

- Kap. 8; d) M. Shibasaki in *Advances in Metal-Organic Chemistry* (Hrsg.: L. S. Liebeskind), JAI, Greenwich, **1996**, S. 119–151.
- [10] Übersicht über Palladium-katalysierte Allylierungen von Stickstoff: P. Metz, *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl) 4th ed. 1952–, Vol. E21/2*, **1996**, S. 5643–5669.
- [11] a) A. Ashimori, B. Bachand, L. E. Overman, D. Poon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6477–6487; b) A. Ashimori, B. Bachand, M. Calter, S. P. Govek, L. E. Overman, D. J. Poon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6488–6499.
- [12] Die Epimerisierung dieser Zwischenstufe über einen π - σ - π -Mechanismus wäre ungünstig, da die Termini in **3** disubstituiert und neopentylisch sind.
- [13] Obwohl ein *anti*-Angriff auf η^3 -Allylpalladiumzwischenstufen mit sehr weichen Nucleophilen beobachtet worden ist, gibt es keine verwandten Präzedenzfälle für Abfangreaktionen durch neutrale Amide: (A. Heumann, M. Réglier, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 975–1015 und Lit. [10]).
- [14] Die Synthese von anellierten Indolen über bimolekulare Kupplung von 2-Halogenanilinen mit Dienen ist eingehend von Larock und Mitarbeitern entwickelt und untersucht worden.^[15] Die Kupplung einer asymmetrischen intramolekularen Heck-Reaktion mit bimolekularem Abfangen einer η^3 -Allylpalladiumzwischenstufe wurde zuerst von Shibasaki und Mitarbeitern beschrieben.^[16] Die stereochemischen Fragen, die das Kernstück dieser Arbeit sind, wurden in diesen frühen Studien nicht überprüft.
- [15] Für eine Übersicht, siehe: R. C. Larock, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 111–124.
- [16] a) K. Kagechika, M. Shibasaki, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4093–4094. Beispiele mit achiralen Palladiumkatalysatoren: b) B. Burns, R. Grigg, P. Ratananukul, V. Sridharan, P. Stevenson, T. Worakun, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4329–4332; c) R. Grigg, V. Sridharan, S. Sukirthalingam, T. Worakun, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1139–1142.
- [17] C. K. Hwang, W. S. Li, K. C. Nicolaou, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2295–2298.
- [18] a) E. J. Corey, J. A. Katzenellenbogen, G. H. Posner, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4245–4247; b) M. A. Blanchette, M. S. Malamas, M. H. Nantz, J. C. Roberts, P. Somjai, D. C. Whritenour, S. Masamune, M. Kageyama, T. Tamura, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2817–2825.
- [19] A. J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis* **1981**, 165–185.
- [20] Übersicht: J. Tsuji, *Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*, Wiley, Chichester, **1997**, S. 188–209.
- [21] M. F. Lipton, A. Basha, S. M. Weinreb, *Org. Synth. Coll. Vol.* **1988**, *6*, 492–495.
- [22] A. Lieberknecht, H. Griesser, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4275–4278.
- [23] a) K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199–4200; b) K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 302–324.
- [24] Die Ergebnisse dieser Experimente stimmen mit den Zuordnungen von von Nussbaum und Danishefsky überein.^[6] Andere spektroskopische und analytische Daten für diese Produkte stimmen mit den von diesen Autoren angegebenen überein.
- [25] T. Janecki, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 641–650.
- [26] D. Basavaiah, A. K. D. Bhavani, S. Pandiaraju, P. K. S. Sarma, *Synlett* **1995**, 243–244.
- [27] E. Bald, K. Saigo, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1975**, 1159–1162.
- [28] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156.
- [29] Die (*E*)-Dienylaldehydzwischenstufe in dieser Sequenz isomerisiert schnell; ihre Bildung und erfolgreiche Kondensation mit **9** verlangte die genaue Beachtung der experimentiellen Details (siehe Hintergrundinformationen).
- [30] Spektroskopische und analytische Daten für diese Produkte stimmten mit den bekannten Angaben überein.^[2, 5]

Direkter Nachweis der unteren kritischen Lösungstemperatur von oberflächenfixierten thermoresponsiven Hydrogelen durch Oberflächenplasmonenresonanz**

