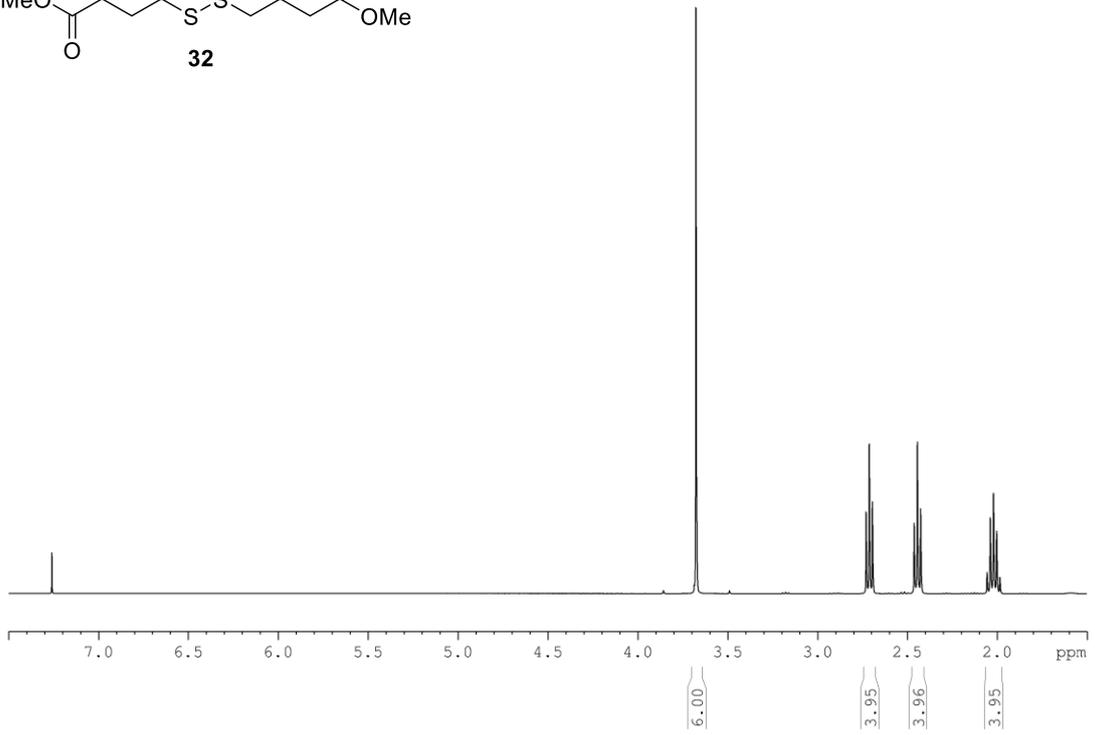
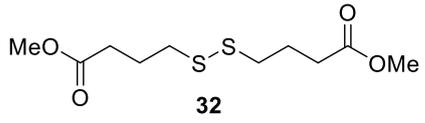


