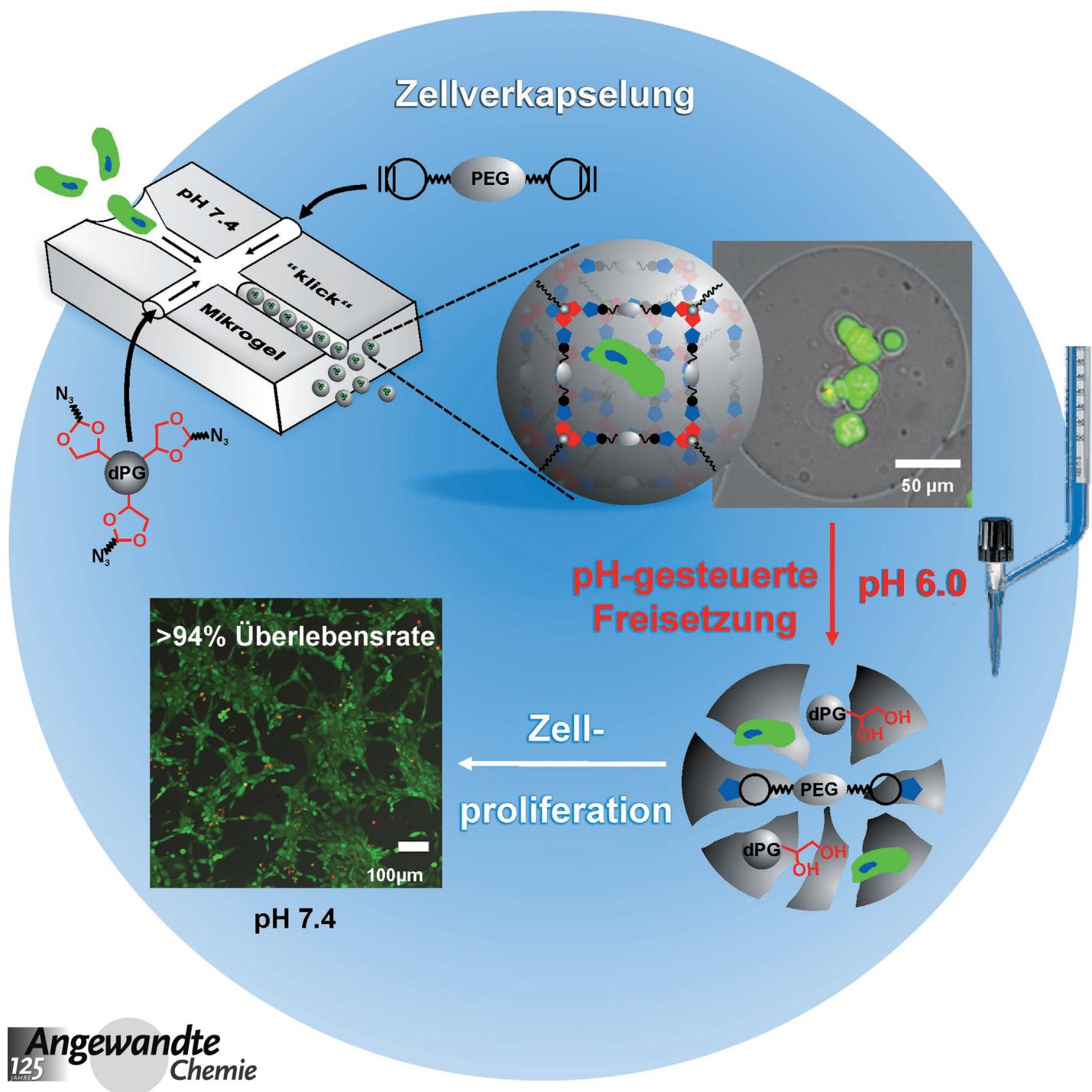


# Ein Mikrogelbaukasten für die bioorthogonale Verkapselung und pH-gesteuerte Freisetzung von lebenden Zellen\*\*

Dirk Steinhilber, Torsten Rossow, Stefanie Wedepohl, Florian Paulus, Sebastian Seiffert und Rainer Haag\*



**Abstract:** pH-Spaltbare zellbeladene Mikrogele mit exzellenten Langzeitüberlebensraten wurden durch Kombination bio-orthogonaler spannungsvermittelter Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) und Tröpfchen-basierter Mikrofluidik hergestellt. Poly(ethylenglycol)dicyclooctin und dendritisches Poly(glycerinazid) fungierten als bioinerte Mikrogelbausteine. Die Azid-Konjugation erfolgte mithilfe unterschiedlicher säurelabiler Benzacetallinker, wodurch eine präzise Steuerung der Abbaukinetik im interessanten pH-Bereich zwischen 4.5 und 7.4 ermöglicht wurde. Hierdurch konnte eine pH-gesteuerte Freisetzung der verkapselten Zellen auf Abruf erreicht werden, ohne ihre Überlebensrate oder Ausspreizung zu beeinträchtigen. Folglich können die Mikrogelpartikel für die temporäre Verkapselung von Zellen verwendet werden, wobei sich die Zellen während der Verkapselung studieren und manipulieren lassen. Anschließend können die Zellen durch Zersetzung des Mikrogelgerüstes isoliert und freigesetzt werden.