Erik Wischerhoff,* Thomas Zacher,
André Laschewsky* und El Djouhar Rekaï

Die Affinitätsbiosensorik ist eine wichtige Methode, um biochemische Bindungsprozesse zu untersuchen: Sie ermöglicht, biomolekulare Wechselwirkungen in Echtzeit zu verfolgen, und gestattet somit dem Anwender, kinetische Konstanten aus den Daten von Wechselwirkungsexperimenten abzuleiten.^[1] Eines der populärsten Transduktionsprinzipien in der Affinitätsbiosensorik ist die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).^[2] Die Anregung von Oberflächenplasmonen in dünnen Metallfilmen – oftmals Gold – durch totalreflektiertes Licht führt zu einem Minimum in der Intensität des reflektierten Lichtes bei einem bestimmten Einfallswinkel Θ_{SPR} , dem Resonanzwinkel. Eine Veränderung des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Goldoberfläche verschiebt die Lage dieses Resonanzwinkels. SPR ermöglicht Wechselwirkungsmessungen in Echtzeit und erfordert keine markierten Analyten.^[3]

Eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Affinitätsbiosensorik ist eine chemisch angepasste Sensoroberfläche. Typischerweise werden Hydrogele als biokompatible Matrices verwendet, um die Denaturierung von kovalent immobilisierten Biomolekülen zu verhindern und deren eigentliche Funktionalität an Sensoroberflächen zu erhalten.^[4] Häufig werden hier Polysaccharide eingesetzt.^[5] Obwohl diese die Aufgabe meist in zufrieden stellender Weise erfüllen, sind synthetische hydrophile Polymere aufgrund einiger Vorteile eine attraktive Alternative. Erstens können sie widerstandsfähiger gegenüber rigiden chemischen Bedingungen (starke Säuren, Fouling etc.) sein und zweitens bieten sie die Möglichkeit, durch Anpassen ihrer Struktur Polymere mit neuen physikalischen Eigenschaften zu erhalten. Ein beeindruckendes Beispiel für die Möglichkeiten, die sich durch gezielte Modifikation von Hydrogelen eröffnen, sind die thermoresponsiven Hydrogele.^[6]

Thermoresponsive Hydrogele weisen in wässriger Lösung ein ungewöhnliches Verhalten auf, das dem intuitiven Emp-

[*] Dr. E. Wischerhoff,^[+] Dipl.-Phys. T. Zacher^[+]
BioTuL AG
Gollierstraße 70, 80339 München (Deutschland)
E-mail: e.wischerhoff@pharm.uu.nl
Prof. Dr. A. Laschewsky, Dr. El D. Rekaï
Department of Chemistry
Université Catholique de Louvain
Place L. Pasteur 1, 1348 Louvain-la-Neuve (Belgien)
Fax: (+32)10-472836
E-mail: laschewsky@cico.ucl.ac.be

[+] Neue Adresse:
Department of Pharmaceutical Proteomics
Universiteit Utrecht
Sorbonnelaan 16, 3508 TB Utrecht (Niederlande)
Fax: (+31)30-251-8219

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Kommission (CEE BIO-CT97-962372 und Erbfmbct 982915) unterstützt.

finden widerspricht, da sie im Allgemeinen eine untere kritische Lösungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) aufweisen. Wenn die Temperatur einen bestimmten Wert überschreitet, gewöhnlich bezeichnet als Trübungspunkt, fallen sie aus der Lösung aus. Auch unter den speziellen Bedingungen, die im eingeschränkten Raum an einer Oberfläche herrschen, sollten thermoresponsive Hydrogele einen analogen Phasenübergang eingehen.^[7] Für Anwendungen an Sensoroberflächen ist solch ein Verhalten von besonderem Interesse, denn es erlaubt, die Oberflächeneigenschaften zu schalten oder neue Funktionalitäten einzuführen. Einige Anwendungen nutzen bereits den Phasenübergang an der Oberfläche.^[8] Direkt beobachtet wurde jedoch ein entsprechender Übergang an einer Oberfläche bislang nicht. Im Folgenden berichten wir über den direkten Nachweis der LCST eines neuen thermoresponsiven, an eine Goldoberfläche gebundenen Hydrogels durch Oberflächenplasmonenresonanz.

Die spezifische Balance von hydrophilen und hydrophoben Gruppen ist ein Charakteristikum vieler thermoresponsiver Polymere, die eine LCST in wässriger Lösung aufweisen.^[9] Um die Übergangstemperatur einzustellen, haben wir wasserlösliche Polymere durch partielle Acylierung modifiziert.^[10] Im Vergleich zum weit verbreiteten Ansatz der Copolymerisation erleichtert diese Strategie die Herstellung chemisch homogener, statistischer Copolymere und eröffnet so prinzipiell die Möglichkeit eines scharfen Phasenübergangs. Das für diese Arbeit gewählte Vorläuferpolymer war Poly-*N*-[tris-(hydroxymethyl)methyl]acrylamid (P-THMA; siehe Einschub in Abbildung 1), das bekannt ist durch biomedizinische Anwendungen.^[11] Partiiell acetylierte P-THMA-Derivate weisen eine LCST in wässriger Lösung auf;^[10] die beobachteten Trübungspunkte hängen von der Konzentration ab. P-THMA mit 40 Mol-% Acetoxygruppen überdeckt den physiologisch interessanten Temperaturbereich von 20 bis 45 °C (Abbildung 1).