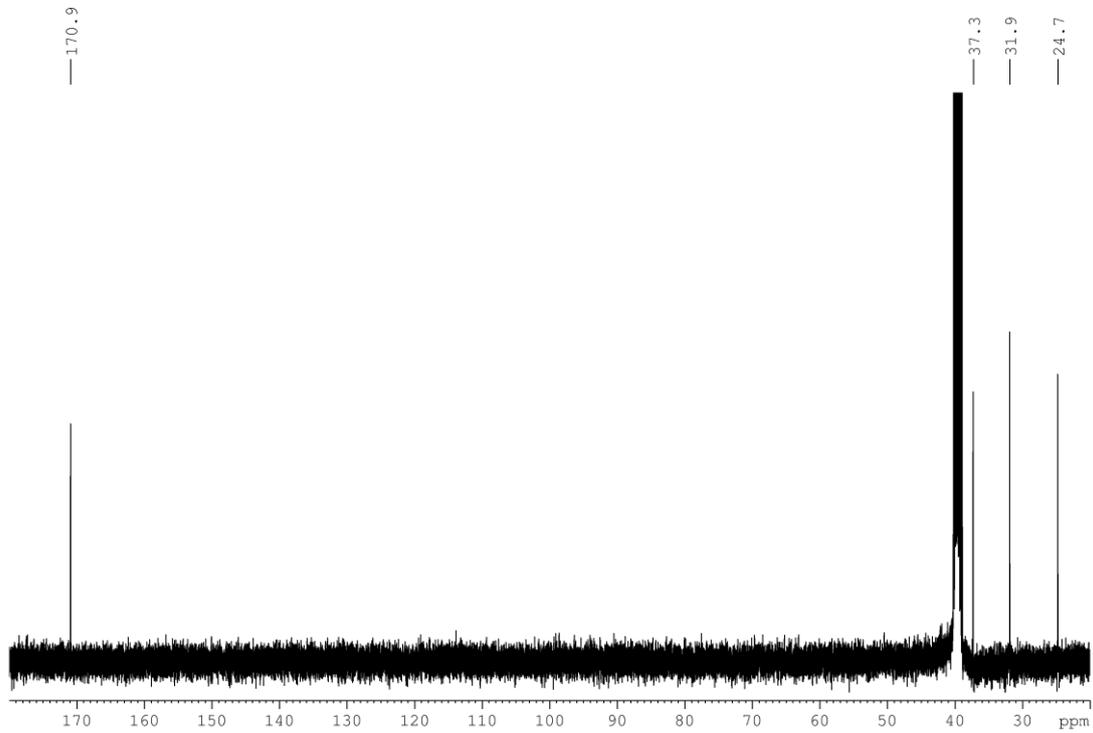
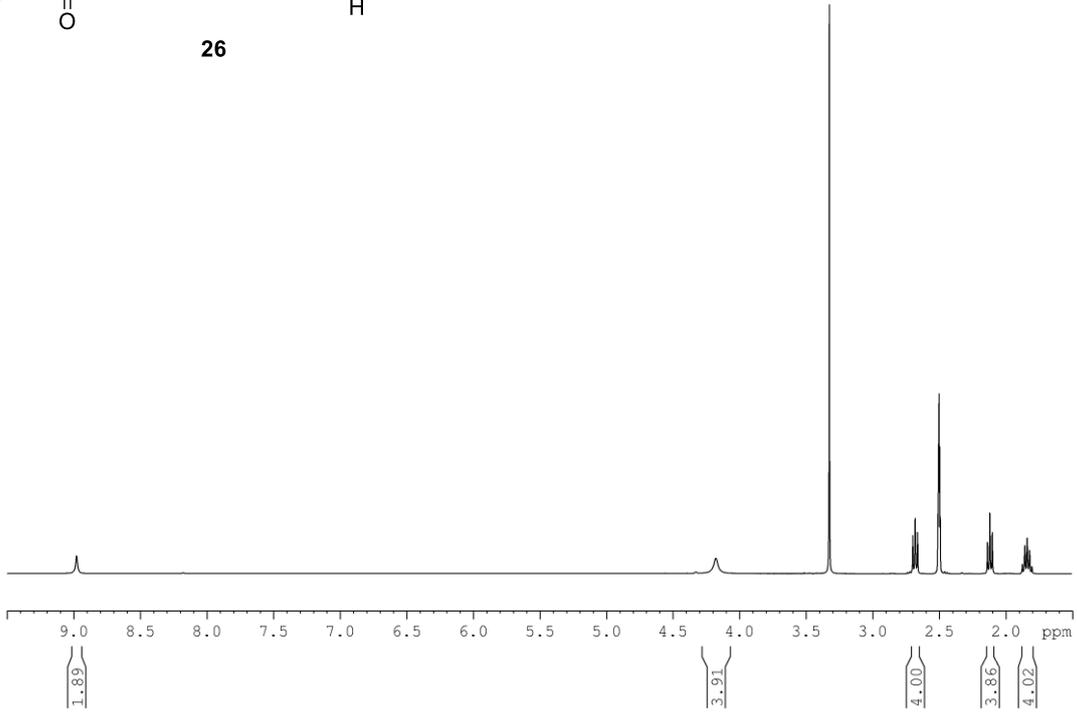
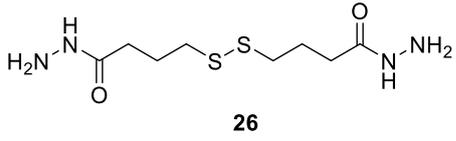












Danksagungen

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kirschning bedanken. Dafür, dass ich die Möglichkeit bekam, das vorliegende Thema während meiner Promotion selbstständig, mit allen Freiheiten und eigenen Ideen zu bearbeiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Marie Weinhart für die Übernahme des Korreferats sowie bei Prof. Dr. Franz Renz für die Übernahme des Drittprüfers.

Ein besonders großer Dank geht an Dr. Gerald Dräger. Dafür, dass du mir bei diesem Thema mit Rat und Tat zu Seite standst. Auch die gemeinsamen Gespräche außerhalb des wissenschaftlichen Kontextes habe ich sehr geschätzt.

Für die Möglichkeit, die biologischen Versuche eigenständig durchführen zu können, bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Thomas Thum des IMTTS der Medizinischen Hochschule Hannover. Ein großer Dank gilt hier Dr. Franziska Kenneweg für die Einarbeitung und Unterstützung in der Zellkultur, Elisa Mohr für die Hilfe beim Imaging sowie der gesamten Gruppe für die Unterstützung bei aufkommenden Fragen.

Für die Unterstützung der rheologischen Messungen danke ich Dr. Iliyana Pepelanova. Auch dafür, dass du mein Interesse für das Thema Hydrogele durch ein Praktikum während des Masterstudiums geweckt hast.

