

**Biomimetische Grenzflächen mittels
hierarchisch strukturierter Systeme
zur molekularen Erkennung**

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefugnis
für das Fach Physikalische Chemie
vorgelegt von**

Dr. Günter E. M. Tovar

**Fakultät Chemie
Universität Stuttgart**

Januar 2004

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1) Zusammenfassung.....	I
2) Einleitung.....	4
I) Chemisch reaktive Oberflächen für die kontrollierte Immobilisierung biologischer Rezeptormoleküle.....	6
a) Kolloidfunktionalisierung mittels Reaktionen bifunktionaler Moleküle.....	7
b) Supramolekulare reaktive Festkörperoberflächen mittels selbstorganisierender Organosilane.....	8
c) Reaktive Polymeroberflächen mittels Copolymerisation grenzflächen- aktiver Monomere	9
II) Polymerkolloide mit synthetischen molekularen Erkennungsstellen mittels molekularen Prägens.....	10
III) Integration kolloidaler Festkörper mit molekular erkennender Oberfläche in bioanalytischen Funktionselementen.....	12
3) Ergebnisse.....	14
I) Oberflächenreaktionen mittels bifunktionaler Organosilane bestimmen die Reaktivität kolloidaler Silicapartikel für die kovalente Bindung von Proteinmonoschichten und deren Bioaktivität.....	14
a) Die Konzentration der zur Reaktion eingesetzten bifunktionalen Organosilane definiert die Oberflächendichte der dadurch eingeführten reaktiven Gruppen	14
b) Durch Folgereaktionen mit bifunktionalen Molekülen werden an der modifizierten Oberfläche neue reaktive Gruppen kontrolliert eingebracht und sterisch für die Proteinkonjugation optimiert	14
c) Proteinrezeptoren binden unter Erhalt ihrer Rezeptorfunktion kovalent an die modifizierten Partikel	15
d) Poly(ethylenglycol)-modifizierung der Silica-Nanopartikel unterbindet die unspezifische Bindung adsorptiver Proteine	15
e) Cytokin-funktionalisierte Nanopartikel stimulieren spezifische Zell- antworten über molekulare Erkennung an der Partikeloberfläche	17
II) Selbstorganisierende Monoschichten aus Organosilanen.....	19
a) Oligo(ethylenglycol)-terminierte Organosilanmonoschichten verringern die unspezifische Adsorption von Proteinen	19
b) Binäre Mischungen aus Oligo(ethylenglycol)- und Alkyl-terminierten Silanen zeigen ebenfalls proteophobe Wirkung.....	19
c) Chelatkomplexierende Monoschichten gewährleisten die orientierte Immobilisierung bioaktiver Proteine.....	20

d)	Die spezifische Immobilisierung des Light Harvesting Complex II an NTA-SAM erhöht die Fluoreszenzausbeute des Proteinkomplexes.....	21
III)	Polymernanopartikel für proteinverträgliche Konjugationsreaktionen mittels	
Aktivester-Surfmeren		22
a)	Eine neue Klasse von Aktivestersurfmeren wird synthetisch erschlossen und erweist sich als grenzflächenaktiv	22
b)	Die Aktivestersurfmerer copolymerisieren mit Methylmethacrylat und Styrol zu Copolymernanopartikeln	22
c)	Die Surfmerer befinden sich vorzugsweise an der Partikeloberfläche	23
d)	Die Reaktivität der Aktivestersurfmerer gegenüber Hydrolyse und Konjugationsreaktion wurde mit Hilfe Isothermer Titrations-Mikrokalorimetrie bestimmt	23
e)	Die oberflächengebundenen Aktivestersurfmerer binden Proteine kovalent unter Erhalt deren Bioaktivität	24
IV)	Molekular geprägte Polymere in kolloidalem Format.....	24
a)	Die Miniemulsionspolymerisation ist zur quantitativen Synthese molekular geprägter Nanopartikel geeignet	24
b)	Die molekular geprägte Polymerkolloide sind chemisch definierte Nanomonolithe	25
c)	Die MIP-Kolloide diskriminieren in ihrem Adsorptionsverhalten enantiomere Template	26
d)	Mikrokalorimetrische Messungen an MIP-Kolloiden geben Aufschluss über die Spezifität der Templat-Polymer-Wechselwirkung	26
e)	Ein erweitertes Langmuir-Modell ermöglicht die mathematische Beschreibung der Adsorptionsprozesse des Templats an MIP-Kolloiden in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten	27
V)	Biomolekül-bindende Nanopartikel und –schichten als Selektoren in Festphase-gestützten bioanalytischen Funktionselementen.....	28
a)	Molekular erkennende Nanopartikel werden mit Hilfe von Polyelektrolytmultischichten als funktionelle monopartikuläre Schicht an Chipoberflächen verankert	28
b)	Die mikrostrukturierte Anlagerung Biomolekül-bindender Nanopartikel ermöglicht die Darstellung multifunktionaler Microarrays.....	30
c)	Molekular erkennende SAM-Oberflächen ermöglichen den Ligandennachweis mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations (MALDI)-Massenspektrometrie.....	32
d)	Biomolekül-bindende Nanopartikel erhöhen die Sensitivität der Affinitäts-MALDI-Massenspektrometrie.....	33
e)	Rezeptor-funktionalisierte Nanopartikel binden Peptide aus komplexen Mischungen selektiv und führen sie dem MALDI-MS-Nachweis zu	35
f)	Rezeptor-gebundene Proteinliganden werden von mikrostrukturiert abgeschiedenen Affinitätspartikeln für orts aufgelösten MALDI-TOF-MS-Nachweis präsentiert	35
g)	Die molekular geprägten Nanopartikel eignen sich zum Einsatz als Selektorphase in einer Kompositmembran.....	36
4)	Literatur.....	38

5) Anhang	50
I) Erklärung	50
II) Lebenslauf mit wissenschaftlichem Werdegang	51
III) Lehrtätigkeiten an der Universität Stuttgart	54
a) Vorlesungen und Praktika	54
b) Betreute Diplomarbeiten an Universitäten	54
c) Betreute Dissertationen	55
d) Betreute Studienarbeiten an Universitäten	55
e) Betreute Diplomarbeiten (FH).....	55
f) Betreute Studienarbeiten und Praxissemester (FH).....	56
IV) Publikationsliste.....	57
a) Wissenschaftliche Originalpublikationen.....	57
b) Patente und Patentanmeldungen (Auswahl).....	58
c) Proceedings / sonstige Artikel (Auswahl).....	60
d) Vorträge (Auswahl).....	63
e) Konferenzbeiträge / Poster (Auswahl)	64
V) Danksagung	68
VI) Kopien eigener Publikationen	70

1) Zusammenfassung

So genannte biomimetische Grenzflächen wurden mit Hilfe synthetischer und biologischer Materialien als hierarchisch strukturierte Multischichtsysteme aufgebaut, chemisch und strukturell analysiert und für molekulare Erkennungsreaktionen eingesetzt. Als funktionelle Schichten an der Festkörperoberfläche ahmen die synthetischen Konstrukte das biologisch zentrale Prinzip der molekularen Erkennung an der Fest/Flüssig-Grenzfläche nach.

Über drei unterschiedliche Wege wurden biologische Makromoleküle mit spezifischen Bindestellen chemisch kontrolliert an ultradünn organisch beschichteten anorganischen oder polymeren Festkörperoberflächen verankert. Alternativ dazu wurden synthetische Bindestellen während der Synthese polymerer Festkörper durch molekulares Prägen induziert. Die so erzeugten Funktionsmaterialien wurden entweder unmittelbar in bioanalytischen Verfahren eingesetzt oder zunächst zu mesoskopischen Strukturen weiterverarbeitet und dann als bioanalytische Funktionselemente verwendet.

Die chemisch reaktiven Oberflächen zur Bindung biologischer Rezeptoren wurden nach verschiedenen Methoden aufgebaut: (I) Bifunktionale Moleküle wurden mit Hilfe einer ihrer beiden funktionellen Gruppen mit Festkörperoberflächen zur Reaktion gebracht. Die zweite chemisch funktionelle Gruppe, die während der Reaktion der ersten Funktion mit der Oberfläche unbeeinflusst blieb, hielt nun ihrerseits spezifische Reaktionszentren zur Umsetzung mit Reaktanden an der Oberfläche bereit. Dieses zweistufige Vorgehen wurde am Beispiel der Reaktion von Organosilanen mit kolloidalen Silicapartikeln untersucht. Durch Kontrolle der Reaktionsbedingungen bei der Festphasenbindung des bifunktionalen Moleküls wurde die Dichte der funktionellen Gruppen für Folgereaktionen an der Oberfläche bestimmt. Folgereaktionen mit in gleicher Weise bifunktionalen organischen Molekülen wurden zur Modulation der Oberflächenstrukturen und ihrer chemischen Zusammensetzung eingesetzt, wobei die Oberflächendichte der reaktiven Zentren durch kontrollierte Reaktionsbedingungen gesteuert wurde. Eine Reihe von biologisch aktiven Proteinen wurde an diese aktivierten Kolloide gebunden und in ihrer Rezeptorfunktion charakterisiert. Cytokin-funktionalisierte Silica-Nanopartikel zeigten dabei in Zellassays bisher für partikuläre Systeme unbekannte zellmimetische Wirkung auf ihre Zielzellen. Zur Reduzierung unerwünschter unspezifischer Bindung von Proteinen wurden proteophobe Schichten durch die kovalente Anbindung von Poly(ethylenglycol) an die Kolloide erzeugt.

(II) Auch trifunktionale Moleküle wurden zur Funktionalisierung von Oberflächen eingesetzt. Zusätzlich zu zwei funktionellen Gruppen an den beiden räumlich entgegengesetzten Strukturenden wiesen diese Moleküle eine dritte Funktion auf: Aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit ordnen sich die Moleküle an einer Grenzfläche spontan zu strukturierten Schichten. Diese Selbstorganisation (*self-assembly*) wurde am Beispiel von Organosilanen untersucht, die an planaren Glas- oder Siliziumoxidoberflächen zu Monoschichten (SAM) abgeschieden wurden. Durch Folgereaktion mit organischen bifunktionalen Molekülen wurde eine mit zweiwertigen Metallionen komplexbildende funktionelle Gruppe an der Oberfläche verankert. Mit Hilfe dieser Funktionalität wurde unter Bildung

eines gemischten Chelatkomplexes aus oberflächengebundenem Molekül und spezifischen Peptidsequenzen der Proteine der biologische Rezeptor sterisch ausgerichtet an der Oberfläche immobilisiert.

(III) Eine weitere Variante zum Aufbau chemisch reaktiver Oberflächen zur Bindung biologischer Rezeptoren wurde am Beispiel polymerisierbarer Tenside untersucht. Die dazu synthetisierten Moleküle zeigten ebenfalls trifunktionale Eigenschaften. Sie wiesen eine polymerisierbare Ankergruppe, eine selbstorganisierende Funktion sowie eine Aktivestergruppe auf. Diese trifunktionalen Moleküle wurden mit klassischen Monomeren wie Styrol und Methylmethacrylat in radikalischer Emulsionspolymerisation zu nanoskopisch dimensionierten Copolymerpartikeln umgesetzt. Der Gehalt an trifunktionalen Molekülen in der Ausgangsemulsion bestimmte dabei den Partikeldurchmesser sowie die Dichte der funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche. Biologische Rezeptormoleküle wurden unter Erhalt der Molekül-bindenden Eigenschaft mit den Partikeln konjugiert, dies wurde am Beispiel des Proteins Streptavidin gezeigt und quantifiziert.

Eine neuartige Methode zur Darstellung von Polymerkolloiden mit synthetischen Bindestellen für Liganden biologischen Ursprungs wurde als Grundlage zur Synthese von degradationsstabilen Rezeptoren entwickelt. Am Beispiel der Copolymerisation von Methacrylsäure mit Ethylenglycoldimethacrylat wurden mittels Templatpolymerisation Copolymernetzwerke in kolloidaler Gestalt in radikalischer Miniemulsionspolymerisation nach dem Prinzip des molekularen Prägens in Gegenwart von als nichtpolymerisierbare Template wirkenden Aminosäurederivaten dargestellt. Die erhaltenen Kolloide wurden in ihrer chemischen Zusammensetzung und Struktur sowie in ihrem spezifischen Adsorptionsverhalten untersucht. Dabei gelang mittels mikrokolorimetrischen Messungen erstmals der Nachweis von durch Templatpolymerisation dargestellten nichtkovalenten Prägestellen.

Die mit Molekül-erkennender Funktion ausgestatteten Kolloide wurden in Suspension eingesetzt und auch zur Darstellung mesoskopischer Funktionselemente in bioanalytischen Methoden verwendet. Partikel-Mono- und Multischichten wurden durch Abscheidungsverfahren an planaren Oberflächen erzeugt. Dabei wurde durch die Modifizierung der Oberfläche mittels Polyelektrolytschichten nach dem Layer-by-Layer (LbL)-Verfahren die Zusammensetzung und Struktur der oberflächlichen Kolloidschichten gesteuert. Partikelmonoschichten aus molekular geprägten Polymerkolloiden wurden so als Molekülsensitive Beschichtung eines optischen wellenleiterspektroskopischen Sensors abgeschieden.

Die nach dem LbL-Verfahren verankerten Partikelschichten wurden durch die Adaption dreier unterschiedlicher Verfahren mikrostrukturiert. Der Einsatz photolithografischer Verfahren erzeugte in der Partikelschicht resultierende Negativabdrucke vorgefertigter Masken. Alternativ wurden dazu komplementäre Positiv-Abdrücke durch Einsatz der Technik des Mikrokontaktstempeln hergestellt. Mit Hilfe der Partikelabscheidung unter Verwendung von Roboter-gestützten Microspottern wurde eine Methodik zur Herstellung multifunktionaler Bio-Microarrays entwickelt und am Beispiel der spezifischen Nukleinsäure- und Proteinbindung untersucht. Eine Methode des massenspektrometrischen Nachweises oberflächengebundener Liganden wurde in verschiedenen Konfigurationen (SAM, Partikel, Partikelchip) mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-

Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) realisiert. Die Herstellung von Kompositmembranen mit zu Schichten abgedehnten molekular geprägten Polymerkolloiden als Selektor wurde untersucht und die Membranen charakterisiert.

Die zur Oberflächenfunktionalisierung eingesetzten Moleküle, der Verlauf der Oberflächenreaktionen sowie die molekülspezifischen Bindeereignisse an den Oberflächen wurden mit Hilfe von auf die jeweiligen Materialien spezifisch angepassten Untersuchungsmethoden charakterisiert. Zur Analyse der chemischen Zusammensetzung und Struktur der Einzelmoleküle sowie deren Eigenschaften wurden Experimente mit Hilfe von FT-IR-Spektroskopie, ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie, Isotherme Titrationsmikrokalorimetrie (ITC), Verbrennungselementaranalyse (EA), MALDI-TOF-MS, Wilhelmy-Waage-Grenzflächenspannungsmessungen und der Langmuir-Blodgett-Filmwaage durchgeführt. Die Kolloide wurden mit Hilfe von Dynamischer Lichtstreuung (DLS), Zetapotenzialmessungen, ITC, Partikelladungstitrationen (PCD), Rasterkraftmikroskopie (AFM), Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie (REM/TEM), konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, ^1H - und ^{13}C -NMR, EA und MALDI-TOF-MS untersucht. Zur Charakterisierung der planaren Oberflächen wurden Untersuchungen mittels Null-Ellipsometrie, Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), Kontaktwinkelmessungen, Optische Wellenleiterspektroskopie sowie AFM, REM, Licht- und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Durch den Einsatz dieses reichen Methodenspektrums konnten weitreichende Einsichten in Entstehung, Struktur und biomimetische Funktion der beschriebenen hierarchisch aufgebauten Materialien gewonnen werden.

Die Molekül-spezifisch bindenden Oberflächen wurden nach zwei grundsätzlich verschiedenen Prinzipien aufgebaut: Entweder wurden durch chemische Prozesse an der Oberfläche reaktive Gruppen kontrolliert verankert, die mit Hilfe einer weiteren Reaktion biologische Rezeptormoleküle unter Erhalt deren biologischer Aktivität an der Oberfläche immobilisieren. Oder es wurden während der Entstehung der Festkörperoberfläche synthetische Erkennungsstellen für biologische Ligandenmoleküle durch eine Templatpolymerisation dargestellt. Diese chemischen Reaktionen zur Ausstattung der Oberflächen für die molekulare Erkennung fanden an sphärischen Kolloiden oder makroskopisch ausgedehnten planaren Trägern statt. Weiterhin wurden die mit molekularer Erkennungsfunktion ausgestatteten Kolloide zu Schichten an planaren Trägern abgedehnt. Dabei wurden diese Schichten mikrostrukturiert, so dass lateral aufgelöste Mikrostrukturen mit multifunktionaler Oberfläche entstanden. Die Kolloid-Multischichtsysteme wurden als Funktionselemente in bioanalytischen Verfahren zur spezifischen Molekülbindung eingesetzt. Kompositmembranen mit molekular erkennenden Kolloiden als Selektoren wurden zur spezifischen Festphasenextraktion in Membranverfahren eingesetzt.

Die hier präsentierte Forschung an den dargestellten neuartigen nanoskopisch strukturierten Systemen führt zu einem weitreichenden Erkenntnisgewinn über die Struktur-Funktionsbeziehungen chemischer Systeme mit molekularer Erkennungsfunktion. Die vorliegende Arbeit leistet damit einen wesentlichen Beitrag zum weitergehenden Verständnis chemischer Funktionsmaterialien und erlaubt eine Erweiterung der Methoden zur Oberflächen-gestützten Analyse von Proben biologischen Ursprungs.

2) Einleitung

In der Natur ist das Prinzip der molekularen Erkennung von herausragender Bedeutung: Mit ihrer Hilfe findet die für das Leben unverzichtbare Kommunikation zwischen Systemen wie Zellkompartimenten, Zellen oder Organen statt. Die molekulare Erkennung erfolgt dabei in der Regel an abgeschlossenen Strukturen. Diese bestehen entweder aus nur einem Molekül, beispielsweise einem hormonellen Botenstoff, oder sie werden durch das supramolekulare Zusammenspiel mehrerer Einzelmoleküle gebildet. Die Komplexität solcher Aggregate variiert: Sie können chemisch homogen beispielsweise aus einzelnen Proteinen bestehen, wie bei einer Vielzahl von Proteinkomplexen oder aber es sind hochkomplizierte Gebilde bis hin zu sich beständig dynamisch verändernden Verbänden verschiedener Moleküle wie Zellen oder Gewebe. Alle diese Elemente kommunizieren über molekulare Erkennung miteinander – unabhängig von ihrem Aufbau oder ihrer Größe, die von wenigen Nanometern für lösliche Proteine bis hin zu Geweben und Organen reicht deren Gestalt makroskopische Dimensionen erreicht.^[1, 2]

Die Vermittler der molekularen Erkennung sind dabei vor allem Makromoleküle, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Monomeren aufgebaut sind und daher eine schier unerschöpfliche Struktur- und damit Funktionsvielfalt bieten.^[3] Dabei findet die Identifikation über miteinander attraktiv wechselwirkende, im Raum fixierte funktionelle Gruppen statt. Die Wechselwirkungskräfte sind dabei nichtkovalent und beruhen auf einer spezifischen Kombination von im besonderen Wasserstoffbrückenbindung mit van der Waals- und Dispersionskräften sowie elektrostatischer Kraft. Das räumlich orientierte Zusammenwirken dieser Kräfte vermittelt die spezifische Erkennung einzelner Moleküle in einem molekularen Bindeereignis, in dem die beteiligten Partner als Rezeptor und Ligand bezeichnet werden.^[4]

Für die Erkennungsreaktion wird der Bindepartner, also der Träger der eigentlichen Erkennungsstellen, häufig von chemisch hierarchisch aufgebauten Einheiten umgeben. Beispiel hierfür ist eine Zellmembran, welche aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Lipiden, Proteinen und weiteren Makromolekülen besteht, die auf supramolekularer Ebene wechselwirken. Die Funktionsfähigkeit einer Erkennungsstelle hängt häufig direkt und äußerst sensibel von ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung ab. Erst der hierarchische Aufbau dieser chemischen Umgebung ermöglicht letztlich also die biologische Funktion der Erkennung. Zudem definiert in der Regel die chemische Umgebung die Orientierung der Erkennungsstelle im Raum relativ zur zweidimensionalen Grenzfläche und wirkt so zusätzlich auf die biologische Funktion.^[5]

Die vorliegende Habilitationsschrift zeigt, wie biomimetische Grenzflächen mit molekularer Erkennungsfunktion durch den definierten Aufbau hierarchischer Strukturen an Festkörperoberflächen aufgebaut werden. Dabei werden durch die Kontrolle deren molekularer Zusammensetzung entweder mittels chemischer Reaktionen biologische Bindestellen an der Oberfläche räumlich angeordnet oder synthetische Bindestellen geschaffen (Abbildung 1). Solche Bindestellen werden anschließend zur spezifischen Bindung ihrer Liganden eingesetzt. Sind die Festkörper, deren Oberfläche auf diese Weise molekular erkennend ausgestattet wurden, nanoskopisch klein, so können sie zu mesoskopischen

Strukturen angeordnet und in größeren Verbänden zur spezifischen Erkennung eingesetzt werden (Abbildung 2). Diese Vorgehensweise ermöglicht ein Modellieren der Grenzflächeneigenschaften von der molekularen Ebene bis hin zu makroskopischen Dimensionen.

Methodisch verläuft die molekulare Ausstattung der Festkörperoberflächen mit Bindestellen nach zwei grundsätzlichen Vorgehensweisen: (I) Chemisch reaktive Oberflächen werden mittels bi- und trifunktionaler Moleküle aufgebaut und dann über chemisch komplementäre, reaktive funktionelle Gruppen mit biologischen Rezeptormolekülen versehen (Abbildung 1 (a) – (c)). Alternativ werden (II) synthetische Rezeptorstellen simultan zur Entstehung des Festkörpers an dessen Oberfläche induziert (Abbildung 1 (d)).

