

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Juni 2020 (25.06.2020)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2020/127899 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G03F 7/00 (2006.01) *G03F 7/20* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/086564

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Dezember 2019 (20.12.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A384/2018 20. Dezember 2018 (20.12.2018) AT

(71) Anmelder: **TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN**
[AT/AT]; Karlsplatz 13, 1040 Wien (AT).

(72) Erfinder: **LUNZER, Markus**; Baumgarten, 13, 7122 Gols
(AT). **BAUDIS, Stefan**; Kirchenplatz, 6/7/6, 1230 Wien

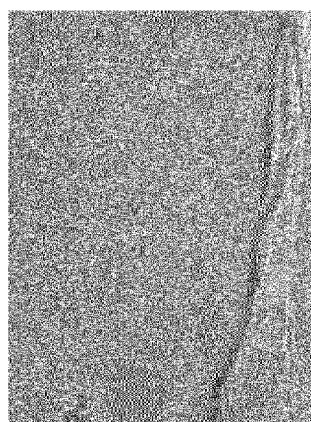
(AT). **OVSIAKOV, Aleksandr**; Hütteldorfer Straße,
212/19, 1140 Wien (AT). **LISKA, Robert**; Mühlratzstraße,
26, 2123 Schleibach (AT).

(74) Anwalt: **ELLMAYER, Wolfgang**; Mariahilferstraße, 50,
1070 Wien (AT).

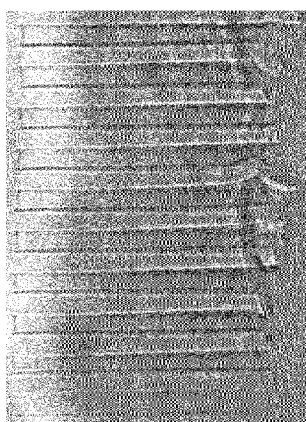
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: USE OF TWO-PHOTON PHOTSENSITISERS

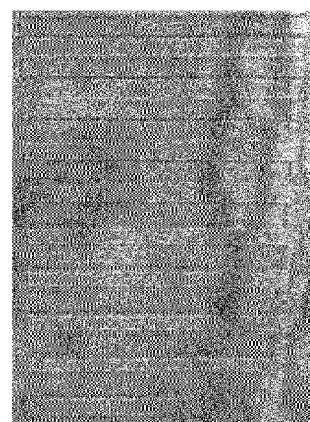
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ZWEIFHOTONEN-PHOTOSENSIBILISATOREN



AA Vergleichsbeispiel 2



BB Beispiel 2



CC Beispiel 3

Figur 2

AA Comparative example 2
BB Example 2
CC Example 3

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of two-photon photosensitisers for photochemical cleavage of disulfide bonds -S-S- in a solid or semi-solid matrix, by bringing the disulfide bonds into contact with a two-photon photosensitiser and irradiating the reaction mixture obtained in this way with light at a suitable wavelength to allow two-photon absorption of the photosensitiser, and the photosensitiser, without undergoing intramolecular cleavage, transmits the absorbed energy to the disulfide bonds and thus causes cleavage of the bonds.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Zweiphotonen-Photosensibilisatoren zum photochemischen Spalten von in einer festen oder halbfesten Matrix enthaltenen Disulfidbindungen, -S-S-, durch In-Kontakt-Bringen der Disul-

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2020/127899 A1

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

fidbindungen mit einem Zweiphotonen-Photosensibilisator und Bestrahlung des dadurch erhaltenen Reaktionsgemischs mit Licht mit einer geeigneten Wellenlänge, um Zweiphotonen-Absorption des Photosensibilisators zu ermöglichen, wonach der Photosensibilisator, ohne eine intramolekulare Spaltung zu erfahren, die aufgenommene Energie auf die Disulfidbindungen überträgt und dadurch deren Spaltung bewirkt.

Verwendung von Zweiphotonen-Photosensibilisatoren

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Zweiphotonen-Photosensibilisatoren zum photochemischen Spalten von in einer festen oder halbfesten Matrix enthaltenen Bindungen.

STAND DER TECHNIK

Hydrogele sind stark hydratisierte Polymernetzwerke mit vielseitig steuerbaren Eigenschaften und werden derzeit in diversen Strategien für die Erforschung von Zellfunktionen, Tissue Engineering, regenerative Medizin und Zellfreisetzung eingesetzt, da mit ihnen unter anderem die physikochemischen Eigenschaften der nativen extrazellulären Matrix (EZM) von biologischem Weichgewebe nachgeahmt werden können (siehe z.B. Tibbitt et al., *Biotechnol. Bioeng.* 103, 655-663 (2009). Unter Einsatz von photosensitiven Hydrogelen können darüber hinaus die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Gele auf vergleichsweise einfache und saubere Weise durch den Einsatz von Licht dynamisch gesteuert werden.

Dabei erfolgt der Abbau der Hydrogele üblicherweise durch direkte Bestrahlung mittels UV/VIS-Licht oder -Lasern, wobei die Gele photolabile funktionelle Gruppen in der Hauptkette enthalten, die bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge eine Spaltung erfahren, wodurch das Hydrogel abgebaut wird (siehe z.B. DeForest und Anseth, *Nat. Chem.* 3, 925-931 (2011); Tibbitt et al., *Soft Matter* 6, 5100-5108 (2010); Griffin und Kasko, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 13103-13107 (2012)).

Neben Cumarin-Derivate, Ruthenium-Komplexe oder 7-Nitroindolyl-Gruppierungen enthaltenden Gelen (siehe z.B. Azagarsamy et al., *ACS Macro Lett.* 3, 515-519 (2014); Lee und Kim, *J. Appl. Polym. Sci.* 124, 4339-4345 (2012); Wong et al., *Macromolecules* 43, 2824-2831 (2010); Theis et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 15857-15860 (2017), und *Angew. Chem.* 129, 16071-16075 (2017); Rapp et al., *Chem. Eur. J.* 24, 2328-2333 (2018)), kommen dazu mitunter auch Gele zum Einsatz, die in die Ketten eingebettete o-Nitrobenzyl- (oNB-) Gruppierungen enthalten, da o-NB-Gruppierungen eben-

falls mittels Bestrahlung spaltbar sind (siehe z.B. Zhao et al., *Macromolecules* 45, 1723-1736 (2012)), ihre Synthese und Handhabung sich aber einfacher gestaltet.

