

Oberflächenfunktionalisierung durch spannungsvermittelte Alkin-Azid-Klickreaktionen**

Radostina Manova, Teris A. van Beek und Han Zuilhof*

Alkine · Azide · Klick-Chemie · Oberflächenchemie ·
Oberflächenfunktionalisierung

In Anbetracht der ständig abnehmenden Größe von aktiven Bauelementen und der damit einhergehenden Zunahme des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen wird die Funktionalisierung von Oberflächen zusehends wichtiger. Infolgedessen stehen effiziente Wege für solche Funktionalisierungen durch das Aufbringen von funktionellen Mono- oder Mehrfachschichten im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsarbeiten des vergangenen Jahrzehnts, sowohl was harte (typischerweise anorganische) als auch was weiche (polymere, dendritische) Oberflächen betrifft. Zu den spezifischen Merkmalen wünschenswerter Techniken zur Oberflächenmodifizierung gehört die Kombination von hoher Leistungsfähigkeit mit milden, nichtkorrosiven Reaktionsbedingungen. Diese Vorgehensweise vermeidet Aufarbeitungsschritte, mit denen das normalerweise nicht triviale oder nahezu unmögliche Entfernen (oberflächengebundener) Nebenprodukte oder überschüssiger Reaktanten erreicht werden soll. Daher wurden Klickreaktionen wie die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) mit oberflächengebundenen Alkinen oder Aziden eingesetzt,^[1] um eine Vielzahl an Oberflächen zu funktionalisieren.

Allerdings kann sich die Anwesenheit von Cu^I als problematisch erweisen: Cu-Ionen sind zytotoxisch, brechen doppelsträngige DNA auf, modifizieren die Struktur von „proteinabweisenden“ Ethylenoxideinheiten und können die intrinsischen funktionellen Oberflächeneigenschaften verändern, etwa die Leitfähigkeit durch Monoschichten auf Halbleiteroberflächen oder die Fluoreszenz von Quantenpunkten. Daher wurden in den letzten fünf Jahren alternative Verfahren entwickelt, darunter die metallfreie Ligationschemie, die entweder keine weitere Aktivierung erfordert (z.B. *N*-Hydroxysuccinimid-basierte Amidbildung)^[2] oder eine aktivierte, aber spurlose Chemie einsetzt (z. B. photoinduzierte Thiol-En-Additionsreaktionen).^[3] Vor kurzem wurden mehr-

rere Beispiele für den Versuch beschrieben, spurlose Reaktionen mit Raumtemperaturbedingungen durch die Anwendung von spannungsvermittelten Alkin-Azid-Cycloadditionen (SPAAC oder Huisgen-Bertozzi-artige Cycloadditionen)^[4] auf Oberflächen zu verbinden. Dieses Highlight konzentriert sich auf vier derartige Reaktionen und behandelt den gegenwärtigen Sachstand sowie die Ziele der kommenden Jahre.

Boons et al. modifizierten die Oberfläche von Organomicellen, die aus maßgeschneiderten Blockcopolymeren aufgebaut waren.^[5] Nach dem Anfügen von Aminogruppen an amphiphile Copolymeren aus Polyethylenoxid und Poly(ϵ -caprolacton) konnte die resultierende Spezies mit einem Dibenzocyclooctinderivat umgesetzt werden, das mit einer aktivierten Estereinheit funktionalisiert war (Abbildung 1a). Dies lieferte Micellen mit einer Cyclooctineinheiten enthaltenden Oberfläche (Abbildung 1b), die leicht mit einer Reihe von Aziden, darunter Fluoreszenzfarbstoffen, Peptiden und azidverknüpften Mannosiden, umgesetzt werden konnten. Die letzteren Produkte banden spezifisch an Oberflächen, auf denen Concanavalin A abgeschieden war. Ähnlich funktionalisierte Micellen könnten möglicherweise auch für den Wirkstofftransport geeignet sein, und erste Schritte wurden bereits gemacht, um diese Möglichkeit aufzuzeigen.

Quantenpunkte (QDs) sind ein interessantes Hilfsmittel bei Fluoreszenzbildgebungsverfahren. Die Funktionalisierung von QD-Oberflächen gelang mithilfe einer von Texier et al. veröffentlichten metallfreien Klickreaktion.^[6] Cyclooctinmodifizierte QDs sind mit azidomarkiertem Mannosamin funktionalisiert und die konjugierten QDs mit Mannosamin-konjugaten verglichen worden, die durch CuAAC hergestellt worden waren. Interessanterweise nahm die Quantenausbeute der QDs, die in Gegenwart von Cu hergestellt wurden, – eingesetzt zur Markierung von Zellmembranepitopen – um 50 % bezogen auf die Anfangsausbeute ab, während die durch SPAAC hergestellten QDs sogar eine 30-proz. Verbesserung der Quantenausbeute aufwiesen.