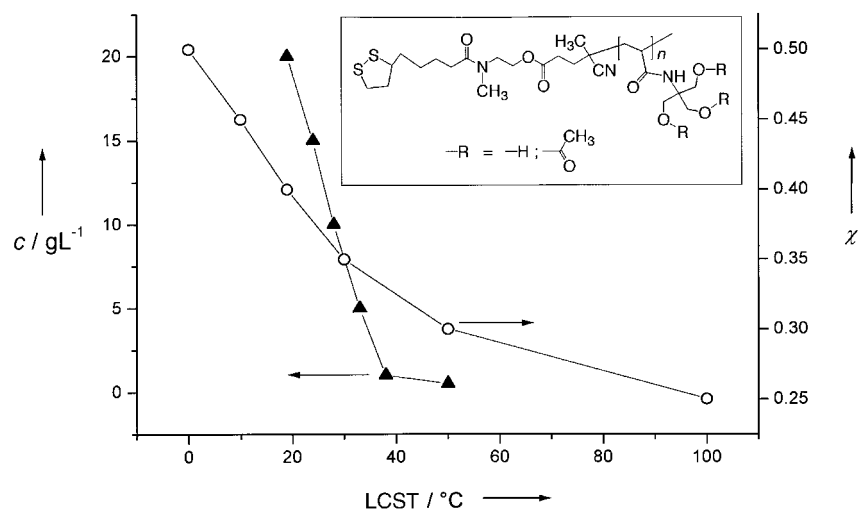


Abbildung 1. Abhängigkeit der LCST wässriger Lösungen von acetyliertem P-THMA vom molarem Anteil der Acetylierung χ (Konzentration 20 g L⁻¹; offene Kreise) sowie von der Polymerkonzentration c (Acetylierungsgrad 40%; gefüllte Dreiecke). Die Linien dienen lediglich dazu, den Verlauf der Messwerte zu verdeutlichen und haben keine physikalische Bedeutung. Im Einschub ist die Struktur von P-THMA mit dem Disulfidgruppen tragenden Azoinitiatorfragment gezeigt.

Allerdings ist es nicht evident, wie sich Polymere, die in Lösung thermoresponsiv sind, verhalten, wenn sie an einer Oberfläche befestigt sind. Für die Messung der temperaturabhängigen Konformation der fixierten Polymere haben wir einen SPR-Prototypen (BioTul AG, München) verwendet. Da das evaneszente Feld der Oberflächenplasmonen exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abfällt, wird der Kollaps des Hydrogels bei Durchschreiten des Trübungspunktes den durchschnittlichen lokalen Brechungsindex ändern (Abbildung 2). Folglich sollte der Kollaps als Winkelverschiebung des Intensitätsminimums zu verfolgen sein.

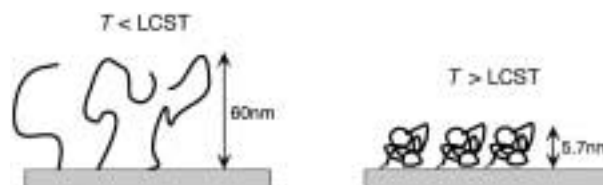


Abbildung 2. Schematische Darstellung des thermoresponsiven Effekts von acetyliertem P-THMA, das an einer Goldoberfläche chemisorbiert ist, wie er mit SPR bestimmt und quantifiziert wurde. Der Phasenübergang findet bei LCST \approx 26 °C statt.

Die SPR-Apparatur verwendet eine Laserdiode ($\lambda = 784$ nm) als Lichtquelle und hat eine Winkelauflösung von 0,005°. Das monochromatische Licht gelangt durch ein Zylinderprisma zu einem goldbeschichteten Glasplättchen (BK7-Glas, $n = 1,511$), das mit Immersionsöl optisch an das Prisma gekoppelt ist. Die Intensität des reflektierten Lichts wird als Funktion des Einfallswinkels mit einer Photodiode gemessen.

