

DOI: 10.1002/ange.200600357


Reaktive Polymere, die „klicken“***Himabindu Nandivada, Hsien-Yeh Chen,
Lidija Bondarenko und Jörg Lahann**

Weitere Fortschritte im Bereich bioaktiver Oberflächen erfordern neue Strategien für die robuste und spezifische Anbindung von biologischen Liganden.^[1] Wir haben eine mit Alkylgruppen substituierte, reaktive Polymerbeschichtung entwickelt, die durch Gasphasenabscheidung erzeugt wird. Derartige Reaktivbeschichtungen können auf Substraten abgeschieden und anschließend durch räumlich kontrollierte „Klickchemie“ oberflächenmodifiziert werden. Der Begriff „Klickchemie“ umfasst eine Gruppe von leistungsfähigen Reaktionen, die modular, weitreichend anwendbar und relativ unabhängig vom Lösungsmittel und pH-Wert sind und auf stereospezifische Weise hohe bis sehr hohe Ausbeuten liefern.^[2] Die am weitesten verbreitete Klickreaktion ist die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition von Aziden an terminale Alkine.^[3] Diese Verknüpfungsreaktion wurde bereits für Anwendungen in der Wirkstoffentwicklung^[4] und für die gezielte Entwicklung von Enzyminhibitoren genutzt.^[5,6] Ebenfalls beschrieben wurde die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden an alkinmodifizierte selbstorganisierte Monolagen (SAMs, self-assembled monolayers) als eine Methode zur kontrollierten Oberflächenfunktionalisierung.^[7-11]

Klickreaktionen sind bioorthogonal und hängen stark von der räumlichen Nähe und optimalen Orientierung der Reaktionspartner ab, was sie zu aussichtsreichen Methoden für die maßgeschneiderte Erzeugung von biologischen Grenzflächen macht.^[12] Da es jedoch an adäquaten Polymerbeschichtungen mangelt, die für die oberflächenspezifische Immobilisierung genutzt werden können, ist die Anwendung der 1,3-dipolaren Cycloaddition in diesem Bereich bislang stark begrenzt. Einige Reaktivbeschichtungen wurden durch Gasphasenabscheidung (CVD, chemical vapor deposition) substituierter [2.2]Paracyclophane hergestellt. Dabei wurden Poly(*p*-xylylene) mit unterschiedlichen funktionellen Grup-

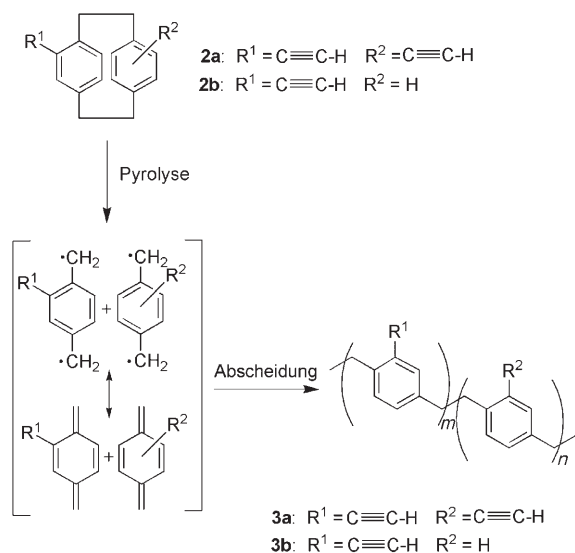
[*] H. Nandivada, H.-Y. Chen, Dr. L. Bondarenko, Prof. J. Lahann
Department of Chemical Engineering
University of Michigan
Ann Arbor, MI-48109 (USA)
Fax: (+1) 734-764-7453
E-mail: lahann@umich.edu

[**] J.L. dankt der National Science Foundation (NSF) für ein Career-Stipendium (DMR-0449462) und für Unterstützung im Rahmen des Major Research Instrumentation Program (DMR-0420785). Wir danken Prof. Larson (University of Michigan) für Zugang zum Fluoreszenzmikroskop und Prof. J. Kim (Materials Science and Engineering, University of Michigan) für Zugang zum Spektrofluorometer.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

pen, z. B. Amine,^[13,14] Ester,^[15–17] Aldehyde^[18] und Alkohole,^[19–21] synthetisiert und zur Immobilisierung von Biomolekülen genutzt.

