



## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2014 104 735.4**(22) Anmeldetag: **03.04.2014**(43) Offenlegungstag: **08.10.2015**(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **10.03.2016**(51) Int Cl.: **C07B 37/10 (2006.01)****C07D 493/04 (2006.01)****C07C 231/00 (2006.01)****C03C 17/30 (2006.01)****C07D 487/04 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden  
e.V., 01069 Dresden, DE; Technische Universität  
Dresden, 01069 Dresden, DE**

(74) Vertreter:

**Sperling, Fischer & Heyner Patentanwälte, 01277  
Dresden, DE**

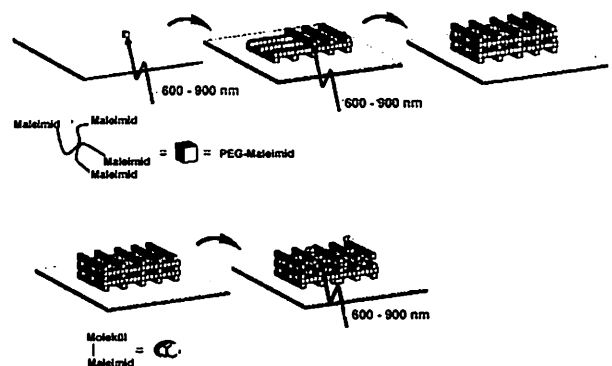
(72) Erfinder:

**Schlierf, Michael, Dr. rer. nat., 01326 Dresden,  
DE; Jungnickel, Christiane, Dipl.-Phys., 01099  
Dresden, DE; Tsurkan, Mikhail, Dr., 01217  
Dresden, DE; Werner, Carsten, Prof. Dr.rer.nat.,  
01069 Dresden, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

**WO 2010/ 014 820 A2**(54) Bezeichnung: **Verfahren zur lichtgesteuerten Erzeugung von kovalenten Konjugaten**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur lichtgesteuerten Erzeugung von kovalenten Konjugaten zwischen jeweils zwei Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur durch eine lichtgesteuerte Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, zur kovalenten Verbindung zwischen zwei gleichen oder unterschiedlichen funktionellen Gruppen, ausgewählt aus den funktionellen Gruppen von Maleimid-Derivaten und/oder deren 2- und/oder 3-substituierten Derivaten, wobei die Derivatmoleküle als die mit den genannten funktionellen Gruppen ausgestatteten zu verbindenden Moleküle gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur jeweils eine oder mehrere funktionelle Gruppen aufweisen, und als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle bilden, bioaktive Moleküle, insbesondere Moleküle von Peptiden, Proteinen, Nucleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren, und/oder synthetische Polymere und/oder Moleküle von niedrigem Molekulargewicht, insbesondere Wirkstoffmoleküle, und/oder Farbstoffmoleküle, insbesondere Fluorophore, oder Derivatmoleküle, die neben den für die Additionsreaktion notwendigen funktionellen Gruppen Farbstoffgruppen, insbesondere fluorophore Gruppen, enthalten, und/oder Moleküle von Biotin und/oder von Biotin-Analoga und/oder Molekülen einer Substratoberfläche, insbesondere von Glas, eingesetzt werden, dadurch gekennzeichnet, dass die Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, als eine Zwei-Photonen-Reaktion bei einer Wellenlänge im Bereich von  $\lambda = 600$  bis  $900$  nm stattfindet.



**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur lichtgesteuerten Erzeugung von kovalenten Konjugaten zwischen jeweils zwei Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur durch eine lichtgesteuerte Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition. Die vorgeschlagenen Bedingungen für die Reaktion der Konjugatbildung ermöglichen die Anwendung des Verfahrens für die räumlich und zeitlich gesteuerte Erzeugung von Materialien sowie eine in situ Konjugation in lebender Materie, zum Beispiel Gewebe. Das Verfahren kann bei der zweidimensionalen und dreidimensionalen Strukturierung, der Manipulation und der Funktionalisierung angewendet werden.

**[0002]** Der Nutzen der Material- und Polymerwissenschaft für biologische und medizinische Anwendungen liegt üblicherweise in der Möglichkeit, verschiedene biologische Aktivitäten zu implementieren, was normalerweise durch kovalente oder nicht-kovalente Konjugation an den Materialien oder Polymermatrizen erreicht wird (Nature biotechnology 2005 (23) 47 bis 55). Unter verschiedenen vorgeschlagenen Techniken ist die Click-Chemie der vielversprechendste Ansatz für die Schaffung von kovalenten Konjugaten, während die Peptid-Dimerisierung und die Ligand-Protein-Wechselwirkung für die nicht-kovalente Konjugation eingesetzt werden (Chem. Rev., 2013, 113 (7), 4905–4979). Obwohl die Effizienz einer solchen chemischen Reaktion sehr hoch ist, fehlt deren Chemie eine starke räumliche und zeitliche Kontrolle über die Konjugation der bioaktiven Komponenten, da die Reaktion innerhalb des gesamten Volumens der Reaktionsmischung auftritt.

**[0003]** Als Alternative bietet sich eine lichtgesteuerte Reaktion an. Eine lichtgesteuerte Reaktion ermöglicht eine Konjugation im Bereich der Belichtung und im Fall eines Zwei-Photonen-Prozesses eine Konjugation nur im Belichtungsfokus. Die Vorteile der Anwendung einer solchen lichtgesteuerten Zwei-Photonen-Reaktion für die räumliche Material-Konjugation oder Material-Strukturierung konnte am Beispiel des lichtgesteuerten Materialabbaus und des lichtgesteuerten Entfernens von Schutzgruppen gezeigt werden. Wie in den Druckschriften Nature Materials, 2011, 799–806 und Nature Chemistry 2011 (12) 925–31 beschrieben, ermöglicht der lichtinduzierte Abbau die Strukturierung einer Hydrogel-Matrix, während der orthogonale Ansatz die lichtinduzierte Freisetzung von Biomolekülen und damit die Modulation der Zelnsiedlung und -orientierung ermöglicht. Der vorgeschlagene Ansatz ist eine einfache Methode, um verschiedene Matrix-Strukturen mit definierten biochemischen Funktionalisierungen zu erzeugen, die beispielsweise die Schaffung verschiedener lokal sehr definierter Umgebungen ermöglicht, um Zellwachstum und -differenzierung zu lenken (Nature, 2012,

(482) 477–8; Nature Materials 2013, 13 Oktober, 1–6). Jedoch wird hierbei die Strukturierung und Funktionalisierung durch das Entfernen von bereits erzeugtem Material und durch das Einführen von biologischen Aktivitäten mittels Entfernen von Schutzgruppen erreicht. Die lichtgesteuerte Synthese wäre eine vielversprechende Alternative zum lichtgesteuerten Materialabbau und lichtgesteuerten Entfernen von Schutzgruppen, weil die Synthese sowohl für die Erzeugung als auch für die Funktionalisierung des Materials zu jeder Zeit und in jeder Position genutzt werden kann. Die Photopolymerisation ist eine häufig verwendete Technik mit einer starken zeitlichen Kontrolle, wie unter anderem in der Druckschrift Polymer 48 (2007) 5599–5611 berichtet wird. Die Photopolymerisation erfordert aber in der Regel toxische Fotoinitiatoren und findet innerhalb des gesamten Volumens des Reaktionsgemisches mittels eines Radikalmechanismus statt, was ihre räumliche Kontrolle erheblich erschwert. Bis jetzt sind vor allem Fotolacke wie zum Beispiel Femtobond und Omocer verwendet worden, um dreidimensionale Nanostrukturen durch eine mit einem Fotoinitiator gesteuerte Polymerisationsreaktion zu erzeugen. Auch wenn die Produkte eines solchen Verfahrens biokompatibel sind, wie in der Druckschrift Adv. Mater. 2011 (23) 1341–1345 beschrieben, umfasst der Entwicklungsprozess mehrere nicht-biokompatible Schritte wie Vor- und Nachbacken bei hohen Temperaturen, eine übermäßige Behandlung mit Lösungsmitteln wie Isopropanol und dem Zusatz von toxischen Fotoinitiatoren, wie aus der Druckschrift Adv. Funkt. Mater. 2013 (42), 6117–6122 hervorgeht. Die Anwesenheit von Fotoinitiatoren kann auch die nachfolgende Fluoreszenzmikroskopie erschweren. Darüber hinaus benötigen einige der häufig verwendeten Fotolacke eine Titan-Schicht, um Biokompatibilität zu erlangen, wie aus der Druckschrift Laser Appl. 2012 (24), 042011 bekannt ist. Deshalb war die Anwendung von lichtgesteuerten Strukturierungsverfahren in Gegenwart von lebenden Zellen und Geweben bisher kaum möglich.