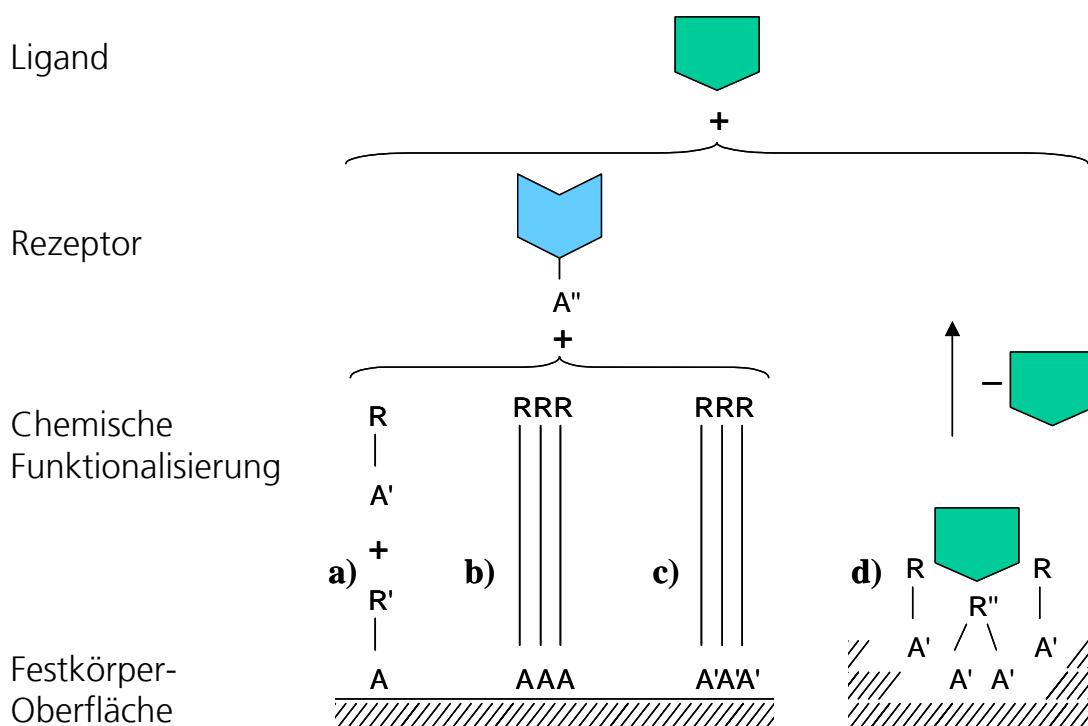


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktionsprinzipien beim Aufbau molekular definierter hierarchischer Strukturen für die molekulare Erkennung eines Liganden an der Flüssig/Fest-Grenzfläche: (a) Bifunktionale Organosilane mit einer reaktiven Silanankergruppe A werden an der Oberfläche kovalent gebunden und bringen eine variabel gestaltete funktionelle Gruppe R' ein. Diese reagiert mit einer zu R' chemisch komplementären und damit reaktiven funktionellen Gruppe A' eines weiteren bifunktionellen Moleküls. Die dadurch eingeführte funktionelle Gruppe R wird mit der Ankergruppe A'' eines biologischen Rezeptormoleküls zur Reaktion gebracht. (b) Wie a) mit zusätzlich langkettiger, möglicherweise substituierter Alkylgruppe zwischen den funktionellen Gruppen A und R ; die Ketten gehen eine untereinander kohäsiv wirkende supramolekulare Wechselwirkung ein und induzieren dadurch einen hohen strukturellen Ordnungsgrad in der resultierenden monomolekularen Schicht. (c) Analog zu b), hier mit radikalisch polymerisierbarer Ankergruppe A' zur Oberflächenfixierung durch Copolymerisation. (d) Simultane Bildung eines polymeren Festkörpers und an dessen Oberfläche induzierter synthetischer molekular erkennender Bindestellen nach der Methode des molekularen Prägens: Molekülgemische mit radikalisch polymerisierbarer Ankergruppe A' bringen funktionelle Gruppen R und R'' ein, welche mit einem nichtpolymerisierbaren Templat während und nach radikalischer Polymerisation räumlich orientiert wechselwirken; auch nach Extraktion des Templats bleiben räumlich fixierte Bindestellen für das Templat als Ligand im hochvernetzten Polymer erhalten.

Kolloidale Festkörper, die nach einem der vorangegangenen Verfahren mit molekular erkennender Funktion ausgestattet wurden, bringen ihre Erkennungsfunktion als mesoskopische Elemente in bioanalytische Funktionsschichten ein, indem sie (I) mittels supramolekularer Wechselwirkung an Festkörperoberflächen gebunden (Abbildung 2 (a)), (II) mit lichtabsorbierender Matrix an Massenspektrometrie-Targets abgeschieden (Abbildung 2 (b)) oder (III) als Selektorphase in Kompositmembranen integriert werden (Abbildung 2 (c)).

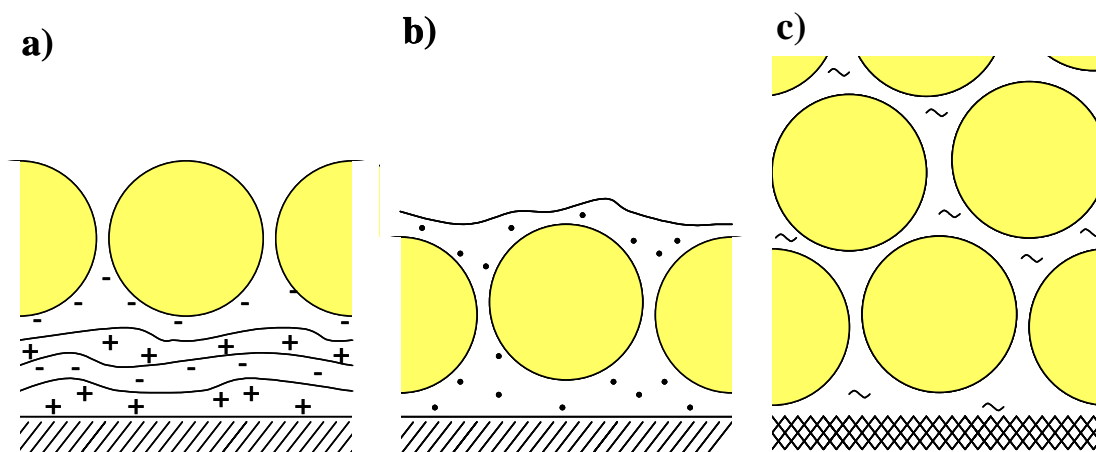


Abbildung 2: Sphärische Festkörper mit einem Durchmesser von ca. 80 nm – 200 nm, deren spezifisch molekülbindende Oberflächen nach den Methoden in Abbildung 1 definiert aufgebaut wurden, werden in bioanalytische Funktionselemente wie folgt integriert: (a) Molekular bindende Oberflächen werden erzeugt, indem mittels Layer-by-Layer (LbL)-Verfahren generierte Polyelektrolytmehrfachschichten an einem makroskopischen Festkörper verankert werden, welche ihrerseits als supramolekularer Anker für die Physisorption der Kolloide dienen. Die so fixierten Kolloide stellen ihre molekularen Bindestellen an der neu entstandenen makroskopischen Oberfläche für Bindereaktionen bereit. Mittels Photolithographie, Mikrokontaktstempeln oder Mikrospotting der Polyelektrolyt- oder Kolloidschicht entstehen (multi)-funktionelle mikrostrukturierte Oberflächen. (b) Kolloide werden in Suspension zur Bindung ihrer Liganden eingesetzt und führen diese durch Einbettung in eine dünne Schicht lichtabsorbierender Matrix einer MALDI-massenspektrometrischen Analyse zu. (c) Molekular geprägte Kolloide werden als Schicht in poröse Strukturen integriert und dienen in der entstandenen Kompositmembran als Selektor zur zielgerichteten Extraktion ihrer Bindepartner.

I) Chemisch reaktive Oberflächen für die kontrollierte Immobilisierung biologischer Rezeptormoleküle

Biologische Rezeptormoleküle sind Makromoleküle, die ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung in der spezifischen Anordnung ihrer chemisch funktionellen Gruppen tragen. Die richtige Aneinanderreihung der Einzelbausteine, beispielsweise von Nucleinsäuren oder Aminosäuren, ist dabei ein erster Schritt. Allerdings befähigt erst die dreidimensionale Anordnung von zunächst linearen Polymerketten insbesondere Proteine zu zielgerichteter und spezifischer Wechselwirkung mit ihren Bindepartnern. Damit diese fragilen Strukturen erhalten bleiben, stellen solche biologische Erkennungsmoleküle spezifische Ansprüche an ihre unmittelbare chemische Umgebung. Festkörperoberflächen sind für die meisten biologischen Makromoleküle unnatürlich und damit als Reaktionsumge-

bung ungeeignet. Durch ihre chemische Funktionalisierung können sie jedoch biokompatibel gestaltet werden.

Eine chemisch stabile Funktionalitätsänderung von Festkörperoberflächen kann mittels bifunktionaler Moleküle vorgenommen werden. Diese Moleküle besitzen zum einen eine sogenannte Ankergruppe, die aus chemischen Gruppen gebildet wird, die mit einer Festkörperoberfläche zur Reaktion gebracht werden kann und damit das Molekül kovalent am Träger verankert (siehe auch Abbildung 1 (a) – (c)). Die zweite Funktion stellt die Kopfgruppe solcher Moleküle dar und wird genutzt, um mit einer weiteren chemischen Reaktion oder durch Komplexierung biologische Rezeptormoleküle kovalent zu binden. Dabei wird die chemische Kopfgruppe des bifunktionalen Moleküls so gewählt, dass die Biokonjugation unter sanften Bedingungen vorgenommen werden kann und damit die fragile Struktur des biologischen Rezeptormoleküls während der Immobilisierung erhalten bleibt. Darüber hinaus ist für die sterisch anspruchsvolle Funktion der Rezeptorwirkung vor allem ihre räumliche Orientierung an der Grenzfläche ein kritischer Parameter und soll daher durch die chemische Oberflächenfunktionalisierung gesteuert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Habilitation wurden nach drei Darstellungsweisen biokonjugative Oberflächen zur kontrollierten Immobilisierung von biologischen Rezeptormolekülen erzeugt: (a) Bifunktionale Organosilanmoleküle mit einer zur Hydrolyse- und Kondensationsreaktion befähigten Ankergruppe und einer reaktiven Kopfgruppe wurden mit Silica-Oberflächen umgesetzt. Die so an der Oberfläche verankerte reaktive Kopfgruppe wurde wiederum mit bifunktionalen organischen Molekülen zur Reaktion gebracht und dergestalt zur Bindung des biologischen Rezeptormoleküls kettenverlängernd variiert. (b) Trifunktionale Organosilanmoleküle, die zusätzlich zu den bei (a) auftretenden Funktionen selbstorganisierende Eigenschaften besitzen, werden an Siliziumoxid- und Glasoberflächen als monomolekulare Schichten verankert. Die so an der Oberfläche gebundene Kopfgruppe wurde gegebenenfalls mit bifunktionalen organischen Molekülen zur Reaktion gebracht und zur Verankerung des biologischen Rezeptormoleküls auf diese Weise kettenverlängernd variiert oder zeigte unmittelbar bioaktive Wirkung. (c) Trifunktionale Moleküle, die in ihrer Struktur ähnlich zu (b) aufgebaut sind, die aber als Ankergruppe eine radikalisch polymerisierbare Gruppe tragen, werden mittels Copolymerisation mit Polymerpartikeln verknüpft und binden derart eine reaktive Kopfgruppe zur Verankerung des biologischen Rezeptormoleküls an der Partikeloberfläche.

a) Kolloidfunktionalisierung mittels Reaktionen bifunktionaler Moleküle

Organosilane mit der allgemeinen Strukturformel SiX_3R ($\text{X} = \text{OR}, \text{Hal}$) sind ausgezeichnet geeignet, anorganische und organische Phasen miteinander zu verbinden, da sie zwei Funktionen tragen: Eine mit mineralischen Oberflächen reagierende Silanankergruppe $-\text{SiX}_3$ und einen über die chemisch äußerst stabile Silizium-Kohlenstoffbindung verankerten organischen Rest R.^[6] Die Silangruppe kann unter Eingehen einer Hydrolyse-/Kondensationsreaktionsfolge kovalente Bindungen zu hydroxylierten Festkörperoberflächen ausbilden. Dabei wird im ersten Schritt die Si–X-Bindung hydrolytisch gespalten, Alkohol oder Halogensäure entstehen als Nebenprodukt. Die entstandene substituierte Kieselsäure kann nun mit der hydroxylierten Festkörperoberfläche Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und wird dadurch physisorptiv gebunden. Besondere Stabili-

tät erhält die Oberflächenfunktionalisierung durch die folgende Chemisorption, bei der eine Silanolgruppe der substituierten Kieselsäure mit einer beispielsweise an einer SiO_2 -Oberfläche vorhandenen Silanolgruppe eine Kondensationsreaktion unter Ausbildung von Siloxanbindungen eingeht.

Die weiteren Silanolgruppen des nun kovalent gebundenen Moleküls bleiben entweder erhalten und tragen durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilität der Struktur bei, alternativ kondensieren sie mit benachbarten Silanolgruppen unter Ausbildung weiterer Siloxanbindungen. Diese Reaktion kann allerdings auch zu einer Polymerisation in die dritte Dimension von der ursprünglichen Grenzfläche wegführen. Eine Bildung ungeordneter Molekülmultischichten ist die Folge. Dieses Reaktionsverhalten wird insbesondere dann beobachtet, wenn kurzkettenartige Reste R verwendet werden.^[6] In jedem Fall aber wird die organische Funktion R durch die gebildete Siloxanschicht an der Oberfläche exponiert. Ist diese Gruppe derart gewählt, dass sie mit weiteren organischen Molekülen zur Reaktion zu bringen ist, können in Folge(n) chemisch hierarchische Strukturen aufgebaut werden, mit deren Hilfe unter Steuerung einer räumlichen Anordnung biologische Rezeptormoleküle bei Erhalt ihrer Funktion immobilisiert werden.

Kolloidale Partikel sind von steigender Bedeutung für die Biotechnologie, beispielsweise um Proteine oder Nucleinsäuren bei der Aufarbeitung oder Anwendung besser handhaben zu können. Dabei konzentrierten sich Forschung und Anwendung lange Zeit auf Mikropartikel. Erst in jüngster Zeit erlangen hier Nanopartikel mit einem Durchmesser kleiner als $1 \mu\text{m}$ als Forschungsthema zunehmende Bedeutung. Kolloidale Silica-Kügelchen eignen sich als flexibel funktionalisierbare anorganische Träger biologischer Funktionen und sind damit besonders interessante Werkzeuge für die chemische Forschung im Grenzgebiet zu Biotechnologie und Biomedizin.^[7] Organosilane können mit mineralischen, besonders silicatischen Oberflächen jeder Morphologie zur Reaktion gebracht werden. In der Biotechnologie und Biomedizin finden planare Träger vor allem als diagnostische oder sensorische Transducerelemente Verwendung.

b) Supramolekulare reaktive Festkörperoberflächen mittels selbstorganisierender Organosilane

Als trifunktionale Organosilane werden Moleküle bezeichnet, die zusätzlich zur Silanankergruppe und organischen Kopfgruppe eine weitere Funktion einbringen, die zu einer nichtkovalenten attraktiven Wechselwirkung der Moleküle führt, welche parallel zur Grenzfläche ausgerichtet ist. Diese kohäsive Wechselwirkung führt im Zusammenspiel mit der Interaktion zwischen den Ankergruppen und der Festkörperoberfläche zur spontanen Bildung einer monomolekularen Schicht.^[8-12] Die entstehenden Strukturen zeichnen sich durch ihren hohen Ordnungsgrad aus und werden als *self-assembled monolayer* (SAM) oder selbstorganisierende Monoschichten bezeichnet.

Ihre Fähigkeit zur Selbstorganisation erhalten Organosilane dadurch, dass zwischen ihrer Silanankergruppe und der organischen Kopfgruppe langkettige Alkylsegmente inseriert sind. An den seit seiner Einführung durch Sagiv vermutlich bestuntersuchteten Organosilanen Octadecyltrichlorsilan^[13] wurde gezeigt, dass die zunächst hydrolysierten und an einem dünnen Wasserfilm an der Festkörperoberfläche physisorbierten Silanmole-

küle^[14] eine laterale Beweglichkeit der Einzelmoleküle innerhalb der zweidimensionalen Schicht aufweisen können, die der Beweglichkeit von Lipiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche gleichkommt. Damit wird durch mögliche Restrukturierungsprozesse die Ausbildung von Strukturen höheren Ordnungsgrades während der physisorptiven Phase an der Grenzfläche ermöglicht.^[15] Als Träger werden häufig hochreine Siliziumwafer verwendet, welche bei Sauerstoffkontakt an Luft eine 2.0 nm bis 2.5 nm dünne Siliziumdioxidschicht ausbilden. Die Oberfläche dieser vier bis fünf Siloxaneinheiten dünnen Schicht weist Siloxan- und Silanolgruppen auf. Mittels sowohl basisch als auch sauer katalysierter Hydrolyse kann sie zu einer reinen Silanoloberfläche vereinheitlicht werden. Durch eine Kondensationsreaktion unter Beteiligung der Silanolgruppen adsorbierter Moleküle sowie der festen Grenzfläche, welche mit organischen Basen katalysiert werden kann,^[16] entstehen kovalente Siloxanbindungen und somit eine Chemisorption, welche nur durch eine erneute Hydrolyse rückgängig zu machen ist.^[17]

Werden Organosilane mit nur einer hydrolysierbaren funktionellen Gruppe am Silan verwendet, wird eine Polymerisation in die dritte Dimension von der Oberfläche weg ausgeschlossen. Sie wurde für bi- oder trihydrolysierbare Silane beobachtet.^[18] Kondensieren solche monohydrolysierbaren Organosilane, kann nur die Reaktion mit der Oberfläche und damit eine Chemisorption stattfinden. Alternativ formiert sich eine unreaktive Siloxanspezies durch die Kondensation zwischen benachbarten Silanolmolekülen, welche im weiteren Verlauf von der Oberfläche desorbieren können und Platz machen für die kovalente Bindung anderer hydrolysiertes Organosilane, welche in Folge kovalent an der Oberfläche binden können.^[18]

Organosilane mit funktionellen Kopfgruppen können reaktive Zentren für Folgereaktionen einbringen. Dieser höhere Grad an Funktionalität der Moleküle geht allerdings häufig mit einem geringeren Schichtordnungsgrad gegenüber nichtfunktionalisierten n-Alkylsilanen einher. Epoxy-,^[19, 20] Amino-,^[21] Vinyl-Gruppen^[22] sowie eine Reihe weiterer funktioneller Kopfgruppen^[23] wurden auf diese Weise mit SAM an mineralischen Oberflächen verankert.

Die Verwendung von trifunktionalen Organosilanen ermöglicht es also im besonderen Maße, die Chemie und Struktur an der Grenzfläche zu kontrollieren und schafft damit besonders günstige Voraussetzungen zur gerichteten spezifischen und orientierten Bindung biologischer Moleküle. Auch die Wechselwirkung dieser Grenzfläche mit Biomolekülen, insbesondere die Vermeidung unerwünschter Proteinadsorption, wird mit Hilfe einer solchen monomolekularen Schicht kontrollierbar.

c) Reaktive Polymeroberflächen mittels Copolymerisation grenzflächenaktiver Monomere

Polymerpartikel können für Biokonjugationsreaktionen mit trifunktionalen Molekülen, die eine Ankergruppe, eine reaktive Kopfgruppe sowie ein die Selbstorganisation an einer Grenzfläche induzierendes Strukturelement aufweisen, vorbereitet werden.^[24-27] Dabei können die Kopfgruppe und das selbstorganisierende Strukturelement den oben besprochenen Organosilanen entsprechen, die Ankergruppe muss der Polymerchemie angepasst werden. Für die Bindung funktionaler Moleküle an Polymerpartikel, welche durch

radikalische Polymerisation dargestellt werden, bietet sich die Einführung einer radikalisch polymerisierbaren Ankergruppe an. Die Verankerung kann so bereits während der Entstehung des Polymers durch Copolymerisation stattfinden.

Kolloidale Polymerpartikel werden im wissenschaftlichen Labor wie in der industriellen Produktion überwiegend mit Hilfe der zweiphasigen Emulsionspolymerisation dargestellt.^[28] Dabei werden Polymere in durch Tenside grenzflächenstabilisierten kugelförmigen Kompartimenten kontrolliert gebildet.^[29, 30] Sind grenzflächenaktive polymerisierbare Moleküle in diesem heterophasigen System enthalten, so organisieren sie sich an der Öl/Wasser-Grenzfläche und setzen deren Grenzflächenenergie herab. Folgerichtig werden solche Moleküle als polymerisierbare Tenside oder auch Surfmerer bezeichnet (der Begriff verweist dabei auf die Funktionen *surfactant* und *monomer*).^[31, 32] Analog zu unpolymerisierbaren Tensiden sind Surfmerer mit anionischer,^[33] kationischer^[24, 34] und nichtionischer^[35] hydrophiler Gruppe bekannt. Die Einsatzfähigkeit als polymerisierbare Ankergruppe in Surfmeren ist für eine Reihe prominenter Polymergrundbausteine wie Acryl-,^[36] Acrylamid-,^[37] Methacryl-,^[38, 39] Maleat-^[34] sowie Styrol-Gruppen^[35] gezeigt worden.