Erst kürzlich haben auch die Erfinder des vorliegenden Anmeldungsgegenstandes in
5 Lunzer et al., "A Modular Approach to Sensitized Two-Photon Patterning of Photo-degradable Hydrogels", *Angew. Chem. Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.201808908 (veröffentlicht am 6. September 2018), den photoinduzierten Abbau von auf oNB-Gruppierungen in der Hauptkette basierenden, photoabbaubaren Hydrogelsystemen auf Basis von Hyaluronsäure offenbart, allerdings unter Verwendung von Zweiphotonen-Photo-
10 initiatoren als Sensibilisatoren, d. h. Energieüberträger auf die spaltbaren oNB-Gruppen. Bei dem Gel handelte es sich um ein zytokompatibles Hydrogel aus mit Polyethylenglykol (PEG) vernetzten Hyaluronsäureketten, die darüber hinaus o-Nitrobenzylester-Verbindungen zwischen den Hyaluronsäureketten aufweisen und selbst in Gegenwart lebender Zellen unter Einsatz des Zweiphotonen-Sensibilisators photo-
15 degradierbar sind.

Gängige, in der Polymerchemie eingesetzte Photoinitiatoren absorbieren in der Regel ein einziges Photon, üblicherweise bei Wellenlängen im UV-Bereich, und erfahren dadurch eine intramolekulare Spaltung einer oder mehrerer Bindungen unter Ausbildung
20 von entweder ionischen Resten oder (zumeist) freien Radikalen, üblicherweise unter gleichzeitiger Isomerisierung und Abspaltung einer reaktiven Gruppe. Zweiphotonen-Initiatoren bzw. -Sensibilisatoren sind hingegen ebenfalls in der Polymerchemie eingesetzte Photoinitiatoren mit chromophoren Gruppierungen, bei denen erst nach Absorption zweier Photonen der ein reaktiver angeregter Zustand erreicht wird. Dies bietet mehrere Vorteile: Zum einen kann im Bereich größerer Wellenlängen, z.B. im na-
25 hen Infrarotbereich (d.h. mit NIR-Lasern), und folglich bei niedrigeren Energieniveaus gearbeitet werden, wodurch höhere Eindringtiefen der zur Anregung eingesetzten Strahlung in das jeweilige Medium sowie eine räumlich enger begrenzte Fokussierung ermöglicht werden. Zum anderen kommt es zu keiner intramolekularen Spaltung des
30 Initiators und somit nicht zur Teilnahme von Fragmenten des Initiators an den durch die Bestrahlung ausgelösten chemischen Reaktionen, z. B. Photopolymerisation, da der Zweiphotonen-Initiator die aufgenommene Energie mittels eines Elektronentrans-

fers auf einen geeigneten Akzeptor, z. B. eine Doppelbindung eines photopolymerisierbaren Monomers, abgibt, das dabei gleichzeitig am Initiator-molekül entstehende Kation jedoch mesomeriestabilisiert wird (siehe z. B. Albota et al., Science 281, 1653-1656 (1998); Cumpston et al., Nature 398, 51-54 (1999)).

5

Dadurch besteht selbst bei der Spaltung von lebende Zellen enthaltenden Hydrogelen keine Gefahr einer Schädigung der unmittelbar neben dem bestrahlten Bereich befindlichen Zellen während des Bestrahlungsvorgangs, da die Anregung wie erwähnt im nahen Infrarotbereich (NIR) erfolgt, wo Zellen und auch die Komponenten von Hydro-

10

oNB-Derivate als photospaltbare Gruppierungen innerhalb der Ketten von Hydrogelen oder anderen festen oder halbfesten Matrices haben allerdings den Nachteil, dass ihre Synthese zwar einfacher als jene anderer Chromophore ist, sich aber dennoch weiterhin vergleichsweise aufwändig gestaltet. Zudem sind oNB-Derivate, wie auch andere photospaltbare Gruppen, nur irreversibel photospaltbar und daher inherent lichtempfindlich, weshalb ihre Handhabung unter Lichtschutz zu erfolgen hat.

15

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung vor diesem Hintergrund war die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur photoinduzierten Spaltung spezifischer Bindungen in festen oder halbfesten Matrices, deren Synthese sich einfacher gestaltet als jene auf Basis konventioneller photospaltbarer Gruppen, wie z.B. o-Nitrobenzyl-Gruppierungen, und die geringere Lichtempfindlichkeit aufweisen.

20

25 OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Dieses Ziel erreicht die vorliegende Erfindung durch Bereitstellung der Verwendung von Zweiphotonen-Photosensibilisatoren zum photochemischen Spalten von in einer festen oder halbfesten Matrix enthaltenen Disulfidbindungen, -S-S-, durch In-Kontakt-Bringen der Disulfidbindungen mit einem Zweiphotonen-Photosensibilisator und Be-

30

aufgenommene Energie auf die Disulfidbindungen überträgt und dadurch deren Spaltung bewirkt.

Die vorliegende Erfindung beruht dabei auf der überraschenden Erkenntnis der Erfinder, dass auch Disulfidbindungen durch Transfer eines Elektrons von einem im angeregten Zustand vorliegenden Zweiphotonen-Photosensibilisator photoinduziert spaltbar sind – und zwar, ohne dass das in der chromophoren Gruppierung des Sensibilisators mesomeriestabilisierte Kation eine chemische Reaktion mit den Disulfidbindungen oder deren Spaltprodukten eingeht. Diese Tatsache war umso überraschender, da aus der Fachliteratur (Zieger et al., Angew. Chem. Int. Ed. 56, 5625-5629 (2017)) bekannt war, dass Disulfidbindungen unter Anwendung von Zweiphotonen-Sensibilisierung erzeugt werden können, anstatt sie zu spalten.

Ohne sich auf eine Theorie festlegen zu wollen, nehmen die Erfinder an, dass es nach dem Elektronentransfer vom Photosensibilisator auf die Disulfidbindung zu einer Spaltung der Bindung unter Ausbildung eines freien Thiylradikals, $-S\cdot$, und eines Thiolatanions, $-S^-$, kommt, wobei Letzteres in wässrigen Systemen anzunehmenderweise unter Anlagerung eines H^+ -Ions zu einem Thiol $-SH$ weiterreagiert. Dass allerdings offenbar weder das Thiylradikal noch das Thiolatanion mit dem mesomeriestabilisierten Kation des Sensibilisators reagiert – was sich anhand des Umstands zeigt, dass es in den bestrahlten Gelen zu keinerlei Verfärbungen kam und folglich die chromophore Gruppierung des Sensibilisators keine Reaktion eingegangen sein konnte –, war dabei besonders überraschend. Die Aufklärung des genauen Reaktionsmechanismus ist Gegenstand derzeitiger Forschungen der Erfinder.

