

DISS. ETH Nr. 13058

**TAILORED ORGANIC THIN FILMS  
ON GOLD AND TITANIUM  
PEPTIDE-GRAFTING, PROTEIN RESISTANCE AND PHYSICAL  
CHARACTERIZATION**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of Doctor of Technical Science

presented by  
SHOU-JUN XIAO  
M. Sc. Chemistry, Fudan University

born on Dec. 07, 1963  
China

accepted on the recommendation of

PROF. DR. N.D. SPENCER, examiner  
DR. M. TEXTOR, co-examiner  
DR. H. SIGRIST, co-examiner

ZÜRICH 1999

---

## Abstract

In order to improve the biocompatibility of titanium implants widely used in biomedical applications, the cell-adhesive, RGD-containing peptides were immobilized on titanium surfaces through a three-step reaction procedure. The first step is silanization of titanium surfaces with (3-aminopropyl)triethoxysilane, resulting in a multilayer film of poly(3-aminopropyl)siloxane. The second reaction step, a key step of this modification procedure, is grafting functional crosslinking groups (maleimide, iodoacetate, succinimidyl ester, and arylazide) through the surface reaction of primary amines with succinimidyl esters. The final step is the covalent attachment of RGD-containing peptides through a thioether, an amide linkage, or a photochemical reaction. Two model, cell-adhesive peptides, H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-OH (GRGDSPC) and H-Arg-Gly-Asp-Cys-OH (RGDC) were immobilized through covalent addition of the cysteine thiol (-SH) group to the maleimidyl group. An approximate coverage of 0.2~0.4 peptides per nm<sup>2</sup> was calculated through independent quantitative analyses. The RGD-modified samples were then tested with the osteoblastic cell line MC3T3-E1 and rat bone marrow cells *in vitro*. Preliminary cell culture results show positive effects for osteoblastic cell line MC3T3-E1 but negative effects for rat bone marrow cells in cell adhesion, differentiation, and integration. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), infrared reflection absorption spectroscopy (IRAS), time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (ToF-SIMS), ellipsometry, and radiolabeling techniques were applied to characterize the surfaces. The controversy as regards the interpretation of the IRAS spectra, especially for the maleimidylhexanoyl pendant surface, motivates us to investigate the detail of the surface reactions of primary amines with amino-reactive heterobifunctional crosslinkers.

Two model aminothiols, cystamine and 4-aminothiophenol, were self-assembled on gold surfaces as the starting films for model investigations. Different types of thiol-, amino-, and photo-reactive crosslinkers were then attached to the two amino-terminated SAMs. Based on IRAS and XPS measurements, two types of reaction schemes have been observed: (1) modification through single group binding, (2) occurrence of side reactions and production of multiple-group-modified surfaces. A typical example for the latter case is the reaction of N-succinimidyl-6-maleimidyl hexanoate (EMCS) with terminal NH<sub>2</sub> groups, producing a mixture of both maleimidyl and succinimidyl ester groups on the surface. The conclusion is confirmed by the study of SAMs of pure N, N'-bis(maleimidylhexanoyl)cystamine (BMHC), synthesized separately. The functionalized surfaces with crosslinking groups can be used for further specific or non-specific attachment of biomolecules.

Finally, two types of poly(ethylene glycol) (PEG) were grafted to amino-terminated surfaces, methoxy-PEG in a "standing-up" configuration and bridging-PEG in a "lying-down" configuration. Their surface structures and reaction yields were studied with IRAS and XPS. The protein resistance of PEG-coatings was evaluated with the optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS). Only the bridging PEG exhibited protein resistance.

## Zusammenfassung

Um die Biokompatibilität von Titanoberflächen für Implantate und biomedizinische Anwendungen zu verbessern, wurden zelladhäsive Oligopeptide, die eine RGD-Sequenz enthalten, mittels einer Dreistufen-Reaktion kovalent an die Titanoberfläche angebunden. Der erste Schritt beinhaltet die Silanisierung von Titanoberflächen mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan, welche zu einem Mehrschichten-Film bestehend aus Poly(aminopropyl)siloxan führt. Der zweite Reaktionschritt, der entscheidende Schritt der gesamten Reaktionssequenz, ist das Anknüpfen von funktionellen Vernetzungsgruppen (Maleimid, Iodacetat, Succinimidyl-Ester, und Arylazid) durch die Oberflächenreaktion von primären Amiden mit Succinimidyl-Estern. Im letzten Schritt wird das RGD-enthaltende Peptid über die Thiolfunktion addiert (Amid-Bindung oder über eine photochemische Reaktion). Zwei zelladhäsive Modell-Peptide H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-OH (GRGDSPC) und H-Arg-Gly-Asp-Cys-OH (RGDC) wurden durch kovalente Addition der Cystein-Thiol-Gruppe an die Maleimidyl-Gruppe immobilisiert. Ein ungefährer Bedeckungsgrad von 0.2-0.4 Peptid/nm<sup>2</sup> wurde mit unabhängigen quantitativen Methoden berechnet. Die RGD-modifizierten Proben wurden in der Osteoblastzelllinie MC3T3-E1 und Rattenknochenmarkzellen *in vitro* getestet. Die ersten Zellkulturergebnisse zeigen bezüglich Zelladhäsion, Differenzierung und Integration positive Effekte für Osteoblasten und negative Effekte für die Knochenmarkzellen. Um die Oberflächen zu charakterisieren, wurden X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (IRAS), Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy (ToF-SIMS), Ellipsometrie und Radiolabeling Techniken eingesetzt. Die kontroverse Interpretation von IRAS-Spektren, speziell für Maleimidylhexanoyl, motivierte uns, die Details der Oberflächenreaktionen von primären Aminen mit aminoreaktiven heterobifunktionellen Vernetzungsmolekülen zu untersuchen.

Im Hinblick auf ein verbessertes Verständnis der Reaktionsmechanismen an der Oberfläche wurden zwei Modell-Aminothiole, Cystamin und 4-Aminothiophenol, auf Goldoberflächen adsorbiert (selbstorganisierende Monoschichten, SAM). Verschiedene Typen von Thiol-, Amino- und Photo-reaktiven Vernetzungsmolekülen wurden an die aminoterminierte SAMs angebunden. Basierend auf XPS und IRAS Messungen wurden zwei verschiedene Reaktionsschemata beobachtet: (1) Modifikation durch Ein-Gruppen-Bindung, (2) auftreten von Nebenreaktionen und Produktion von Mehrfach-Gruppen-modifizierten Oberflächen. Ein typisches Beispiel für den zweiten Fall ist die Reaktion von N-Succinimidyl-6-maleimido-caproat (EMCS) mit NH<sub>2</sub>-Endgruppen, was zu einer Mischung von Maleimidyl- und Succinimidylestergruppen auf der Oberfläche führt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Untersuchung von SAMs bestätigt, für welche speziell

synthetisiertes, reines N,N'-Bis(maleimidylhexanoyl)cystamin (BMHC) verwendet wurde. Die funktionalisierten Oberflächen mit vernetzenden Gruppen können für spezifische oder unspezifische Bindung von Biomolekülen an die Oberfläche benutzt werden.

Zum Schluss wurden zwei Typen von Polyethylenglykolen auf aminoterminierten Oberflächen aufgebracht: Methoxy-PEG in "standing-up"-Konfiguration und bridging-PEG in "lying-down" Konfiguration. Ihre Oberflächenstruktur und Reaktionskinetik wurden mit IRAS und XPS studiert. Die Resistenz gegen Proteinadsorption wurde mit Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) ermittelt. Nur das bridging-PEG zeigte Resistenz gegen Proteinadsorption.