Als reaktive funktionelle Gruppe wurde für die hier beschriebenen Surfmerer ein so genannter „Aktivester“ ausgewählt.^[40] Ein solcher Ester kann unter bioverträglichen Reaktionsbedingungen in hoher Ausbeute mit Nucleophilen umgesetzt werden.^[41]

Polymerkolloide für die Biokonjugation können auch in mehrstufigen Prozessen durch die nachträgliche Oberflächenfunktionalisierung bereits gebildeter Polymerteilchen dargestellt werden. Doch gerade die Verwendung von Surfmeren mit einer reaktiven Gruppe für die Biokonjugation eröffnet die besonders elegante Möglichkeit, die Dichte der konjugativen Gruppen an der Partikeloberfläche schon während der Partikeldarstellung zu steuern. Genau dies schafft die Voraussetzungen für die kontrollierte und ortsgerichtete Immobilisierung von biologischen Molekülen in einer einstufigen Reaktion.

II) Polymerkolloide mit synthetischen molekularen Erkennungsstellen mittels molekularen Prägens

Ein generelles Problem bei der Verwendung von Proteinen als Erkennungselemente in technologischen Prozessen besteht in deren limitierter Stabilität. Während ein lebendes System auf molekularer Ebene eine kurze Halbwertszeit ihrer vitalen Funktionsträger aufgrund des Kreislaufprinzips und der beständigen Regeneration der Materialien ohne weiteres tolerieren kann, ist diese Instabilität für avisierte technische Anwendungen von molekularerkennenden Elementen ein limitierender Faktor.

Chemisch dargestellte Rezeptoren weisen im Allgemeinen eine deutlich höhere Stabilität auf als biologische Makromoleküle. Chemiker haben bereits in Form synthetischer Moleküle eine ganze Reihe von komplexierenden und molekularerkennenden Strukturen realisiert.^[42, 43] Parallel zum Aufbau strukturell aufwändiger Einzelmoleküle mit molekularer Erkennungsfunktion mit Hilfe der organischen Synthese ist in den letzten zehn Jahren die Methodik des molekularen Prägens (*molecular imprinting*) entstanden.^[44-47]

Diese wurde inspiriert durch die (Aufbau)prinzipien der Natur, in der die Sequenz und insbesondere die räumliche Anordnung funktioneller Gruppen in Makromolekülen wie zum Beispiel Proteinen komplexe und hoch spezifische Erkennungsstellen bilden: Ein Polymer Netzwerk wird in Gegenwart nicht-polymerisierbarer Template synthetisiert, wobei zwischen funktionellen und strukturellen Gruppen der Template und der polymerisierenden Monomere räumlich orientierte Wechselwirkungen stattfinden. Eine Extraktion der Template schafft im Polymer und vor allem an dessen Oberfläche molekulare Hohlräume. Diese erzeugen in Folge der so räumlich orientiert angeordneten funktionellen Gruppen im Polymer Netzwerk eine molekularspezifische Bindestelle.^[44-48]

Reaktionsprodukte des molekularen Prägens sind hochvernetzte Polymermonolithe, welche vielen in der Polymerwissenschaft üblichen Analysemethoden unzugänglich sind.^[49] Ihre Gestalt wird durch die geometrischen Bedingungen des Reaktionsgefäßes bestimmt. Für die chromatographische Charakterisierung, beispielsweise mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), werden solche Monolithe durch Stoßen und Mahlen zerkleinert und dann entsprechende Bruchstücke geeigneter Größe durch ein Größenausschlussverfahren ausgewählt.^[50] Für die Anwendung des geprägten Materials als selektive stationäre Phase in der HPLC sind Bruchstücke mit einem Durchmesser von ca. 10 µm bis 20 µm gut geeignet. Diese werden typischerweise in einer Ausbeute von maximal 20 % gewonnen. Geprägte Materialien wurden auch als Selektoren in der Festphasenextraktion^[51-54] oder in der Kapillarelektrochromatographie eingesetzt.^[55, 56] Für andere Geometrien geprägten Materials ist ein Weg, seine Synthese in Reaktionsgefäßen spezifischer Geometrien (mold) durchzuführen. In diesem Sinne wurden Kapillaren gefüllt,^[57] Säulen gepackt,^[58] oder Filtrationsmembranen erzeugt.^[59, 60]

Die nun gelungene Synthese von molekular geprägten Polymeren in zweiphasigen Öl/Wasser-Systemen als Kolloide^[61-66] hat entscheidende Vorteile gegenüber der traditionellen Darstellung makroskopischer Monolithe: Zum einen lassen sich die Polymerisationsbedingungen in solchen Zweiphasensystemen deutlich einfacher kontrollieren als bei einer *bulk*-Monolithsynthese. Zum anderen entsteht das molekular geprägte Polymer unmittelbar in einem Format mit großem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, also einer großen Austauschfläche mit möglichen Erkennungsstellen. Es entfällt nicht nur die ansonsten obligate Zugabe von Porogenen zur Erzeugung einer großen spezifischen Oberfläche, sondern auch das aufwändige und die Ausbeute reduzierende Zerstoßen, Mahlen und Sieben. Zudem ersetzen sphärische Partikel in einer definierten Morphologie die aus dem Zerkleinerungsprozess stammenden irregulär geformten Bruchstücke.^[66]

Im Gegensatz zu den kinetisch kontrollierten Emulsionspolymerisationsprozessen, welche zur Erzeugung kolloidaler molekular geprägter Polymere eingesetzt wurden,^[61-63] wurde für die Synthese der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen molekular geprägter Polymerkolloide die Miniemulsionspolymerisation gewählt, da dieses Verfahren die prinzipiellen Voraussetzungen bietet, alle zur Generierung der synthetischen Bindestellen notwendigen Komponenten – Monomere, Vernetzer und Template – nahe ihres Reaktionsortes vorzulegen.^[64] Die mittels thermisch oder photochemisch initiiertes radikalischer Polymerisation generierten Kolloide wurden umfassend charakterisiert und nach Extraktion der Template für molekulare Bindeversuche eingesetzt und in ihren molekular erkennenden Eigenschaften analysiert.^[64, 65]

III) Integration kolloidaler Festkörper mit molekular erkennender Oberfläche in bioanalytischen Funktionselementen

Sphärische Kolloide können an Festkörpergrenzflächen zu mehr oder minder dicht gepackten Schichten adsorbiert werden.^[67] Dabei ist sowohl für die erzielte Packungsdichte als auch für die Stabilität der entstehenden Struktur das Verhältnis zwischen Partikel-Festkörperoberfläche-Wechselwirkungen sowie interpartikulären Interaktionen von entscheidender Bedeutung.^[68] Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die attraktiven Kräfte zwischen Partikeln und Festkörper zu steuern, beispielsweise durch chemische Kopplung oder elektrostatische Anziehung.^[68, 69] Insbesondere die Kontrolle von Ladungen an Festkörperoberflächen gibt flexible Möglichkeiten an die Hand, um die in der Regel geladenen Kolloide an eine Oberfläche zu binden.^[69-71]

Das Aufbringen von Polyelektrolyt-Multschichten nach dem sogenannten Layer-by-Layer (LbL)–Verfahren ermöglicht die flexible Kontrolle über die Ladungsverteilungen an Festkörperoberflächen über einen weiten Bereich.^[69, 72, 73] LbL-Schichtsysteme wurden dementsprechend verwendet, um Partikel an Oberflächen zu verankern.^[70] Tragen die Kolloide an ihrer Oberfläche molekulare Bindestellen, bleiben diese inklusive ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung dabei an der dem Festkörper abgewandten Seite erhalten.^[74, 75] Darüber hinaus können so aufgebrachte Kolloidanordnungen mit Hilfe verschiedener Verfahren mikrostrukturiert werden und damit modular multifunktionelle Biochipoberflächen erzeugt werden.^[74]

Zur Erfassung des enormen Informationsgehaltes von Genomen und Proteomen wird zunehmend die Biochip-Technologie in Forschung und Technik avisiert, in welcher Daten parallel und häufig automatisiert gewonnen werden sollen. Insbesondere die DNA-Chiptechnologie wird bereits seit einigen Jahren in der biologischen und medizinischen Forschung intensiv eingesetzt.^[76] Um nun analog auch die eigentlichen Funktionsträger der häufigsten biologischen Aktivitäten, die Proteine und ihre Interaktionsmuster, mit Hilfe Chip-basierter Systeme untersuchen zu können, stellen sich angesichts dieser komplexen Molekülgattung die Anforderungen an eine kontrollierte Oberflächenchemie mikrostrukturierter Träger im Gegensatz zu DNA-basierten Systemen als deutlich anspruchsvoller dar. Zugrunde liegt dem zum einen die ungleich größere Bandbreite von chemischen Variationen, da Proteine im Wesentlichen aus 20 Aminosäuren aufgebaut sind, die eine große Varianz an funktionellen Seitengruppen aufweisen. DNA-Moleküle dagegen sind von lediglich vier unterschiedlichen Nukleotiden codiert, die in ihrer Chemie deutliche Ähnlichkeiten aufweisen.^[1-3] Zum anderen benötigen Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren für ihre Funktionalität als Bindepartner eine – durch den Kontakt mit Festkörperoberflächen häufig negativ beeinflusste – intermolekulare dreidimensionale Struktur. Dementsprechend befindet sich die Forschung an Protein-Microarrays noch in einem sehr frühen Stadium und stimuliert ein äußerst dynamisches Forschungsgebiet rund um die Erzeugung und Anwendung von Protein-Microarrays.^[77-84]

In der hier vorliegenden Habilitationsarbeit wird eine Methodik zur Darstellung von Protein-Microarrays beschrieben, die in einem zweistufigen Prozess die chemische Gestaltung der unmittelbaren Umgebung der Proteinrezeptoren an der Festkörperoberfläche (*bottom-up*) mit der physikalischen Erzeugung der mikrostrukturierten Trägeroberflä-

che (*top-down*) kombiniert: Zunächst werden kolloidale Partikel an ihrer Oberfläche proteinbindend ausgestattet, dann werden diese Partikel über LbL-Schichten mikrostrukturiert an makroskopische feste Träger gebunden.^[74, 75] Die entstehenden mikrostrukturierten Träger eignen sich als Biochips für die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen und ermöglichen in der DNA-Chiptechnologie im Vergleich zu etablierten Verfahren zudem eine signifikante Sensitivitätssteigerung.^[85]

Die affinen planaren oder kolloidalen Oberflächen wurden als selektive Träger für die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations (MALDI)-Massenspektrometrie eingesetzt. MALDI-MS hat sich seit ihrer Entdeckung durch Karas und Hillenkamp^[86, 87] zu einer physikalisch-chemischen Analysemethode mit herausragender Bedeutung für die *Life Sciences* etabliert.^[88] Biomoleküle werden dazu in eine dünne Schicht einer lichtabsorbierenden Matrix eingebettet, durch LASER-Beschuss schonend als intaktes Teilchen desorbiert und entweder zu typischerweise einfach oder zweifach geladenen Ionen ionisiert. Diese Ionen werden dann beispielsweise durch Flugzeitanalyse über ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z direkt identifiziert oder es werden Strukturdaten bis hin zur Proteinsequenzierung durch gezielt eingesetzte Zerfallsprozesse gewonnen, die mit Daten aus Strukturdatenbanken verglichen werden können.^[89, 90] Ein entscheidender Schritt vor jeder Analyse ist jedoch die Desorption der untersuchten Moleküle von der Festkörperoberfläche bei gleichzeitiger Ionisation. Der genaue molekulare Mechanismus des MALDI-Prozesses ist noch immer ungeklärt.^[91] Eine maximale Ausbeute desorbierter und ionisierter Teilchen wird beobachtet, wenn die Analytmoleküle mit der lichtabsorbierenden Matrix, bestehend aus niedermolekularen organischen Verbindungen mit konjugierten π -Elektronensystemen wie 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure) oder α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Co-Kristall-Schichten bilden. Um den Nachweis von Peptiden und Proteinen auch aus Mischungen zu ermöglichen, wurden affine Oberflächen zur Vorreinigung der Analyten verwendet, welche dann als Träger für eine anschließende MALDI-MS Analyse dienen.^[92-95]

Molekular geprägte Polymerkolloide können als Schicht in miteinander verklebte Mikrofiltrationsmembranen eingebracht und auf diese Weise eine Kompositmembran hergestellt werden, in der die molekular geprägten Polymernanopartikel als Selektor fungieren.^[96-98] Die in der oberflächennahen Schicht der sphärischen Nanopartikel zugänglichen spezifischen Bindestellen trennen über molekulare Erkennung spezifisch ihre Liganden aus einem Stoffgemisch während dieses durch die Kompositmembran strömt. Verfahrenstechnisch handelt es sich hierbei um einen modifizierten Festphasenextraktionsprozess. Entscheidende Vorteile dieses modularen Ansatzes gegenüber Verfahren zur Erzeugung direkt molekular geprägter oder funktionalisierter Membranen, sind sowohl die einfache Herstellung der Kompositmembran als auch die extrem hohe Oberflächendichte der Prägestellen.

3) Ergebnisse

I) Oberflächenreaktionen mittels bifunktionaler Organosilane bestimmen die Reaktivität kolloidaler Silicapartikel für die kovalente Bindung von Proteinmonoschichten und deren Bioaktivität

Die Oberflächenfunktionalisierung mineralischer Oberflächen für die bioaktive Immobilisierung von Proteinrezeptoren mittels bifunktionaler Organosilane wird am Beispiel kolloidaler Silicapartikel aufgezeigt.^[99] Die Kontrolle über die chemischen Funktionalitäten an der Festphasenoberfläche sowie deren strukturelle Beschaffenheit ermöglicht, die Bioaktivität der resultierenden Proteinschichten zu optimieren.^[7, 100]

a) Die Konzentration der zur Reaktion eingesetzten bifunktionalen Organosilane definiert die Oberflächendichte der dadurch eingeführten reaktiven Gruppen

Sphärische Silica-Nanopartikel mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm wurden mittels Sol-Gel-Synthese^[101] aus Tetraethoxysilan nach der von Stöber entwickelten Methode^[102] dargestellt. Da diese Partikel in der Gegenwart von Wasser hergestellt wurden, ist ihre Oberfläche dicht mit Silanolgruppen belegt. Mittels des bifunktionalen 3-Aminopropyltriethoxysilans (APS) wurden nun primäre Aminogruppen als reaktive Gruppen durch Hydrolyse-/Kondensationsreaktionen der Triethoxysilanankergruppe mit Silanolgruppen der Partikel an der Partikeloberfläche fixiert. Die Nanopartikel wurden dabei vor und nach der chemischen Oberflächenmodifizierung durch verschiedene voneinander unabhängige Methoden charakterisiert.^[99]

Zetapotenzialmessungen zeigen sehr deutlich den Wechsel der Oberflächeneigenschaften durch die Reaktion. Bei einem pH = 4.7 zeigen die ursprünglichen Partikel ein Zetapotenzial von -23 mV, welches durch die Reaktion mit APS ins Positive verschoben wird. Dabei ist das Ausmaß der Zetapotenzialverschiebung direkt von der zur Reaktion eingesetzten APS-Konzentration abhängig und erreicht mit +47 mV das Maximum.^[99] Weder mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) noch Dynamischer Lichtstreuung (DLS) wurde eine Schichtdickenzunahme durch die Reaktion beobachtet. Die Effizienz der organischen Oberflächenmodifizierung wurde mittels Elementaranalyse zu einer maximalen Oberflächendichte von 1.8 Aminogruppen pro nm² quantifiziert.^[99]

b) Durch Folgereaktionen mit bifunktionalen Molekülen werden an der modifizierten Oberfläche neue reaktive Gruppen kontrolliert eingebracht und sterisch für die Proteinkonjugation optimiert

Die durch die Silanisierung eingebrachten reaktiven Gruppen sind für eine direkte Immobilisierung raumerfüllender Proteine wie Streptavidin^[103] oder Streptactin, einer Mutante des Streptavidins,^[104] noch nicht optimal geeignet.^[99] Am Beispiel einer Umsetzung von aminofunktionalisierten Partikeln mit Bernsteinsäureanhydrid wurde der positive Ein-

fluss der mit einer Kettenverlängerung einhergehenden Modifizierung der zunächst eingebrachten reaktiven Gruppe dargestellt.^[99] Bernsteinsäureanhydrid reagiert ringöffnend als bifunktionales Agens, bildet dabei mit dem oberflächengebundenen primären Amin eine Amidbindung aus und bringt seine zweite Carbonsäure als neue reaktive Gruppe an der Oberfläche ein. Die Reaktion lässt sich in Suspension so führen, dass sie quantitativ verläuft, also die ursprünglich an der Oberfläche verankerten Aminogruppen vollständig in freie Carbonsäuren überführt werden und dabei der Linker zwischen fester Partikeloberfläche und reaktiver Gruppe zur Proteinkonjugation verlängert wird.^[99] Diese Umsetzung hängt direkt von der Konzentration des bifunktionalen Moleküls ab. Mittels Polyelektrolyttitrationen unter Verwendung eines Partikelladungsdetektors (PCD), welcher die Partikel starken Scherkräften aussetzt und dadurch die diffuse Ionenschicht um die Partikel teilweise abschert, wurde beobachtet, dass die so eingebrachten Carbonsäuregruppen für Makromoleküle besser zugänglich sind als die ursprünglich vorhandenen Aminogruppen.^[99]

c) **Proteinrezeptoren binden unter Erhalt ihrer Rezeptorfunktion kovalent an die modifizierten Partikel**

Streptavidin^[103] und Streptactin^[104] sind tetramere Proteine, welche vier für Reaktionen zugängliche primäre Aminogruppen tragen – drei Lysinseitengruppen und den N-Terminus. Die Reaktivität der chemisch funktionalisierten Silicapartikel wurde am Beispiel deren Umsetzung mit Streptavidin und Streptactin demonstriert.^[99] Dabei hängt das Ausmaß der Umsetzung direkt von der Konzentration der Reaktanden, hier von der Proteinkonzentration, ab und konvergiert gegen einen Maximalwert. Die Menge der bioaktiv gebundenen Proteine wurde mittels fluorometrisch quantifizierbarer Ligamentitrationen bestimmt. Dabei wurde nachgewiesen, dass mit der hier beschriebenen dreistufigen Oberflächenreaktion im Vergleich zu bislang bekannten partikulären Systemen für die Streptavidinimmobilisierung^[105] eine dreifach höhere Proteindichte an der Partikeloberfläche erzielt wurde. Mit der hier angewendeten Immobilisierungsstrategie wurde die bioaktive Verankerung von je einem Streptavidinmolekül pro Fläche von 90.9 nm² erzielt.^[99]

d) **Poly(ethylenglycol)-modifizierung der Silica-Nanopartikel unterbindet die unspezifische Bindung adsorptiver Proteine**

Als „unspezifische Bindung“ von Proteinen wird häufig deren Physisorption bezeichnet. Bei dieser findet keine spezifische Wechselwirkung zwischen dreidimensional angeordneten funktionellen Gruppen der Oberfläche und den Proteinen – also eine molekulare Erkennung – statt. Die adhäsive Wechselwirkung beruht grundsätzlich jedoch auf den gleichen Kräften wie die molekulare Erkennung, im besonderen auf einer hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen sowie Dispersionskräften.^[106] Proteophobe Oberflächen minimieren die attraktive Wirkung dieser Kräfte auf Proteine, so dass deren Solubilisierung energetisch günstiger wird und sie nicht an der Oberfläche adherieren.

Poly(ethylenglycol)-modifizierte Oberflächen wirken inert gegenüber der Adsorption von Proteinen.^[107] Die Reduktion der unspezifischen Adsorption beruht auf der chemi-

schen Struktur der Polymerketten sowie ihrer an der Festkörper/Wasser-Grenzfläche eingenommenen Konformation, die bedeutende attraktive Kräfte zwischen Oberfläche und Protein verhindern. Poly(ethylenglycol)ketten sind ungeladen, demzufolge sind elektrostatische Kräfte ausgeschlossen. Desweiteren sind diese Moleküle hydrophil und entsprechend stark hydratisiert- ohne Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Folgerichtig ist auch eine attraktive hydrophobe Wechselwirkung auszuschließen.^[108] Poly(ethylenglycol)ketten besitzen große Freiheitsgrade bezüglich ihrer Konformation und ragen als mobile Ketten in die Wasserphase hinein. Eine Bindung eines Biopolymers an diese Ketten würde deren Konformationsfreiheitsgrade stark einschränken und wäre damit energetisch und entropisch ungünstig.

