

Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften Karlsruher Institut für
Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplomchemiker Bastian Münster

aus

Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: PD Dr. Frank Breitling

Korreferent: Prof. Dr. Michael Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Kurzfassung

Das am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg entwickelte und von der PEPperPRINT GmbH kommerziell angewandte Laserdruckerverfahren zur partikelbasierten Festphasensynthese von Peptiden im Arrayformat ist in der Lage, hochaufgelöste Peptidarrays mit einer Spotgröße von $250 \times 500 \mu\text{m}^2$ herzustellen, was einer Spotdichte von ca. 1.000 Spots/cm² entspricht. Der Hauptvorteil der partikelbasierten Festphasenpeptidsynthese mit dem Laserdrucker im Vergleich zu anderen Verfahren zur Herstellung hochaufgelöster Arrays aus Lösung, liegt in der Möglichkeit, alle 20 proteinogenen Aminosäuren parallel an die Oberfläche zu koppeln. Darüber hinaus zeichnet sich diese Methode aufgrund der *in situ* Synthese direkt an einem funktionalisierten Glasträger, durch eine hohe Flexibilität aus. Die in den Tonerpartikeln eingebetteten Aminosäureaktivester können stabil über Monate in den Druckwerken, bei Raumtemperatur, gelagert werden. All dies resultiert in extrem niedrigen Synthesekosten von ca. 0,135 € pro Peptid.

Ein neuer am KIT entwickelter Ansatz zur Herstellung hochdichter kombinatorischer Peptidarrays, der auf der Strukturierung von mit Aminosäureaktivester beladenen Mikropartikeln mittel Laserstrahlung beruht, ermöglicht die Herstellung deutlich höher aufgelöster Arrays. Allerdings erfordert diese Methode speziell abgestimmte Mikropartikel.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, basierend auf den Aminosäuretonern der Laserdruckerapplikation, eine entsprechende Modifikation der mit Aktivester beladenen Mikropartikel vorgenommen. Nach der erfolgreichen Anpassung der Partikelgrößenverteilung ($d(0,5) < 5,0 \mu\text{m}$) und -zusammensetzung wurde das Sprühtrocknungsverfahren als Alternative zum Mahlprozess für die Mikropartikelherstellung untersucht. Eine Optimierung der Prozessparameter ermöglichte die reproduzierbare Herstellung von mit Aminosäureaktivester beladenen Mikropartikelchargen.

Zusätzlich wurde das Partikelmatrixmaterial mittels Differential Scanning-Calorimetry auf seine thermischen Eigenschaften untersucht. In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss verschiedener Aktivesterkonzentrationen auf die Glasübergangstemperatur der Partikelmatrix genauer betrachtet werden. Mehrere photometrisch ausgewertete

Versuchsreihen belegten eine zu erwartende Diffusionslimitierung der im Partikelmatrixmaterial eingebetteten Aktivesterbausteine bei der Kupplungsreaktion an den Syntheseträger. Durch dynamische Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry-Messung konnte erstmals die Frage geklärt werden, wie tief ein Aminosäureaktivester-Derivat während der Kupplungsreaktion in den Synthesefilm an der Oberfläche eindringen kann.

Neben den für die Festphasenpeptidsynthese gängigen Aminosäure-Derivaten konnten auch Spezialbausteine wie Biotin-Pentafluorophenylester, der bei Markierungsexperimenten aber auch bei der Aufreinigung von Peptiden im Arrayformat Anwendung findet, sowie Fmoc-S-acetamidomethyl-L-cysteine-pentafluorophenylester, ein orthogonal zur Fmoc-/^tBu-Strategie entschützbare Cystein-Derivat, erfolgreich in die partikelbasierte SPPS integriert werden. Die Ankupplung des in Mikropartikeln eingebetteten Fmoc-Cys(Acm)-OPfp, sowie die chemische Umwandlung und Abspaltung der Schutzgruppe wurde mit Röntgenphotonen-Spektroskopie quantifiziert. Des Weiteren gelang die partikelbasierte Immobilisierung des 6-merigen Peptids CYWDDK(Biotin) auf funktionalisierten Glasoberflächen und der entsprechende Nachweis über Streptavidin-Farbstoff Konjugat.

In einem Proof of Principle Experiment konnte am KIT gezeigt werden, dass eine Variante des laserbasierten Verfahrens in der Lage war, mit im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mikropartikeln auf einer vorstrukturierten Synthesoberfläche ein Biotin-Muster mit einer Auflösung von 1.000.000 Spots/cm² zu erzeugen.

Abstract

The particle based solid phase peptide synthesis with a laser printer developed at the German Cancer Research Center Heidelberg (DKFZ) is able to produce peptide arrays with a spot size of $250 \times 500 \mu\text{m}^2$ and a spot density of approximately 1.000 Spots/ cm^2 . The advantage of this technique compared to similar procedures is the parallel coupling of all 20 proteinogenic amino acids within a single step. The amino acid active esters embedded inside the polymer micro-particles show no significant decay and can be stored inside the printing-units at room-temperature for months. With a price of 0,135 € per peptide this procedure is extremely cost-efficient.

However, the resolution is still too low to analyze whole proteomes. A newly developed approach based on the structuring of particles on synthesis surfaces using a laser system is capable of much higher resolutions, but requires specially optimized micro-particles.

In this work, the amino acid toners employed within the laser printing system were modified to meet the requirement of the new approach. After the successful reduction of the average particle-size ($d(0,5) < 5,0 \mu\text{m}$) and distribution, the spray drying procedure was established as an alternative method to reproducibly manufacture small amounts of experimental toners with active esters.

The thermic properties of the matrix material were examined using Differential Scanning Calorimetry, enabling the characterization of the influence of different concentrations of activated esters on the glass transition temperature. Also, photometric measurements indicated that the diffusion of the active esters within the matrix material was limited. Dynamic Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry was employed to track coupling depth within the synthesis film. These results showed that synthesis occurred nearly exclusively in the top 60 nm of the material.

Aside from common SPPS amino acid derivatives, special building blocks like Biotin-pentafluorophenylesters and Fmoc-S-acetamidomethyl-L-cysteinepentafluorophenylester, were successfully incorporated within the matrix material. The coupling of these building blocks was proven by fluorescence experiments for biotin and XPS measurements for the cysteine derivative. The 6meric peptide CYWDDK(Biotin) was coupled particle-based to a functionalized substrate as well and detected by fluorescence reactions.

A proof of principle experiment conducted at KIT used the manufactured particles to generate a biotin pattern with a resolution of 1.000.000 Spots/cm² on a pre-structured surface, demonstrating the possibilities generated by the work performed.

Abkürzungen

AEG ₃	Amino(ethylenglycol) ₃
Å	Angström (10 ⁻¹⁰ m)
β-Ala	β-Alanin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CMOS	Komplementärer Metall-Oxid-Halbleiter (complementary metal oxide semiconductor)
DATT	1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecane
DCM	Dichlormethan
DG	Derivatisierungsgrad
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N</i> -diisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry)
eV	Elektronenvolt (1,602176565*10 ⁻¹⁹ kg m ² s ⁻²)
3-GPS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
ESA	Essigsäureanhydrid
EtOH	Ethanol
exo	exotherm

Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(-Schutzgruppe)
h	Stunde(n) (hour(s)) (3.600 s)
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
% (w/w)	Massenprozent
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
min	Minute(n) (minute(s)) (60 s)
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)
MeOH	MeOH
% (n/n)	Molprozent
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
OPfp	Pentafluorophenylester
Pbf	2,2,4,6,7,-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylgruppe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PDFA	Piperidin-Dibenzofullven- Addukt

PEG	Polyethylenglycol
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methylmethacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
10/90-PEGMA-co-PMMA	Copolymer-Synthesefilm aus 10 % (n/n) PEGMA und 90 % (n/n) PMMA
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	Selbstorganisierende Monolage (self assembled monolayer)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis)
Strep.	Streptavidin
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl(-Schutzgruppe)
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
ToF-SIMS	Flugzeit Sekundärionen-Massenspektroskopie (time of flight secondary ion mass spectrometry)
Trt	Trityl(-Schutzgruppe)
% (v/v)	Volumenprozent
W.E.	Willkürliche Einheiten
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (X-Ray photoelectron spectroscopy)
z.A.	Für die Analyse (Reinheitsgrad)

z.S. Für die Synthese (Reinheitsgrad)

Inhalt

Abkürzungen	i
Abbildungen.....	ix
Tabellen	xiii
Formeln	xv
1. Einleitung.....	1
1.1. Peptidarrays	7
1.2. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Allgemeines Prinzip).....	9
1.3. Herstellungsmethoden für mit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel (Das Mahlverfahren).....	12
1.4. Herstellungsmethoden für mit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel (Der Sprühtrocknungsprozess).....	14
1.5. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Der Laserdrucker-Ansatz)	16
1.6. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Die CMOS-Chip – Variante).....	18
1.7. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Das laserbasierte Anschmelzverfahren).....	19
2. Motivation	20
3. Ergebnisse und Diskussion	21
3.1. Vorüberlegung zum Mikropartikeldesign.....	21
3.2. Partikelherstellung.....	23
3.2.a) Das Mahlverfahren.....	23
3.2.b) Das Sprühtrocknungsverfahren	28
3.3. Thermische Analyse mittels Differential Scanning Calorimetry.....	35
3.4. Untersuchung der Kupplungseigenschaften des in Mikropartikeln eingebetteten Aktivesters	42
3.4.a) Photometrische Untersuchung.....	42

3.4.b)	Der Einfluss der Partikelmorphologie auf die Kupplungsausbeute	55
3.4.c)	Untersuchung der partikelbasierten Kupplung eines Aktivesters in der Tiefe des Polymerfilms.....	60
3.5.	Das Einbringen spezieller Bausteine in die Partikelmatrix.....	72
3.5.a)	Biotin-OPfp Ester	72
3.5.b)	Fmoc-Cys(Acm)-OPfp.....	77
3.5.c)	Peptide	85
4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	89
5.	Materialien und Geräte.....	91
5.1.	Chemikalien und Lösungsmittel	91
5.2.	Geräte.....	92
6.	Experimentelle Methoden.....	97
6.1.	Das Mahlverfahren	97
6.2.	Das Sprühtrocknungsverfahren.....	97
6.3.	Reinigung und Aktivierung von Siliziumwafern und Glasobjektträgern.....	98
6.4.	Silanisierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES).....	98
6.5.	Veresterung mit α -Bromoisobutyrylbromid (BIBS)	99
6.6.	Silanisierung mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (3-GPS).....	99
6.7.	Polymerisierung (100% PEGMA-Oberfläche)	99
6.8.	Kupplung von Aminosäuren an Hydroxyl- bzw. Aminofunktionen (aus Lösung)	100
6.9.	Acetylierung freier Hydroxy- und Aminofunktionen auf der Syntheseoberfläche (Capping).....	100
6.10.	Entfernung der <i>N</i> -terminalen Fmoc-Schutzgruppe (Entschützung).....	101
6.11.	Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen (Seitenketten-Entschützung).....	101
6.12.	Kupplung von Aminosäureaktivestern aus Lösung.....	101
6.13.	Partikelbasierte Kupplung von Aminosäureaktivestern oder Spezialbausteinen	102

6.14. Behandlung der Oberfläche gegen unspezifische Adsorption von Proteinen (Blockierung der Oberfläche für Fluoreszenzassays)	102
6.15. Färbung mit Streptavidin-Farbstoff Konjugat.....	102
Literatur	103

Abbildungen

Abbildung 1: Ursprüngliche Strategie der SPPS nach Merrifield.....	1
Abbildung 2: Mechanismus der Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe.....	2
Abbildung 3: Säurelabile Seitenketten-Schutzgruppen.....	3
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kondensationsreaktion einer Aminosäure an eine an der festen Phase angebotene Amino-Funktion	3
Abbildung 5: DIC vermittelte Kupplung einer Aminosäure in der SPPS	4
Abbildung 6: Razemisierung des hochreaktiven O-acylharnstoff Intermediats über das 5(4H)-oxazolone.....	5
Abbildung 7: Fmoc- geschützter Pentafluorophenylester.....	6
Abbildung 8: PEGMA- und PEGMA-co-PMMA - Syntheseeoberflächen für die partikelbasierte SPPS im Arrayformat.....	9
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Synthesesyklus der partikelbasierten SPPS ..	10
Abbildung 10: Der Mini-Sprühtrockner B-290	15
Abbildung 11: Peptidlaserdrucker	16
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Standard Druckwerks.....	17
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Verlaufs des kombinatorischen, laserbasierten Anschmelzverfahrens.....	19
Abbildung 14: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (I)	23
Abbildung 15: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (II).....	24
Abbildung 16: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (III)	25
Abbildung 17: Partikelgrößenverteilungen einer mit der IKA M 20 Mühle zerkleinerten und anschließend mit der 50 AS feingemahlten Partikelcharge.	26
Abbildung 18: Partikelgrößenverteilungen der sprühgetrockneten Ansätze LK958-010, - 011 und -014.....	29
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Partikelformierung (I).....	30

Abbildung 20: Sprühgetrocknete Partikelchargen mit Inlet-Temperaturen von 70 °C, 50 °C und 45 °C.....	31
Abbildung 21: Beispiele für eine Anomalie in der Oberflächenbeschaffenheit sprühgetrockneter Partikel.....	32
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Partikelformierung (II)	32
Abbildung 23: NMR Spektren von reinem Matrixmaterial (Referenz), LK958-042 (Probe 1) und LK958-037 (Probe 2) im Vergleich.....	33
Abbildung 24: DSC Messung des reinen S-LEC-P LT 75 52 (Heiz- / Kühlrate: 10 K/min, Isotherme: 10 min).....	36
Abbildung 25: Vergleich der 1. Aufheizsegmente der DSC-Analysen der in Tabelle 7 aufgeführten Proben	38
Abbildung 26: Vergleich der 2. Aufheizsegmente der DSC-Analysen der in Tabelle 8 aufgeführten Proben	39
Abbildung 27: HPLC-Vergleichsmessungen der Sprühtrocknerpartikelchargen LK958-032, -042, -035, -036 und -037.....	44
Abbildung 28: Kupplungseffizienz verschiedener sprühgetrockneter Partikelchargen mit unterschiedlichem Fmoc-Gly-OPfp Gehalt.....	45
Abbildung 29: Kupplungseffizienzen der Partikelcharge LK958-042 bei verschiedenen Reaktionsbedingungen	47
Abbildung 30: Strukturformeln von Fmoc-Gly-OPfp und Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp	49
Abbildung 31: Kupplungseffizienz verschiedener sprühgetrockneter Partikelchargen mit unterschiedlichem Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Gehalt.....	51
Abbildung 32: Durch intramolekularen Ringschluss aus Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp gebildetes β -Lactam	51
Abbildung 33: HPLC-Analysen der Sprühtrocknerpartikelchargen LK958-048 und -049.....	52
Abbildung 34: REM Aufnahmen gemahlener und sprühgetrockneter Mikropartikel.....	55
Abbildung 35: Biotin-OPfp beladene mit Strep.-Dylight 680 angefärbte Mikropartikel.....	56
Abbildung 36: REM-Aufnahmen der Kanten von auf dem Syntheseträger deponierten und verdichteten Partikelschichten.	57
Abbildung 37: Bei 90 °C auf einer 100% PEGMA Oberfläche verflüssigte Mikropartikel ..	58

Abbildung 38: Schmelzbild verdichteter Mikropartikel auf einer 100% PEGMA Oberfläche.....	59
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Probenherstellung für das TOF-SIMS Experiment.....	62
Abbildung 40: Poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala) ₃ -NH ₂ funktionalisierten Siliziumwafers.....	63
Abbildung 41: Poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala) ₃ -NH ₂ funktionalisierten Siliziumwafers nach der partikelbasierten Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp.....	64
Abbildung 42: Auf die Gesamtionenzahl normierte, poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala) ₃ -NH ₂ funktionalisierten Siliziumwafers nach der partikelbasierten Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp.....	65
Abbildung 43: Profilometermessungen der TOF-SIMS Sputterkrater	67
Abbildung 44: Auf die Gesamtionenzahl normierte, poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala) ₃ -NH ₂ funktionalisierten Siliziumwafers nach der Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp aus Lsg. im Vergleich zur partikelbasierten Kupplung.....	68
Abbildung 45: Schematische Darstellung der Verteilung des C ₁₉ H ₁₅ ⁺ sowie des SiOH ⁺ korrelierten Signals nach der partikelbasierten Kupplung des Fmoc-Cys(Trt)-OPfp anhand eines 3D-Rendering-Modells.....	69
Abbildung 46: Heatmap der Trityl-Signalverteilung über die 300 x 300 μ m ² große mit TOF-SIMS untersuchte 100 % PEGMA(β -Ala) ₃ -NH ₂ -Oberfläche nach der Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Kupplung aus Lösung und aus Partikel.....	70
Abbildung 47: Fluoreszenzscan von mit dem laserbasierten Ansmelzverfahren strukturierten, mit Biotin-OPfp beladenen, mit dem Mahlverfahren hergestellten Mikropartikeln auf zwei unterschiedlich funktionalisierten Glasträgern	74
Abbildung 48: Fluoreszenzscan eines mit dem laserbasierten Ansmelzverfahren synthetisierten Dipeptidarrays.....	75
Abbildung 49: Mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops aufgenommenes Fluoreszenzbild	76
Abbildung 50: Konversion von Cys(Acm) in Cys(Scm) durch Methoxycarbonylsulfenylchlorid und anschließende Reduktion der Disulfidbrücke mit Dithiothreitol	77

Abbildung 51: XPS Vergleichsmessung der partikelbasierten Kupplung des Fmoc-Cys(Acm)-OPfp an eine mit 100 % PEGMA-(β -Ala)-NH ₂ funktionalisierte Objektträger-Oberfläche.....	79
Abbildung 52: Immobilisierung des in Partikel eingebetteten Peptids auf einer 3-GPS funktionalisierten Glasobjektträger Oberfläche.....	86
Abbildung 53: Fluoreszenzscans der partikelbasierten Peptidkupplung	87
Abbildung 54: Heiz-und Kühlprogramm der DSC-Messungen	92
Abbildung 55: Aus dem DSC-Signal ermittelte Werte	93

Tabellen

Tabelle 1: Bei der SPPS verwendete Hydroxylamin Additive	5
Tabelle 2: Bestandteile und Funktion der Additive in einem mit Aminosäureaktivester beladenen Toner der Laserdrucker Applikation	12
Tabelle 3: Übersicht über die Partikelformulierung für das laserbasierte Anschmelzverfahren	22
Tabelle 4: Partikelgrößenverteilungen von zu Testzwecken hergestellten mit der IKA M 20 Mühle zerkleinerten Rohmassen aus reinem Matrixmaterial	26
Tabelle 5: Drei Ansätze zur Untersuchung der aus dem Sprühtrocknungsprozess resultierenden Partikelgrößenverteilungen	28
Tabelle 6: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 24 dargestellten DSC-Kurven....	36
Tabelle 7: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 25 aufgeführten DSC-Kurven....	38
Tabelle 8: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 26 aufgeführten DSC-Kurven....	40
Tabelle 9: Charakteristische Werte aus dem 2. Aufheizsegment der DSC Analyse der Partikelcharge LK958-029, eines Gemischs aus 25 %(w/w) Graphit Nanopartikeln in Matrixmaterial und reiner Graphit Nanopartikeln.....	41
Tabelle 10: Zusammensetzung der mit Fmoc-Gly-OPfp beladenen, mit dem Sprühtrockner hergestellten Partikelchargen	44
Tabelle 11: Stoffmengenverhältnisse und Ausbeuten der Kupplungsexperimente mit den sprühetrockneten Partikelchargen LK958-034, -042, -035, -036, -037, einer PEPPERPRINT Toner-Feinfraktion und einer Referenz aus Lösung.....	46
Tabelle 12: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Gly-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-042 bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.	48
Tabelle 13: Zusammensetzung der Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen, mit dem Sprühtrockner hergestellten Partikelchargen	50
Tabelle 14: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-048, LK958-049, einer PEPPERPRINT Toner-Feinfraktion und einer Referenz aus Lösung.....	53
Tabelle 15: Vergleich des Ausbeute- und Überschuss-Verhältnisses der partikelbasierten Kupplungsreihen.....	53

Tabelle 16: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Gly-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-042, LK958-045	57
Tabelle 17: Zusammensetzung und Charakterisierung der sprühgetrockneten Partikelcharge LK 958-017	61
Tabelle 18 Zusammensetzung und Größenverteilung der mit Biotin-OPfp beladenen Mikropartikelchargen	72
Tabelle 19: Zusammensetzung und Charakterisierung der mit Fmoc-Cys(Acm)-OPfp beladenen Mikropartikelcharge LK958-047	78
Tabelle 20: Berechnete Abschwächungslängen (λ) und Wirkungsquerschnitte (σ) nach Scofield	81
Tabelle 21: S / C - Verhältnisse bzw. relativer Schwefelgehalt der mit XPS vermessenen Proben.	83
Tabelle 22: XPS-Messparameter	95

Formeln

Formel 1: Derivatisierungsgrad der Syntheseoberfläche	43
Formel 2: Berechnung von λ nach Stadler	81
Formel 3: Vereinfachter Term zur Berechnung der Signalintensität	82
Formel 4: Berechnung des Signalintensitäts- bzw- stöchiometrischen Verhältnisses zweier Elemente.....	82
Formel 5: Berechnung des Sprungs in der Wärmekapazität beim Glasübergang.....	93

1. Einleitung

Merrifields Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) liegt das Konzept zugrunde, eine Aminosäure kovalent an ein festes Syntheseträgermaterial anzubinden und dann Aminosäure um Aminosäure schrittweise zu koppeln, bis das Peptid mit der gewünschten Aminosäuresequenz dargestellt worden ist.^{[1] [2] [3]} Die ursprüngliche Vorgehensweise ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.^[1]

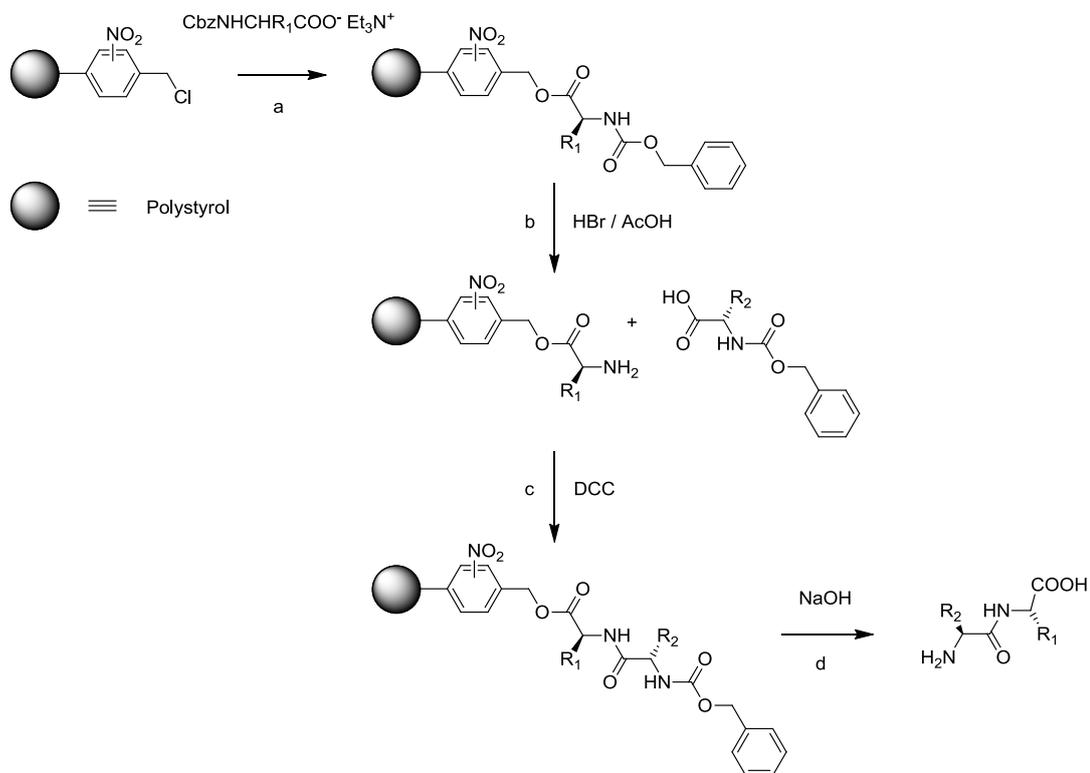


Abbildung 1: Ursprüngliche Strategie der SPPS nach Merrifield: (a) Kupplung der ersten Carboxybenzyl-geschützten Aminosäure an die feste Phase (b) Saure Entschützung des N-Terminus mit HBr / AcOH (c) Verlängerung der Peptidkette durch Anbindung einer weiteren Carboxybenzyl-geschützten Aminosäure mit DCC. Die Wiederholung der Schritte (b) und (c) führen zur Etablierung der gewünschten Aminosäuresequenz. (d) Abspaltung des fertig synthetisierten Peptids.^[1]

Dieser automatisierbare Ansatz und seine weiterentwickelten Varianten sind Grundlage vieler Methoden zur synthesechemischen Darstellung unterschiedlicher Peptide und Oligonukleotide an festen Trägermaterialien.^{[4] [5] [6] [7]} Er gibt auch für die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Anwendungen die zugrundeliegende Synthesestrategie vor.

Bei Aminosäuren handelt es sich um multifunktionale Moleküle. Um unerwünschte Nebenprodukte während der SPPS zu vermeiden, muss eine geeignete Schutzgruppenstrategie gewählt werden. Die klassischen Merrifield Varianten der SPPS werden nach der Boc-/Benzyl-Strategie durchgeführt. Hierbei beruht die Orthogonalität^[8]^[9] der Entschützung des *N*-Terminus und der Aminosäureseitenketten-Funktionen auf einer graduellen Säurelabilität der jeweiligen Schutzgruppe.^[1]^[7]^[10]^[11] Eine wichtige Ergänzung zur SPPS nach Merrifield stellt die Einführung der *N*-terminalen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc) dar.^[10]^[12]^[13] Die Verwendung dieser basenlabilen Schutzgruppe für den *N*-Terminus der wachsenden Peptidkette ermöglicht eine Entschützung der *N*-terminalen Aminofunktion (Abbildung 2), die bezüglich der säurelabilen Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen mechanistisch orthogonal verläuft. Die Verwendung *N*-terminal Fmoc-geschützter Aminosäure-Derivate und das Schützen der Aminosäureseitenketten mit im Sauren spaltbaren Schutzgruppen wird als Fmoc-/*t*Bu-Variante der SPPS bezeichnet.^[7]

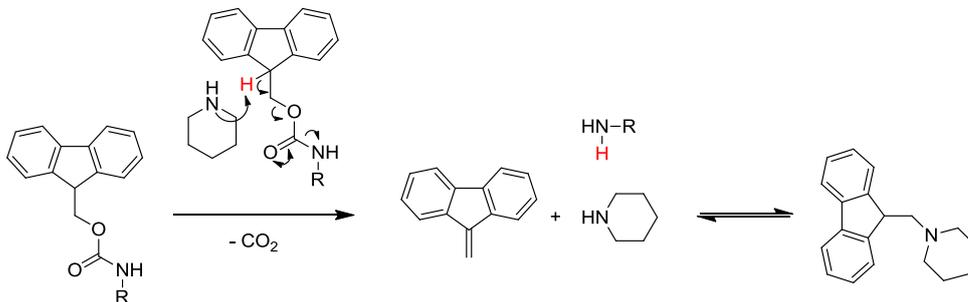
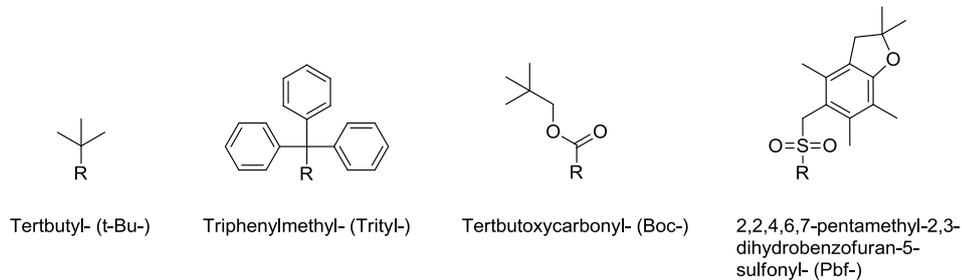


Abbildung 2: Mechanismus der Entschützung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin unter Bildung des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts (PDFA) (rechts).

In Abbildung 3 ist eine Übersicht im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Schutzgruppen für Aminosäureseitenketten dargestellt. Diese sind durch Trifluoressigsäure (TFA) abspaltbar.



R – Aminosäure (über die jeweilige Seitenketten-Funktion gekuppelt)

Abbildung 3: Säurelabile Seitenketten-Schutzgruppen: Die Seitenketten-Funktionen von Serin, Threonin, Tyrosin, Asparaginsäure und Glutaminsäure sind t-Bu-geschützt, die von Cystein, Histidin, Asparagin und Glutamin sind Trityl-geschützt, Lysin und Tryptophan Seitenketten sind Boc-geschützt und die Guadinyl-Funktion des Arginin ist an eine Pbf-Schutzgruppe gekuppelt.

Die Kupplung einer Fmoc- und seitenkettengeschützten Aminosäure an eine an der festen Phase angebotene Aminogruppe erfordert die Aktivierung der Aminosäuren-Carboxyl-Funktion gegenüber eines nukleophilen Angriffs (Abbildung 4) durch eine elektronenziehende Gruppe. [14]

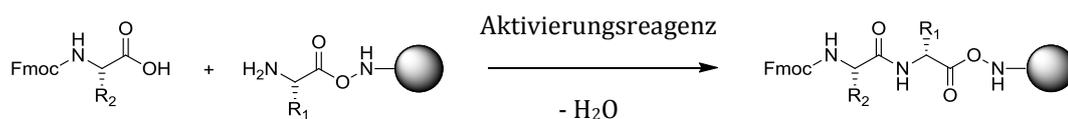


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kondensationsreaktion einer Aminosäure an eine an der festen Phase angebotene Amino-Funktion.

Bei der klassischen Merrifieldsynthese wird Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) [15] als Aktivierungsreagenz verwendet. [1] Da DCC während der Peptidsynthese ein unlösliches Harnstoff-Nebenprodukt bildet, wird in der SPPS Diisopropylcarbodiimid bevorzugt eingesetzt. Carbodiimide liefern gute Reaktionsausbeuten und sind preiswert, aber auch

stark toxisch. [16] Die *in situ* gebildete, hochreaktive Zwischenstufe, im Falle des DIC handelt es sich um eine O-acylharnstoff Spezies, kann durch Hydroxylamin-Additive abgefangen und in einen weniger aktiven, stabileren Ester überführt werden (Abbildung 5). Dadurch ist es möglich die unerwünschte Umlagerung in den unreaktiven N-acylharnstoff zu vermeiden. [17]

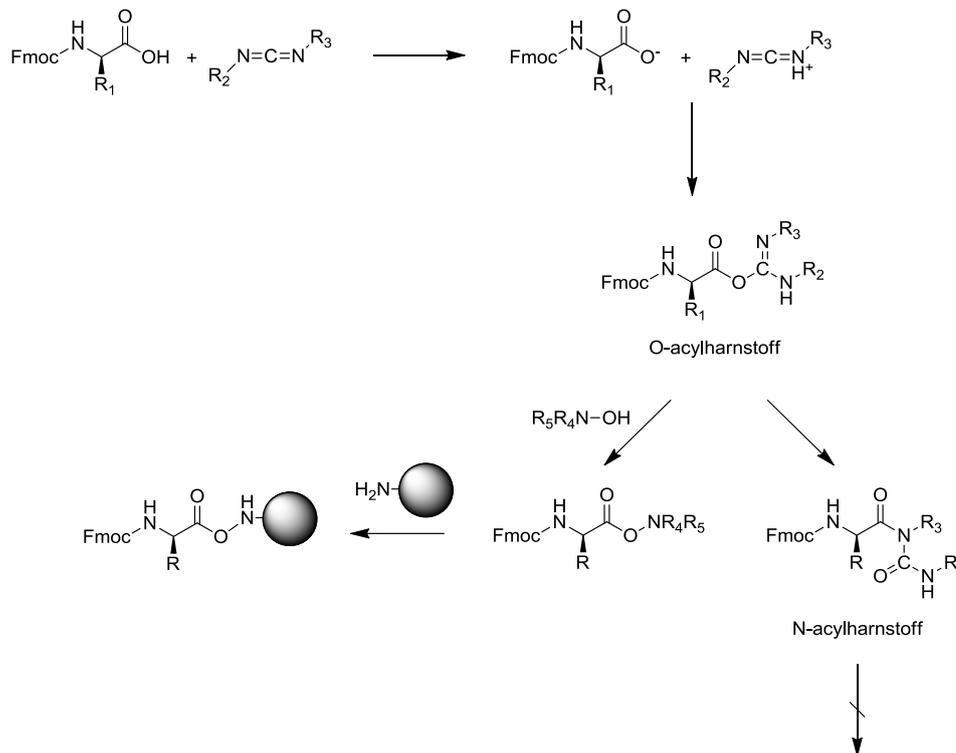


Abbildung 5: DIC vermittelte Kupplung einer Aminosäure in der SPPS. Der *in situ* erzeugte O-acylharnstoff wird durch ein Hydroxylamin abgefangen und bildet einen stabileren Aktivester.

Eine Razemisierung der zu kuppelnden Aminosäure über eine 5(4H)-oxazolone Cyclisierung [14] (Abbildung 6) und eine damit einhergehende Keto-Enol Tautomerisierung, die den Verlust der Stereoinformation zur Folge hätte ist so ebenfalls zu verhindern.

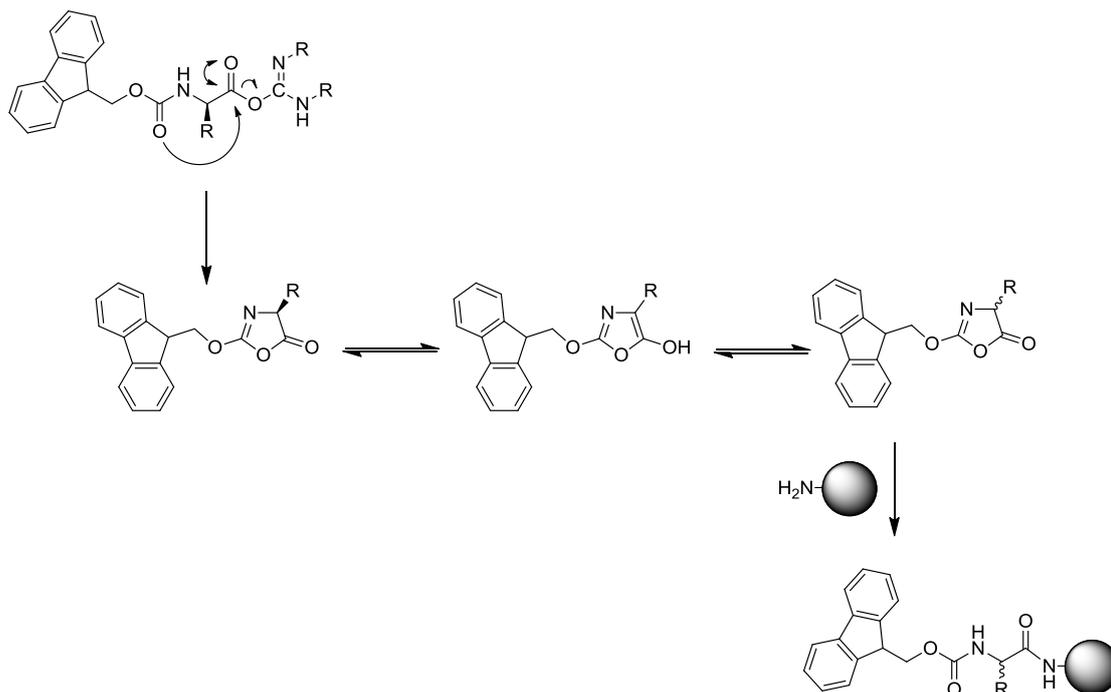


Abbildung 6: Razemisierung des hochreaktiven O-acylharnstoff Intermediats über das 5(4H)-oxazolone.

Als Hydroxylamin Additive kommen zum Beispiel die in Tabelle 1 dargestellten Verbindungen in Frage.