In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind die zu spaltenden Disulfidbindungen in einer von einem Polymernetzwerk, noch bevorzugter einem über diese Disulfidbindungen vernetzten Polymernetzwerk, gebildeten Matrix enthalten, wodurch die Spaltung der Bindungen jeweils zu einer lokalen Erweiterung der Matrix führt.

Das Polymernetzwerk ist dabei vorzugsweise ein Gel, insbesondere ein Hydrogel, das unter anderem für die eingangs erwähnten Zwecke eingesetzt werden kann.

Die Vermischung des Zweiphotonen-Photosensibilisators mit dem Gel erfolgt gemäß weiterer bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung auf einfache Weise, indem das Gel mit einer Lösung des Zweiphotonen-Photosensibilisators in einem geeigneten Lösungsmittel, bei Hydrogelen beispielsweise Wasser, gequollen wird, um den Zweiphotonen-Photosensibilisator möglichst gleichmäßig im Gel zu verteilen, bevor die Bestrahlung erfolgt.

Eine solche Lösung des Zweiphotonen-Photosensibilisators weist vorzugsweise eine relativ niedrige Konzentration von nur etwa 0,01 mM bis etwa 1 mM, noch bevorzugter von etwa 0,05 mM bis etwa 0,5 mM, insbesondere von etwa 0,1 mM, auf, um Kosten zu sparen, die Wechselwirkung mit etwaigen im Gel verkapselten lebenden Zellen gering zu halten und ein Übermaß an Spaltungsreaktionen – oder auch, in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Gels, etwaiger Nebenreaktionen – zu verhindern.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen können durch die Spaltung der Disulfidbindungen Spaltprodukte, vorzugsweise solche mit einer wünschenswerten chemischen und/oder biologischen Aktivität, von der Matrix abgelöst werden. Auf diese Weise kann das die Disulfidbindungen enthaltende Gel oder Hydrogel beispielsweise zur Wirkstoff- oder Arzneimittelabgabe an biologische Systeme, wie z.B. lebende Zellen oder Gewebe, dienen. Dazu können beispielsweise Wirkstoffgruppierungen jeweils über eine – oder auch zwischen zwei – Disulfidbrücke(n) in das Gel eingebaut werden.

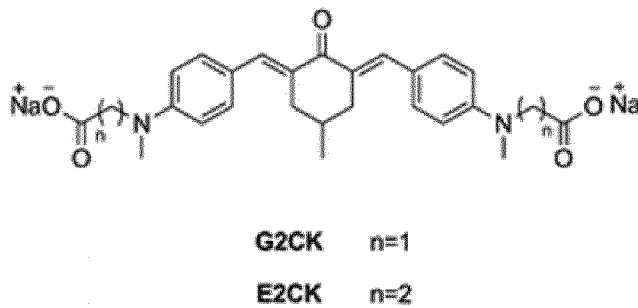
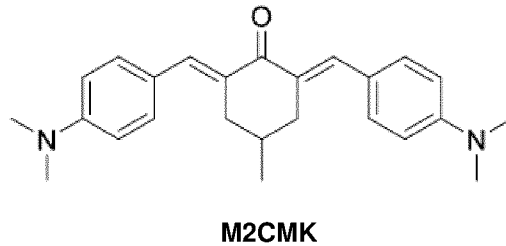
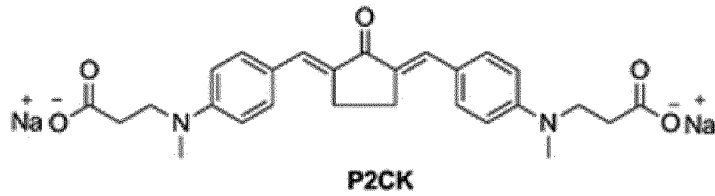
In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden durch die Spaltung der Disulfidbindungen sowie anschließendes Auswaschen des Photosensibilisators und zumindest eines Teils etwaiger Spaltprodukte aus der jeweils bestrahlten Stelle ein oder mehrere Kanäle in der Matrix ausgebildet. Dies wird dadurch ermöglicht, dass aufgrund der Verwendung von Strahlung größerer Wellenlänge als im Falle von herkömmlichen Einphotonen-Initiatoren sowie der quadratischen Abhängigkeit der Zweiphotonen-Absorption von der Intensität des Lichts (im Gegensatz zur linearen Abhängigkeit im Falle herkömmlicher Einphotonen-Absorption) eine Beschränkung des anregungsaktiven Volumens des Lichtstrahls erfolgen kann, d.h. die Bindungsspaltung auf einen deutlich kleineren Bereich begrenzt werden kann, so dass bei ge-

eigneter intermittierender Verlagerung des Strahlungsfokus innerhalb des Gels nach und nach ein der Bewegung des Fokussierungspunkts entsprechender Gang oder Kanal innerhalb des Gels, beispielsweise von einem äußeren Rand des Gels in dessen Inneres hinein, ausgebildet wird. Derartige mit Kanälen versehene Gele können
5 vielerlei Anwendung finden, beispielsweise zur Vermehrung lebender Zellen innerhalb der Kanäle oder auch als Mikrofluidikvorrichtungen oder dergleichen.

Gemäß vorliegender Erfindung sind zwar prinzipiell alle bekannten Zweiphotonen-Photosensibilisatoren einsetzbar, allerdings wird vorzugsweise ein Photosensibilisator
10 mit einem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt $\sigma_{2P} > 1$ GM (Goeppert-Mayer) im entsprechenden relevanten Spektralbereich eingesetzt, um keine übermäßig hohe Lichtintensität und/oder lange Bestrahlungsdauer wählen zu müssen.

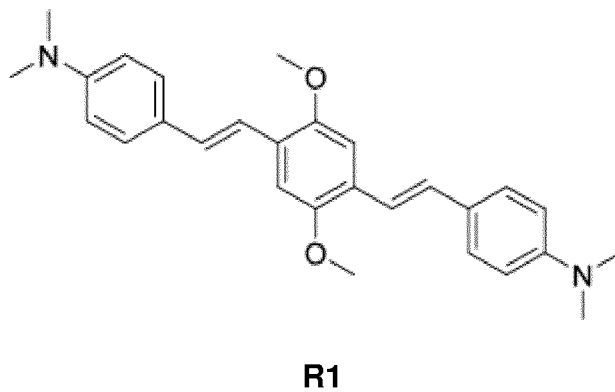
In diesem Zusammenhang sei zudem festgehalten, dass aufgrund der identischen Wirkungsweise und folglich derselben Vorteile wie bei der Zweiphotonen-Absorption dem einschlägigen Fachmann bewusst ist, dass gemäß vorliegender Erfindung anstelle von
15 Zweiphotonen- auch Drei- oder Mehrphotonen-Sensibilisatoren einsetzbar sein und zu vergleichbaren Ergebnissen führen sollten. Aufgrund des noch höheren Energiebedarfs als im Falle der Zweiphotonen-Absorption sind derartige Ausführungsformen jedoch nicht zu bevorzugen, weswegen hierin auch nicht näher darauf eingegangen
20 wird.