Um dieses Prinzip weiterzuentwickeln, haben wir durch CVD-Polymerisation alkinmodifizierte Beschichtungen hergestellt (Schema 1). Wir konnten nachweisen, dass die erhaltenen Polymerfilme für räumlich kontrollierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloadditionen verwendet werden können.



Schema 1. Synthese von alkinfunktionalisierten Polymeren durch CVD von Diethynyl[2.2]paracyclophan (**2a**) und 4-Ethynyl[2.2]paracyclophan (**2b**).

Die Ausgangsverbindungen für die CVD – Diethynyl[2.2]paracyclophan (**2a**) und Ethynyl[2.2]paracyclophan (**2b**) – wurden aus kommerziell erhältlichem [2.2]Paracyclophan (**1**) nach einer von Hopf und Mitarbeitern entwickelten Methode hergestellt.^[22] Hierbei entstehen die pseudo-*ortho*- und pseudo-*meta*-Verbindungen als Hauptprodukte. In unserem Fall war es nicht erforderlich, diese für die nachfolgende CVD aufzutrennen.

Zunächst wurde versucht, das Dialkin **2a** zur Bildung von Poly(diethynyl-*p*-xylylen) (**3a**) abzuscheiden. Hierzu wurde **2a** bei Temperaturen zwischen 90 und 110 °C und einem reduzierten Druck von 0.5 mbar sublimiert, in die Pyrolysekammer überführt (650 °C) und dann in der Abscheidungskammer (15 °C) zum Polymer umgesetzt. Es wurde ein polymerartiger Film erhalten, der jedoch nicht die für Alkingruppen typische Infrarotbande bei 3200 cm⁻¹ zeigte, was auf das Fehlen der Alkingruppe schließen ließ. Außerdem wurden zahlreiche Nebenprodukte gebildet, die nicht weiter untersucht wurden, aber möglicherweise durch eine Alkin-Vinyliden-Umlagerung entstanden sein könnten.^[23] Unter veränderten CVD-Bedingungen (z. B. Pyrolysetemperaturen unter 550 °C) wurden zwar alkinfunktionalisierte Polymerfilme mit Schichtdicken von 50 nm erhalten (bei 50 mg der Vorstufe auf einem 4-Inch-Wafer), diese waren allerdings wenig reaktiv und relativ instabil bei thermischer Behandlung oder im Kontakt mit organischen Lösungsmitteln (siehe

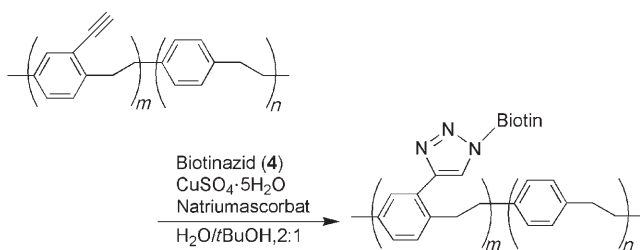
Hintergrundinformationen). Aus diesen Gründen wurden diese Filme nicht weiter untersucht.