Eine Anwendung der cyclooctinbasierten Klickreaktionen auf Glasoberflächen entwickelten kürzlich Kuzmin et al.^[7] Eine epoxidfunktionalisierte Glasoberfläche wurde mit einem aminverknüpften Azadibenzocyclooctin (ADIBO) in eine hochreaktive cyclooctinfunktionalisierte Oberfläche überführt (Abbildung 2). Deren Reaktivität wurde mit Aziden untersucht, die eine Fluoreszenzsonde trugen. Da die zusätzliche Amidfunktionalität die Reaktion gegenüber der

[*] R. Manova, Dr. T. A. van Beek, Prof. Dr. H. Zuilhof
Laboratorium voor Organische chemie, Wageningen University
Dreijenplein 8, 6703 HB Wageningen (Niederlande)
Fax: (+31) 317-484-914
E-Mail: han.zuilhof@wur.nl

[**] Diese Arbeit wurde durch das deutsch-niederländische INTERREG-IV-Programm, die EU (europäischer Fonds für regionale Entwicklung), das Ministerium für Wirtschaft, Energie, Bauen, Wohnen und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen, das Niederländische Wirtschaftsministerium, Provinz Gelderland, und das Programm-Management Euregio Rhein-Waal gefördert.

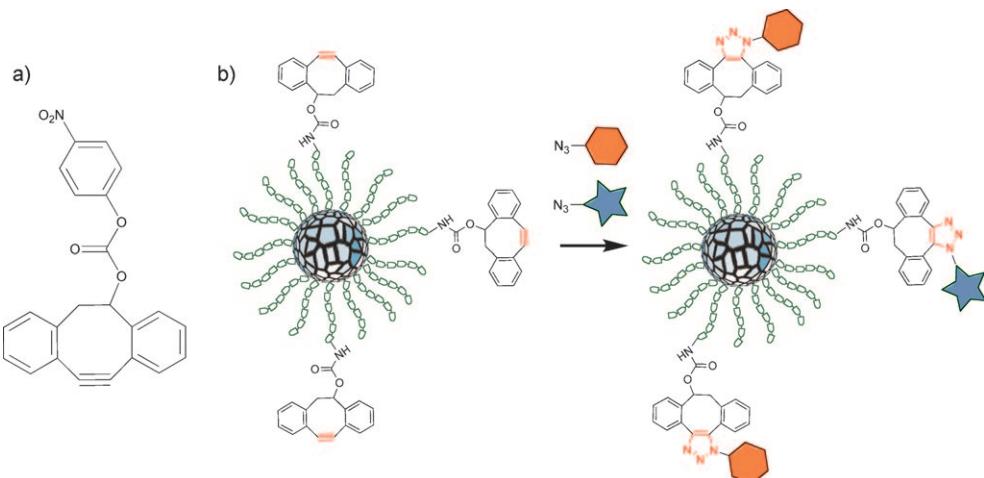


Abbildung 1. a) Struktur von Dibenzocyclooctin mit einer aktivierten Estereinheit. b) Micelle mit cyclooctinfunktionalisierter Oberfläche. Blaue Sterne und orange Sechsecke repräsentieren unterschiedliche funktionelle Gruppen.