**[0004]** Die zugrunde liegende Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens, welches es ermöglicht, zeitlich und räumlich gesteuert, auch in Gegenwart eines biologischen Systems und unter physiologischen Bedingungen, Materialien durch Konjugationsreaktionen zu erzeugen und gegebenenfalls zu verändern, ohne das biologische System zu beeinträchtigen.

**[0005]** Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Dieses ist ein Verfahren zur lichtgesteuerten Erzeugung von kovalenten Konjugaten zwischen jeweils zwei Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur. Die Erzeugung der Konjugate erfolgt durch eine lichtgesteuerte Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, zur kovalenten Verbindung zwischen zwei gleichen oder un-

terschiedlichen funktionellen Gruppen. Dabei sind die funktionellen Gruppen ausgewählt aus den funktionellen Gruppen von Maleimid-Derivaten und/oder deren 2- und/oder 3-substituierten Derivaten, wobei die Derivatmoleküle jeweils eine oder mehrere funktionelle Gruppen aufweisen. Mit dem Begriff Derivatmoleküle werden im Rahmen dieser Erfindung die mit den genannten funktionellen Gruppen ausgestatteten, zu verbindenden Moleküle gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur bezeichnet. Als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle bilden, werden bioaktive Moleküle, insbesondere Moleküle von Peptiden Proteinen, Nukleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren, und/oder synthetische Polymere und/oder Moleküle von niedrigem Molekulargewicht, insbesondere Wirkstoffmoleküle, und/oder Farbstoffmoleküle, insbesondere Fluorophore, oder Derivatmoleküle, die neben den für die Additionsreaktion notwendigen funktionellen Gruppen Farbstoffgruppen, insbesondere fluorophore Gruppen enthalten, und/oder Moleküle von Biotin und/oder Biotin-Analoga und/oder Molekülen einer Substratoberfläche, insbesondere von Glas, eingesetzt. Erfindungsgemäß findet die Additionsreaktion als eine Zwei-Photonen-Reaktion bei einer Wellenlänge im Bereich von  $\lambda = 600$  bis  $900$  nm, vorzugsweise bei  $\lambda = 800$  nm, statt.

**[0006]** Die Konzeption der vorliegenden Erfindung besteht in der räumlich und zeitlich gesteuerten Erzeugung einer starken kovalenten Bindung zwischen zwei Molekülen, die auch unter schonenden physiologischen Bedingungen durchführbar ist. Die lichtgesteuerte Additionsreaktion ist vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, die normalerweise in einer Ein-Photonen-Reaktion in einem Wellenlängenbereich von  $\lambda = 280$  bis  $330$  nm stattfinden würde. Vorliegend wurde aber ein Zwei-Photonen-Prozess mit Wellenlängen im Bereich von  $\lambda = 600$  bis  $900$  nm entwickelt, um diese Reaktion durchführen zu können. Die Vorteile der Anwendung des Zwei-Photonen-Prozesses für eine Cycloadditionsreaktion gegenüber einer Ein-Photonen-Reaktion bestehen darin, dass der Wellenlängenbereich nicht mit Biopolymeren interferiert und damit die Reaktionen in der Gegenwart von lebenden Zellen und Gewebestrukturen durchgeführt werden können. Zusätzlich können mittels eines Zwei-Photonen-Prozesses räumlich und zeitlich gezielter Strukturen von Konjugaten, einschließlich zwei- und dreidimensionale Konjugatstrukturen, geschaffen sowie Oberflächen und Strukturen zweidimensional und dreidimensional funktionalisiert und verändert werden.

**[0007]** Als Moleküle gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle bilden, sind gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung bioaktive Moleküle vorgesehen. Dies können unter

anderem Moleküle von Proteinen und Peptiden, insbesondere von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Antikörpern oder eines Proteins der Extrazellulären Matrix (ECM), sein. Des Weiteren können dies auch Moleküle von Nukleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren sein.

**[0008]** Als Moleküle gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle bilden, können aber auch synthetische Polymere, zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), eingesetzt werden. Dabei können auch synthetische Polymere verwendet werden, die mit den oben genannten bioaktiven Molekülen konjugiert sind, das heißt sowohl bioaktive Moleküle als auch die für den Zwei-Photonen-Prozess notwendigen funktionellen Gruppen enthalten.

**[0009]** In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung können als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle für die Konjugation bilden, Moleküle von niedrigem Molekulargewicht, insbesondere Wirkstoffmoleküle, eingesetzt werden.

**[0010]** Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung können als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen Derivatmoleküle für die Konjugation bilden, Farbstoffmoleküle, insbesondere von Fluorophoren, verwendet werden. Alternativ können andere Derivatmoleküle neben den für die Additionsreaktion notwendigen funktionellen Gruppen Farbstoffgruppen, insbesondere fluorophore Gruppen, enthalten. Die Verwendung von Farbstoffmolekülen bzw. Farbstoffgruppen ermöglicht zum Beispiel eine Visualisierung einer zwei- oder dreidimensionalen Konjugatstruktur.

**[0011]** Des Weiteren können als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen Derivatmoleküle für die Konjugation bilden, Moleküle von Biotin und/oder von Biotin-Analoga eingesetzt werden. Diese ermöglichen die nicht-kovalente Wechselwirkung mit Biotin bindenden Proteinen, beispielsweise Avidin.

**[0012]** Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht damit sowohl den Aufbau einer zwei- oder dreidimensionalen Struktur als auch den schrittweisen Aufbau von Schichtebenen aus Konjugaten aus Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur.

**[0013]** Zusammenfassend lassen sich die wesentlichen Vorteile der Anwendung des erfindungsgemäßen Zwei-Photonen-Prozesses folgendermaßen beschreiben:

- Durch das Verfahren besteht die Möglichkeit, nicht nur zweidimensional, sondern auch dreidimensional zu strukturieren, zu manipulieren und zu funktionalisieren.
- Die räumliche Auflösung ist aufgrund eines verringerten Reaktionsvolumens im Fokus des Laserstrahls wesentlich erhöht.
- Die erhöhte Wellenlänge für den Zwei-Photonen-Prozess gegenüber dem Ein-Photonen-Prozess führt zu einer erhöhten Eindringtiefe und zu einer verminderten Toxizität für Biomaterial aufgrund des reduzierten Absorptionskoeffizienten gegenüber nahem UV-Licht.

**[0014]** Vorteilhaft ist die Anwendung des Verfahrens für den schrittweisen Aufbau einer zweidimensionalen oder dreidimensionalen Konjugatstruktur. Die dreidimensionale Konjugatstruktur kann zum Beispiel eine harte, plastische oder Hydrogel-Struktur sein. Diese enthält vorzugsweise freie funktionelle Gruppen, wodurch eine weitere Zwei-Photonen-gesteuerte Additionsreaktion, zum Beispiel eine 2-2-Cycloaddition, an diesen Gruppen möglich ist, was eine post-in-situ-Modifikation bzw. Funktionalisierung mit anderen Molekülen ermöglicht, zum Beispiel Fluorophoren, Proteinen, Signalmolekülen.

**[0015]** Als dreidimensionale Konjugatstruktur ist durch das Verfahren auch eine kovalent verbundene Mehrschichtstruktur erhältlich, die schrittweise durch die Zugabe von bioaktiven Molekülen, insbesondere Molekülen von Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren, die die für die Zwei-Photonen-gesteuerte Additionsreaktion, wie zum Beispiel eine 2-2-Cycloaddition, erforderlichen funktionellen Gruppen aufweisen, erzeugt wird. Dabei sind die jeweiligen Moleküle zweier miteinander verbundener Schichten entweder gleicher oder wechselnder chemischer Natur.