Stoffklasse	Strukturformel	-X / Namenskürzel
Hydroxylamin Additive		CH / (HOBT) N / (HOAt)

Tabelle 1: Bei der SPSS verwendete Hydroxylamin Additive zum Abfangen des bei der Aktivierung der zu kuppelnden Aminosäure *in situ* erzeugten Aktivester Intermediats. [16] [17]

Unmittelbar nach der Bildung des Aktivesters beschleunigt die Zugabe einer tertiären Stickstoffbase wie N-methylimidazol (NMI), Diisopropylethylamin (DIPEA) oder 4-Dimethylamino-pyridin (DMAP), die Kupplung an die feste Phase. [14] [18]

Eine weitere Möglichkeit eine C-terminal aktivierte Aminosäure in die SPPS einzubringen stellt die Verwendung der entsprechenden, hochreaktiven Säurehalogenide dar. [16] Ihr Hauptnachteil besteht in der Bildung von Halogenwasserstoff bei der Kondensationsreaktion, der den Zusatz einer Base zur Neutralisierung erfordert. Säurechloride neigen in Anwesenheit einer Base dazu über den 5(4H)-oxazolone Mechanismus zu racemisieren (vgl. Abbildung 6). [14] Die entsprechenden Fluoride zeigen dieses Verhalten nicht und reagieren auch ohne Stickstoffbase zu den erwünschten Kupplungsprodukten. Sie können *in situ* erzeugt werden und kommen hauptsächlich bei sterisch anspruchsvollen Reaktionen zum Einsatz. [19]

Isolier- und lagerbare Aktivester sind weniger reaktiv als die *in situ* hergestellten aktiven Spezies. Zu diesen Verbindungen gehören zum Beispiel die entsprechenden Succinimid-, Nitrophenyl- und Pentafluorophenylester. Die Fmoc- und seitenkettengeschützten Pentafluorophenylester finden oft Anwendung in der Fmoc-/^tBu basierten SPPS. Es handelt sich um effektive Acylierungsreagentien, die besonders bei Zugabe von HOBT keine Nebenreaktionen zeigen. [20] [21] Sie sind als Derivate aller 20 proteinogenen Aminosäuren kommerziell erwerblich. Außerdem liefern die Pentafluorophenylester auch ohne weitere Additive hervorragende Reaktionsausbeuten in der SPPS. [22]

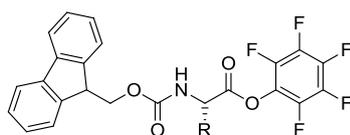


Abbildung 7: Fmoc- geschützter Pentafluorophenylester.

Weitere Modifikationen und Weiterentwicklungen der SPPS wie unterschiedliche Synthescharze, Schutzgruppenstrategien, verwendete Lösungsmittel, Linker, Aktivierungsreagenzien und Reaktionsbedingungen sind ausführlich in der Literatur beschrieben und sollen hier nicht im Detail ausgeführt werden. [7] [10] [14] [16] [23]

1.1. Peptidarrays

Die Verwendung hochdichter Bibliotheken zur Untersuchung von molekularen Interaktionen, zeichnet sich durch geringen Probenverbrauch und dem schnellen parallelen Screening einer Vielzahl an möglichen Interaktionspartnern in einem einzigen biochemischen Assay aus. [24] [25]

Im Falle der DNA-Mikroarrays ist die Entwicklung hochaufgelöster Bibliotheken wesentlich schneller verlaufen als dies für Peptidarrays der Fall ist. [25] [26] Zur *in situ* Synthese von hochdichten Oligonukleotid-Mikroarrays kommen Tintenstrahldruck Ansätze, elektrochemische oder photolithographische Verfahren zum Einsatz. [26] Die Herstellung eines entsprechenden Protein- oder Peptidmikroarrays ist bezüglich der Kombinatorik, die aus 20 verschiedenen Monomer-Bausteinen resultiert, um ein Vielfaches komplexer. [25]

R. Frank beschrieb 1992 eine Methode zur Synthese von Peptiden im Array-Format auf Cellulose Membranen. [27] Mit der SPOT-Technik ist es unter Anwendung der Merrifield'schen SPPS und der Fmoc / *t*Bu-Schutzgruppenstrategie möglich Peptide unter voller Kombinatorik ortsgenau, manuell oder automatisiert, [28] zu synthetisieren. Die Auflösung der erzeugten Bibliotheken ist bei dieser Methode durch die Verwendung von in der Peptidchemie gängigen Lösungsmitteln limitiert (25 Spots/cm²). [29] Die Spots würden bei einer zu dichten Anordnung ineinander laufen wodurch die Ortsinformation der zu synthetisierenden Peptide verloren ginge. Die Erhöhung der Anzahl an Spots pro Fläche durch beliebiges Verkleinern der Lösungsmittelvolumina ist durch die Verdunstung des Lösungsmittels, selbst bei der Verwendung von N, N'-Dimethylformamid (DMF), nicht praktikabel. [29] Die Herstellung hochdichter Peptidarrays wird durch eine Variante der SPOT-Technik, der SC²-Methode ermöglicht. Dieses Verfahren wird von der INTAVIS AG [30] und JPT [31] kommerziell angewandt. [32]

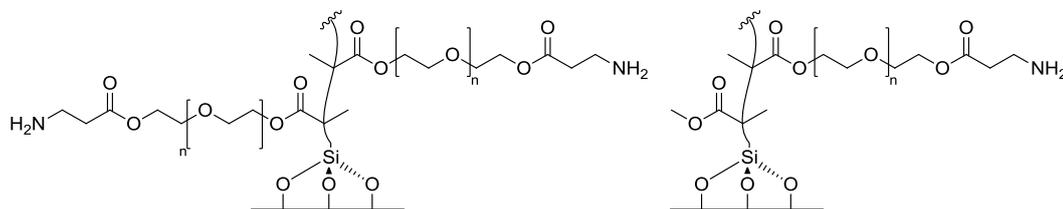
Auf die Peptidarraysynthese ausgerichtete kombinatorische Herangehensweisen, zur *in situ* Synthese hochdichter Arrays durch photolithographische Techniken, sind in der Literatur ausführlich beschrieben. [25] [29] Meist sind diese Verfahren nur schwer in Routinesynthesen zu überführen, da sie die Verwendung nicht standardisierter Bausteine und arbeitsintensiver Protokolle erfordern. Darüber hinaus sind die repetitiven Kupplungsausbeuten lithographischer Methoden in Kombination mit photolabilen

Schutzgruppen oft schlecht. [29] Die kombinierte Nutzung von Digital Mirror Devices mit einer auf photogenerierten Säuren basierenden Schutzgruppenstrategie bietet eine Möglichkeit hochdichte Peptidarrays mit guten Kupplungsausbeuten darzustellen. [33] [34] Diese photogenerierten Säuren müssen allerdings nach der Entschützungsreaktion, über ein Mikrofluidiksystem, in z-Richtung des Arrays entfernt werden um Fehlentschützungen an unerwünschten Positionen des Arrays zu vermeiden. [29] Selbst bei diesen weiterentwickelten Methoden sind extrem kurze Kupplungszeiten, keine Möglichkeit der Acetylierung und ein Zeitrahmen von ca 10 h pro Aminosäure-Schicht ein bestehender Nachteil. [34]

1.2. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Allgemeines Prinzip)

Generell folgt dieser Ansatz der Merrifield'schen SPPS. Für die Synthese werden Fmoc- und seitenkettengeschützte Aminosäure-Pentafluorophenylester (-OPfp) verwendet. Diese Aktivester können *in situ* hergestellt und verarbeitet werden, sind aber auch isolierbar. Die Aminosäure-OPfp-Ester werden in ein bei Raumtemperatur festes Polymermaterial eingebettet. Dieses Polymer wird bei erhöhter Temperatur verflüssigt und dient der Peptidsynthese als Reaktionsmedium. Das viskose, verflüssigte Polymermaterial erlaubt die Ausbildung von Reaktionssphären im Mikrometermaßstab ohne ineinander zu fließen oder vor dem vollständigen Ablauf der Reaktion zu verdampfen und schützt die Reaktion vor äußeren Umwelteinflüssen wie Feuchtigkeit oder Sauerstoff. [35]

Als feste Phase dienen Polyethylenglycolmethacrylat (PEGMA) oder PEGMA-Polymethylmethacrylat- (PEGMA-co-PMMA) Copolymer aufgebracht auf Siliziumwafer bzw. Glaträger. [36] [37]



mit $n = 3$ bis 5

Abbildung 8: PEGMA- (a) und PEGMA-co-PMMA- (b) Syntheseoberflächen für die partikelbasierte SPPS im Arrayformat.

Die Nukleophilie der Syntheseoberflächen wird durch Anbindung von β -Alanin und die damit einhergehende Bereitstellung von Aminofunktionen an der Syntheseoberfläche erhöht. Die Hydroxyl-Funktionen des nicht mit β -Alanin funktionalisierten Syntheseträgers würden zu langsam mit den OPfp-Estern abreagieren.

Die Ablagerung der Mikropartikel und die durch Temperaturerhöhung und Verflüssigung des polymeren Matrixmaterials eingeleitete Kupplungsreaktion sind zeitlich voneinander getrennt. Dadurch ist es möglich, die Oberfläche mit unterschiedlichen Mikropartikelsorten zu beladen und alle in den Partikeln eingebetteten Aktivester in einem einzigen Kupplungsschritt pro Partikelschicht kovalent an der Syntheseoberfläche zu immobilisieren. Der Hauptunterschied zu Methoden wie der SPOT-Technik oder lithographischen Verfahren zur hochdichten SPPS im Arrayformat liegt darin, dass die Oberfläche zunächst mit allen 20 Aminosäurederivaten strukturiert wird, bevor der parallele, gleichzeitige Kupplungsschritt erfolgt. Nicht abreagierte Aminosäurederivate und Partikelmatrixreste werden gewaschen. Auf der Oberfläche verbliebene Aminofunktionen werden acetyliert um die Synthese von Peptiden mit fehlerhaften Aminosäuresequenzen zu unterbinden. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe kann der Syntheszyklus von vorne beginnen. Der Verlauf der Partikelbasierten SPPS ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt. [35]

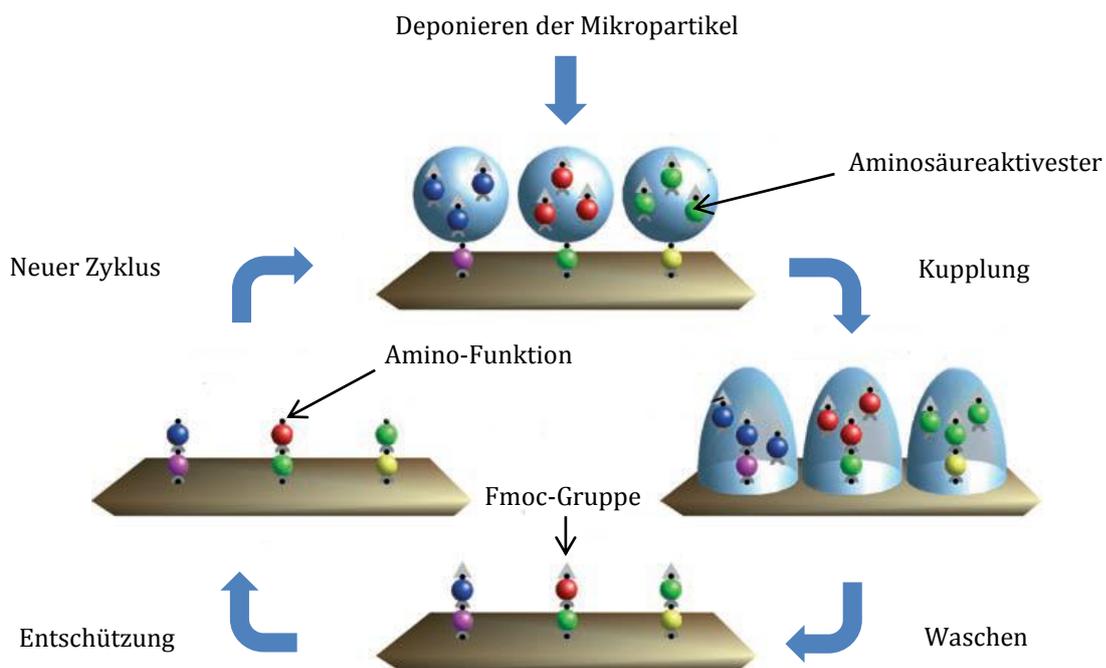


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Syntheszyklus der partikelbasierten SPPS. [35]

Die Reaktionsausbeuten dieser Variante sind mit denen der SPPS unter Standardbedingungen vergleichbar. [38] Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die

in Partikel eingebetteten Aktivester über einen längeren Zeitraum, ohne nennenswerten Zerfall, lagerbar sind. [35]

1.3. Herstellungsmethoden für mit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel (Das Mahlverfahren)

Bei dieser Methodik zur Partikelherstellung werden zunächst alle Partikelkomponenten in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst bzw. homogen dispergiert, falls es sich um schwer- oder unlösliche Pigmente handelt. Die Komponenten eines Laserdruckertoners, zur partikelbasierten Peptidarraysynthese, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt. [35] [38]

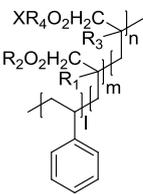
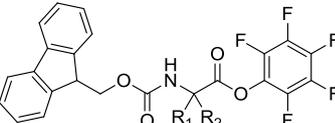
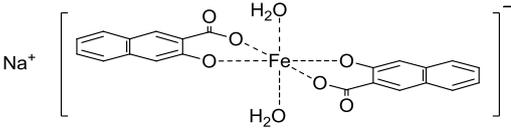
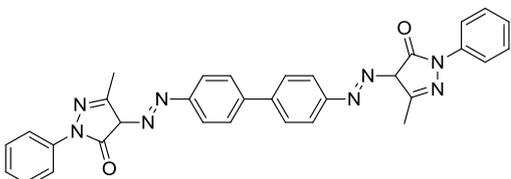
Partikelkomponenten	Strukturformeln	Funktion im Partikel
S-LEC-P LT 75 52		Matrixmaterial / „festes Lösungsmittel“
Aminosäureaktivester		Eingebettetes Monomer zur Arraysynthese
Natrium-diaquobis(3-hydroxy-2-naphthonsäure)-ferrat(III) (FeNp ₂) [39]		Charge Control Agent (CCA) zur Stabilisierung der Oberflächenladung der Partikel
Pyrazolon Orange		Pigment

Tabelle 2: Bestandteile und Funktion der Additive in einem mit Aminosäureaktivester beladenen Toner der Laserdrucker Applikation. [35] [38]

Sobald eine homogene Lösung bzw. Dispersion vorliegt, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Hierbei bläht das in die Gasphase übergehende Lösungsmittel die Partikelrohmasse auf. Es bildet sich ein spröder, amorpher Feststoff, der an der Schlenklinie weitergetrocknet und anschließend mit Hilfe eines Spatels grob zerstoßen wird.

Das getrocknete Rohmaterial muss nun schrittweise zerkleinert werden. Untersuchungen von kommerziell erhältlichen, im Farblaserdruk eingesetzten Tonerpartikeln zeigen, dass der ideale Durchmesser eines Tonerpartikels bei 10 µm liegt. ^[35] ^[38] Zur Zerkleinerung des Rohmaterials werden nacheinander zwei Mühlentypen eingesetzt. Während des Grobmahlgangs mit einer Schneidmühle, wird das Mahlgut auf eine Größe im Bereich von mehreren hundert µm im Durchmesser gebracht. In der Mahlkammer dieses Mühlentyps rotiert ein Schläger, der das Grobmahlgut zertrümmert. Durch die Verwirbelung des Materials in der Kammer, tragen Kollisionen zwischen den Fragmenten des Rohmaterials untereinander und mit den Mühlenwänden zur Zerkleinerung bei. Auf den Grobmahlgang folgt ein Feinmahlgang unter Verwendung einer Spiral- oder Luftstrahlmühle. Das Mahlgut wird über einen Rüttler in die Spiralmühle gefördert. Druckluft reißt die groben Partikel mit in die Mahlkammer, wo sie, durch einen zweiten Luftstrahl, der tangential zum Injektionsluftstrahl angelegt wird, beschleunigt werden. Die Mahlwirkung beruht auf Kollisionen der Partikel untereinander und mit den Oberflächen der Mahlkammer. Nach dem Feinmahlgang sichern Sieb- und Sichtprozesse, dass die Partikeldurchmesser im angestrebten Größenbereich vorliegen. ^[35]

Durch diese Vorgehensweise können Partikelchargen von mehreren hundert Gramm problemlos und reproduzierbar hergestellt werden. Das schnelle Entfernen des Lösungsmittels zu Beginn des Verfahrens verhindert einen Zerfall des eingebetteten Aminosäurederivats. ^[35] Bei anderen industriell angewandten Prozessen zur Farbtone Herstellung, wie Extrusions- oder Emulsionspolymerisations-Verfahren wäre das schadlose Einbringen des Aminosäureaktivesters in die Tonerpartikel, aufgrund der jeweiligen Prozessparameter nicht möglich. ^[38]

1.4. Herstellungsmethoden für mit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel (Der Sprühtrocknungsprozess)

Der Sprühtrocknungsprozess findet in der Lebensmittel- oder pharmazeutischen Industrie Anwendung. Er dient der Herstellung von Partikeln und Pulvern aus Lösungen, Suspensionen und Schlämmen. Unter anderem werden Waschmittel-, Kaffee- oder Milchpulver durch Sprühtrocknung erzeugt. Auch aerosolbasierte Medikamente können so hergestellt werden. [40] [41]

Beim Sprühtrocknungsprozess wird eine Lösung bzw. Suspension der Partikelkomponenten, unter Verwendung eines Sprühmediums, durch ein spezielles Bauteil der Sprühtrocknungsapparatur, dem Atomisator, in viele kleine Tröpfchen zerteilt. Im Falle wässriger Lösungen oder Suspensionen dient beheizte Druckluft als Sprühgas. Bei organischen Lösungsmitteln sind Inertgase wie Stickstoff oder CO₂ aus Sicherheitsgründen besser als Sprühmedium geeignet. Die Atomisierung der zu versprühenden Lösung bewirkt eine Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche und ermöglicht eine schonende Verdampfung des Lösungsmittels durch das beheizte Sprühgas. [40]

In Abbildung 10 ist der schematische Aufbau einer Sprühtrocknungsapparatur vom Typ Mini-Sprühtrockner B-290 der Firma Büchi Labortechnik AG (Flawil 1 / Schweiz) gezeigt. Die zu versprühende Lösung bzw. Suspension wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in eine Zweistoffdüse gepumpt. Die Funktionsweise dieses Atomisatorstyps basiert auf den hohen Reibungskräften, die zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und dem Sprühgas entstehen. Zweistoff- oder pneumatische Düsen sind in der Lage selbst hochviskose Lösungen und Suspensionen zu versprühen und besonders kleine Tröpfchen zu generieren. [42]

Das Sprühgas dient beim Sprühtrocknen als Wärmeträger und wird über eine elektrische Heizung temperiert. Die Inlet-Temperatur ist direkt regelbar. Während sich die Outlet-Temperatur aus der gewählten Pumprate, der Konzentration der Lösung bzw. Suspension, der eingestellten Aspiratorleistung, der Inlet-Temperatur, dem angelegten Sprühgasfluss sowie aus dem Siedepunkt des verwendeten Lösungsmittels ergibt. [42]

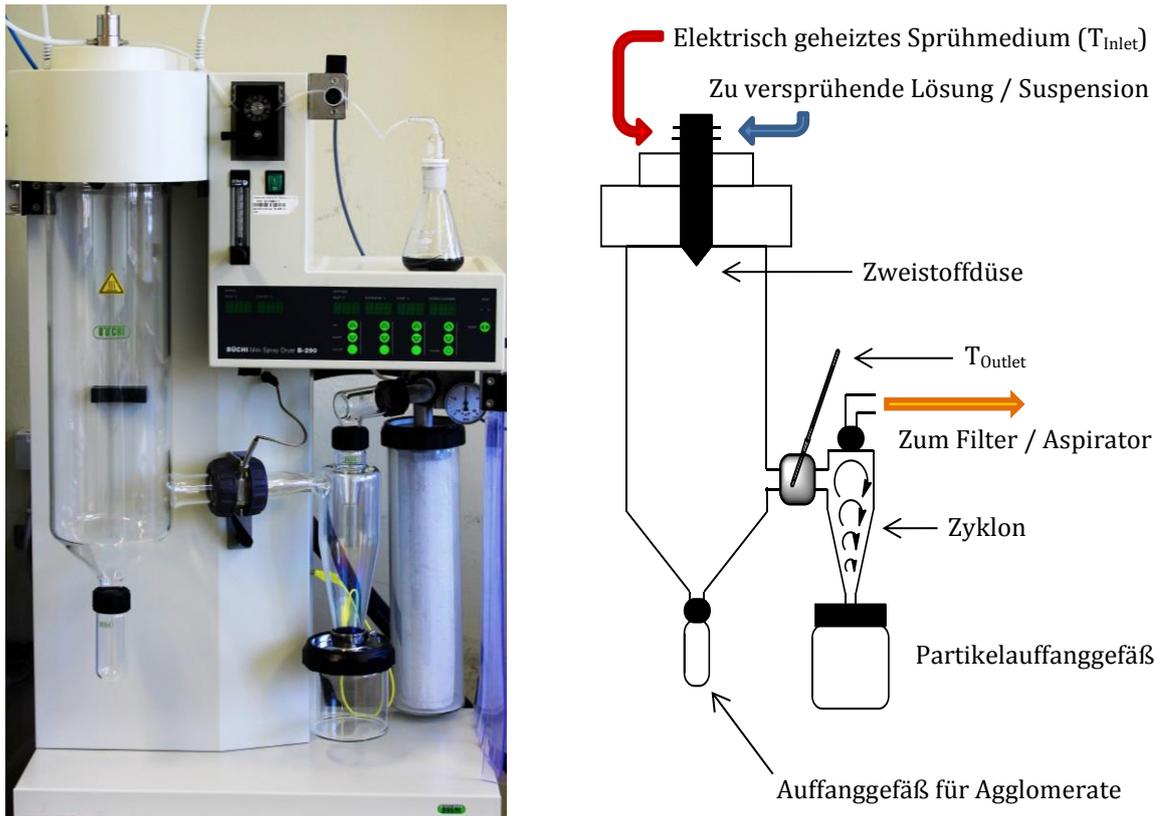


Abbildung 10: Der Mini-Sprühtrockner B-290 der Firma Büchi Labortechnik AG. [42]

Die resultierende Partikelgröße wird vor Allem von der Geschwindigkeit des Sprühgasflusses, der Konzentration der Partikelkomponenten in der zu versprühenden Lösung bzw. Suspension, der Pumprate und dem verwendeten Lösungsmittel beeinflusst. Der Mini-Sprühtrockner B-290 ermöglicht die Herstellung von Partikeln im Größenbereich von 1-25 μm . Bis auf den Sprühgasfluss haben alle bisher angesprochenen Parameter einen Einfluss auf die Partikel ausbeute und die Restfeuchte des Sprühguts. In Kombination mit dem Mini-Sprühtrockner B-290 sorgt der Inertloop B-295 (Büchi Labortechnik AG), durch Kontrolle des Sauerstoffgehalts in der Sprühtrocknungsapparatur für zusätzliche Sicherheit beim Versprühen organischer Lösungsmittel. Eine Kühlfalle ermöglicht die Rückgewinnung des Lösungsmittels. [42]

1.5. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Der Laserdrucker-Ansatz)

Der in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg / Deutschland), dem Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung (Stuttgart / Deutschland), der KMS Automation GmbH (Schramberg-Waldmössingen / Deutschland), der TU Varna (Department of Physics, Varna / Bulgarien) und Mikrosystemi (Varna / Bulgarien) entwickelte und von der PEPPERPRINT GmbH (Heidelberg / Deutschland) kommerzialisierte xerographische Ansatz zur Herstellung hochdichter kombinatorischer Peptidarrays erreicht derzeit eine Auflösung von 1.000 Spots/cm². Der Laserdrucker erlaubt das Verdrucken von mit Aminosäure-Pentafluorophenylester beladenen Tonerpartikeln und somit das Strukturieren einer 20 x 20 cm² großen Syntheseträgerplatte mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren zeitgleich in einem einzigen Druckzyklus. Der Laserdrucker verfügt über 24 in Reihe angeordnete Druckwerke. 20 dieser Druckwerke enthalten Toner, der jeweils mit einem anderen proteinogenen Aminosäureaktivester beladen ist. [43]



Abbildung 11: Peptidlaserdrucker der Firma PEPPERPRINT GmbH (links). In Reihe angeordnete Druckwerke (rechts). [44]

In Abbildung 12 ist der Aufbau eines Standard Oki Druckwerks exemplarisch dargestellt. Die Tonerpartikel werden im Reservoir des Druckwerks gelagert. Feuchtigkeitsbedingte Verklumpung und Agglomeration der Tonerpartikel kann durch Zugabe von hydrophoben Silika-Nanopartikeln, eines festen Dispersionsmittels, verhindert werden. Eine

Ladungswalze aus Schaumstoff überträgt eine durch Reibung an der Transportwalze erzeugte negative triboelektrische Ladung auf die Oberfläche der Tonerpartikel. Die geladenen Tonerpartikel werden über die Transportwalze zur Organic Photoconductor-Walze (OPC-Walze) befördert. Dieses Bauteil ist über seine gesamte Oberfläche mit einem Polymer beschichtet, das im Dunkeln Isolator Eigenschaften besitzt und über eine Ladungswalze negativ aufgeladen wird. Sobald die Polymerschicht von der LED Zeile des Druckwerks bestrahlt wird, wird sie an den belichteten Stellen leitend. Die negative Ladung kann über eine Erdung abfließen und an der Walzenoberfläche entsteht ein negatives Ladungsmuster, welches das spätere Druckbild invers vorgibt. Die von der Transportwalze herangeförderten negativ geladenen Tonerpartikel springen auf die neutralisierten Stellen der OPC-Walze. Unterhalb des zu bedruckenden Mediums ist an einer Elektrode eine positive Gegenspannung angelegt. Dies bewirkt, dass die Tonerpartikel von der Oberfläche der OPC-Walze auf das Substrat übertragen werden, während diese über die zu bedruckende Oberfläche wälzt. Dort wird das Druckbild von einer Heizeinheit fixiert. Ein Abstreifer entfernt verbliebene Partikel von der OPC-Walze, die Ladungswalze stellt die uniforme negative Oberflächenladung wieder her und der Druckzyklus kann von neuem beginnen. [43]

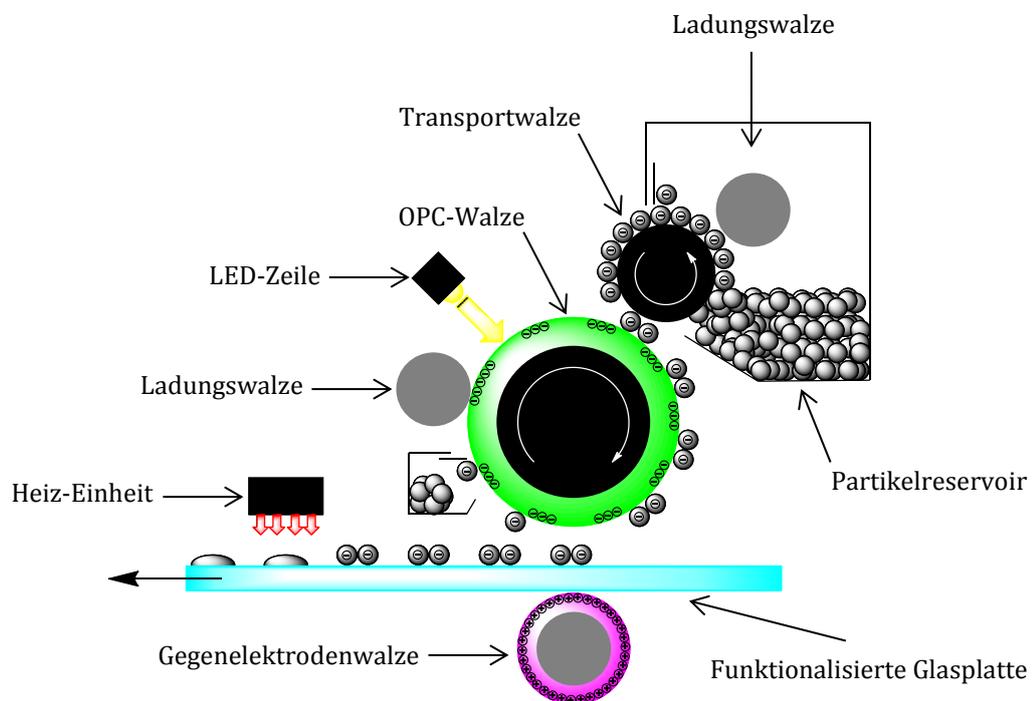


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Standard Druckwerks. [38]

1.6. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Die CMOS-Chip – Variante)

Bei dieser speziellen Variante der partikelbasierten Peptidarraysynthese, wird die Ortsinformation des Arrays mit Hilfe von Gitter- und Pixelelektroden auf der Oberfläche eines CMOS-Chips generiert. Die Aminosäureaktivester beladenen Mikropartikel werden von einem speziell entwickelten Aerosol Generator in einem Luftstrom dispergiert und dabei triboelektrisch geladen. Dieses Aerosol wird über den CMOS Chip geblasen, auf dessen Oberfläche die von den Gitter und Pixelelektroden erzeugten elektrischen Felder für die ortsgenaue Partikelablagerung sorgen. Nachdem die Oberfläche des Chips mit allen notwendigen Partikelsorten strukturiert ist, wird das „feste Lösungsmittel“, die Partikelmatrix, aufgeschmolzen und die eingebetteten Aminosäurederivate können zur Oberfläche diffundieren und kuppeln. Nach der erforderlichen nasschemischen Behandlung der Oberfläche und den notwendigen Waschschrinen kann der Syntheszyklus von neuem beginnen. Auch bei diesem Verfahren ist es möglich die komplette Oberfläche mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren zu strukturieren und den anschließenden Kupplungsschritt parallel auszuführen. Mit dem CMOS-Chip Ansatz gelingt die Herstellung von Peptidarrays mit einer Auflösung von 10 000 Peptiden/ cm². [37] [45] [46] [47] [48] [49]

Eine Modifikation dieser Vorgehensweise, die den CMOS-Chip zur ortsgenaue Ablagerung von Mikropartikeln nutzt, das entstandene Partikelmuster dann allerdings mittels eines Druckverfahrens auf eine, für die chemische Behandlung besser geeignete, funktionalisierte Glasoberfläche überträgt, ist an anderer Stelle beschrieben. [50] [51]

1.7. Partikelbasierte kombinatorische Arraysynthese (Das laserbasierte Ansmelzverfahren)

Diese Methode basiert auf der Idee Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel auf einer Oberfläche homogen abzulagern und an bestimmten Stellen mit einem Laser zu fixieren. Nicht fixiertes Material kann in einem weiteren Schritt von der Oberfläche entfernt und eine weitere Partikelsorte abgelagert und fixiert werden. So wird die Syntheseoberfläche schrittweise mit allen proteinogenen Aminosäuren strukturiert. Schließlich können die in den einzelnen Spots fixierten Aminosäureaktivester in einem einzigen Kupplungsschritt parallel an die Oberfläche gebunden werden. Nach den erforderlichen Wasch- und chemischen Modifizierungsschritten kann die nächste Partikelschicht auf die Oberfläche gebracht und strukturiert werden. Eine schematische Darstellung dieses Verfahrens ist in Abbildung 13 gezeigt. [52] [53] [54]

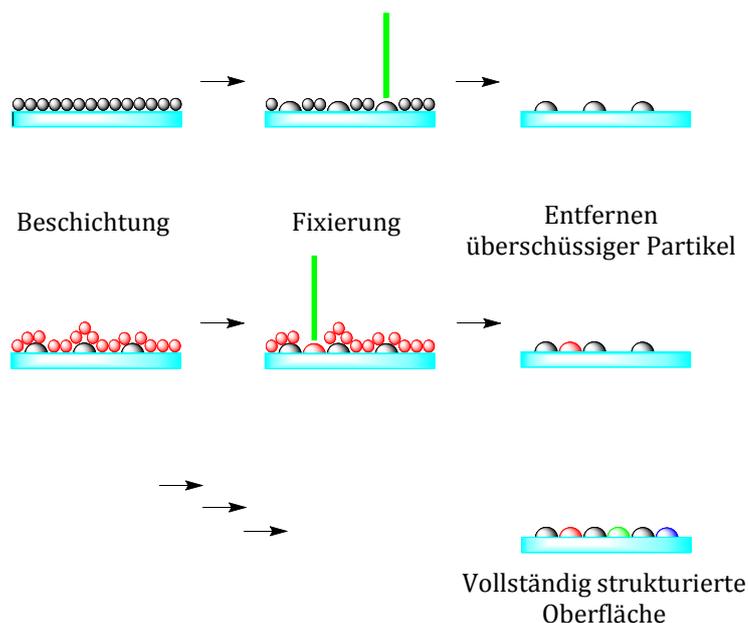


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Verlaufs des kombinatorischen laserbasierten Ansmelzverfahrens: Auf die Strukturierung der Oberfläche mit allen Partikelsorten, folgt der parallele Kupplungsschritt im Ofen bei 90 °C für 90 min unter Argon-Atmosphäre. Nach den erforderlichen nasschemischen Wasch und Modifizierungsschritten (Blocken und Entschützung) kann der nächste Strukturierungszyklus beginnen. [53]

2. Motivation

Die Nutzung der in Abschnitt 1.1. beschriebenen Technologie zur Peptidarraysynthese gibt auch gleichzeitig die Limitierung in der Auflösung des resultierenden Arrays vor. Alle in Reihe angeordneten Druckwerke müssen softwarebasiert und mechanisch gegeneinander justiert werden um reproduzierbare Druckbilder zu erzeugen. Für zukünftige Anwendungen der Peptidarraytechnologie, beispielsweise die Übersetzung des Proteoms eines Organismus ins Peptidarrayformat, wird es notwendig werden, die Auflösung der Arrays zu erhöhen.

Beim partikelbasierten Ansatz zur Peptidarraysynthese hängt die Auflösung eines resultierenden Arrays zunächst nur von der Größe der verwendeten Partikel ab. Im Rahmen dieser Überlegung ist eines der Ziele dieser Arbeit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel mit einem kleineren Durchmesser als bei der Laserdruckerapplikation herzustellen. Die Größenverteilung der Partikeldurchmesser soll auf einen Zentralwert von $d(0,5) < 5 \mu\text{m}$ gebracht werden.

Die Partikelzusammensetzung muss auf die Verwendung der Mikropartikel im laserbasierten Anschmelzverfahren zugeschnitten und optimiert werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig neben den thermischen Eigenschaften der Partikel auch die Kupplungseffizienzen der eingebetteten Monomere an und in der polymerbasierten Syntheseoberfläche genauer zu untersuchen.

Eine Erweiterung des Anwendungsbereichs der Peptidarraytechnologie macht es notwendig auch nicht proteinogene, mit der SPPS-Chemie kompatible Monomer Bausteine in die Partikelmatrix einzubetten und sie so für die partikelbasierte Arraysynthese zugänglich zu machen.

Aus diesen Gründen ist es zweckmäßig eine alternative Herstellungsmethode für Mikropartikel zu untersuchen, die eine schnelle und reproduzierbare Produktion von Mikropartikelansätzen im experimentellen Größenmaßstab ermöglicht.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Vorüberlegung zum Mikropartikeldesign

Zur Herstellung von Aminosäureaktivester beladenen Mikropartikeln einer Größenverteilung mit einem Zentralwert von $d(0,5) < 5 \mu\text{m}$, wurde das am Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg / Deutschland) von der Arbeitsgruppe „Chipbasierte Peptidbibliotheken“ entwickelte Mahlverfahren herangezogen. [35] Anschließend wurde der Sprühtrocknungsprozess, [40] als alternative Methode zur Partikelherstellung, untersucht und verglichen. Die Partikelkomponenten leiteten sich von der Zusammensetzung der Toner des Laserdruckerverfahrens zur SPPS ab. Das kommerziell erhältliche Polymer S-LEC-P LT 75 52 der Sekisui CO, LTD (Osaka / Japan) diente als Matrixmaterial für die Partikelherstellung, in die Fmoc- und seitenkettengeschützte Aminosäureaktivester eingebettet wurden. [35]

Neben Partikelmatrixmaterial und Aminosäurederivat enthält der Laserdrucker-Toner das für die Xerographie notwendige Charge Control Agent (CCA) FeNp₂. [39] Dieser Eisenkomplex dient der Stabilisierung der Oberflächenladung der Mikropartikel. Dadurch ist ein korrekter Übertrag der Tonerpartikel auf die OPC-Walze und von dort auf das zu bedruckende Medium sichergestellt. [35] Wechselwirkungen zwischen Partikelkomponenten und dem CCA können den Druckprozess stark beeinträchtigen. [55] Verfahren zur Messung der triboelektrisch erzeugten Ladung an der Partikeloberfläche sind in der Literatur beschrieben. [56] Das Additiv Pyrazolon-Orange wird für die optische Qualitätssicherung in die Partikelformulierung eingebracht. [35] Beim laserbasierten Anschmelzverfahren zur SPPS machen die verwendeten Partikelablagerungstechniken diese Substanzen überflüssig. Um mögliche störende Interaktionen auf die thermischen und kupplungschemischen Untersuchungen auszuschließen, entfallen FeNp₂ und Pyrazolon Orange.

Wegen der niedrigen Kosten und dem breiten Absorptionsspektrum vom UV- bis in den NIR- Bereich des elektromagnetischen Spektrums finden Graphit Pigmente als Kunststoffadditive oder bei technischen Prozessen wie z.B. dem Laserschweißen Anwendung. [57] Für das laserbasierte Anschmelzverfahren zur Peptidarraysynthese war es nötig, einen Absorber in die Partikel einzuführen, um ein Fixieren der Partikel durch

einen Laser an der Syntheseträgeroberfläche zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Graphit Nanopartikel im aminosäurebeladenen Polymermikropartikel dispergiert. Das breite Absorptionsspektrum des Graphits eröffnete die Möglichkeit Laser verschiedenster Wellenlängen für das Verfahren in Betracht zu ziehen. Durch Vorversuche konnte ermittelt werden, dass ein Graphitgehalt von 2 % (w/w/w) ausreichte um die Partikel mittels Laserbestrahlung an der Syntheseoberfläche anzuschmelzen und so zu fixieren. Bei einer Erhöhung der Absorber Konzentration im Partikelansatz kam es zur Sedimentation der Graphitnanopartikel in der Lösung bzw. Suspension der Partikelbestandteile beim Herstellungsprozess. Eine geringere Graphitkonzentration ermöglichte keine ausreichende Absorption der Laserstrahlung und damit keine Fixierung mehr. Die Komponenten, die für die Herstellung von Mikropartikeln für das laserbasierte Anschmelzverfahren verwendet wurden, wurden zur Übersicht in Tabelle 3 zusammengefasst.