Carboxyfunktionalisierte Silica-Nanopartikel wurden über Umsetzungen mit APS- und Bernsteinsäureanhydrid dargestellt und mit einem Amino-poly(ethylenglycol)methylether der mittleren Molmasse 2000 g mol^{-1} und damit einer mittleren Ethylenglycol-Wiederholungseinheit von ca. 45 nach der Carbodiimid-Methode^[109] umgesetzt. Die so funktionalisierten Partikel zeigten sich vollständig inert gegenüber der Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA), einem Molekül, welches üblicherweise ein hohes Ausmaß unspezifischer Bindung an den unterschiedlichsten Oberflächen zeigt.^[107] In diesem Sinne zeigten native Silica-Nanopartikel oder zu Vergleichsexperimenten dargestellte Silica-Nanopartikel, welche durch Oberflächenreaktionen mit Amino-, Carboxy-, Aminodextran- oder Carboxydextran-Funktionen versehen wurden, alle ein zum Teil erhebliches Ausmaß unspezifischer Adsorption von BSA (siehe Abbildung 3 (a)).^[110]

Statt des Methylether-terminierten Amino-poly(ethylenglycol)s wurde auch ein Gemisch dieses proteophoben Moleküls mit einem bireaktiven Poly(ethylenglycol), nämlich einem Diamino-poly(ethylenglycol) der mittleren Molmasse 644 g mol^{-1} bei dem eine Aminofunktion mit einer Boc-Schutzgruppe versehen war, mit den Carboxyfunktionalisierten Silica-Nanopartikeln umgesetzt. Durch Umsetzung der geschützten Amino-Gruppen mit Trifluoressigsäure entstanden Silica-Nanopartikel mit einer gegenüber unspezifischer Proteinadsorption weitgehend inerten Poly(ethylenglycol)-Schale sowie zur Biokonjugation einsetzbarer Amino-Gruppen (Abbildung 3 (b)).^[111]

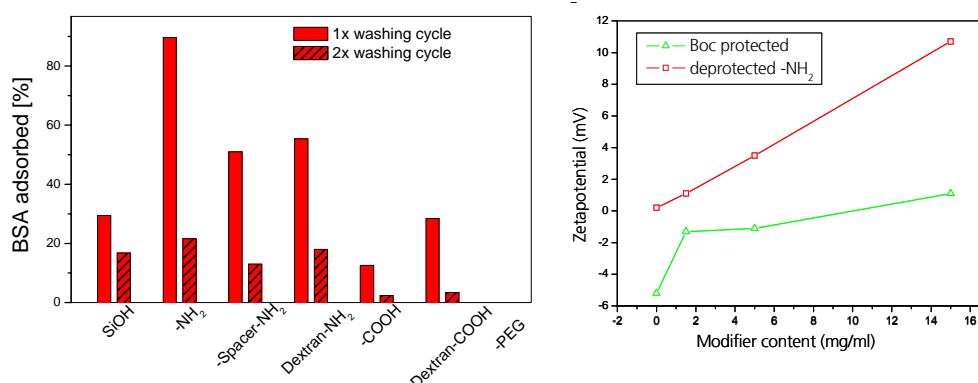


Abbildung 3: (a) Silica-Nanopartikel wurden kovalent mit chemisch unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet. Nur die kovalente Funktionalisierung mit Poly(ethylenglycol)-Ketten mit Methylether-Endgruppe verhindert die unspezifische Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA) vollständig. (b) Durch

Coimmobilisierung eines einseitig mit der Boc-Schutzgruppe geschützten Diamino-poly(ethylenglycol)-Derivates mit dem Methylether-terminierten Poly(ethylenglycol)-Ketten werden reaktive Gruppen in die Poly(ethylenglycol)-Schale der Silicapartikel eingeführt. Die Freisetzung der primären Aminogruppen durch Umsetzung der geschützten Amine mit Trifluoressigsäure führt in Abhängigkeit vom Gehalt an Diamino-poly(ethylenglycol) während der Funktionalisierung zu einem Anstieg im Zetapotenzial. Dagegen steigen die gemessenen Zetapotenziale des geschützten Amins nur leicht an, was eine hinreichende Stabilität der Schutzgruppe anzeigt.^[111]

e) Cytokin-funktionalisierte Nanopartikel stimulieren spezifische Zellantworten über molekulare Erkennung an der Partikeloberfläche

Proteine spielen eine Schlüsselrolle bei der Zell-Zell-Kommunikation. Dabei unterscheidet sich die Wirkung membrangebundener oder löslicher Varianten desselben Proteins erheblich voneinander. Cytokin TNF- α , ein Vertreter der Familie der Tumornekrose-Faktoren (TNF) und Hoffnungsträger für neue Strategien bei der Krebsbekämpfung,^[112] zeigt das Phänomen, dass dieses Cytokin im menschlichen Körper sowohl in membrangebundener Form vorkommt als auch nach Enzym-vermittelter Abspaltung von der Zellmembran als lösliche Variante auftritt.^[113] Die Wirkungsweise beider Formen auf die jeweiligen Zielzellen unterscheidet sich dramatisch: Während das lösliche TNF- α nur den sogenannten TNF-Rezeptor TNF-R1 ansprechen kann, wirkt das membranständige TNF- α auf beide bekannten Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. Die zelluläre Antwort auf die jeweiligen Signalgeber wiederum, wird durch das Ansprechen beider Rezeptoren gesteuert und hängt qualitativ wie quantitativ vom Ausmaß der Aktivierung des jeweiligen Rezeptors ab.^[114] Ein zellmimetisches Konstrukt, welches wie das membranständige TNF- α beide TNF-Rezeptoren stimulieren kann, ist damit der Schlüssel zur Kontrolle über die Zellantwort.^[7]

Silica-Nanopartikel wurden organisch derart modifiziert, dass lösliche TNF-Mutanten bioaktiv an der Partikeloberfläche immobilisiert werden konnten.^[7, 115] Für diese Experimente wurden ortsspezifisch modifizierte TNF-Mutanten von den Gruppen um Prof. Klaus Pfizenmaier und Prof. Peter Scheurich, Institut für Immunologie und Zellbiologie (IZI), Universität Stuttgart, bereitgestellt. Beispielsweise wurden aminofunktionalisierte Silica-Nanopartikel mit verschiedenen Linkerlängen mittels eines weiteren bifunktionalen Agens für die kovalente Bindung Cystein-modifizierter TNF- α -Mutanten vorbereitet.^[110] Das dazu verwendete bifunktionale Molekül trägt auf der einen Seite eine N-Hydroxysuccinimidgruppe. Diese Aktivester-Gruppe^[40] kann mit primären Aminogruppen zur Reaktion gebracht werden. An der anderen Seite befindet sich eine Maleinsäureimidgruppe, welche mit Thiolgruppen umsetzbar ist. Beide Reaktionen verlaufen unter sanften Bedingungen quantitativ.^[116]

Um die Wechselwirkung zwischen diesen Partikeln und Zellen mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie verfolgen zu können, wurden die Partikel in ihrem Kern fluoreszenzmarkiert. Dazu wurden verschiedene fluoreszenzaktive Farbstoffe über eine mit der Amino-Kopfgruppe des APS eingegangene Amidbindung kovalent an ein Silan gekoppelt. Dieses wurde während der Partikelsynthese nach Stöber^[102] zum Sol gegeben und im Partikelinneren unter Erhalt der fluoreszenten Eigenschaften integriert.^[111] Die Ober-

flächenfunktionalisierung dieser fluoreszenzaktiven Partikel verlief analog zu der Modifizierung nicht-fluoreszenzaktiver Silica-Nanopartikel.

Die Bioaktivität der Biokonjugate wurde in Zelltests mit spezifisch TNF-sensitiven Zellen untersucht und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die TNF-Hybridpartikel wiesen dabei eine klare Abhängigkeit ihrer Eigenschaften von der funktionalen Partikelschale auf. Dabei zeigten beispielsweise die mit Maleinsäureimidgruppen funktionalisierten und mit dem Cystein TNF- α umgesetzten Nanopartikel eine eindeutige Stimulation des TNF-R2 und damit eine bislang unbekannte Simulation der Wirkung des membrangebundenen TNF- α mit einem partikulären synthetisch-biologischen Hybridsystem (siehe Abbildung 4).^[111, 117]

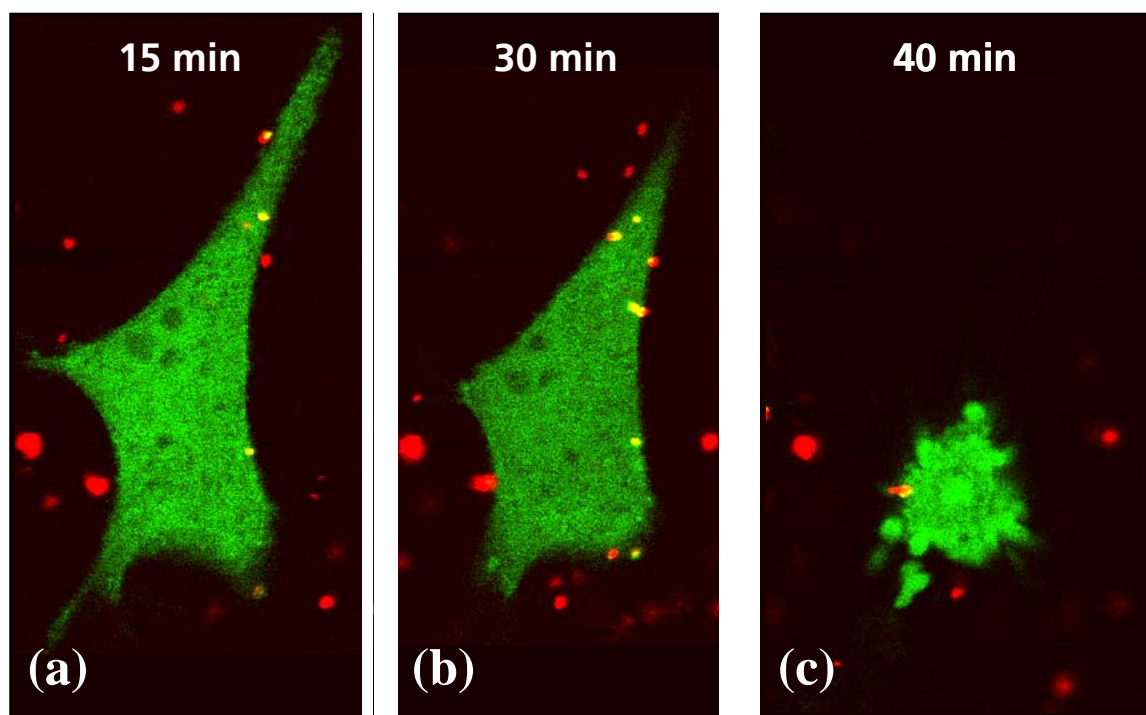


Abbildung 4: Konfokale Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach 15 min, 30 min und 40 min zeigen die zellmimetische Wirkung von mit TNF- α kivalent funktionalisierten Silica-Nanopartikeln im Zelltest indem die Zielzellen durch die Bindung der Nanopartikel in den programmierten Zelltod (Apoptose) getrieben werden. Die Nanopartikel sind im anorganischen Kern mit einem kovalent gebundenen fluoreszierenden Farbstoff rot markiert. Spezifische Mausfibroblasten (MF-R2-Fas-Zellen) wurden zu diesem Versuch eingesetzt. Die Zellen tragen auf ihrer Zellmembran ausschließlich den TNF-R2 Rezeptor, können also über lösliches TNF- α nicht stimuliert werden. Bei Stimulation des TNF-R2 über zellmembranständiges TNF- α wird über das Protein FAS und das an Fas bindende Protein FAS Death Domain (FADD) eine apoptotische Signalkaskade ausgelöst. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde FADD mit dem Protein *green fluorescent protein* (GFP) zu einem FADD-GFP fusioniert. Die roten und grünen Fluoreszenzsignale ergeben in der Überlagerung einen gelben Farbton, die gelben Punkte zeigen also die Bindung der TNF- α -Nanopartikel über die molekulare Erkennung des TNF-R2 Rezeptors der Zellen an. Ca. 3-4 Partikel sind notwendig, um eine Zelle in die Apoptose zu treiben.^[111]

II) Selbstorganisierende Monoschichten aus Organosilanen

a) Oligo(ethylenglycol)-terminierte Organosilanmonoschichten verringern die unspezifische Adsorption von Proteinen

Die proteinabweisende Wirkung von Poly(ethylenglycol)-Schichten wurde bereits diskutiert. Durch die Verwendung des in der Forschung weitverbreitet untersuchten Modellsystems für selbstorganisierende Schichten (Thiolate adsorbiert an Edelmetallen wie Gold und Silber) wurde gezeigt, dass auch kurzkettenige Oligo(ethylenglycol)-terminierte Monoschichten die unspezifische Proteinadsorption reduzieren.^[118-120] Als besonders effektiv erwies sich dabei das Thiolat $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OCH}_3$, welches die Adsorption einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine an Goldoberflächen vollständig unterdrückt. Dabei wurde die proteinabweisende Wirkung einer helikalen Konformation des Oligo(ethylenglycol)segments zugeordnet.^[121] Können die Segmente aus Gründen erhöhter Packungsdichte, wie zum Beispiel bei der Monoschichtbildung durch des Oligo(ethylenglycol)thiols an Silberoberflächen, nur eine all-trans-Konformation einnehmen, findet keine Hydratisierung und auch keine proteinabweisende Wirkung statt.^[122, 123] Tatsächlich zeigten die bislang einzigen Untersuchungen an Oligo(ethylenglycol)-terminierten Silanen ebenfalls eine geringere proteinabweisende Wirkung als für die analogen Thiolatsysteme an Gold.^[124] Allerdings wurden mit $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ ($n = 2, 3$) am Silananker trihydrolysierbare Verbindungen dargestellt und für die SAM-Bildung verwendet. Trifunktionelle Silane binden in vergleichbar hoher Packungsdichte an Siliziumoxidoberflächen wie Thiolate an Silber.^[18] Dabei stehen die Alkylketten beider Systeme bei optimaler Packungsdichte senkrecht. Vermutlich kann daher das von Lee und Laibinis untersuchte Tri(ethylenglycol)segment nicht die für die proteinabweisende Wirkung erforderliche helikale Struktur einnehmen, während das Di(ethylenglycol)segment *per se* zu kurz ist, um eine helikale Struktur zu bilden.^[124]

Organosilane mit einer monohydrolysierbaren Silanankergruppe, die noch zwei Methylgruppen trägt, können nicht so dicht packen wie trihydrolysierbare Silane. Anstelle eines Platzbedarfs von nur 20 \AA^2 , wie für trihydrolysierbare Silane beobachtet, nehmen monohydrolysierbare Dimethylsilan-Ankergruppen pro Molekül eine Fläche von $32 - 38 \text{ \AA}^2$ ein.^[18] Diese weniger dichten Schichten zeichnen sich durch einen geringeren Ordnungsgrad aus als er für trihydrolysierbare Silane erreichbar ist.^[18] Ein geringerer Ordnungsgrad des Monolayers sollte die konformellen Freiheitsgrade der Oligo(ethylenglycol)segmente weiter erhöhen und sich dementsprechend günstig auf die Ausbildung proteinabweisender Eigenschaften auswirken. Von uns synthetisierte und zu Monoschichten verarbeitete monohydrolysierbare Silane mit der Strukturformel $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OR}$, mit $\text{R} = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, zeigten entsprechende proteophobe Wirkung.^[125-129]

b) Binäre Mischungen aus Oligo(ethylenglycol)- und Alkyl-terminierten Silanen zeigen ebenfalls proteophobe Wirkung

Auch die Beimischung einer zweiten Molekülkomponente in die Monoschicht bis zu 10 % ist ohne Verlust der proteophoben Wirkung möglich.^[126, 127, 129] Binär gemischte

SAM aus dem oben genannten Methoxytri(ethylenglycol)undecenyl dimethylchlorsilan mit Dodecyldimethylchlorsilan wurden präpariert, mittels Ellipsometrie- und Kontaktwinkelmessungen charakterisiert und anschließend Adsorptionsexperimente des Proteins His₆-tag-RBD durchgeführt, welches uns von PD Dr. Martin Engelhard vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, zur Verfügung gestellt wurde.^[130] His₆-tag-RBD ist eine Variante der Ras-bindenden Domäne (RBD), einem Bestandteil der *Raf-Kinase*.^[131] RBD bindet an die aktivierte Form des tumorrelevanten Proteins Ras, das so genannte Ras-GTP. Ras-Mutanten können Ras-GTP stabilisieren und man nimmt an, dass sie ca. 30 % aller humanen Karzinome hervorrufen.^[132] Abbildung 5 zeigt das große Ausmaß unspezifischer Adsorption des His₆-tag-RBD an Silanmonolagen mit hohem Anteil an Alkyl-terminierten Molekülen. Oberhalb eines kritischen Anteils an Oligo(ethylenglycol)silan in der Silanisierung von $X_{EG} \geq 0.9$ wird die unspezifische Adsorption von His-tag-RBD verhindert.

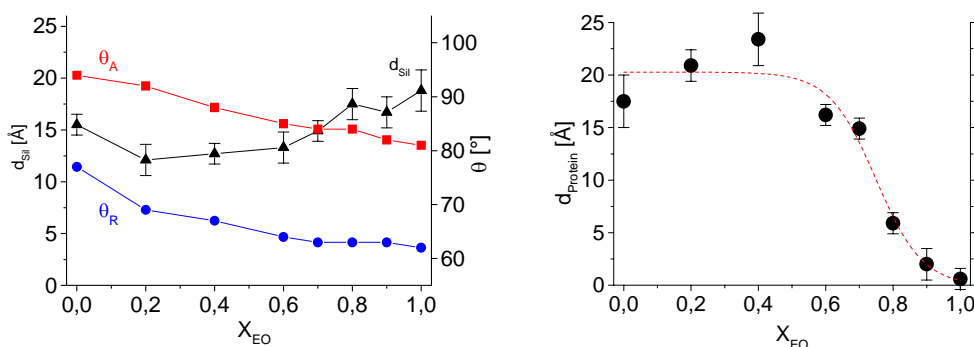


Abbildung 5: (a) Ellipsometrische Schichtdicke und Kontaktwinkelmessung binär gemischter SAM aus Methoxytriethylenglycolundecenyl dimethylchlorsilan und Dodecyldimethylchlorsilan in Abhängigkeit des Molenbruchs bezogen auf das tri(ethylenglycol)-terminierte Silan. (b) Unspezifische Adsorption von His₆-tag-RBD an binär gemischte SAM aus Methoxytriethylenglycolundecenyl dimethylchlorsilan und Dodecyldimethylchlorsilan als ellipsometrische Schichtdicke in Abhängigkeit des Molenbruchs.

c) Chelatkomplexierende Monoschichten gewährleisten die orientierte Immobilisierung bioaktiver Proteine

Um eine Vorzugsorientierung der zu immobilisierenden Proteine zu induzieren, müssen die proteinbindenden Gruppen an der SAM-Oberfläche ortsspezifisch mit funktionellen Gruppen der Proteine wechselwirken. Die Proteinbiochemie ermöglicht die einfache Einführung spezifischer Gruppen, welche zur Immobilisierung genutzt werden können, beispielsweise das sogenannte His-tag: eine an das Protein angehängte Peptidsequenz, die aus der Aminosäure Histidin besteht. Solche Sequenzen bilden mit synthetischen komplexierenden Molekülen, wie Nitrilotriessigsäure (NTA)-Derivaten und einer Reihe zweiwertiger Metallionen gemischte Chelatkomplexe.^[133] Dabei wurde für den His₆-tag/Ni²⁺/NTA-Komplex eine Dissoziationskonstante von $K_D \approx 10^{-13}$ M bestimmt.^[134] Auf dieser hochaffinen Bindung aufbauend gelang die Immobilisierung von His-tag-Proteinen an Affinitätschromatographiesäulen,^[133] Lipidmonoschichten an der Wasser/Luft-Grenzfläche,^[135]

^{136]} Thiolatmonoschichten an der Gold/Wasser-Grenzfläche^[137, 138] sowie Organosilanmonoschichten an der Siliziumoxid/Wasser-Grenzfläche.^[128, 129, 139-142]

Zur Immobilisierung von Proteinen über eine His-tag-Funktion wurde zweistufig eine Monoschicht aufgebaut, indem zunächst das monohydrolisierbare (3-Glycidoxypropyl)dimethylethoxysilan unter Zugabe katalytischer Mengen Triethylamin an der basisch oxidativ hydrolysierten Siliziumoxidoberfläche eines Siliziumwafers zu einer $8.5 \pm 2 \text{ \AA}$ dünnen Schicht fixiert wurde.^[128, 142] Die Epoxysilanschicht entsprach in ihrer Schichtdicke einer dichten Monolage.^[19] Die eigens synthetisierte N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure wurde dann mit der Epoxy-Kopfgruppe des SAM umgesetzt.^[128, 142] Diese Oberflächenreaktion führte zu einer Schichtdickenzunahme von $4.0 \pm 3 \text{ \AA}$ und entsprach damit einer Ausbeute der Oberflächenreaktion von 70 %.^[129] Neben der Oberflächenreaktionskontrolle mit Kontaktwinkelmessungen wurde mit XPS die chemische Zusammensetzung vor und nach den Umsetzungen untersucht. Dabei wurde die Einführung der Epoxygruppen mit der initialen Silanschicht und ihre Reaktion bei der Umsetzung mit N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure mit Kohlenstoff-C1s-Detailspektren belegt sowie die Einführung von Stickstoff und nach Kontaktierung der modifizierten Substrate mit wässriger Nickelsulfatlösung auch die Einführung von Ni^{2+} an der Oberfläche nachgewiesen.^[129]

Die so mit Ni^{2+} /NTA-Chelatkomplexen funktionalisierten Substrate wurden nun in eine His₆-tag-RBD-haltige wässrige Lösung gegeben. Der His₆-tag wurde von PD Dr. Martin Engelhard auf der entgegengesetzten Seite der Bindestelle eingeführt, so dass die Proteinmutante für eine sterisch optimal ausgerichtete Bindung an einer Ni^{2+} /NTA-Chelatkomplexierenden Oberfläche vorbereitet war. Die Adsorption des His-tag-RBD wurde mittels einer eigens konstruierten Messzelle *in situ* durch ellipsometrische Messungen verfolgt. Der zeitliche Verlauf der Adsorption von His-tag-RBD an die funktionalisierte Oberfläche deutete dabei auf eine diffusionskontrollierte Adsorptionskinetik hin. Die gemessene Dicke der His-tag-RBD-Schicht von $24.0 \pm 3 \text{ \AA}$ entsprach einer dicht gepackten Proteinmonoschicht unter Ausbildung eines gemischten NTA/ Ni^{2+} /His-tag-Chelatkomplexes an der Oberfläche.^[129]

d) Die spezifische Immobilisierung des Light Harvesting Complex II an NTA-SAM erhöht die Fluoreszenzausbeute des Proteinkomplexes

Der *Light Harvesting Complex II* (LHC II) ist ein Proteinkomplex, der eine Antennenfunktion bei der Photosynthese ausübt und dessen Basis aus einem zylinderförmigen Trimer von 5 nm Höhe und 7 nm Durchmesser gebildet wird.^[143-145] In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jörg Wrachtrup, Physikalisches Institut der Universität Stuttgart, stand ein natives und ein am C-Terminus His₆-tag-modifiziertes LHC II für Immobilisierungsversuche zur Verfügung.^[128] Das immobilisierte LHC II wurde dann seiner Funktionalität folgend mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei zeigte natives LHC II ein geringes Maß an unspezifischer Bindung an hydroxylierten aber unsilanisierten Glaträgern oder an Glas/NTA-SAM/ Ni^{2+} -Oberflächen. Das His₆-tag-LHC II adherierte an beiden untersuchten Oberflächen, wobei nur die Immobilisierung an der chelatkomplexierenden Monolage zu einer homogenen Proteinschichtbildung führte. Das chelatimmobilisierte

His₆-tag-LHC II zeigte darüber hinaus an der NTA-SAM/Ni²⁺-Oberfläche eine um den Faktor vier stärkere Fluoreszenzaktivität als am nicht silanisierten Substrat. Gegenüber dem unspezifisch gebundenen LHC II an Glas wies es sogar eine um den Faktor 28 höhere Fluoreszenzaktivität auf.^[128]

III) Polymernanopartikel für proteinverträgliche Konjugationsreaktionen mittels Aktivester-Surfmeren

a) Eine neue Klasse von Aktivestersurfmeren wird synthetisch erschlossen und erweist sich als grenzflächenaktiv

Über eine zweistufige Synthese wurden p-(11(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyl dimethyl-sulfonium methylsulfat (AUPDS) und p-(11(Methacrylamido)undecanoyloxy)-phenyl-dimethylsulfonium methylsulfat (MUPDS) mit einer Ausbeute von 80 % (AUPDS) und 70 % (MUPDS) erhalten.^[25, 26] Als Ausgangsprodukt für beide Synthesen wurde 11-Aminoundecansäure eingesetzt. Deren Aminogruppe wurde im ersten Syntheseschritt mit Acryl- oder Methacrylsäurechlorid acyliert,^[146] und deren Säuregruppe in der Folgereaktion nach der Carbodiimid-Methode^[109] mit 4-Hydroxyphenyldimethylsulfoniummethylsulfat verestert.^[26] Der Syntheseweg ist dabei modular: Durch die Wahl anderer ω-Aminocarbonsäuren kann die amphiphile Eigenschaft der resultierenden Surfmerer moduliert sowie durch die Wahl anderer Säurechloride die polymerisierbare Gruppe variiert werden und somit für die Copolymerisation mit entsprechenden Basismonomeren angepasst werden.

