

(19)



Deutsches  
Patent- und Markenamt



(10) **DE 10 2013 225 772 B4** 2017.03.02

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2013 225 772.4**

(22) Anmeldetag: **12.12.2013**

(43) Offenlegungstag: **18.06.2015**

(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **02.03.2017**

(51) Int Cl.: **C08G 73/06 (2006.01)**

**C08G 63/08 (2006.01)**

**C08G 63/91 (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:

**Technische Universität Dresden, 01069 Dresden,  
DE**

(74) Vertreter:

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

(72) Erfinder:

**Scharnweber, Dieter, Prof. Dr. habil, 01824  
Gohrisch, DE; Jordan, Rainer, Prof., 01705 Freital,  
DE; Pamula, Elzbieta, Prof., Krakow, PL**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

**WO 2011/ 127 256 A1**

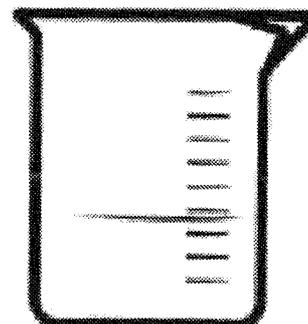
**WO 2013/ 119 650 A1**

**HOOGENBOOM, R.: Poly(2-oxazoline)s:  
A polymer class with numerous potential  
applications. In: Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 48,  
(2009), S. 7978-7994**

(54) Bezeichnung: **Oberflächenfunktionalisiertes Polymer für biologische Anwendungen und Verfahren zu dessen Herstellung**

**PLGA+PEG+  
Dichlormethan+Poly  
(2-oxazolin) als AM**

(57) Hauptanspruch: Oberflächenfunktionalisiertes Polymer für biologische Anwendungen, das in wässrigen Systemen eine feste hydrophobe Phase bildet, in der im Bereich der Phasengrenze zur Umgebung die hydrophoben Bereiche von amphiphilen Molekülen zumindest teilweise angeordnet sind, wobei die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle als freie Enden mit ihrem jeweiligen hydrophilen Terminus hin zur hydrophilen Umgebung ausgerichtet sind und wobei als amphiphile Moleküle solche aus der Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e ausgewählt sind, an deren jeweiligem hydrophilen Terminus ein biologisch funktionelles Molekül konjugiert ist.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein oberflächenfunktionalisiertes Polymer für biologische Anwendungen und ein Verfahren zu dessen Herstellung, das heißt ein Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung von Polymeren. Insbesondere betrifft die Erfindung die biologische Funktionalisierung von Polyestern bzw. von auf Polyestern basierenden Polymeroberflächen für biologische Anwendungen.

**[0002]** Bisher erfolgten derartige Funktionalisierungen entweder durch (i) kovalente Anbindung biologisch funktioneller Moleküle (BFM) oder (ii) durch deren adsorptive Immobilisierung. So ist zum Beispiel in der WO 2002/083931 A2 ein Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen, insbesondere Enzymen oder enzymatischen Systemen, an plasmachemisch aktivierte beziehungsweise funktionalisierte, chemisch inerte Trägeroberflächen, zum Beispiel polyhalogenierte Polymere, beschrieben. Dabei erfolgt zunächst eine Aktivierung der chemisch inerten Trägeroberfläche durch Modifizierung der Trägeroberfläche mit plasmachemischen Methoden; anschließend eine Anbindung mindestens eines zu immobilisierenden Biomoleküls, gegebenenfalls nach seiner Überführung in einen aktivierten, anbindungsfähigen Zustand, an die aktivierte Trägeroberfläche. Die Biomoleküle können mittels kovalenter und/oder ionischer Bindung über die reaktive(n) funktionelle(n) Gruppe(n) unmittelbar oder mittelbar an die Trägeroberfläche angebunden werden.

**[0003]** Diese bisher bekannten Lösungen weisen die folgenden Nachteile auf:

- (i) Diese sind chemisch aufwändig, erfordern zusätzliche Prozessschritte und sind für viele Arten von Oberflächen schwer anwendbar.
- (ii) Bei diesen Lösungen besteht eine geringe und wenig definierte Stabilität der Funktionalisierung, die biologische Aktivität der biologisch funktionellen Moleküle wird unter Umständen durch eine direkte Wechselwirkung mit der Polymeroberfläche beeinflusst.