**[0016]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch für die Beschichtung oder Modifikation von zweidimensionalen und dreidimensionalen Oberflächen anwendbar, die mit den für die Zwei-Photonen-gesteuerte Additionsreaktion, beispielsweise eine 2-2-Cycloaddition, notwendigen funktionellen Gruppen, ausgewählt aus den funktionellen Gruppen von Maleimid-Derivaten und/oder deren 2- und/oder 3-substituierten Derivaten, vormodifiziert sind. Insbesondere eignet sich das Verfahren zur Modifikation von Zelloberflächen, die mit den für die Zwei-Photonen-gesteuerte Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, notwendigen funktionellen Gruppen vormodifiziert sind.

**[0017]** Der Zwei-Photonen-Prozess zerstört nicht die Biopolymerstruktur und kann vor allem auch in Gegenwart von lebenden Zellen und Gewebekulturen durchgeführt werden. Der beschriebene Prozess er-

möglicht die Kombination von Molekül A und Molekül B als Partner, die die notwendigen reaktiven Gruppen aufweisen, wobei die Moleküle A und B von unterschiedlicher chemischer Natur sein können. Die beschriebene Reaktion vereinfacht die beschriebenen Strategien für die lichtgesteuerte Synthese und/oder die Modifikation von Materialien wie Hydrogelen, Bio-Konjugaten und funktionellen Beschichtungen. Das Verfahren ermöglicht die Erzeugung von zeitlich und räumlich exakt definiertem strukturiertem Material um ein Objekt. Unabhängig davon, ob es sich bei diesem Objekt um eine lebende Zelle, ein Biopolymer oder ein Arzneimittel handelt, kann es in das strukturierte Material eingeschlossen werden. Die Konjugate bzw. Derivate der Reaktionsgruppen mit verschiedenen aktiven Molekülen, wie Peptiden, Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, Nukleinsäuren wie DNA und RNA, Antikörpern oder niedermolekularen organischen Molekülen und Polymeren, können an oder in dem Material sowie jeweils miteinander verbunden werden, ohne dabei die Aktivitäten der betreffenden Moleküle, die Materialeigenschaften oder das biologische System zu zerstören, wenn die Verbindung in vivo erfolgt.

**[0018]** Die Anwendung dieser Reaktion für eine zweidimensionale und dreidimensionale Strukturierung und Manipulation bietet eine hervorragende Möglichkeit, Materialien in situ mit oder innerhalb lebender Materie zu erzeugen und die Zell- oder Gewebekultur in einer kontrollierten Art und Weise mit den so gebildeten Materialmatrizen zu verbinden.

**[0019]** Es lassen sich die Vorteile der Erfindung folgendermaßen zusammenfassen:

Mit der Erfindung wird eine lichtgesteuerte Reaktion für eine räumlich und zeitlich definierte Erzeugung einer starken kovalenten Bindung zwischen zwei Molekülen ermöglicht. Das Verfahren eignet sich zur gesteuerten schrittweisen Konjugation der reaktiven Einheiten, das heißt der funktionellen Gruppen von unterschiedlichen Molekülen, wobei die Reaktion in situ durchgeführt werden kann. Das Verfahren kann angewendet werden, um ortsspezifische Konjugate mit günstigen pharmakologischen Eigenschaften, zum Beispiel eine reduzierte Immunogenität und eine erhöhte Zirkulationszeit, zu bilden. Das beschriebene Verfahren kann für die molekulare Konjugation in einer Lösung jeder Art verwendet werden. Insbesondere das Fehlen der Notwendigkeit eines Fotoinitiators und die niedrige Energie erlaubt die Anwendung des Verfahrens in vivo, was wiederum eine in situ-Anwendung für zweidimensionale und dreidimensionale Strukturierung, Manipulation und Strukturierung in Gegenwart von lebenden Zellen ermöglicht.

**[0020]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer mit Maleimidgruppen funktionalisierten Substratoberfläche, insbesondere von Glas.

**[0021]** Aus der WO 2010/014820 A2 sind Zusammensetzungen und Verfahren zur Modifizierung von Oberflächenpartikeln bekannt, an denen Biomoleküle angebracht werden sollen. Die Partikel können Kügelchen und Nanopartikel von Metallelementen, Metalllegierungen, Glas, Polymeren sowie deren Derivaten und Verbindungen enthalten. Die dabei verwendeten Reaktionen, um die Oberfläche zu modifizieren, sind Silylierungen und spezifische Reaktionen von Amino-, Thiol-, Cyclopentadien- und Epoxy-silan-Oberflächen mit einer der folgenden funktionellen Gruppen: N-Hydroxysuccinimid-, Maleimid-, Carboxy-, Thiol-, Methoxy-, Amino-, Acryloyloxy-, Epoxy- und Biotingruppen.

**[0022]** Gemäß der Erfindung wird eine mit Maleimidgruppen funktionalisierte Substratoberfläche, insbesondere von Glas, durch ein Verfahren hergestellt, bei dem

- a) eine Aminosilanisierung der Substratoberfläche in der Weise erfolgt, dass danach auf der modifizierten Substratoberfläche freie Aminogruppen vorliegen,
- b) eine kovalente Ankopplung von Carboxylgruppen des Polyethylenmethacrylats (PEMA) an die freien Aminogruppen der aminosilansierten Oberfläche erfolgt, wobei nach der Ankopplung auf der modifizierten Substratoberfläche freie Carbonsäure-Anhydridgruppen vorliegen und
- c) die Carbonsäure-Anhydridgruppen mit freien Aminogruppen eines Maleimidderivates konjugiert werden.

**[0023]** Eine solche Vorfunktionalisierung einer Substratoberfläche, beispielsweise von Glas, mit Maleimid-Gruppen ermöglicht, wie oben bereits beschrieben, die gezielte Anbindung von weiteren, Maleimid- oder andere funktionelle Gruppen enthaltenden Molekülen an das Substrat über eine lichtgesteuerte Zwei-Photonen-Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition.

**[0024]** Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen mit Bezugnahme auf die zugehörigen Zeichnungen. Es zeigen:

**[0025]** Fig. 1: Reaktionsgleichungen für die 2-2-Cycloaddition von Maleimid-Derivaten und Maleinsäure-Derivaten;

**[0026]** Fig. 2: die Vielfalt von Maleimid enthaltenden Materialien für die Bildung und/oder Funktionalisierung der Materialien;

**[0027]** Fig. 3: a) eine dreidimensionale Strukturierung und b) eine post-in-situ-Funktionalisierung mit Maleimid-konjugierten Molekülen;

**[0028]** Fig. 4a)–c): ein optischer Aufbau und das Arbeitsprinzip eines Zwei-Photonen-Prozesses, Stand der Technik;

**[0029]** Fig. 5: verschiedene Wege der Oberflächenmodifikation mit Maleimidgruppen;

**[0030]** Fig. 6: die schrittweise Modifikation von Glas mit Maleimidgruppen und

**[0031]** Fig. 7: eine schematische Darstellung der Funktionalisierung eines Polypeptid-Konjugats mit Maleimid.

**[0032]** Die Fig. 1 zeigt in den Reaktionsgleichungen 1 bis 3 schematisch die lichtgesteuerten 2-2-Cycloadditionen von Maleimid-Derivaten miteinander. Die Reaktionsgleichungen 4 bis 6 stellen – ebenfalls schematisch – die lichtgesteuerte 2-2-Cycloaddition von Maleinsäure-Derivaten bzw. Maleinsäure-Monoamid-Derivaten miteinander dar, wobei diese Reaktionsgleichungen 4 bis 6 nicht Teil der Erfindung sind. Dabei können die Molekülreste  $R_0$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  der Derivate gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur sein und zum Beispiel an unterschiedlichen Positionen des Maleimidrings substituiert bzw. konjugiert sein.

**[0033]** Die Fig. 2 zeigt die Vielfalt von Maleimid enthaltenden Materialien für die Bildung und/oder Funktionalisierung der Materialien. Zum einen zeigt die Fig. 2a) ein mit vier Maleimidgruppen konjugiertes Molekül. Des Weiteren sind in b) ein Maleimid-Polymer-Wirkstoff-Konjugat sowie in c) Maleimid-Biomolekül-Konjugate dargestellt. Als Biomoleküle können beispielsweise Oligonukleotide, wie DNA- und RNA-Moleküle, oder Proteine sowie Antikörper eingesetzt werden.