Die Grenzflächenaktivität beider Moleküle wurde nach der Wilhelmy-Plattenmethode an der Luft/Wasser-Grenzfläche durch Titration von Reinstwasser bestimmt. Dabei erniedrigte AUPDS die Grenzflächenspannung auf $40.5 \pm 0.5 \text{ mN m}^{-1}$ bei einer kritischen Micellbildungskonzentration (cmc) von $6.0 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$ und MUPDS auf $58.5 \pm 0.5 \text{ mN m}^{-1}$ bei einer cmc von $3.2 \pm 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$.^[26]

b) Die Aktivestersurfmerer copolymerisieren mit Methylmethacrylat und Styrol zu Copolymernanopartikeln

Die radikalische Polymerisierbarkeit der beiden dargestellten Methylsulfat-Moleküle wurde sowohl in Homopolymerisationsreaktionen wie auch in Copolymerisationsreaktionen mit Methylmethacrylat (MMA) und Styrol (St) nachgewiesen.^[25, 26] Dabei wurde die Copolymerisation als Emulsionspolymerisation mit dem jeweiligen Surfmer als einzigem Emulgator durchgeführt. Bereits ein Gehalt von nur 0.1 % an AUPDS (bezogen auf den Gehalt des Comonomers MMA in der Ausgangsemulsion) führte zum Erhalt diskreter Partikel mit enger Größenverteilung.^[26] Der mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte hydrodynamische Durchmesser der resultierenden Polymerpartikel war über den Surfmeranteil bei der Emulsionscopolymerisation im Bereich zwischen 167 nm bei einem AUPDS-Anteil von 0.1 mol-% und 109 nm bei 10.0 mol-% steuerbar.^[26, 147] Alle Polymerisationsreaktionen verliefen dabei mit einem hohen Umsatz zwischen 90 % und 96 %. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten einen um bis ca. 40 %

kleineren Durchmesser der kugelförmigen Partikel im getrockneten Zustand.^[147] Spektroskopische Untersuchungen mittels ¹H-NMR konnten zeigen, dass die Surfmerer mit den Comonomeren Styrol und Methylmethacrylat copolymerisierten.^[26]

c) Die Surfmerer befinden sich vorzugsweise an der Partikeloberfläche

Mittels Verbrennungs-Elementaranalyse wurde das Surfmerer-zu-Comonomer-Verhältnis in p(MMA-co-AUPDS)-Polymeren untersucht und belegt, dass 75 ± 5 % des zur Emulsionspolymerisation eingesetzten Surfmerers in den Copolymeren enthalten war.^[26] Mit Hilfe von Polyelektrolyttitrationen wurde der AUPDS-Gehalt an der Partikeloberfläche bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass bei einer AUPDS-Konzentration von 0.5 mmol L^{-1} in der Ausgangsemulsion 86 ± 32 mol-% des Surfmerers auf der Partikeloberfläche titriert werden konnte. Mit steigender AUPDS-Konzentration in der Ausgangsemulsion nahm der Anteil an oberflächengebundenem AUPDS ab.^[26] Diese Korrelation wurde in Übereinstimmung mit der gefundenen Abhängigkeit der Partikelanzahl von der AUPDS-Konzentration mit einer zunehmenden micellaren Nukleation während des Polymerisationsvorgangs erklärt. Diese Einkapselung führt bei einem hohem AUPDS-Gehalt von 8 mol-% dazu, dass sich ein Teil der Surfmerer im Partikelinneren befindet und damit für Folgereaktionen unzugänglich ist.^[26]

Die Oberflächenladungsdichte der Copolymerisation resultierenden Partikel wurde aus den Ergebnissen der Polyelektrolyttitration abgeschätzt. Die höchste Ladungsdichte ergab dabei eine maximale Dichte von 1.4 Aktivester-Gruppen pro nm^2 Partikeloberfläche. Anhand der Molekülstruktur wurde der Platzbedarf der geladenen Oxyphenyldimethylsulfonium-Gruppe abgeschätzt und daraus extrapoliert, dass die maximal gefundene Oberflächenbeladung an Aktivestergruppen einer zur Hälfte dicht gepackten Monolage der Surfmerermoleküle an der Oberfläche entspricht.^[148]

d) Die Reaktivität der Aktivestersurfmerer gegenüber Hydrolyse und Konjugationsreaktion wurde mit Hilfe Isothermer Titrations-Mikrokalorimetrie bestimmt

Die Hydrolyse der oberflächengebundenen Aktivestersurfmerer zeigte wie erwartet eine starke Abhängigkeit von der Temperatur.^[27] Am Beispiel von in wässrigem Puffer bei pH 7.5 suspendierten p(AUPDS-co-St)-Copolymerpartikeln wurde mit Hilfe der Isothermen Titrations-Mikrokalorimetrie (ITC) die Halbwertszeit der Aktivesterhydrolyse bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ zu 9 Tagen und bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ zu 65 Tagen ermittelt.^[27]

Die Reaktivität der Aktivestersurfmerer wurde am Beispiel der Umsetzung des Farbstoffs Remazol-*brilliant blue*, welcher eine primäre Aminogruppe trägt, in wässrigem Puffer bei pH 7.5 mit gelöstem AUPDS und mit suspendierten p(AUPDS-co-St)-Copolymerpartikeln mit Hilfe von ITC-Messungen quantifiziert.^[27] Anhand eines 1:1-Reaktionsmodells wurde dabei für die Konjugationsreaktion des gelösten AUPDS eine Reaktionsenthalpie von $\Delta H = -32.1 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für das oberflächengebundene Surfmerer von $\Delta H = -38.8 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt.^[27]

e) Die oberflächengebundenen Aktiverestursurfmerer binden Proteine kovalent unter Erhalt deren Bioaktivität

Die Reaktivität der Surfmer-Nanopartikel wurde am Beispiel der konjugativen Bindung des Proteins Streptavidin untersucht und mittels ITC-Messungen und Titration der Rezeptorbindestellen des Partikel-gebundenen Streptavidins mit einem fluoreszenzaktiven Liganden quantifiziert.^[27, 147] Poly(AUPDS-co-St)- und Poly(AUPDS-co-MMA)-Copolymerpartikel wurden in wässrigem Puffer bei pH 7.5 mit Streptavidin, welches reaktive primäre Aminogruppen trägt, zur Reaktion gebracht. Die Menge des gebundenen Proteins und die Aktivität des Oberflächen-konjugierten Streptavidins zur Ligandenbindung wurden mit Hilfe der Fluoreszenztitration mit Biotin-4-Fluorescein^[149] quantifiziert.^[147] Die Auswertung der Fluoreszenztitrationsdaten ergibt, dass pro 1 g p(MMA-co-AUPDS)-Partikel 3.0 ± 0.5 mg Streptavidin-Tetramer (entsprechend 54 ± 10 nmol) funktional immobilisiert wurden. Pro 1 g p(St-co-AUPDS) wurden 28 ± 5 mg und 500 ± 90 nmol Streptavidin-Tetramer gebunden.^[147] Der Flächenbedarf pro Protein wurde unter Annahme des mit dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmessers von 106 ± 3 nm für die verwendeten p(St-co-AUPDS)-Partikel zu 160 ± 20 nm² berechnet. Damit entspricht die ermittelte Packungsdichte von Streptavidin an der Copolymerpartikel-Oberfläche etwa 22 % der Dichte von Streptavidin in zweidimensionalen Einkristallen an der Luft-Wasser-Grenzfläche.^[150]

Die Funktionalisierung von Polymerkolloiden bereits während ihrer Darstellung in dem hier gezeigten einstufigen Verfahren durch Copolymerisation der trifunktionalen Surfmerer ermöglicht Proteinkonjugationsreaktionen an der erzeugten Kolloidoberfläche. Dabei ist die Dichte an Reaktionszentren an der Oberfläche geringer als bei den Organosilan-basierten Systemen. Diese konnten im direkten Vergleich das Protein Streptavidin zu dichten Monolagen an der Oberfläche von mineralischen kolloidalen oder planaren Trägern immobilisieren.

IV) Molekular geprägte Polymere in kolloidalem Format

a) Die Miniemulsionspolymerisation ist zur quantitativen Synthese molekular geprägter Nanopartikel geeignet

Mittels Miniemulsionspolymerisation^[151] gelang die Darstellung molekular geprägter Polymere in einem kolloidalen Format als sphärische Polymerpartikel.^[64, 65, 152] Am Beispiel der Wechselwirkung zwischen dem Aminosäurederivat Boc-Phylalaninamid (BFA) und Poly(methacrylsäure(MAA))-co-(ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA)) wurden durch thermisch^[64] und photochemisch^[65] initiierte Miniemulsionspolymerisationsreaktionen sphärische Polymermonolithe mit Durchmessern zwischen 50 nm und 300 nm dargestellt (Abbildung 6). Die molekular geprägten Kolloide entstehen dabei quantitativ mit einer Ausbeute von 98 ± 2 %.

Die Miniemulsionspolymerisation^[151, 153, 154] bietet dabei die idealen Voraussetzungen zur Synthese kolloidaler molekular geprägter Polymere, da sie analog zur Suspensionspolymerisation als Öl-in-Wasser-Heterophasenpolymerisation erfolgt, indem

emulgierte Monomertröpfchen zu kolloidalen Polymerpartikeln polymerisiert werden. Durch Scherkräfte werden dabei die Tröpfchen auf Größen zwischen 50 nm und 500 nm Durchmesser dispergiert und die Dispersion mit der Zugabe eines wasserunlöslichen hydrophoben Agens durch Aufbau eines osmotischen Druckes im Tröpfcheninneren gegen Ostwaldreifung der Emulsion stabilisiert.^[153] Im Idealfall werden dann die Monomertröpfchen 1:1 in polymerisierte Partikel überführt.^[155] Dieser einstufige Prozess bietet die Möglichkeit, in einer Zweiphasenmischung alle zur molekularen Prägung erforderlichen Reagenzien in der unmittelbaren Nähe ihres Reaktionsortes vorzulegen.

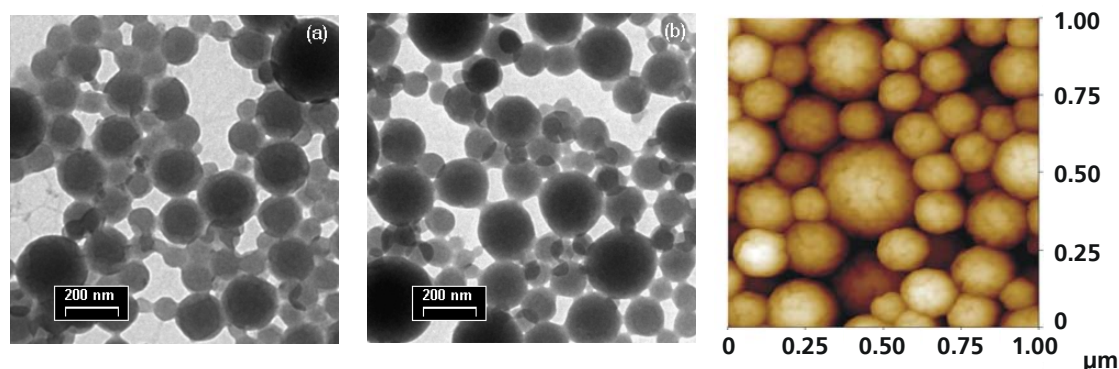


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen von Nanopartikeln aus Poly(methacrylsäure)-co-(ethylenglycoldimethacrylat): (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines in Abwesenheit von Templatmolekülen mittels Miniemulsionspolymerisation dargestellten Copolymeren und (b) eines molekular geprägten Polymeren, dargestellt in Gegenwart des Aminosäurederivates Boc-Phylalaninamid als Templat. Die Partikel zeigen eine sphärische Gestalt bei einer für die Miniemulsionspolymerisation typischen Partikelgrößenverteilung.^[64] (c) Die Rasterkraftmikroskopische Aufnahme des geprägten Polymeren im *tapping-mode* deutet eine Himbeer-ähnliche Morphologie der Partikeloberfläche an.^[127]

b) Die molekular geprägte Polymerkolloide sind chemisch definierte Nanomonolithe

Die chemische Zusammensetzung und die Struktur der kolloidal verteilten Festkörper wurden mit verschiedenen Methoden analysiert. Dabei konnte mittels ¹³C-*colloidal phase* (CP)-*magic angle spinning* (MAS)-NMR die chemische Zusammensetzung aufgeklärt und der Einschluss des Templats BFA während der Polymersynthese belegt werden.^[64] Mittels ¹H-NMR wurde gezeigt, dass durch Extraktion des Polymeren das Templat entfernt werden kann.^[64] Stickstoff-Gasadsorptionsexperimente nach dem Brunauer-Emmet-Teller (BET)-Verfahren zeigten einen deutlichen Anstieg der spezifischen Oberfläche der Kolloide durch die Extraktion, welche dem Entfernen der Template zugeordnet werden konnte.^[64] Messungen der Oberflächenspannung der Miniemulsionen vor sowie der Partikelsuspension nach der Polymerisationsreaktion in Abwesenheit und im Beisein von Templatmolekülen zeigten einen Einfluss des Templats auf die Oberflächenspannung des entstandenen Latex. Dies deutet auf die Absenkung der Oberflächenenergie der molekular geprägten Polymere durch den Einschluss der Template an der Partikeloberfläche und/oder auf einen Einfluss der Template auf die Morphologie der entstandenen Partikel hin.^[64]

c) Die MIP-Kolloide diskriminieren in ihrem Adsorptionsverhalten enantiomere Template

Mittels Bindestudien in Suspension mit UV-absorptionsspektroskopischer Quantifizierung wurde eine bevorzugte Bindung des ursprünglichen Templates BFA an mit BFA geprägte Copolymerpartikel gegenüber nicht geprägten Vergleichsproben festgestellt.^[64] Darüber hinaus wurde eine enantiomere Diskriminierung der Bindung an die geprägten Partikel belegt, die in ihrem Ausmaß vom MAA-Gehalt in den Partikeln abhing. Die größte Menge der spezifischen Bindung zugeordneter Adsorption fand an Copolymeren statt, die aus einer Emulsion mit molarem Verhältnis $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}} = 0.25:1$ dargestellt wurden, welches bereits für herkömmlich im *bulk*-Verfahren dargestellte molekular geprägte p(MAA-co-EGDMA) Copolymernetzwerke als bevorzugt bindend beschrieben war.^[46, 64]

d) Mikrokolorimetrische Messungen an MIP-Kolloiden geben Aufschluss über die Spezifität der Templat-Polymer-Wechselwirkung

Die Isotherme Titrations-Mikrokolorimetrie ist eine ausgesprochen direkte Methode zur thermodynamischen Erfassung spontan ablaufender Prozesse durch die sequenzielle Zugabe definierter Mengen eines Reaktionspartners zu einer Reaktionsmischung und wird häufig zur Charakterisierung molekularer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt.^[156-160] Die Wechselwirkung zwischen Templat und nichtkovalent molekular geprägten Polymeren wurde bislang am Beispiel der hier beschriebenen kolloidalen Partikel aufgezeigt.^[65] Nahezu zeitgleich führten Kirchner und Wulff die ersten mikrokolorimetrischen Untersuchungen der chemischen Esterbildung zwischen kovalent geprägten Boronsäurepolymeren und Zuckertemplaten durch.^[161]

Die mikrokolorimetrischen Studien zum Adsorptionsverhalten der geprägten p(MAA-co-EGDMA) Copolymerpartikel zeigten deutlich die energetisch bevorzugte Adsorption des Templatmoleküls, welches auch zur Prägung genutzt wurde. Die aus den Messungen errechneten freien Bindeenthalpien für die Adsorption von zu L-BFA strukturell ähnlichen Aminosäurederivaten an mit L-BFA geprägten Partikeln waren mit $\Delta H_{\text{ads}} = -10.9 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ für L-boc-Tryptophan, $\Delta H_{\text{ads}} = -5.1 \pm 1.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ für L-boc-Phenylalanin und $\Delta H_{\text{ads}} = -2.8 \pm 0.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ für L-boc-Tyrosin deutlich geringer als für die Adsorption des L-BFA mit $\Delta H_{\text{ads}} = -21.1 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ (siehe Abbildung 7).^[65] Darüber hinaus wurde auch bei der Adsorption des entgegengesetzten Enantiomers, des D-BFA, mit $\Delta H_{\text{ads}} = -12.7 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, eine deutliche Diskriminierung durch die Bindestellen festgestellt.^[65] Die Messung der Adsorption dieser Aminosäurederivate an ungeprägte Polymere ergab dagegen mit $\Delta H_{\text{unsp.ads}} = \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ Bindeenthalpien im Bereich des mittleren Messfehlers.