In den Experimenten wurden reines und partiell acetyliertes P-THMA über die terminalen Disulfidgruppen auf Gold chemisorbiert und anschließend wurden die beschichteten Substrate in Wasser, das sich in einer Durchflusszelle befand, eingetaucht. Schrittweise wurde Wasser auf bestimmte Temperaturen erwärmt und in die Durchflusszelle injiziert, währenddessen jeweils die SPR-Messungen durchgeführt wurden (Abbildung 3). Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden jeweils mehrere Messkurven gemittelt. Eine Polynomannäherung an die Datenpunkte des einfachen P-THMA (Abbildung 3, offene Kreise) dient als Referenzkurve und gibt in Übereinstimmung mit den von Schiebener et al.^[12] aufgelisteten Daten die Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex von Wasser wieder. Die mittlere Steigung der Kurve beträgt $-0,011$ deg K⁻¹, entsprechend einer temperaturabhängigen Brechungsindexänderung von Wasser von $-1,0 \times 10^{-4}$ K⁻¹.

Die analogen Messungen mit modifiziertem P-THMA, das an 40% der Hydroxygruppen acetyliert ist, sind in Abbildung 3 (gefüllte Kreise) gezeigt. Neben

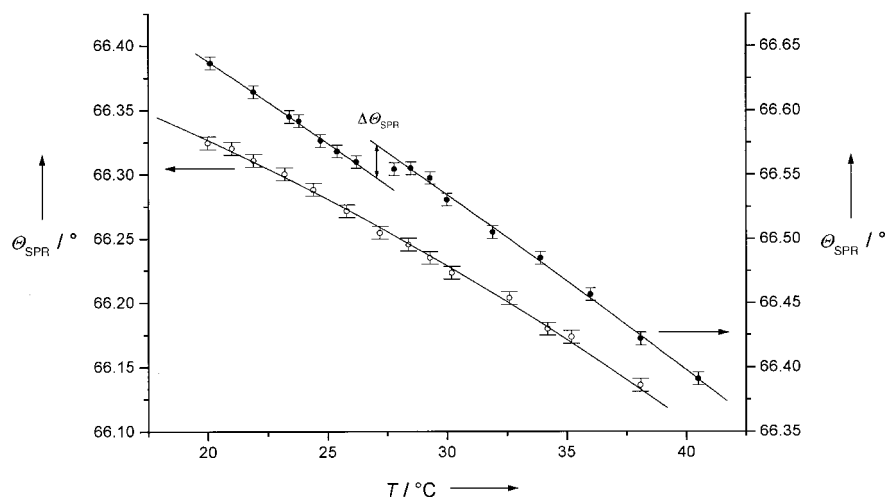


Abbildung 3. Offene Kreise: $\Theta_{\text{SPR}}(T)$ -Auftragung des unmodifizierten P-THMA. Die Kurve gibt die Abhängigkeit des Brechungsindex von Wasser von der Temperatur wieder und dient als Referenz. Gefüllte Kreise: $\Theta_{\text{SPR}}(T)$ -Auftragung des acetylierten P-THMA (Acetylierungsgrad 40%). Der Kollaps des Hydrogels bei $T = \text{LCST}$ führt durch den Phasenübergang, wie er in Abbildung 2 illustriert ist, zu einer signifikanten Verschiebung $\Delta\Theta_{\text{SPR}}$.

der generellen Abnahme des Resonanzwinkels mit steigender Temperatur erkennt man eine deutliche Änderung in der Steigung zwischen ca. 26 und 28.5°C, die zu einem Versatz von $\Delta\Theta_{\text{SPR}} = 0.026^\circ$ führt. Dieser Versatz zeigt den Phasenübergang des acetylierten P-THMA bei steigender Temperatur an. Auf Fresnel-Gleichungen basierende Modellrechnungen^[13] ergeben unter Annahme homogener Schichten, dass die gemessenen Werte von $\Theta_{\text{SPR}}(T)$ mit dem beobachteten Versatz von $\Delta\Theta_{\text{SPR}} = 0.026^\circ$ einem gequollenen Hydrogelfilm von etwa 60 nm Dicke bei $T < \text{LCST}$ entsprechen, der auf eine Dicke von 5.7 nm kollabiert, wenn die Temperatur die LCST übersteigt. Für das kollabierte Hydrogel wurde ein Brechungsindex von 1.478 angenommen, für das gequollene Hydrogel wurde nach Garnet^[14] ein gemischter Brechungsindex von 1.344 berechnet. Die Breite ΔT des Phasenübergangs kann zu $\Delta T \approx 2.5^\circ\text{C}$ abgeschätzt werden und ist im Wesentlichen auf die statistisch verteilten Kettenlängen des Polymers zurückzuführen. (Eine vollständig acetylierte Probe aus derselben Charge wurde mit Gelpermeationschromatographie analysiert; es ergab sich eine scheinbare Polydispersität von 8.)