**[0034]** Die Fig. 3 zeigt die dreidimensionale Strukturierung und die post-in-situ-Funktionalisierung mit Maleimid-konjugierten Molekülen. Gemäß der Fig. 3a) enthält jedes PEG-Maleimid-Konjugat vier Maleimidgruppen. Die dreidimensionale Nanostrukturierung erfolgt mittels eines Zwei-Photonen-Prozesses, welcher zu einer lokal definierten 2-2-Cycloaddition von Maleimidgruppen der PEG-Maleimid-Konjugate und damit zu einem Hydrogel führt. Die abgebildete dreidimensionale Gitterstruktur ist eine typische Hydrogellteststruktur.

**[0035]** Die Fig. 3b) zeigt, wie die dreidimensionale Hydrogelstruktur zu einem späteren Zeitpunkt mit anderen Maleimid-konjugierten Molekülen, zum Beispiel Fluorophoren, Proteinen, Signalmolekülen, durch eine Zwei-Photonen-gesteuerte 2-2-Cycloaddition an freien Maleimidgruppen in und auf dem Hydrogel modifiziert werden kann.

**[0036]** Die Fig. 4a zeigt einen beispielhaften optischen Aufbau 1 für eine Zwei-Photonen-Strukturierung gemäß dem Stand der Technik. Bestandteile des Aufbaus sind unter anderem:

ein Femtosekundenlaser 2,  $\lambda/2$ -Platten 3, Strahlteiler 4, ein akustooptischer Modulator 5, eine Lochblende 6, ein Strahlaufweiter 7, ein Spiegel 8, ein dichroitischer Spiegel 9, ein Detektor 10, eine Kamera 11, ein Galvoscaner 12 sowie ein Objektiv 13 und eine Beleuchtung 14. Die Datenverarbeitung und Steuerung erfolgen in einer Rechneinheit 15. Der Laserstrahl wird über die verschiedenen optischen Elemente zum Objektisch mit der Probe 16 geleitet, wo der Schreib- und Modifikationsprozess stattfindet.

**[0037]** Typische Strukturierungsparameter für zum Beispiel ein  $100\times$  Öbobjektiv bei einer Wellenlänge von 800 nm sind: eine Schreibgeschwindigkeit von 10 bis 1000  $\mu\text{m/s}$  sowie eine Leistung von 0,1 bis 100 mW.

**[0038]** Die Fig. 4b zeigt eine Skizze des fokussierten Laserstrahls, in dessen Fokuspunkt durch die sehr hohe Photonendichte der Zwei-Photonen-Prozess stattfindet. Die Ausdehnung des Fokuspunktes mit ausreichender Photonendichte liegt in allen drei Raumrichtungen x, y, z im Submikrometerbereich. Die 2-2-Cycloaddition erfordert neben optimierten Strukturparametern die Anwesenheit von zwei funktionellen Gruppen, zum Beispiel zwei Maleimidgruppen, im Fokus des Zwei-Photonen-Laser-Schreib- bzw. Strukturierungssystems.

**[0039]** Die Fig. 4c zeigt ein Energieschema des Zwei-Photonen-Prozesses. Der angeregte Zustand, der normalerweise mittels eines Photons der Energie  $h\nu_1$  (Plancksches Wirkungsquantum  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{Js}$ , Frequenz  $\nu_1 > \nu_2$ ) erreicht wird, kann unter der Voraussetzung sehr hoher Photonendichten über einen virtuellen Zwischenzustand durch zwei Photonen der Energie  $h\nu_2$  erzeugt werden. Um die benötigte Photonendichte zu erreichen, kommen hoch gepulste Femtosekunden-Laser zum Einsatz.

**[0040]** Die Fig. 5 zeigt verschiedene Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation, um funktionelle Gruppen an die Oberfläche anzubringen, die für die 2-2-Cycloaddition geeignet sind. So zeigt die linke Seite der Fig. 5 die Funktionalisierung von Carboxyleinheiten mit 1-(2-Aminoethyl)pyrrol-2,5-dion (Maleimid). Die rechte Seite der Fig. 5 zeigt die Funktionalisierung von Aminoeinheiten durch Carbodiimid-Chemie, hier mit einem 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester. Beide Wege führen zur Funktionalisierung der Oberfläche mit Maleimidgruppen.

**[0041]** Die Fig. 6 zeigt eine schrittweise Glasmodifikation mit Maleimidgruppen über Funktionalisierungen mit Aminosilan, Polyethylmethacrylat (PEMA) und 1-(2-Aminoethyl)-pyrrol-2,5-dion (Maleimid).

**[0042]** Die Fig. 7 zeigt eine schematische Darstellung der Funktionalisierung eines Polypeptid-Konjugats mit Maleimid.

Beispiel 1:

**[0043]** Das Beispiel 1 betrifft eine räumlich gesteuerte zweidimensional-molekulare Funktionalisierung von Aminogruppen enthaltenden Oberflächen über einen Zwei-Photonen-Prozess.

**[0044]** Oberflächen, die verfügbare Aminogruppen enthalten, können durch gewöhnliche Carbodiimidchemie mit Maleimidgruppen funktionalisiert werden, wie der rechte Teil in der Fig. 5 schematisch zeigt. Die aminotermiierten Glasflächen wurden entsprechend einer Vorschrift aus Nature Protocols 2010, 5, 1042–1050 durch direkte Aminosilanaddition hergestellt. Die präparierte Oberfläche wurde mit einer 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester-Lösung einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Isopropanol behandelt. Die Lösung wurde auf die Probe aufgebracht, um die gesamte Oberfläche zu bedecken. Die bedeckte Fläche wurde bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert, um die Vollständigkeit der Reaktion zu erreichen. Als Nächstes wurde die Oberfläche intensiv, das heißt mindestens 3-mal, mit Isopropanol gewaschen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die funktionalisierten Oberflächen können vor der Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Maleimid-funktionalisierten Oberflächen wurden als Substrate für anzubringende Maleimid-Konjugate von Peptiden, Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, DNA, RNA, Antikörpern oder niedermolekularen organischen Molekülen und Polymeren verwendet. Beispielhaft wurde eine ATTO 532-Maleimid-Lösung mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Wasser hergestellt. Die Lösung wurde auf die Maleimid-funktionalisierte Oberfläche aufgebracht und die gewünschte Struktur durch eine Zwei-Photonen-Reaktion ( $\lambda = 800 \text{ nm}$ ) erzeugt. Peptid-Maleimid-Konjugate oder andere wasserlösliche Maleimid-Konjugate können in ähnlicher Weise in Wasser funktionalisiert werden, während phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), gegebenenfalls mit Magnesiumionenzugabe, für Proteine, Antikörper oder DNA und RNA genutzt wird, um deren Konformation stabil zu halten.

Beispiel 2:

**[0045]** Das Beispiel 2 betrifft eine räumlich gesteuerte zweidimensional-molekulare Funktionalisierung von Carboxylgruppen enthaltenden Oberflächen durch einen Zwei-Photonen-Prozess.

**[0046]** Substrate mit Carboxylgruppen an ihrer Oberfläche, die durch Plasmabehandlung von Kunststoff-Oberflächen hergestellt werden, können mit Maleimid durch Carbodiimid-Chemie funktionalisiert

werden, wie in Fig. 5 dargestellt. Glasoberflächen, die gegenüber einer Plasmabehandlung inert sind, können, wie in der Druckschrift Nature Protocols 2010 5, 1042 bis 1050, beschrieben, mit Maleimidgruppen modifiziert werden. Die Bildung einer Polymeroberfläche bietet gegenüber der direkten Aminolyse von Glas eine bessere Beschichtungsstabilität. Die Fig. 6 zeigt eine schrittweise Glasmodifikation.