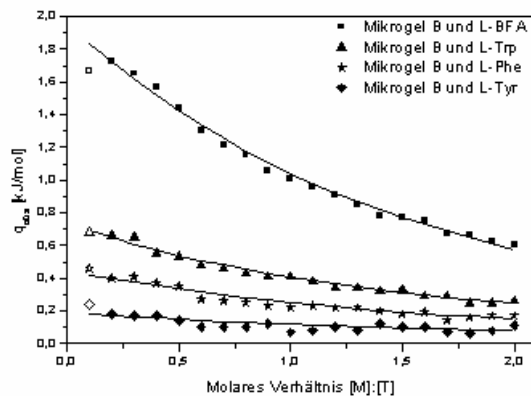


Abbildung 7: Resultierende Isothermen aus den kalorimetrischen Rohdaten für die Titrations suspendierter mit L-Boc-Phenylanilid (L-BFA) geprägter p(MAA-co-EGDMA)-Copolymerpartikel mit L-BFA, L-boc-Tryptophan (L-Trp), L-boc-Phenylalanin (L-Phe) und L-boc-Tyrosin (L-Tyr). Die unterschiedlichen Kurvenverläufe der Bindungswärmen zeigen eindeutig die Strukturerkennung von L-BFA durch die mit L-BFA geprägten Partikel.^[65]

e) Ein erweitertes Langmuir-Modell ermöglicht die mathematische Beschreibung der Adsorptionsprozesse des Templats an MIP-Kolloiden in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten

Zur Beschreibung der Adsorptionsprozesse an molekular geprägten Polymeren wurde bereits eine Vielzahl von Adsorptionsmodellen verwendet. Dabei kommt die Langmuirsche Adsorptionsisotherme der Beschreibung der idealisierten Adsorption von Templaten an ein molekular geprägtes Polymerpartikel sehr nahe. Die Langmuirsche Voraussetzung einer begrenzten Zahl an Bindestellen^[162] entspricht der Vorstellung eines idealen geprägten Polymers, welches nur solche Bindestellen anbietet, die durch Einschluss und Extraktion der Template entstanden sind. Im Realfall ist die Adsorption von Templaten an molekular geprägten Polymeren um einen Term für die Beschreibung der unspezifischen Adsorption zu erweitern. Dieser Term eines erweiterten Langmuir-Modells wird für seinen Konzentrations-abhängigen Gültigkeitsbereich als linear abhängig von der Templatkonzentration angenommen.^[163] Molekular geprägte Polymere wurden alternativ über ein sogenanntes Bi-Langmuir-Modell beschrieben, in dem zwei Sorten von Bindestellen, eine hochaffine und eine niederaffine Spezies, unterschieden werden.^[164-167] Die Beschreibung der Templat-Adsorption an molekular geprägten Polymeren nach dem Freundlich-Modell basiert auf dem Konzept heterogener Affinitäten, welche durch eine hypothetische Affinitätsgleichgewichtskonstante und einen Heterogenitätsindex erfasst werden.^[168-170] Auch ein gemischtes Langmuir-Freundlich-Modell wurde bereits zur Beschreibung der Wechselwirkung eingesetzt.^[171]

Die Anwendung des erweiterten Langmuir- und des Freundlich-Modells zeigte in beiden Fällen eine exzellente Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Bindeeigenschaften der hier beschriebenen molekular geprägten Polymerkolloide. Dabei wurde zur Abschätzung einer realen Affinitätskonstante für die Wechselwirkung zwischen geprägtem Polymer und Ligand dem erweiterten Langmuir-Modell der Vorzug gegeben.^[172] Die Gleichgewichtskonstante für L-BFA-geprägte Poly(MAA-co-EGDMA)-Partikel mit

einem Comonomer-Verhältnis von MAA:EGDMA von 0.25:1 als Rezeptor und L-BFA als Ligand wurde zu $K_D = 4.1 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Konzentration der maximal beladbaren Prägestellen wurde zu 37.8 mmol g^{-1} und die Rate der unspezifischen Bindung zu 1.1 L g^{-1} errechnet.^[172]

Reaktionskinetische Untersuchungen zeigten, dass die molekulare Erkennungsreaktion zwischen Bindestelle und Ligand der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der spezifischen Adsorption ist, der eine Geschwindigkeitskonstante von $k_a = 0.0056 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ergab. Für die unspezifische Bindung wurde die Geschwindigkeitskonstante zu $k_u = 0.0455 \text{ L g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt.^[172]

V) Biomolekül-bindende Nanopartikel und –schichten als Selektoren in Festphase-gestützten bioanalytischen Funktionselementen

a) Molekular erkennende Nanopartikel werden mit Hilfe von Polyelektrolytmultischichten als funktionelle monopartikuläre Schicht an Chipoberflächen verankert

Die in der vorliegenden Habilitationsarbeit beschriebenen sphärischen (bio)-funktionalen Nanopartikel sind Kolloide, die elektrostatisch oder sterisch gegen Agglomeration geschützt sind. Die Aktivierung von Chipoberflächen mit Hilfe der Deposition adhäsionsvermittelnder Schichten schafft die Voraussetzungen für eine stabile Verankerung der Nanopartikel an diesen Oberflächen.^[74]

Dabei eignen sich nach dem Layer-by-Layer (LbL)–Verfahren^[72, 173] definiert zu nanoskopischen Multischichten abgedehnte entgegengesetzt geladene Polyelektrolyte sehr gut als vielseitige Adhäsionsvermittler.^[74] Der feste Grundträger muss nur wenige Ladungen aufweisen: Glasobjektträger, Siliziumwafer oder Metallschichten besitzen bei neutralem pH eine ausreichende Oberflächenladungsdichte, um direkt LbL-Schichten zu tragen. Ungeladene Festkörperoberflächen, wie sie bei einer Vielzahl von Polymeren gegeben sind, wurden beispielsweise mittels plasmachemischer Verfahren mit Ladungsträgern in ausreichender Dichte modifiziert und so für eine weitere Verwendung adaptiert.^[174]

Als Polykationen eignen sich beispielsweise Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) und als Polyanionen Salze der Polystyrolsulfonsäure (SPS) für LbL-Multischichten.^[73] Oberflächenladungen tragende Nanopartikel binden ähnlich wie Polyelektrolyte physisorptiv an LbL-Schichten. Die attraktive Wechselwirkung zwischen den Polyelektrolytschichten und ihrem Träger, zwischen den Polyelektrolytschichten selbst sowie zwischen den Polyelektrolytschichten und den Partikeln beinhaltet einen wichtigen elektrostatischen Anteil. Zusätzlich wird die freie Energie ΔG durch einen entropischen Term stabilisierend verringert: Die Polyelektrolyten insertieren in die elektrischen Doppelschichten benachbarter Ladungsträger und setzen dabei eine große Anzahl nichtpolymerer Ionen frei. Der Entropieverlust durch die eingeschränkten Konformationsfreiheitsgrade der Polymere wird durch den Entropiegewinn der nun gelösten Ionen überkompensiert. Im Fall der Adsorption der Nanopartikel ist darüber hinaus kaum ein Entropieverlust durch Absenkung der Konformationsfreiheitsgrade gegeben, da diese *per se* niedrig liegen. Auch die

Dispersionskräfte zwischen den Multischichtelementen tragen zur Stabilität der Struktur entscheidend bei. Entsprechend der Natur der hier beschriebenen Adhäsion ist die Ionenzusammensetzung, der pH-Wert und die Temperatur von genereller Bedeutung für die Stabilität der erzeugten Multischichtstrukturen.^[69]

Am Beispiel von mit L-BFA molekular geprägten Poly(MAA-co-EGDMA)-Nanopartikeln wurde gezeigt, dass eine bioaktive Multischicht durch die Abscheidung von Kolloiden an Polyelektrolytschichten erzeugt werden kann.^[175] Die oxidische Oberfläche eines optischen Wellenleiters^[176] wurde dazu sequentiell mit Polyelektrolyten und Polymerkolloiden beschichtet und das Bindeverhalten der resultierenden Multischicht mit Hilfe der Wellenleiterspektroskopie verfolgt (siehe Abbildung 8).^[175]

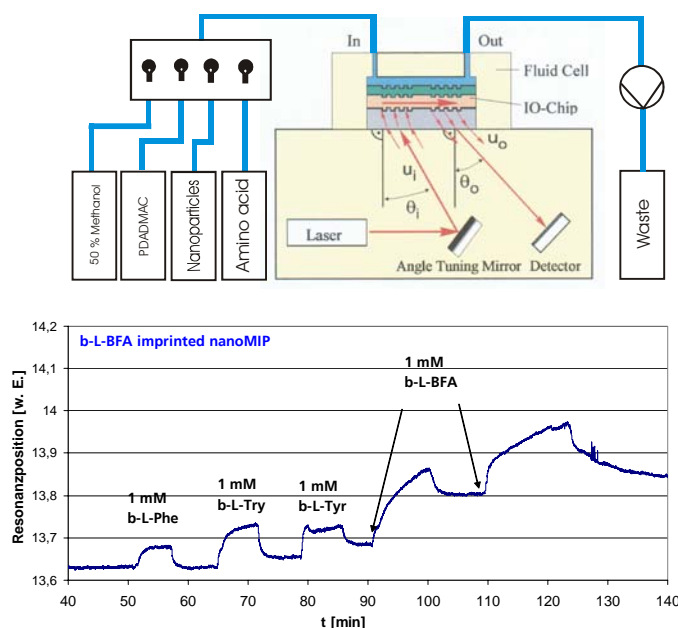


Abbildung 8: Molekular geprägte Polymere wurden über eine Polyelektrolytschicht als Selektorschicht an der oxidischen Oberfläche eines optischen Gitterkoppler-Wellenleiters^[176] angebracht. Sequenziell wurden unterschiedliche Aminosäurederivate enthaltende Lösungen über die Wellenleiteroberfläche geleitet. Die Bindung der Liganden an der Partikelschicht wurde über die Zeit als Verschiebung der Resonanzposition aufgrund der Änderung des optischen Brechungsindex in der nanoMIP-Schicht über das evaneszente Feld des Wellenleiters aufgezeichnet. Dabei wurde eine Präferenz zur Bindung des zur Prägung verwendeten Templatmoleküls L-Boc-Phenylalaninanilid (BFA) gegenüber strukturnahen Aminosäurederivaten festgestellt.^[175]

Die negativ geladene Siliziumdioxidoberfläche des Wellenleiters wurde in einer geschlossenen Meßzelle mit angeschlossenem Fluidsystem mit einer PDADMAC enthaltenden Lösung behandelt. An die mit dem Polykation beschichtete Oberfläche konnte unmittelbar eine Partikelschicht der wegen ihres MAA-Anteils an ihrer Oberfläche negativ geladenen geprägten Kolloide adsorbiert werden. Vergleichsmessungen mit Nullellipsometrie und Rasterkraftmikroskopie zeigten für Partikel mit einem mittels DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser von 240 nm eine effektive Schichtdicke für die Kolloidschicht von ca. 130 nm, welche Waschschrinen der Oberfläche mit

Methanol/Wasser-Gemischen standhielt. Ohne vorherige PDADMAC-Behandlung der Oberfläche blieb unter sonst gleichen Bedingungen kein Kolloid an der Oberfläche haften. Die so mit einer Multischicht funktionalisierte Oberfläche des Wellenleiters wurde sequentiell mit unterschiedliche Aminosäurederivate enthaltenden Lösungen beschickt und die Änderung der optischen Schichtdicke der Multischicht mit dem evaneszenten Feld des optischen Wellenleiters verfolgt (siehe Abbildung 8). Die Oberfläche wies dabei deutlich unterschiedliche Affinitäten für die unterschiedlichen Liganden auf. Diese qualitativen Untersuchungen belegen die Verwendbarkeit der molekular geprägten Polymerkolloide zur funktionellen Beschichtung von Sensoroberflächen.^[177]

b) Die mikrostrukturierte Anlagerung Biomolekül-bindender Nanopartikel ermöglicht die Darstellung multifunktionaler Microarrays

Die Mikrostrukturierung von (Bio)-Chipoberflächen durch die Verankerung (bio)-funktioneller Nanopartikel mit Hilfe von Polyelektrolytmultischichten gelingt auf vielfältige Weise: Zum einen können die Polyelektrolytmultischichten mittels Photolithographie, Mikrokontaktstempeln sowie Mikrospotting mikrostrukturiert werden und dann die Kolloide durch einfache Dip-Prozesse aufgetragen werden. Zum anderen können die Polyelektrolytmultischichten homogen abgeschieden werden und die Nanopartikel mittels Mikrokontaktstempeln und Mikrospotting mikrostrukturiert aufgetragen werden.^[75, 174, 178, 179]

Durch die Flexibilität der Verfahrensweise ist die Bandbreite der erzeugbaren Mikrostrukturen enorm: Der Einsatz der Photolithographie ermöglicht die Negativ-Abbildung selbst komplexer Maskenstrukturen (siehe Abbildung 9 (a) bis (c)). Die Abscheidung durch Mikrokontaktstempel erzeugt gegenteilige Positiv-Abbildung von Masken. Die Verwendung von Spotting-Robotern zur Schichtabscheidung ermöglicht die Herstellung mikrostrukturierter Arrays (siehe Abbildung 9 (d)). Hierbei ist die Erzeugung von Bereichen vielfältiger Funktionalität methodisch einfach zugänglich, indem unterschiedliche funktionalisierte Nanopartikel abgeschieden werden.^[178, 179]

Im hier angewendeten photolithographischen Verfahren wurden zunächst Polyelektrolytmultischichten homogen abgeschieden. Nach Auflegen einer lichtundurchlässigen Maske wurde die Oberfläche mit kurzwelligem UV-Licht bestrahlt.^[180, 181] Mit Hilfe nullellipsometrischer Messungen und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) wurde die Zusammensetzung der bestrahlten Oberfläche analysiert und die Parameter zur Kontrolle des Photoablationsprozesses ermittelt.^[178] Die Kontrolle der Ionenstärke, des pH-Wertes und der Temperatur während der anschließenden Deposition der (bio)-funktionalen Nanopartikel ermöglicht eine Steuerung der Dichte der erhaltenen Nanopartikelschichten. Die laterale Auflösungsgrenze der Methode ist durch die Lichtstreuung während des photolithographischen Verfahrensschritts prinzipiell limitiert. Dementsprechend liegt die physikalische Auflösungsgrenze bei $\lambda/2$, also bei dem hier verwendeten UV-Licht einer Wellenlänge von 185 nm bereits im Bereich der Größe der Nanopartikel. Hier wurden die Masken durch einfaches Auflegen abgebildet, dadurch vergrößerte sich die Auflösungsgrenze zu ca. einem Mikrometer, wie mittels Rasterkraftmikroskopie ermittelt wurde.^[178]

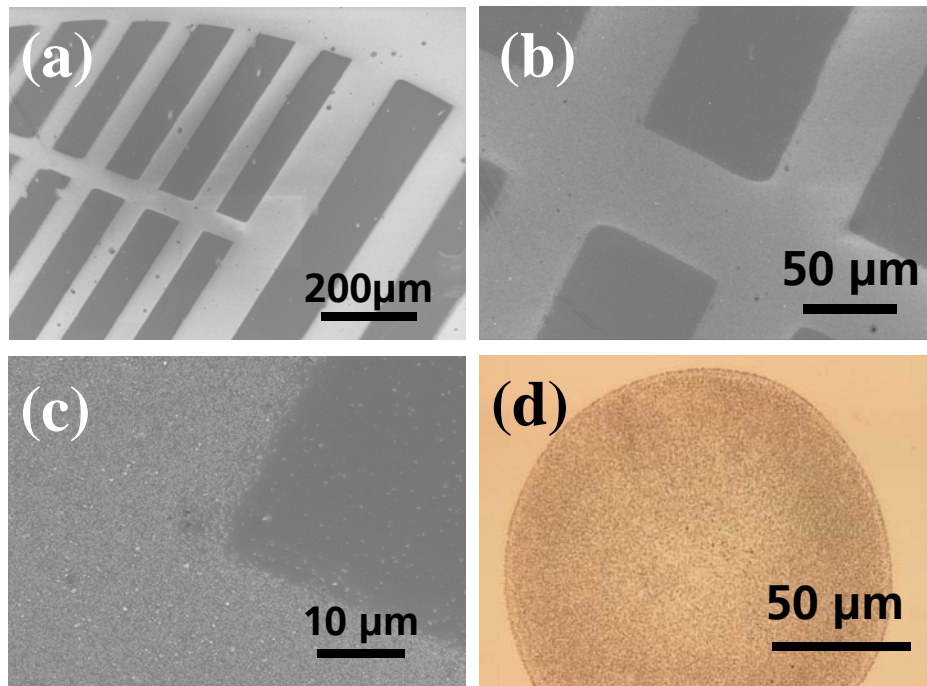


Abbildung 9: Mikrostrukturierte Chipflächen durch Abscheidung von Silica-Nanopartikeln an Polyelektrolyt-multischichten auf Glasträgern. (a) – (c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Silica-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 100 nm an über eine Maske photoablatierten Schichten aus Poly(allylaminhydrochlorid)/Poly(acrylsäure)/Poly(allylaminhydrochlorid). Die Nanopartikel adherieren in den nicht ablatierten Bereichen. (d) Lichtmikroskopische Aufnahme von Silica-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 140 nm, die mit Ring-Pin-Mikrospotting an eine PDADMAC-Monoschicht auf einem Glasträger zu einem Spot mit einem Durchmesser von 140 µm abgeschieden wurden.

Bei der strukturierten Auftragung mittels Mikrokontaktstempeln (*micro-contact printing* oder *softlithography*)^[182] wird mit Hilfe eines mikrostrukturierten Stempels aus elastomerem Polysiloxan eine Nanopartikelsuspension wie „Tinte“ auf eine planare Festkörperoberfläche übertragen. Um den ursprünglich hydrophoben Siloxanstempel zu hydrophilisieren, wurden an dessen Oberfläche mit Hilfe eines Niederdruck-Sauerstoffplasmas polare Gruppen eingeführt.^[183] Die Übertragungsrate der Partikel aus der am Stempel adherierten Nanopartikelsuspension auf die mit Polyelektrolytschichten homogen überzogene Oberfläche hängt von den Relationen der attraktiven Kräfte zwischen Stempeloberfläche und Partikeln, der Solubilisierung der suspendierten Partikel sowie der attraktiven Kräfte zwischen Partikeln und LbL-beschichtetem Substrat ab.^[178] Die Auflösungsgrenze des Mikrokontaktstempels liegt im unteren Nanometerbereich,^[182] so dass bei dem hier beschriebenen Stempeln der Nanopartikel der Partikeldurchmesser die Auflösungsgrenze bestimmt.^[178]

Für die DNA-Chiptechnologie wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Methoden zur Erzeugung von Microarrays entwickelt.^[76, 184] Dabei werden Biomoleküle enthaltende Tröpfchen mit nur wenigen Picolitern Volumen auf feste Oberflächen übertragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels verbleiben auf einer kreisrunden einige hundert Mikrometer kleinen Fläche (*spot*) die adherierten Biomoleküle an der Chipoberfläche. Eine Nanopartikelsuspension ist nach diesem Prinzip ebenfalls übertragbar.^[178] In der vorliegen-

den Arbeit wurde dazu ein sogenannter Nadel-Ring-Mikrospotter (*ring-pin microspotter*) eingesetzt: In einem wenige Millimeter breiten Metallring wird zunächst durch Eintauchen ein dünner Film einer Nanopartikelsuspension aufgespannt. Durch dieses Reservoir wiederum taucht eine Metallnadel und wird dabei von der Suspension benetzt. Die an der Nadelspitze befindliche Nanopartikelsuspension wird anschließend durch eine computer-gesteuerte Präzisionsmechanik mit einer Festkörperoberfläche kontaktiert. Nanopartikel aus der Suspension adherieren an der mit Polyelektrolytschichten homogen beschichteten Oberfläche. Durch eine solche sequenzielle Beschichtung können multifunktionale Microarrays erzeugt werden. Die laterale Auflösung der einzelnen Spots hängt in erster Linie von der übertragenen Flüssigkeitsmenge ab und ist somit Geräte-bedingt. Typisch sind Spotdurchmesser von ca. 150 μm , welche auf wenige Micrometer genau platziert werden können.^[178]

Die durch die Abscheidung von (bio)-funktionalisierten Nanopartikeln mikrostrukturierten und derart für die Protein-Bindung funktionalisierten Chips können unmittelbar in Proteinbindeversuchen eingesetzt werden. Alternativ werden Ligand-Rezeptor Bindeversuche in Suspension durchgeführt und die beladenen Partikel für eine weitergehende Analyse mikrostrukturiert abgeschieden.^[74]

c) Molekular erkennende SAM-Oberflächen ermöglichen den Ligandenachweis mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations (MALDI)-Massenspektrometrie

Die monomolekulare Multischicht SAM-NTA/ Ni^{2+} /His₆-tag-RBD wurde erfolgreich als Rezeptor zur Bindung seines Liganden Ras und zur Probenpräparation für eine direkte MALDI-TOF-MS Analyse eingesetzt.^[185-187] Der Erhalt der biochemischen Aktivität des oberflächengebundenen RBD und die Ras-GTP-Bindung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Werner Bouschen und Prof. Dr. Bernhard Spengler am Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg nachgewiesen (Abbildung 10).^[188, 189]

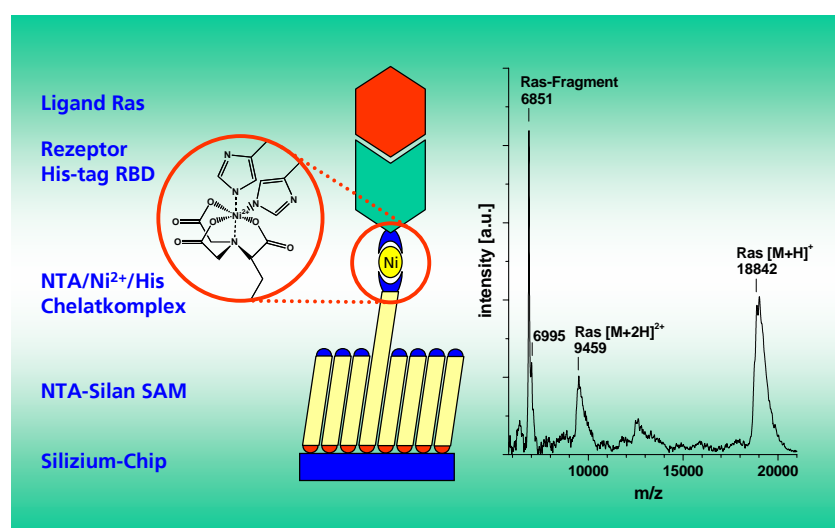


Abbildung 10: Durch sequenzielle Reaktionsfolge wurde ein SAM mit chelatkomplexierender NTA-Kopfgruppe aufgebaut. Nach Zugabe von Ni^{2+} und His₆-tag-RBD bildete sich an der Monolage ein gemischter

Chelatkomplex aus, welcher den biologischen Rezeptor günstig für die Bindung seines Ras-Liganden ausrichtet. Die Bindung des Liganden an der so aufgebauten Multischicht wurde nach Zugabe einer lichtabsorbierenden Matrix mit MALDI-TOF-MS nachgewiesen.^[127]

d) Biomolekül-bindende Nanopartikel erhöhen die Sensitivität der Affinitäts-MALDI-Massenspektrometrie

Auch partikuläre Systeme, insbesondere solche mit magnetischen Eigenschaften, wurden für die hochaffine Anbindung, Separation und Voranreicherung von Proteinen bei der Probenvorbereitung zur MALDI-TOF-MS-Analytik eingesetzt. Antikörper eines zu isolierenden Proteins werden auf der Partikeloberfläche immobilisiert und anschließend aus komplexen Matrices das entsprechende Protein isoliert.^[190] Vor dem Probenauftrag auf das MALDI-Target wird das Protein in einem zusätzlichen Arbeitsschritt freigesetzt, auf den Träger übertragen und vermessen.^[191]

Bei eigenen Experimenten gelang der MALDI-Nachweis Partikel-gebundener Liganden in Gegenwart der Partikel in der lichtabsorbierenden Schicht.^[192] Mit Ligandenbindenden Partikeln können Analytmoleküle über molekulare Erkennung spezifisch aus ihrer ursprünglichen Phase abgetrennt, gereinigt und die Protein-beladenen Partikel in eine wenige μm dünne Schicht mit lichtabsorbierender Matrix eingelagert werden. Dazu wurden an Streptavidin-funktionalisierte Polymerpartikel biotinylierte Antikörper gebunden und die resultierenden Konstrukte zur Bindung deren Antigen eingesetzt. Die mit Antigen beladenen Partikel wurden dann gemeinsam mit lichtabsorbierenden Matrixmolekülen zu einer dünnen Schicht auf dem MALDI-Probenräger abgeschieden und vermessen. Auf diese Weise gelang der massenspektrometrische Nachweis des Liganden, in diesem Fall des Cytokins Makrophagen Migrations Inhibierungsfaktor (MIF).^[193] Die Assayspezifität wurde mittels diverser Vergleichsexperimente unter Beweis gestellt.^[194] Wurden anstelle der zunächst für die bioanalytische Fragestellung verwendeten kommerziellen Streptavidinmikropartikel mit ca. 2 μm Durchmesser die im eigenen Labor synthetisierten 100 nm kleinen Silicapartikel mit Streptavidinbeschichtung^[99] verwendet, war eine deutliche Steigerung des massenspektrometrischen Signals bei einer ansonsten vergleichbaren Gesamtkonzentration des Analyten zu beobachten (Abbildung 11 (a) und (b)).^[195]

Die große spezifische Austauschfläche der Kolloide ist vermutlich ein wichtiger Grund für diese Sensitivitätssteigerung, da sie einerseits eine relativ gesehen größere Menge an Analytenbindung ermöglicht und andererseits eine große Kontaktfläche zur Ausbildung von Cokristallen zwischen Matrix- und Analytmolekülen bereitstellt. Zudem ist die kolloidale Größe der Partikel vermutlich von großem Vorteil für die Anregung des Desorptions/Ionisationsprozesses durch die LASER-Strahlung. Im Gegensatz zu Multischichten aus mehrere μm großen Partikeln sind Multischichten aus 100 nm kleinen Partikeln im Wesentlichen transparent für das verwendete LASER-Licht der Wellenlänge 337 nm. So ist tatsächlich durch Mehrfachabscheidung der beladenen Silica-Nanopartikel eine weitere Sensitivitätssteigerung zu erreichen, welche bei Mikropartikeln nicht zu beobachten ist.^[195] Dabei wird die Absolutmenge an Analyten durch Mehrfachbeschichtungen in beiden Fällen erhöht, die Signalintensität steigt aber nur bei Partikeln der Größe um 100 nm an. Vermutlich sind bei den Mikropartikeln im Wesentlichen nur die Liganden der

obersten Partikellage für den MALDI-Prozess zugänglich, während die Nanopartikel den Prozess auch für untere Lagen ermöglichen.