Partikelkomponenten	Strukturformeln	Funktion im Partikel
S-LEC-PLT 75 52		Matrixmaterial / „festes Lösungsmittel“
Aminosäureaktivester		Eingebettetes Monomer zur Arraysynthese
Graphit	Nanopartikel < 30 nm	Absorber für Laserstrahlung / Schwarzpigment

Tabelle 3: Übersicht über die Partikelformulierung für das laserbasierte Anschmelzverfahren.

3.2. Partikelherstellung

3.2.a) Das Mahlverfahren

Das von der PEPperPRINT GmbH angewendete Mahlverfahren liefert Tonerpartikel einer für die Laserdruckerapplikation optimalen Größenverteilung ($d(0,5) = 10,0 \mu\text{m}$).^[35] Um den Median der Größenverteilung in einen Bereich von $< 5 \mu\text{m}$ zu verschieben, musste der Mahlprozesses angepasst werden. Der Mahlvorgang bestand weiterhin aus zwei grundlegenden Schritten: Dem Grob- und dem Feinmahlschritt.

Für den Grobmahlgang stand eine M 20 Universalmühle der Firma IKA (Staufen / Deutschland) zur Verfügung. Dieser Schneidmühlentyp zertrümmert das Rohmaterial in der Mahlkammer mit einem rotierenden Schläger. Darüber hinaus werden die in der Mahlkammer umherwirbelnden Grobpartikel durch Kollisionen untereinander und mit den Mahlkammerwänden weiter zerkleinert. In Abbildung 14 ist die Partikelgrößenverteilung eines Mahlgangs mit 60 s Mahldauer dargestellt. Es wurde eine Rohmasse aus reinem Matrixmaterial prozessiert, die zunächst in DCM gelöst, am Rotationsverdampfer und der Schlenklinie getrocknet und schließlich mit dem Spatel zerstoßen wurde.

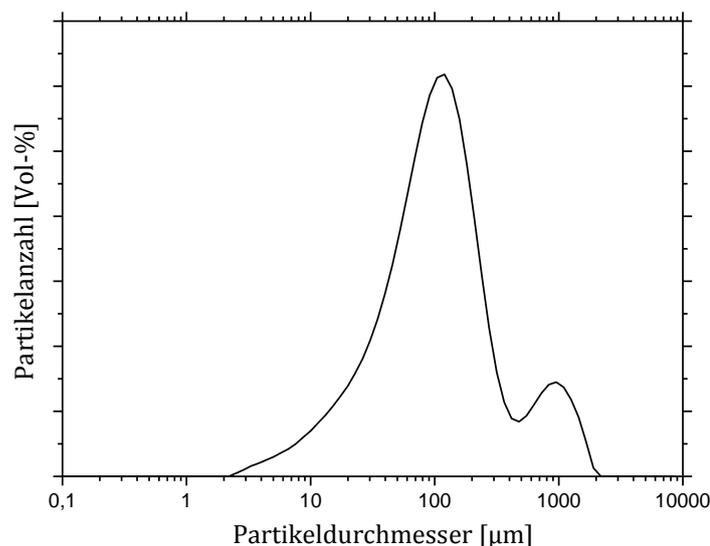


Abbildung 14: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (I). Das polymerbasierte Partikelmatrixmaterial wurde in DCM gelöst, getrocknet, grob zerstoßen und 60 s mit der IKA M 20 Mühle gemahlen.

Charakteristische Werte dieser Größenverteilung waren $d(0,1) = 24,8 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 111,2 \mu\text{m}$ und $d(0,9) = 575,7 \mu\text{m}$. Der $d(0,1)$ -Wert besagte, dass 10 % aller Partikel einen kleineren Durchmesser als $24,8 \mu\text{m}$ besaßen. Beim $d(0,5)$ -Wert handelte es sich um den Zentralwert der Verteilung. 50 % aller Partikel waren kleiner als $111,2 \mu\text{m}$. Mit $d(0,9) = 575,7 \mu\text{m}$, waren 90 % aller Partikel der Größenverteilung kleiner als $575,7 \mu\text{m}$. Die Schulter in der Größenverteilung zeigte, dass Partikel mit Durchmessern im Bereich von $1000 \mu\text{m}$ im Mahlgut vorhanden waren. Die Wiederholung des 60 s Mahlgangs, lieferte eine zu kleineren Partikeldurchmessern verschobene Größenverteilung mit einem homogenen Profil (Abbildung 15).

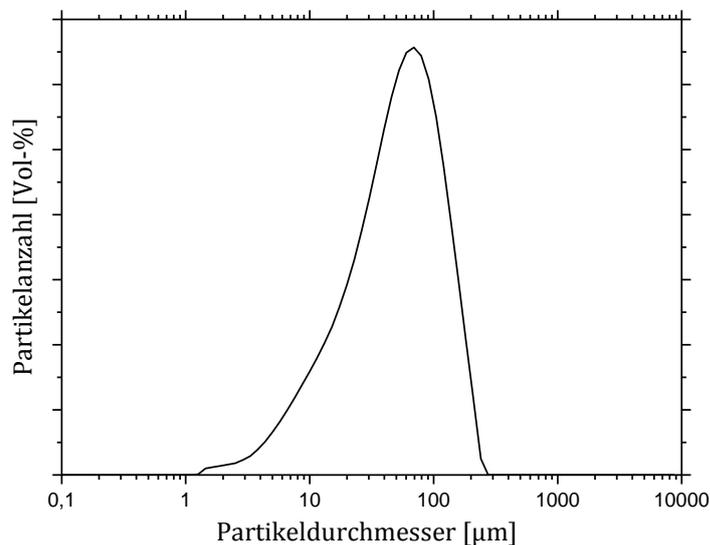


Abbildung 15: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (II). Das polymerbasierte Partikelmatrixmaterial wurde in DCM gelöst, getrocknet, grob zerstoßen und 2 x 60 s mit der IKA M 20 Mühle gemahlen.

Die in Abbildung 15 graphisch dargestellte Größenverteilung besaß die charakteristischen Werte $d(0,1) = 12,6 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 55,4 \mu\text{m}$ und $d(0,9) = 139,6 \mu\text{m}$. Ein drittes Wiederholen des 60 s Mahlgangs führte zu keiner weiteren Verbesserung des Mahlergebnisses.

Ein Verkürzen der Mahldauer von 60 auf 15 s lieferte die in Abbildung 16 illustrierte Größenverteilung. Mit $d(0,1) = 17,4 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 92,7 \mu\text{m}$ und $d(0,9) = 264,4 \mu\text{m}$, schien der Mahlgang mit 15 s Mahldauer effizienter als der 60 s Mahlgang zu verlaufen. Ein Grund hierfür war die durch Reibung während des Zerkleinerungsprozesses entstehende Wärme in der Mahlkammer, die zum Verbacken der Grobpartikel führte. Trotz der an den Metallmantel der Mahlkammer angeschlossenen Wasserkühlung reichte die Wärmeentwicklung aus um die Mahleffektivität zu beeinflussen. Verlängerte man den Mahlgang auf Zeiten über 5 min konnte man bereits die Bildung von Schlieren aufgrund von beginnender Verflüssigung des Polymermaterials beobachten.

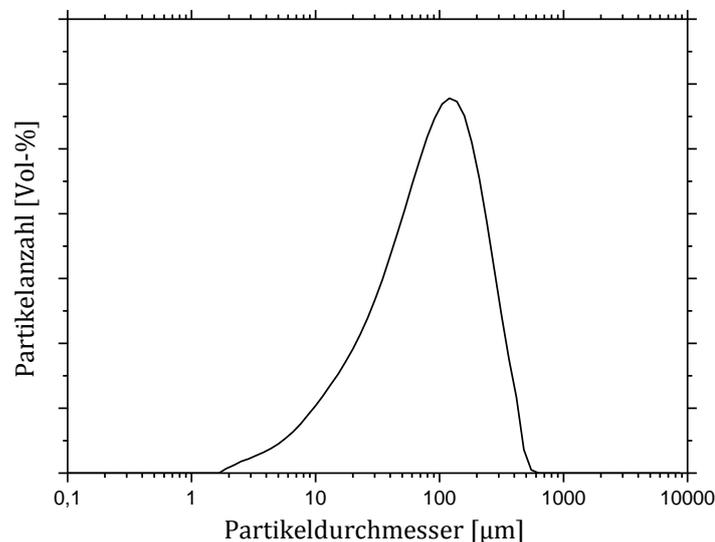


Abbildung 16: Partikelgrößenverteilung einer zu Testzwecken hergestellten Rohmasse aus reinem Matrixmaterial (III). Das polymerbasierte Partikelmatrixmaterial wurde in DCM gelöst, getrocknet, grob zerstoßen und 15 s mit der IKA M 20 Mühle gemahlen.

Auch bei einer Wiederholung des 15 s Mahlgangs wurde die resultierende Größenverteilung zu kleineren Partikeldurchmessern verschoben. Zwischen den Mahlergebnissen der 3. und 4. Wiederholung war kein signifikanter Unterschied mehr zu erkennen (vgl. Tabelle 4).

Mahlgang	Größenverteilung		
	d(0,1) [μm]	d(0,5) [μm]	d(0,9) [μm]
1 x 15 Sekunden	17,4 μm	92,7 μm	264,4 μm
2 x 15 Sekunden	12,0 μm	66,2 μm	186,9 μm
3 x 15 Sekunden	8,3 μm	44,9 μm	139,8 μm
4 X 15 Sekunden	8,6 μm	47,3 μm	131,4 μm

Tabelle 4: Partikelgrößenverteilungen von zu Testzwecken hergestellten mit der IKA M 20 Mühle zerkleinerten Rohmassen aus reinem Matrixmaterial. Das polymerbasierte Partikelmatrixmaterial wurde in DCM gelöst, getrocknet, grob zerstoßen und für die entsprechende Zeit mit der IKA M 20 Mühle gemahlen.

Der Feinmahlgang wurde mit einer 50 AS Spiralmühle der Firma Hosokawa Alpine (Augsburg / Deutschland) durchgeführt. Die Spiralmühle zerkleinerte das mit der IKA M 20 Mühle grob gemahlene Partikelmaterial weiter. Bei einer Materialzufuhr von 1,0 g pro Minute, einem Injektionsdruck von 3,0 bar und einem Mahldruck von 3,0 bar erhielt man Mikropartikel der gewünschten Größenverteilung mit einem Median im Bereich von $< 5 \mu\text{m}$.

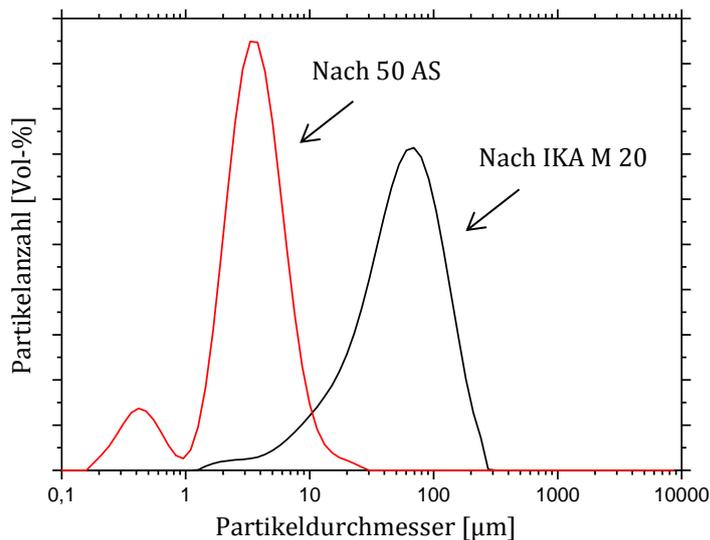


Abbildung 17: Partikelgrößenverteilungen einer mit der IKA M 20 Mühle zerkleinerten und anschließend mit der 50 AS feingemahlene Partikelcharge. Das polymerbasierte Partikelmatrixmaterial, Fmoc-Gly-OPfp und Graphit wurden in DCM gelöst, getrocknet, grob zerstoßen 1 x 15 s mit der IKA M 20 Mühle und anschließend mit der 50 AS Spiralmühle gemahlen. Der Feinmahlgang erfolgte unter Zufuhr von 1,0 g Grobpartikel / min über einen Rüttler (Amplitude 56) mit 3,0 bar Mahl- und 3,0 bar Injektionsdruck.

Nach dem Grobmahlgang wies die Partikelgrößenverteilung die folgenden Werte auf: $d(0,1) = 15,6 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 59,9 \mu\text{m}$ und $d(0,9) = 141,9 \mu\text{m}$. Das durch die Zerkleinerung des Rohmaterials durch die Schneidmühle erzielte Mahlergebnis wird durch die Menge des zu zerkleinernden Rohmaterials, den durch Zerstoßen mit dem Spatel erreichten Fragmentierungsgrad der Rohmasse und die Härte des zu zermahlenden Materials beeinflusst. Neben Schwankungen in Menge und Effizienz der Vorzerkleinerung des Mahlguts durch den Spatel, könnte auch die Beladung des Polymermaterials mit Fmoc-Gly-OPfp und Graphit Nanopartikeln dazu beigetragen haben, dass der 15 s Mahlgang bezüglich des $d(0,5)$ und $d(0,9)$ -Werts effizienter verlief als der im Vorversuch (vgl. Tabelle 4). Der anschließend durchgeführte Feinmahlgang lieferte eine homogene Größenverteilung mit dem gewünschten Zentralwert $d(0,5) = 3,8 \mu\text{m}$. Die Verteilung zeigte bei Partikeldurchmessern im Nanometerbereich eine Schulter, die durch Nanopartikel verursacht wurde, die beim Feinmahlgang anfielen und nicht von der Mikropartikelcharge getrennt werden konnten.

Generell war beim Feinmahlgang besonders darauf zu achten, dass die Größenverteilung des Grobmaterials nicht zu breit war. Zu große Partikel in der groben Mahlfraktion führten zu inhomogener Zufuhr des zu zerkleinernden Materials über den Rüttler. Dies wiederum führte zu Verstopfung der Feinmühle oder zu inhomogenen Mahlresultaten aufgrund schwankender Druckverhältnisse bzw. schwankender Mengen an Grobpartikeln in der Mahlkammer. Bei einem nicht zufriedenstellenden Feinmahlergebnis, wurde der Feinmahlgang wiederholt um eine bessere Größenverteilung zu erzielen.

3.2.b) Das Sprühtrocknungsverfahren

Unter Verwendung des Mini-Sprühtrockner B-290 lassen sich Partikel herstellen, deren Eigenschaften sich durch mehrere Parameter beeinflussen lassen (siehe Abschnitt 1.3.).

Die im Folgenden beschriebenen sprühgetrockneten Mikropartikelchargen wurden mit einem Glasfluss von 600 L/h, einer Aspiratorleistung von 100 % und einer Pumprate von 20 % hergestellt. Diese Parameter konnten zuvor in einem Applikationslabor der Firma Büchi (Essen / Deutschland) unter der Anleitung von Herrn Dr. Marco Kleine (Produktspezialist Verdampfung & Chromatographie) getestet werden.

Der Einfluss der Temperatur des Trocknungsmediums und der Konzentration der Partikelkomponenten in der zu versprühenden Lösung, wurde für die Herstellung von Aktivester beladenen Mikropartikeln, experimentell genauer untersucht. Wie bei dem in Abschnitt 1.2.) vorgestellten Mahlverfahren wurde auch beim Sprühtrocknungsprozess eine resultierende Partikelgrößenverteilung mit einem Zentralwert ($d(0,5)$) von $< 5 \mu\text{m}$ angestrebt.

Die Partikelgröße sollte mit zunehmender Verdünnung der Lösung der Partikelkomponenten abnehmen. Um eine genaue Korrelation zwischen verwendetem Lösungsmittelvolumen und resultierender Partikelgröße zu erhalten, wurden 4,4 g S-LEC-P LT 75 52, 0,5 g Fmoc-Gly-OPfp und 0,1 g Graphit Nanopartikel in unterschiedlichen Volumina DCM gelöst bzw. dispergiert und bei einer Inlet-Temperatur von $70 \text{ }^\circ\text{C}$ sprühgetrocknet.

Ansatz	Lösungsmittelvolumen
LK958-011	12,5 ml
LK958-010	25,0 ml
LK958-014	50,0 ml

Tabelle 5: Drei Ansätze zur Untersuchung der aus dem Sprühtrocknungsprozess resultierenden Partikelgrößenverteilungen. Je 4,4 g S-LEC-P LT 75 52, 0,5 g Fmoc-Gly-OPfp und 0,1 g Graphit Nanopartikel wurden in unterschiedlichen Volumina DCM gelöst.

Die aus den Ansätzen LK958-010, -011 und -014 (Tabelle 5) resultierenden Partikelgrößenverteilungen sind in der Abbildung 18 vergleichend dargestellt.

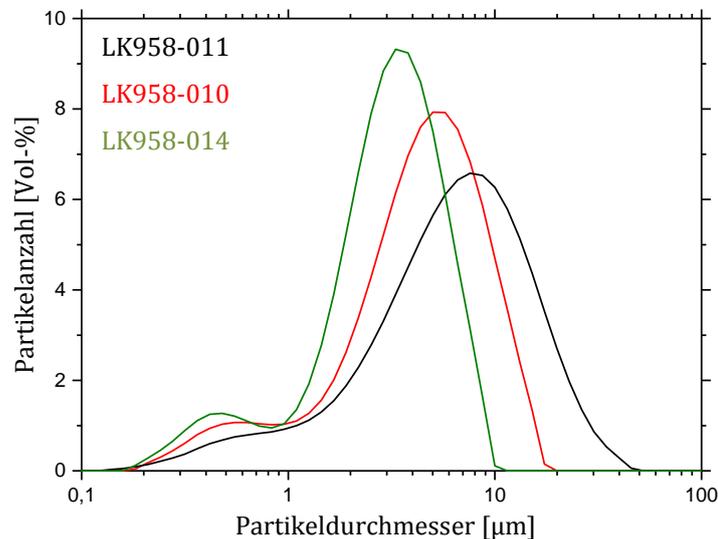


Abbildung 18: Partikelgrößenverteilungen der sprühtrockneten Ansätze LK958-010, -011 und -014. Die charakteristischen Werte der Größenverteilungen betragen für LK958-011 (schwarzer Graph): $d(0,1) = 1,6 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 6,9 \mu\text{m}$, $d(0,9) = 18,2 \mu\text{m}$, für LK958-010 (roter Graph): $d(0,1) = 1,2 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 4,9 \mu\text{m}$, $d(0,9) = 10,6 \mu\text{m}$ und für LK958-014 (grüner Graph): $d(0,1) = 0,9 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 3,3 \mu\text{m}$, $d(0,9) = 6,5 \mu\text{m}$.

Die Partikelgrößenverteilungen der verschiedenen Ansätze wurden mit zunehmendem Lösungsmittelvolumen schmaler und wanderten zu kleineren Partikelgrößen. Beim Lösen des Ansatzes der Partikelkomponenten mit der Gesamtmasse 5,0 g in 50,0 ml DCM ergaben sich die angestrebten, charakteristischen Partikelgrößenverteilungswerte $d(0,1) = 0,9 \mu\text{m}$, $d(0,5) = 3,3 \mu\text{m}$ und $d(0,9) = 6,5 \mu\text{m}$. Auf dieser Grundlage wurden für alle folgenden Sprühtrocknungschargen pro 5,0 g Partikelmaterial, 50,0 ml DCM verwendet.

Um den Einfluss der Temperatur des Trocknungsmediums auf das Sprühergebnis zu untersuchen, musste die Inlet-Temperatur am Sprühtrockner variiert werden. Das als Sprühmedium verwendete Inertgas wurde von einer Heizeinheit in der Nähe der Zweistoffdüse auf die am Sprühtrockner eingestellte Inlet-Temperatur erwärmt. Bei der Outlet-Temperatur handelte es sich um die Temperatur, der die fertigen Partikel während des Sprühtrocknungsprozesses tatsächlich ausgesetzt waren. Für eine effiziente Trocknung der zu versprühenden Lösung bzw. Dispersion, musste die Inlet-Temperatur

oberhalb des Siedepunkts des verwendeten Lösungsmittels liegen. Die Outlet-Temperatur musste unterhalb des Temperaturbereichs des Glasübergangs des Partikelmatrixmaterials gehalten werden, um ein Verflüssigen der gebildeten Partikel zu vermeiden.

Während des Sprühtrocknungsprozesses verdampfte das Lösungsmittel aus den im Trocknungsmedium dispergierten Tröpfchen. Konvektions- und Diffusionsprozesse führten zu Materialtransport vom Inneren des Tröpfchens zur Oberfläche und umgekehrt. Je mehr Lösungsmittelmoleküle aus dem Tröpfchen in die Gasphase übergingen, umso viskoser wurde das Partikelmaterial und umso langsamer verliefen diese Materialtransportprozesse. Das in der Partikelformulierung als Matrixmaterial verwendete Polymer begann einen Film zu bilden, der die Hülle des Partikels darstellte. Bildete sich die äußere Hülle des Partikels schnell genug, wurden Lösungsmittelmoleküle im Inneren, des außen bereits festen Partikels, eingeschlossen. Aufgrund der zugeführten Wärme gingen auch diese Lösungsmittelmoleküle in die Gasphase über und blähten das Partikel auf. Erkalte dieses Partikel nach dem Sprühtrocknungsprozess, kondensierte und kontrahierte der im Inneren eingeschlossene Lösungsmittelrest. Es bildeten sich sphärische Hohlpartikel, deren Hülle durch den im inneren entstandenen Unterdruck Deformationen aufwiesen. [41] [58] [59]

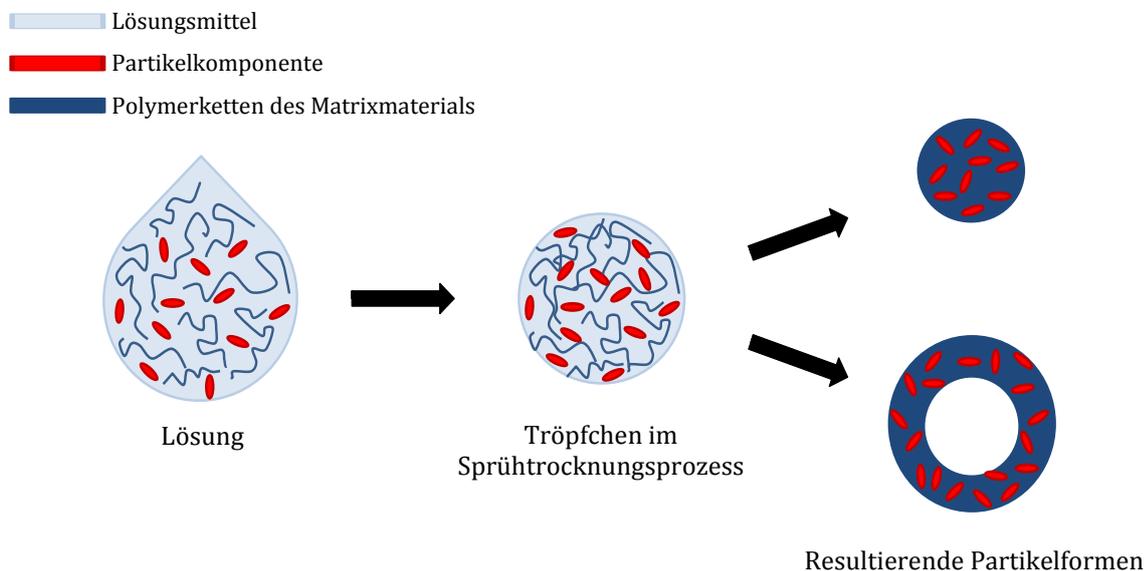


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Partikelformierung (I). Vollpartikel werden bevorzugt bei hochverdünnten Lösungen, kleinen Tröpfchen-Durchmessern, guter Löslichkeit der Partikelbestandteile im verwendeten Lösungsmittel niedriger Temperatur und ungehinderter Diffusion von Lösungsmittel- und Partikelkomponenten-Moleküle gebildet. Hohlpartikel entstehen bei hoher Temperatur, dem Versprühen von hochkonzentrierten Lösungen, großen Tröpfchen-Durchmessern, der Verwendung von Lösungsmitteln mit hohem Dampfdruck und bei einer Behinderung der Diffusion der Lösungsmittel- und Partikelkomponenten-Molekülen durch Filmbildung. [58]

Hohe Inlet-Temperaturen sorgten für ein schnelles Verdampfen des Lösungsmittels an der Tropfenoberfläche und für das schnelle Ausbilden einer lösungsmittelundurchlässigen Partikelhülle, was die Ausbildung von Hohlpartikeln begünstigt. Niedrigere Inlet-Temperaturen sollten die Bildung von Vollpartikeln begünstigen, da der Transport von Lösungsmittelmolekülen aus dem Inneren des sich bildenden Partikels zur Oberfläche länger möglich ist. Bei den in Abbildung 20 illustrierten REM-Bildern ist ein solcher Zusammenhang nicht zu erkennen. Das verwendete Lösungsmittel DCM besaß einen so hohen Dampfdruck, dass sich selbst bei einer Inlet-Temperatur von 45 °C aus den oben beschriebenen Gründen Hohlpartikel bildeten. Da das Sprühgut zudem bei 45 °C Inlet-Temperatur noch relativ feucht wirkte wurden die folgenden Partikelchargen mit einer Inlet-Temperatur von 50 °C hergestellt.

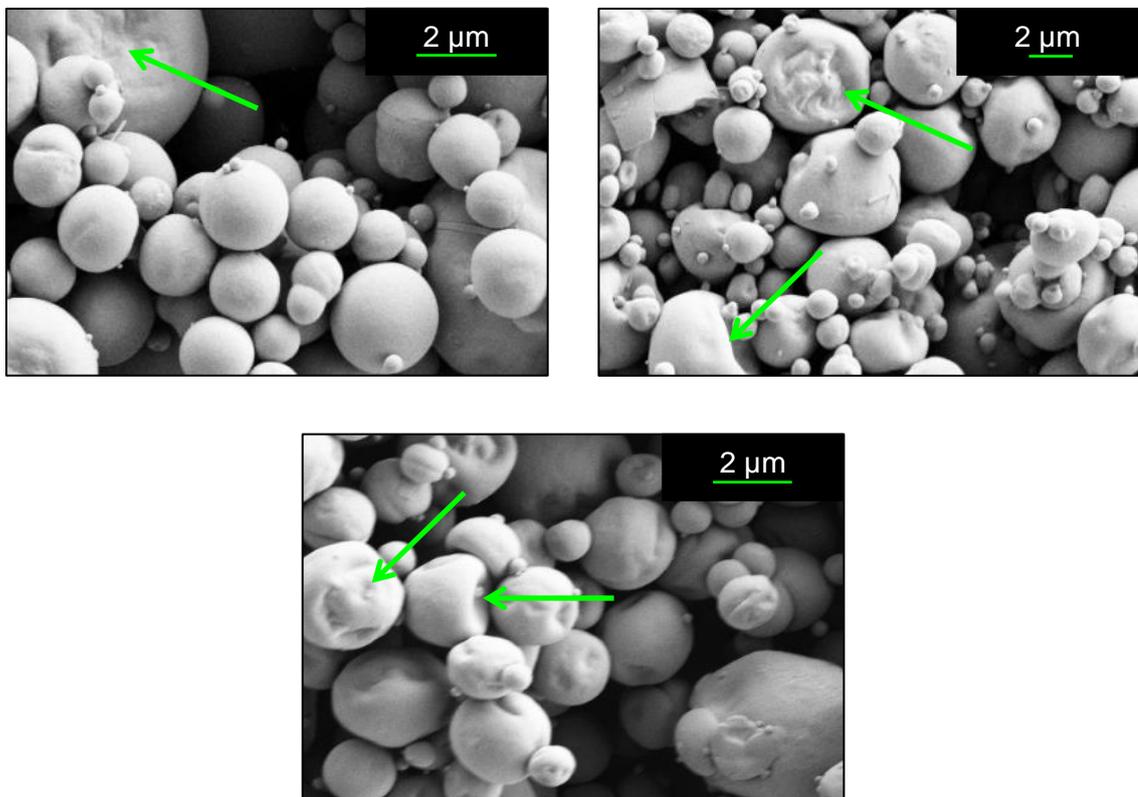


Abbildung 20: Sprühgetrocknete Partikelchargen mit Inlet-Temperaturen von 70 °C (links), 50 °C (rechts) und 45 °C (unten).

Ein weiterer Effekt, dessen Ursache in der Wechselwirkung zwischen Polymerketten und verwendetem Lösungsmittel lag, wurde in Abbildung 21 dargestellt. Es handelt sich um vergrößerte Ausschnitte aus REM-Aufnahmen von Partikelagglomeraten aus zwei

verschiedenen Sprühtrocknungschargen. Die eingerahmten Partikel in der Mitte der REM-Bilder wiesen an ihrer Oberfläche wulstartige Verformungen auf.

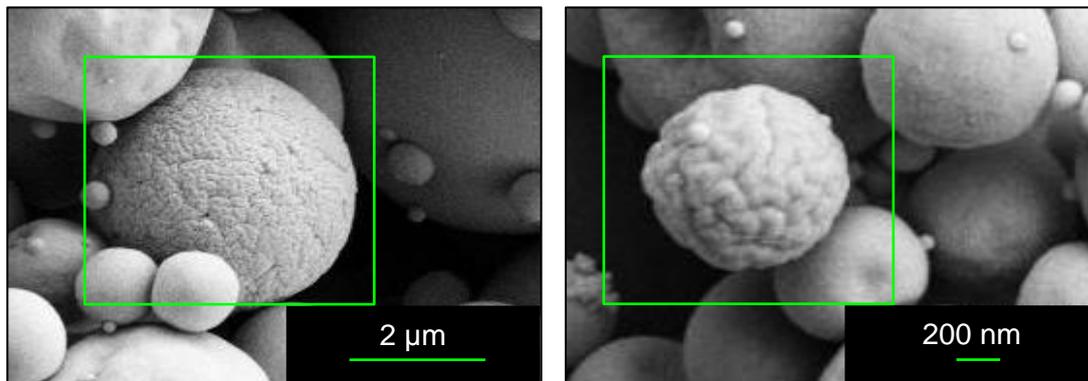


Abbildung 21: Beispiele für eine Anomalie in der Oberflächenbeschaffenheit sprühtrockneter Partikel.

Derartige Partikelmorphologien wurden beobachtet, wenn sich die Partikelkomponenten nicht ausreichend in dem verwendeten Lösungsmittel gelöst hatten. War dies der Fall, dann nahmen die Polymerketten eine knäuelartige Konformation ein und begannen bereits in der frühen Verdampfungsphase des Sprühtrocknungsprozesses in den Lösungsmittel Tröpfchen zu präzipitieren. Die einzelnen Partikelkomponenten bzw. unterschiedlich langen Ketten des verwendeten Polymermaterials entmischten sich, wodurch die Ausbildung einer homogenen Partikeloberfläche nicht mehr möglich war. [58]

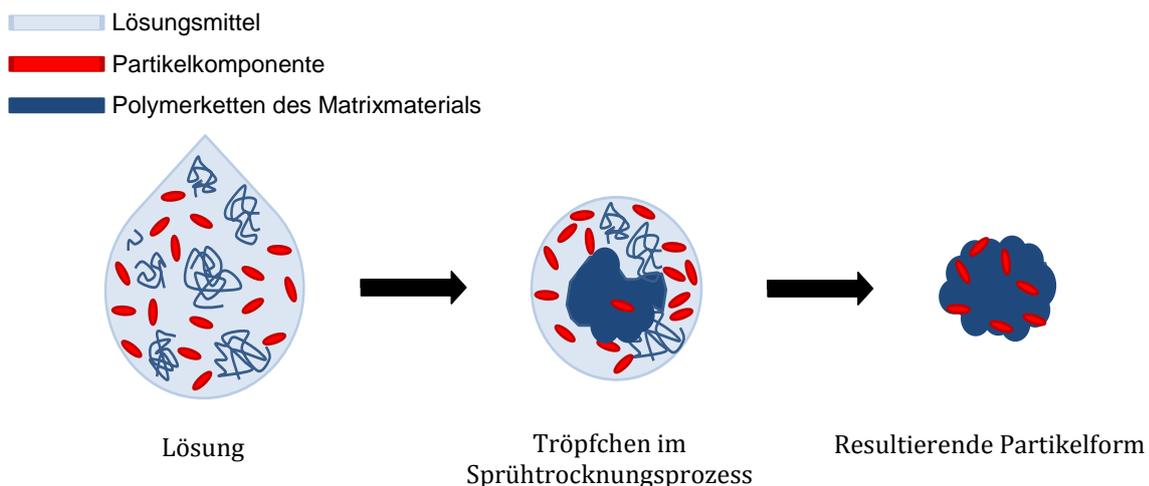


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Partikelformierung (II). Nicht vollständig gelöste Polymerketten des Partikelmatrixmaterials begannen im Tröpfchen zu präzipitieren und verursachten die in Abbildung 21 dargestellten Partikelmorphologien. [58]

Zur Verifizierung eines mutmaßlichen Rückstandes an DCM in den Hohlpartikeln, wurden fertig hergestellte Partikel mit deuteriertem Chloroform gelöst und NMR-spektroskopisch untersucht. Die beiden Partikelchargen wurden aus dem Partikelmatrixmaterial S-LEC-P LT 75 52, aus 2 % (w/w/w) Graphit Nanopartikeln und aus unterschiedlichen Mengen an Fmoc-Gly-OPfp hergestellt. Die Partikelcharge LK958-037 enthielt 9,1 % (w/w/w) des Aminosäureaktivesters, während die Charge LK958-042 mit 2,3 % (w/w/w) beladen war (vgl. Tabelle 10). Neben den Peaks, die dem Partikelmatrixmaterial und dem eingebetteten Fmoc-Gly-OPfp Ester zuzuordnen waren, erhielt man Signale für DCM im Bereich um 5,4 ppm. ^[60]

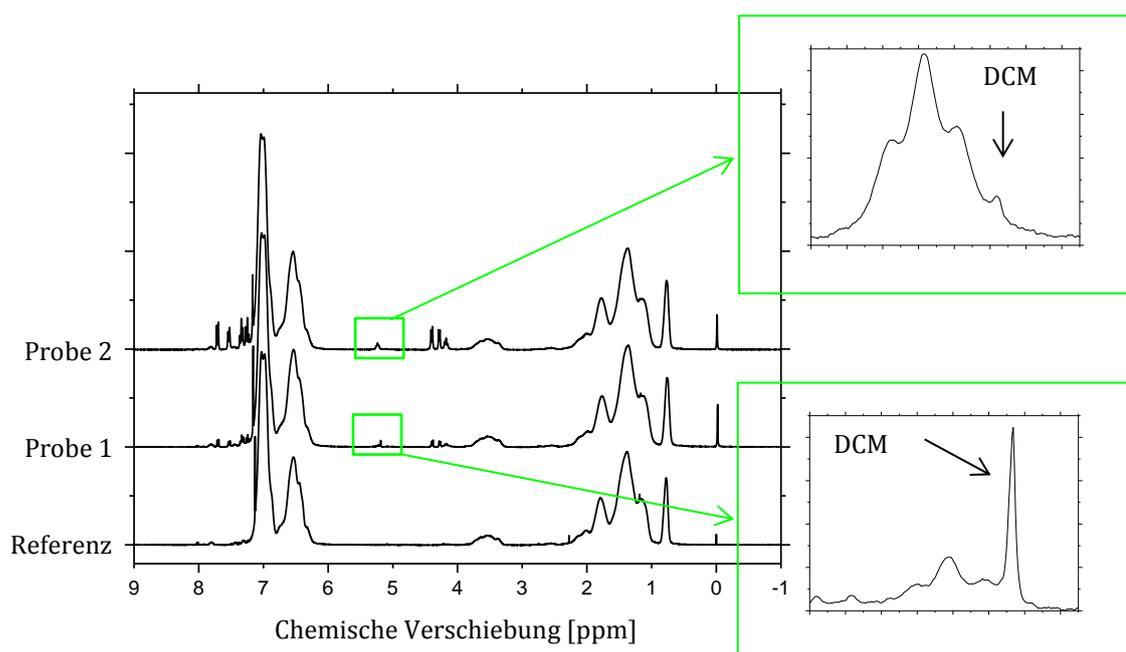


Abbildung 23: NMR Spektren von reinem Matrixmaterial (Referenz), LK958-042 (Probe 1) und LK958-037 (Probe 2) im Vergleich. Probe 1: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,80$ (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, *Harom.* Fmoc), 7,63 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, *Harom.* Fmoc), 7,38 (m, 4H, *Harom.* Fmoc), 5,33 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, -NH-), 4,39 (5H, *Haliph.* Fmoc, GlyCH₂) ppm. Probe 2: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,80$ (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, *Harom.* Fmoc), 7,63 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, *Harom.* Fmoc), 7,39 (m, 4H, *Harom.* Fmoc), 5,34 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, -NH-), 4,39 (5H, *Haliph.* Fmoc, GlyCH₂) ppm.