In bevorzugten Ausführungsformen wird gemäß vorliegender Erfindung ein aus der Klasse der Benzyliden-Derivate ausgewählter Zweiphotonen-Photosensibilisator, vorzugsweise einer der nachstehend dargestellten Benzylidenketon-Initiatoren P2CK,
25 M2CMK, G2CK und E2CK, eingesetzt, wie er von den Erfindern bereits erfolgreich zur bekannten Spaltung von o-Nitrobenzyl-Gruppierungen enthaltenden Hydrogelen eingesetzt wurde (siehe "Lunzer et al.", oben):



5

In anderen bevorzugten Ausführungsformen wird gemäß vorliegender Erfindung der nachstehend dargestellte Benzyliden-Initiator R1 eingesetzt:



10

Und schließlich sieht die vorliegende Erfindung in bevorzugten Ausführungsformen vor, dass die Spaltung der Disulfidbindungen im Verlauf eines 3D-Druckverfahrens oder im Anschluss daran durchgeführt wird, was speziell im Falle der gewünschten Erzeugung

von Kanälen in den Matrices eine exakte Programmierung der Verlagerung des Strahlungsfokus innerhalb der jeweiligen Matrix sowie eine rasche Anfertigung der Kanäle ermöglicht.

5 KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend anhand von nichteinschränkenden Beispielen sowie unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen näher beschrieben, die Folgendes darstellen:

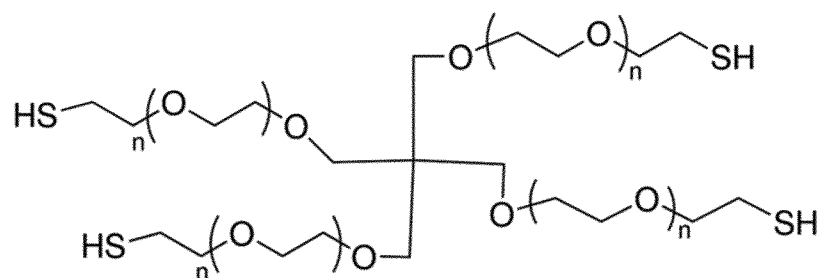
10 Fig. 1 zeigt Lichtmikroskop-Aufnahmen bei 10facher Vergrößerung von in Vergleichsbeispiel 1 und Beispiel 1 bestrahlten Hydrogelen.

Fig. 2 zeigt Lichtmikroskop-Aufnahmen bei 10facher Vergrößerung von in Vergleichsbeispiel 2, Beispiel 2 und Beispiel 3 bestrahlten Organogelen.

15 BEISPIELE

Die in den nachfolgenden Beispielen eingesetzten Chemikalien, so auch die Sensibilisatoren, wurden aus kommerziellen Quellen bezogen und, sofern nicht Gegenteiliges angegeben ist, ohne weitere Reinigung in den beschriebenen Reaktionen eingesetzt.

20 Als Ausgangsprodukt zur Herstellung der Solvogelee wurde das nachstehend dargestellte Tetraol 4arm-PEG5k-SH, ein sternförmig verzweigtes Polyethylenglykolphthiol auf Basis von PEGyliertem Pentaerythrit mit einem mittleren zahlenmäßigen Molekulargewicht von etwa 5.000 eingesetzt, das von Sigma Aldrich unter der Katalognr. JKA7002 erhältlich ist:



4arm-PEG5k-SH

Synthesebeispiel 1 – Herstellung von Hydrogelen

Zu einer Lösung von 4arm-PEG5k-SH (10 Gew.-%) in deionisiertem Wasser wurden NaI und 30%iges Wasserstoffperoxid in solchen Mengen zugesetzt, dass die Endkonzentration von NaI 1 mM und jene von H₂O₂ 1 Gew.-% betrug. Von der so erhaltenen Makromer-Lösung wurden 27 µl in zylindrische Silikon-Formen (von Sigma Aldrich) auf Hochpräzisions-Glasträgern (erhältlich von Ibidi) pipettiert und mit Octadecyl-modifizierten Deckplättchen (von Carl Roth) abgedeckt. Die Reaktionsgemische wurden zumindest 1 h lang bei Raumtemperatur umgesetzt, um über Disulfidbindungen vernetzte Hydrogele zu erhalten, die danach mit deionisiertem Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in deionisiertem Wasser gequollen wurden.

Zur Herstellung Sensibilisator-hältiger Hydrogele wurden die über Nacht in Wasser gequollenen Gele jeweils unmittelbar vor ihrer Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren zumindest 1 h lang in einer 0,1 mM wässrigen Sensibilisator-Lösung gequollen. Danach wurde die jeweilige zylindrische Gelprobe mit einem Skalpell in gerader Linie durchtrennt, um eine glatte Kante zu erhalten.

Synthesebeispiel 2 – Herstellung von Organogelen auf Acetonitril-Basis

Die Synthese dieser Organogele erfolgte in analoger Weise zu Synthesebeispiel 1, wobei anstelle von deionisiertem Wasser Acetonitril als Lösungs- und Quellmittel eingesetzt wurde und die Reaktionsdauer zumindest 1,5 h betrug.

Zur Herstellung Sensibilisator-hältiger Organogele wurden die über Nacht in Acetonitril gequollenen Gele jeweils unmittelbar vor ihrer Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren zumindest 1,5 h lang in einer 0,5 mM Sensibilisator-Lösung in Acetonitril gequollen und danach wie in Synthesebeispiel 1 geschnitten.

Vergleichsbeispiele 1 und 2, Beispiele 1 bis 3

Die in den Synthesebeispielen hergestellten Solvogelee wurden zunächst ohne und anschließend gemäß vorliegender Erfindung mit Photosensibilisator mit Zweiphotonen-Strahlung unter Verwendung eines gepulsten Lasers entsprechender Wellenlänge ge-

mäß einem vorprogrammierten Schema bestrahlt, um darin nach Möglichkeit Kanäle auszubilden.