**[0047]** Die präparierten Oberflächen wurden unter einer Lösung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) mit einer Konzentration von 1 mg/ml inkubiert, um NHS-Ester von Carbonsäuregruppen zu bilden. Als Nächstes wurden die präparierten Oberflächen mehrmals mit Wasser gewaschen und mit wässriger Lösung des Trifluoressigsäure-Salzes von 3-Maleimidopropionilamin mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml behandelt. Die Lösung wurde auf die Probe aufgebracht, um die gesamte Oberfläche zu bedecken. Die bedeckte Fläche wurde bei Raumtemperatur, das heißt 15 bis 30 °C, für mindestens eine Stunde inkubiert, um die Vervollständigung der Reaktion zu erreichen. Als Nächstes wurde die Oberfläche intensiv, das heißt mindestens dreimal, mit Isopropanol gewaschen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die funktionalisierten Oberflächen können vor der Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Die Maleimid-funktionalisierten Oberflächen wurden als Substrat für anzubringende Maleimid-Konjugate von Peptiden, Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, DNA, RNA, Antikörpern oder niedermolekularen organischen Molekülen und Polymeren verwendet. Als Beispiel wurde eine Lösung von ATTO532-Maleimid einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Wasser präpariert. Die Lösung wurde auf die Maleimid-funktionalisierte Oberfläche aufgebracht und die gewünschte Struktur durch eine Zwei-Photonen-Reaktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 800$  nm erzeugt. Peptid-Maleimid-Konjugate oder andere wasserlösliche Maleimid-Konjugate können in ähnlicher Weise in Wasser funktionalisiert werden, während phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), gegebenenfalls mit Magnesiumionenzugabe, für Maleimid-Konjugate mit Proteinen, Antikörpern oder DNA und RNA verwendet werden muss, um ihre Konformation stabil zu halten.

#### Beispiel 3:

**[0048]** Das Beispiel 3 betrifft die räumlich-kontrollierte Erzeugung eines Polymernetzwerks, das heißt eine dreidimensionale Strukturierung, über einen Zwei-Photonen-Prozess.

**[0049]** Das Polymernetzwerk kann aus einer Lösung von beliebigen Molekülen mit mindestens drei Maleimidgruppen-Funktionen erstellt werden. Beispielfähig wurde das im Handel erhältliche Maleimid-terminierte Polyethylenglykol PEG ( $M_w \leq 10000$  Da) in Wasser oder, wenn das Molekulargewicht 10000 Da

überschreitet, einem Acetonitril-Wasser-Gemisch gelöst. Der Feststoffgehalt der Lösung betrug 10 %. Die Lösung wurde auf einer Glasbodenschale aufgebracht und über einen Zwei-Photonen-Prozess wurde ein Hydrogel-Netzwerk erzeugt. Dabei wurde/wurden Maleimid-modifiziertes Glas oder Maleimid-modifizierte transparente Polymeroberflächen verwendet, um die geschaffenen Strukturen kovalent anzubinden. Die Zunahme des Feststoffgehaltes vom Reaktionsgemisch führt entsprechend zu einer Verstärkung bzw. Versteifung des gebildeten Material-Netzwerks, während die Abnahme des Feststoffgehaltes vom Reaktionsgemisch zu einer Verringerung bzw. Erweichung des gebildeten Material-Netzwerks führt.

#### Beispiel 4:

**[0050]** Das Beispiel 4 betrifft die räumlich-kontrollierte Erzeugung eines kovalent gebundenen dreidimensionalen Biopolymer-Netzwerks, wobei das Biopolymere ein Polysaccharid ist.

**[0051]** Das Polymernetzwerk kann aus einer Lösung von beliebigen Biomolekülen erzeugt werden, die – ähnlich wie im Beispiel 3 – mit mindestens drei funktionellen Maleimidgruppen konjugiert sind und in Wasser oder einem organischen nicht-nukleophilen Lösungsmittel, wie zum Beispiel DMF, DMSO, Acetonitril, Methanol usw. oder deren Mischungen, löslich sein sollten. Biomoleküle, die in PBS oder Zellmedien löslich sind, können ohne starke Beeinträchtigung ihrer ursprünglichen Faltung und entsprechender Aktivitäten polymerisiert werden. Die Biopolymer-Maleimid-Konjugate, die eine große Anzahl an Maleimidgruppen enthalten, bilden steifere Materialien als die gleichen Biopolymer-Konjugate mit einer kleineren Menge an Maleimidgruppen. Zum Beispiel wurde eine Hyaluronsäureprobe ( $M_w = 17000$  Da) mit 4 und 6 Maleimidgruppen auf bekanntem Wege, zum Beispiel entsprechend Adv. Mater. 2013, 25, 2606–2610, funktionalisiert und – auf ähnlichem Wege wie in Beispiel 3 – ohne Befestigung an ein Substrat, es wurde nicht modifiziertes Glas verwendet, – unter Anwendung eines Zwei-Photonen-Prozesses polymerisiert. Das Speichermodul, eine rheologische Eigenschaft, des Hyaluronsäure-Konjugates mit 6 Maleimidgruppen war 40-mal größer (steifer) als das Speichermodul des Hyaluronsäure-Konjugates mit 4 Maleimidgruppen. Die Zunahme des Feststoffgehaltes vom Reaktionsgemisch führt entsprechend zu einer Verstärkung bzw. Versteifung des gebildeten Material-Netzwerks, während die Abnahme des Feststoffgehaltes vom Reaktionsgemisch zu einer Verringerung bzw. Erweichung des gebildeten Material-Netzwerks führt.

#### Beispiel 5:

**[0052]** Das Beispiel 5 betrifft die räumlich kontrollierte Erzeugung eines kovalent verbundenen Bio-

polymer-Netzwerks, das heißt eine dreidimensionale Strukturierung, wobei das Biopolymer ein Polypeptid ist.

**[0053]** Das Konzept der Materialstrukturierung ist ähnlich wie in Beispiel 4. Zum Beispiel wurde eine Lösung von Kollagen 1 in PBS (pH 7,4) mit einer Endkonzentration von weniger als 1 mg/ml hergestellt. Die Lösung wurde über Nacht mit dem Ziel einer vollständigen Ausbildung von Kollagenfasern inkubiert. Nachfolgend wurde die Probenlösung mit 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester einer Konzentration von 100 µm/ml funktionalisiert. Die Reaktion wurde über Nacht durchgeführt und mit Mikrodialyseschläuchen gereinigt. Die dialysierte Lösung wurde in ähnlicher Weise wie in Beispiel 4 mit oder ohne Anbindung an ein Substrat unter Anwendung eines Zwei-Photonen-Prozesses polymerisiert.

#### Beispiel 6:

**[0054]** Das Beispiel 6 betrifft die räumlich kontrollierte Erzeugung eines kovalent verknüpften Bio-Hybridmaterial-Netzwerks.

**[0055]** Das Konzept der Material-Strukturierung ist ähnlich wie in den Beispielen 4 und 5. Auch in diesem Fall wurden die verwendeten Polymer-Peptid-Konjugate oder Polysaccharid-Polymer-Konjugate mit mindestens drei Maleimidgruppen modifiziert und für die Bildung eines Hydrogel-Netzwerks verwendet. Zum Beispiel wurde ein Maleimid-terminiertes PEG-Peptid-Konjugat mit MMP-(Matrix-Metalloproteinase)-spaltbaren Peptiden funktionalisiert, wie in ChemCom 2010 Macromol Com. 2010 beschrieben. Anschließend wurde das gereinigte Konjugat mit einem 3-Maleimidipropionic-N-hydroxysuccinimidester, siehe Fig. 7, nach einer ähnlichen Vorschrift wie in Beispiel 5 funktionalisiert.

**[0056]** Das gebildete Maleimid-terminierte PEG-Peptid-Konjugat wurde ähnlich wie in den Beispielen 4 und 5 mit oder ohne kovalente Anbindung an ein Substrat unter Anwendung eines Zwei-Photonen-Prozesses polymerisiert.

#### Beispiel 7:

**[0057]** Das Beispiel 7 betrifft die räumlich kontrollierte Erzeugung eines kovalent verbundenen Mehrschicht-Hydrogel-Netzwerks, das heißt eine dreidimensionale Strukturierung.

**[0058]** Das gebildete Maleimid-terminierte Konjugat aus den Beispielen 3 bis 6 kann durch einen Zwei-Photonen-Prozess mit oder ohne Befestigung an einem Substrat stufenweise auf der Oberfläche polymerisiert werden. Dadurch wurde ein mehrschichtiges Hydrogel-Netzwerk erzeugt, welches Schichten

aus unterschiedlichen Materialien und Dicken enthält.