**H**ydrogele sind eine wichtige Klasse von Biomaterialien für Anwendungen in der regenerativen Medizin<sup>[1]</sup> und für die gesteuerte Freisetzung von therapeutischen Biomolekülen.<sup>[2]</sup> Dies liegt vor allem an ihren mechanischen Eigenschaften, die vielen Objekten in lebenden Systemen ähnlich sind. Daher sind Hydrogele ideale Gerüststrukturen für die Verkapselung, die Stabilisierung, die Kultivierung und den Transport von lebenden Zellen,<sup>[2a]</sup> Proteinen<sup>[3]</sup> und Oligonukleotiden.<sup>[4]</sup> Entscheidend für diese Anwendungen ist die Freisetzung dieser biologischen Objekte mit präziser Steuerung des Zielortes sowie der Freisetzungsgeschwindigkeit.<sup>[5]</sup> Um dieses Ziel zu erreichen, sind der Abbau des Hydrogels durch Spaltung von chemischen Bindungen innerhalb des Polymernetzwerkes, die darauffolgende Auflösung des Gels und die Freisetzung der verkapselten Gäste eine erfolgversprechende Strategie. Außer den photolytischen,<sup>[6]</sup> hydrolytischen<sup>[7]</sup> und enzymatischen<sup>[8]</sup> Abbaumechanismen ist auch die saure Hydrolyse bestens für Anwendungen geeignet, die eine gesteuerte Freisetzung erfordern.<sup>[9]</sup> Da Protonen für ihre

zentrale Rolle in der Zellkommunikation bekannt sind,<sup>[10]</sup> könnten verkapselfte Zellen aktiv die Hydrogelmatrix auflösen, wodurch sie direkten Einfluss auf die Zelldifferenzierung,<sup>[8]</sup> -proliferation<sup>[11]</sup> und -migration<sup>[12]</sup> nehmen können. Im Unterschied zum enzymatischen Abbau, der diffusionskontrolliert ist,<sup>[13]</sup> zeigt die saure Hydrolyse keine Diffusionslimitierung, da die geringe Größe der Protonen als Katalysator vernachlässigbar ist. Demzufolge hängt die Abbaukinetik ausschließlich von der Spaltung der chemischen Bindung ab, und somit kann die Freisetzung der Gäste am Zielort präzise gesteuert werden.

Sauer spaltbare Hydrogele wurden kürzlich durch freie radikalische Vernetzung<sup>[14]</sup> und Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) hergestellt.<sup>[15]</sup> Allerdings sind die Methoden nicht für die Verkapselung von empfindlichen Biomolekülen geeignet, da diese von freien Radikalen oder Metallionen geschädigt werden können.<sup>[16]</sup> Um jedoch eine homogene und effiziente Verkapselung zu erreichen, müssen die Zellen während der Bildung des Hydrogels verkapst werden. Folglich sind milde Vernetzungsreaktionen nötig, die 1) orthogonal zu den funktionellen Gruppen der Biomoleküle sind, 2) nicht zytotoxisch sind und 3) schnell bei 37°C ablaufen.<sup>[5]</sup> Die spannungskontrollierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) erfüllt diese Voraussetzungen<sup>[17]</sup> und wurde kürzlich für die Verkapselung von lebenden Zellen in makroskopischen Hydrogelen verwendet.<sup>[18]</sup> Wenngleich dieser Ansatz aussichtsreich ist, konnte keine Freisetzung der Zellen unter physiologischen Bedingungen erreicht werden. Dies ist allerdings für die Zelltherapie und für Anwendungen in der zellulären Biophysik notwendig.<sup>[19]</sup> Darüber hinaus sind Hydrogelpartikel mit Größen im Mikrometerbereich (Mikrogele) viel besser als makroskopische Hydrogele für diese Anwendungen geeignet, da Mikrogele die exakte Steuerung der zellulären Mikroumgebung ermöglichen.<sup>[20]</sup> Zusätzlich können Mikrogele mit Mikropipetten und Mikrospritzen gehandhabt werden.<sup>[21]</sup>