Im weiteren Verlauf der Studie untersuchten wir die Abscheidung des einfach alkinsubstituierten Paracyclophans **2b**. Tatsächlich konnte das entsprechende Polymer, Poly(4-ethynyl-*p*-xylylen-*co-p*-xylylen) (**3b**), sogar unter typischen CVD-Bedingungen^[20] ohne nennenswerte Nebenreaktionen synthetisiert werden (Druck 0.5 mbar, Sublimations-, Pyrolyse- und Substrattemperaturen 90–110 °C, 680 °C bzw. 15 °C). Das FTIR-Spektrum von **3b** zeigt eine starke C-H-Bande der Alkingruppe bei 3286 cm⁻¹ und ein weiteres Signal bei 2100 cm⁻¹, das der C-C-Dreifachbindung zugeordnet werden kann. Die IR-spektroskopische Analyse wurde durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) bestätigt, die zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenzusammensetzung herangezogen wurde. Die Analyse ergab einen Gehalt von 1.3 % Sauerstoff, der von Verunreinigungen stammen könnte, die während der Polymerisation oder der Probenvorbereitung eingebracht wurden.

Das hochaufgelöste C1s-Spektrum von **3b** zeigt ein symmetrisches schmales Signal (Halbwertsbreite 1.13 eV) bei 285.6 eV, das charakteristisch für ausschließlich an C oder H gebundenen Kohlenstoff ist.^[24] Daneben tritt ein $\pi-\pi^*$ -Signal bei 291.7 eV auf, das typisch für aromatische π -Elektronen ist und für ähnliche Polymere bereits beschrieben wurde.^[19] Mit Ellipsometrie wurde die Schichtdicke von **3b** zu 91.81 ± 0.03 nm bestimmt (bei 50 mg der Vorstufe). Das Polymer ist stabil in wässrigen und organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Ethanol, Methanol und Chloroform. Ein Tesafilmtest^[18] ergab eine zufriedenstellende Oberflächenhaftung des Polymerfilms auf Glas, Poly(dimethylsiloxan) (PDMS), Silicium und Gold.

Bei der spektrofluorometrischen Analyse von **3b** beobachtet man ein charakteristisches Anregungssignal bei 380 nm und ein Emissionssignal bei 450 nm. Die Signale verschwanden, nachdem das Polymer drei Stunden auf 150 °C erhitzt wurde; möglicherweise trat eine Polymernetzung ein (Hintergrundinformationen). Um die thermische Stabilität zu testen, wurden die FTIR-Spektren nach Aufbewahrung des Polymers bei 20, 80, 150 und 250 °C verglichen. Die C-H-Bande bei 3283 cm⁻¹ wurde mit steigender Temperatur kleiner und verschwand im Fall der bei 250 °C aufbewahrten Probe vollständig (Hintergrundinformationen). Die Temperaturabhängigkeit bestätigt, dass das Polymer **3b** nur begrenzt thermisch stabil ist und vermutlich über die Alkingruppe vernetzt.

Um zu prüfen, ob sich Polymer **3b** für heterogene Klickreaktionen eignet, studierten wir sein Verhalten in Gegenwart von Aziden. Hierzu untersuchten wir die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition zwischen **3b** und Biotinazid (**4**) in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat und Natriumascorbat (Schema 2). Wie bereits für homogene Phasen beschrieben, liefert diese Kupplung ein Triazol.^[25] Natriumascorbat fungiert als Reduktionsmittel und erzeugt in situ Kupfer(I)-Ionen, die die eigentliche katalytische Spezies der Reaktion sind.^[25] Biotinazid (**4**) wurde als Modell-Ligand verwendet, weil Biotin einen sehr stabilen nichtkovalenten Komplex mit Streptavidin bildet (das seinerseits häufig zur Anbindung von biotinylierten Biomolekülen verwendet wurde).^[15]



Schema 2. 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition von Biotinazid (4) mit Polymer 3b.