Bei Dr. Jörg Fohrer, Dr. Linn Müggenburg, Dr. Jörn Droste sowie Dagmar Körtje, Monika Rettstedt, Sabine Ohlrogge sowie Jens Müller bedanke ich mich für die NMR-Analytik.

Auch bei der Abteilung für Chemikalienbestellungen und Ausgabe möchte ich mich auf diesem Wege bedanken. Danke Mihail Astratov, Anne Schulz und Kevin Wiederholdt für die unkomplizierte und meist schnelle Beschaffung der Chemikalien.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Ines Roloff und Linda Hermanns für die Unterstützung bei Verwaltungsangelegenheiten sowie bei der Beschaffung von Büromaterialien.

Für das intensive Korrekturlesen danke ich Anastasia Stohwasser, Katharina Hempel, Lena Fraedrich sowie Prof. Dr. Marc Heidelmann.

Meinen Bacheloranden Jöran Heilmann und Christian Heintz sowie meinen Praktikantinnen Anastasia Stohwasser und Lena Fraedrich danke ich für die Unterstützung durch die Bearbeitung von Teilprojekten dieser Arbeit.

Dem Labor 028 mit allen (ehemaligen) Mitgliedern danke ich für das schöne Arbeitsklima. Dazu zählen: Dr. Therese Planke, Dr. Samhita Banerjee, Elisa Ospanow, Katharina Hempel, Anastasia Stohwasser und Lena Fraedrich.

Besonders danke ich Anastasia Stohwasser und Katharina Hempel für die schönen Stunden, Tage und Nächte besonders außerhalb des Instituts.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die angenehme Zeit während der Promotion. Die gemeinsame Mittagspause, die gemeinsamen Retreats nach Norderney und in die sächsische Schweiz sowie die Grillabende und Weihnachtsfeiern sorgten für einen guten Ausgleich zur wissenschaftlichen Arbeit.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie. Meinen Eltern Jutta und Ottmar danke ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion. Ihr standet immer hinter mir und meinen Entscheidungen, was mich zu dem gemacht hat, der ich heute bin. Mein letzter Dank geht an meinen Partner Volker. Auch du standest immer hinter mir und hast mir durch deine objektive Sichtweise auf die Dinge zur Fertigstellung dieser Arbeit geholfen.

Lebenslauf und Publikationsliste

Persönliche Daten

Name Pascal Lienig
Geburtstag /-ort 15.09.1989 in Hoya / Weser
Staatsangehörigkeit Deutsch

Akademischer Werdegang

Promotionsstudent seit 07/19
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Institut für organische Chemie in der Arbeits-
gruppe von Prof. Dr. Andreas Kirschning zum
Thema:
Entwicklung neuer Polysaccharid-basierter
Materialien für biomedizinische Anwendungen.

Masterstudium Wirk- und
Naturstoffchemie
10/16 – 05/19
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Master of Science Wirk- und Naturstoffchemie,
abschließende Masterarbeit bei Prof. Dr.
Andreas Kirschning zum Thema:
Entwicklung neuer „klickfähiger“
Polysaccharide für die Erzeugung
biomedizinisch relevanter Hydrogele.

Forschungsaufenthalt
10/17 – 03/18
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Forschungsprojekt in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Alcides José Monteiro da Silva zum
Thema:
Semisynthesis of Chalcones from Pinocembrin
and Hesperetin

Bachelorstudium Chemie
10/13 – 09/16
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Bachelor of Science Chemie, abschließende
Bachelorarbeit bei Prof. Dr. Markus Kalesse
zum Thema:
Untersuchungen zur Kiyooka-Aldol-Reaktion.

Abitur
06/09
Johann-Beckmann-Gymnasium Hoya

Ausbildung / berufliche Tätigkeit

Chemielaborant
06/13 – 09/16
Abbott Laboratories GmbH Hannover,
Pharmaceutical Development and API Process
Development, Chemielaborant in Teilzeit

Ausbildung zum Chemielaboranten
08/10 – 06/13
Abbott Laboratories GmbH in Kooperation mit
Solvay Fluor GmbH Hannover

Verschiedenes

Freiwilligendienst
04/10 – 06/10
Cruz Vermelha Brasileira (brasilianisches
Rotes Kreuz) und ONG Ressurgir, Rio de
Janeiro inklusive Intensivkurs Portugiesisch

Zivildienst
06/09 – 03/10
Pflege- und Therapieheim Gut Retzen

**Wissenschaftliche Beiträge und
Publikationen**

Publikation
07/23
3D-Printed Microfluidic Perfusion System for
Parallel Monitoring of Hydrogel-Embedded Cell
Cultures. Meyer KV, Winkler S, Lienig P, Dräger
G, Bahnemann J., Cells. 2023 Jul 9; 12(14):
1816. doi: 10.3390/cells12141816.

Vortrag auf der 8. EuChemS in Lissabon
09/22
Dextran, pullulan and lentinan, new scaffold
materials for use as hydrogels in tissue
engineering