Das von den Erfindern bereits früher beschriebene Setup (Ovsianikov et al., "Laser Photofabrication of Cell-Containing Hydrogel Constructs", Langmuir 30, 3787-3794, (2014); doi:10.1021/la402346z) basiert auf einem Femtosekunden-gepulstem Laser (MaiTai DeepSee, Spectra Physics) mit einer Wellenlänge von 800 nm und einer Pulsdauer von 70 fs hinter dem Objektiv (C-Achroplan 32x/0,85 W, ZEISS). Dabei sollten in einer Höhe von etwa 150 µm über dem Glasboden von der glatten Schnittkante weg parallele Kanäle mit rechteckigen Querschnitten (Breite: 0,1 µm, Höhe: 0,5 µm) mit einer konstanten Schreibgeschwindigkeit von 200 mm/s in den Gelproben fabriziert werden.

Die Laserleistung wurde dabei zwischen 10 mW und 100 mW (in Schritten von 10 mW) variiert, wobei für jeden Leistungswert ein eigener Kanal an einer unterschiedlichen Position entlang der Schnittkante des Gels geschnitten werden sollte, um zu überprüfen, ab welcher Laserleistung es – wenn überhaupt – zur Ausbildung eines geeigneten Kanals kommen würde.

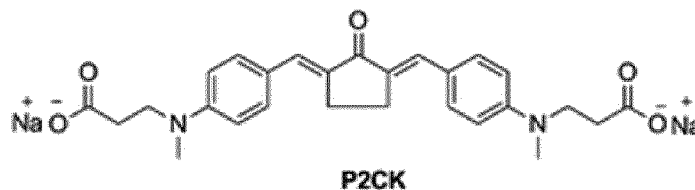
Anschließend wurden die bestrahlten Proben mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in PBS bzw. Acetonitril gequollen. Die Kanäle wurden danach mittels Lichtmikroskopie bei 10facher Vergrößerung analysiert (AxioObserver Z1, ZEISS).

Vergleichsbeispiel 1 – Hydrogel ohne Sensibilisator

Zunächst wurde das in Synthesebeispiel 1 erhaltene Hydrogel ohne Quellung in einer Sensibilisatorlösung wie oben beschrieben bestrahlt, wobei es dennoch zur Spaltung von Disulfidbindungen und somit zur Ausbildung von kanalförmigen Strukturen kam. Eine Lichtmikroskop-Aufnahme des dabei erhaltenen Musters ist in Fig. 1, linkes Bild, dargestellt, wobei die Laserleistung hier – wie in allen anderen Fällen auch – von unten nach oben, beginnend mit 10 mW in Schritten von jeweils 10 mW bis zu 100 mW erhöht wurde.

Beispiel 1 – Hydrogel mit P2CK als Photosensibilisator

Das über Nacht in Wasser gequollene Hydrogel wurde vor der Bestrahlung in einer 0,1 mM wässrigen Lösung des nachstehend dargestellten Photosensibilisators P2CK gequollen und anschließend wie oben beschrieben mit einem Skalpell geschnitten und analog zu Vergleichsbeispiel 1 bestrahlt. Eine Lichtmikroskop-Aufnahme des dabei erhaltenen Musters ist in Fig. 1, rechtes Bild, dargestellt.

*Diskussion der Ergebnisse von Vergleichsbeispiel 1 und Beispiel 1*

Im linken Bild von Fig. 1 ist zu erkennen, dass es in Vergleichsbeispiel 1 in Abwesenheit von Sensibilisator erst ab einer Leistung von 50 mW überhaupt Strukturen im Hydrogel auszumachen sind. Diese sind jedoch selbst bei der maximalen Leistung von 100 mW recht schwach und diffus, so dass eine deutlich höhere Laserleistung erforderlich wäre, um einigermaßen klar ausgeprägte Kanäle in das Gel zu "schreiben", was jedoch die Gefahr von Schäden in den Bereichen um den Kanal herum mit sich bringen würde – speziell in Fällen, in denen die Hydrogele lebende Zellen beherbergen.

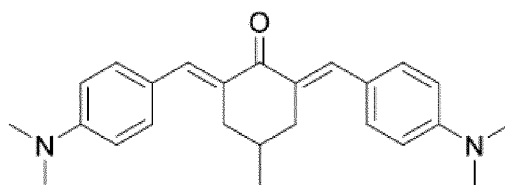
In dem in Beispiel 1 angefertigten rechten Bild sind hingegen bereits bei der niedrigsten Laserleistung von 10 mW (wenn auch noch sehr schwache) Kanäle zu erkennen, die bei 20 mW ähnlich ausgeprägt waren wie bei 100 mW im Hydrogel ohne Sensibilisator. Ab 40 mW Laserleistung sind die Kanäle klar und scharf ausgebildet. Außerdem waren im Gel keinerlei Verfärbungen erkennbar. Gemäß vorliegender Erfindung bestrahlte Hydrogele sind daher für eine praktische Anwendung, z.B. zur Nachahmung von biologischem Weichgewebe, sehr gut geeignet, und ihre Herstellung erfordert weder komplexe organische Synthesen noch eine unangemessen hohe Laserleistung, da bereits 40 mW ausreichend sind.

Vergleichsbeispiel 2 – Organogel ohne Sensibilisator

In Analogie zu Vergleichsbeispiel 1 wurde auch ein in Synthesebeispiel 2 hergestelltes Organogel auf Basis von Acetonitril ohne Zusatz eines Sensibilisators wie oben beschrieben bestrahlt. Eine Lichtmikroskop-Aufnahme des dabei erhaltenen Musters ist in Fig. 2, linkes Bild, dargestellt.

Beispiel 2 – Organogel mit M2CMK als Sensibilisator

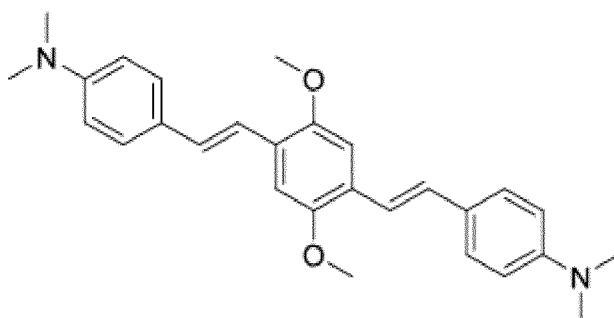
Das über Nacht in Acetonitril gequollene Hydrogel wurde vor der Bestrahlung in einer 0,5 mM Lösung des nachstehend dargestellten Benzylidenketon-Photosensibilisators M2CMK in Acetonitril gequollen und anschließend wie oben beschrieben mit einem Skalpell geschnitten und analog zu Vergleichsbeispiel 2 bestrahlt. Eine Lichtmikroskop-Aufnahme des dabei erhaltenen Musters ist in Fig. 2, mittleres Bild, dargestellt.