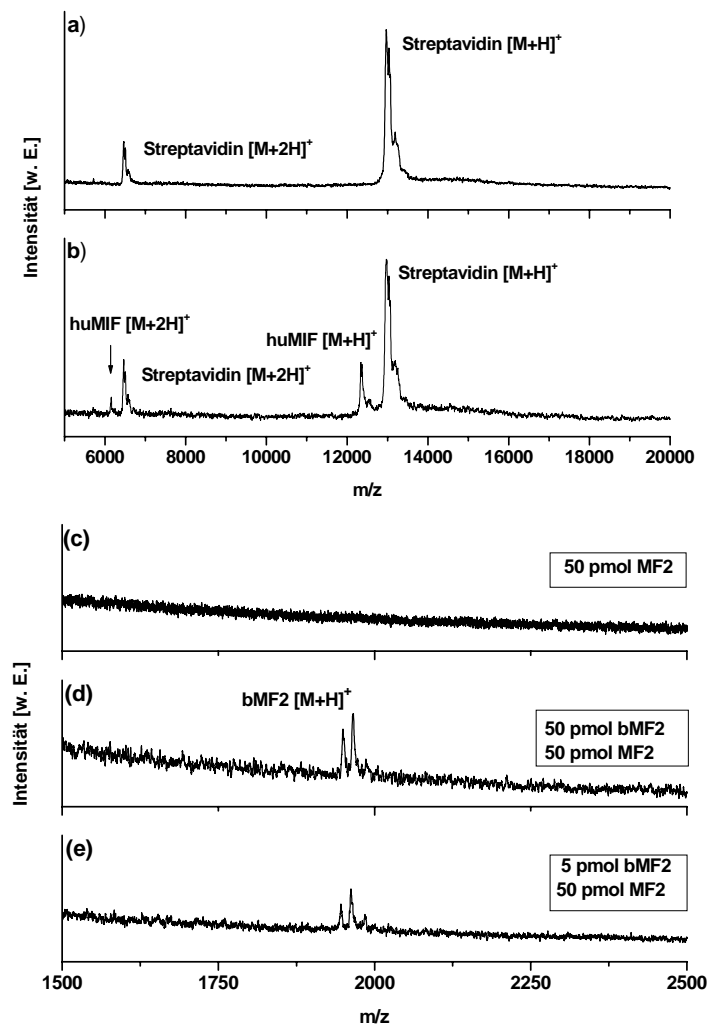


Abbildung 11: ((a) und (b)): Streptavidin-funktionalisierte Nanopartikel binden über einen Antikörper den Analyten MIF und können direkt vom MALDI-Chip vermessen werden. (a) Massenspektrum der Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikel nach Inkubation mit huMIF, ohne Zugabe von biotiniertem anti-huMIF-Antikörper. Das Spektrum zeigt nur dem Streptavidinmonomer zuzuordnende Signale. (b) Massenspektrum der gleichen Partikel bei Inkubation mit anti-huMIF-Antikörper und huMIF. Die dem huMIF [M+H]⁺ und [M+2H]⁺ zuzuordnenden Signale zeigen die spezifische Bindung des Cytokins durch die funktionalisierten Partikel, welche sie der Messung zuführen.^[186] ((c) bis (e)): MALDI-TOF-MS Spektren eines Gemisches des biotinylierten Peptids bMF2 mit dem unbiotinylierten MF2 nach Bindeexperimenten an 25 µg Streptavidin-funktionalisierten Silica-Nanopartikeln, nachfolgenden Waschschrritten und Integration der beladenen Partikel in die lichtabsorbierende Matrix enthaltende Probenschicht. Die Peptidgemische enthielten (a) 50 pmol MF2, kein bMF2, (b) 50 pmol MF2, 50 pmol bMF2 und (c) 50 pmol MF2, 5 pmol bMF2. Nur in den Spektren b) und c) sind Signale bei $m/z = 1945.9 \pm 0.5$ und $m/z = 1961.9 \pm 0.5$ deutlich zu erkennen. Das theoretische Masse-zu-Ladungs-Verhältnis des einfach protonierten bMF2 Signals liegt bei 1945.3, so dass die Signale exakt dem Massesignal [M+H]⁺ des Peptids und einem vermutlich einfach mit Sauerstoff oxidierten Ion zugeordnet werden können.^[192, 195]

e) **Rezeptor-funktionalisierte Nanopartikel binden Peptide aus komplexen Mischungen selektiv und führen sie dem MALDI-MS-Nachweis zu**

Die Rezeptorfunktion Streptavidin-funktionalisierter Nanopartikel führt zur spezifischen Bindung biotinylierter Peptide aus Peptidmischungen.^[195] Abbildung 11 (c) – (e) zeigt MALDI-Massenspektren des biotinylierten bMF2, einer 16 Aminosäuren langen Peptidsequenz, die Teil der Bindedomäne des Cytokins MIF ist und am N-terminus spezifisch biotinyliert wurde, nach Bindeexperimenten durch Nanopartikelsuspendierung in Mischungen aus biotinyliertem und nichtbiotinyliertem MF2 unterschiedlicher Konzentration. Damit steht eine Methode zur Aufreinigung und für den gezielten Nachweis gelabelter Peptide durch Biotinylierung mittels Nanopartikel und MALDI-MS zur Verfügung. Bioanalytisch von noch größerem Interesse sind jedoch labelfreie Methoden zur Analyse von Biomolekülen, wie sie im Folgenden beschrieben werden.

Streptavidin-funktionalisierte Nanopartikel binden biotinylierte Humane Leukozyten-Antigen (HLA)-Proteinkomplexe und ermöglichen deren selektive Peptidbindung aus komplexen Peptidmischungen.^[196] Die selektive Bindung von Peptiden an HLA ist zentral für die Erkennung infizierter und transformierter Zellen durch T-Zellen und ist daher Ausgangspunkt für Strategien zur Immuntherapie.^[197] Mit den derzeit verfügbaren Methoden ist immer nur ein Zielpeptid in seinen Bindeeigenschaften an HLA zu untersuchen. Diese *in vitro*-Situation ist fern der Gegebenheiten *in vivo*, bei denen verschiedene Peptide durch den *major histocompatibility complex* (MHC)-*class I* prozessierten Signalweg dargestellt werden und dann um die mögliche Bindung am HLA-Rezeptor konkurrieren. In Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Flad und Prof. Dr. Claudia Müller, Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunoheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen, sowie Dr. Hermann Beck und Prof. Dr. Gerhard Müller, Institut für Rheumatologie und Nephrologie der Universität Göttingen, gelang die bioaktive Bindung biotinylierter HLA-A2 Komplexe an Streptavidin-funktionalisierte Nanopartikel. Die so funktionalisierten Partikel ermöglichten das Screening von Bindeereignissen auch aus komplexen Peptidmischungen sowie die unmittelbare Analyse der bindenden Peptide durch einen direkten MALDI-massenspektrometrischen Nachweis, indem verlässlich zwischen HLA-bindenden und HLA-nichtbindenden Peptiden unterschieden werden konnte.^[196]

f) **Rezeptor-gebundene Proteinliganden werden von mikrostrukturiert abgeschiedenen Affinitätspartikeln für orts aufgelösten MALDI-TOF-MS-Nachweis präsentiert**

Molekular erkennend ausgestattete Nanopartikel können zur Ligandenbindung eingesetzt werden und mikrostrukturiert für die direkte MALDI-TOF-MS-Analyse abgeschieden werden.^[174, 198, 199] Entsprechend dem zuvor beschriebenen Vorgehen wurden Streptactin-funktionalisierte Silica-Nanopartikel zur Bindung eines Strep-tag-modifizierten Proteins, Strep-tag-rhuMIF (ein Strep-tag ist eine Aminosäuresequenz, welche als Ligand mit hoher Affinität an das Protein Streptactin bindet; Strep-tag-rhuMIF ist rekombinant hergestelltes humanes MIF, welches mit der Strep-tag-Sequenz exprimiert wurde), eingesetzt und gemeinsam aus einer lichtabsorbierende Matrix enthaltenden Suspension an einem MALDI-Probenträger mit einem Microspotter zu ca. 150 nm kleinen Spots abge-

schieden (siehe Abbildung 12). Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das an den Nanopartikeln gebundene *Strep-tag*-rhuMIF mit Hilfe eines Linear-MALDI-TOF-Massenspektrometers über seinen einfach protonierten Massenpeak eindeutig identifiziert. In Weiterentwicklung dieses Ansatzes können multifunktionelle Microarrays aufgebaut werden, welche zur Ligandenbindung und –identifizierung unbekannter Liganden eingesetzt und dann beispielsweise mit rasternden MALDI-MS-Verfahren ausgelesen werden.^[200]

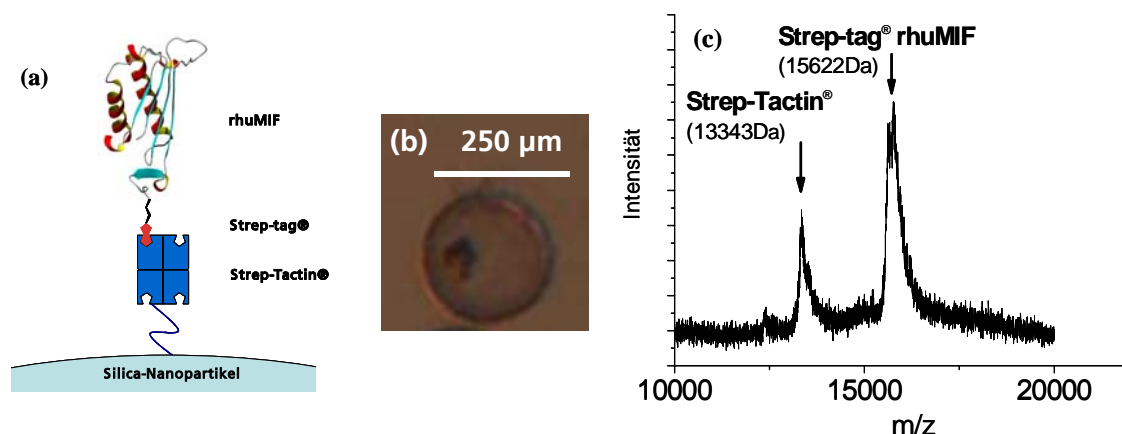


Abbildung 12: (a) Streptactin wurde kovalent an Silica-Nanopartikeln immobilisiert und bindet das modifizierte Cytokin *Strep-tag*-rhuMIF über molekulare Erkennung. (b) Durch mikrostrukturierte Abscheidung mit lichtabsorbierender Matrix entsteht ein Spot mit ca. 220 µm Durchmesser, welcher direkt als Target für die Vermessung mittels Linear-MALDI-TOF-MS dient. (c) Das im Microspot gemessene Massenspektrum zeigt für *Strep-tag*-rhuMIF das Massensignal des einfach protonierten Moleküls und für Streptactin des einfach protonierten Monomers.^[199]

g) Die molekular geprägten Nanopartikel eignen sich zum Einsatz als Selektorphase in einer Kompositmembran

Molekular geprägte Kolloide wurden als Schicht in poröse Strukturen integriert und dienen in der entstandenen Kompositmembran als Selektor zur zielgerichteten Extraktion ihrer Bindepartner.^[96, 97] Kompositmembranen mit einer gröÑenselektiven Schicht kolloidaler Polymerpartikel sind bekannt.^[201] Festphasenextraktionsmembranen mit selektiver Schicht aus molekular geprägten Polymeren wurden mit Hilfe von Pfropf-Polymerisationsverfahren auf Mikro- und Ultrafiltrationsmembranen dargestellt.^[60, 202-204] Die Abscheidung einer dünnen Schicht der hier beschriebenen molekular geprägten Polymer-nanopartikel gelang durch einfache *dead end*-Filtration mittels herkömmlicher Polymermembranen mit Porendurchmesser von 100 nm als Trägerschicht. Die Partikel wurden einem Filterkuchen entsprechend kontrolliert als dicht gepackte Schicht abgeschieden.^[98] Die beschichtete Trägermembran wurde mit einer weiteren Polymermembran am Rand verklebt und die entstandene Kompositmembran zu Trennversuchen eingesetzt.^[96, 97]

Die Trennversuche zeigten eine eindeutige Abhängigkeit der hydrodynamischen Parameter von der Schichtdicke der abgeschiedenen molekular geprägten Nanopartikel. Der Stofftransport durch die nanoskalige Schüttung wurde mit einem Kapillarmodell mo-

delliert,^[205] welches die real vorhandenen intrapartikulären Zwischenräume (Zwickel) der Schüttung durch theoretisch angenommene Kapillaren ersetzt, die parallel zueinander durch einen Festkörper ziehen. Die Anwendbarkeit des Modells und ihre für laminare Strömung durch die Kapillaren zugrunde liegenden Carman-Kozeny-Gleichung wurde gezeigt. Durch Modellierung der hydrodynamischen Experimente wurde die Porosität der Nanopartikelschüttung zu $\varepsilon = 0.38$ ermittelt.^[97]

Mit Hilfe der Modellierung gelang eine Annäherung an die optimalen Betriebsbedingungen bezüglich der zueinander gegenläufigen Parameter der spezifischen Trennleistung durch eine bevorzugte spezifische Adsorption der Templatmoleküle an den Partikeln einerseits und der Permeabilität der Kompositmembran andererseits. Im Experiment wurde Boc-phenylalaninanilid aus einem Stoffgemisch mit Boc-phenylalanin mit einer Konzentration von je $50 \mu\text{M}$ im kontinuierlich zirkulierenden *dead end*-Betrieb bei einer Schichtdicke der molekular geprägten Partikel von $38 \mu\text{m}$ und einer Selektivität der Kompositmembran von $\alpha = 2$ (wobei α das Verhältnis der Stoffmengen von BFA und Phenylalanin in Permeat und Feed angibt) sowie einer maximalen Bindekapazität von $50 \mu\text{mol}$ BFA pro g Partikelmasse abgetrennt. Die Wasser-Permeabilität der Kompositmembran wurde zu $70 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ bestimmt.^[96]

Die hier untersuchte Kompositmembran zeigte sich gegenüber den bereits bekannten Membranen mit molekular geprägten Selektoren^[60, 202-204] vorteilhaft in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute, d.h. die abgetrennte Stoffmenge Boc-phenylalaninanilid pro Feedvolumen und Zeit. Bei optimaler Konfiguration der Kompositmembran und der entsprechenden Verfahrensbedingungen können in einer Stunde 8.2 g Boc-phenylalaninanilid pro m^3 Feedvolumen abgetrennt werden.^[96, 97] Die definierte Darstellung der molekular geprägten Polymere als kolloidale Partikel und die einfache Steuerung der Dicke der selektiven Schicht in der resultierenden Kompositmembran bietet zudem methodische Vorteile gegenüber den bereits bekannten Verfahren zur Erzeugung molekular geprägter Kompositmembranen.^[96]

4) Literatur

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, Weinheim, **1990**.
- [2] J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Oxford, **1990**.
- [3] J. Kendrew, *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science, Oxford, **1994**.
- [4] D. Leckband, Measuring the Forces that Control Protein Interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 1.
- [5] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, Oriented Immobilization of Proteins. *Mikrochim. Acta* **1998**, 128, 127.
- [6] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, Plenum Press, New York, **1982**.
- [7] G. E. M. Tovar, P. Scheurich, Nanotechnologische Werkzeuge für die Immunologie. *Bioworld* **2002**, 2002-1, 6.
- [8] F. Schreiber, Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **2000**, 65, 151.
- [9] A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* **1996**, 96, 1533.
- [10] A. Ulman, *An introduction to ultrathin organic films - From Langmuir-Blodgett to self-assembly*, Academic Press: Boston, **1991**.
- [11] M. Mrksich, G. M. Whitesides, Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 55.
- [12] F. Effenberger, G. Götz, B. B., M. Wezstein, Photoinduzierte Herstellung und Strukturierung von selbstorganisierten Monoschichten mit 1-Alkenen und Aldehyden auf Siliciumhydrid-Oberflächen. *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2651.
- [13] J. Sagiv, Organized monolayers by adsorption. I. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers and solid substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92.
- [14] D. L. Allara, A. N. Parikh, F. Rondelez, Evidence for a unique chain organization in long chain silane monolayers deposited on two widely different solid substrates. *Langmuir* **1995**, 11, 2357.
- [15] C. Carraro, O. W. Yauw, M. M. Sung, R. Maboudian, Observation of Three Growth Mechanisms in Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 4441.
- [16] C. P. Tripp, M. L. Hair, Chemical attachment of chlorosilanes to silica: a two-step amine-promoted reaction. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, 5693.
- [17] D. E. Leyden, W. T. Collins, *Silylated Surfaces*, Gordon and Breach, Science Publishers, Inc., New York, **1980**.
- [18] A. Y. Fadeev, T. J. McCarthy, Self-Assembly is not the only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon. *Langmuir* **2000**, 16, 7268.

- [19] V. V. Tsukruk, I. Luzinov, D. Julthongpiput, Sticky Molecular Surfaces: Epoxysilane Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1999**, *15*, 3029.
- [20] I. Luzinov, D. Julthongpiput, A. Liebmann-Vinson, T. Cregger, M. D. Foster, V. V. Tsukruk, Epoxy-Terminated Self-Assembled Monolayers: Molecular Glues for Polymer Layers. *Langmuir* **2000**, *16*, 504.
- [21] S.-C. P. Huang, K. D. Caldwell, J.-N. Lin, H.-K. Wang, J. N. Herron, Site-Specific Immobilization of Monoclonal Antibodies Using Spacer-Mediated Antibody Attachment. *Langmuir* **1996**, *12*, 4292
- [22] S. Heid, F. Effenberger, K. Bierbaum, M. Grunze, Self-Assembled Mono- and Multilayers of Terminally Functionalized Organosilyl Compounds on Silicon Substrates. *Langmuir* **1996**, *12*, 2118.
- [23] Y. Barness, O. Gershevit, M. Sekar, C. N. Sukenik, Functionalized Silanes for the Preparation of Siloxane-Anchored Monolayers. *Langmuir* **2000**, *16*, 247
- [24] K. Takahashi, M. Suzuki, J. Kido, N. Kuramoto, K. Nagai, Alternating copolymerization of a surface-active monomer having an active ester group with dialkyl fumarates. *Polymer* **1995**, *36*, 4675.
- [25] M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Synthesis of novel activated ester surfmers for use in preparation of latexes for bioconjugation. *Polymer Preprints* **2002**, *43-2*, 1003.
- [26] M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Polymer nanoparticles with activated-ester surface by using functional surfmers. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 770.
- [27] A. Weber, M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Bioconjugative Polymer Nanospheres Studied by Isothermal Titration Calorimetry. *Thermochim. Acta* **in press**.
- [28] F. Caruso, *Colloids and Colloid Assemblies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [29] P. A. Lovell, M. S. El-Aasser, *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers*, John Wiley & Sons, Chichester, **1997**.
- [30] R. G. Gilbert, *Emulsion Polymerisation: A Mechanistic Approach*, Academic Press, San Diego, **1995**.
- [31] J. M. Asua, H. A. S. Schoonbrood, Reactive surfactants in heterophase polymerization. *Acta Polymerica* **1998**, *49*, 671.
- [32] A. Guyot, K. Tauer, J. M. Asua, S. Van Es, C. Gauthier, A. C. Hellgren, D. C. Sherrington, A. Montoya-Goni, M. Sjöberg, O. Sindt, F. Vidal, M. Unzué, H. Schoonbrood, E. Shipper, P. Lacroix-Desmazes, Reactive surfactants in heterophase polymerization. *Acta Polymerica* **1999**, *50*, 57.
- [33] A. Guyot, Recent progress in reactive surfactants in emulsion polymerization. *Macromol. Symp.* **2002**, *179*, 105.
- [34] A. Montoya-Goni, D. C. Sherrington, Reactive surfactants in heterophase polymerization. XXIII. Synthesis and characterization of novel dialkyl maleate cationic surfmers. *Polymer* **1999**, *40*, 1067.
- [35] E. T. W. M. Schipper, O. Sindt, T. Hamaide, P. Lacroix Desmazes, B. Mueller, A. Guyot, M. J. W. A. Van den Enden, F. Vidal, J. J. G. S. Van Es, A. L. German, A. Montoya Goni, D. C. Sherrington, H. A. S. Schoonbrood, J. M. Asua, M. Sjöberg, Reactive surfactants in heterophase polymerization for high-performance polymers. Part 1. Synthesis of functionalized poly(ethylene oxide)-b-poly(butylene oxide) copolymers as surfmers, inisurfs, and transurfs in heterophase polymerization. *Colloid & Polymer Science* **1998**, *276*, 402.