**[0004]** Aus der WO 2005/042025 A1 ist ein Verfahren bekannt, bei dem ein Medizinprodukt beschichtet wird, wobei die Beschichtung ein bioaktives Mittel, wie zum Beispiel ein pharmazeutisches Mittel oder ein Medikament, umfasst, das über einen Linker mit einem Copolymer verbunden ist. Das Copolymer besteht aus selbstanordnenden amphiphilen Molekülen mit jeweils mindestens einem hydrophilen Bereich und mindestens einem hydrophoben Bereich.

**[0005]** Auch in der Druckschrift HOOGENBOOM, R.: Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. In: Angew. Chem. Int. Ed., Vol. 48, (2009), S. 7978–7994, wird auf die Selbstorganisation amphiphiler Moleküle, zum Beispiel von Copo-

ly(2-oxazolin)en, verwiesen. Diese Druckschrift beschreibt des Weiteren zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für Poly(2-oxazolin)e, insbesondere biomedizinische Verwendungen. So wird unter anderem die Konjugation von Poly(2-oxazolin)en mit Proteinen beschrieben, mit Poly(2-oxazolin)en funktionalisierte Wirkstoffträger sowie als Biozid-endfunktionalisierte Polymere.

**[0006]** Die WO 2011/127256 A1 beschreibt amphiphile Poly(oxazolin)e, konjugiert mit Polypeptiden. Das amphiphile Blockcopolymer umfasst wenigstens ein hydrophiles Segment, zum Beispiel Poly(2-Ethyl-2-oxazolin), und wenigstens ein hydrophobes Segment, zum Beispiel Poly(2-Butyl-2-oxazolin).

**[0007]** Aus der WO 2013/119650 A1 ist ein amphiphiles Blockcopolymer bekannt, das mit Protein konjugiert ist. Das amphiphile Blockcopolymer umfasst wenigstens ein hydrophiles Poly(2-oxazolin)-Segment und wenigstens ein hydrophobes Poly(2-oxazolin). Es kann des Weiteren zum Beispiel ein Segment aus einer Gruppe von Verbindungen, umfassend Polylactide, Poly(lactid-co-glycolsäure), Poly(lactid-co-glycolid) und Polycaprolacton, enthalten.

**[0008]** Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines oberflächenfunktionalisierten Polymers – mit einer im Vergleich zum Stand der Technik verbesserten Stabilität der Funktionalisierung – für biologische Anwendungen sowie eines einfachen und kostengünstigen Verfahrens zu dessen Herstellung, das heißt ein Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung von Polymer substraten mit dem Ziel einer definierten Immobilisierung und Präsentation der biologisch funktionellen Moleküle an Grenzflächen.

**[0009]** Die Lösung der Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in einem oberflächenfunktionalisierten Polymer für biologische Anwendungen nach Anspruch 1. Es wird ein Polymer ausgewählt, welches in wässrigen Systemen eine feste hydrophobe Phase bildet, in der im Bereich der Phasengrenze zur Umgebung die hydrophoben Bereiche von amphiphilen Molekülen zumindest teilweise angeordnet sind, wobei die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle als freie Enden mit ihrem jeweiligen hydrophilen Terminus hin zur hydrophilen Umgebung ausgerichtet sind. Als amphiphile Moleküle sind solche aus der Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e ausgewählt, an deren jeweiligem hydrophilen Terminus ein biologisch funktionelles Molekül konjugiert ist.

**[0010]** Mit dem Begriff „hydrophob“ werden Substanzen charakterisiert, die sich nicht mit Wasser mischen und es auf der Oberfläche meist „abperlen“ lassen. Unter hydrophober Phase ist in diesem Zusammenhang eine Phase zu verstehen, deren Oberfläche an ihrer Phasengrenze gegenüber Wasser einen Kon-

taktwinkel von mehr als 90° aufweist. Unter einer hydrophilen Phase ist dementsprechend eine Phase zu verstehen, deren Oberfläche an ihrer Phasengrenze gegenüber Wasser einen Kontaktwinkel kleiner als 90°, zumeist nahe 0°, aufweist. Amphiphilie ist eine spezielle Eigenschaft eines Moleküls, das hydrophobe und hydrophile Bereiche aufweist.