Hier präsentieren wir einen neuen Mikrogelbaukasten für die bioorthogonale Verkapselung von lebenden Zellen durch SPAAC und ihre programmierte Freisetzung durch Hydrolyse von Benzacetalen. Wir kombinierten diese Chemie mit Tröpfchen-basierter Mikrofluidik,<sup>[19a,22]</sup> um Säugetierzellen in stimuliresponsiven Mikrogele zu verkapsteln (Abbildung 1). Die Verwendung von unterschiedlich substituierten Benzacetalen als pH-spaltbare Linker, angebracht an einem dendritischen Baustein, ermöglichte die Steuerung der Freisetzungskinetik im interessanten pH-Bereich zwischen 4.5 und 7.4, ohne dabei die ursprünglichen mechanischen Eigenschaften der Matrix zu verändern. Diese beiden Parameter sind dafür bekannt, vorwiegend über das Schicksal der Zellen zu entscheiden.<sup>[23]</sup> Folglich ist unser Ansatz dem konventionell verwendeten enzymatischen Hydrogelabbau, bei dem die Abbaukinetik nur durch die Veränderung des ursprünglichen Vernetzungsgrades angepasst werden kann, überlegen.<sup>[8]</sup>

Um nicht spezifische Hydrogel-Zell-Wechselwirkungen zu verhindern, verwendeten wir zytokompatibles dendritisches Polyglycerin (dPG) und lineares Poly(ethylenglycol) (PEG)<sup>[15,24]</sup> als bioinerte Mikrogelbausteine.<sup>[25]</sup> In der hier vorgestellten Studie wurden homodifunktionales PEG-Dicyclooctin (PEG-DIC) und dPG-Polyazid hergestellt und als

[\*] D. Steinhilber,<sup>[+]</sup> T. Rossow,<sup>[+]</sup> Dr. S. Wedepohl, F. Paulus,

Dr. S. Seiffert, Prof. Dr. R. Haag

Freie Universität Berlin

Institut für Chemie und Biochemie

Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

E-Mail: haag@chemie.fu-berlin.de

Dr. S. Seiffert

Helmholtz-Zentrum Berlin, F-ISFM Weiche Materie und Funktionale Materialien, Berlin (Deutschland)

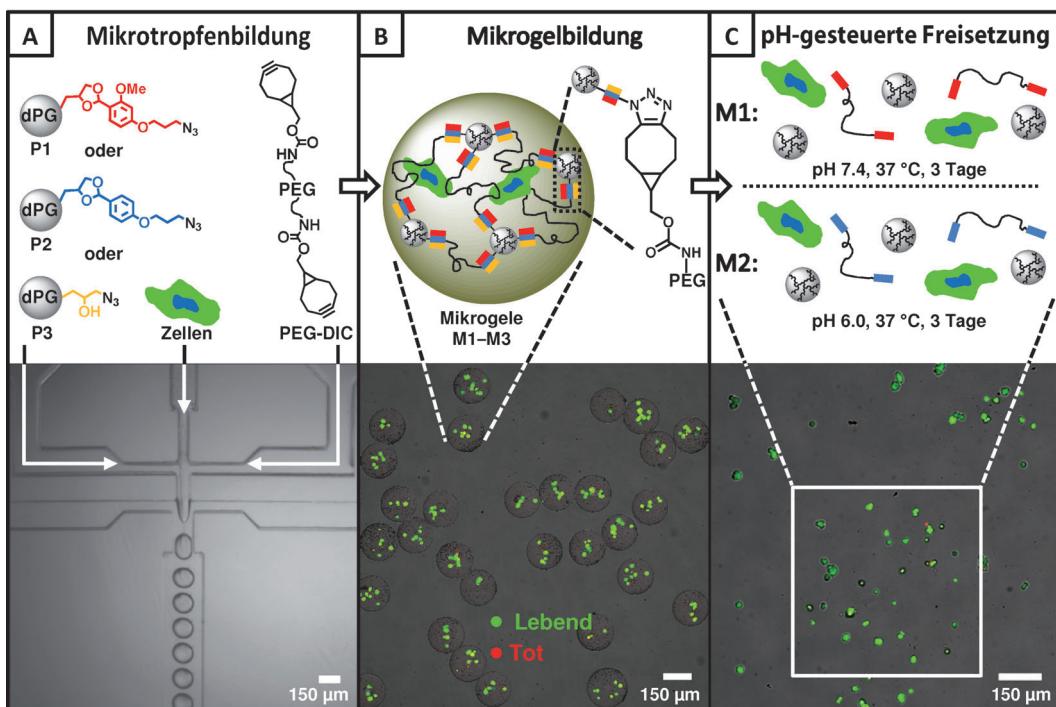
Dr. S. Seiffert, Prof. Dr. R. Haag

Helmholtz Virtuelles Institut – Multifunktionale Biomaterialien für die Medizin, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