#### Beispiel 8:

**[0059]** Das Beispiel 8 betrifft die räumlich kontrollierte dreidimensionale Funktionalisierung von Zelloberflächen.

**[0060]** Die Zelloberflächen wurden direkt durch die Behandlung mit einer 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester-Lösung einer Konzentration von 10 µm/ml oder mit die Zellwand durchdringenden Peptiden oder Proteinen, welche mit Maleimidgruppen vorfunktionalisiert sind, funktionalisiert. Die verschiedenen Maleimid-Konjugate wurden dann durch den Zwei-Photonen-Prozess direkt an die Zellwand angebracht. Für die Einzelzellfixierung unter dem Laser wurde eine Mikrofluid-Technologie eingesetzt, wie in der Druckschrift Biophysical Journal 2005, 3689–98, beschrieben.

#### Beispiel 9:

**[0061]** Das Beispiel 9 betrifft die räumlich kontrollierte Funktionalisierung von Mizellen oder Partikeln.

**[0062]** Die Oberflächen von mikrometergroßen Partikeln oder Micellen wurden mit Maleimidgruppen in einer ähnlichen Weise, wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben, funktionalisiert. Anschließend können die verschiedenen Maleimid-Konjugate durch Zwei-Photonen-Technik direkt an die Oberfläche angebracht werden. Für die Partikel- oder Mizellen-Fixierung unter dem Laser wurde eine Mikrofluid-Technik eingesetzt, wie in der Biophysical Journal 2005, 3689–98, beschrieben. Die funktionalisierten Teilchen oder Mizellen wurden durch Dialyse gereinigt.

#### Bezugszeichenliste

1	optischer Aufbau
2	Femtosekundenlaser
3	$\lambda/2$ -Platten
4	Strahlteiler
5	akustooptischer Modulator
6	Lochblende
7	Strahlaufweiter
8	Spiegel
9	dichroitischer Spiegel
10	Detektor
11	Kamera
12	Galvoscaner
13	Objektiv
14	Beleuchtung
15	Rechnereinheit
16	Objektisch mit Probe



### Patentansprüche

1. Verfahren zur lichtgesteuerten Erzeugung von kovalenten Konjugaten zwischen jeweils zwei Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur durch eine lichtgesteuerte Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, zur kovalenten Verbindung zwischen zwei gleichen oder unterschiedlichen funktionellen Gruppen, ausgewählt aus den funktionellen Gruppen von Maleimid-Derivaten und/oder deren 2- und/oder 3-substituierten Derivaten, wobei die Derivatmoleküle als die mit den genannten funktionellen Gruppen ausgestatteten zu verbindenden Moleküle gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur jeweils eine oder mehrere funktionelle Gruppen aufweisen, und als Moleküle, die zusammen mit den funktionellen Gruppen die Derivatmoleküle bilden, bioaktive Moleküle, insbesondere Moleküle von Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren, und/oder synthetische Polymere und/oder Moleküle von niedrigem Molekulargewicht, insbesondere Wirkstoffmoleküle, und/oder Farbstoffmoleküle, insbesondere Fluorophore, oder Derivatmoleküle, die neben den für die Additionsreaktion notwendigen funktionellen Gruppen Farbstoffgruppen, insbesondere fluorophore Gruppen, enthalten, und/oder Moleküle von Biotin und/oder von Biotin-Analoga und/oder Molekülen einer Substratoberfläche, insbesondere von Glas, eingesetzt werden, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, als eine Zwei-Photonen-Reaktion bei einer Wellenlänge im Bereich von  $\lambda = 600$  bis  $900$  nm stattfindet.

2. Anwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 für den Aufbau einer zwei- oder dreidimensionalen Struktur und/oder für den schrittweisen Aufbau von Schichtebenen aus Konjugaten aus den Molekülen gleicher oder unterschiedlicher chemischer Natur.

3. Anwendung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Konjugatstruktur eine harte, plastische oder Hydrogel-Struktur ist.

4. Anwendung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die dreidimensionale Konjugatstruktur eine kovalent verbundene Mehrschichtstruktur ist, die schrittweise durch die Zugabe von bioaktiven Molekülen, insbesondere Moleküle von Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren (RNA, DNA), Polysacchariden, Lipiden oder kleinen organischen Molekülen und Polymeren, die die für die Additionsreaktion, vorzugsweise eine 2-2-Cycloaddition, erforderlichen funktionellen Gruppen aufweisen, erzeugt wird, wobei die jeweiligen Moleküle zweier miteinander verbundener Schichten gleicher oder wechselnder chemischer Natur sind.

5. Anwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 für die Beschichtung oder Modifikation von zwei-dimensionalen und dreidimensionalen Oberflächen, die mit den für die Additionsreaktion, vorzugsweise 2-2-Cycloaddition, notwendigen funktionellen Gruppen, ausgewählt aus den funktionellen Gruppen von Maleimid-Derivaten und/oder deren 2- und/oder 3-substituierten Derivaten, vormodifiziert sind.

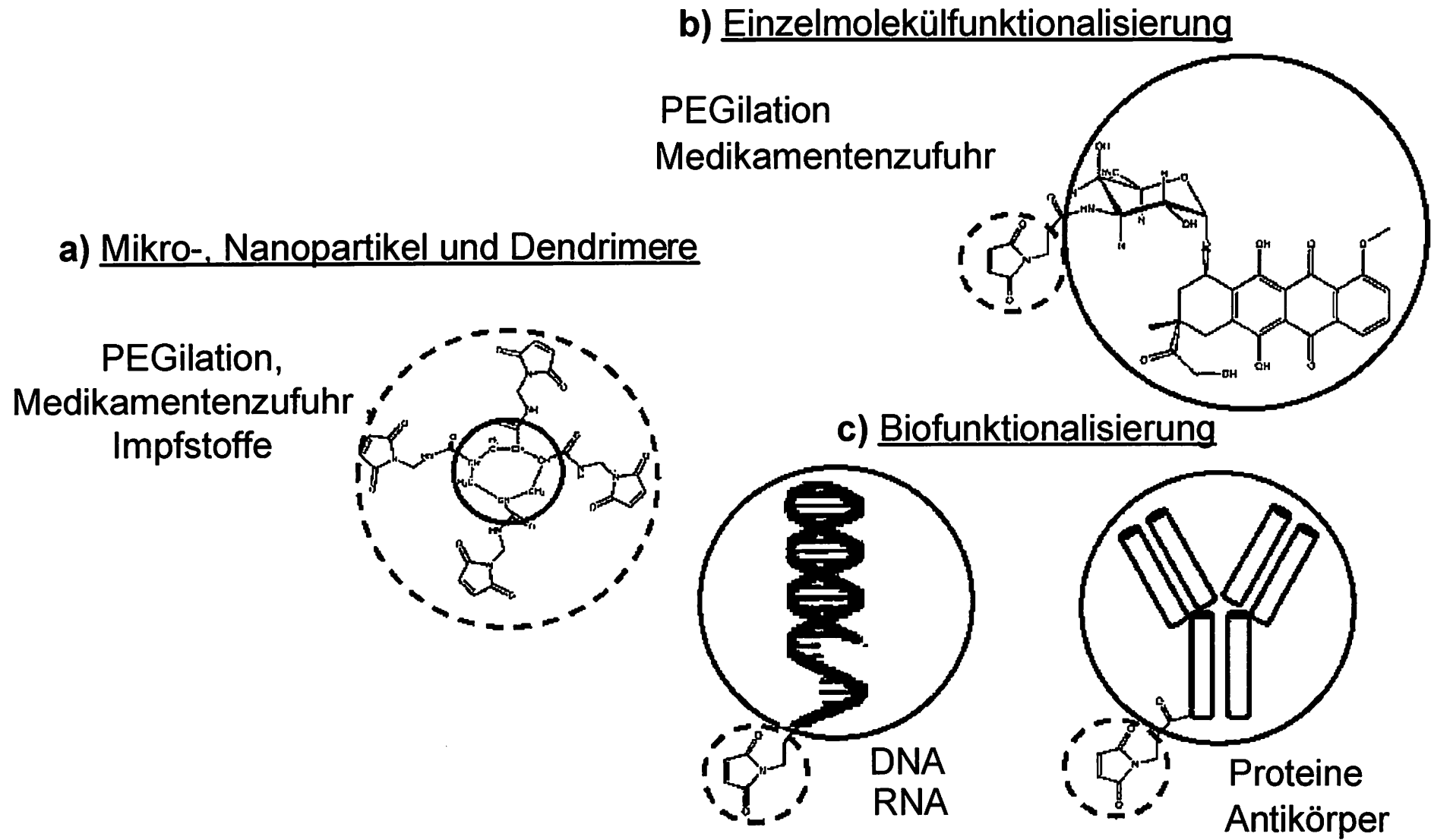
6. Anwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 zur Modifikation von Zelloberflächen, wobei die Zelloberflächen mit den für die Zwei-Photonen-Additionsreaktion, vorzugsweise für eine 2-2-Cycloaddition, notwendigen funktionellen Gruppen vormodifiziert sind.