Der thermisch induzierte Übergang auf der Goldoberfläche findet bei $T \approx 26^\circ\text{C}$ statt, was einer Konzentration von etwa 15 g L^{-1} in wässriger Lösung entspräche. Die durch die SPR-Messungen ermittelten Dimensionen für den kollabierten und den gequollenen Hydrogelfilm deuten auf eine lokale Konzentration des Polymers in dem chemisorbierten gequollenen Hydrogelfilm von etwa 120 g L^{-1} , wenn eine Dichte des Polymers von 1.2 g cm^{-3} angenommen wird. Zwei Faktoren mögen diese Differenz erklären: Erstens könnten die gemessenen Temperaturen infolge von Wärmeflussseffekten systematisch leicht zu hoch sein und zweitens ist es sehr wahrscheinlich, dass sterische Einschränkungen für Polymerketten an Grenzflächen einen wesentlichen Einfluss auf den Phasenübergang haben^[7] und somit die Übergangstemperatur für räumlich eingeschränkte Polymerketten zu höheren Werten verschieben. Beispielsweise wurde über eine gleichartige

Erhöhung von Übergangstemperaturen bei oberflächenfixierten Flüssigkristallpolymeren berichtet.^[15]

Wir haben am Beispiel von acetyliertem P-THMA gezeigt, dass durch kontrollierte chemische Modifizierung eine LCST in einem bereits bekannten Polymer eingeführt und eingestellt werden kann. Die Chemisorption eines solchen Polymers führt zu thermoresponsiven Hydrogelen auf Goldoberflächen. Wir haben den thermisch induzierten Übergang direkt mit SPR nachgewiesen und anhand eines Vergleiches der Messungen mit berechneten Werten den thermoresponsiven Effekt quantifiziert. Aufgrund ihrer unkomplizierten Struktur und ihres ausgeprägten thermoresponsiven Verhaltens bieten die vorgestellten Hydrogele das Potential für interessante biochemische Anwendungen, wie etwa die Steuerung von Bin-

dungsprozessen an Sensoroberflächen durch Variation der Temperatur.

Eingegangen am 18. Mai,
veränderte Fassung am 20. September 2000 [Z15143]

- [1] M. Fivash, E. M. Towler, R. J. Fisher, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 97–101.
- [2] B. Liedberg, K. Johansen in *Methods in Biotechnology*, Vol. 7 (Hrsg.: K. R. Rogers, A. Mulchandani), Humana, Totowa, **1998**, S. 31–53.
- [3] A. Szabo, L. Stolz, R. Granzow, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 699–705.
- [4] S. Löfås, B. Johnsson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1526–1528.
- [5] a) J. H. Elam, H. Nygren, M. Stenberg, *J. Biomed. Mater. Res.* **1984**, 18, 953–959; b) J. Piehler, A. Brecht, K. E. Geckeler, G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 579–590.
- [6] N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1715.
- [7] P. W. Zhu, D. H. Napper, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 698–705.
- [8] a) N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1990**, 11, 571–576; b) T. Oya, T. Enoki, A. Grosberg, S. Masamune, T. Sakiyama, Y. Takeoka, K. Tanaka, G. Wang, Y. Yilmaz, M. S. Feld, R. Dasari, T. Tanaka, *Science* **1999**, 286, 1543–1545; c) K. Uchida, K. Sakai, O. H. Kwon, E. Ito, T. Aoyagi, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **2000**, 21, 169–173.
- [9] L. D. Taylor, L. D. Cerankowski, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1975**, 13, 2551–2570.
- [10] A. Laschewsky, E. D. Rekaï, E. Wischerhoff, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **1999**, 40, 189–190.
- [11] P. Barthélemy, J. C. Maurizis, J. M. Lacombe, B. Pucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1559–1562.
- [12] P. Schiebener, J. Straub, J. M. H. Levelt Sengers, J. S. Gallagher, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1990**, 19, 677–715.
- [13] K. S. Johnston, S. R. Karlsen, C. C. Jung, S. S. Yee, *Mater. Chem. Phys.* **1995**, 42, 242–246.
- [14] M. Garnet, *Philos. Trans. R. Soc. A* **1904**, 203, 385–420.
- [15] B. Peng, D. Johannsmann, J. Rühle, *Macromolecules* **1999**, 32, 6759–6766.