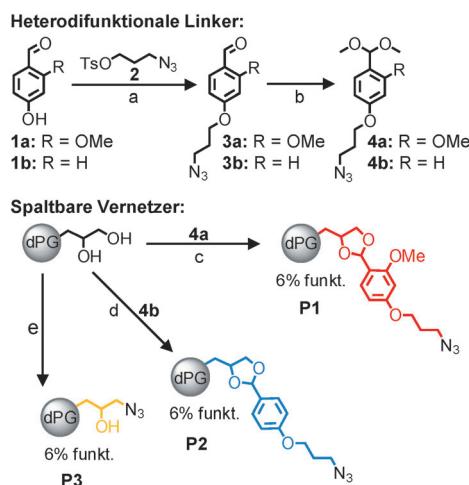
[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch den SFB 1112 (D.S.) und den SFB 765 (F.P., R.H.), das Liebig-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie (S.S.) und das Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin (T.R.) finanziert. Besonderer Dank gilt C. Schlesener und T. Becherer für die GPC- und MALDI-TOF-Messungen. Des Weiteren bedanken wir uns bei Hendrik Becker für das Übersetzen des Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308005> zu finden.



**Abbildung 1.** Zellverkapselung und Freisetzung: A) Unterschiedliche dPG-Azid-Makromonomere P1–P3 mit säurespaltbaren Linkern unterschiedlicher Hydrolysekinetik und PEG-Dicyclooctin wurden hergestellt. Eines der dPG-Makromonomere, der PEG-Dicyclooctin-Vernetzer und NIH 3T3-Zellen wurden in eine Mikrofluidikeinheit injiziert, die dazu diente, monodisperse, mikrometergroße Tröpfchen herzustellen. Anschließende Durchmischung der drei Flüssigkeiten innerhalb der monodispersen Tropfen führte zur Tropfengelierung durch SPAAC. B) Dadurch wurden mikrometergroße, zellbeladene Hydrogelpartikel M1–M3 gebildet. Die Überlebensrate der verkapselten Zellen betrug über 94%. Dies wurde mithilfe von Fluoreszenz-basierten „Live-Dead-Assays“ ermittelt, die lebende Zellen in Grün und tote Zellen in Rot anfärben. C) Die Inkubation der Mikrogele M1–M3 bei pH 7.4, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> führte zu einer Auflösung von M1 nach drei Tagen und einer Freisetzung der Zellen mit einer unveränderten Überlebensrate von 96%. Unter diesen Inkubationsbedingungen zeigten die Mikrogele M2 keinen vollständigen Abbau, und auch nach zweiwöchiger Inkubation wurde keine Freisetzung der Zellen beobachtet. Die Inkubation der Mikrogele M2 bei pH 6.0, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> führte zu einer vollständigen Auflösung der Partikel nach drei Tagen und einer Freisetzung der Zellen mit einer unveränderten Überlebensrate von 94%. Die Mikrogele M3 zeigten keine Auflösung bei pH-Werten zwischen 6.0 und 7.4.

Makromonomere für die In-situ-Vernetzung durch SPAAC verwendet. Ein Mikrogelabbau bei niedrigem pH-Wert wurde ermöglicht, indem die Bindung des Azids an dPG über einen säurelabilen Benzacetallinker erfolgte. Zunächst wurden heterodifunktionale Linker synthetisiert, die eine terminale Azid- und Dimethylacetalgruppe trugen (Schema 1). Durch die Verwendung von aromatischen Kernsegmenten, die entweder eine elektronenschiebende Methoxygruppe in *ortho*-Position zum Aldehyd (**1a**) oder ein Wasserstoffatom (**1b**) tragen, ist es möglich, die Abbaukinetik des Acetals zu steuern, da diese stark von der Elektronendichte des Acetals abhängt.<sup>[26]</sup> Diese Synthese basiert auf *para*-Hydroxybenzaldehyd als Ausgangssubstanz, da Phenolate exzellente Nukleophile für Kupplungsreaktionen mit elektrophilen Aziden **2** sind. Durch die hohen Ausbeuten der Reaktionen und durch die kommerzielle Verfügbarkeit der Startmaterialien konnte die Synthese dieser Verbindungen im Multigramm-Maßstab erfolgen. Anschließend wurden die Aldehyde **3a** und **3b** durch die Bildung von Dimethylacetalen aktiviert, wodurch die Zwischenprodukte **4a** und **4b** erhalten wurden. Die Linker konnten durch eine säurekatalysierte Transacetalisierung an dPG gekuppelt werden, wobei Reaktionsbedingungen, wie kürzlich von uns und anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht, verwendet wurden.<sup>[15,27]</sup> Dadurch