7. Verfahren zur Herstellung einer mit Maleimidgruppen funktionalisierten Substratoberfläche, insbesondere von Glas, bei dem

- a) eine Aminosilanisierung der Substratoberfläche in der Weise erfolgt, dass danach auf der modifizierten Substratoberfläche freie Aminogruppen vorliegen,
- b) eine kovalente Ankopplung von Carboxylgruppen des Polyethylenmethacrylats (PEMA) an die freien Aminogruppen der aminosilansierten Oberfläche erfolgt, wobei nach der Ankopplung auf der modifizierten Substratoberfläche freie Carbonsäure-Anhydridgruppen vorliegen und
- c) die Carbonsäure-Anhydridgruppen mit freien Aminogruppen eines Maleiminderivates konjugiert werden.

Es folgen 8 Seiten Zeichnungen





**Fig. 2**

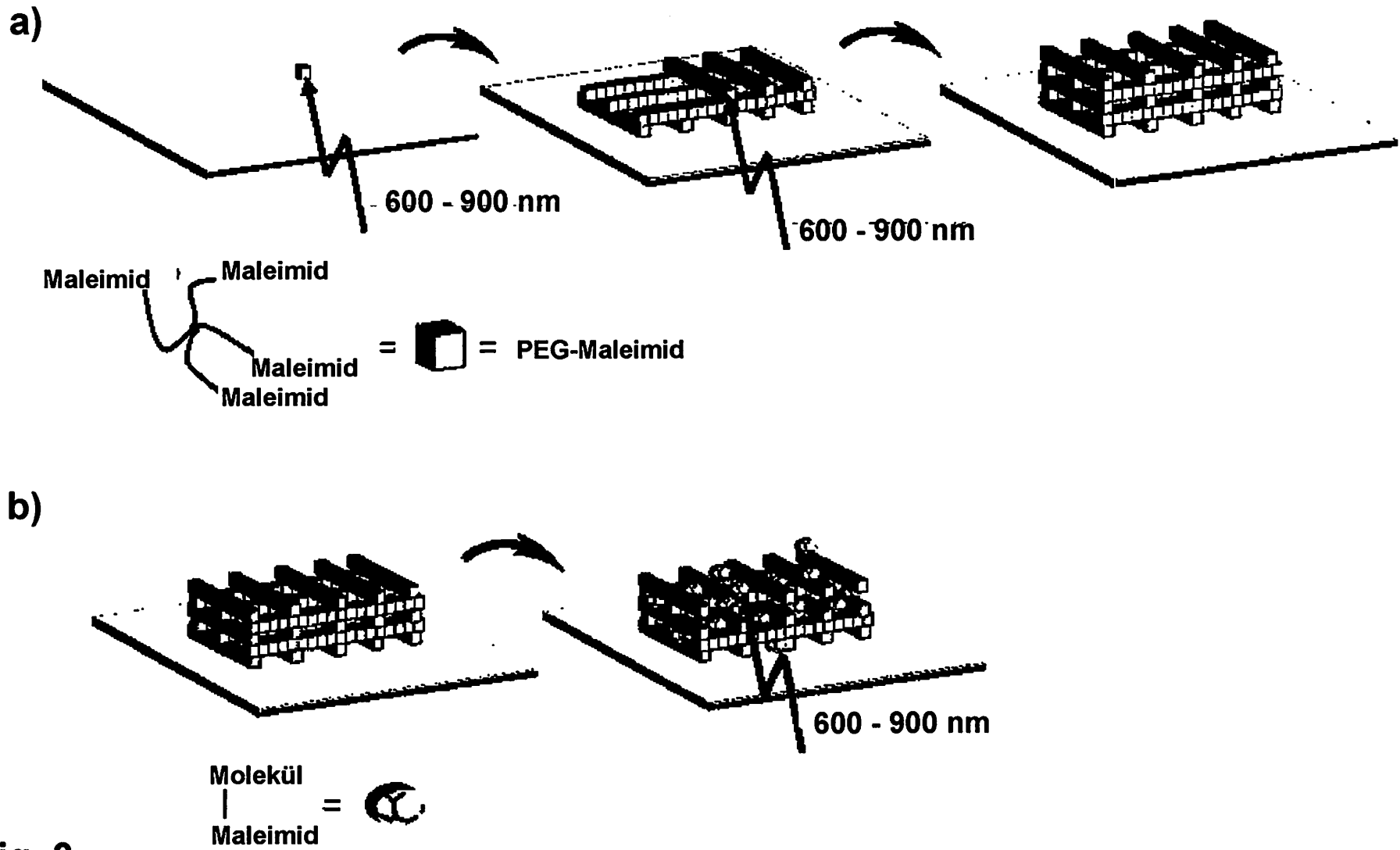
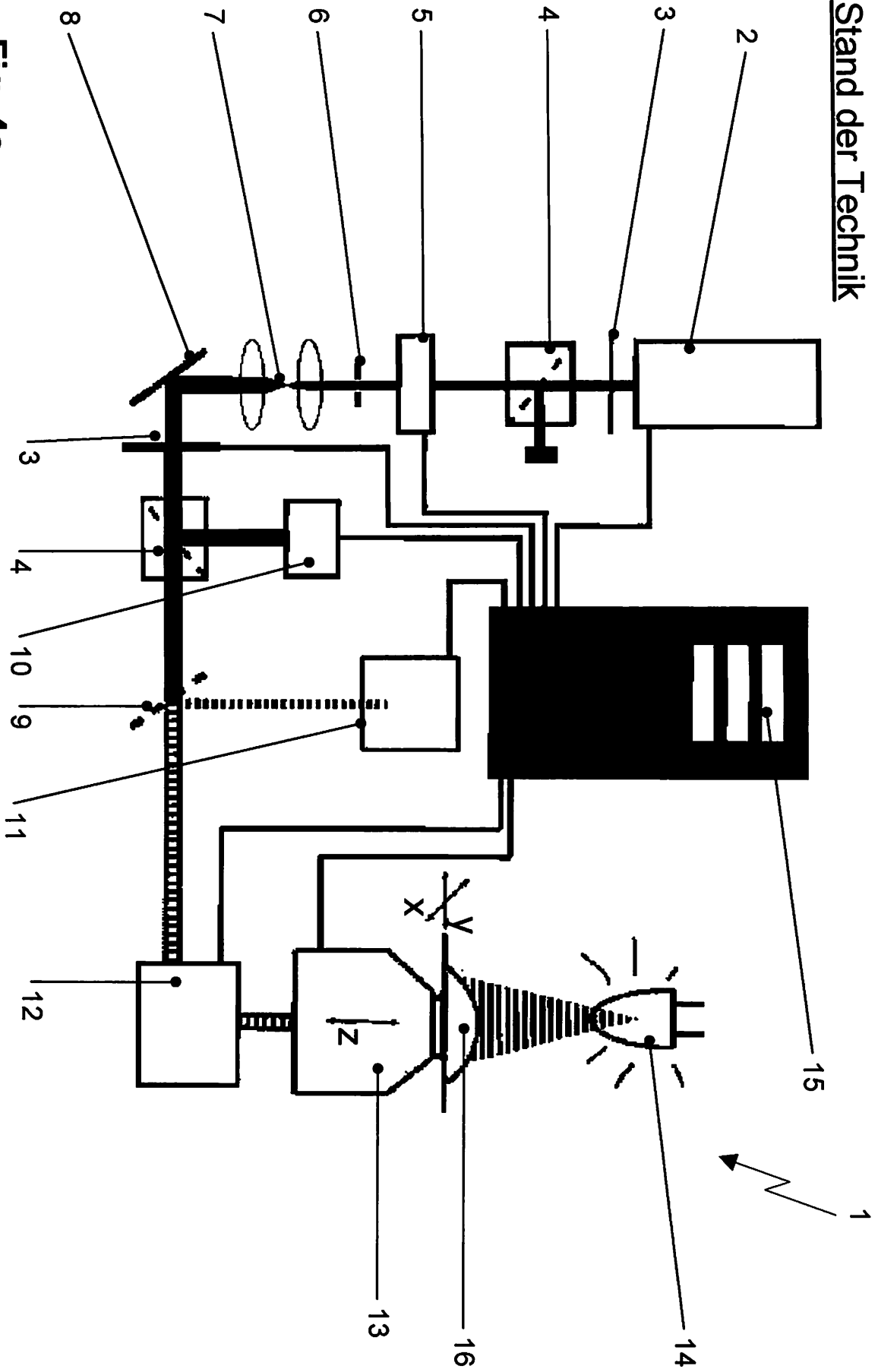