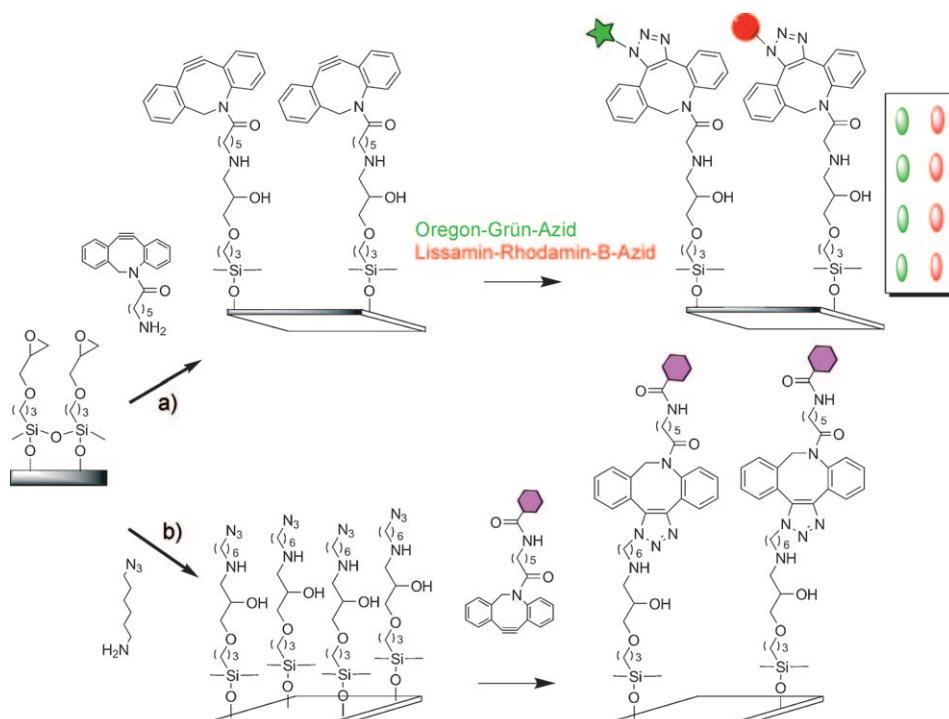


Abbildung 2. a) Azadibenzocyclooctinfunktionalisierte Glasoberfläche, die anschließend mit fluoreszierenden Gruppen behandelt wurde (grüner Stern, roter Kreis). b) Inverse kupferfreie Klickreaktion ausgehend von azidterminierten Oberflächen und anschließende lokale Immobilisierung eines Fluoreszenzmarkers (violettes Sechseck).

von Dibenzocyclooctin beschleunigt, erreichte die Klickreaktion mit nur 0.1 mm Azid Oberflächensättigung nach nur 100 min bei Raumtemperatur. Diese hohe Effizienz bei niedrigen Konzentrationen ist insofern von Bedeutung, als die Menge an maßgeschneidertem Azid entweder durch die Verfügbarkeit der derivatisierten Naturstoffe oder durch die Komplexität der Synthese begrenzt sein kann. Die Autoren untersuchten auch die inverse Reaktion, bei der azidfunktionalisierte Oberflächen mit ADIBO behandelt wurden. Die Anwendung von routinemäßig zugänglichen, azidfunktionalisierten Oberflächen in Verbindung mit ADIBO eröffnete

einen vielseitigen Zugang zur Oberflächenbiokonjugation durch die Biotinylierung der Oberfläche, die Immobilisierung von Proteinen und das Mustern der Oberfläche mit Fluoreszenzsonden.

Während die oben genannten Reaktionen einfach durchzuführen sind, wird das Lokalisieren im Wesentlichen durch das lokale Auftröpfen einer Reaktionslösung auf eine Oberfläche erreicht. Obwohl das Spotting mit Mikroadditionssystemen routinemäßig durchführbar ist, wäre eine Kombination mit anderen Lokalisierungsverfahren wünschenswert. Eine derartige Technik entwickelten vor kurzem

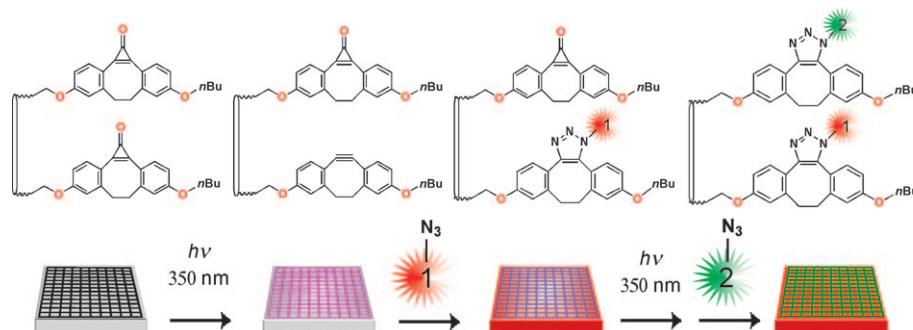


Abbildung 3. Musterbildung auf Klickoberflächen mithilfe einer Sequenz aus lichtinduzierter lokaler Entschützung und Cycloaddition.^[8]