M2CMK

Beispiel 3 – Organogel mit R1 als Sensibilisator

Das über Nacht in Acetonitril gequollene Hydrogel wurde vor der Bestrahlung in einer 0,5 mM Lösung des nachstehend dargestellten Benzyliden-Photosensibilisators R1 in Acetonitril gequollen und anschließend wie oben beschrieben mit einem Skalpell geschnitten und analog zu Vergleichsbeispiel 2 bestrahlt. Eine Lichtmikroskop-Aufnahme des dabei erhaltenen Musters ist in Fig. 2, rechtes Bild, dargestellt.



R1

Diskussion der Ergebnisse von Vergleichsbeispiel 2, Beispiel 2 und Beispiel 3

Im linken Bild von Fig. 2 ist zu erkennen, dass es in Vergleichsbeispiel 2 ohne Sensibilisator selbst bei der höchsten Laserleistung kaum zur Ausbildung von Strukturen gekommen war. Im Gegensatz dazu sind in den Beispielen 2 und 3 unter Verwendung der Sensibilisatoren M2CMK (mittleres Bild) und R1 (rechtes Bild) praktisch über das gesamte Leistungsspektrum, jedenfalls aber ab 20 mW Leistung, Kanäle klar und scharf ausgebildet worden. Erneut waren in den Gelen keinerlei Verfärbungen erkennbar. Gemäß vorliegender Erfindung erhaltene Organogele sind daher für praktische Anwendungen besonders gut geeignet, und ihre Herstellung erfordert weder komplexe organische Synthesen noch eine unangemessen hohe Energiezufuhr, da bereits eine minimale Laserleistung von 10 mW bzw. 20 mW ausreicht.

Vergleichsbeispiel 3

Um zu untersuchen, ob der Zweiphotonen-Photosensibilisator P2CK auch als Einphotonen-Sensibilisator einsetzbar ist, wurde ein zu Beispiel 1 analoger Versuch mit einem in Synthesebeispiel 1 erhaltenen Hydrogel durchgeführt, wobei die Bestrahlung jedoch mit einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich, nämlich von 460 nm erfolgte. Dazu wurde das Hydrogel mit Aluminiumfolie zur Hälfte abgedeckt und 15 min lang mit einer 460-nm-LED bestrahlt (OmniCure® LX400 LED UV Spot Curing System mit 460 nm LED-Kopf (Excelitas Technologies), Modus: 100%). Der Abstand von der LED betrug 5 cm, was einer Lichtstärke von 6 mW/cm² entspricht.

Anschließend konnte keine Veränderung der bestrahlten Fläche beobachtet werden – und zwar weder mit freiem Auge noch mittels Lichtmikroskopie bei 2,5facher Vergrößerung). Das mit P2CK-gequollene Hydrogel wurde daher auch mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (ZEISS LSM700) bei 20facher Vergrößerung bei 488 nm (Z-Stack) abgerastert. Unter dem Mikroskop konnte keine Veränderung des so gescannten Bereichs beobachtet werden. P2CK ist folglich nicht als Einphotonen-Sensibilisator geeignet, was sehr überraschend war – vor allem, weil es sich bei P2CK um eine intensiv rot gefärbte Verbindung handelt, die im Bereich um 500 nm ein Absorptionsmaximum aufweist.

PATENTANSPRÜCHE

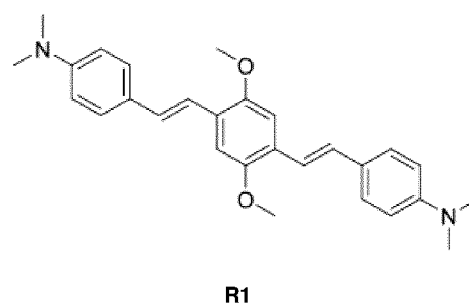
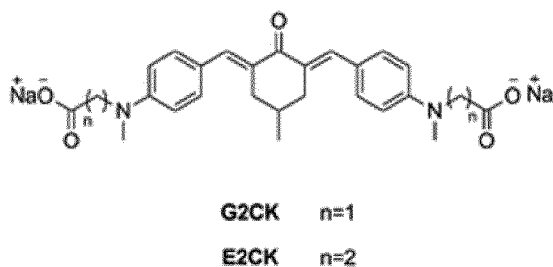
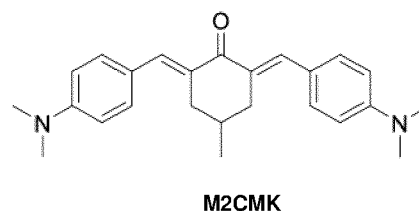
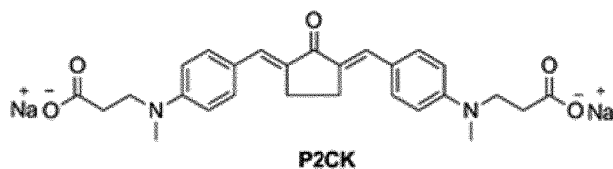
1. Verwendung von Zweiphotonen-Photosensibilisatoren zum photochemischen Spalten von in einer festen oder halbfesten Matrix enthaltenen Disulfidbindungen, -S-S-, durch In-Kontakt-Bringen der Disulfidbindungen mit einem Zweiphotonen-Photosensibilisator und Bestrahlung des dadurch erhaltenen Reaktionsgemischs mit Licht mit einer geeigneten Wellenlänge, um Zweiphotonen-Absorption des Photosensibilisators zu ermöglichen, wonach der Photosensibilisator, ohne eine intramolekulare Spaltung zu erfahren, die aufgenommene Energie auf die Disulfidbindungen überträgt und dadurch deren Spaltung bewirkt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die zu spaltenden Disulfidbindungen in einer von einem Polymernetzwerk, vorzugsweise einem über diese Disulfidbindungen vernetzten Polymernetzwerk, gebildeten Matrix enthalten sind.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymernetzwerk ein Gel, vorzugsweise ein Hydrogel, ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Gel mit einer Lösung des Zweiphotonen-Photosensibilisators in einem geeigneten Lösungsmittel gequollen wird, um den Zweiphotonen-Photosensibilisator im Gel zu verteilen, bevor die Bestrahlung erfolgt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Lösung des Zweiphotonen-Photosensibilisators mit einer Konzentration von etwa 0,01 mM bis etwa 1 mM, vorzugsweise von etwa 0,05 mM bis etwa 0,5 mM, insbesondere von etwa 0,1 mM, eingesetzt wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Spaltung der Disulfidbindungen Spaltprodukte, vorzugsweise solche mit

einer wünschenswerten chemischen und/oder biologischen Aktivität, von der Matrix abgelöst werden.