**[0011]** Vorzugsweise ist das oberflächenfunktionalisierte Polymer, genauer gesagt das Polymersubstrat des oberflächenfunktionalisierten Polymers, ein Thermoplast. Vorteilhaft ist das Polymersubstrat ein Polyester bzw. weist eine auf Polyestern basierende Polymeroberfläche auf. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das auf Polyestern basierende Polymersubstrat aus der Gruppe der Copolymere, insbesondere der statistischen Copolymere, der Gradienten-Copolymere und der Blockcopolymere ausgewählt. Als besonders vorteilhaft erwies sich als Polymersubstrat Poly(lactid-co-Glycolid) (PLGA).

**[0012]** Als amphiphiles Molekül ist vorzugsweise mindestens eine der Verbindungen der Klasse der Poly(2-oxazolin)e vorgesehen, bestehend aus einer Kombination von hydrophilen und hydrophoben Monomereinheiten. Die Kombination dieser Monomereinheiten gestaltet das Poly(2-oxazolin) amphiphil. Die Kombination dieser Monomereinheiten ist realisiert als Copolymer und kann vorteilhaft in Form eines statistischen Copolymers, Gradientencopolymers oder Blockcopolymers vorliegen. Hierbei sind die Poly(2-oxazolin)-Monomereinheiten gekennzeichnet durch ihre Substitution in der Seitenkette, die ihre Wasserlöslichkeit bestimmt. Insbesondere sind kurzkettige Seitengruppen mit n- oder iso-Alkylgruppen oder auch Arylgruppen hydrophil für eine Anzahl X der Kohlenstoffatome C in der Seitenkette, die im Bereich C1 bis C3 (das heißt X liegt im Bereich 1 bis 3) liegt, und hydrophob für C4 und größere CX-Werte. Die Amphiphilie kann auch durch eine Kombination mittels Konjugation von hydrophilen Poly(2-oxazolin)en und langkettigen hydrophoben Molekülteilen realisiert sein. Beispielsweise kann ein Poly(2-oxazolin) mit einem n-Alkan, perfluorierten Verbindungen oder aromatischen Molekülsegmenten oder auch Lipiden bzw. Lipopolymeren gebunden sein.

**[0013]** Die Poly(2-oxazolin)e sind an ihrem hydrophilen Terminus vorteilhaft jeweils mit einem der folgenden biologisch funktionellen Moleküle konjugiert: Adhäsionspeptid-Sequenzen, antimikrobiell wirkende Peptide, andere biologisch aktive Peptide, Proteine, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, und Aptamere.

**[0014]** Ein entsprechendes oberflächenfunktionalisiertes Polymer für biologische Anwendungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7 ist durch ein Verfahren

zu dessen Herstellung nach Anspruch 8 erhältlich. Bei diesem Verfahren wird/werden

- a) ein an der Oberfläche zu funktionalisierendes Polymer, das heißt das Polymersubstrat, das in wässrigen Systemen eine feste hydrophobe Phase bildet, und ein hydrophiles Polymer sowie ein amphiphiles Polymer, bestehend aus Molekülen der Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e, mittels eines Lösungsmittels in eine homogene Lösung gebracht,
- b) das Lösungsmittel abgetrennt, so dass eine Phasenseparation mit Ausbildung einer Phasengrenze zwischen einer hydrophoben Phase aus dem zu funktionalisierenden Polymer und einer hydrophilen Phase aus dem hydrophilen Polymer stattfindet und sich die amphiphilen Moleküle (AM) an der Phasengrenze derart ausrichten, dass die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle zumindest teilweise in der hydrophoben Phase und die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle zumindest teilweise in der hydrophilen Phase angeordnet werden,
- c) die hydrophile Phase abgetrennt, so dass die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle als freie Enden mit ihrem jeweiligen hydrophilen Terminus hin zur Umgebung ausgerichtet sind, während die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle weiterhin im zu funktionalisierenden Polymer angeordnet sind.