Orski et al., die eine geschützte Dibenzocyclooctineinheit mit einem Aminlinker an einer Polymerbürste auf Siliciumoxid befestigten.^[8] Die Dibenzocyclooctineinheit war mit einer photoentfernbaren Cyclopropenoneinheit maskiert, die einerseits thermisch völlig stabil ist, andererseits aber durch Bestrahlung mit UV-Licht schnell aktiviert werden kann (350 nm, 3 min; Abbildung 3). Dieser photochemische Schritt führte zu einem quantitativen CO-Verlust und erzeugte an den bestrahlten Punkten reaktive C≡C-Bindungen. Die Autoren demonstrierten diese Demaskierung durch einen Prozess aus lokaler Bestrahlung, Reaktion mit N₃-gebundenem Farbstoff 1, nachfolgendem Entschützen aller restlichen Cyclopropenoneinheiten und Reaktion aller neu gebildeten Dreifachbindungen mit N₃-gebundenem Farbstoff 2, was völlig problemlos eine strukturierte Oberfläche ergab.

Die Reinigung von Oberflächen durch nichtchromatographische Methoden ist wie in der Polymerwissenschaft^[9] essenziell und treibt die Entwicklung von echten Klickreaktionen voran: Nach einer unvollständigen Umsetzung können sich Oberflächen geringfügig oder auch erheblich anders als Oberflächen mit quantitativ modifizierten Endgruppen verhalten; aber sie können normalerweise nicht in vollständig substituierte Oberflächen überführt werden. Im besten Fall kann eine generische Passivierungsmethode (Oberflächenblockierung) eingesetzt werden, um die Probleme zu minimieren. Somit gibt die oben vorgestellte Chemie zudem Hinweise auf weitere erforderliche Entwicklungen. Erstens muss die Reaktionseffizienz quantitativ sein. Die Schwierigkeit, dieses Ziel zu erreichen, zeigt sich in der eleganten Arbeit von Boons et al.,^[5] in der eine Ausbeute von 58–76 % für die Cycloadditionsreaktion genannt wird. Zweitens ist es angesichts der Größe beispielsweise der Dibenzocyclooctineinheit unwahrscheinlich, dass sämtliche Azide auf azidterminierten Oberflächen oder in den oben angeführten Polymerbürsten reagieren. Da diese Oberflächen für biodiagnostische Aufgaben von besonderem Interesse sind, sollte eine Kreuzkontamination möglichst nahe null liegen, was wenigstens die Entwicklung von quantitativen Blockierungsverfahren erfordert, wenn die Cycloadditionsreaktion nicht

quantitativ ausgeführt werden kann. Ferner neigen hoch reaktive Cycloalkineinheiten dazu, außer mit Aziden auch mit anderen Gruppen zu reagieren, was die Lebensdauer der cycloalkinterminierten Oberflächen verringert. Abhängig von der Anwendung ist deshalb eine feineinstellbare Reaktivität dieser Gruppen eine Aufgabe, die weitere vergleichende kinetische Studien erfordert. Die oben vorgestellten Arbeiten zeigen also sowohl die Möglichkeiten als auch die Herausforderungen dieses spannenden Teilgebiets der organischen Oberflächenchemie auf.

Eingegangen am 1. Februar 2011
Online veröffentlicht am 3. Mai 2011

- [1] J. P. Collman, N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **2004**, *20*, 1051–1053.
- [2] M. Yang, R. L. M. Teeuwen, M. Giesbers, J. Baggerman, A. Arafat, F. A. de Wolf, J. C. M. van Hest, H. Zuilhof, *Langmuir* **2008**, *24*, 7931–7938.
- [3] a) D. Weinrich, P. C. Lin, P. Jonkheijm, U. T. T. Nguyen, H. Schröder, C. M. Niemeyer, K. Alexandrov, R. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1274–1279; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1252–1257; b) M. A. Caipa Campos, J. M. J. Paulusse, H. Zuilhof, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5512–5514; c) C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1584–1617; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
- [4] a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; b) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.
- [5] J. Guo, G. Chen, X. Ning, M. A. Wolfert, X. Li, B. Xu, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13360–13366.
- [6] A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 583–588.
- [7] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.
- [8] S. V. Orski, A. A. Poloukhine, S. Arumugam, L. D. Mao, V. V. Popik, J. Locklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024–11026.
- [9] C. Barner-Kowollik, F. E. Du Prez, P. Espeel, C. J. Hawker, T. Junkers, H. Schlaad, W. Van Camp, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 61–64; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 60–62.