Eine Vergrößerung der NMR Spektren der Partikelchargen LK958-037 und -042 im Verschiebungsbereich zwischen 5,40 bis 5,10 ppm (Abbildung 23, grüne Rahmen) zeigte an der Flanke des jeweiligen, dem Proton am Stickstoffatom des Aminosäurederivats zuzuordnenden Triplets (Probe 1: $\delta = 5,33$ (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, -NH-) ppm; Probe 2: $\delta = 5,34$ (t, 1H, $J = 6,0$ Hz, -NH-) ppm), ^[61] bei beiden Spektren einen weiteren Peak. Dieser Peak stammte von DCM-Rückständen aus dem Sprühtrocknungsprozess in der jeweiligen Probe

(Probe 1 und 2: $\delta = 5,30$ (s, 2H, Cl_2CH_2) ppm). ^[60] Die Messungen belegten somit die Ausbildung von Hohlpartikeln nach dem oben beschriebenen Prozess (Abbildung 19) als auch die erfolgreiche Einbettung des Aktivesters in die Polymermatrix durch den Sprühtrocknungsansatz.

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Herstellung von Mikropartikeln der gewünschten Größenverteilungen ($d(0,5) < 5 \mu\text{m}$), unter Verwendung des Mahlverfahrens (siehe Abschnitt 1.3.a) und des Sprühtrocknungsprozesses (siehe Abschnitt 1.3.b) beschrieben. Außerdem wurde die Ursache unterschiedlicher Morphologien sprühgetrockneter Mikropartikel diskutiert. Das erfolgreiche Einbetten des Fmoc-Gly-OPfp Esters sowie ein Restgehalt von Lösungsmittel in den hergestellten Partikelchargen, der den Ausbildungsprozess von Hohlpartikeln belegte, konnte mittels NMR Spektroskopie beobachtet werden. Der Sprühtrocknungsprozess eignet sich aufgrund der einfachen Prozessführung und der schnellen Partikelherstellung im Rahmen der Kapazität des Mini-Sprühtrockners B-290 vor allem zur Herstellung experimenteller Partikelchargen für die partikelbasierte SPPS im Arrayformat.

3.3. Thermische Analyse mittels Differential Scanning Calorimetry

Die thermischen Eigenschaften der mit Aminosäureaktivester beladenen Tonerpartikel der Laserdruckerapplikation sind bereits teilweise beschrieben. ^[35] Diese sollten im Folgenden nun für die sprühgetrockneten, für das laserbasierte Ansmelz-Verfahren entwickelten Mikropartikel untersucht werden, um eine vergleichbare Kupplungseffizienz sicherzustellen. Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Mengen an zugegebenem Aminosäureaktivester auf die Lage der Glasübergangstemperatur der Partikelmatrix bestimmt.

Kühlt man ein bei höheren Temperaturen flüssiges, kristallisationsfähiges Polymer ab, verhindert man falls die Kristallbildungsrate langsamer als die Kühlrate verläuft, eine Kristallisation des Materials. Die Viskosität der Polymerschmelze nimmt beim Abkühlen zu und die einzelnen Polymerketten verlieren ihre Mobilität. Es gelingt keine strukturelle Relaxation mehr. Sie frieren beim Durchlaufen des Glasübergangs- oder Einfrierbereichs in einer Konformation außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts ein. Es bildet sich ein amorphes Glas. Beim Erwärmen des amorphen Polymers durchläuft das Material oberhalb des Glasübergangsbereichs zunächst einen gummielastischen Zustand und beginnt sich mit zunehmender Temperatur wieder zu verflüssigen. ^[62] Der Verlauf der Wärmekapazität (C_p) gegen die Temperatur (T) zeigt im Bereich des Glasübergangs eines Polymers eine Unstetigkeit (Phasenübergang zweiter Ordnung). ^[63] Da das Messsignal bei der Differential-Scanning-Calorimetry (DSC) direkt mit C_p zusammenhängt, bietet sich diese Messmethode zur experimentellen Untersuchung des Glasübergangsbereichs polymerbasierter Materialien an. ^[62]

Die Glasübergangstemperatur (T_g) kann von der mechanischen und thermischen Vorgeschichte, der chemischen Natur und Struktur der Polymerketten, dem Verzweigungsgrad und vom Molekulargewicht des Polymers beeinflusst werden. Eine Verschiebung von T_g kann man durch die Zugabe bestimmter Additive (Plasticizer) gezielt herbeiführen. ^[62]

Für die thermische Analyse wurde ein Differential Scanning Kalorimeter des Typs 204 F1 Phoenix der Firma NETZSCH-Gerätebau GmbH (Selb / Deutschland) verwendet. Die Ergebnisse der thermischen Untersuchung des reinen S-LEC-P LT 75 52 Polymers mittels DSC wurden in Abbildung 24 dargestellt. Die experimentelle Vorgehensweise ist dem Material und Geräteteil zu entnehmen.

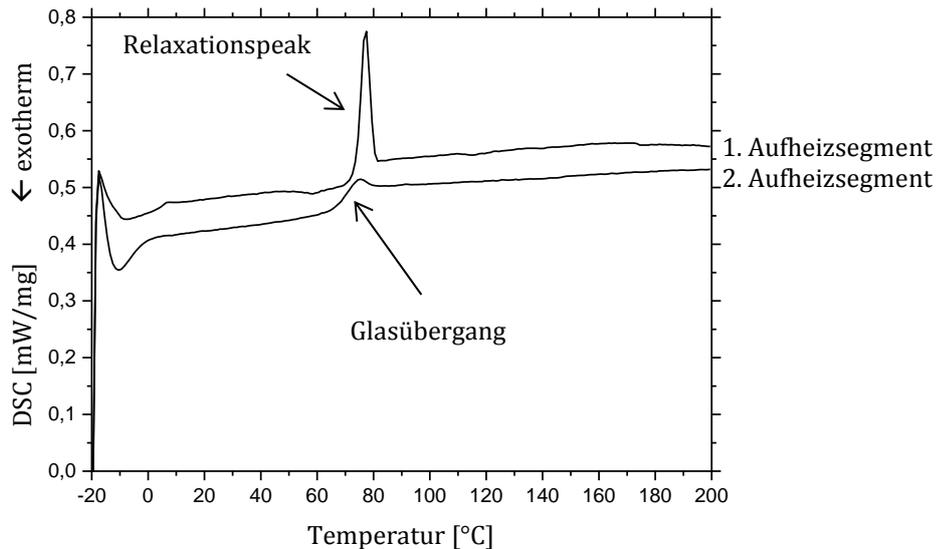


Abbildung 24: DSC Messung des reinen S-LEC-P LT 75 52 (Heiz- / Kühlrate: 10 K/min, Isotherme: 10 min).

Segment	Heizrate	Glasübergangstemperatur (T_g)
1. Aufheizsegment	10 K/min	74,1 °C
2. Aufheizsegment	10 K/min	70,2 °C

Tabelle 6: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 24 dargestellten DSC-Kurven.

Die DSC-Kurve des 1. Aufheizsegments zeigte zusätzlich zum erwarteten Glasübergang einen Peak. Dieser überlagerte die vom Glasübergang verursachte „Stufe“ im DSC-Signal. Hierbei handelte es sich um die sogenannte Enthalpielaxation. Dieser wurde durch Lagerung des S-LEC-P 75 52, über einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur, was einem Tempern des Materials bei Raumtemperatur entsprach, verursacht.

Ein amorphes Polymermaterial befindet sich unterhalb T_g in einem metastabilen Glaszustand. Dennoch ist es in einem gewissen Temperaturrahmen, selbst unterhalb T_g möglich, dass das Material in einen stabileren Zustand relaxiert, was mit einer Erniedrigung der Enthalpie verbunden ist. Dieses Phänomen, das unter anderem Änderungen in den mechanischen Eigenschaften des Materials im Glaszustand zur Folge haben kann, ist als „physikalisches Altern“ bekannt und beispielsweise durch Tempern des Glases bei Temperaturen oberhalb von T_g vollständig thermisch reversibel. Das Erscheinungsbild des Relaxationspeaks im Spektrum ist von den bei der thermischen Analyse verwendeten Heiz- und Kühlraten abhängig. [62] [64]

Der ausgeprägte Glasübergang bei 74,1 °C, sowie das Ausbleiben eines Schmelzpeaks bei höheren Temperaturen sprachen dafür, dass es sich bei dem Partikelmatrixmaterial um ein amorphes Polymer handelte.

Das S-LEC-P LT 75 52 dient in der partikelbasierten SPPS gleichzeitig als Partikelmatrixmaterial und bei Temperaturen oberhalb seines T_g als Reaktionsmedium. Somit limitiert die Viskosität dieses Materials und die Beladung mit aktiviertem Monomer die Reaktionsausbeute der Ankupplung an die verwendeten Syntheseoberflächen. Zukünftige Anwendungen und damit einhergehende Optimierungen bezüglich der Partikelzusammensetzung, erfordern die Kenntnis des Einflusses der Partikelkomponenten auf die thermischen Eigenschaften des Polymers. Der Einfluss des Aminosäureaktivesters auf den Glasübergang des Partikelmatrixmaterials wird am Beispiel des Fmoc-Glycin-OPfp Esters untersucht (vgl. Abbildung 25 und 26).

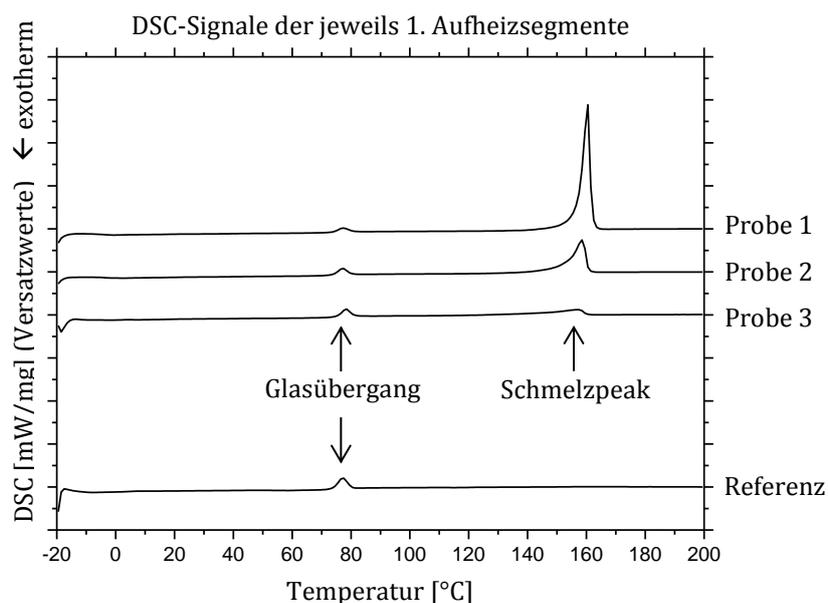


Abbildung 25: Vergleich der 1. Aufheizsegmente der DSC-Analysen der in Tabelle 7 aufgeführten Proben.

Probe	Zusammensetzung	Heizrate	Glasübergangstemperatur (T_g)
1	50 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp mit Matrixmaterial	10 K/min	75,1 °C
2	30 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp mit Matrixmaterial	10 K/min	74,2 °C
3	10 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp mit Matrixmaterial	10 K/min	75,5 °C
Referenz	Reines Matrixmaterial (S-LEC-P LT 75 52)	10 K/min	74,1 °C

Tabelle 7: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 25 aufgeführten DSC-Kurven.

In Abbildung 25 und der zugehörigen Tabelle 7 wurden die DSC-Kurven der 1. Aufheizsegmente unterschiedlicher Gemenge aus polymerem Matrixmaterial und Fmoc-Gly-OPfp Aktivester dargestellt. Der für reines Matrixmaterial charakteristische Glasübergang war in Kombination mit dem endothermen Enthalpielaxationspeak, bei jeder Probenzusammensetzung, bei gleichen Temperaturen zu finden. Zusätzlich wiesen

die DSC Kurven des 1. Aufheizsegments bei jeder der drei Proben einen Peak bei einer Temperatur von ca. 159 °C auf. Es handelte sich hierbei um den Schmelzpeak des beigemengten Fmoc-Gly-OPfp Aktivesters (Lit.: $T_m=156,3 - 157,4$ °C).^[61] Die Fläche des Schmelzpeaks korrelierte mit dem Aktivestergehalt der jeweiligen Probe.

Nach dem 1. Aufheizsegment, wurde die jeweilige Probe auf -20°C abgekühlt und ein weiteres Heizsegment gefahren. Während des 1. Aufheizvorgangs und dem damit verbundenen Verflüssigen des Partikelmatrixmaterials sollte ein Lösen des Aktivesters im verflüssigten Polymer, die thermischen Eigenschaften des S-LEC-P LT 75 52 beeinflussen.^[62]

Das DSC-Signal des 2. Aufheizsegments der Probe 1 (Abbildung 26) besaß bei 121,4 °C einen exothermen Kristallisationspeak.

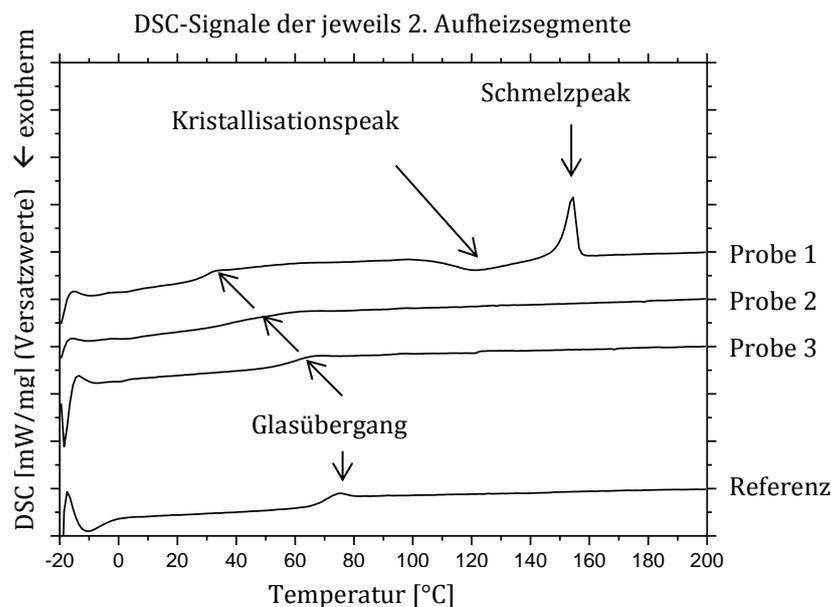


Abbildung 26: Vergleich der 2. Aufheizsegmente der DSC-Analysen der in Tabelle 8 aufgeführten Proben.

Es könnte sich hierbei um das Kaltkristallisieren von Fmoc-Gly-OPfp gehandelt haben, das aufgrund seiner hohen Konzentration aus dem viskosen Polymermaterial ausgefallen war. Der bei 154,2 °C auftretende Schmelzpeak, der bezüglich seiner Fläche mit dem Kristallisationspeak vergleichbar war, gab das Aufschmelzen der zuvor entstandenen

Kristalle wieder. Betrachtete man die Temperatur bei dem dieser Schmelzpeak auftrat, fiel ein geringer Temperaturunterschied zu den Fmoc-Gly-OPfp korrelierten Schmelzpeaks aus Abbildung 25 auf. Hierfür war die Bildung von Mischkristallen aus Fmoc-Gly-OPfp und Bestandteilen des Polymermaterials eine mögliche Erklärung.

Probe	Zusammensetzung	Heizrate	Glasübergangstemperatur (T_g)
1	50 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp in Matrix	10 K/min	29,4 °C
2	30 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp in Matrix	10 K/min	46,3 °C
3	10 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp in Matrix	10 K/min	60,1 °C
Referenz	Reines Matrixmaterial (S-LEC-P LT 75 52)	10 K/min	70,2 °C

Tabelle 8: Charakteristische Werte aus den in Abbildung 26 aufgeführten DSC-Kurven.

Bei allen DSC Kurven der 2. Aufheizsegmente fiel im Vergleich zum reinen S-LEC-P LT 75 52, eine Verschiebung des Glasübergangs zu niedrigeren Temperaturen auf. Die Erniedrigung von T_g hing vom beigemengten Fmoc-Gly-OPfp Anteil der jeweiligen Probe ab. Dieses Ergebnis und die Tatsache dass bei den Proben 2 und 3 keine dem Fmoc-Gly-OPfp zuzuordnenden Kristallisations- und Schmelzpeaks in den DSC-Kurven des 2. Heizsegments auftraten, zeigten, dass sich der Aktivester tatsächlich im verflüssigten Polymermaterial gelöst hatte.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Graphit Nanopartikel als Additiv zum S-LEC-P LT 75 52 untersucht. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 9 aufgeführt. Den DSC-Analysen konnten keine relevanten thermischen Übergänge entnommen werden. Die Graphit Nanopartikel hatten demnach keinen Einfluss auf die Glasübergangstemperatur des Partikelmatrixmaterials und damit auch nicht auf die thermischen Eigenschaften der mit Aminosäureaktivester beladenen Mikropartikel.

Probe	Zusammensetzung	Heizrate	Glasübergangstemperatur (T _g)
1	Graphit Nanopartikel	10 K/min	---
2	LK958-029 5% (w/w) Graphit in Matrix	10 K/min	70,2
3	25 % (w/w) Graphit in Matrix	10 K/min	72,6 °C
Referenz	Reines Matrixmaterial (S-LEC-P LT 75 52)	10 K/min	70,2 °C

Tabelle 9: Charakteristische Werte aus dem 2. Aufheizsegment der DSC Analyse reinen Matrixmaterials, der Partikelcharge LK958-029 (5% (w/w) Graphit eingebettet in Matrixmaterial), eines Gemischs aus 25 % (w/w) Graphit Nanopartikeln in Matrixmaterial und reiner Graphit Nanopartikeln.

Zusammenfassend war zu sagen, dass die thermischen Analysen mittels DSC zeigten, dass sich der eingebettete Aminosäureaktivester bei Massenanteilen von < 50 % (w/w) im verflüssigten Partikelmatrixmaterial gelöst hatte und die Glasübergangstemperatur herabsetzte. Außerdem verdeutlichte die Analyse des reinen Partikelmatrixmaterials, dass die Lagerung bei Raumtemperatur Auswirkungen auf die Materialeigenschaften in Form von thermisch reversibler, physikalischer Alterung hatte. Da ein solcher Effekt sowohl gewünschte als auch unerwünschte Auswirkungen auf die entsprechende Anwendung des Materials haben kann ist die Lagerzeit und -temperatur der Mikropartikel für die partikelbasierte SPPS zu überdenken.

3.4. Untersuchung der Kupplungseigenschaften des in Mikropartikeln eingebetteten Aktivesters

3.4.a) Photometrische Untersuchung

Betrachtet man die Mikropartikelzusammensetzung unter dem Aspekt des Aminosäureaktivester Gehalts, so fällt ein Überschuss an Aminosäure-Derivat in Bezug auf die Dichte der funktionellen Gruppen am Syntheseträger auf. Dieser Zusammenhang soll am folgenden Beispiel verdeutlicht werden.

Ein handelsüblicher Glasobjektträger besitzt eine Fläche von ca. 20 cm². Funktionalisiert man einen solchen Mikroskop-Objektträger mit einem 100 % PEGMA-(β -Ala)₁-NH₂-Synthesefilm, erzeugt man je nach Schichtdicke eine Aminogruppen-Dichte von ca. 16 nmol/cm². Teilt man den funktionalisierten Glasobjektträger in 5 gleichgroße Stücke, wie es bei den in diesem Kapitel (3.4.a.) beschriebenen Versuchsreihen erfolgte, erhält man ein Syntheseträgerfragment auf dessen Oberfläche 64 nmol an Aminogruppen vorzufinden sind. Ein für die Laserdruckerapplikation entwickelter Toner der PEPperPRINT GmbH enthält 10 % (w/w/w/w) an Aminosäureaktivester-Derivat in Bezug auf seine Gesamtmasse. Deponiert man 50 mg eines Fmoc-Gly-OPfp beladenen Toners auf der Oberfläche des Syntheseträgerfragments, bringt man 5 mg Fmoc-Gly-OPfp (mit M = 463,35 g/mol) auf die Oberfläche. Dies entspricht einer Stoffmenge von n = 10,8 μ mol. Im Verhältnis zu den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche resultiert hieraus ein 169-facher Überschuss an Aktivester.

Die Partikelformulierung für das Laserdruckverfahren basiert auf empirischen Untersuchungen die eine möglichst quantitative Kupplung des eingebetteten Aktivesterbausteins an die Oberfläche als Ziel hatten.

Die quantitative Untersuchung der Kupplungseffizienz mit oberflächensensitiven spektroskopischen Methoden ist schwierig und kostspielig. Es handelt sich bei den hier verwendeten Syntheseoberflächen auf molekularer Ebene um komplexe dreidimensionale Systeme, die sich in ihrer genauen Zusammensetzung mit gängigen oberflächensensitiven Methoden wie IR- oder XPS-Spektroskopie nur schwer analysieren lassen. ^[65] Eine Quantifizierung der Reaktionsausbeuten mit Hilfe von NMR-Spektroskopie durch die

Verwendung von spaltbaren Linkern, die ein Abspalten des Syntheseprodukts von der Oberfläche ermöglichen würden, kommt wegen der niedrigen Stoffmengen nicht in Frage.

Deshalb sollte die Kupplungseffizienz, durch die im Folgenden diskutierten Versuche, indirekt durch Uv/Vis-Spektroskopie untersucht werden. Vor jedem Kupplungsschritt musste der Syntheseträger mit einer Lösung aus 20% (v/v) Piperidin in DMF entschützt werden um die funktionellen Gruppen an der Oberfläche, in diesem Fall Amino-Funktionen, für eine Reaktion zugänglich zu machen. Das sich hierbei in der Reaktionslösung bildende Piperidin-Dibenzofulven-Addukt (PDFA) konnte bei einem Absorptionsmaximum von 301 nm photometrisch vermessen werden (vgl. Abbildung 2). Auf diese Weise war es auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes möglich, über die Konzentration des PDFA in der verwendeten Entschützungslösung, die Dichte an funktionellen Gruppen an der Oberfläche des Syntheseträgers, den Derivatisierungsgrad (DG), in mol/cm² zu bestimmen (Formel 1).^[38]

$$DG = \frac{n}{A} = \frac{E * V}{\epsilon * d * A}$$

Formel 1: Derivatisierungsgrad der Syntheseoberfläche. Mit: n - Stoffmenge; A - Oberfläche des Syntheseträgerfragments; E - Extinktion; V - Volumen der Entschützungslösung; d - Länge des Strahlengangs durch die Küvette; ϵ - Extinktionskoeffizient (5129 L/mol).^[38]

Vor der Kupplung einer Aminosäure wurde die Oberfläche Fmoc- entschützt und anhand der photometrischen Vermessung der Entschützungslösung der DG bestimmt (\rightarrow DG₁). Nach der Kupplung der Aminosäure und den entsprechenden Wasch- und Blockierungsschritten entschätzte man die Oberfläche erneut (\rightarrow DG₂). Aus dem Quotienten DG₂ / DG₁ ergab sich die Ausbeute der Kupplungsreaktion an die Oberfläche in Prozent. Neben der einfachen Probenpräparation stellte vor allem die Möglichkeit eine Aussage zur Kupplungsausbeute über die gesamte Tiefe des PEGMA-Polymerfilms zu machen, Vorteile dieser Vorgehensweise dar.

Zur Untersuchung der Kupplungseffizienz wurden sprühgetrocknete Mikropartikelchargen unterschiedlichen Aminosäureaktivester Gehalts herangezogen (Tabelle 10).

Komponenten		Charge				
		LK958-037	LK958-036	LK958-035	LK958-042	LK958-034
Fmoc-Gly-OPfp [463,35]	n	2,0 mmol	1,5 mmol	1,0 mmol	0,5 mmol	0,1 mmol
	Masse	926,0 mg	695,0 mg	463,0 mg	232,0 mg	46,0 mg
	% (w/w/w)	9,1 %	6,8 %	4,5 %	2,3 %	0,4 %
S-LEC-P LT 75 52	Masse	9,074 g	9,305 g	9,537 g	9,768 g	9,954 g
	% (w/w/w)	88,9 %	91,2 %	93,5 %	95,7 %	97,6 %
Graphit	Masse	0,2 g				
	% (w/w/w)	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %

Tabelle 10: Zusammensetzung der mit Fmoc-Gly-OPfp beladenen, mit dem Sprühtrockner hergestellten Partikelchargen.

Die Integrität des in den einzelnen Partikelchargen eingebetteten Fmoc-Gly-OPfp Esters konnte mit Hilfe von HPLC-Vergleichsanalysen überprüft werden.

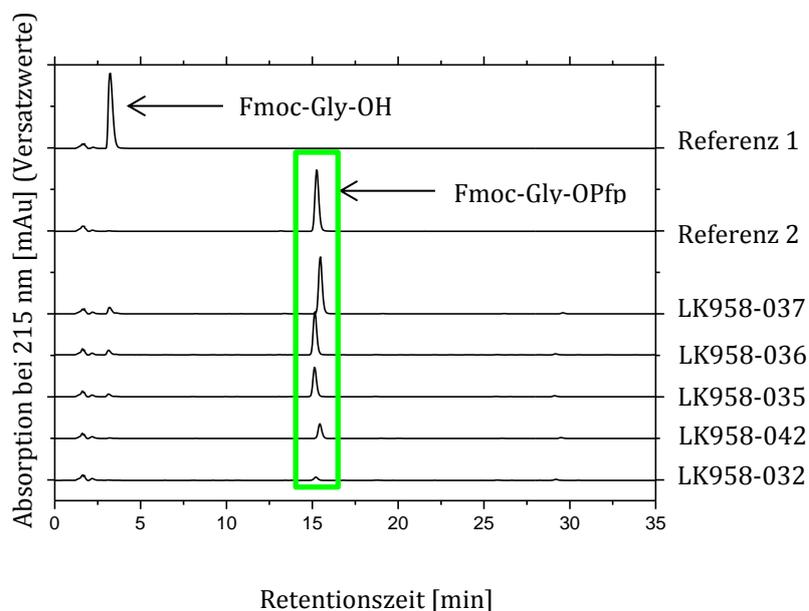


Abbildung 27: HPLC-Vergleichsmessungen der Sprühtrocknerpartikelchargen LK958-032, -042, -035, -036 und -037.

Als Substrate dienten 100%-PEGMA gegraftete, mit einem β -Alanin funktionalisierte Glasoberflächen. Diese Syntheseträger boten im Vergleich zu Mischpolymer- oder SAM Oberflächen eine höhere Dichte an funktionellen Aminogruppen und sollten deshalb verlässliche Extinktionswerte für die folgenden Uv/Vis-Messungen liefern.

Bei der Verwendung von Oberflächen mit hohem DG tragen Verdampfung oder Küvetten-Fehler nur in sehr geringem Maße zum relativen Fehler bei. In Abbildung 28 wurden die Mittelwerte der Reaktionsausbeuten von 10 Kupplungsexperimenten pro Partikelcharge vergleichend dargestellt. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken wiedergegeben.

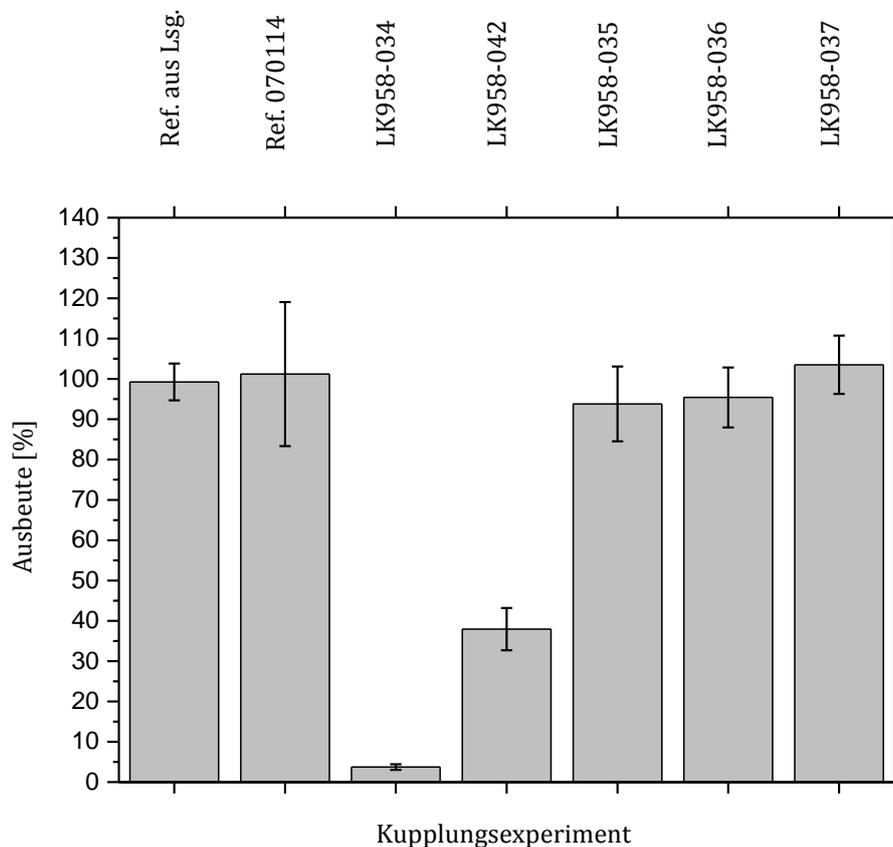


Abbildung 28: Kupplungseffizienz verschiedener sprühtrockneter Partikelchargen mit unterschiedlichem Fmoc-Gly-OPfp Gehalt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Chargen ist Tabelle 11 zu entnehmen. Die Kupplung des in den Mikropartikeln eingebetteten Fmoc-Gly-OPfp erfolgte bei 90 °C für 90 min unter Argon-Atmosphäre.

Die relativ hohen Fehler und das Auftreten zum Teil unrealistischer Syntheseausbeuten von > 100 % wurden auf unvermeidbare Verunreinigungen der Oberfläche durch Feinstaub und ähnlichen Adsorbate aus der Umgebungsatmosphäre zurückgeführt. Aus diesem Grund handelte es sich hier nicht um absolute Werte. Die Daten waren dennoch untereinander vergleichbar, da sich die systematischen Fehler in allen Experimenten ähnlich auf die Ergebnisse ausgewirkt haben sollten.

Für die Kupplungsexperimente wurden Mikropartikel der jeweiligen Charge auf etwa 3,9 cm² große mit 100 % PEGMA-(β -Ala)₁-NHFmoc funktionalisierte Glasobjektträger-Fragmente (1/5 eines intakten Mikroskop-Objektträgers der Fläche 7,6 × 2,6 cm²) deponiert und bei 90 °C für 90 min unter Argon-Atmosphäre gekuppelt. Die Stoffmengenverhältnisse der Kupplungsreihen wurden in der folgenden Tabelle dargestellt. Sie konnten mithilfe der photometrischen Vermessung der Fmoc-Entschützungslösung vor und nach dem jeweiligen Kupplungsexperiment ermittelt werden.

Charge	Aminogruppendichte am Syntheseträger	Stoffmenge an deponiertem Fmoc-Gly-OPfp	Überschuss	Ausbeute
LK958-034	70,7 nmol	0,5 μ mol	7 fach	3,7 %
LK958-042	69,4 nmol	2,6 μ mol	37 fach	37,9 %
LK958-035	69,9 nmol	6,5 μ mol	93 fach	93,8 %
LK958-036	74,0 nmol	10,2 μ mol	138 fach	95,4 %
LK958-037	71,3 nmol	16,2 μ mol	227 fach	103,5 %
Ref PPP	53,3 nmol	5,0 μ mol	94 fach	101,2 %
Ref. Lsg.	47,5 nmol	27,0 μ mol	568 fach	99,2 %

Tabelle 11: Stoffmengenverhältnisse und Ausbeuten der Kupplungsexperimente mit den sprühtrockneten Partikelchargen LK958-034, -042, -035, -036, -037, einer PEPPERPRINT Tonerfeinfraktion und einer Referenz aus Lösung.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Kupplungsreaktionen bei einem 93 fachen Überschuss von zu kuppelndem Fmoc-Gly-OPfp, im Vergleich zu den Aminofunktionen an der Oberfläche, im Rahmen des Fehlers quantitativ verliefen. Die in Abbildung 27 dargestellten HPLC-Vergleichsmessungen belegten einen geringen Zerfall des Fmoc-Gly-

OPfp Esters während des Sprühtrocknungsprozesses. Da die Reaktionsausbeuten der Kupplungsexperimente der Charge LK958-035 und der beiden Referenzreaktionen (Abbildung 28, Tabelle 11) übereinstimmten, konnte für diese Versuchsreihe davon ausgegangen werden, dass die Stabilität des Fmoc-Gly-OPfp keinen Einfluss auf die hier diskutierten Kupplungseffizienzen besaß.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Auswirkung verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Kupplungseffizienz des im Partikel eingebetteten Aminosäureaktivesters untersucht.

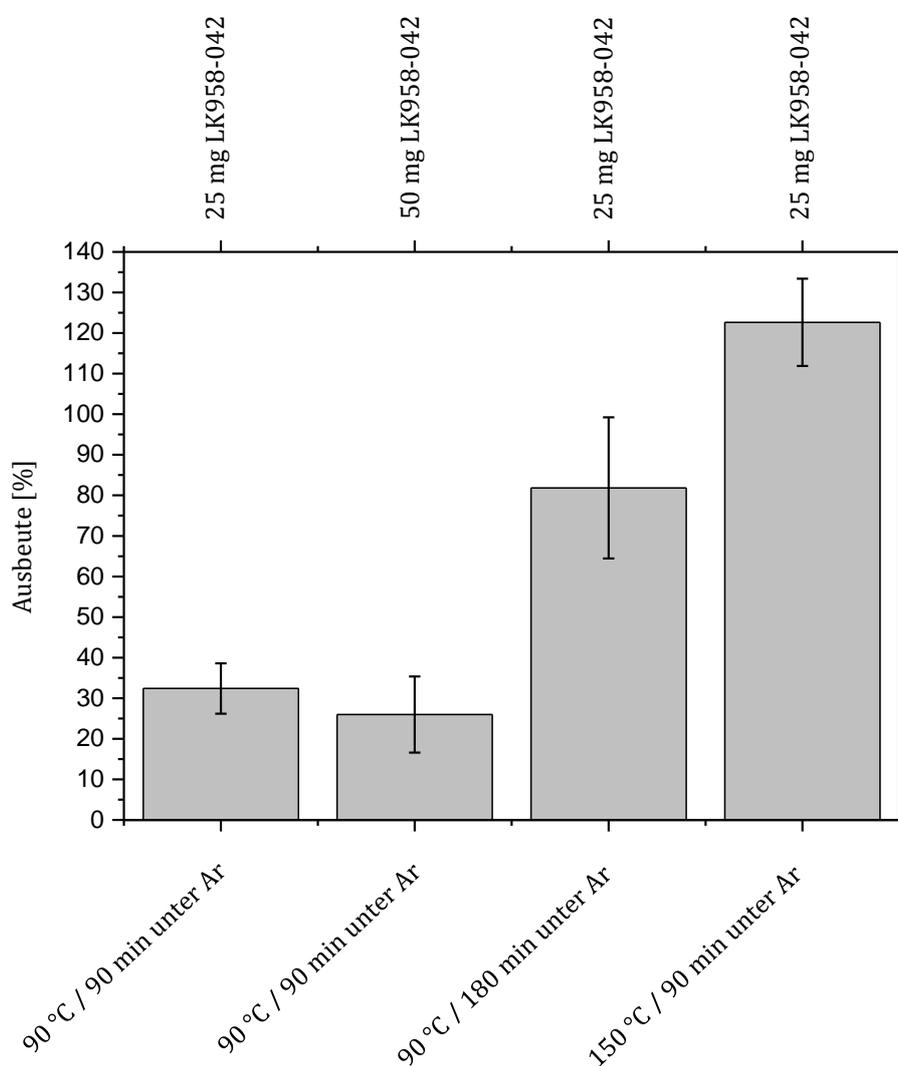


Abbildung 29: Kupplungseffizienzen der Partikelcharge LK958-042 bei verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Eine Variation der Menge deponierter Mikropartikel des gleichen Aktivesteranteils hatte auf die Kupplungseffizienz keine Auswirkung. Die Ausbeuten der Kupplungen von 25,8 mg und 49,8 mg Mikropartikel der Charge Lk958-042 (2,3 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp im Vergleich zur Partikelgesamtmasse, vgl. Tabelle 10) bei 90 °C für 90 min unter Ar-Atmosphäre, stimmten im Rahmen des Fehlers überein (Abbildung 29, Tabelle 12).