**[0015]** Erfindungsgemäß ist am jeweiligen hydrophilen Terminus der amphiphilen Polymere ein biologisch funktionelles Molekül konjugiert, womit die biologisch funktionellen Moleküle immobilisiert und präsentiert werden.

**[0016]** Durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise erfolgt gemäß der Konzeption der Erfindung eine Selbstorganisation amphiphiler Polymere an der Phasengrenze der nicht-wasserlöslichen, hydrophoben Polymere. Über diese Selbstorganisation erfolgt überraschenderweise eine definierte Anordnung amphiphiler Moleküle in der Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Materialien, wobei das hydrophile Material die biologische Umgebung der hydrophoben Biomaterialoberfläche darstellen kann. Hierbei ist zudem die Art der eingesetzten amphiphilen Polymere, der Poly(2-oxazolin)e, von Bedeutung. Der Einsatz von Polymeren aus dieser Polymerklasse hat folgende Vorteile:

1. Aufgrund der definierten Syntheseroute können die amphiphilen Polymere in einem breiten Spektrum dem zu modifizierenden Substrat und der Umgebung angepasst werden.
2. Die amphiphilen Polymere können regioselektiv und quantitativ mit biologisch funktionellen Molekülen funktionalisiert werden.

3. Der hydrophile Teil des amphiphilen Polymers kann den spezifischen Erfordernissen angepasst werden, zum Beispiel für die Kontrolle der Biokompatibilität und/oder die Steuerung der Zelladhäsion.

**[0017]** Mögliche Anwendungen für auf diese Weise oberflächenfunktionalisierte Polymere ergeben sich insbesondere auf dem Gebiet der Medizin, hier vor allem der regenerativen Medizin, zum Beispiel beim Knochenaufbau.

**[0018]** Die vorliegende erfindungsgemäße Lösung stellt eine einfache, aber definierte Möglichkeit zur Oberflächenfunktionalisierung einer im Biomaterialbereich breit eingesetzten Polymergruppe durch ein biokompatibles, hoch definiertes und variables Polymersystem, nämlich das der Poly(2-oxazolin)e, bereit.

**[0019]** Auf diese Weise können alle hydrophoben Polymerphasenfestkörper an ihrer Oberfläche funktionalisiert werden. Als hydrophiles Polymer wird vorzugsweise ein Polyethylenglykol (PEG) eingesetzt. Als Lösungsmittel für den Verfahrensschritt a) sind insbesondere Dichlormethan und Chloroform geeignet.

**[0020]** Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen mit Bezugnahme auf die zugehörige Zeichnung. Es zeigt:

**[0021]** **Fig. 1:** die schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels für das erfindungsgemäße Verfahren.

**[0022]** Die **Fig. 1** zeigt die schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels für das erfindungsgemäße Verfahren. Hierbei wird kompaktes Polylactid-co-Glycolid (PLGA) mit einem Poly(2-oxazolin) funktionalisiert. In Abbildung a) der **Fig. 1** ist ein Reaktionsgefäß dargestellt, welches Polylactid-co-Glycolid (PLGA) als Polymersubstrat sowie Polyethylenglykol (PEG) als hydrophiles Polymer sowie amphiphile Moleküle (AM) aus der Gruppe der Poly(2-oxazolin)e enthält, die mittels des Lösungsmittels Dichlormethan bei einer Temperatur von 0 °C bis 40 °C in eine homogene Lösung gebracht werden.

**[0023]** Polylactid-co-Glycolid (PLGA) ist eine organische Substanz auf Milchsäurebasis, genauer gesagt ein Co-Polymer aus Milch- und Glykolsäure, das vom menschlichen Körper leicht abgebaut werden kann. Sie findet Anwendung als chirurgisches Nähmaterial, in Form von biologisch degradierbaren Implantaten sowie als Hilfsstoff für die Herstellung von Depotarzneiformen.

**[0024]** Poly(2-oxazolin)e stellen eine Polymerklasse dar, bei der je nach Substituent in Position 2 des Oxazolinrings die physikalischen und makromolekularen Eigenschaften der jeweiligen Polymere gesteuert werden können.