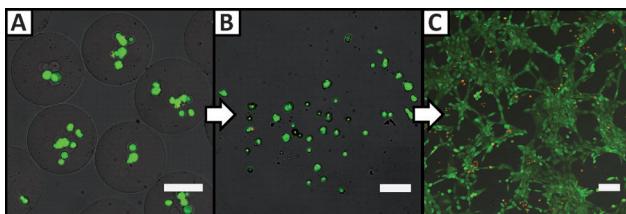


**Schema 1.** Allgemeines Reaktionsschema für die Herstellung der säurelabilen dPG-Polyazide (P1 und P2) und des stabilen dPG-Polyazids (P3) mit einem Funktionalisierungsgrad von 6%. Es wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet: a) Aceton, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Rückfluss, 12 h, 81%; b) Methanol, Trimethylorthoformiat, PTSA, Rückfluss, 1 h, vollständige Umsetzung; c) DMF, PTSA, RT, 3 h, 80%; d) DMF, PTSA, RT, 3 h, 83%; e) synthetisiert entsprechend einer veröffentlichten Vorschrift.<sup>[28]</sup> PTSA = *para*-Toluolsulfonsäure, Ts = Tosyl.

konnten zwei Azid-funktionalisierte dPG-Makromonomere mit unterschiedlicher Abbaukinetik (**P1** und **P2**) hergestellt werden. Zusätzlich synthetisierten wir nichtabbaubares dPG-Azid (**P3**) als Kontrollsubstanz.<sup>[28]</sup> Da Azide in vielen weiteren chemischen Reaktionen Verwendung finden und zusätzlich in andere nützliche reaktive Gruppen umgewandelt werden können,<sup>[29]</sup> wird dieser Ansatz breiten Nutzen für Anwendungen finden, die eine stimuliresponsive Bindungsspaltung erfordern. Für die Synthese von PEG-DIC verwendeten wir eine Vorschrift von van Delft et al.<sup>[30]</sup> und synthetisierten Cyclooctine mit Carbonatfunktionalitäten. Dabei konnte der PEG-DIC-Vernetzer über eine Carbamatbindung zwischen PEG-Diamin und dem aktivierte Cyclooctin gebildet werden.

Mit diesen neuen Makromonomeren konnten mithilfe Tröpfchen-basierter Mikrofluidik die NIH 3T3-zellbeladenen Mikrogele **M1–M3** mit unterschiedlicher Abbaukinetik hergestellt werden (Abbildung 1A; Hintergrundinformationen (SI) für weitere Details). Die Mikrogele quollen im Zellmedium auf eine einheitliche Größe von 170 µm an und enthielten gleichmäßig verteilte Zellen (Abbildung 1B).

Um den Quellungsgrad und damit die mechanischen Eigenschaften der Mikrogele konstant zu halten, wurden dPG-Polyazid-Makromonomere **P1–P3** mit dem gleichen Molekulargewicht und Funktionalisierungsgrad verwendet. Außerdem enthielten alle Mikrogele **M1–M3** den gleichen Anteil an Polymer (217 g L<sup>-1</sup>). Durch die Verwendung von Modellmikrogele<sup>[22a]</sup> mit der gleichen Zusammensetzung wie jener der zuvor berichteten Mikrogele, jedoch ohne eingekapselte Zellen, konnten wir gravimetrisch den massebezogenen Quellungsgrad bestimmen. Hierbei gilt  $Q = w_{\text{nass}}/w_{\text{trocken}}$ , wobei  $w_{\text{nass}}$  die Masse des gequollenen und  $w_{\text{trocken}}$  die Masse des trockenen Mikrogele ist. Für die abbaubaren und die stabilen Mikrogele wurden nahezu identische  $Q$ -Werte im Bereich zwischen 20 und 26 erhalten. Somit konnte die Überlebensrate der Zellen in den drei unterschiedlichen Mikrogeleproben **M1–M3** in Abhängigkeit ihrer Abbaukinetik, aber unabhängig vom ursprünglichen Quellungsgrad untersucht werden. Nach einem Tag der Verkapselung konnten exzellente Zellüberlebensraten von über 94% in allen Mikrogeleproben erhalten werden (Abbildung 2A und Abbildung S3 (SI)). Sogar eine Woche nach der Zellverkapselung und -kultivierung bei pH 7.4, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> war keine Minderung der Zellüberlebensrate in den Mikrogele **M2**