Rkt.- Bedingungen	Aminogruppendichte am Syntheseträger	Stoffmenge an deponiertem Fmoc-Gly-OPfp	Überschuss	Ausbeute
90 °C / 90 min	38,8 nmol	2,5 µmol (49,8 mg Partikel)	64 fach	25,9 %
90 °C / 90 min	32,7 nmol	1,3 µmol (25,8 mg Partikel)	40 fach	32,4 %
90 °C / 180 min	35,2 nmol	1,3 µmol (25,3 mg Partikel)	37 fach	81,8 %
150 °C / 90 min	37,1 nmol	1,3 µmol (25,0 mg Partikel)	35 fach	122,6 %

Tabelle 12: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Gly-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-042 bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass für eine möglichst effektive Kupplungsreaktion nicht die Menge der verwendeten Mikropartikel sondern der Anteil an Aktivester in der Partikelzusammensetzung entscheidend war. Alle weiteren Kupplungsexperimente wurden aus diesem Grund mit ca. 25,0 mg Mikropartikeln der jeweiligen Chargen durchgeführt. Eine Verlängerung der Kupplungsdauer von 90 min auf 180 min führte zu einer Erhöhung der Kupplungseffizienz (Abbildung 29, Tabelle 12). Die Reaktion an der Oberfläche verlief beim Erhöhen der Reaktionstemperatur auf 150 °C quantitativ (Abbildung 29, Tabelle 12).

In Verbindung mit den in Abbildung 28 und Tabelle 11 illustrierten Daten, sprachen diese Ergebnisse dafür, dass das viskose, polymere Reaktionsmedium für die eingebetteten Aminosäureaktivester eine Diffusionsbarriere darstellte. Die Verlängerung der Reaktionszeit und die Erhöhung der Reaktionstemperatur stellten sich als Möglichkeiten heraus, dieser Diffusionsbarriere entgegen zu wirken. An dieser Stelle sei erwähnt, dass eine Temperaturerhöhung für die partikelbasierte Peptidsynthese an der festen Phase kein geeignetes Mittel zur Steigerung der Kupplungseffizienz darstellt, da frühere

Untersuchungen darauf hindeuteten, dass chirale Aminosäuren bei Temperaturen oberhalb von 90 °C während der Kupplungsreaktion an die Syntheseoberfläche zur Racemisierung bzw. zum Zerfall neigten. [35]

In den bisher beschriebenen Kupplungsexperimenten wurden Fmoc-Glycin-OPfp beladene Mikropartikel verwendet. Glycin ist aus strukturchemischer Sicht die einfachste der 20 proteinogenen Aminosäuren, da sie keine Seitenkette und damit auch keine Chiralität aufweist, wodurch für die SPPS keine zusätzliche Schutzgruppe notwendig ist (Abbildung 30, links). Die hier diskutierten Erkenntnisse bezüglich der partikelbasierten Kupplung von in Mikropartikeln eingebetteten Aminosäureaktivestern sollten daher für eine sterisch anspruchsvollere AS reproduziert und bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde das Kupplungsverhalten von mit Fmoc-Arginin-2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-OPfp Estern (Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp) (Abbildung 30, rechts) beladenen Mikropartikeln untersucht.

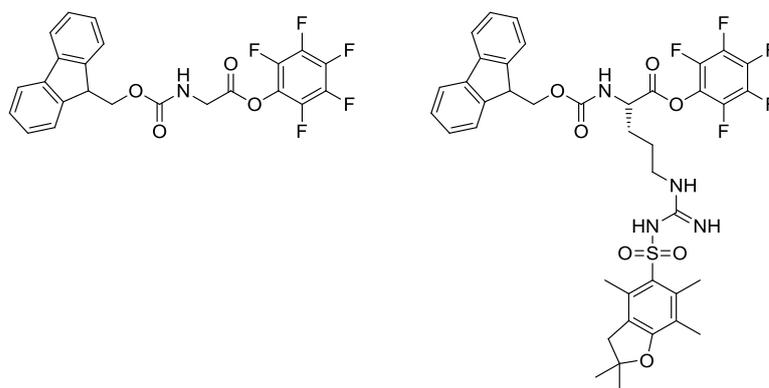


Abbildung 30: Strukturformeln von Fmoc-Gly-OPfp (links) und Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp (rechts).

Die Zusammensetzung der für die Versuchsreihe verwendeten Mikropartikel wurde in Tabelle 13 aufgeführt.

Komponenten		Charge	
		LK958-048	LK958-049
Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp [814,82]	Stoffmenge	0,5 mmol	1,5 mmol
	Masse	408,0 mg	1220,0 mg
	% (w/w/w)	4,0 %	11,9 %
S-LEC-P LT 75 52	Masse	9,6 g	8,8 g
	% (w/w/w)	94,0 %	86,1 %
Graphit	Masse	0,2 g	0,2 g
	% (w/w/w)	2,0 %	2,0 %

Tabelle 13: Zusammensetzung der Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen, mit dem Sprühtrockner hergestellten Partikelchargen.

Die Partikelformulierungen der sprühgetrockneten Partikelchargen LK958-048 und -049 entsprachen auf die Stoffmenge bezogen den Zusammensetzungen der Chargen LK958-042 und -036 (vgl. Tabelle 10). Die Unterschiede im prozentualen (w/w/w) Anteil an eingebettetem Monomer zwischen den mit Fmoc-Gly-OPfp und Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen Mikropartikeln ergaben sich aus den unterschiedlichen Molmassen der Aktivester. Bei 90 min Kupplungszeit bei 90 °C unter Argon-Atmosphäre lieferte die Partikelcharge LK958-042 eine Reaktionsausbeute von 37,9 %, während die Kupplungsreaktionen bei Verwendung der Charge LK958-036 unter äquivalenten Reaktionsbedingungen quantitativ verliefen (vgl. Abbildung 28, Tabelle 11)

In Abbildung 31 wurden die Ergebnisse der partikelbasierten Kupplungsexperimente zu den Partikelsorten LK958-048 und -049 bei 90 °C für 90 min unter Argon-Atmosphäre graphisch, vergleichend dargestellt. Erneut diente die Anbindung des Aktivesters aus Lösung und aus PEPperPRINT Tonerpartikeln einer Feinfraktion als Referenz. Neben dem sterischen Anspruch des Arginin-Derivats war die Stabilität des entsprechenden OPfp-Esters für die Kupplungseffizienz entscheidend. Die Anbindung aus Lösung ergab eine Reaktionsausbeute von ca. 70 %. Eine Kupplung des Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Esters aus der Referenzpartikelcharge von PEPperPRINT verlief mit einer deutlich geringeren Effizienz.

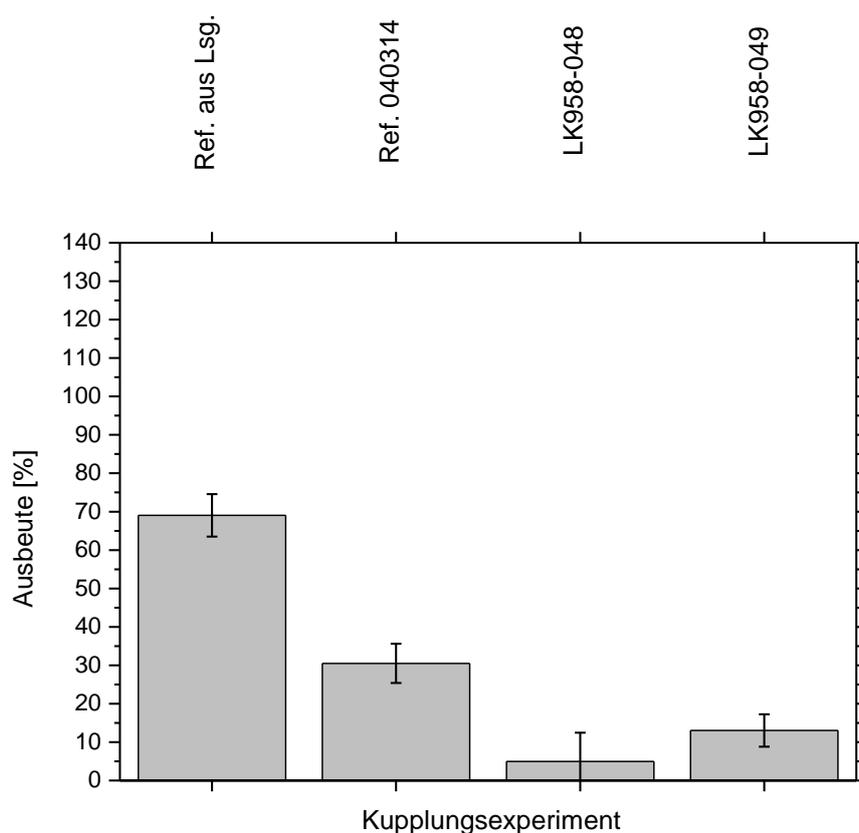


Abbildung 31: Kupplungseffizienz verschiedener sprühgetrockneter Partikelchargen mit unterschiedlichem Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Gehalt, (90 °C / 90 min unter Ar).

Der Unterschied in der Reaktionsausbeute der beiden Referenzsysteme konnte durch die entsprechenden HPLC-Profile erklärt werden. Wahrscheinlich wandelte sich bereits während der Herstellung der mit Aktivester beladenen Mikropartikel (Mahlverfahren) ein gewisser Teil des Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Esters in das entsprechende β -Lactam um, welches für die Knüpfung einer Amidbindung an der Syntheseoberfläche nicht mehr zur Verfügung stand (Abbildung 32). [66]

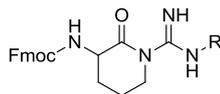


Abbildung 32: Durch intramolekularen Ringschluss aus Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp gebildetes β -Lactam. R- Pbf-Schutzgruppe

Bei der Herstellung der Partikelchargen LK958-048 und -049 mittels des Sprühtrocknungsverfahrens wandelte sich, prozessbedingt, ein größerer Anteil des Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Esters in das β -Lactam um als im Mahlverfahren. Grund hierfür war die durch den Sprühtrocknungsprozess bedingte, längere Verweilzeit der Partikelkomponenten in Lösung.

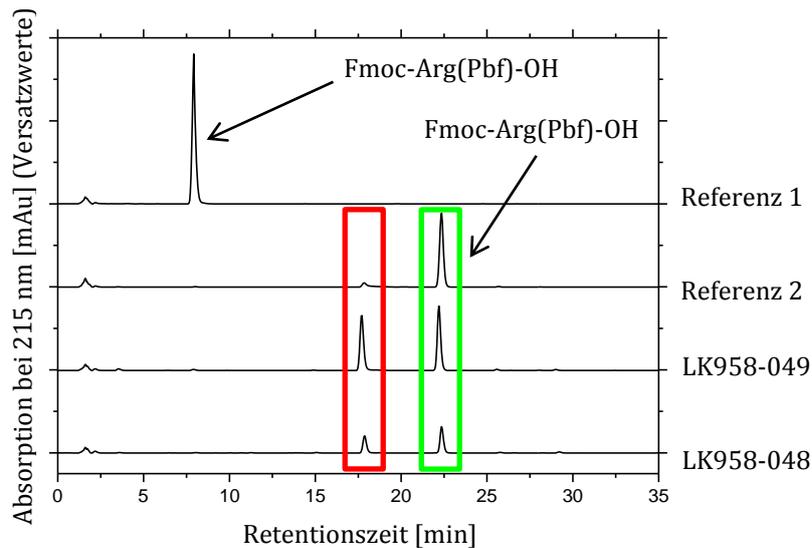


Abbildung 33: HPLC-Analysen der Sprühtrocknerpartikelchargen LK958-048 und -049. Die Vergleichsmessung der Fmoc-Arg(Pbf)-OH Referenzprobe ergab, dass der Aktivester sich nicht einfach zersetzt hatte, sondern eine Umwandlung ins β -Lactam (roter Rahmen) wahrscheinlich war. Referenzmessung von Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp (grüner Rahmen).

Bei den in Abbildung 33 illustrierten, grün umrandeten Peaks handelte es sich um den Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp Ester. Die rot umrandeten Peaks stammten vom β -Lactam.

Charge	Aminogruppendichte am Syntheseträger	Stoffmenge an deponiertem Fmoc-Gly-OPfp	Überschuss	Ausbeute
LK958-048	54,4 nmol	1,2 µmol	22 fach	4,9 %
LK958-049	48,4 nmol	3,7 µmol	76 fach	13,0 %
Ref. PPP	50,5 nmol	3,2 µmol	63 fach	30,0 %
Ref Lsg.	45,3 nmol	15,0 µmol	331 fach	69,0 %

Tabelle 14: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-048, LK958-049, einer PEPperPRINT Toner-Feinfraktion und einer Referenz aus Lösung.

Die HPLC-Vergleichsmessungen belegten die Umwandlung eines gewissen Teils des Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp während des Sprühtrocknungsprozesses. Berücksichtigt man jedoch, dass bei gleichen Prozessparametern, während der Herstellung beider Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen Partikelchargen, der gleiche Anteil des Arginin-Aktivesters ins β -Lactam überführt wurde, war über den Vergleich der Verhältnisse von Stoffmengenüberschüssen und Kupplungsausbeuten ein Rückschluss auf die Diffusionslimitierung möglich.

	Verhältnis		Verhältnis	
	LK958-042	LK958-036	LK958-048	LK958-049
Überschuss an zu kuppelndem Aktivester	1	3,7	1	3,5
Ausbeute	1	2,5	1	2,6

Tabelle 15: Vergleich des Ausbeute- und Überschuss-Verhältnisses der partikelbasierten Kupplungsreihen. Die Partikelcharge LK958-042 enthielt 2,3 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp, LK958-036 war mit 6,8 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp beladen während die Charge LK958-048 4,0 % (w/w) Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp, und LK958-049 11,9 % Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp enthielt. In absoluten Stoffmengen betrachtet war die Partikelzusammensetzung von LK958-042 und-048 gleich. Ebenso verhielt es sich für LK958-036 und-049. Die jeweilige prozentuale Abweichung resultierte aus der Molmasse des verwendeten Aktivesters.

Bei den beiden mit Fmoc- Gly-OPfp beladenen Partikelchargen lieferte LK958-036, die einen 3,7 fach höheren Überschuss an Fmoc-Gly-OPfp am Syntheseträger erzeugte, eine 2,5-mal so hohe Ausbeute. Die gleichen Verhältnisse konnten für die mit Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp beladenen Partikelchargen errechnet werden (Tabelle 15). Betrachtete man nun die Kupplungseffizienzen der beiden mit Fmoc-Gly-OPfp beladenen Chargen im Hinblick auf die Reaktionsausbeuten der Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp enthaltenden Partikel der jeweils

entsprechenden Zusammensetzungen, fiel ein Einbruch in der Reaktionsausbeute von 87,1 % für LK958-042 im Vergleich zu LK 958-048 auf. Der Vergleich der Kupplungsreaktionen unter Verwendung von LK958-036 und -049 zeigte einen Effizienzeinbruch von 86,4 %. Dieses Ergebnis sprach für eine deutliche Diffusionslimitierung im Falle der partikelbasierten Kupplung des voluminöseren und deshalb sterisch anspruchsvolleren Arginin-Derivats durch das viskose Reaktionsmedium.

3.4.b) Der Einfluss der Partikelmorphologie auf die Kupplungsausbeute

Partikelchargen, die mit dem Mahlverfahren hergestellt wurden unterscheiden sich von sprühgetrockneten Partikeln unter Anderem in ihrer Morphologie. Die mit Hilfe des Mahlverfahrens hergestellten Mikropartikel besaßen zufällige Formen. Die vielen Ecken und Abbruchkanten spannten zahlreiche Flächen auf, die die Gesamtoberfläche des Partikels groß im Vergleich zum Partikelvolumen werden ließ (Abbildung 34, links). Das Sprühtrocknungsverfahren hingegen lieferte sphärische Partikel mit einem geringen Oberflächen- zu Volumenverhältnis (Abbildung 34, rechts).

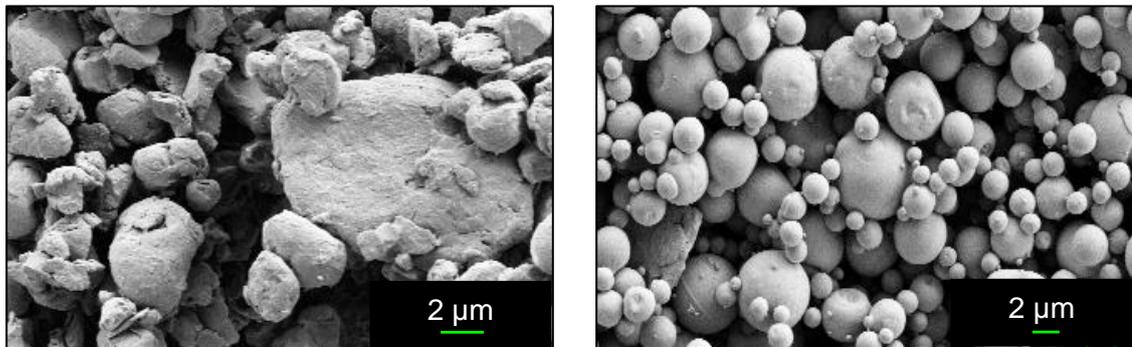


Abbildung 34: REM Aufnahmen gemahlener (links) und sprühgetrockneter Mikropartikel (rechts).

Das unterschiedliche Volumen zu Oberflächen-Verhältnis konnte durch Anfärben der mit dem jeweiligen Verfahren hergestellten Partikel illustriert werden. Dafür wurden Partikel mit eingebettetem Biotin-OPfp-Ester durch das Mahl- und das Sprühtrocknungsverfahren hergestellt. Beide Partikelsorten wurden mit einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat angefärbt.

Die Bindung des Vitamins Biotin an das homotetramere Protein Streptavidin (52 – 62 kDa) basiert hauptsächlich auf Wasserstoffbrückenbindung und hydrophoben Wechselwirkungen. ^[67] ^[68] Es handelt sich um die stärkste nicht kovalente Bindung ($K_D(\text{gebundenes Biotin}) = 10^{-15} \text{ mol / L}$). ^[69] ^[70] Das Streptavidin-Biotin System findet oft Anwendung in biotechnologischen Assays.

Für den Bindungs-Assay ließ man die Partikel zunächst in Phosphat gepufferter, mit dem Tensid Tween 20 versetzter Salzlösung (PBS-T) quellen. Anschließend wurde die Partikeloberfläche in Rockland-Puffer, einer Proteinmischung, geblockt um unspezifische Farbstoff- bzw. Proteinanlagerung zu vermeiden. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS-T wurden die Partikelproben in 10 %-iger Rockland-Lösung in PBS-T mit Streptavidin-DyLight 680 inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T und entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) wurden die Partikelproben auf einem Objektträger im Odyssey Scanner bei 700 nm gescannt.

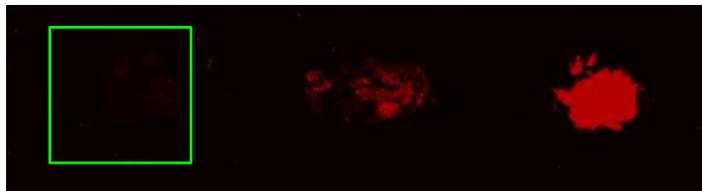


Abbildung 35: Biotin-OPfp beladene mit Strep.-Dylight 680 angefärbte Mikropartikel aus dem Sprühtrocknungsprozess (mitte) und dem Mahlverfahren (rechts). Eine Mikropartikelcharge der gleichen Größenverteilung, die nicht mit Biotin beladen war, allerdings aus dem gleichen Partikelmatrixmaterial bestand diente als Negativkontrolle (links, grüner Rahmen).

Die Aminosäureaktivester beladene Negativkontrolle (Abbildung 35, grüner Rahmen) zeigte lediglich Fluoreszenz im Intensitätsbereich des Hintergrunds und diente als Beweis, dass keine unspezifische Wechselwirkung des Streptavidin-Farbstoff-Konjugats mit der Partikeloberfläche stattfand. Die Partikelprobe, die mit Hilfe des Mahlverfahrens hergestellt wurde fluoreszierte deutlich intensiver als die Probe der sprühgetrockneten Mikropartikel. Dies zeigte, dass die gemahlene Partikel, aufgrund ihrer im Vergleich zum Volumen sehr großen Oberfläche, einen größeren Anteil an eingebettetem Aktivester unmittelbar an ihrer Oberfläche trugen als die sprühgetrockneten Partikel. Unter Annahme einer Diffusionslimitierung bei der Anbindung der in die Mikropartikel eingebetteten Aktivesterbausteine an die Oberfläche sollten hauptsächlich diejenigen Aktivester-Moleküle binden die sich nahe der Partikeloberfläche befanden. Bei Verwendung der mittels des Mahlverfahrens hergestellten Partikel wäre somit eine wesentlich effizientere Kupplung zu erwarten gewesen.

Die sprühgetrockneten Partikel führten bei gleicher Stoffmenge an auf der Oberfläche deponiertem eingebettetem Aktivester zu einer besseren Ausbeute als die mit dem Mahlverfahren hergestellten Partikel (Tabelle 16).

Charge	Aminogruppendichte am Syntheseträger	Stoffmenge an deponiertem Fmoc-Gly-OPfp	Überschuss	Ausbeute
LK958-042	32,7 nmol	1,3 μmol	39,7 fach	32,4 %
LK958-045	38,4 nmol	1,2 μmol	31,2 fach	18,3 %

Tabelle 16: Ergebnisse der Kupplungsreihe von Fmoc-Gly-OPfp beladenen Mikropartikeln der Charge LK958-042, LK958-045. Bei der Partikelcharge LK958-042 handelte es sich um sprühgetrocknete, bei LK958-045 um mit dem Mahlverfahren hergestellte Partikel. Beide Partikelsorten enthielten je 2,3 % (w/w) Fmoc-Gly-OPfp.

Dieses Resultat schien sich zunächst mit dem in Abbildung 35 illustrierten Ergebnis zu widersprechen. Eine Untersuchung der abgelagerten Partikel auf der Syntheseoberfläche lieferte eine Erklärung für diese Beobachtung (Abbildung 36).

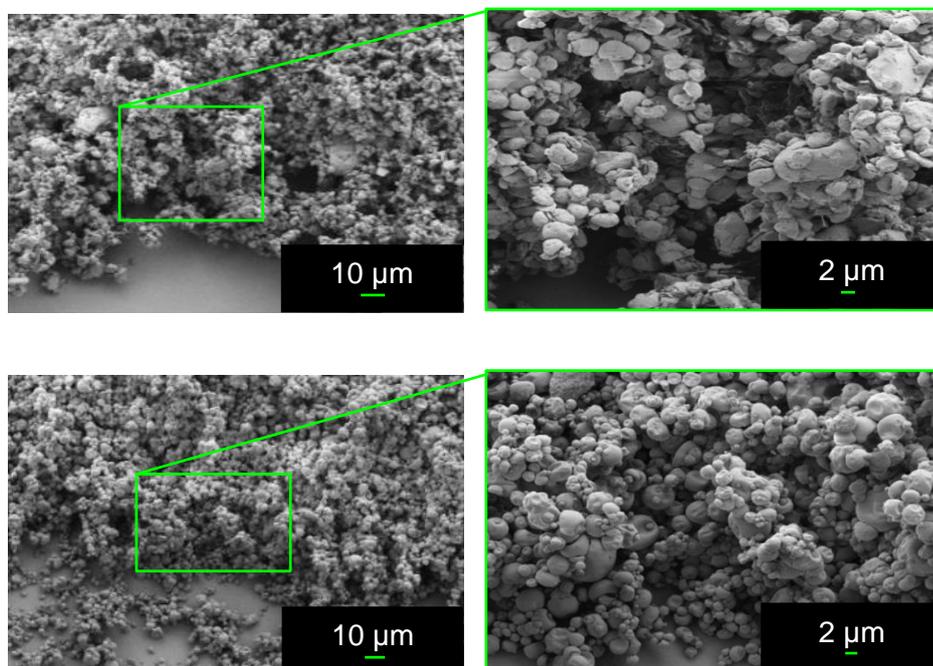


Abbildung 36: REM-Aufnahmen der Kanten von auf dem Syntheseträger deponierten und verdichteten Partikelschichten. Gemahlene Partikel (oben) vs. sprühgetrocknete Partikel (unten).

Unabhängig ihrer Form bildeten die beiden Partikelchargen beim Deponieren auf der Syntheseoberfläche poröse Schichten. [74] Aufgrund der Porosität der Partikelschicht entstanden beim Verflüssigen des Partikelmatrixmaterials Hohlräume. Gaseinschlüsse wirkten thermisch isolierend und führten somit zu Temperaturschwankungen im porösen Partikelhaufen. Dies erschwerte ein gleichmäßiges Benetzen der Oberfläche durch die verflüssigte Mikropartikelmatrix und beeinflusste die Ausbeute der partikelbasierten Kupplung. Da die mit dem Sprühtrocknungsverfahren hergestellten Hohlpartikel besser zu verdichten waren, fiel die Reaktionsausbeute der partikelbasierten Kupplung höher aus.

Betrachtete man die in Abbildung 37 (rechts) illustrierte REM-Aufnahme, konnte man einen Ausschnitt der angeschmolzenen Partikelschicht erkennen, in dem die ursprünglichen Partikelstrukturen noch deutlich vorhanden waren.

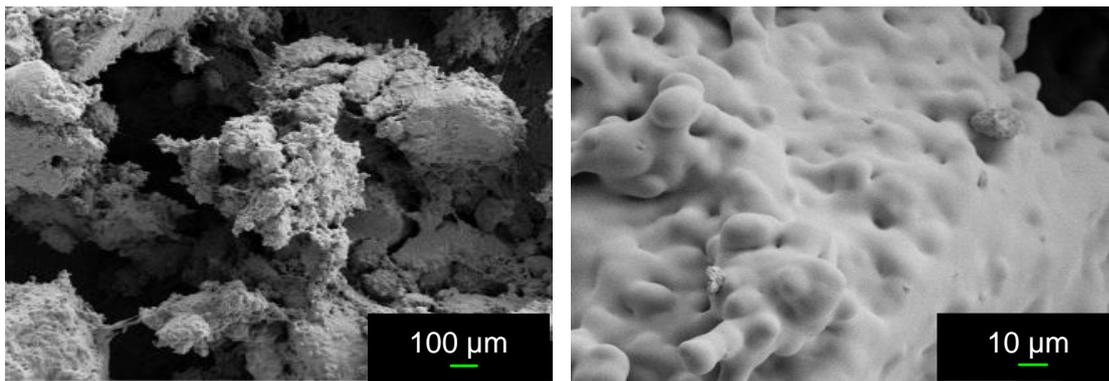


Abbildung 37: Bei 90 °C auf einer 100% PEGMA Oberfläche verflüssigte Mikropartikel.

Das Anschmelzen auf der Oberfläche deponierter und mit dem Spatel verdichteter Mikropartikel, führte wegen der dichteren Partikelpackung zu einem homogenen Schmelzbild (Abbildung 39).

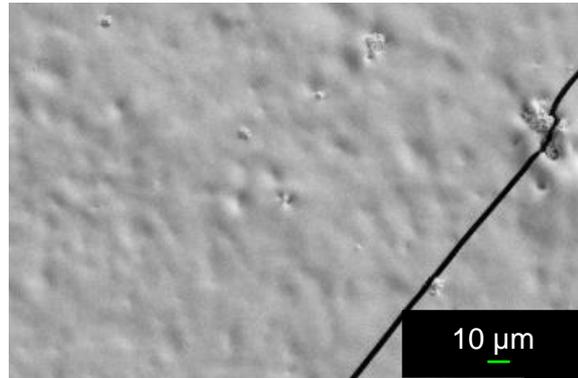


Abbildung 38: Schmelzbild verdichteter Mikropartikel auf einer 100% PEGMA Oberfläche. Bei der schwarzen Linie im unteren rechten Bereich handelte es sich um einen bei der Abkühlung entstandenen Riss im erstarrten Partikelmaterial.

3.4.c) Untersuchung der partikelbasierten Kupplung eines Aktivesters in der Tiefe des Polymerfilms

Bei den partikelbasierten Ansätzen zur SPPS im Arrayformat dient das S-LEC-P LT 75 52 Polymer (T_g (reines Polymer) = 74,1 °C) als Partikelmatrix und Reaktionsmedium. Bei einer Kupplungstemperatur von 90 °C liegt das Partikelmatrixmaterial als viskose Flüssigkeit vor und ermöglicht die Diffusion der eingebetteten Aktivester zum Syntheseträger. Der Verdacht einer Limitierung der Kupplungseffizienz in der Tiefe der Syntheseoberfläche war aufgrund der Viskosität des Reaktionsmediums naheliegend und wurde durch die in Kapitel 3.4.a.) diskutierten Ergebnisse untermauert. Das im Folgenden beschriebene Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) Experiment ermöglichte die Untersuchung der Kupplungsreaktion des im Partikel eingebetteten Aminosäure Aktivesters in der Tiefe des Polymerfilms der Syntheseoberfläche.

Bei TOF-SIMS wird die zu analysierende Oberfläche mit Primärionen beschossen. Das Primärion gibt beim Auftreffen seine kinetische Energie an die Oberfläche ab. Folgestöße können dann zur Emission von Oberflächenteilchen, strukturellen Veränderungen in der Oberfläche (Strahlenschäden) oder Implantation von Primärionen in tiefergelegene Schichten der Oberfläche führen. [65] [72] Bei den von der Probe emittierten Teilchen handelt es sich meist um ungeladene Fragmente. Emittierte, geladene Sekundärionen können mit Hilfe eines elektrischen Feldes in einen Time of Flight Analysator mit Reflektron geleitet und ein Massenspektrum aufgenommen werden. [72] Die Materialeigenschaften der Probe und die zu erwartenden Sekundärionen bestimmen die Auswahl der zu verwendenden Primärionenquelle, sowie die Wahl zwischen monoatomaren oder Clusterionen. [73] Bei sehr hohen Signalintensitäten, ist der Detektor aufgrund seiner Totzeit nicht mehr in der Lage, das Messsignal in einzelne Ionen aufzulösen. Der lineare Zusammenhang zwischen Signalintensität und Anzahl an Ionen einer bestimmten Sorte ist dann nicht mehr gegeben, was eine quantitative Interpretation der Daten verhindert. Dies wurde in den im Folgenden betrachteten Datensätzen durch die Auswahl von Sekundärionen mit geeigneter Intensität, sowie einer Poisson-Korrektur verhindert. [74] [75]

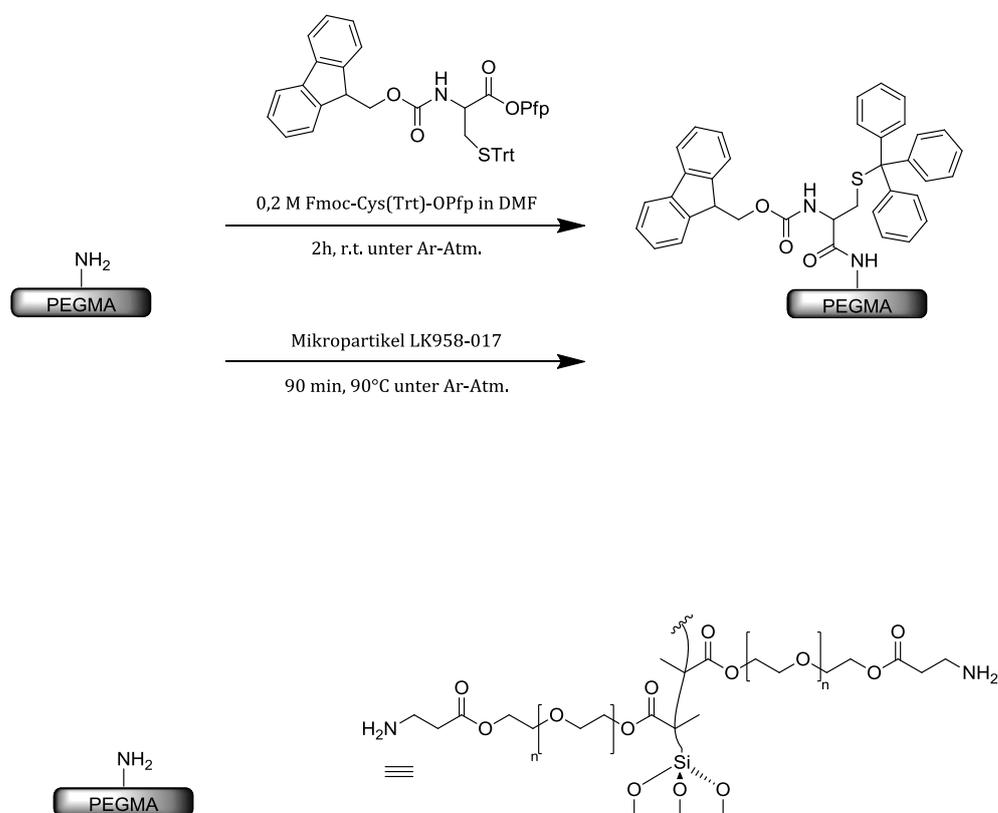
Mit Hilfe des Sprühtrockners wurde eine Partikelcharge mit eingebettetem Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Ester hergestellt und charakterisiert (Tabelle 17). Die Wahl des für diese Untersuchungen verwendeten Aktivesters fiel auf das entsprechende Cystein Derivat, da mit der schwefelhaltigen Seitenkette dieser Aminosäure ein gut detektierbares Heteroatom in den Polymerfilm der Syntheseoberfläche eingeführt wurde.

Gegen ein entsprechend fluoriertes Aminosäurederivat als Marker-Molekül sprach, dass Fluor - Verunreinigung an der Oberfläche durch Vakuumfett, wie es bei UHV-Apparaturen verwendet wird, einführbar gewesen wäre. Fluoridionen sind sehr stabil und haben eine Ionisierungswahrscheinlichkeit von beinahe 100 %. Für die absolute Quantifizierung durch massenspektrometrische Analyse ist ein generelles Problem, dass sich neben der Häufigkeit des zu detektierenden Ions in der Probenzusammensetzung, die Ionisierungswahrscheinlichkeit und Ionenstabilität ebenfalls stark auf die entsprechende Signalintensität auswirken. [72] Deshalb können selbst kleine Verunreinigungen auf der Oberfläche einen großen Einfluss auf das Messergebnis haben. [76]

Komponenten	Charge LK958-017	Größenverteilung			HPLC		
		d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	Ret.	Fläche	
Fmoc-Cys(Trt)- OPfp [751,56]	n	1,0 mmol	0,765 µm	3,377 µm	6,440 µm	34,9 min	498,5 FE
	Masse	1,0 g					
	% (w/w/w)	10,0 %					
S-LEC-P LT 75 52	Masse	8,8 g					
	% (w/w/w)	88,0 %					
Graphit	Masse	0,2 g					
	% (w/w/w)	2,0 %					

Tabelle 17: Zusammensetzung und Charakterisierung der sprühgetrockneten Partikelcharge LK 958-017

Ein Silizium-Wafer wurde mit einem 100 % PEGMA Polymerfilm und drei β -Alaninen funktionalisiert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe von der Oberfläche wurde der Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Ester auf zwei jeweils gleichgroße Fragmente der Syntheseoberfläche gekuppelt. Die Kupplung erfolgte einmal aus Lösung und einmal partikelbasiert. Beide Proben wurden anschließend mit TOF-SIMS vermessen. Die Probenherstellung sowie die Zusammensetzung der Syntheseoberfläche wurden in Abbildung 39 schematisch dargestellt.



mit $n = 3$ bis 5

Abbildung 39: Schematische Darstellung der Probenherstellung für das TOF-SIMS Experiment. Die Kupplung des Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Esters an die Oberfläche des 100 % PEGMA-(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ erfolgte aus Lösung (oben) und partikelbasiert (unten).

Zur Erstellung von TOF-SIMS Tiefenprofilen wurde die Probenoberfläche in einer ersten Versuchsreihe mit Cs-Ionen (0,5keV) gesputtert. Die Sekundär Ionen konnten bei negativer Polarität detektiert werden, um die S-Ionen tiefenaufgelöst nachzuweisen. Die massenkorrelierten Signale einiger typischer Fragmente einer Referenzmessung der 100 % PEGMA-(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ Oberfläche wurden in Abbildung 40 dargestellt. Der Anstieg der Intensitäten für die Si $^+$ und Si $_2^+$ korrelierten Signale zeigte, bei welcher Sputterzeit der Polymerfilm auf der Synthesoberfläche abgetragen und der blanke Siliziumwafer erreicht wurde. Wie erwartet, fielen ab diesem Zeitpunkt alle anderen Signale rapide ab.

Bei der grünen Kurve (Abbildung 40) handelte es sich um das dem Br $^-$ Ion zugeordnete Signal. Dieses hatte seinen Ursprung in der Synthese des Polymerfilms am Syntheseträger, der mittels ATRP auf den Siliziumwafer aufgebracht wurde. Das lokale Maximum bei niedriger Sputterzeit gab den Reaktionsmechanismus der ATRP wieder. Ein an der Oberfläche gebundenes Isobutyrylbromid diente der Polymerisationsreaktion als Startermolekül. Das Bromid „wuchs“ mit zunehmender Schichtdicke aus dem Polymerfilm heraus. Das orangefarbene Signal repräsentierte das CNO $^-$ Fragment, das seinen Ursprung im mit β -Alanin funktionalisierten Synthesefilm hatte, während der schwarze Graph dem S $^-$ Ion zuzuordnen war.