**[0025]** Die Abbildung b) der **Fig. 1** zeigt den Prozess einer Phasentrennung in eine hydrophobe PLGA-Phase und eine hydrophile PEG-Phase, im Laufe des Verdampfens des Lösungsmittels Dichlormethan. In Abbildung c) der **Fig. 1** ist die in diesem Zusammenhang stattfindende Anordnung und Ausrichtung der amphiphilen Moleküle (AM) in der Phasengrenze zwischen hydrophober und hydrophiler Phase schematisch dargestellt. Dabei sind die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle zur hydrophoben Phase und die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle hin zur hydrophilen Phase ausgerichtet, das heißt, sowohl die hydrophoben Bereiche als auch die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle werden jeweils mindestens teilweise in der hinsichtlich der Hydrophilie bzw. Hydrophobie entgegengesetzten Phase angeordnet. Schließlich stellt die Abbildung d) der **Fig. 1** die Situation nach der Entfernung der hydrophilen PEG-Phase dar, was durch Herauslösen erfolgen kann. Die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle (AM) sind als nunmehr freie Enden hin zur Umgebung ausgerichtet, während die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle (AM) nach wie vor zumindest teilweise in der PLGA-Phase angeordnet sind.

#### LISTE DER IN DEN FIGUREN VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

**[0026]**

AM	amphiphile Moleküle
PEG	Polyethylenglykole
PLGA	Polylactid-co-Glycolid

#### Patentansprüche

1. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer für biologische Anwendungen, das in wässrigen Systemen eine feste hydrophobe Phase bildet, in der im Bereich der Phasengrenze zur Umgebung die hydrophoben Bereiche von amphiphilen Molekülen zumindest teilweise angeordnet sind, wobei die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle als freie Enden mit ihrem jeweiligen hydrophilen Terminus hin zur hydrophilen Umgebung ausgerichtet sind und wobei als amphiphile Moleküle solche aus der Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e ausgewählt sind, an deren jeweiligem hydrophilen Terminus ein biologisch funktionelles Molekül konjugiert ist.

2. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass dieses ein Thermoplast ist.

3. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass dieses eine auf Polyestern basierende Polymeroberfläche aufweist.

4. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass dieses aus der Gruppe der Copolymere ausgewählt ist.

5. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Polymersubstrat Polylactid-co-Glycolid (PLGA) vorgesehen ist.

6. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass als amphiphiles Molekül entweder mindestens eine der Verbindungen der Klasse der Poly(2-oxazolin)e vorgesehen ist, bestehend aus einer Kombination von hydrophilen und hydrophoben Monomereinheiten, oder mindestens eine Verbindung aus der Klasse der Poly(2-oxazolin)e vorgesehen ist, bei der die Amphiphilie durch eine Kombination mittels Konjugation eines hydrophilen Poly(2-oxazolin)s und hydrophoben Molekülteilen realisiert ist.

7. Oberflächenfunktionalisiertes Polymer nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Poly(2-oxazolin)e an ihrem hydrophilen Terminus jeweils mit einem der folgenden biologisch funktionellen Moleküle konjugiert sind: Adhäsionspeptid-Sequenzen, antimikrobiell wirkende Peptide, andere biologisch aktive Peptide, Proteine und Aptamere.

8. Verfahren zur Herstellung eines oberflächenfunktionalisierten Polymers für biologische Anwendungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem a) ein an der Oberfläche zu funktionalisierendes Polymer, das in wässrigen Systemen eine feste hydrophobe Phase bildet, und ein hydrophiles Polymer sowie ein amphiphiles Polymer, bestehend aus Molekülen der Polymerklasse der Poly(2-oxazolin)e, mittels eines Lösungsmittels in eine homogene Lösung gebracht werden,

b) das Lösungsmittel abgetrennt wird, so dass eine Phasenseparation mit Ausbildung einer Phasengrenze zwischen einer hydrophoben Phase aus dem zu funktionalisierenden Polymer und einer hydrophilen Phase aus dem hydrophilen Polymer stattfindet und sich die amphiphilen Moleküle (AM) an der Phasengrenze derart ausrichten, dass die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle zumindest teilweise in der hydrophoben Phase und die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle zumindest teilweise in der hydrophilen Phase angeordnet werden,

c) eine Abtrennung der hydrophilen Phase erfolgt, so dass die hydrophilen Bereiche der amphiphilen Moleküle als freie Enden mit ihrem jeweiligen hydrophilen Terminus hin zur Umgebung ausgerichtet sind, wäh-

rend die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle weiterhin im zu funktionalisierenden Polymer angeordnet sind,

**dadurch gekennzeichnet**, dass am jeweiligen hydrophilen Terminus der amphiphilen Polymere ein biologisch funktionelles Molekül konjugiert ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass als hydrophiles Polymer ein Polyethylenglykol (PEG) eingesetzt wird.