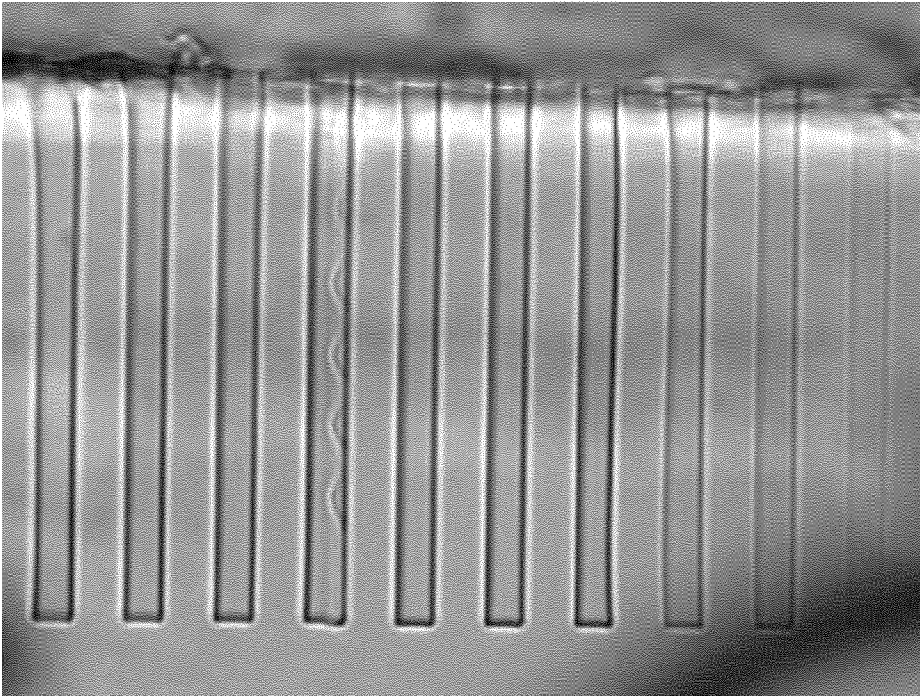
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Spaltung der Disulfidbindungen sowie anschließendes Auswaschen des Photosensibilisators und zumindest eines Teils etwaiger Spaltprodukte aus der jeweils bestrahlten Stelle ein oder mehrere Kanäle in der Matrix ausgebildet werden.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zweiphotonen-Photosensibilisator mit einem Zweiphotonen-Wirkungsquerschnitt $> 1 \text{ GM}$ im entsprechenden relevanten Spektralbereich eingesetzt wird.

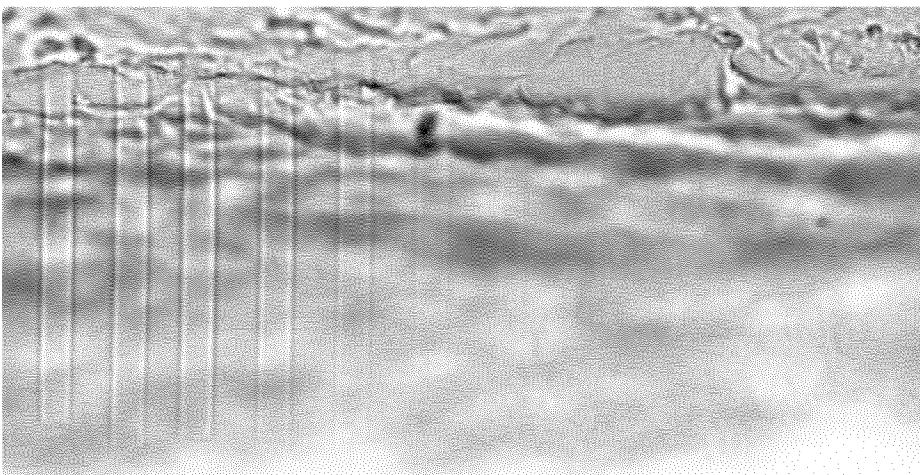
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein aus der Klasse der Benzyliden-Derivate ausgewählter Zweiphotonen-Photosensibilisator, vorzugsweise einer der nachstehend dargestellten Benzylidenketon-Initiatoren P2CK, M2CMK, G2CK und E2CK oder der nachstehend dargestellte Benzyliden-Initiator R1, eingesetzt wird:



10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Spaltung der Disulfidbindungen im Verlauf eines 3D-Druckverfahrens oder im Anschluss daran durchgeführt wird.