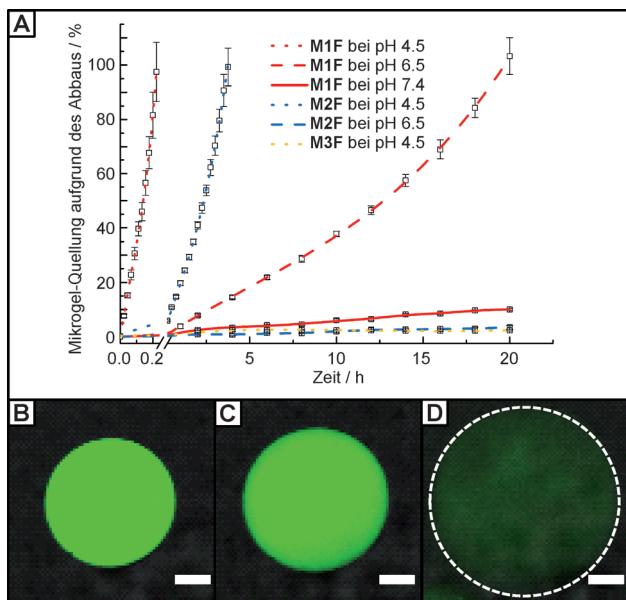


**Abbildung 2.** Aufnahmen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, die nach Färbung der Zellen mit einem „Live-Dead-Assay“ erstellt wurden. Grüne Färbung kennzeichnet lebende Zellen, während rote Färbung tote Zellen markiert. A) Zellbeladene Mikrogele **M1** am Tag 1. B) Gerade freigesetzte Zellen aus **M1** am Tag 3. C) Zellen aus **M1** nach der Freisetzung und anschließenden Inkubation in einer Polystyrolzellkulturschale. Alle Maßstabsbalken kennzeichnen 100 µm.

und **M3** festzustellen. Im Falle des Mikrogele **M1** wurden nach drei Tagen eine vollständige Auflösung der Matrix und eine Freisetzung der Zellen mit einer exzellenten Überlebensrate von 96% (Abbildung 2B) beobachtet. Im Unterschied dazu konnte unter den gleichen Inkubationsbedingungen während einer zweiwöchigen Beobachtungszeit keine Auflösung der Mikrogele **M2** und **M3** festgestellt werden. Die Mikrogele **M2** lösten sich durch Inkubation bei pH 6.0, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bereits nach drei Tagen auf, wodurch ebenfalls Zellfreisetzung mit ausgezeichneten Überlebensraten von 94% (Abbildung S4 (SI)) erreicht wurde. Nach ihrer Freisetzung zeigten die Zellen eine sphärische Morphologie, da sie in einem bioinerten Material verkapselt worden waren und sich dort nicht hatten ausbreiten oder anhaften können. Nach elf weiteren Inkubationstagen in einer Polystyrolzellkulturschale wurden die freigesetzten Zellen erneut untersucht. Dabei wurden sich stark vermehrende und sich ausbreitende Zellen beobachtet (Abbildung 2C). Demzufolge verringerten die Verkapselungschemie und der darauffolgende Abbau der Mikrogele in Polyglycerin und Benzaldehyd-terminiertes PEG nicht die Überlebensraten, in Übereinstimmung mit In-vivo-Studien aus der Literatur.<sup>[25a,31]</sup> Somit ist unser neuer Mikrogelebaukasten ein ausgezeichneter Kandidat für die Verkapselung und Implantation von therapeutischen Stammzellen in Tumorgewebe (pH 6.5–7.0).<sup>[32]</sup> Nach einigen Tagen, in denen das Immunsystem bekanntermaßen am meisten Schaden verursacht, können die Zellen aus den pH-responsiven Mikrogele freigesetzt werden und wären daher in der Lage, sich zu differenzieren, krankes Gewebe wiederaufzubauen und verbleibende Tumorzellen nach der Tumorsektion zu zerstören.<sup>[33]</sup>

Um festzustellen, ob die verkapselten Zellen aktiv die Mikrogele **M1** abbauen können, wurden Mikrogele mit der gleichen Polymerzusammensetzung, aber ohne eingeschlossene Zellen unter den gleichen Bedingungen hergestellt und kultiviert. Eine verlängerte Zeit von vier Tagen wurde für den Abbau beobachtet, woraus sich schließen lässt, dass die Zellen durch ihre metabolische Aktivität Säure an die Mikrogele abgaben und diese sich daher von innen heraus zerstzten.<sup>[10]</sup>

Zur Quantifizierung der Abbaukinetik der Mikrogele wurde der PEG-Vernetzer mit einem Azid-funktionalisierten, grün fluoreszierenden Farbstoff markiert, und fluoreszieren die Mikrogele **M1F–M3F** (ohne Zellbeladung, aber mit dem gleichen Anteil an Makromonomeren wie in **M1–M3**) wurden hergestellt. Nach der Aufarbeitung wurden diese Mikrogele unter basischen Bedingungen aufbewahrt, damit sie ihren Gleichgewichts-Quellungsgrad ohne Abbau erreichen konnten. Daraufhin wurden die Mikrogele mit Pufferlösungen (pH 4.5, 6.5 und 7.4) inkubiert, und ihre Quellung bei 25°C wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Quellen der Mikrogele bei niedrigem pH-Wert ist auf die Acetalhydrolyse und die Verringerung des Vernetzungsgrades zurückzuführen, da in einem Kontrollexperiment keine Quellung für die stabilen Mikrogele **M3** beobachtet wurde. Die Quellung der Partikel als Funktion der Zeit wurde in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 3 A); ein typischer Verlauf dieses Abbauexperiments ist in Abbildung 3B–D dargestellt. Dabei wurden die Mikrogele **M1F** bei allen ge-