Fig. 3

Stand der Technik



**Fig. 4a**

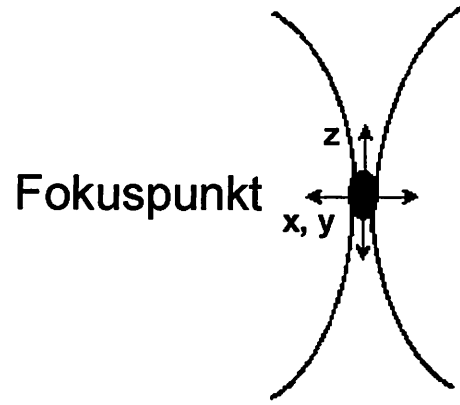


Fig. 4b

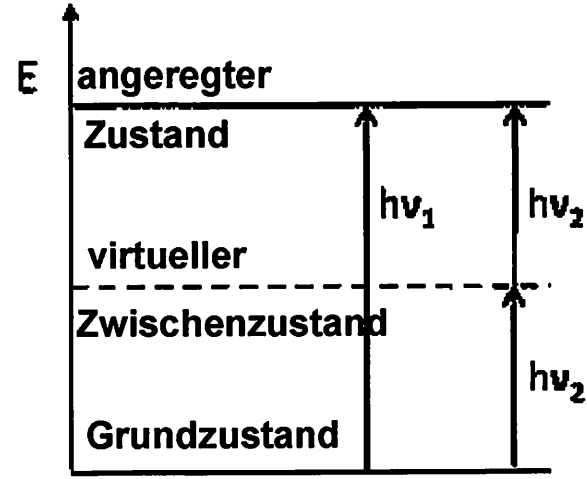
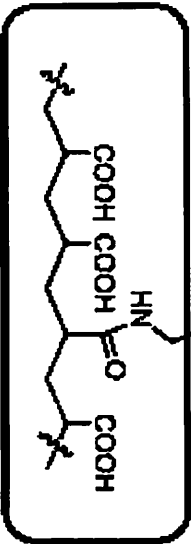
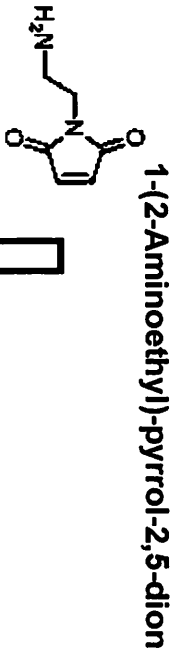
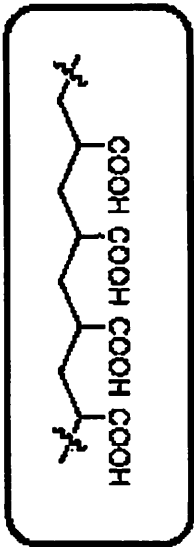


Fig. 4c

Funktionalisierung von Carboxylgruppen



Funktionalisierung von Aminogruppen

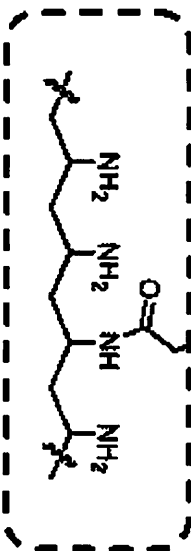
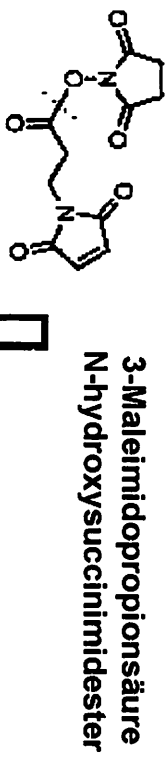
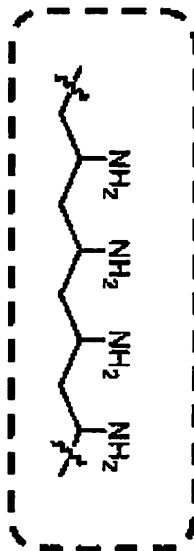


Fig. 5

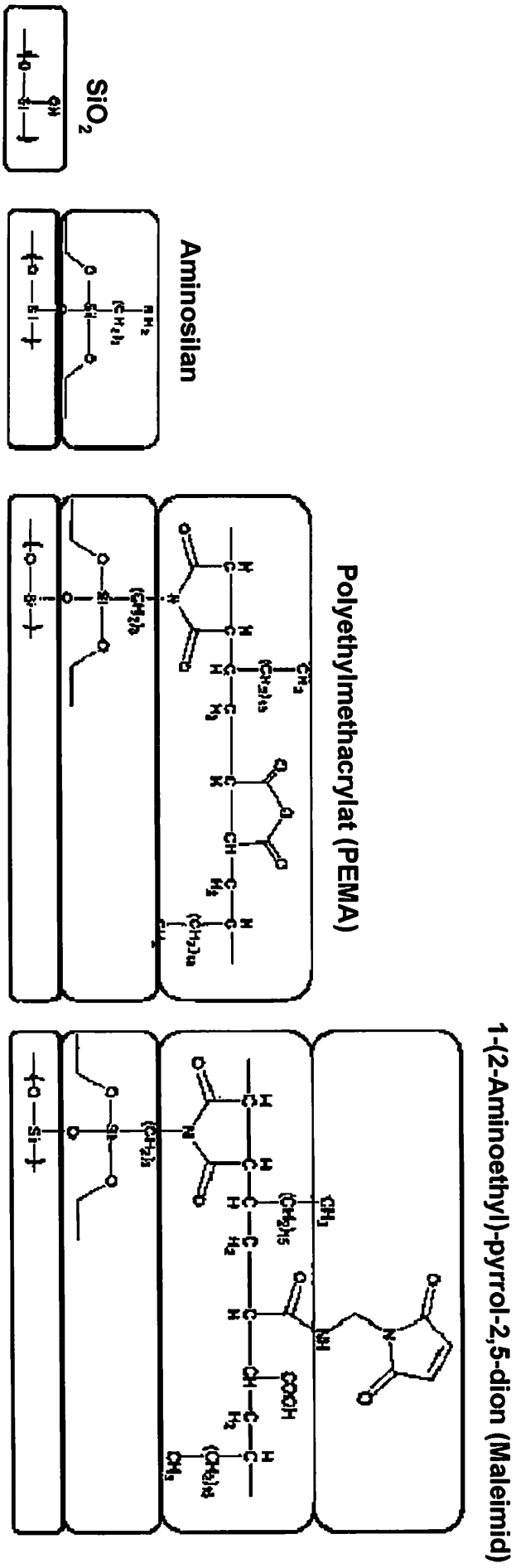


Fig. 6



Fig. 7