10. Verwendung eines oberflächenfunktionalisierten Polymers nach einem der Ansprüche 1 bis 7 auf dem Gebiet der Medizin.

Es folgt eine Seite Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

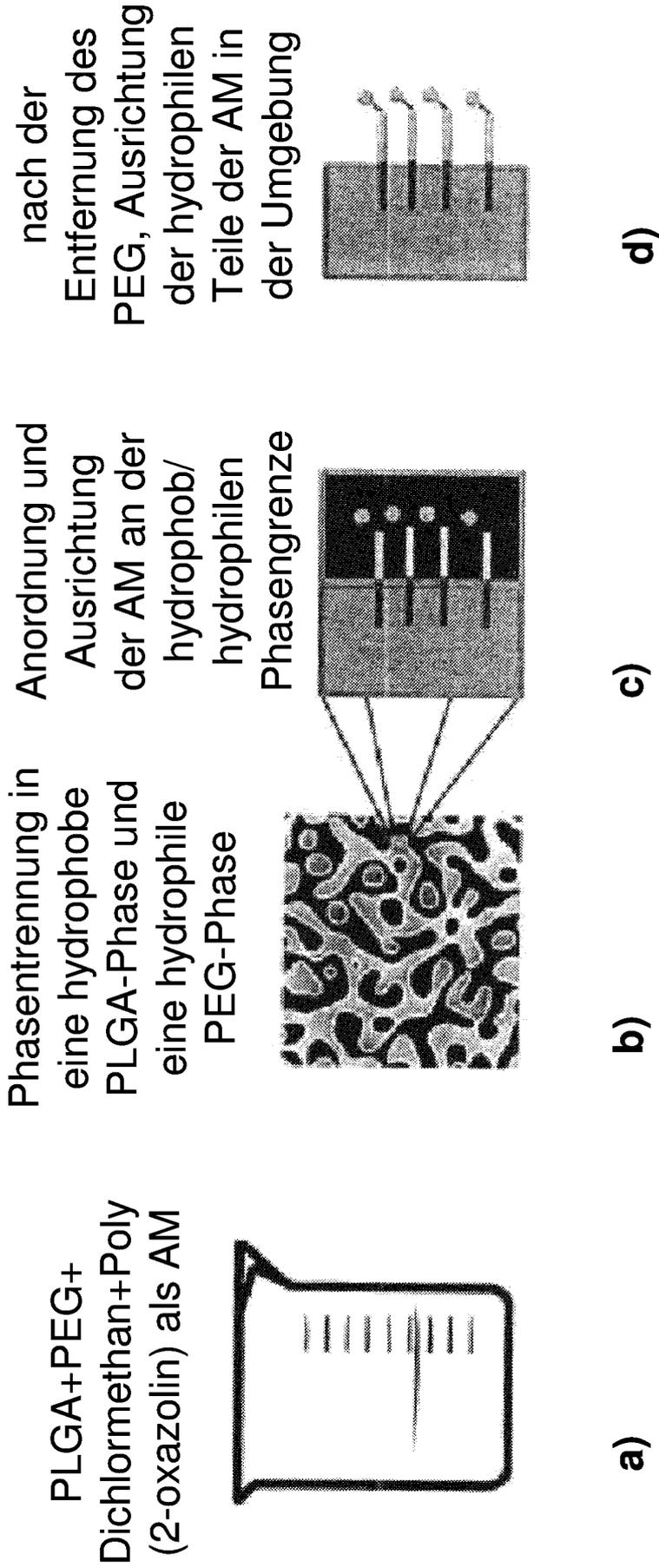


Fig. 1