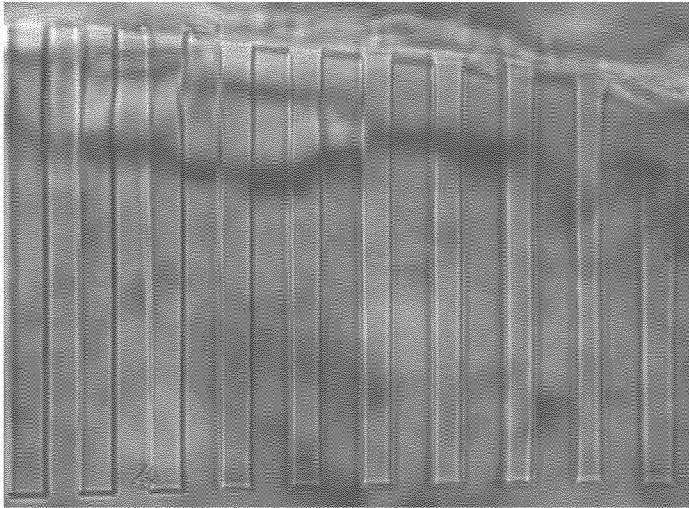


Beispiel 1

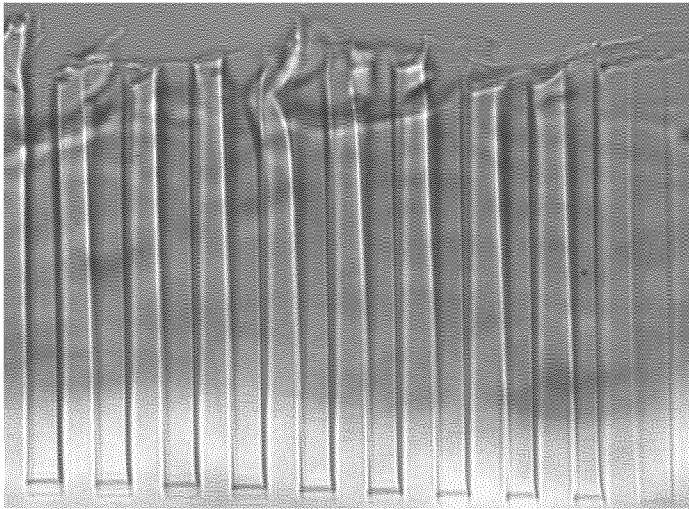


Vergleichsbeispiel 1

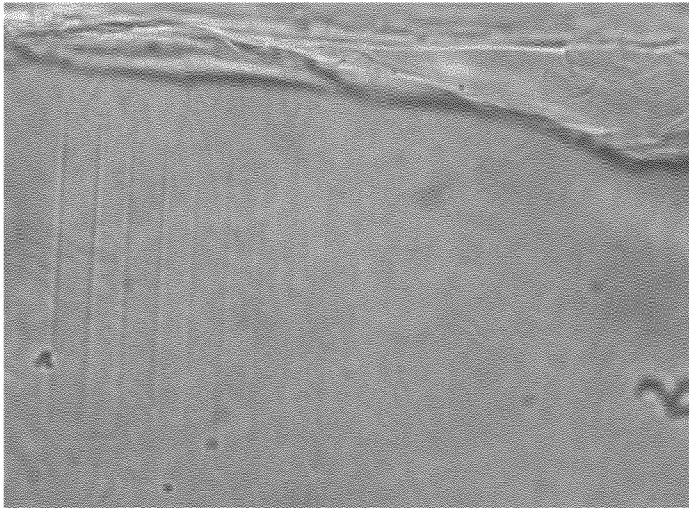
Figur 1



Beispiel 3



Beispiel 2



Vergleichsbeispiel 2

Figur 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/086564**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G03F 7/00**(2006.01)i; **G03F 7/20**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G03F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018071434 A1 (OMENETTO FIORENZO G [US] ET AL) 15 March 2018 (2018-03-15)	1-3,6
Y	abstract; claims 1-3 paragraphs [0027], [0028], [0125], [0223], [0229] page 34 - page 35; examples 1-3	1-10
X	WO 2008077407 A1 (BIONANOPHOTONICS AS [DK]; PETERSEN MARIA TERESA [DK] ET AL.) 03 July 2008 (2008-07-03)	1,2,6
Y	abstract; claims 18,19,21,22 page 4, line 35 - page 6, line 31	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 April 2020

Date of mailing of the international search report

14 April 2020

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Paisdor, Bernd

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/086564

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BENJAMIN D. FAIRBANKS ET AL. "Photodegradable, Photoadaptable Hydrogels via Radical-Mediated Disulfide Fragmentation Reaction" <i>MACROMOLECULES</i>, WASHINGTON, DC, UNITED STATES, Vol. 44, No. 8, 26 April 2011 (2011-04-26), pages 2444-2450 DOI: 10.1021/ma200202w ISSN: 0024-9297, XP055681544 abstract; figures 1,5,7 page 2444, left column - right column, paragraph 2 page 2445, left column, paragraph 2 - paragraph 5 page 2445, left column, last paragraph - right column, paragraph 3 page 2449, left column page 2447, right column	1-10
Y	MARKUS LUNZER ET AL. "A Modular Approach to Sensitized Two-Photon Patterning of Photodegradable Hydrogels" <i>ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION</i>, DE, Vol. 57, No. 46, 12 November 2018 (2018-11-12), pages 15122-15127 DOI: 10.1002/anie.201808908 ISSN: 1433-7851, XP055681523 cited in the application abstract page 15123; figure 1 page 15124, left column, paragraph 2 - page 15125, left column; figure 2	1-10
A	ALEKSANDR OVSIANIKOV ET AL. "Laser Photofabrication of Cell-Containing Hydrogel Constructs" <i>LANGMUIR</i>, US, Vol. 30, No. 13, 01 October 2013 (2013-10-01), pages 3787-3794 DOI: 10.1021/la402346z ISSN: 0743-7463, XP055550512 cited in the application abstract; figure 2	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/086564

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2018071434	A1	15 March 2018	NONE	
WO	2008077407	A1	03 July 2008	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G03F7/00 G03F7/20
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G03F

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2018/071434 A1 (OMENETTO FIORENZO G [US] ET AL) 15. März 2018 (2018-03-15)	1-3,6
Y	Zusammenfassung; Ansprüche 1-3 Absätze [0027], [0028], [0125], [0223], [0229] Seite 34 - Seite 35; Beispiele 1-3 -----	1-10
X	WO 2008/077407 A1 (BIONANOPHOTONICS AS [DK]; PETERSEN MARIA TERESA [DK] ET AL.) 3. Juli 2008 (2008-07-03)	1,2,6
Y	Zusammenfassung; Ansprüche 18,19,21,22 Seite 4, Zeile 35 - Seite 6, Zeile 31 ----- -/-	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. April 2020

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/04/2020

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Paisdor, Bernd

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BENJAMIN D. FAIRBANKS ET AL: "Photodegradable, Photoadaptable Hydrogels via Radical-Mediated Disulfide Fragmentation Reaction", MACROMOLECULES, Bd. 44, Nr. 8, 26. April 2011 (2011-04-26) , Seiten 2444-2450, XP055681544, WASHINGTON, DC, UNITED STATES ISSN: 0024-9297, DOI: 10.1021/ma200202w Zusammenfassung; Abbildungen 1,5,7 Seite 2444, linke Spalte - rechte Spalte, Absatz 2 Seite 2445, linke Spalte, Absatz 2 - Absatz 5 Seite 2445, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte, Absatz 3 Seite 2449, linke Spalte Seite 2447, rechte Spalte -----	1-10
Y	MARKUS LUNZER ET AL: "A Modular Approach to Sensitized Two-Photon Patterning of Photodegradable Hydrogels", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, Bd. 57, Nr. 46, 12. November 2018 (2018-11-12), Seiten 15122-15127, XP055681523, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201808908 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 15123; Abbildung 1 Seite 15124, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 15125, linke Spalte; Abbildung 2 -----	1-10
A	ALEKSANDR OVSIAKOV ET AL: "Laser Photofabrication of Cell-Containing Hydrogel Constructs", LANGMUIR, Bd. 30, Nr. 13, 1. Oktober 2013 (2013-10-01), Seiten 3787-3794, XP055550512, US ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la402346z in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 2 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2019/086564

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2018071434	A1	15-03-2018	KEINE
WO 2008077407	A1	03-07-2008	KEINE