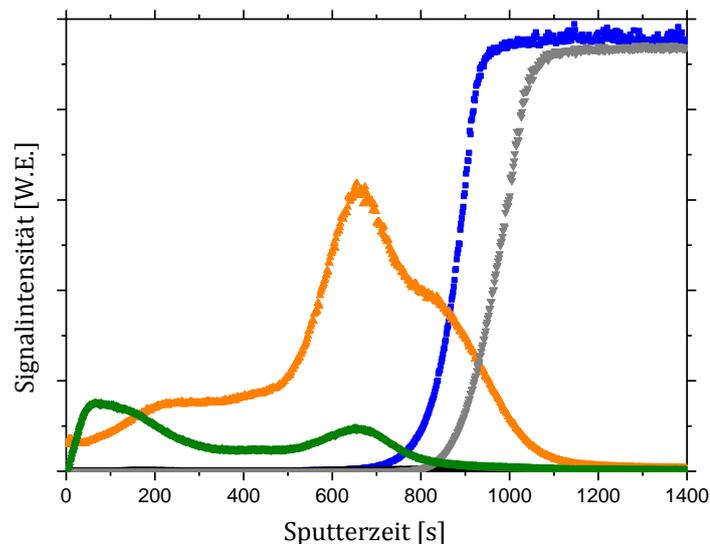


Abbildung 40: Poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ funktionalisierten Siliziumwafers.

Die in Abbildung 41 dargestellten Daten konnten unter gleichen Messbedingungen ermittelt werden. Bei der Probe handelte es sich ebenfalls um eine 100 % PEGMA-(β -Ala)₃-NH₂ Oberfläche. Allerdings wurde diesmal der Fmoc- und Trityl- geschützte Cystein-OPfp Ester partikelbasiert gekuppelt. Das schwarze Signal korrelierte mit dem Auftreten des S⁻ Ions und zeigte, zunächst qualitativ, dass der Aktivester in den Film hinein gekuppelt wurde. Bei dieser Probe konnte der gleiche Verlauf im Br⁻ korrelierten Signal wie bei der in Abbildung 40 dargestellten Referenzmessung der unbehandelten Syntheseoberfläche beobachtet werden.

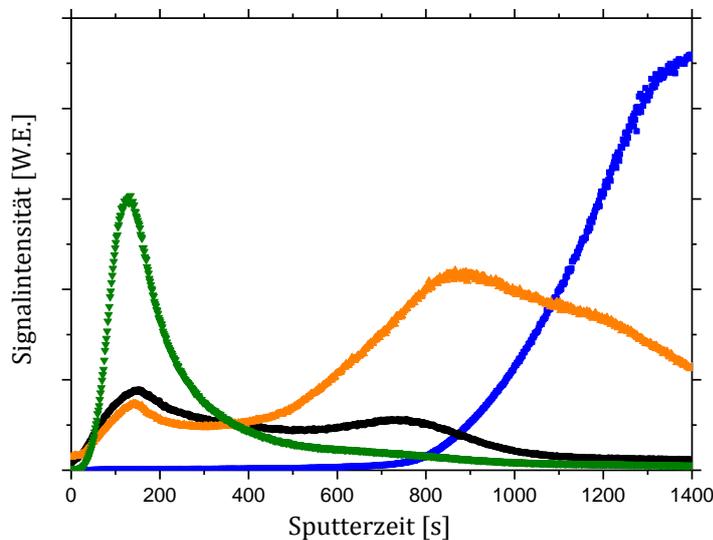


Abbildung 41: Poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofils eines mit 100% PEGMA(β -Ala)₃-NH₂ funktionalisierten Siliziumwafers nach der partikelbasierten Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp.

Bei beiden Messungen war kurz vor dem Anstieg des jeweiligen Si⁻ Signals ein lokales Maximum bei fast allen anderen Massensignalen zu beobachten. Dieses lokale Maximum wurde durch den Primärionenbeschuss der Oberfläche mit Cs Ionen verursacht. Dieser führte durch Rückstoßimplantation dazu, dass oberflächennahe Teilchen in tiefere Oberflächenbereiche befördert wurden. Eine angestrebte quantitative Aussage über die Kupplungstiefe des Aktivesters in den Polymerfilm würde hierdurch verfälscht werden.

Um Implantationseffekte bei weiteren Messungen zu vermeiden, sollten nun anstelle der kleinen und somit leicht in tiefere Schichten der Oberfläche implantierbaren S_2^- -Elementarionen, Molekülonen wie z.B. das CH_3^+ -Ion aus der Seitenkette des Cysteins betrachtet werden. Damit diese Molekülonen nicht bereits während des Sputterprozesses in tiefer gelegenen Oberflächenregionen zerstört wurden, wurde zum Sputtern auf eine C_{60} -Molekülonen-Quelle gewechselt. Die sekundären Molekülonen wurden bei den folgenden Experimenten in positiver Polarität detektiert.

C_{60} -Ionen sind größer als Cs-Ionen wodurch das Sputtern für tiefergelegene Oberflächenregionen schonender verlief. [73] Die erfolgreiche Untersuchung von Peptidfilmen durch das Erstellen von TOF-SIMS-Tiefenprofilen, mittels Sputtern mit C_{60} Molekülonen wurde bereits in der Literatur beschrieben. [77]

Den Rohdatensätzen war zu entnehmen, dass der Verlauf der gemessenen Gesamtionenanzahl (Total Ion-Counts) bei gleichen experimentellen Bedingungen von Messung zu Messung zum Teil starken Schwankungen unterlag. Um trotzdem vergleichende Aussagen treffen zu können, wurden die Poisson-korrigierten Messsignale auf den Verlauf der gemessenen Gesamtionenanzahl der jeweiligen Messung normiert.

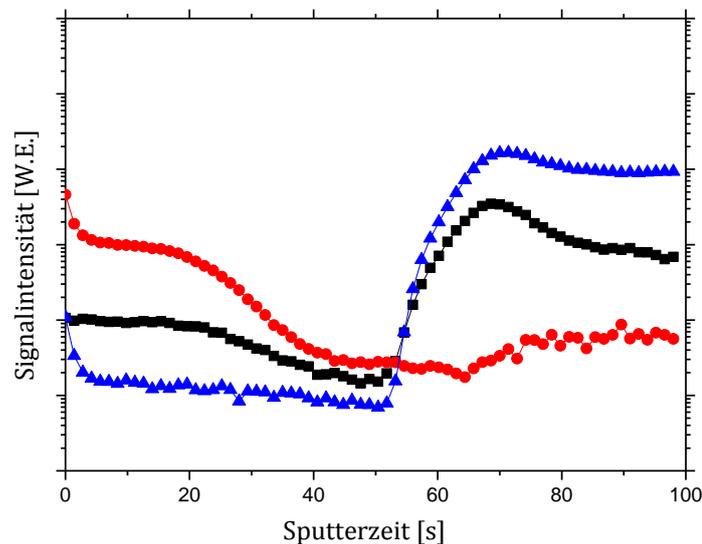


Abbildung 42: Auf die Gesamtionenanzahl normierte, poisson-korrigierte Messsignale des dynamisches TOF-SIMS Tiefenprofil eines mit 100% PEGMA(β -Ala)₃-NH₂ funktionalisierten Siliziumwafers nach der partikelbasierten Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp. Das Si⁺ korrelierte Signal ist blau, das CH₃⁺ bzw. SiOH⁺ zuzuordnende Signal schwarz und das C₁₉H₁₅⁺ korrelierte Signal rot dargestellt.

Die schwarze Kurve (Abbildung 42) konnte sowohl dem Cystein Seitenkettenfragment CH_3S^+ als auch gleichzeitig SiOH^+ , einem Sekundär Ion aus dem Siliziumwafer, zugeordnet werden. Das Signal fiel mit zunehmender Sputterzeit ab, und stieg beim Erreichen des Siliziumwafers mit dem Si^+ korrelierten Signal (Abbildung 42, blaue Kurve) erneut an. Obwohl dieses Ergebnis den Erwartungen entsprach, war es aufgrund der Massenüberschneidung zweier detektierter Moleküle für eine quantitative Untersuchung der Kupplungstiefe des Cystein-Derivats ratsam auf ein Molekülfragment auszuweichen, das einzig dem Cystein zuzuordnen war. Trotzdem stellte dieses Ergebnis eine hervorragende Kreuzkontrolle für die Abschätzung des Tiefenprofils der Kupplung dar.

Das Fragment Ion der Trityl-Schutzgruppe ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}^+$) der Cystein Seitenkette konnte ebenfalls in der Tiefe des Polymerfilms des Syntheseträgers ausgemacht werden (Abbildung 42, rote Kurve). Der Signalverlauf stimmte mit dem des Cystein Seitenkettenfragments überein. Implantationseffekte wurden bei den hier betrachteten Signalen unter den verwendeten Messparametern (vgl. Abschnitt 5.2.) nicht beobachtet.

Für eine quantitative Aussage bezüglich der Kupplungstiefe des Aktivesters im Polymerfilm des Syntheseträgers, musste die Sputterzeitskala der in Abbildung 41 – 43 dargestellten Ergebnisse in eine Längenskalisierung überführt werden. Da bei konstanten Sputterparametern, beim Übergang zwischen zwei Materialien unterschiedlicher Härte - in diesem Fall Polymerfilm und Siliziumwafer – die Linearität zwischen Sputterzeit und abgetragener Materialmenge verloren geht, war die Längenskalisierung nicht anhand der bekannten Sputterrate und Sputterzeit errechenbar. Das Experiment musste wiederholt und der Sputtervorgang vor Erreichen des Siliziumwafers abgebrochen werden. Anschließend wurde die Tiefe des Sputterkraters mit Hilfe des Profilometers Bruker V220 Si der Bruker Cooperation (Billerica / MA / USA) ermittelt (Abbildung 43).

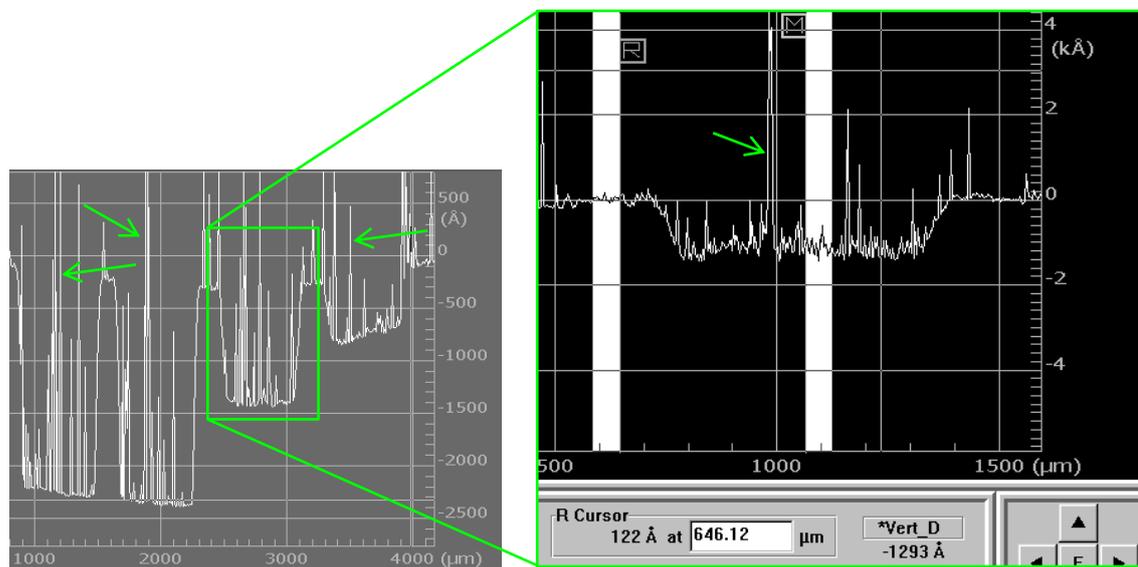


Abbildung 43: Profilometermessungen der TOF-SIMS Sputterkrater. Während die beiden linken Krater bis in den Siliziumwafer hineinreichten, wurde der Sputterprozess bei den beiden rechten Kratern früher unterbrochen. Die zum Teil sehr hohen Peaks stammten von Verunreinigungen der Probenoberfläche durch Adsorbate aus der Umgebungsluft.

Die zum Teil starken Interferenzen, die bei der Profilometermessung auftraten (Abbildung 43, grüne Pfeile) wurden von Feinstaubpartikeln, die aus der Umgebungsluft auf der Probenoberfläche adsorbiert wurden, hervorgerufen. Anhand der gemessenen Tiefe des Kraters (Abbildung 43, grüne Markierung) und der bekannten Sputterzeit konnte nun die Kupplungstiefe des Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Esters im Polymerfilm, in nm, errechnet werden.

Diese Längenskalierung besaß allerdings nur innerhalb des Polymerfilms Gültigkeit. Die Gesamtdicke des Polymerfilms lag bei ca. 230 nm.

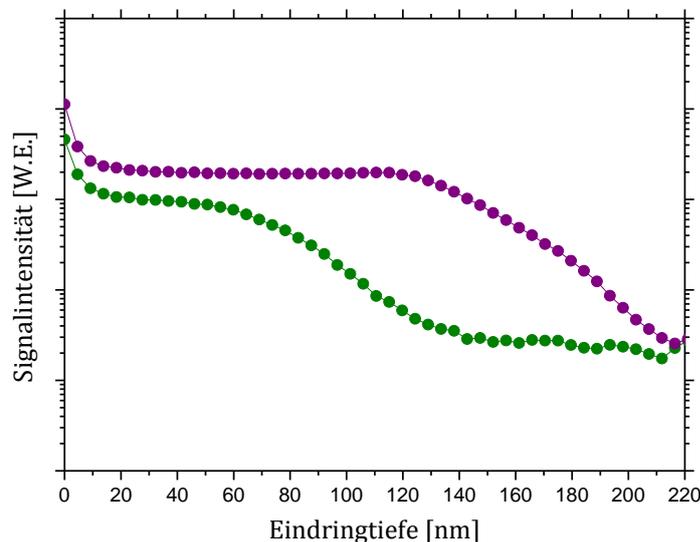


Abbildung 44: Auf die Gesamtionenzahl normierte, poisson-korrigierte Messsignale des dynamischen TOF-SIMS Tiefenprofil eines mit 100% PEGMA(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ funktionalisierten Siliziumwafers nach der Kupplung von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp aus Lsg. (lila Kurve) im Vergleich zur partikelbasierten Kupplung (grüne Kurve).

Abbildung 44 zeigt das Poisson-korrigierte, auf den Verlauf der Gesamtionenzahl normierte, Trityl- korrelierte Signal im 100 % PEGMA(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ - Synthesefilm für die Kupplung aus Lösung (lila Kurve) und die partikelbasierte Anbindung des Aktivesters (grüne Kurve).

Der Kurvenverlauf über die ersten 10 nm wurde durch die vom Sputtern bedingte Oberflächenzerstörung beeinflusst und war wenig aussagekräftig. Ab einer Filmtiefe von 10 nm erreichte das Verhältnis von detektierter Schicht und vorauslaufender durch Sputtern bedingter Oberflächenzerstörung eine Sättigung, wodurch die Werte verlässlich wurden. Die Ausbeute bei der partikelbasierten Anbindung des Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Ester nahm bei 60 bis 70 nm Filmtiefe schnell ab, während die Kupplungseffizienz aus Lösung bis zu einer Filmtiefe von 120-130 nm konstant verlief.

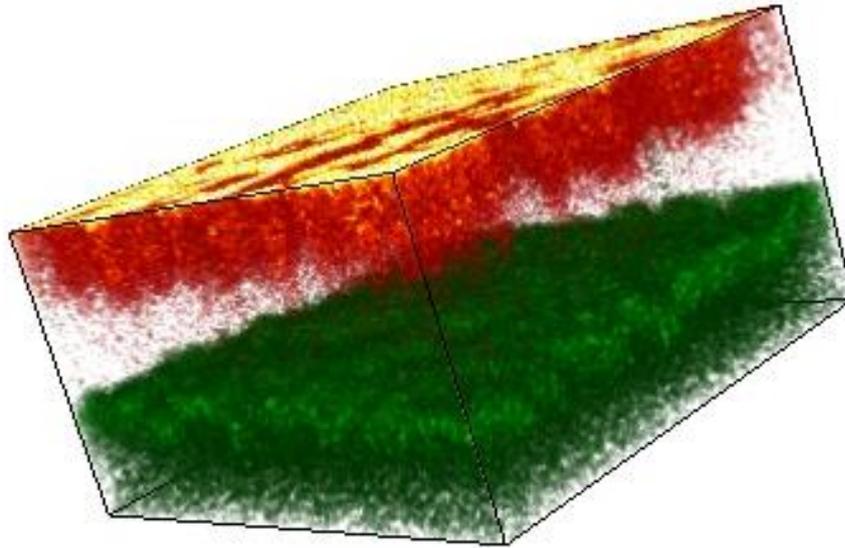


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Verteilung des $C_{19}H_{15}^+$ sowie des $SiOH^+$ korrelierten Signals nach der partikelbasierten Kupplung des Fmoc-Cys(Trt)-OPfp anhand eines 3D-Rendering-Modells.

Das Rendering Modell (Abbildung 45) vermittelte einen dreidimensionalen Eindruck über die Kupplungstiefe im Polymerfilm über eine $300 \times 300 \mu m^2$ große Fläche. Der Bereich zwischen der grün dargestellten Silizium-Wafer Oberfläche und der Oberfläche der rot / gelb dargestellten Verteilung des Trityl- korrelierten Signals entsprach dem Polymerfilm des Syntheseträgers. Da, wie bereits erwähnt, zwischen Materialien unterschiedlicher Härte keine Linearität zwischen Sputterzeit und Menge an abgetragenem Material besteht wurde bei dieser Darstellung auf eine Längenskalierung verzichtet.

Auffällig war die Struktur in der Verteilung des Trityl- korrelierten Signals über die $300 \times 300 \mu m^2$ große, untersuchte Fläche. Die Inhomogenitäten in der Verteilung wurden von hydrophoben Eigenschaften des Partikelmatrixmaterials verursacht. Beim Verflüssigen des Materials unter Kupplungsbedingungen bildete sich aufgrund der Hydrophobizität des Reaktionsmediums ein kleiner Kontaktwinkel zur Oberfläche aus. Dieses Verhalten ist in Bezug auf die Synthese eines hochdichten Peptidarrays wichtig, da hierdurch ein

Zusammenfließen benachbarter Spots vermieden wird. Die poröse Partikelpackung (vgl. Abbildung 36) führte besonders bei einer flächigen partikelbasierten Kupplung über mehrere $100 \mu\text{m}^2$ dazu, dass die Benetzung der Oberfläche relativ inhomogen ausfiel (Abbildung 46), da sich das verflüssigte Polymer zu einzelnen Inseln zusammenschloss.

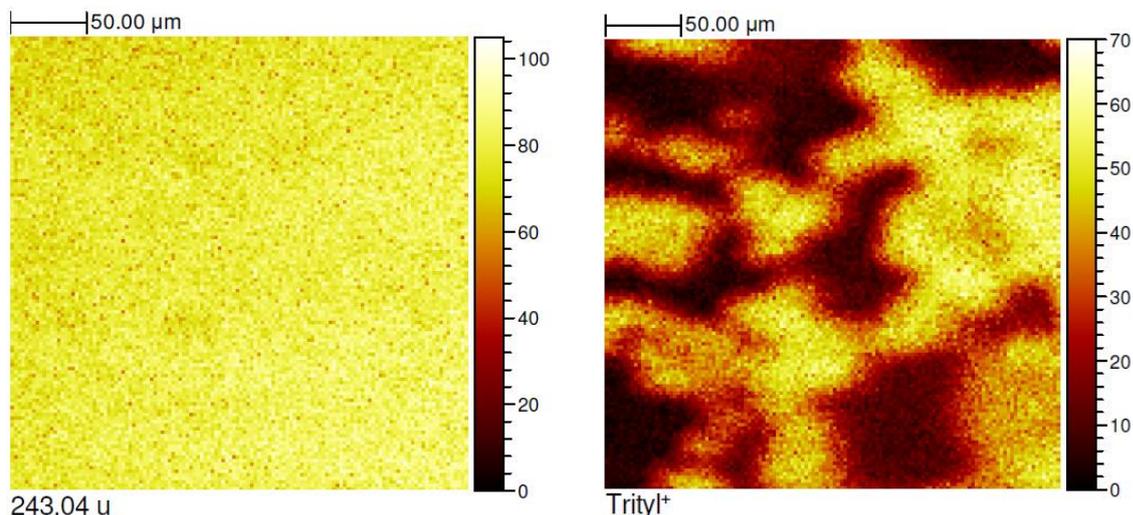


Abbildung 46: Heatmap der Trityl-Signalverteilung über die $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ große mit TOF-SIMS untersuchte 100 % PEGMA(β -Ala) $_3$ -NH $_2$ -Oberfläche nach der Fmoc-Cys(Trt)-OPfp Kupplung aus Lösung (links) und aus Partikel (rechts).

Zusammenfassend konnte an dieser Stelle festgehalten werden, dass die Ergebnisse aus der Kupplungsreihe von mit Fmoc-Gly-OPfp beladenen Mikropartikeln darauf hinwiesen, dass das viskose Reaktionsmedium bei der partikelbasierten Kupplung die Diffusion der eingebetteten Aktivester zur Oberfläche beeinträchtigte und somit die Reaktionsausbeute beeinflusste. Sowohl eine Verlängerung der Reaktionszeit als auch eine nicht zu empfehlende Erhöhung der Reaktionstemperatur konnten dem entgegenwirken. Bei Aminosäureaktivestern, wie Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp, die zu Nebenreaktionen neigen, erwies sich die Mikropartikelherstellung durch das Mahlverfahren als schonendere Variante, deren Partikel zu höheren Kupplungsausbeuten führte. Um eine möglichst quantitative Umsetzung der an der Oberfläche angebotenen Aminofunktionen zu gewährleisten bietet sich eine wiederholte partikelbasierte Kupplung des jeweiligen Aktivesters an. Die aus den verschiedenen Herstellungsverfahren resultierenden Partikelmorphologien beeinflussten die Reaktionsausbeuten entsprechend der beim Deponieren und Verdichten erzeugten porösen Packungen auf der Synthesoberfläche. Das TOF-SIMS Experiment zeigte, dass poröse Partikelschichten aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen

Oberfläche und verflüssigtem Partikelmatrixmaterial eine schlechtere Benetzung des Syntheseträgers herbeiführen. Vorsichtiges Verdichten der deponierten Partikelschicht stellte eine Möglichkeit dar dieses Problem zu verringern. Eine Mehrfachbeschichtung der Oberfläche und eine entsprechende Wiederholung der partikelbasierten Kupplung ist eine andere Möglichkeit dem Effekt einer ungenügenden Oberflächenbedeckung entgegen zu wirken. Besonders der Vergleich der Eindringtiefe des aus Lösung bzw. partikelbasiert gekoppelten Fmoc-Cys(Trt)-OPfp in den Synthesefilm auf der Waferoberfläche lieferte wichtige Erkenntnisse für die Anwendung. Da der Gehalt des partikelbasiert gekoppelten Cystein-Derivats ab einer Filmtiefe von 60 nm abfiel, ist die Synthese dickerer Polymerfilme unnötig. Dies spart Reaktionszeit in der Oberflächenpräparierung und somit Ressourcen.

3.5. Das Einbringen spezieller Bausteine in die Partikelmatrix

Neben den Fmoc- und Seitenketten-geschützten Aminosäureaktivestern sollten auch Bausteine für spezielle Applikationen, die mit den Bedingungen der partikelbasierten SPPS kompatibel sind, durch Einbetten in die polymere Partikelmatrix für diese Anwendung zugänglich zu machen sein. Um dies zu verifizieren, wurden die in diesem Kapitel geschilderten Versuche durchgeführt.

3.5.a) Biotin-OPfp Ester

Dieser spezielle Baustein ist zum einen für Fluoreszenznachweise mit den entsprechenden Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff Konjugaten, zum anderen für die *in situ* Aufreinigung von Peptiden im Arrayformat von Interesse.

Zu Versuchszwecken wurde je eine Partikelcharge mit dem Sprühtrockner und mittels des Mahlverfahrens hergestellt. Die Zusammensetzung und die resultierende Größenverteilung der beiden Partikelchargen wurden in Tabelle 18 zusammengefasst.

Komponenten	Ansatz	Größenverteilung			Herstellungsmethode
		d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	
Biotin-OPfp [410,36]	n	2,4 mmol	0,8 µm	3,5 µm	6,7 µm
	Masse	1,0 g			
	% (w/w/w)	10,0 %			
S-LEC-P LT 75 52	Masse	8,8 g	1,2 µm	4,9 µm	9,5 µm
	% (w/w/w)	88,0 %			
Graphit	Masse	0,2 g			
	% (w/w/w)	2,0 %			

Tabelle 18: Zusammensetzung und Größenverteilung der mit Biotin-OPfp beladenen Mikropartikelchargen.

Beide Partikelchargen kamen bereits in den in Kapitel 3.4.b) diskutierten Versuchen zur Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit der Partikel unterschiedlich hergestellter Chargen zur Anwendung.

Die Integrität des eingebetteten Biotin Aktivesters konnte durch ein Kupplungsexperiment an eine Syntheseoberfläche mit anschließendem Anfärben durch ein Streptavidin-Farbstoff Konjugat sichergestellt werden.

Sowohl die mittels des Mahlverfahrens hergestellten, als auch die sprühgetrockneten Biotin-OPfp beladenen Mikropartikel dienten in Proof of Principal Experimenten zur Verifizierung des laserbasierten Ansmelz-Verfahrens und einiger Varianten dieser Methode zur kombinatorischen partikelbasierten SPPS.

Abbildung 47 zeigt ein Portrait von Charles Darwin. Dieses wurde mit Hilfe der mit dem Mahlverfahren hergestellten Biotin-OPfp beladenen Mikropartikel durch das laserbasierte Ansmelz-Verfahren auf zwei verschiedenen funktionalisierten Glasobjektträger Oberflächen erzeugt. Genaue Details zur Beschichtung der Oberfläche mit den Mikropartikeln sowie zur laserbasierten Strukturierung der abgelagerten Partikelschichten sind den Arbeiten von Sebastian Schillo ^[71] und Frieder Märkle ^[53] zu entnehmen.

Nachdem die Partikelschicht durch den Laser (Wellenlänge: 810 nm, Laserleistung: 10 mW, Pulsdauer: 10 ms, Laserfokus-Durchmesser: 7,5 μm) strukturiert wurde, wurden überschüssige Partikel entfernt und die partikelbasierte Kupplungsreaktion bei 90 °C für 90 min unter Argon-Atmosphäre durchgeführt (vgl. Abbildung 13). Das so erzeugte Biotin-Muster auf den Syntheseträgern konnte dann mit Streptavidin-Alexa Fluor 546 Konjugat angefärbt und mit dem Genepix 4000B Fluoreszenzscanner der Firma Axon Instruments (Sunnyvale / CA / USA) ausgewertet werden. ^[53]

Das fertige Portrait aus kovalent an die jeweilige Oberfläche gekuppelten Biotin-Molekülen bestand aus 160.000 Spots auf einer Fläche von 20 \times 20 mm². Hiermit wurde durch das laserbasierte Ansmelz-Verfahren eine Spotdichte von 40.000 Spots / cm² erzeugt.

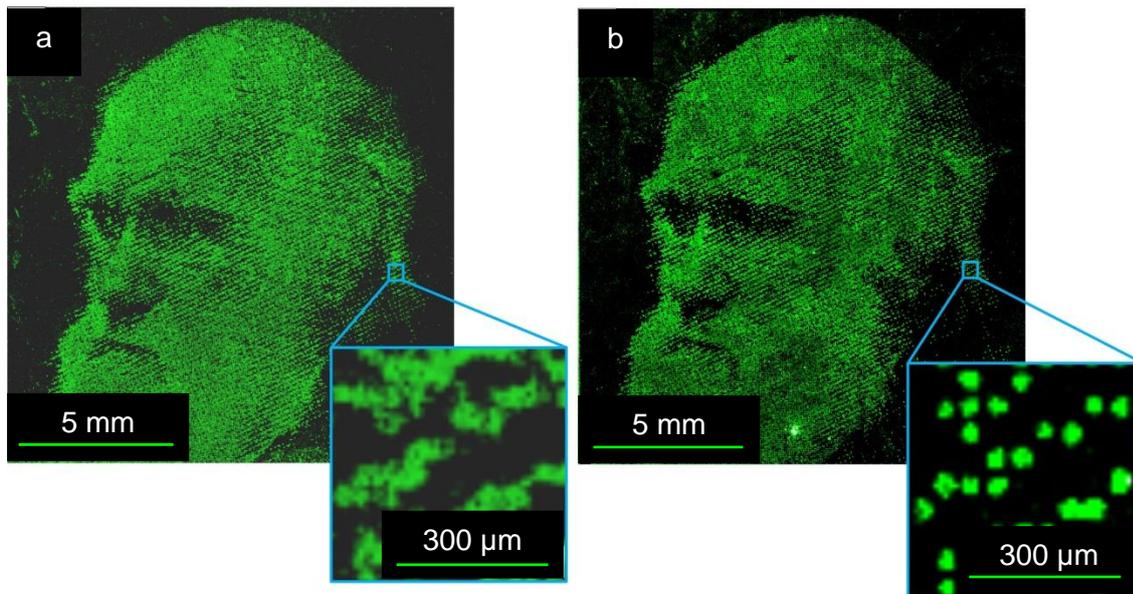


Abbildung 47: Fluoreszenzscan von mit dem laserbasierten Anschmelzverfahren strukturierten, mit Biotin-OPfp beladenen, mit dem Mahlverfahren hergestellten Mikropartikeln auf zwei unterschiedlich funktionalisierten Glasträgern. Die Auflösung des mit dem Genepix 4000B aufgenommenen Fluoreszenzscans betrug $5 \mu\text{m}/\text{Pixel}$, die Anregungswellenlänge lag bei 532 nm . Das Portrait von Charles Darwin wurde auf einem mit $10 / 90 \text{ PEGMA-co-PMMA}(\beta\text{-Ala})_1\text{-NH}_2$ -funktionalisierten Glasobjektträger (a) und auf einer mit einer 3-GPS-Monolage beschichteten und mit 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecane (DATT) funktionalisierten Mikroskop Objektträgeroberfläche (b) erzeugt. Es handelte sich um $40.000 \text{ Spots} / \text{cm}^2$.^[53]

Ein Vergleich der Spotqualität zwischen den beiden Portraits fiel zugunsten des Biotin-Arrays auf dem mit der Monolage funktionalisierten Glasträger aus. Aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Biotin-OPfp beladenen Mikropartikeln und der $10/90 \text{ PEGMA-co-PMMA}$ -Oberfläche, verlief das Entfernen überschüssiger Mikropartikel nach der Strukturierung nicht vollständig, wodurch die Spots im linken Portrait weniger gut voneinander abgegrenzt waren. Es stellte sich heraus, dass der Einsatz eines Ultraschallbads zum Entfernen überschüssiger Partikel die Kontamination durch Restpartikel auf mit Polymer funktionalisierten Oberflächen verringerte.^[53]

In einem weiteren Versuch wurden mit dem Mahlverfahren hergestellte, mit Biotin-OPfp Fmoc-Gly-OPfp, sowie Fmoc-Ala-OPfp beladene Mikropartikel verwendet und der Nachweis erbracht, dass das in Abbildung 13 schematisch dargestellte laserbasierte Anschmelz-Verfahren, zur Herstellung von Peptidarrays verwendet werden kann. Die prozentuale Zusammensetzung (w/w) der Fmoc-Gly-OPfp und Fmoc-Ala-OPfp beladenen Mikropartikelchargen entsprachen der, der Biotin-OPfp-Mikropartikel (vgl. Tabelle 18).

Bei den unterschiedlich gefärbten Spots des in Abbildung 48 illustrierten Dipeptidarrays, handelte es sich um die Dipeptid-Sequenzen Ala-Gly (rote Spots) und Biotin-Gly (grüne Spots). Die Ala-Gly-Sequenzen wurden am *N*-Terminus durch Ankupplung eines DyLight-650-N-hydroxysuccinimid-Derivats (DL 650-NHS) gefärbt, während die Biotin-Gly-Sequenzen mit Streptavidin-DyLight 550 Konjugat (Strp-DL 550) markiert wurden. Für eine verlässliche partikelbasierte Synthese im Arrayformat war für die Ausrichtung des Schicht für Schicht zu synthetisierenden Peptidarrays ein optisches Positionierungssystem notwendig, um beim Strukturieren der zweiten Partikellage die Partikel am jeweils richtigen Spot zu fixieren. Generell folgte die Peptidarraysynthese dem in Abbildung 9 gezeigten Prinzip unter Anwendung der in Abbildung 13 dargestellten Methode. [53]

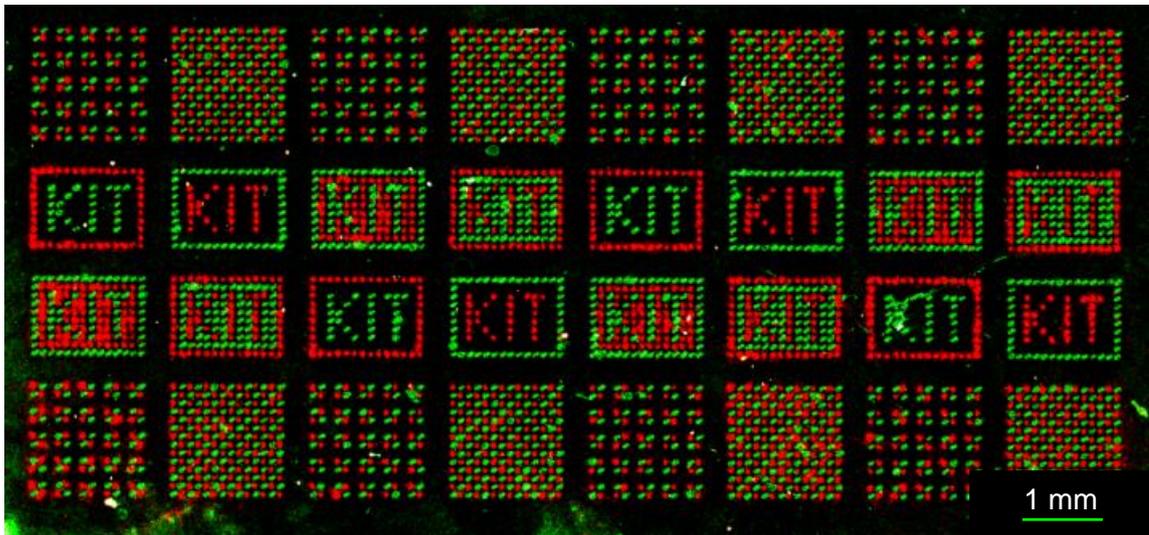


Abbildung 48: Fluoreszenzscan eines mit dem laserbasierten Anschmelzverfahren synthetisierten Dipeptidarrays. Die Auflösung des mit dem Genepix 4000B aufgenommenen Fluoreszenzscans beträgt 5 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$, die Anregungswellenlängen lagen je nach Fluoreszenzmarker bei 532 nm (Strp-DL 550) (grüne Spots) und 635 nm (DL 650-NHS) (rote Spots). Das Array wurde auf einen mit 10 / 90 PEGMA-co-PMMA(β -Ala)₁-NH₂-funktionalisierten Glasobjektträger durch das laserbasierte Anschmelz-Verfahren mit 10.000 Spots/cm² synthetisiert.

Der Mittelpunkt-Abstand zwischen zwei Spots des in Abbildung 48 gezeigten Arrays betrug 100 μm . Mit einer Modifikation des laserbasierten Anschmelz-Verfahrens, dem sogenannte kombinatorische Lasertransfer, wurde bewiesen, dass die partikelbasierte Synthese eines hochdichten Arrays mit einer Auflösung von 1.000.000 Spots/cm² realisierbar war. Dabei kamen mikrostrukturierte Trägeroberflächen und mit Biotin-OPfp

beladene Mikropartikel zum Einsatz. Die genauen Parameter des kombinatorischen Lasertransfers sowie die mit diesem Versuch verbundene Vorgehensweise ist der Arbeit von Frieder Märkle zu entnehmen. ^[53] Generell verfolgte dieser Ansatz die im Folgenden skizzierte Strategie. Die Mikrovertiefungen einer mit Gold besputterten Donoroberfläche wurden mit Partikel gefüllt. Ein mit 100 % PEGMA-(β -Alanin)₁-NH₂-funktionalisierter, ebenfalls mit Vertiefungen vorstrukturierter Syntheseträger wurde unter der Donoroberfläche platziert und ausgerichtet. Durch Laserbeschuss wurden Partikel aus den Vertiefungen des Donorträgers in die Vertiefungen des Syntheseträgers transferiert. Das Partikelmuster in den Vertiefungen des Syntheseträgers wurde unter den für die partikelbasierte SPPS im Arrayformat üblichen Bedingungen weiterprozessiert. ^[53]

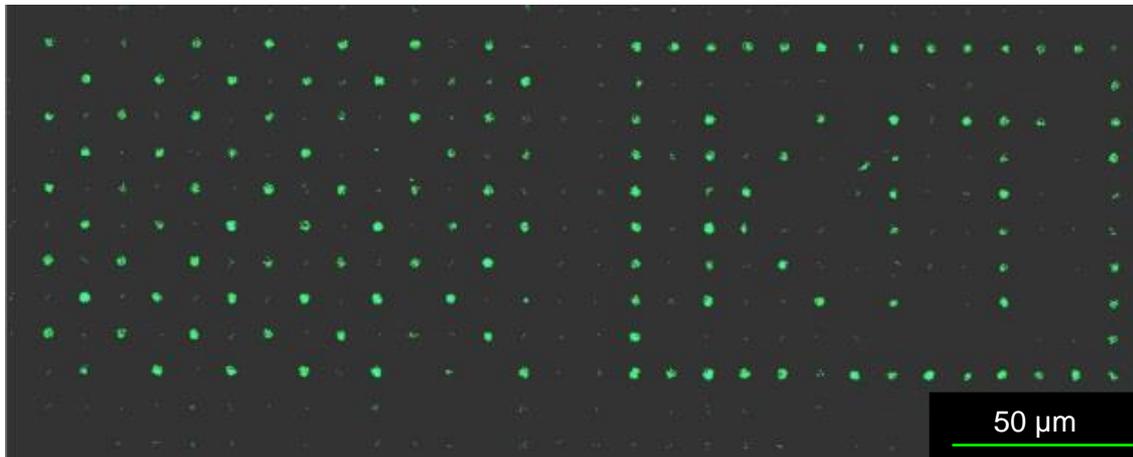


Abbildung 49: Mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops TCS SP5 der Firma Leica Mikrosysteme (Wetzlar / Deutschland) aufgenommenes Fluoreszenzbild. Die Biotin-OPfp beladenen, mit dem Sprühtrockner hergestellten Mikropartikel wurden mittels des kombinatorischen Lasertransfers auf einen strukturierten Syntheseträger transferiert und dort partikelbasiert kovalent an die Oberfläche gebunden. Die gekuppelten Biotinmoleküle wurden mit Streptavidin-Alexa Fluor 546 Konjugat angefärbt. Die Spotdichte der beiden Arrays betrug 1.000.000 Spots/cm². ^[53]

Das Ergebnis wurde als Fluoreszenzscan in Abbildung 49 dargestellt. Das Schachbrettmuster (Abbildung 49, links) und das KIT-Logo (Abbildung 49, rechts) wiesen einen Spotmittelpunkts-Abstand von 10 µm, einen Spotdurchmesser von 7 µm und eine Spotdichte von 1.000.000 Spots/cm² auf.