**Abbildung 3.** Verfolgung der Quellung der Mikrogelpartikel als Indikator für den Abbau bei verschiedenen pH-Werten. A) Fluoreszenzmarkierte Mikrogelle M1F–M3F mit der gleichen Zusammensetzung wie jener der Mikrogelle M1–M3, aber ohne verkapselte Zellen, wurden bei 25 °C und unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Die Zunahme ihrer Durchmesser kann als Messgröße für die Quellung als Folge des Abbaus betrachtet werden. Die maximale Zunahme der Durchmesser hatte für alle Mikrogelproben den gleichen Wert (24–26 %, innerhalb der experimentellen Genauigkeit). Somit konnte dieser maximale Durchmesserzuwachs auf 100 % normiert werden. Die Linien wurden manuell eingefügt, um den Zuwachs besser zu erkennen. B–D) Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen eines Partikels aus dem Ansatz M1F bei pH 4.5 B) zu Beginn der Inkubation, C) bei halber Zeit der Auflösung und D) bei nahezu vollständiger Auflösung des Partikels. Alle Maßstabsbalken kennzeichnen 50 µm.

testeten pH-Werten am schnellsten abgebaut. Bei einem pH-Wert von 4.5 löste sich **M1F** bereits nach 13 min vollständig auf. Eine solche rapide Partikelauflösung ist ideal für die schlagartige Freisetzung von aktiven Substanzen. **M1F** zerstörte sich bei pH 6.5 zügig nach 20 h, wodurch diese Mikrogelle für die Zelltherapie in Tumoren und entzündeten Geweben geeignet sind.<sup>[33,34]</sup> Für die gleiche Inkubationszeit bei pH 7.4 zeigte **M1F** keine signifikante Zersetzung. Somit ist dieses System exzellent für die Verkapselung und Stabilisierung von Zellen unter physiologischen Bedingungen und die Freisetzung der Zellen nach der Injektion am Zielort geeignet. Die Mikrogelle **M2F** lösten sich langsamer auf, mit einem vollständigen Abbau nach 3.75 h bei pH 4.5 und ohne signifikante Zersetzung bei pH 6.5. Diese Art von Mikrogelen ist ideal für Anwendungen, bei denen Zellen über einen längeren Zeitraum stabilisiert und freigesetzt werden sollen. Die Mikrogelle **M1F** und **M2F** haben eine auffallend unterschiedliche Abbaukinetik bei physiologisch relevanten pH-Werten, was sie als Transportsysteme für eine Vielzahl von biologischen Anwendungen interessant macht.

Wir haben in dieser Studie einen neuen Makromonomerbauskasten entwickelt, der es ermöglicht, durch bioorthogonale Vernetzungsschemie lebende Zellen in Mikrogelle

zu verkapseln und diese erstmals unter sauren Bedingungen gezielt freizusetzen. Die verkapselten Zellen konnten innerhalb der Mikrogelle unter vollständiger Erhaltung ihrer Überlebensrate kultiviert werden. Die Auflösung der Mikrogelle konnte präzise durch unterschiedlich substituierte Benzacetale als säurespaltbare Linker gesteuert werden, wobei keine schädlichen Effekte auf die verkapselten und freigesetzten Zellen beobachtet wurden. Folglich können die Mikrogelpartikel für die temporäre Verkapselung von Zellen verwendet werden, wodurch sich die Zellen während der Verkapselung studieren und manipulieren lassen und anschließend je nach Bedarf durch Zersetzung des Mikrogelgerüstes isoliert und freigesetzt werden können. Somit wird unser Ansatz zu tieferen Einblicken in das zelluläre Überleben in künstlichen dreidimensionalen Matrixumgebungen führen. Darüber hinaus hat unser Baukasten das Potenzial zur Stabilisierung und gesteuerten Freisetzung vieler anderer therapeutisch relevanter biologischer Systeme wie Proteine, Gene und sogar Bakterien.<sup>[35]</sup>