Zur räumlich kontrollierten Anbindung des Biotinliganden wurde das Mikrodruckverfahren (μ CP) eingesetzt. Hierbei war es wichtig, das Kupfersalz und das Reduktionsmittel unabhängig voneinander zu verwenden. Deshalb wurden das Azid und das Ascorbat zunächst auf dem Polymerfilm adsorbiert und mit Stickstoff getrocknet, anschließend wurde das Kupfersalz über 12 bis 18 Stunden aufgedruckt (Abbildung 1). Danach wurde die Probe gewaschen und mit Rhodamin-modifiziertem Streptavidin umgesetzt. Fluoreszenzbilder der Oberflächenstruktur (Abbildungen 2a,c) belegen die räumlich kontrollierte Bindung von 4 an 3b. Daher kann geschlossen werden, dass die Alkylgruppen des Polymers mit den Azidgruppen reagierten und somit

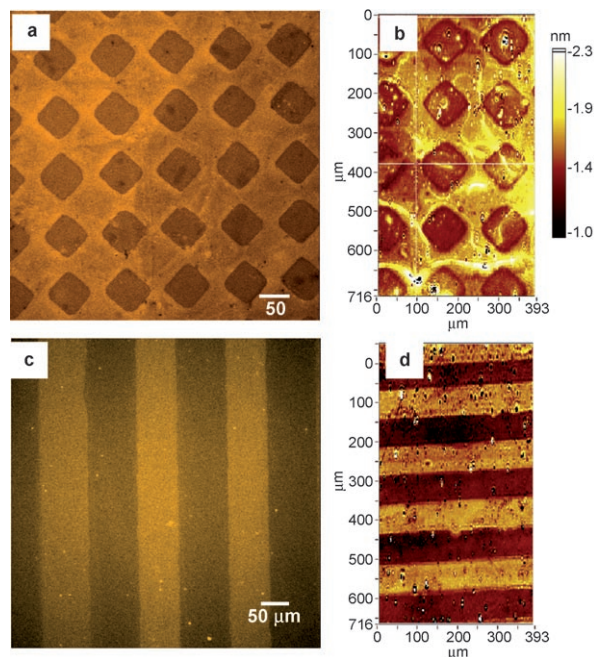


Abbildung 2. a,c) Fluoreszenzbilder, die die Immobilisierung von TRITC-Streptavidin an Biotinazid belegen; b,d) Ellipsometriebilder zur Bestimmung der Schichtdicken. TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat, PDMS = Poly(dimethylsiloxan).

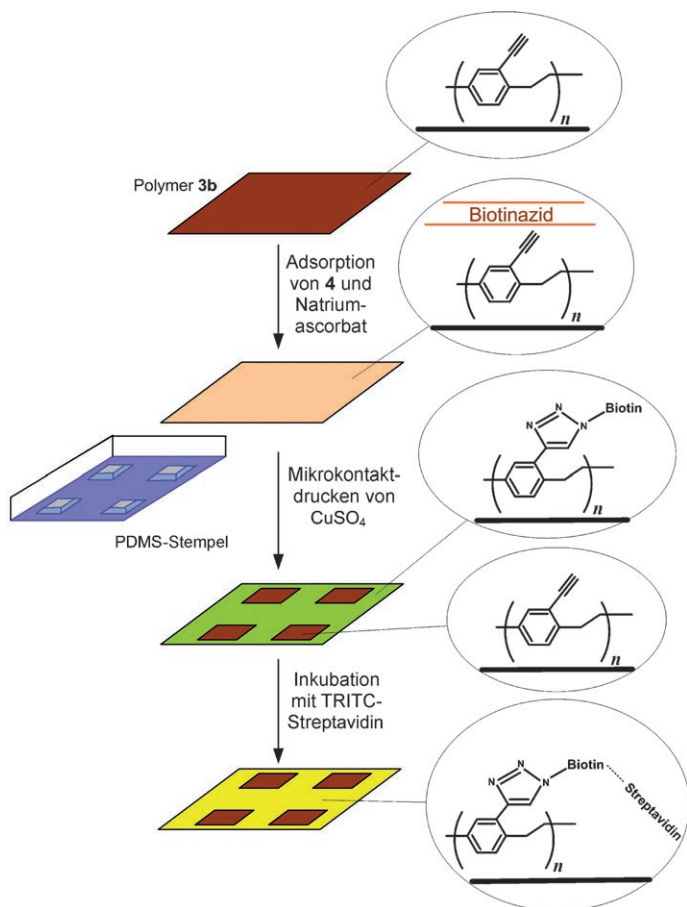


Abbildung 1. Immobilisierung des Biotinazid-Liganden auf dem Reaktivpolymerfilm 3b und anschließendes Mikrokontaktdrucken des Cu^{I} -Katalysators.

als Ankergruppen zur Immobilisierung von Biomolekülen fungieren. Gegenüber einer gleichzeitigen Immobilisierung aller Reaktionspartner erwies sich das zweistufige Verfahren aus Adsorption und μ CP als die bessere Methode.