3.5.b) Fmoc-Cys(Acm)-OPfp

Um nach der partikelbasierten SPPS im Arrayformat ein Chromophor einzuführen, stehen mehrere denkbare Strategien zur Verfügung. Eine Vorgehensweise ist die Kupplung eines Aktivesterderivats des einzuführenden Chromophors über den nukleophilen *N*-Terminus der Fmoc-entschützten Peptide. Darüber hinaus ist eine Anbindung über die entschützten funktionellen Aminosäureseitenketten, wie beispielsweise die nukleophilen Gruppen von Cystein oder Lysin möglich. Diese und die meisten denkbaren Vorgehensweisen haben allerdings den Nachteil, dass ein Peptid statistisch betrachtet mehr als eine funktionelle Seitenkette hat, an die das einzuführende Chromophor binden würde. Damit ein Chromophor an einer definierten Position in eine Peptidsequenz eingeführt werden kann, ist ein Fmoc- geschützter OPfp-aktivierter Monomer-Baustein erforderlich, dessen funktionelle Seitenkette orthogonal zur Fmoc- / *t*Bu-Strategie entschützt werden kann.

Bei Fmoc-Cys(Acm)-OPfp handelt es sich um einen solchen Baustein. Die Acm - Schutzgruppe ^[78] ist stabil gegenüber sauren, basischen und reduktiven Entschützungsbedingungen. Sie findet in der SPPS kaum noch Verwendung, da sie durch Einsatz von Quecksilbersalzen entfernt wird und es darüber hinaus schwer ist die entstehenden Hg²⁺ Ionen aus dem fertig synthetisierten Peptid zu entfernen. ^[79] Behandelt man Cys(Acm) enthaltende Peptide mit Iod kann man inter- und intramolekulare oxidative Cyclisierungen durchführen. ^[80] Ein weiterer Aspekt, der den Fmoc-Cys(Acm)-OPfp Ester für die partikelbasierte SPPS im Arrayformat interessant macht. Für die SPPS auf Polymerbeads ist Cys(Acm) bereits auf die Orthogonalität der Seitenkettenschutzgruppe gegenüber der Fmoc- / *t*Bu Strategie untersucht worden. Die Vorgehensweise für die Konversion des Cys(Acm) in das Cys(Scm) Derivat ^[80] und die anschließende Reduktion der Disulfidbrücke mit DTT ist in Abbildung 50 skizziert. ^[79]

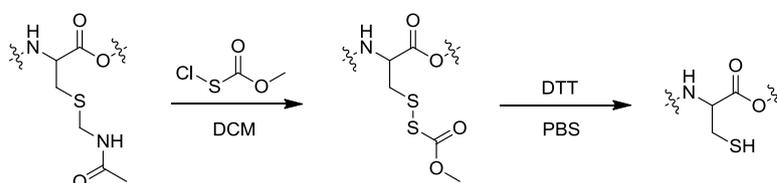


Abbildung 50: Konversion von Cys(Acm) in Cys(Scm) durch Methoxycarbonyl-sulfonylchlorid und anschließende Reduktion der Disulfidbrücke mit Dithiothreitol (DTT). ^[79]

Um die Kompatibilität dieses Aminosäurederivats mit der partikelbasierten SPPS im Arrayformat, sowie die Konvertierung der AcM- in die ScM- Schutzgruppe mit anschließender Entschützung auf der Synthesoberfläche zu untersuchen, wurde zunächst eine entsprechend beladene Mikropartikelcharge mit dem Sprühtrockner hergestellt.

Komponenten	Charge LK958-047	Größenverteilung			HPLC		
		d(0,1)	d(0,5)	d(0,9)	Ret.	Fläche	
Fmoc-Cys(AcM)- OPfp [580,53]	n	2,1 mmol	0,7 µm	3,6 µm	7,6 µm	11,1 min	393,9 FE
	Masse	1,2 g					
	% (w/w/w)	10,0 %					
S-LEC-P LT 75 52	Masse	8,8 g					
	% (w/w/w)	88,8 %					
Graphit	Masse	0,2 g					
	% (w/w/w)	2,0 %					

Tabelle 19: Zusammensetzung und Charakterisierung der mit Fmoc-Cys(AcM)-OPfp beladenen Mikropartikelcharge LK958-047.

Auf drei gleichgroßen, mit je 10 nm eines 100 % PEGMA-(β -Ala)-NH₂ funktionalisierten Glasobjektträger Fragmenten wurden je 25 mg Partikel der Charge LK958-047 deponiert und vorsichtig mit dem Spatel verdichtet. Nach der Kupplung des eingebetteten Aktivesters an die Oberfläche und den erforderlichen Waschschrritten wurden zwei der Oberflächen weiterbearbeitet.

Die für 15 min in einer Petrischale in DCM vorgequollenen Syntheseträger wurden in einer Lösung aus 65 µl Methoxycarbonyl-sulfonylchlorid (0,7 mmol) in 10 ml DCM für 3 h gerüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Oberfläche mit DCM gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Eine der beiden Proben wurden in PBS-T vorgequollen, für 30 min mit einer Lösung aus 111,6 mg DTT (0,7 mmol) in 10 ml PBS-T behandelt und anschließend mit PBS-T, entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) und EtOH gewaschen und getrocknet. Alle drei Glasobjektträger Fragmente wurden mittels XPS untersucht. Ein viertes, nichtprozessiertes, mit dem gleichen Synthesefilm funktionalisiertes Glasobjektträger Fragment diente für diese Vergleichsmessungen als Referenz.

In Abbildung 51 wurden die Ergebnisse der XPS-Vergleichsmessungen aufgeführt. Es handelte sich dabei um die Detailspektren der S2p-Signale im Bereich von 175 - 155 eV. [81] Die Referenzprobe wies keine Signale bei den für Schwefel charakteristischen Bindungsenergien auf und wurde daher nicht gezeigt.

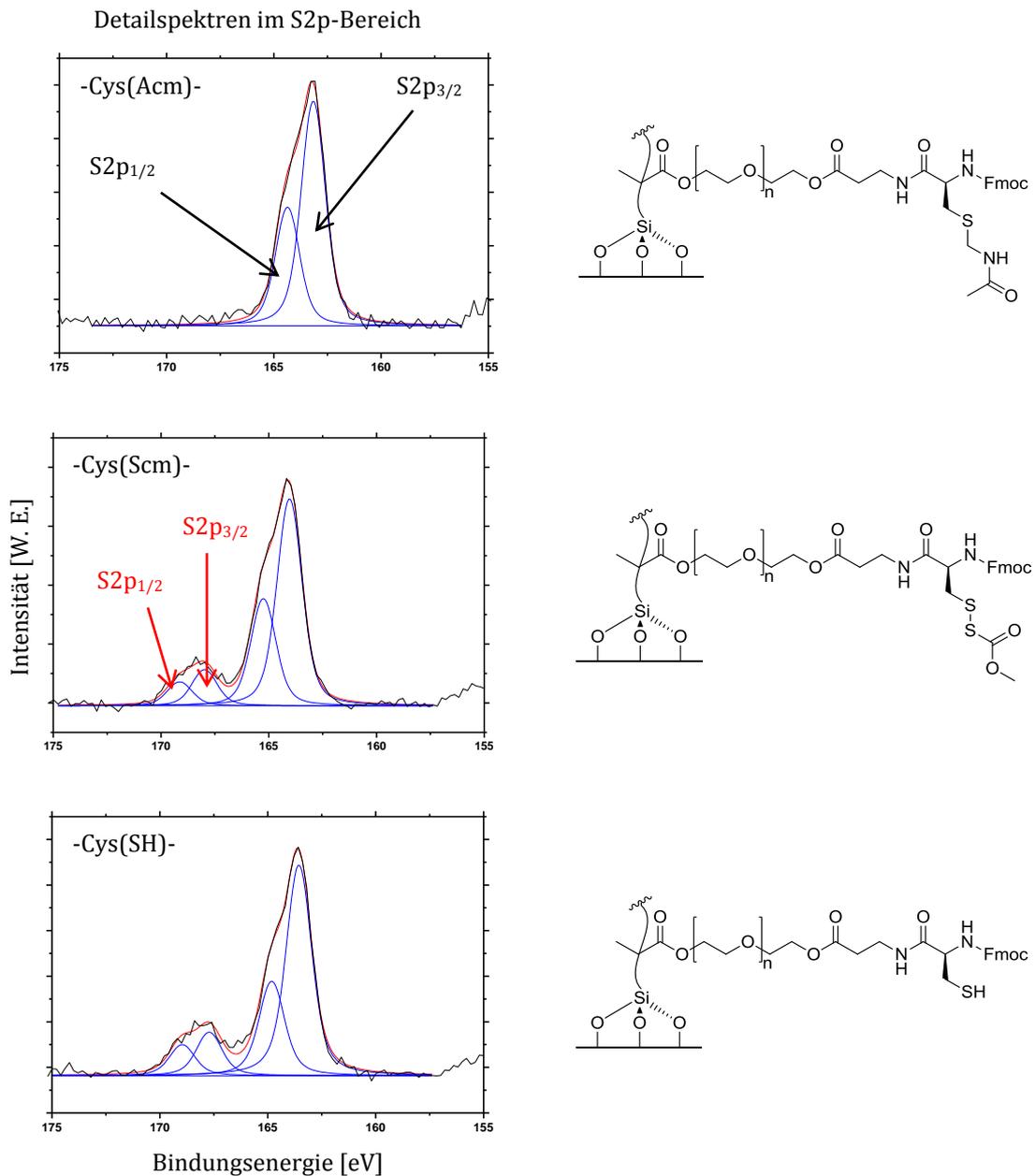


Abbildung 51: XPS Vergleichsmessung der partikelbasierten Kupplung des Fmoc-Cys(Acm)-OPfp an eine mit 100 % PEGMA-(β-Ala)-NH₂ funktionalisierte Objektträger-Oberfläche.

Bei den erhaltenen S2p Signalen handelte es sich um Dubletts mit einem Peakabstand von je 1,2 eV und einem Flächenverhältnis von 1 : 2 (bezogen auf das S2p_{1/2} korrelierte Signal).^[82] Da die Referenzprobe keine Signale im Bindungsenergiebereich von 175 – 155 eV aufwies, deutete die XPS-Messung der -Cys(Acm)- Probe auf die erfolgreiche partikelbasierte Kupplung des Cystein-Derivats hin.

Das mittlere und untere in Abbildung 51 dargestellte Spektrum enthielt je ein weiteres Dublett bei höherer Bindungsenergie (ca. 168,4 eV). Auch hier betrug der Abstand der Peaks des Dubletts 1,2 eV. Leichte Abweichungen im erwarteten Flächenverhältnis (1 : 2), der S2p_{1/2} zu den S2p_{3/2} korrelierten Signalen hatten ihre Ursache im durch die geringe Signalintensität erschwerten Fit der entsprechenden Voigt Profile aufgrund eines schlechter werdenden Signal zu Rausch Verhältnisses.

Es ist wahrscheinlich, dass die um 4 eV zu höheren Bindungsenergien verschobenen S2p-Signale aus im Film unspezifisch eingelagertem Methoxycarbonyl-sulfenylchlorid bzw. einem Nebenprodukt mit einer oxidierten Schwefelspezies stammten. Der Bindungsenergieunterschied war zu hoch als dass er auf die beiden unterschiedlich substituierten Schwefelatome der Disulfidbrücke der-Cys(Scm)- Probe zurückzuführen gewesen wäre.^[82] ^[83] Die beiden Schwefelspezies der Disulfidbrücke waren unter den Messbedingungen nicht in separate Signale auflösbar.

Der Schwefelgehalt in den einzelnen Proben konnte in Relation zum jeweiligen Kohlenstoffgehalt mittels XPS quantifiziert werden. Unter Berücksichtigung der für die Messung verwendeten Aluminiumanode ($K_{\alpha} = 1487$ eV) wurden die entsprechenden Wirkungsquerschnitte (σ)^[84] und Abschwächungslängen (λ)^[85] für die betrachteten Orbitale element- und probenspezifisch in Tabelle 15 aufgelistet.

V. Stadler konnte bei der Untersuchung alkyliischer Monolagen zeigen, dass für λ die folgende exponentielle Näherung am besten mit den experimentell ermittelten Daten in Einklang zu bringen war.^[86] Da die gezeigten XP-Spektren mit demselben XP-Spektrometer bzw. demselben Messaufbau gemessen wurden, wurde λ nach Formel 2 berechnet.

$$\lambda_A(E_A) = 0,59 e^{\left(\frac{594,26-E_A}{150,43}\right)} + 19,39$$

Formel 2: Berechnung von λ nach Stadler. Bei E_A handelt es sich um die Bindungsenergie des Photoelektrons. [86]

Probe	Orbital	I (in F.E.)	λ (in Å)	σ	f	Bindungsenergie (in eV)
Referenz	S2p	---	---	---	---	175-155
	C1s1/2	1210,9	24,0	1	24,0	284,6
	N1s	69,7	21,5	1,80	38,7	399,0
-Cys(Acm)-	S2p1/2	18,2	29,7	0,567	16,8	164,4
	S2p3/2	34,4	29,7	1,11	32,9	163,2
	C1s1/2	1159,1	24,0	1	24,0	284,6
	N1s	115,9	21,5	1,80	38,7	399,6
-Cys(Scm)-	S2p1/2	30,4	29,6	0,567	16,8	165,2
	S2p3/2	58,6	29,7	1,11	32,9	164,0
	S2p1/2	6,7	29,4	0,567	16,6	169,1
	S2p3/2	10,2	29,4	1,11	32,7	167,9
	C1s1/2	1128,1	24,0	1	24,0	284,6
	N1s	90,4	21,5	1,80	38,7	399,7
-Cys(SH)-	S2p1/2	18,4	29,6	0,567	16,8	164,8
	S2p3/2	40,8	29,7	1,11	32,9	163,6
	S2p1/2	6,0	29,4	0,567	16,6	168,9
	S2p3/2	8,5	29,4	1,11	32,7	167,7
	C1s1/2	1169,8	24,0	1	24,0	284,6
	N1s	95,3	21,5	1,80	38,7	399,6

Tabelle 20: Berechnete Abschwächungslängen (λ) und Wirkungsquerschnitte (σ) nach Scofield. [84] Der Faktor f entspricht dem Produkt aus Wirkungsquerschnitt und Abschwächungslänge.

Der Term, der die absolute Intensität I_A eines Photoelektronen-Peaks des Elements A beschreibt, hängt von vielen Parametern ab, ist komplex und nur schwer numerisch lösbar. [87] Eine vereinfachte Form dieses Terms ist in Formel 3 dargestellt. Es handelt sich um eine Näherung bei der unter Voraussetzung konstanter Messbedingungen und Betrachtung relativer Signalintensitäten, apparative Parameter entfallen und diverse Faktoren mit geringem Einfluss vernachlässigt werden. [43] [86]

$$I_A = \sigma_A N_A \lambda_A(E_A) T(E_A) \cos \theta [1 - e^{(-z)/\lambda_A(E_A) \cos \theta}]$$

Formel 3: Vereinfachter Term zur Berechnung der Signalintensität. $T(E_A)$ ist die Transmissionswellenfunktion, die die Detektionswahrscheinlichkeit von Photoelektronen unterschiedlicher kinetischer Energie berücksichtigt und für den Spektrometer experimentell ermittelt werden muss. [43] [86]

Unter der Annahme einer homogenen, statistischen Verteilung zweier betrachteter Elemente in der Probe, erhält man das folgende Intensitätsverhältnis. [86]

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{f_A N_A}{f_B N_B} \qquad \frac{N_A}{N_B} = \frac{f_B I_A}{f_A I_B}$$

Formel 4: Berechnung des Signalintensitäts- bzw. stöchiometrischen Verhältnisses zweier Elemente. N ist die Teilchendichte des betrachteten Elements. Der Faktor f ist das Produkt aus $\lambda \times \sigma$. [86]

Die Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses von Schwefel zu Kohlenstoff der vermessenen Proben nach Formel 4 lieferte die in Tabelle 21 aufgelisteten Daten. Zur Bestimmung des, durch die Anbindung und chemische Modifizierung des Cystein-Derivats, in die Probe eingebrachten Schwefelgehalts wurde für jede der drei Proben das S2p_{3/2} Signal der Dubletts bei niedrigerer Bindungsenergie (ca. 164 eV) herangezogen.

Probe	S / C-Verhältnis (bezogen auf das $Sp_{3/2}$ -Signal)	N / C-Verhältnis (bezogen auf das $N1s_{1/2}$ -Signal)
Referenz	---	0,036
-Cys(Acm)-	0,022	0,062
-Cys(Scm)-	0,038	0,050
-Cys(SH)-	0,025	0,050

Tabelle 21: S / C - Verhältnisse bzw. relativer Schwefelgehalt der mit XPS vermessenen Proben.

Der Schwefelgehalt nahm, wie erwartet, mit der Bildung der Disulfidbrücke bei der Überführung der Acm- in die Scm-Gruppe zu. Bei einer quantitativ verlaufenden Reaktion hätte sich der relative Schwefelanteil verdoppeln müssen. Dennoch sprachen die Daten dafür, dass die Reaktion mit einer Ausbeute von ca. 86 % erfolgreich verlaufen ist. Nach der Reduktion bzw. dem Entfernen der Scm-Gruppe mit DTT verringerte sich der relative Schwefelanteil in der Probe. Auch diese Reaktion verlief, wenn auch nicht quantitativ, mit 81 % Ausbeute, erfolgreich.

Einen weiteren Indikator für den Reaktionsverlauf, vom partikelbasierten Ankuppeln des Cystein-Derivats an den 100 % PEGMA-(β -Ala)₁-NH₂ funktionalisierten Glasobjektträger bis hin zum Entfernen der Scm-Gruppe, stellte die Änderung des relativen Stickstoffgehalts der einzelnen Proben dar.

Bei einer quantitativen Reaktion wäre eine dreifache Erhöhung des Stickstoffgehalts der Proben zu erwarten gewesen. Diesbezüglich verlief die partikelbasierte Ankupplung des Fmoc-Cys(Acm)-OPfp mit 57 % Ausbeute. Eine vollständige Umwandlung der Acm- in die Scm-Gruppe hätte den Verlust eines Drittels des Stickstoffs in der Probenzusammensetzung bedeutet. Das N / C-Verhältnis hätte auf 0,041 reduziert werden müssen. Das gemessene N / C-Verhältnis ließ den Schluss zu, dass die Umwandlung der Seitenkettenschutzgruppe mit einer Ausbeute von 57 % verlaufen war. Der Unterschied zur über das Schwefelsignal ermittelten Umwandlungseffizienz wurde wahrscheinlich durch unspezifische Einlagerung des bei der Konversion des Acm- in die Scm-Gruppe entstehenden, stickstoffhaltigen Nebenprodukts verursacht. Durch unspezifische Adsorption oder sogar kovalente Anknüpfung im Polymerfilm verursachte dieses Nebenprodukt ein höheres N / C-Verhältnis in der Probe als zu erwarten gewesen war und ließ dadurch die chemische Umwandlung der Acm-Gruppe weniger effizient erscheinen.

Erwartungsgemäß änderte sich der Stickstoffgehalt der Probe bei der Reduktion der Disulfidbrücke mit DTT nicht mehr.

3.5.c) Peptide

Der partikelbasierte Kupplungsansatz bietet die Möglichkeit Moleküle ortsgenau auf einer Oberfläche zu deponieren, mit Hilfe des laserbasierten Ansmelz-Verfahrens zu strukturieren und zu immobilisieren. In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob vorgefertigte Peptidmodule in die vollkombinatorische partikelbasierte SPPS eingebracht werden können um das Screening nach bestimmten sequenzabhängigen Eigenschaften von Peptiden zu erleichtern. Neben Standard-Syntheseoberflächen können so auch spezialisierte Detektionsoberflächen wie CMOS-Chips mit ganzen Peptiden funktionalisiert werden, die sensitiv gegenüber den wiederholten Kupplungsbedingungen einer vollständigen Peptidsynthese wären.

Das bei 90 °C viskose, als Reaktionsmedium dienende Partikelmatrixmaterial schränkte für die Aminosäure-Derivate Fmoc-Gly-OPfp und Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp die Diffusion ein. Experimentelle Partikelchargen mit unterschiedlichem Gehalt an eingebettetem Peptid sollten bestätigen, inwiefern das S-LEC-P LT 75 52 für die partikelbasierte Anbindung von ganzen Peptiden geeignet war. Das 6-merige Peptid der Sequenz CYWDDK(Biotin) diente für diese Versuchsreihen als Modellpeptid. Die Seitenkette des *N*-terminalen Cysteins lieferte mit der Thiol-Funktion eine funktionelle Gruppe zur Immobilisierung des Peptids [88] [89]. Das *C*-terminale, biotinylierte Lysin bot die Möglichkeit zum Nachweis der erfolgreichen partikelbasierten Kupplung des Peptids an die Zieloberfläche durch ein Streptavidin-Konjugat.

Die experimentellen Mikropartikel für die im Folgenden diskutierten Versuchsreihen wurden über das Mahlverfahren, unter Verzicht auf den Feinmahlschritt durch die Luftstrahlmühle, hergestellt. Die Herstellung mit dem Sprühtrockner war aufgrund der schlechten Löslichkeit des Peptides in DCM oder Aceton nicht möglich. Das verwendete DMF kann im Sprühtrocknungsprozess aufgrund des hohen Siedepunkts nur schwer verwendet werden. Auch eine Vermessung der Partikelchargen durch den MASTERSIZER 2000 entfiel, da die Messung mit einem hohen Materialverlust einhergeht und an anderer Stelle zu erwartende Größenverteilungen bereits ermittelt wurden (vgl. Abschnitt 3.2.a.)).

Die Partikelherstellung erforderte zunächst das Lösen bzw. homogene Dispergieren der Partikelbestandteile in einem geeigneten Lösungsmittel. Hierfür wurden Graphit Nanopartikel, S-LEC-P LT 75 52 und das Peptid in einem Rundkolben in DMF gelöst. Nach dem Entfernen des DMFs am Rotationsverdampfer bei 65 °C, wurde die Rohmasse so

lange an der Schlenklinie weiter getrocknet bis sie spröde genug war, um sie mit dem Spatel zu zerkleinern und mit der Schneidmühle zu mahlen.

Für die Versuchsreihen wurden je 20 mg Partikel 6 unterschiedlicher Chargen mit konstantem Graphit Nanopartikelanteil (2 % (w/w/w)), und bezogen auf die Gesamtmasse der jeweiligen Partikelcharge variierendem Peptidanteil, auf einer Oberfläche deponiert und gekuppelt. Ein Spotmuster aus Partikeln konnte unter Zuhilfenahme einer temperaturbeständigen Maske aus Kapton® Folie (Poliimidfolie) auf der Oberfläche erzeugt werden. Die Anbindung des Peptids wurde durch Markierung mit einem fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Konjugat (Strep.-Dylight 800) nachgewiesen. Die partikelbasierten Immobilisierungsexperimente wurden auf 3-GPS funktionalisierten Glasoberflächen durchgeführt. [89] [90] [91]

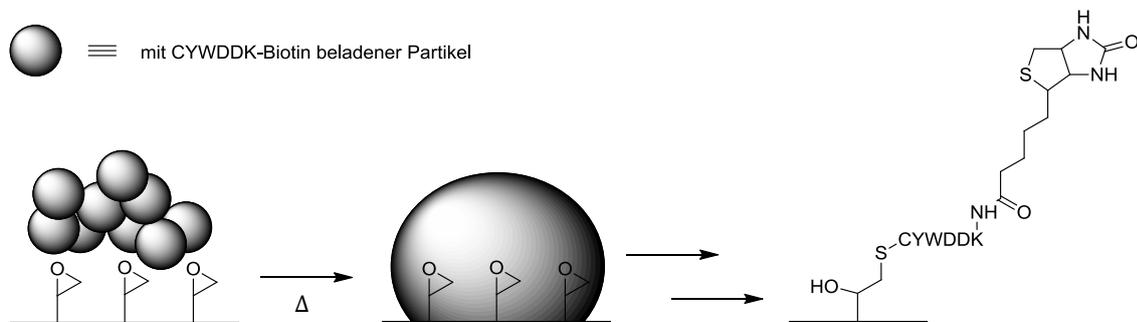


Abbildung 52: Immobilisierung des in Partikel eingebetteten Peptids auf einer 3-GPS funktionalisierten Glasobjektträger Oberfläche.

Bei den in dieser Versuchsreihe durchgeführten partikelbasierten Kupplungsreaktionen des Peptids CYWDDDK(Biotin) an oberflächengebundene Epoxy-Gruppen, wurde auf katalytisch aktive Additive verzichtet. Lewis-Säuren zur Schwächung der C-O Bindung des Oxirans an der Oberfläche, tertiäre Stickstoff- oder photogenerierte Basen zur Erzeugung eines Thiolats wären Möglichkeiten gewesen die Reaktion zu beschleunigen. [91] [92]

Das in die Partikelmatrix eingebettete Peptid konnte ohne weitere Zusätze bei Reaktionszeiten zwischen 90 und 180 min und Reaktionstemperaturen zwischen 90 und 120 °C an die epoxyfunktionalisierte Oberfläche gekuppelt werden. Abbildung 53 zeigte das Ergebnis der partikelbasierten Kupplung des Peptids CYWDDDK(Biotin) an die 3-GPS funktionalisierte Glasoberfläche.

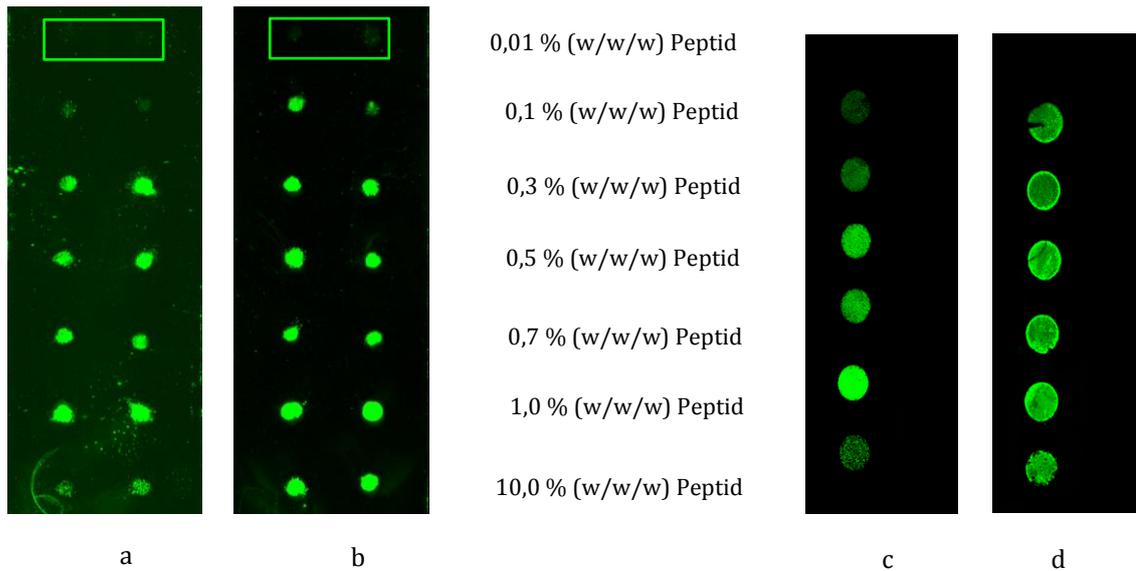


Abbildung 53: Fluoreszenzscans der partikelbasierten Peptidkupplung für (a) 90 min bei 90 °C und (b) 120 °C, sowie bei (c) 90 °C für 90 min und (d) 180 min.

Die für 90 min bei 90 °C durchgeführte Kupplungsreihe zeigte bei der Partikelcharge mit 0,1 % (w/w/w) an eingebettetem Peptid einen deutlichen Einbruch der Bindungseffizienz des Peptids an die Oberfläche. Erhöhte man die Kupplungstemperatur auf 120 °C und verringerte dadurch die Viskosität des Reaktionsmediums, (Abbildung 53, b) waren die Spots der Partikelcharge mit 0,1 % (w/w/w) Peptid noch deutlich zu erkennen. Behielt man die Reaktionstemperatur von 90 °C bei und erhöhte die Kupplungsdauer von 90 auf 180 min, war kein Fluoreszenzintensitätsunterschied zwischen den Partikelchargen (10 % bis 0,1 % (w/w/w)) mehr auszumachen. (Abbildung 53, d). Auch hier wirkte sich das viskose Reaktionsmedium limitierend auf die Reaktionsausbeute an der Trägeroberfläche aus. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur führte zu einer Erniedrigung der Viskosität und somit einer Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit. Die Verlängerung der Reaktionsdauer führte dazu, dass selbst bei den Partikelchargen niedrigerer Konzentration genügend Peptide durch das Reaktionsmedium diffundieren konnten um die funktionellen Gruppen am Trägermaterial abzusättigen.

In diesem Kapitel wurde das Einbetten in Mikropartikel und das partikelbasierte Kuppeln von Spezialbausteinen diskutiert. Ein orthogonal zur Fmoc-^tBu-Strategie entschützbares Cystein-Derivat wurde partikelbasiert an die Syntheseoberfläche gekuppelt und die Entschützungsreaktion mit XPS quantifiziert. Die partikelbasierte Kupplung eingebetteter

Bausteine an funktionalisierte Oberflächen konnte mit kurzen Peptiden durchgeführt werden. Unter Verwendung der mittels Sprühtrocknungs- und Mahlverfahren hergestellten, optimierten Mikropartikeln wurde gezeigt dass das laserbasierte Verfahrens zur SPPS im Arrayformat prinzipiell bereits Auflösungen bis zu 1 000 000 Spots pro cm² erreicht.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Aktivester beladene Mikropartikel bezüglich der Anforderungen des laserbasierten Anschmelzverfahrens zur Herstellung hochdichter Peptidarrays optimiert werden.

Abgesehen von technologisch bedingten Limitierungen, hängt die Auflösung eines durch die partikelbasierte SPPS hergestellten Peptidarrays in erster Linie von der Größenverteilung der verwendeten Mikropartikel ab. Es gelang sowohl durch Modifizierung des Mahlverfahrens als auch durch Optimierung des Sprühtrocknungsprozesses, mit Aminosäureaktivester beladene Mikropartikel mit Größenverteilungen, die Zentralwerte von $d(0,5) < 5,0 \mu\text{m}$ aufwiesen, herzustellen. Auf dieser Grundlage und durch das gezielte Ausrichten der Partikelzusammensetzung auf die Anforderungen der laserbasierten Verfahren zur partikelbasierten SPPS war es möglich, Dipeptid-Arrays mit Auflösungen von über 40.000 Spots/cm² herzustellen. Auf einem vorstrukturierten Syntheseträger wurde durch eine Variante des laserbasierten Anschmelzverfahrens mit aus dieser Arbeit resultierenden Mikropartikeln ein Biotin-Array erzeugt, das sogar eine Auflösung von 1.000.000 Spots/cm² besaß.

Die in Zusammenhang mit der Partikelcharakterisierung durchgeführten thermischen Analysen mittels DSC konnten den Einfluss verschiedener Mengen an Aktivester auf das Verflüssigungsverhalten der Partikelmatrix aufklären. Die hier gewonnenen Erkenntnisse bieten einen Ansatzpunkt zur Optimierung von Reaktions- und Prozessbedingungen bei der partikelbasierten SPPS. Ausserdem können diese Daten als Referenz für die Untersuchung neuartiger Partikelmatrixmaterialien dienen die effizientere Reaktionsbedingungen und höhere Syntheseausbeuten ermöglichen. Ein Polymermaterial mit niedrigerem T_g , das bei 90 °C weniger viskos vorliegt und die Diffusion der eingebetteten Aktivesterbausteine zur Syntheseoberfläche weniger stark behindert, würde sich gerade bei voluminösen Aminosäure-Derivaten wie z.B. Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp positiv auf die Reaktionsausbeute auswirken. Während der Laserdruckeransatz auf ein sprödes, hartes Partikelmatrixmaterial angewiesen ist, das nicht an den Walzen und Druckwerkkomponenten kleben bleibt, wäre die Verwendung von niedrig schmelzenden Polymermaterialien bei den laserbasierten Methoden zur SPPS im Arrayformat denkbar. Die durchgeführten Kupplungsexperimente wiesen bei einer Temperatur von 90 °C auf

viskositätsbedingte Diffusionslimitierungen bei der Immobilisierung der eingebetteten Aktivester hin. Dynamische TOF-SIMS Messungen ergaben zusätzlich, dass die Reaktionsausbeuten bei der partikelbasierten Kupplung eines Aktivesterbausteins ab einer Synthesefilmtiefe von 60 nm rapide abfallen. Diese Erkenntnis trägt zur Optimierung der Oberflächenfunktionalisierung für die partikelbasierte SPPS bei, da die Herstellung dünnerer Synthesefilme deutlich weniger zeitintensiv ausfällt. Generell könnten die in dieser Arbeit diskutierten ToF-SIMS Experimente zukünftig als Ausgangspunkt für eine *in situ* Bestimmung der Ausbeuten bei verschiedenen, während der partikelbasierten SPPS dargestellten Sequenzen dienen.

Das erfolgreiche Einführen spezieller Bausteine in die Mikropartikel ermöglicht der partikelbasierten SPPS, Arrays für neuartige Applikationen hervorzubringen. In Zukunft könnten gezielt weitere nicht-proteinogenen Bausteine wie zuckerhaltige Aminosäuren, für Immunoassays, Bausteine mit speziellen elektronischen Eigenschaften um elektrische Bauteile wie Dioden oder Transistoren zu simulieren, in die partikelbasierte SPPS eingeführt werden. In diesem Zusammenhang erwies sich der Mini-Sprühtrockner als wertvolles Alternativverfahren zur Partikelherstellung, da gerade die Herstellung kleiner, experimenteller Partikelansätze, im 10 g Maßstab, wesentlich schneller, effizienter und einfacher prozessiert werden konnte als dies mit dem Mahlverfahren der Fall gewesen wäre.

In Kombination mit den Arbeiten von Frieder Märkle, Sebastian Schillo und Jakob Striffler, bilden die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse den technologischen Rahmen für zukünftige Weiterentwicklungen in der partikelbasierten SPPS durch laserbasierte Verfahren und den daraus erwachsenden neuen Applikationen von Peptidarrays.

5. Materialien und Geräte

5.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Anbietern bezogen:

Alfa Aesar (Karlsruhe / Deutschland): 2,2'-Bipyridin (mind. 99 %), Molekularsieb (3 Å, 4 Å)

Bachem (Bubendorf / Schweiz): Fmoc-Cys(Acm)-OPfp

Iris Biotech (Marktrechwitz / Deutschland): Biotin-OPfp, Fmoc-β-Ala-OH

Merck (Darmstadt / Deutschland): Chloroform zur Analyse (z.A.), DCM (z.A.), DIPEA zur Synthese (z.S.), DMF (z.A.), DMSO (z.A.), H₂O₂ (z.S.), H₂SO₄ (z.S.), iPrOH (z.A.), KOH (z.A.), MeOH (z.A.), Piperidin (z.S.), TFA (z.S.), Fmoc-Arg(Pbf)-OPfp (>99,9 %), Toluol (z.A.)

Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim / Deutschland): 3-GPS (mind. 98 %), APTES (mind. 99 %), BIBS (mind. 98 %), CuBr (mind. 98 %), DIC (mind. 99 %), Fmoc-Cys(Trt)-OPfp (mind. 98 %), NaN₃ (mind. 99 %), NMI (mind. 99 %), PBS BioPerformance Certified pH 7,4 Mischung, TIBS (mind. 99 %), Tween20, Fmoc-Gly-OPfp (mind. 98 %)

VWR (Darmstadt / Deutschland): Toluol (mind. 99,5 %), Ethanol (mind. 99,5 %), Essigsäureanhydrid (mind. 98 %)

Thermo Fisher Scientific (Schwerte / Deutschland): Streptavidin-DyLight 800

Rockland (Gilbertsville / USA): „Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting - MB-070

Sekisui Chemical CO, LTD. (Osaka / Japan): S-LEC-P LT 7552

MIT Corp. (Richmond / CA / USA): Graphit Nanopartikel (99,9 %, <30 nm, T_M = 3652 °C)

PSL GmbH (Heidelberg / Deutschland): CYWDDK(Biotin) (mind. 95 %)

5.2. Geräte

Im folgenden Abschnitt wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Technologien beschrieben.

Differential Scanning Calorimetry

Für die thermischen Analysen wurde ein Differential Scanning Kalorimeter 204 F1 Phoenix der Firma NETZSCH-Gerätebau GmbH (Selb / Deutschland) verwendet. Die Proben wurden mit dem in

Abbildung 54 dargestellten Temperaturverlauf vermessen.

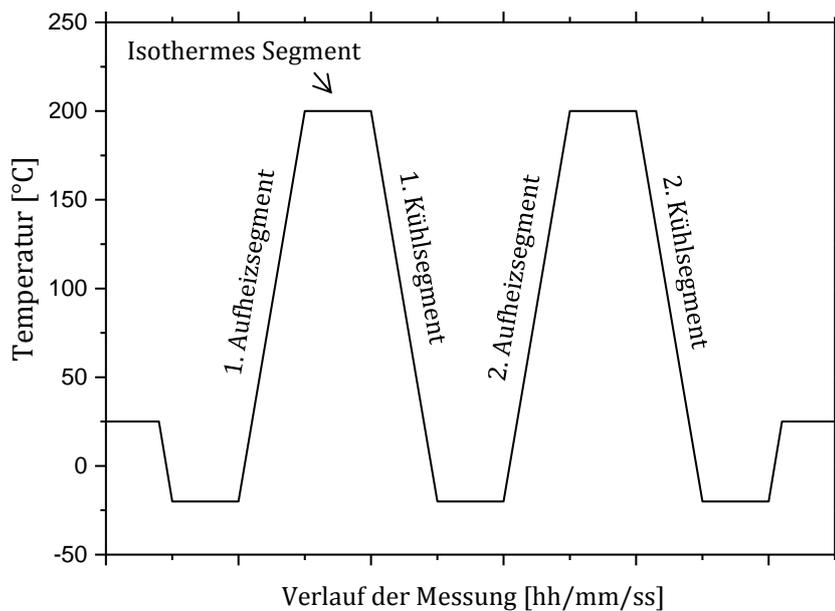


Abbildung 54: Heiz- und Kühlprogramm der DSC-Messungen

Die Proben wurden in Aluminium DSC-Probentiegeln der Firma Netzsch (Selb / Deutschland) vermessen. Die Heiz- und Kühlrate betrug 10 K/min während die isothermen Segmente 10 min andauerten. Um die Probe während der Abkühlsegmente auf -20 °C zu kühlen wurde flüssiger Stickstoff verwendet. Die Messkammer wurde über die

gesamte Dauer der Messung mit einer Flussrate von 0,2 ml/min mit Stickstoff, als Schutzgas, gespült. Jede Messung musste automatisch mit einer Korrekturmessung, die zuvor mit einem leeren Probentiegel durchgeführt worden ist verrechnet werden um Hintergrundsignale zu minimieren und das Signal zu Rausch Verhältnis zu verbessern. Die Auswertung der gemessenen Graphen erfolgte automatisch mit der Proteus® Software Version 4.7.0 der Firma NETZSCH. In Abbildung 55 ist exemplarisch dargestellt, wie die DSC-Kurven anhand der Gerätesoftware ausgewertet wurden.

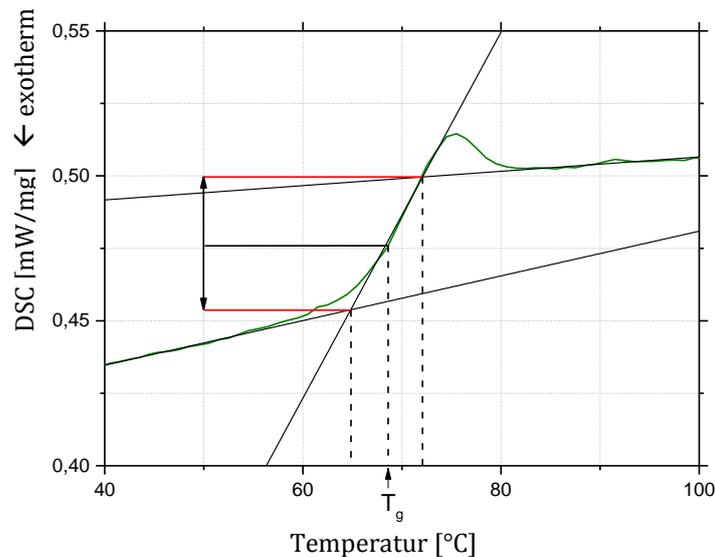


Abbildung 55: Aus dem DSC-Signal ermittelte Werte ^[93]

Die linearen Bereiche ober- und unterhalb des Glasübergangs wurden extrapoliert. Anhand des Schnittpunkts mit einer an den linearen Bereich des Glasübergangs gefitteten Gerade, wurde ΔC_p automatisch nach Formel 5 berechnet.

$$\frac{DSC(T_1) - DSC(T_2)}{\text{Heizrate}} * 60 = \Delta C_p$$

Formel 5: Berechnung des Sprungs in der Wärmekapazität beim Glasübergang. ^[93]

Die Glasübergangstemperatur T_g entsprach der Temperatur $T \left(\frac{1}{2} \Delta C_p \right)$ bei der die Hälfte der Änderung in der Wärmekapazität (ΔC_p) durchlaufen wurde. [93]

Partikelgrößenbestimmung

Der MASTERSIZER 2000 von **Malvern Instruments** (Worcestershire / UK) diente zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilungen. Die Berechnung der Partikeldurchmesser, aufgrund der in der Messzelle auftretenden Beugungsphänomene, erfolgt über das Fraunhofermodell. Die Messungen wurden automatisch durch die Gerätesoftware ausgewertet. [94]

Partikelproduktion

Für die Partikelproduktion kamen der Mini-Sprühtrockner B-290 in Verbindung mit dem Inert Loop B-295 der **Büchi Labortechnik GmbH** (Essen/Deutschland), sowie die M20 Schneidmühle der **IKA Werke GmbH & Co. KG** (Staufen / Deutschland) und die 50 AS Luftstrahlmühle von **Hosokawa-Alpine** (Augsburg / Deutschland), zum Einsatz. Die genauen Mahlparameter sind Abschnitt 6.1 zu entnehmen.

Röntgen-Photoelektronen Spektroskopie (XPS)

Die Röntgen-Photoelektronen Spektren wurden mit dem MAX-200 Spektrometer der **Leybold AG** (Hanau / Deutschland) am Physikalisch Chemischen Institut (PCI) der Ruprecht-Karls-Universität (Heidelberg / Deutschland) aufgenommen. Eine Aluminiumanode ($K_{\alpha 1,2} = 1487$ eV) diente als Röntgenquelle. Beim Detektor handelte es sich um einen Energieanalysator vom Typ EA 200. Die experimentelle Auflösung der Anlage betrug 0,9 eV. In Tabelle 22 wurden die angewandten Messparameter und die Bindungsenergiebereiche bei denen die Detailspektren aufgenommen wurden aufgeführt.

Orbital	Startenergie (in eV)	Endeenergie (in eV)	Schrittweite (in meV)	Verweilzeit (in ms)	Passenergie (In eV)	Scans
C1s	298	273	200	100	48	20
N1s	410	389	200	250	48	20
O1s	541	521	200	40	48	20
Si2p	110	89	200	100	48	20
S2p	180	156	200	250	48	20
Übersicht	1000	-4,8	400	10	96	2

Tabelle 22: XPS-Messparameter

Waren die Detailspektren um mehr als 1,0 eV verschoben, wurde die Messung unterbrochen und der Energiebereich für den Detailscan entsprechend angepasst. Grund hierfür waren in der Regel Aufladungseffekte an der Probenoberfläche. Nach der Normierung aller Spektren auf die gerätespezifische Transmissionsfunktion, wurden die Daten mit Hilfe der Microcal Origin 3.78 Software und dem zugehörigen Peak-Fitting-Tool der Microcal Software Inc. (Northhampton / Massachusetts / USA) analysiert. Vor der Peakintegration wurde jedes Spektrum auf das C1s korrelierte Signal (284,6 eV) normiert. Um Peakhöhen bzw. Peakflächen errechnen zu können musste der Hintergrund der Spektren subtrahiert werden. Zu diesem Zweck wurde jedes Spektrum mittels der Shirley Baseline-Substraction korrigiert. ^[95]

Flugzeitanalysierte Sekundärionen Massenspektrometrie (TOF-SIMS)

Die entsprechenden TOF-SIMS Messungen wurden mit einem TOF.SIMS5 Gerät mit Reflektron ToF-Analysator der *ION-TOF GmbH* (Münster / Deutschland) durchgeführt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimenten erzeugte eine Bi-Cluster Liquid Metal Ion Gun, die mit einer Pulsdauer zwischen 1,1 und 1,3 ns arbeitete, bei 25 keV Bi₃-Primärionenpulse. Bei einer orts aufgelösten Messung konnten 500 x 500 µm² mit einer lateralen Auflösung von 4 µm gescannt werden. Die dynamischen Tiefenprofile wurden durch Sputtern der Probenoberfläche mit Cs- bzw. C₆₀-Molekülonen erhalten. Die C₆₀-Quelle arbeitete mit 20 keV. Eine Elektronenkanone (21eV) glich während der Messung auf der Oberfläche entstandene Ladungen aus. Das Ionen-Reflektron musste dementsprechend nachjustiert werden. C⁺, CH⁺, CH₂⁺, und CH₃⁺ bzw. C⁻, C₂⁻, C₃⁻ korrelierte Signale dienten zur Kalibrierung.

Photometrie

Die PDFA Bestimmung wurde in UV-Cuvette Micro Einwegküvetten der **Brand GmbH & Co. KG** (Wertheim / Deutschland) mit einem **Jenway** 7305 Spektralphotometer der **Bibby Scientific Ltd.** (Staffordshire / UK) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop vom Typ Supra 60 VP der **Carl Zeiss GmbH** (Jena / Deutschland) wurde zum Erstellen der entsprechenden REM-Aufnahmen verwendet.

HPLC-Analysen

Für die HPLC Analysen wurde eine Säule des Modells CC 125/3 Nukleosil 100-3 C18 HD in Verbindung mit einer Vorsäule CC 8/3 Nukleosil 100-3 C18 HD von **Macherey-Nagel** (Düren / Deutschland) in einer HPLC Anlage ÄKTA™ Purifier 10 von **Amasham Pharmacia Biotech** (Freiburg / Deutschland) verwendet. Bei Laufmittel A handelte es sich um einen 0,05 M, wässrigen TEAP-Puffer (pH 2,25). Laufmittel B bestand aus 10 % (v/v) Laufmittel A in MeCN. Während der 30 min Messzeit wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min ein Laufmittelgradient von 60 – 95 % (v/v) bezüglich des Laufmittels B gefahren.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die ¹H-NMR Spektren wurden auf einem Bruker Avance 300 der **Bruker Corporation** (Billerica / MA / USA) bei 300 MHz aufgenommen.

Fluoreszenznachweise

Der Odyssey Infrared Imager von **LI-COR Biosciences** (Lincoln / NE / USA) diente der Auswertung von Fluoreszenzassays unter Verwendung von DyLight 800 sowie DyLight 680 markierten Konjugaten.

Der Genepix 4000B Fluoreszenzscanner, der Firma **Axon Instruments** (Sunnyvale / CA / USA) wurde für die Auswertung von Färbeexperimenten mit den Fluorophoren Alexa Fluor 546, DyLight 550 und Dylight 650 verwendet.

6. Experimentelle Methoden

6.1. Das Mahlverfahren

In einem Rundkolben mit Rührfisch wurden das polymerbasierte Matrixmaterial S-LEC-C LT 75 52, sowie alle anderen festen Partikelkomponenten mit Ausnahme des einzubettenden Aktivesters vorgelegt und unter Rühren durch Zugabe von DCM (z.A.) gelöst bzw. dispergiert. Sobald die Lösung bzw. Dispersion homogen vorlag, konnte der Aminosäureaktivester hinzugegeben und gelöst werden. Das Lösungsmittel wurde nun am Rotationsverdampfer bei 55°C entfernt. Dadurch bildete sich eine spröde Rohmasse, die beim Entfernen des Lösungsmittels aufgebläht wurde. Mit Hilfe des Spatels wurde die Rohmasse im Kolben grob zerstoßen, an der Schlenklinie über Nacht weiter getrocknet und anschließend mit einer M20 Schneidmühle der Firma IKA zerkleinert. Der Grobmahlgang musste portionsweise durchgeführt werden, da die maximale Füllmenge der Mühle 250 ml betrug. Jeder Batch wurde für 15 s bei 20.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) gemahlen. Das Mahlgut wurde nach jedem Mahlgang mit dem MASTERSIZER 2000 der Firma Malvern vermessen. Wies die Partikelgrößenverteilung einen Median von $(d(0,5)) = 100 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$ oder kleiner auf, erfolgte der Feinmahlgang. Mit Hilfe der 50AS Spiralmühle der Firma Hosokawa Alpine wurden die Grobpartikel mit 3,0 bar Mahl- und 3,0 bar Injektionsdruck bei einer Materialzuführtrate von 1,0 g pro min feingemahlen.

6.2. Das Sprühtrocknungsverfahren

Das Polymer S-LEC-P LT 75 52 und Graphit Nanopartikel wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Schliff und Rührfisch vorgelegt. Nachdem Matrixmaterial und Absorber in DCM (z.A.) gelöst bzw. dispergiert waren, konnte der Aminosäureaktivester zugegeben werden. Hatte sich dieser ebenfalls gelöst, wurde die Lösung bzw. Dispersion durch einen Silikonschlauch über einen Abgang am Erlenmeyerkolben unter weiterem Rühren in die Sprühtrocknerapparatur B-290 in Verbindung mit dem InertLoop B-295 der Firma Büchi gepumpt. Die fertigen Partikel konnten nach Beendigung des Prozesses aus dem Auffanggefäß des Sprühtrockners entnommen werden.

6.3. Reinigung und Aktivierung von Siliziumwafern und Glasobjektträgern

Um auf SiO₂-Oberflächen Silanolgruppen zu erzeugen und somit chemische Modifikationen zu ermöglichen, musste die Oberfläche zunächst von störenden Adsorbaten gereinigt und das SiO₂-Netzwerk aufgebrochen werden. In einer Petrischale wurden die Glasobjektträger in 1,0 M Kaliumhydroxid-Lösung in iPrOH (z.A.) für 3 h gerüttelt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit destilliertem und anschließend mit entionisiertem Wasser (Millipore Qualität). Nach zweimaligem spülen mit EtOH (z.A.) wurden die Oberflächen der geätzten Glasträger im Luftstrom getrocknet.

Siliziumwafer wurden in einer Petrischale für 30 min in 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid in konzentrierter Schwefelsäure (Caro'sche Säure) gerüttelt. Die Caro'sche Säure wurde vorsichtig abgegossen und der Wafer mehrfach gründlich mit destilliertem-Wasser gespült. Anschließend konnte die Oberfläche mit entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) und schließlich mit EtOH (z.A.) gewaschen und im Luftstrom getrocknet werden. Die trockenen, gereinigten und aktivierten Oberflächen wurden direkt weiterverarbeitet.

6.4. Silanisierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES)

Ein aktivierter Siliziumwafer oder Glasobjektträger wurde in einer Petrischale mit einer Lösung aus 2,9 % APTES und 2,4 % (v/v/v) entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) in EtOH (z.A.) für 16 h im Exsikkator unter Argon-Atmosphäre inkubiert. Beim Abgießen der Lösung musste mit EtOH (z.A.) nachgespült werden, sodass der Wafer bzw. der Objektträger nicht trockenlief. Damit sollte ein Auskristallisieren des in der Reaktionslösung noch vorhandenen APTES und die damit einhergehende Beschädigung des self-assembled monolayers (SAM) verhindert werden. Nach dreimaligem Spülen mit EtOH (z.A.), wurde der Wafer bzw. Objektträger im Luftstrom getrocknet und die Oberfläche im Ofen bei 120°C für 45 min getempert um die Kondensationsreaktion zu komplettieren. Nach dem Abkühlen konnte der Wafer bzw. Objektträger direkt weiterverarbeitet oder unter Argon-Atmosphäre bei 4 - 8 °C gelagert werden.

6.5. Veresterung mit α -Bromoisobutyrylbromid (BIBS)

In einem Schlenkkolben unter Argon-Atmosphäre wurde eine 0,6 mM Lösung aus DIPEA in trockenem, über Molekularsieb gelagertem DCM vorgelegt und mit Eis auf 0 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wurde im Schutzgas Gegenstrom eine 0,2 mM Lösung BIBS in ebenfalls über Molsieb gelagertem DCM unter starkem Rühren zugetropft. Anschließend wurde die Lösung nach dem Gegenstromprinzip über den silanisierten Siliziumwafer bzw. Glasobjektträger, in einer Petri-Schale, im Exsikkator gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde die Reaktionslösung abgegossen und die Oberfläche 2 x 3 min mit DCM (z.A.) und 2 x 2 min mit MeOH (z.A.) gewaschen und im Anschluss im Luststrom getrocknet. Die Oberfläche wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.6. Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (3-GPS)

Ein aktivierter Siliziumwafer oder Glasobjektträger wurde in einer Petrischale in einer Lösung aus 10 % (v/v) 3-GPS in über Molsieb gelagertem, trockenem Toluol für 16 h inkubiert. Nach Abgießen der Reaktionslösung, wurde die Oberfläche 3 x 1 min mit Toluol (z.A.) und 2 x 1 min mit DCM (z.A.) gewaschen. Nach Trocknung der Oberfläche im Vakuum erfolgte die Lagerung 4 °C unter Argon-Atmosphäre bis zur weiteren Verwendung.

6.7. Polymerisierung (100% PEGMA-Oberfläche)

Ein Schlenkkolben wurde dreimal evakuiert und mit Argon geflutet. 10 ml PEGMA, 10 ml entionisiertes Wasser (Millipore Qualität) und 10 ml MeOH (z.A.) wurden im Gegenstrom vorgelegt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 280 mg 2,2'-Bipyridin (Bipy) im Gegenstrom. Nachdem das Bipy vollständig gelöst war, konnte der Reaktionslösung 128 mg Cu(I)Br, ebenfalls im Argon Gegenstrom, zugeführt werden. Nach 5 minütigem Rühren wurde die nach Vorschrift 6.4. veresterte Si-Oberfläche in einer Petrischale in einem Exsikkator mit der Reaktionslösung im Gegenstrom übergossen. Es wurde für mindestens 16 h bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre inkubiert. Die resultierende Polymerfilmdicke hing von der Inkubationsdauer ab und lag bei der hier beschriebenen Vorgehensweise im Bereich von 80 bis 200 nm. Nach der Inkubation in der Reaktionslösung wurde die Oberfläche mit entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) gespült. Dann musste 3 x 5 min mit entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) und

2 x 3 min mit MeOH (z.A.) gewaschen werden. Rückstände aus der Inkubation mit der Polymerisationslösung konnten, falls nötig, in Chloroform im Ultraschallbad entfernt werden. Nach Trocknung im Luftstrom wurde die Oberfläche bei 4 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert. Ein mitprozessierter Siliziumwafer diente als Reaktionskontrolle. Die charakteristische Farbänderung zeigte eine erfolgreiche Polymerisation an.

6.8. Kupplung von Aminosäuren an Hydroxyl- bzw. Aminofunktionen (aus Lösung)

In einem Schlenkkolben mit Rührfisch und Septum wurde unter Argon-Atmosphäre eine 0,2 M Lösung des zu kuppelnden Aminosäure-Derivats mit freier Carboxy-Funktion in trockenem, über Molsieb gelagertem, DMF vorgelegt. Über das Septum wurde im Argon-Gegenstrom 1,2 eq. DIC zugegen und für 5 min gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung, ebenfalls über das Septum und im Argon-Gegenstrom mit 2,0 eq. NMI versetzt und für 1 min gerührt. In einer Petri-Schale im Exsikkator, wurde die Syntheseoberfläche mit der Reaktionslösung übergossen. Nach dreimaliger Evakuierung des Exsikkators wurde mit Argon beschickt. Für die Reaktion mit Hydroxylgruppen wurde über Nacht inkubiert, für die Reaktion mit Aminogruppen 2 h. Anschließend wurde der Siliziumwafer bzw. der Mikroskop-Objektträger 3 x 5 min mit DMF (z.A.) und 2 x 3 min mit MeOH (z.A.) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die Oberfläche wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.9. Acetylierung freier Hydroxy- und Aminofunktionen auf der Syntheseoberfläche (Capping)

Um die Synthese fehlerhafter Peptidsequenzen zu unterbinden wurde die Syntheseoberfläche in einer Lösung aus 10 % (v/v/v) Essigsäureanhydrid (ESA) und 20 % (v/v/v) DIPEA in DMF (z.A.) im Exsikkator auf dem Rüttler über Nacht inkubiert, wenn freie Hydroxylgruppen blockiert werden sollten. Aminofunktionen wurden für 2 h acetyliert. Anschließend wurde 3 x 5 min mit DMF (z.A.) und 2 x 3 min mit MeOH (z.A.) gewaschen und die Oberfläche im Luftstrom getrocknet. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Syntheseoberfläche bei 4 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.10. Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (Entschützung)

Der Syntheseträger wurde für 20 min mit einer Lösung aus 20% Piperidin (v/v) in DMF (z.A.) überschichtet. Verwendete man für die Überschichtung der Synthesoberfläche definierte Volumina der Entschützungslösung, so konnten diese nach Vollendung der Entschützung vorsichtig mit einer Eppendorf Pipette von der Oberfläche in eine Küvette überführt und die Absorption des PDFA bei 301 nm UV/Vis-spektroskopisch vermessen werden. Die Oberfläche wurde anschließend 3 x 5 min mit DMF (z.A.), 2 x 3 min mit MeOH (z.A.) gewaschen, im Luftstrom getrocknet und bei 4°C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.11. Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen (Seitenketten-Entschützung)

Der Syntheseträger wurde in einer Petrischale für 30 min in DCM gequollen. Anschließend wurde die Oberfläche 3 x 30 min mit einer jeweils frisch angesetzten Lösung aus 51 % (v/v/v/v) Trifluoressigsäure (TFA), 3 % (v/v/v/v) Triisobutylsilan (TIBS) und 2 % (v/v/v/v) entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) in DCM (z.A.) auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde der Syntheseträger 1 x 30 min mit einer Lösung aus 5 % (v/v) DIPEA in DMF (z.A.) behandelt. Danach wurde 3 x 5 min in DMF (z.A.) und 2 x 3 min in MeOH (z.A.) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Oberfläche bei 4°C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.12. Kupplung von Aminosäureaktivestern aus Lösung

Der Syntheseträger wurde bei Raumtemperatur für 2 h in einer Petri-Schale im Exsikkator unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml pro Mikroskop Objektträger einer 0,2 M Lösung des entsprechenden Aktivesters in trockenem DMF überschichtet. Alternativ wurde die Oberfläche mit 30 ml der 0,2 M Reaktionslösung übergossen. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Syntheseträger 3 x 5 min mit DMF (z.A.) und 2 x 3 min mit MeOH (z.A.) gewaschen, im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert.

6.13. Partikelbasierte Kupplung von Aminosäureaktivestern oder Spezialbausteinen

Die mit einem Aktivester oder Spezialbaustein beladenen Mikropartikel wurden mit dem Spatel auf den Syntheseträger aufgebracht (125 mg pro Mikroskop Objektträger) und vorsichtig verdichtet bis sich eine gleichmäßige Partikelschicht auf der Oberfläche ergab. Der Syntheseträger wurde anschließend in einer Petri-Schale in der Kupplungskammer unter Argon-Atmosphäre für 90 min bei 90 °C temperiert. Nach dem Erkalten wurde der Syntheseträger vom Partikelmatrixmaterial, nicht abreagiertem Aktivester und anderen verbliebenen Partikelkomponenten zügig mit DCM (z.A.) gereinigt. Anschließend wurde die Oberfläche 3 x 5 min in DCM (z.A.) und 2 x 3 min in MeOH (z.A.) gewaschen, im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung unter Argon-Atmosphäre bei 4 °C gelagert.

6.14. Behandlung der Oberfläche gegen unspezifische Adsorption von Proteinen (Blockierung der Oberfläche für Fluoreszenzassays)

Die Oberfläche des Peptidarrays wurde für 30 min in mit Phosphatsalz auf pH 7,4 gepufferter und mit 0,05 % Tween 20 (v/v) versetzter wässriger Lösung (PBS-T) vorgequollen. Um die unspezifische Proteinadsorption zu unterbinden wurde für 1 h in einer Petrischale in Rockland Blocking-Puffer (RL) gerüttelt. Danach wurde das Blockierungsmedium abgegossen, 5 min in PBS-T gewaschen und direkt mit der Färbelösung inkubiert.

6.15. Färbung mit Streptavidin-Farbstoff Konjugat

Das zu färbende Array wurde in einer Petrischale bei Raumtemperatur, unter Lichtausschluss mit dem Streptavidin-Farbstoff Konjugat in einer 1:1000 bis 1:5000 (v/v) Verdünnung mit einer wässrigen 10 % (v/v) RL Lösung in PBS-T zwischen 30 min bis zu 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Inkubationslösung abgegossen 3 x 1 min mit PBS-T gewaschen, die Oberfläche kurz mit entionisiertem Wasser (Millipore Qualität) gespült und im Luftstrom getrocknet. Das angefärbte Array konnte dann im Fluoreszenzscanner analysiert werden.

Literatur

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149–2154.
- [2] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 304–305.
- [3] R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1385–1390.
- [4] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **2005**, *34*, 91–118.
- [5] M. Verlander, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **2007**, *13*, 75–82.
- [6] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angewandte Chemie*, **1992**, *104*, 375–391.
- [7] K.-H. Altmann und M. Mutter, *Chemie in unserer Zeit* **1993**, *6*, 274–286.
- [8] D. G. Mullen, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5240–5248.
- [9] G. Barany, F. Albericio, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 4936–4942.
- [10] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez and F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 2455–2504.
- [11] B. W. Erickson and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 3750–3756.
- [12] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 5748–5749.
- [13] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard and B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, **1978**, *13*, 537–539
- [14] A. El-Faham, F. Albericio, *Chemical reviews* **2011**, *111*, 6557–6602.
- [15] J. C. Sheehan , G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067–1068.
- [16] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447–2467.
- [17] R. Subiros-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Organic & biomolecular chemistry*, **2010**, *8*, 3665–3673.
- [18] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 6813–6830.
- [19] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5401–5402.
- [20] E. Atherton, J. L. Holder, M. Meldal, S. Robert, C. Sheppard and R. M. Valerio, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1*, **1988**, 2887–2894.
- [21] W. C. Chan and P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach*, Oxford University Press, New York, NY, USA, **2000**.
- [22] J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*-second edition, Oxford University Press, USA, **2002**.
- [23] F. Guillier, D. Orain and M. Bradley, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 2091–2157.
- [24] R. P. Ekins, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1989**, *7*, 155–168.
- [25] X. Gao, J. P. Pellois, Y. Na, Y. Kim, E. Gulari and X. Zhou, *Molecular Diversity*, **2004**, *8*, 177–187.
- [26] X. Gao, E. Gulari, X. Zhou, *Biopolymers*, **2004**, *73*, 579–596.
- [27] R. Frank, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 9217–9232.

- [28] R. Frank, *Journal of Immunological Methods*, **2002**, 267, 13–26.
- [29] F. Breitling, A. Nesterov, V. Stadler, T. Felgenhauer, F. R. Bischoff, *Molecular bioSystems* **2009**, 5, 224-234.
- [30] INTAVIS AG, <http://www.intavis.com>, **2014**.
- [31] JPT Peptide Technologies GmbH, <http://www.jpt.com>, **2014**.
- [32] A. Dikmans, U. Beutling, E. Schmeisser, S. Thiele, R. Frank, *QSAR & Combinatorial Science*, **2006**, 25, 1069-1080.
- [33] J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari, X. Gao, *Nat Biotechnol*, **2002**, 20, 922-926.
- [34] L. B. Hansen, S. Buus, C. Schafer-Nielsen, *PloS one* **2013**, 8, e68902.
- [35] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angewandte Chemie*, **2008**, 120, 7241-7244.
- [36] V. Stadler, R. Kirmse, M. Beyer, F. Breitling, T. Ludwig, and F. R. Bischoff, *Langmuir*, **2008**, 24, 8151-8157.
- [37] M. Beyer, A. Nesterov, I. Block, K. König, T. Felgenhauer, S. Fernandez, K. Leibe, G. Torralba, M. Hausmann, U. Trunk, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, V. Stadler, F. Breitling, *Science* **2007**, 318, 1888.
- [38] M. Beyer, Dissertation, Universität Heidelberg, **2005**.
- [39] Y. Kawagishi, Y. Ishida, K. Ishikawa, (US 4404271 A 1), **1983**.
- [40] K. Masters, *Ind. Eng. Chem.*, **1968**, 60, 53–63.
- [41] R. Vehring, W. R. Foss, D. Lechuga-Ballesteros, *Journal of Aerosol Science*, **2007**, 38, 728-746.
- [42] Büchi Labortechnik AG, <http://www.buechigmbh.de>, **2014**.
- [43] C. Schirwitz, Dissertation, Universität Heidelberg **2012**.
- [44] PEPperPRINT GmbH, <http://www.pepperprint.com/technology/peptide-laser-printer>, **2014**.
- [45] V. Stadler, M. Beyer, K. König, A. Nesterov, G. Torralba, V. Lindenstruth, M. Hausmann, F. R. Bischoff and F. Breitling, *J. Proteome Res.*, **2007**, 6, 3197–3202.
- [46] K. König, I. Block, A. Nesterov, G. Torralba, S. Fernandez, T. Felgenhauer, K. Leibe, C. Schirwitz, F. Löffler, F. Painke, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2010**, 147, 418-427.
- [47] K. König, Dissertation, Universität Heidelberg, **2010**.
- [48] F. Löffler, Dissertation, Universität Heidelberg, **2012**.
- [49] F. Löffler, J. Wagner, K. König, F. Märkle, S. Fernandez, C. Schirwitz, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, F. R. Bischoff, F. Breitling, A. Nesterov, *Aerosol Science and Technology*, **2011**, 45, 65-74.
- [50] Y.-C. Cheng, Dissertation, TU Darmstadt **2012**.
- [51] F. Löffler, Y.-C. Cheng, T. Foertsch, E. Dorsam, R. Bischoff, F. Breitling and A. Nesterov-Müller, *Biofunctional Xerography*, InTech, in *Biotechnology of Biopolymers*, **2011**, 275-290.

- [52] F. Märkle, Diplomarbeit, Universität Heidelberg, **2010**.
- [53] F. Märkle, Dissertation, Universität Heidelberg, **2014**.
- [54] F. Maerke, F.F. Loeffler, S. Schillo, T. Foertsch, B. Muenster, J. Striffler, C. Schirwitz, F.R. Bischoff, F. Breitling, and A. Nesterov-Mueller, *Adv. Mater.* **2014**, 26, 3730-3734.
- [55] B. Muenster, Diplomarbeit, Universität Heidelberg **2011**.
- [56] A. Nesterov, F. Loeffler, K. Konig, U. Trunk, K. Leibe, T. Felgenhauer, V. Stadler, R. Bischoff, F. Breitling, V. Lindenstruth, M. Hausmann, *The Review of scientific instruments*, **2007**, 78, 075111.
- [57] R. Klein, *Laser welding of plastics*, Weinheim: Wiley-VCH. VIII, 251 S., **2012**.
- [58] J. Raula, H. Eerikainen, E. I. Kauppinen, *International journal of pharmaceutics*, **2004**, 284, 13-21.
- [59] P. Seydel, A. Sengespeick, J. B. and, J. Bertling, *Chemical Engineering & Technology*, **2004**, 27, 505-510.
- [60] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar and A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512-7515.
- [61] S. Jasseron, C. Contino-Pépin, J. C. Maurizis, M. Rapp, B. Pucci, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, 38, 825-836.
- [62] M. J. Richardson, *The Glass Transition Region*, in *Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers* by V.B.F. Mathot, ISBN: 3446175113 (Hanser), **1994**.
- [63] J. H. Gibbs, E. A. DiMarzio, *The Journal of Chemical Physics*, **1958**, 28, 373.
- [64] J. M. Hutchinson, *Progress in Polymer Science*, **1995**, 20, 703-760.
- [65] A. Benninghoven, *Angew Chem.*, **1994**, 106, 1075-1096.
- [66] T. Ljungdahl, J. Veide-Vilg, F. Wallner, M. J. Tamas, M. Grotli, *Journal of combinatorial chemistry*, **2010**, 12, 733-742.
- [67] F. Tausig, F. J. Wolf, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1964**, 14, 205-209.
- [68] P.S. Staytona, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, *Biomolecular Engineering*, **1999**, 16, 39-44.
- [69] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Archives of biochemistry and Biophysics*, **1964**, 106, 1-5.
- [70] M. González, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arrondo, C. E. Argaraña, C. R. C. and, G. D. Fidelio, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 11288-11294.
- [71] S. Schillo, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2014**, (in preparation).
- [72] D. Briggs, J. C. Vickerman, *TOF-SIMS: Materials Analysis by Mass Spectrometry*, ISBN: 1906715173 (IM Publications), **2013**.
- [73] J. S. Fletcher, X. A. Conlan, E. A. Jones, G. Biddulph, N. P. Lockyer and J. C. Vickerman, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 1827-1831.
- [74] M. R. Keenan, V. S. Smentkowski, J. A. Ohlhausen, P. G. Kotula, *Surface and Interface Analysis*, **2008**, 40, 97-106.
- [75] B. J. Tyler, R. E. Peterson, *Surface and Interface Analysis*, **2013**, 45, 475-478.

- [76] J. Striffler, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2014**.
- [77] J. Cheng and N. Winogard, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3651-3659.
- [78] D. Veber, J. Milkowski, S. Varga, R. Denkwalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 5456-5461.
- [79] D. G. Mullen, B. Weigel, G. Barany, M. D. Distefano, *Journal of peptide science*, **2010**, *16*, 219-222.
- [80] B. Kamber, *Helvetica Chimica Acta*, **1973**, *56*, 1370-1381.
- [81] NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, <http://srdata.nist.gov/xps>, **2014**.
- [82] Ch. Zubrängel, C. Deuper, F. Schneider, M. Neumann, M. Grunze, A. Schertel, C. Wöll, *Chemical Physics Letters*, **1995**, *238*, 308-312.
- [83] M. Descostes, F. Mercier, N. Thromat, C. Beaucaire, M. Gautier-Soyer, *Applied Surface Science*, **2000**, *165*, 288-302.
- [84] J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **1976**, *8*, 129-137.
- [85] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.*, **1989**, *93*, 1670-1673.
- [86] V. Stadler, Dissertation, Universität Heidelberg, **2001**.
- [87] T. L. Barr, *Modern ESCA The Principles and Practice of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, ISBN: 9780849386534, (Crc Press Inc), **1994**.
- [88] C. Duschl, A. F. Sévin-Landais, H. Vogel, *Biophysical Journal*, **1996**, *70*, 1985-1995.
- [89] V. Grazu, O. Abian, C. Mateo, F. Batista-Viera, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1495-1501.
- [90] T. Ware, D. Simon, K. Hearon, T. H. Kang, D. J. Maitland, W. Voit, *Macromolecular Bioscience*, **2013**, *13*, 1640-1647.
- [91] C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chemical Society reviews*, **2010**, *39*, 1355-1387.
- [92] F. Fringuelli, F. Pizzo, S. Tortoioli, L. Vaccaro, *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 6785-6787.
- [93] NETZSCH Gerätebau GmbH, NETZSCH Proteus® Software 4.7.0 Manual, **2004**.
- [94] Malvern Instruments Ltd., MASTERSIZER 2000 User Manual, Manual Number MAN0384-1.0., **2007**.
- [95] D. A. Shirley, *Phys. Rev. B*, **1972**, *5*, 4709-4714.

Lebenslauf

Bastian Münster

Geburtsort: Heidelberg

03/2011-07/2014 Promotion mit Abschlussnote magna cum laude (sehr gut)

Thema der Arbeit: „Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren“ ausgeführt am Institut für Mikrostrukturtechnik des KIT

05/2010-02/2011 Diplomarbeit mit Abschlussnote 1,0

Thema der Arbeit: „Tonerbasierte Oligonucleotidsynthese an Glas- und Siliziumoberflächen“ ausgeführt am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

10/2003-01/2011 Chemiestudium (Diplom) mit Abschlussnote 1,8

Ausgeführt an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg mit dem Nebenfach Biophysikalische Chemie

09/1993-06/2002 Abitur mit Abschlussnote 2,0

Ausgeführt am Bunsen-Gymnasium Heidelberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Des Weiteren habe ich die Satzung der Universität Karlsruhe zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet.

Bastian Münster

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei PD Dr. Frank Breitling sowie bei all meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) und anderen Instituten des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, bedanken.