Eingegangen am 11. September 2013  
Online veröffentlicht am 29. November 2013

**Stichwörter:** Gele · Hydrolysen · Klick-Chemie · pH-Spaltbare Linker · Reversible Zellverkapselung

- [1] a) K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1880; b) B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, N. A. Peppas, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3307–3329.
- [2] a) T.-A. Read, D. R. Sorenson, R. Mahesparan, P. O. Enger, R. Timpl, B. R. Olsen, M. H. B. Hjelstuen, O. Haraldseth, R. Bjerkvig, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 29–34; b) D. Seliktar, *Science* **2012**, *336*, 1124–1128.
- [3] T. Vermonden, R. Censi, W. E. Hennink, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2853–2888.
- [4] H. J. Kong, D. J. Mooney, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 455–463.
- [5] P. M. Kharkar, K. L. Kiick, A. M. Kloxin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7335–7372.
- [6] a) A. M. Kloxin, A. M. Kasko, C. N. Salinas, K. S. Anseth, *Science* **2009**, *324*, 59–63; b) C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1852–1855; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1816–1819.
- [7] A. E. Rydholm, C. N. Bowman, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4495–4506.
- [8] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 458–465.
- [9] E. Fleige, M. A. Quadir, R. Haag, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 866–884.
- [10] J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50–61.
- [11] K. J. Lampe, K. B. Bjugstad, M. J. Mahoney, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1857–1866.
- [12] G. P. Raeber, M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1374–1388.
- [13] L. M. Weber, C. G. Lopez, K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *90*, 720–729.
- [14] a) M. C. Parrott, J. C. Luft, J. D. Byrne, J. H. Fain, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928–17932; b) N. Murthy, M. Xu, S. Schuck, J. Kunisawa, N. Shastri, J. M. J. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4995–5000.

- [15] D. Steinhilber, M. Witting, X. Zhang, M. Staegemann, F. Paulus, W. Friess, S. Küchler, R. Haag, *J. Controlled Release* **2013**, *169*, 289–295.
- [16] a) N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, W. J. A. Dhert, *Biomaterials* **2009**, *30*, 344–353; b) G. J. Brewer, *Clin. Neurophysiol.* **2010**, *121*, 459–460; c) D. Steinhilber, S. Seiffert, J. A. Heyman, F. Paulus, D. A. Weitz, R. Haag, *Biomaterials* **2011**, *32*, 1311–1316.
- [17] a) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797; b) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [18] C. A. DeForest, B. D. Polizzotti, K. S. Anseth, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 659–664.
- [19] a) D. Velasco, E. Tumarkin, E. Kumacheva, *Small* **2012**, *8*, 1633–1642; b) W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 223–236.
- [20] A. Khademhosseini, R. Langer, J. Borenstein, J. P. Vacanti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2480–2487.
- [21] G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. D. Vos, G. Hortalano, D. Hunkeler, I. Lacik, A. M. J. Shapiro, J. L. Pedraz, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 104–107.
- [22] a) T. Rossow, J. A. Heyman, A. J. Ehrlicher, A. Langhoff, D. A. Weitz, R. Haag, S. Seiffert, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4983–4989; b) S. Seiffert, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11674–11680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11462–11468.
- [23] B. Trappmann, J. E. Gautrot, J. T. Connelly, D. G. T. Strange, Y. Li, M. L. Oyen, M. A. Cohen Stuart, H. Boehm, B. Li, V. Vogel, J. P. Spatz, F. M. Watt, W. T. S. Huck, *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 642–649.
- [24] M. Weinhart, I. Grunwald, M. Wyszogrodzka, L. Gaetjen, A. Hartwig, R. Haag, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 1992–2000.
- [25] a) A. L. Sisson, D. Steinhilber, T. Rossow, P. Welker, K. Licha, R. Haag, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7676–7681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7540–7545; b) M. Calderón, M. A. Quadir, S. K. Sharma, R. Haag, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 190–218.
- [26] A. P. Griset, J. Walpole, R. Liu, A. Gaffey, Y. L. Colson, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2469–2471.
- [27] L. Cui, J. L. Cohen, C. K. Chu, P. R. Wich, P. H. Kierstead, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15840–15848.
- [28] S. Roller, H. Zhou, R. Haag, *Mol. Diversity* **2005**, *9*, 305–316.
- [29] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5320–5374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188–5240.
- [30] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9612–9615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.
- [31] C. Ding, L. Zhao, F. Liu, J. Cheng, J. Gu, S. Dan, C. Liu, X. Qu, Z. Yang, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1043–1051.
- [32] a) E. Santos, J. L. Pedraz, R. M. Hernández, G. Orive, *J. Controlled Release* **2013**, *170*, 1–14; b) M. Prewitz, F. P. Seib, T. Pompe, C. Werner, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1420–1431.
- [33] T. M. Kauer, J.-L. Figueiredo, S. Hingtgen, K. Shah, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 197–204.
- [34] L. S. Sasportas, R. Kasmieh, H. Wakimoto, S. Hingtgen, J. A. J. M. van de Water, G. Mohapatra, J. L. Figueiredo, R. L. Martuza, R. Weissleder, K. Shah, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4822–4827.
- [35] S. Jakiela, T. S. Kaminski, O. Cybulski, D. B. Weibel, P. Garstecki, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9076–9079; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8908–8911.