Um die Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurden Ellipsometriebilder aufgenommen (Abbildung 2b,d). Zwischen den Biotin-modifizierten und den nichtmodifizierten Oberflächenbereichen wurden nach Inkubation mit Streptavidin Schichtdickenunterschiede zwischen 1 und 2 nm beobachtet, was der ungefähren Dicke einer Proteinmonolage entspricht.^[26]

Das alkyne-funktionalisierte Polymer 3b ist in der 1,3-dipolaren Huisgen-Cycloaddition mit Aziden bemerkenswert reaktiv. Es zeigt eine ausgezeichnete Oberflächenhaftung und gute Stabilität bei erhöhten Temperaturen und in Lösungsmitteln. Weitere Arbeiten sind nötig, um den Mechanismus der CVD genauer aufzuklären und zu untersuchen, ob die hier beschriebene Methode auch bei anderen Cycloadditionen eingesetzt werden kann. Die gezielte Herstellung von bioaktiven strukturierten Oberflächen ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuartiger Biomaterialien und Biogrenzflächen. Darüber hinaus könnten die hier beschriebenen Reaktivbeschichtungen Anwendung in der Diagnostik (Mikroarrays), Biosensorik und Biomedizintechnik finden.

Experimentelles

CVD: 2a (50 mg) wurde bei 90–110°C und 0,5 mbar sublimiert und mit einem Argongasfluss (20 sccm) in die Pyrolysekammer gespült. Nach Pyrolyse (bei unterschiedlichen Temperaturen T_{Pyr}) wurden die

Polymerfilme bei 15°C abgeschieden. $T_{\text{Pyr}} = 650^\circ\text{C}$: IR (Glanzwinkel 85°): $\tilde{\nu} = 837, 1039, 1150, 1439, 1505, 1624, 1694, 1910, 2916, 3010, 3048\text{ cm}^{-1}$. XPS-Signale (%) (bezogen auf aliphatisches C mit 285.0 eV): C 96.9, O 3.1. $T_{\text{Pyr}} = 550^\circ\text{C}$: IR (Glanzwinkel 85°): $\tilde{\nu} = 839.35, 877, 922, 1036, 1261, 1439, 1623, 1913, 2100, 2848, 2921, 3013, 3052, 3285\text{ cm}^{-1}$. XPS-Signale (%) (bezogen auf aliphatisches C mit 285.0 eV): C 93.7, O 6.3. **2b**: CVD wie oben; $T_{\text{Pyr}} = 680^\circ\text{C}$. IR (Glanzwinkel 85°): $\tilde{\nu} = 833, 894, 1158, 1251, 1411, 1454, 1493, 1513, 1605, 1699, 1900, 2102, 2859, 2926, 3015, 3286\text{ cm}^{-1}$; XPS-Signale (%) (bezogen auf aliphatisches C mit 285.0 eV): C 98.7, O 1.3; XPS-Signale (%): 285.6 eV (C1s); 291.7 eV ($\pi-\pi^*$).

Oberflächenanalyse: IR-Spektroskopie: Nicolet 6700; XPS-Elementaranalyse: Photoelektronenspektrometer Axis Ultra X-ray (Kratos Analyticals, Großbritannien) mit $\text{Al}_{\text{K}\alpha}$ -Röntgenquelle; Schichtdickenbestimmung: EP³-SW-Ellipsometer (Nanofilm AG, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 532 nm. Die Vierzonen-Nulling- und Mapping-Experimente wurden bei einem Einfallswinkel von 65° durchgeführt. Die Messpunkte wurde mithilfe eines anisotropen Cauchy-Modells analysiert. Für das Mapping wurden die Daten mit einem Scanner mit einer lateralen Auflösung von 1 μm und einem Bildfeld von 100 \times 500 μm aufgenommen.

Mikrostrukturierung des Polymerfilms **3b**: Die Druckvorlagen wurden nach Literaturangaben strukturiert.^[14] Eine Lösung von **4** (Photoprobe Biotin, Vector Labs, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und Natriumascorbat (1 mM) in Wasser/*tert*-Butylalkohol (2:1) wurde als dünne Schicht auf dem Polymerfilm **3b** aufgebracht. Nach Trocknung (N_2 -Strom) wurde eine CuSO_4 -Lösung mithilfe eines PDMS-Stempels, der 20 min mit einem UV/Ozon-Reiniger behandelt worden war (Jelight), über 12–18 h auf die Oberfläche gedruckt.^[27] Anschließend wurden die strukturierten Oberflächen 1 h mit Rhodamin-modifiziertem Streptavidin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in wässrigem PBS-Puffer mit 0.02% (v/v) Tween 20 und 0.1% (w/v) Rinderserumalbumin) inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Fluoreszenzbilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (Nikon TE200).

Eingegangen am 26. Januar 2006

Online veröffentlicht am 19. April 2006

Stichwörter: Alkine · Gasphasenabscheidung · Immobilisierung · Klickchemie · Reaktivbeschichtung

- [10] T. Lummerstorfer, H. Hoffmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3963–3966.
- [11] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52–57.
- [12] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [13] J. Lahann, I. S. Choi, J. Lee, K. Jensen, R. Langer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3273–3276; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3166–3169.
- [14] J. Lahann, H. Höcker, R. Langer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 746–749; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 726–728.
- [15] J. Lahann, D. Klee, H. Höcker, *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 441–444.
- [16] J. Lahann, M. Balcells, T. Rodon, J. Lee, I. S. Choi, K. F. Jensen, R. Langer, *Langmuir* **2002**, *18*, 3632–3638.
- [17] J. Lahann, M. Balcells, H. Lu, T. Rodon, K. F. Jensen, R. Langer, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2117–2122.
- [18] H. Nandivada, H.-Y. Chen, J. Lahann, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1794–1799.
- [19] J. Lahann, R. Langer, *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 968–971.
- [20] J. Lahann, R. Langer, *Macromolecules* **2002**, *35*, 11, 4380–4386.
- [21] K. Schürmann, J. Lahann, J. Meyer, H. Klosterhalfen, D. Vorwerk, D. Klee, R. W. Günther, *Radiology* **2004**, *230*, 151–162.
- [22] L. Bondarenko, I. Dix, H. Hinrichs, H. Hopf, *Synthesis* **2004**, 2751–2759.
- [23] J. J. Gajewski, *Hydrocarbon Thermal Isomerizations*, Elsevier, San Diego, **2004**, S. 13–15.
- [24] G. Polzonetti, A. M. Ciancusi, A. Furlani, M. V. Russo, *Synth. Met.* **1989**, *28*, D413–D417.
- [25] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [26] J. Voros, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 553–561.
- [27] K. L. Yang, K. Cadwell, N. L. Abbott, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1819–1823.

[1] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487–492.

[2] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; b) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.

[3] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Hrsg.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, S. 1–176.

[4] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.

[5] R. Manetsch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12809–12818.

[6] a) W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1095–1099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053–1057; b) A. Dantas de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Köhn, H. Schröder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 302–307; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296–301.

[7] J. P. Collman, N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **2004**, *20*, 1051–1053.

[8] N. K. Devaraj, G. P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J. P. Collman, E. T. Kool, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8600–8601.

[9] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi, *Langmuir* **2004**, *20*, 3844–3847.