- [36] K. Ito, S. Yokohama, F. Arakawa, Poly(ethylene oxide) macromonomers 5. Dodecyloxy poly(ethylene glycol) methacrylate as an amphiphilic macromonomer for dispersion polymerization. *Polymer Bulletin* **1986**, *16*, 345.
- [37] J. L. Guillaume, C. Pichot, J. Guillot, Emulsifier-Free Emulsion Copolymerization of Styrene and Butyl Acrylate. III. Kinetic Studies in the Presence of a Surface Active Comonomer, the Sodium Acrylamido Undecanoate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1990**, *28*, 137.
- [38] M. J. Unzue, H. A. S. Schoonbrood, J. M. Asua, A. M. Goni, D. C. Sherrington, K. Stahler, K.-H. Goebel, K. Tauer, M. Sjoberg, K. Holmberg, Reactive surfactants in heterophase polymerization. VI. Synthesis and screening of polymerizable surfactants (surfmers) with varying reactivity in high solids styrene-butyl acrylate-acrylic acid emulsion polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 1803.
- [39] V. G. Babak, A. N. Pavlov, T. F. Svitova, A. N. Danilenko, V. V. Egorov, E. A. Varlamova, Surface Properties and Micellization in Aqueous Solutions of Homologous Series of Cationic Surface-Active Monomers. *Colloid J.* **1996**, *58*, 5.
- [40] E. Winterfeld, *Heteroatom Manipulation - Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 6, 11 ed., **1991**.
- [41] T. Seki, K. Aoi, M. Okida, Y. Shiogai, Synthesis of chitin derivatives having peptide side groups by the water-soluble active ester method. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 439.
- [42] J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [43] H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Jon Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2000**.
- [44] G. Wulff, Molekulares Prägen (Imprinting) in vernetzten Materialien mit Hilfe von Matrizenmolekülen - auf dem Weg zu künstlichen Antikörpern. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958.
- [45] B. Sellergren, Molekular geprägte Polymere mit einem Gedächtnis für kleine Moleküle, Proteine oder Kristalle. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1071.
- [46] B. Sellergren, A. J. Hall, in *Molecularly imprinted polymers* (Ed.: B. Sellergren), Elsevier, Amsterdam, **2001**, pp. 21.
- [47] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Imprinted Polymers. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467.
- [48] F. Diederich, P. J. Stang, *Templated Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [49] B. Sellergren, *Molecularly imprinted polymers*, 1 ed., Elsevier, Amsterdam, **2001**.
- [50] M. Kempe, K. Mosbach, Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 317.
- [51] C. Berggren, S. Bayouth, D. Sherrington, K. Ensing, Use of molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective clean-up of clenbuterol from calf urine. *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 105.
- [52] J. Olsen, P. Martin, I. D. Wilson, G. R. Jones, Methodology for assessing the properties of molecular imprinted polymers for solid phase extraction. *Analyst* **1999**, *124*, 467.
- [53] Y. B. Chen, M. Kele, P. Sajonz, B. Sellergren, G. Guiochon, Influence of thermal annealing on the thermodynamic and mass transfer kinetic properties of *D*- and *L*-phenylalanine anilide on imprinted polymeric stationary phases. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 928.

- [54] L. I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting. *Chromatographia* **1997**, *46*, 57.
- [55] L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson, Rapid electrochromatographic enantiomer separations on short molecularly imprinted polymer monoliths. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 43.
- [56] P. T. Vallano, V. T. Remcho, Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents. *J. Chromatogr. A* **2000**, 887, 125.
- [57] N. H. H. Heegaard, S. Nilsson, N. A. Guzman, Affinity capillary electrophoresis - important application areas and some recent developments. *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 29.
- [58] J. Matsui, Y. Miyoshi, R. Matsui, T. Takeuchi, Rod-type affinity media for liquid chromatography prepared by in-situ-molecular imprinting. *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 1017.
- [59] J. Mathew-Krotz, K. J. Shea, Imprinted Polymer Membranes for the Selective Transport of Targeted Neutral Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8154.
- [60] S. A. Piletsky, T. L. Panasyuk, E. V. Piletskaya, I. A. Nicholls, M. Ulbricht, Receptor and transport properties of imprinted polymer membranes - a review. *J. Membr. Sci.* **1999**, *157*, 263.
- [61] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1851.
- [62] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Surface imprinting of cholesterol on submicrometer core-shell emulsion particles. *Macromolecules* **2001**, *34*, 830.
- [63] S. R. Carter, S. Rimmer, Molecular recognition of caffeine by shell molecular imprinted core-shell polymer particles in aqueous media. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 667.
- [64] D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1965.
- [65] A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 824.
- [66] G. E. M. Tovar, C. Gruber, I. Kräuter, in *Topics in Current Chemistry: Colloid Chemistry II, Vol. 227* (Ed.: M. Antonietti), Springer, Berlin, Germany, **2003**, pp. 125.
- [67] S. Slomkowski, B. Miksa, M. Trznadel, D. Kowalczyk, F. W. Wang, Synthesis, morphology, and properties of latex monolayers at the quartz-liquid interface. *Polymer Preprints* **1996**, *37*, 747.
- [68] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed., Academic Press, London, **1992**.
- [69] G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [70] H. Zheng, M. F. Rubner, P. T. Hammond, Particle Assembly on Patterned "Plus/Minus" Polyelectrolyte Surfaces via Polymer-on-Polymer Stamping. *Langmuir* **2002**, *18*, 4505.
- [71] K. M. Chen, X. Jiang, L. C. Kimerling, P. T. Hammond, Selective Self-Organization of Colloids on Patterned Polyelectrolyte Templates. *Langmuir* **2000**, *16*, 7825.

- [72] P. Bertrand, A. Jonas, A. Laschewsky, R. Legras, Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 319.
- [73] G. Decher, Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232.
- [74] G. E. M. Tovar, A. Weber, Microarrays Based on Microstructured Deposition of Functional Nanoparticles for Use in Biotechnology. *Ency. Nanosci. Nanotechnol.* **in press**.
- [75] A. Weber, S. Knecht, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Modularer Aufbau von Biochips durch mikrostrukturierte Abscheidung von funktionellen Nanopartikeln. *Chem. Ing. Tech.* **2003**, *75*, 437.
- [76] G. Ramsey, DNA chips: State-of-the art. *Nature Biotechn.* **1998**, *16*, 40.
- [77] P. Cutler, Protein arrays: the current state- of-the -art. *Proteomics* **2003**, *3*, 3.
- [78] D. N. Wilson, S, Protein-Mikroarray-Technologie - Prinzipien und neuere Entwicklungen. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 510.
- [79] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer, T. O. Joos, Protein microarray technology. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160.
- [80] T. Kodadek, Protein microarrays: prospects and problems. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 105.
- [81] L. J. Kricka, Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *307*, 219.
- [82] M. Snyder, Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* **2001**, *293*, 2101.
- [83] B. B. Haab, M. J. Dunham, B. P. O., Protein microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology* **2001**, *2*, 0004.1.
- [84] G. MacBeath, S. L. Schreiber, Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science* **2000**, *289*, 1760.
- [85] N. Hauser, A. Weber, G. E. M. Tovar, S. Rupp, Nanopartikel-Biochips zur Untersuchung von *C.albicans*. *BIOspektrum* **2003**, *9*, 710.
- [86] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
- [87] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, Laserdesorptions-Massenspektrometrie von Proteinen mit Molmassen zwischen 100 000 und 250 000 Dalton. *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 805.
- [88] M. Kussmann, P. Roespstorff, Characterisation of the covalent structure of proteins from biological material by MALDI mass spectrometry - possibilities and limitations. *Spectroscopy* **1998**, *14*, 1.
- [89] R. Kaufmann, D. Kirsch, B. Spengler, Sequencing of Peptides in a Time-of-Flight MS: Evaluation of Postsource Decay Following Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *131*, 355.
- [90] R. Kaufmann, B. Spengler, F. Lutzenkirchen, Mass Spectrometric Sequencing of Linear Peptides by Product Ion Analysis in a Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 902.

- [91] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Ionization Mechanisms in MALDI Mass Spectrometry: Contribution of Pre-formed Ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1483.
- [92] J.-O. Koopmann, J. Blackburn, High affinity capture surface for matrix-assisted laser desorption/ionisation compatible protein microarrays. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 455.
- [93] M. Merchant, S. R. Weinberger, Recent advancements in surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1164.
- [94] T. A. Worrall, R. J. Cotter, A. S. Woods, Purification of Contaminated Peptides and Proteins on Synthetic Membrane Surfaces for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 750.
- [95] X. Liang, D. M. Lubman, R. D. T., G. D. Nordblom, C. M. Barksdale, On-Probe Immunoaffinity Extraction by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 498.
- [96] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen: Hydrodynamik und Stofftrennung in nanoskaligen Schuttungen. *Chem. Ing. Tech.* **2003**, *75*, 149.
- [97] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanospheres composite membranes. *Desalination* **2002**, *149*, 315.
- [98] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen für die spezifische Stofftrennung. *Chem. Ing. Tech.* **2002**, *74*, 550.
- [99] T. Schiestel, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **in press**.
- [100] G. E. M. Tovar, T. Schiestel, M. Herold, A. Weber, C. Gruber, H. Brunner, in *Nanomed*, Berlin, **2003**.
- [101] J. C. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego, **1990**.
- [102] W. Stöber, A. Fink, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *8*, 62.
- [103] M. Wilchek, in *Avidin-Biotin Technology. Methods in Enzymology, Vol. 184*, Academic Press, San Diego, **1990**, pp. 1.
- [104] S. Voss, A. Skerra, Mutagenesis of a Flexible Loop in Streptavidin Leads to Higher Affinity For the Strep-Tag II Peptide and Improved Performance in Recombinant Protein Purification. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 975.
- [105] T. Buranda, G. M. Jones, J. P. Nolan, J. Keij, G. P. Lopez, L. A. Sklar, Ligand Receptor Dynamics at Streptavidin-Coated Particle Surfaces: A Flow Cytometric and Spectrofluorimetric Study. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3399.
- [106] W. Norde, in *Biopolymers at Interfaces*, 2nd ed. (Ed.: M. Malmsten), Marcel Dekker, New York, **2003**, pp. 21.
- [107] K. Holmberg, G. Quash, in *Biopolymers at Interfaces*, 2nd ed. (Ed.: M. Malmsten), Marcel Dekker, New York, **2003**, pp. 741.

- [108] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. de Gennes, Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 149.
- [109] W. N. Steglich, B., Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren. *Angew. Chemie* **1978**, *90*, 556.
- [110] T. Schiestel, A. Hammer, S. Bryde, G. Zimmermann, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc., Vol. 224*, Boston, Massachusetts, **2002**, pp. 173.
- [111] T. Schiestel, I. Grunwald, S. Bryde, A. Hammer, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *1. BMBF-Symposium Nanobiotechnologie*, Hannover, **2003**.
- [112] F. J. Lejeune, B. B. Kroon, F. Di Filippo, H. J. Hoekstra, M. Santinami, D. Lienard, A. M. Eggermont, Isolated limb perfusion: the European experience. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2001**, *10*, 821.
- [113] R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **2001**, *104*, 487.
- [114] H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 45.
- [115] G. E. M. Tovar, T. Schiestel, H. Brunner, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, A. Hammer, M. Grell, in *DE 101 44 252*, **2002**.
- [116] T. Schiestel, A. Hammer, K. Pfizenmaier, H. Brunner, G. Tovar, in *100. Bunsen-tagung*, Stuttgart, **2001**.
- [117] T. Schiestel, A. Hammer, S. Bryde, G. Zimmermann, P. Scheurich, K. Pfizenmaier, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *Particles 2002 - Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Application of Particle Technology* (Ed.: J. Texter), Orlando, Florida, **2002**, p. 142.
- [118] K. L. Prime, G. M. Whitesides, Adsorption of Proteins onto Surfaces Containing End-Attached Oligo(ethylene oxide): A Model System Using Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714.
- [119] K. L. Prime, G. M. Whitesides, Self-Assembled Organic Monolayers. Model Systems for studying Adsorption of Proteins at Surfaces. *Science* **1991**, *252*, 1164.
- [120] C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, G. M. Whitesides, Formation of self-assembled monolayers by chemisorption of derivatives of oligo(ethylene glycol) of structure HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)_mOH on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 12.
- [121] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426.
- [122] R. Valiokas, S. Svedham, S. C. T. Svensson, B. Liedberg, Self-Assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol)-Terminated and Amide Group Containing Alkanethiolates on Gold. *Langmuir* **1999**, *15*, 3390.
- [123] R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze, Molecular Conformation and Solvation of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9767.
- [124] S.-W. Lee, P. E. Laibinis, Protein-resistant coatings for glass and metal oxide surfaces derived from oligo(ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilanes. *Biomaterials* **1998**, *19*, 1669.

- [125] C. Hoffmann, H. Brunner, G. Tovar, in *LB9 - Organised Molecular Films*, Potsdam, **2000**.
- [126] C. Hoffmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *2. Biosensor Symposium, Vol. barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001* (Ed.: G. Gauglitz), Universität Tübingen, Tübingen, **2001**, pp. Abstr. 180.
- [127] C. Hoffmann, H. Brunner, G. Tovar, in *100. Bunsentagung*, Stuttgart, **2001**.
- [128] C. Hoffmann, *Dissertation*, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2002**.
- [129] G. E. M. Tovar, C. Hoffmann, H. Brunner, in *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt - Zellbiologie und Biosensorik* (Eds.: D. Beckmann, M. Meister, S. Heiden, R. Erb), Erich Schmidt Verlag, Berlin, Germany, **2002**.
- [130] C. F. W. Becker, C. L. Hunter, R. P. Seidel, S. B. H. Kent, R. S. Goody, M. Engelhard, A sensitive fluorescence monitor for the detection of activated Ras: total chemical synthesis of site-specifically labeled Ras binding domain of c-Raf1 immobilized on a surface. *Chem. Biol.* **2001**, 8, 243.
- [131] N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, A. Wittinghofer, The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **1995**, 375, 554.
- [132] M. R. Ahmadian, T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek, Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 7065.
- [133] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography* **1987**, 411, 177.
- [134] A. A. Komissarov, M. T. Marchbank, S. L. Deutscher, The Use of Ni-Nitrilotriacetic Acid Agarose for Estimation of Affinities of Hexahistidine-Tagged Fab to Single-Stranded DNA. *Anal. Biochem.* **1997**, 247, 123.
- [135] C. Dietrich, L. Schmitt, R. Tampe, Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1995**, 92, 9014.
- [136] L. Schmitt, C. Dietrich, R. Tampe, Synthesis and Characterization of Chelator-Lipids for Reversible Immobilization of Engineered Proteins at Self-Assembled Lipid Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8485.
- [137] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides, A Self-Assembled Monolayer for the Binding and Study of Histidine-Tagged Proteins by Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 490.
- [138] M. Liley, T. A. Keller, C. Duschl, H. Vogel, Direct Observation of Self-Assembled Monolayers, Ion Complexation, and Protein Conformation at the Gold/Water Interface: An FTIR Spectroscopic Approach. *Langmuir* **1997**, 13, 4190.
- [139] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1979.
- [140] G. Tovar, C. Hoffmann, H. Brunner, in *American Vacuum Society 46th International Symposium - Biomaterial Interfaces*, Seattle, Washington, USA, **1999**.
- [141] G. Tovar, C. Hoffmann, H. Brunner, in *LB9 - Organised Molecular Films*, Potsdam, **2000**.
- [142] G. Tovar, C. Hoffmann, H. Brunner, in *99. Bunsentagung*, Würzburg, **2000**.

- [143] W. Kühlbrandt, Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 519.
- [144] J. Pieper, M. Rätsep, R. Jankowiak, K.-D. Irrgang, J. Voigt, G. Renger, G. J. Small, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 2412.
- [145] H. van Amerongen, R. van Grondelle, Understanding the Energy Transfer Function of LHCII, the Major Light-Harvesting Complex of Green Plants. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 604.
- [146] S. Y. Mhaskar, R. B. N. Prasad, G. Lakshminarayana, Synthesis of N-Acyl Amino Acids and Correlation of Structure with Surfactant Properties of Their Sodium Salts. *Journal of the American Oil Chemical Society* **1990**, *67*, 1015.
- [147] M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *18. Stuttgarter Kunststoffkolloquium* (Eds.: H.-G. Fritz, C. D. Eisenbach), Universität Stuttgart, Stuttgart, **2003**, pp. 1/V6.1.
- [148] M. Herold, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Manuscript in preparation*.
- [149] H. J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Karl, Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1381*, 203.
- [150] S. Scheuring, D. J. Muller, P. Ringler, J. B. Heymann, A. Engel, Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *Journal of Microscopy* **1999**, *193*, 28.
- [151] J. Ugelstad, M. S. El Aasser, J. W. Vanderhoff, Emulsion polymerization: Initiation of polymerization in monomer droplets. *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* **1973**, *11*, 503.
- [152] G. E. M. Tovar, C. Gruber, M. Dettling, S. Sezgin, M. Lehmann, A. Weber, H. Brunner, in *102. Bunsentagung*, Kiel, **2003**.
- [153] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, Miniemulsion Polymerization with Cationic and Nonionic Surfactants: A Very Efficient Use of Surfactants for Heterophase Polymerization. *Macromolecules* **2000**, *32*, 2679.
- [154] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222.
- [155] K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, M. Antonietti, Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 81.
- [156] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. *J. Mol. Recogn.* **1999**, *12*, 3.
- [157] M. Chellani, Isothermal titration calorimetry: Biological applications. *Am. Biotechn. Lab.* **1999**, 14.
- [158] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods* **1999**, *19*, 213.
- [159] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, John Wiley & Sons, Chichester, **1998**.
- [160] M. L. Doyle, Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Anal. Biotech.* **1997**, *8*, 31.

- [161] R. Kirchner, J. Seidel, G. Wolf, G. Wulff, Calorimetric investigation of chiral recognition processes in a molecular imprinted polymer. *J. Incl. Phen. Macrocycl. Chem.* **2002**, *43*, 279.
- [162] I. Langmuir, The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum. *Journal of American Chemical Society* **1918**, *40*, 1361.
- [163] G. Cutsforth, V. Koppaka, S. Krishnaswamy, J. Wu, K. Mann, B. Lentz, Insights into the complex association of bovine factor Va with acidic-lipid containing synthetic membranes. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2938.
- [164] P. Sajonz, M. Kele, G. Zhong, B. Sellergren, G. Guiochon, Study of the thermodynamics and mass transfer kinetics of two enantiomers on a polymeric imprinted stationary phase. *J. Chromatogr. A* **1998**, *810*, 1.
- [165] L. I. Andersson, R. Mueller, G. Vlatakis, K. Mosbach, Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1995**, *92*, 4788.
- [166] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Mueller, K. Mosbach, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **1993**, *361*, 645.
- [167] K. J. Shea, D. Spivak, B. Sellergren, Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adenine derivatives to imprinted polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368.
- [168] R. J. Umpleby, S. C. Baxter, M. Bode, J. K. Berch Jr., R. N. Shah, K. D. Shimizu, Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 35.
- [169] A. R. Khan, M. R. Riazi, Y. A. Al-Roomi, A thermodynamic model for liquid adsorption isotherms. *Sep. Purif. Technol.* **2000**, *18*, 237.
- [170] P. I. Dalko, Asymmetrische Organokatalyse. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3841.
- [171] R. J. Umpleby, S. C. Baxter, Y. Chen, R. N. Shah, K. D. Shimizu, Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584.
- [172] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Affinity parameters of amino acid derivative binding to molecularly imprinted nanospheres consisting of poly[ethylene glycol dimethacrylate-co-methacrylic acid]. *sent for publication*.
- [173] G. Decher, M. Eckle, J. Schmitt, B. Struth, Layer-by-layer assembled multicomposite films. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 32.
- [174] K. Borchers, A. Weber, T. Schiestel, J. Schmucker, T. Gose, M. Ledermann, A. Ganser, G. Geiger, A. Burger-Kentischer, B. Elkin, V. Sciaratta, J. Bernhagen, H. Brunner, G. Tovar, in *1.BMBF Statusseminar: Neue effiziente Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse*, Bad Honnef, **2003**.
- [175] G. E. M. Tovar, C. Gruber, M. Dettling, S. Sezgin, M. Lehmann, A. Weber, H. Brunner, in *3. Biosensor Symposium* (Ed.: F. W. Scheller), University of Potsdam, Potsdam, Germany, **2003**, p. 31.
- [176] K. Cottier, M. Wiki, G. Voirin, H. Gao, R. E. Kunz, Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips. *Sens. Actuators, B* **2003**, *91*, 241.
- [177] G. E. M. Tovar, C. Gruber, M. Dettling, S. Sezgin, M. Lehmann, A. Weber, H. Brunner, in *3. Biosensor Symposium*, Potsdam, **2003**.

- [178] A. Weber, G. E. M. Tovar, in *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Eds.: J. A. Schwarz, C. Contescu, K. Putyera), Marcel Dekker, New York, USA, **2003**, p. in press.
- [179] G. E. M. Tovar, A. Weber, T. Schiestel, H. Brunner, in *102. Bunsentagung*, Kiel, **2003**.
- [180] G. E. M. Tovar, S. Paul, W. Knoll, O. Prucker, J. Rhe, Patterning Molecularly Thin Films of Polymers - New Methods for Photolithographic Structuring of Surfaces. *Supramolecular Science* **1995**, *2*, 89.
- [181] O. Prucker, M. Schimmel, G. E. M. Tovar, W. Knoll, J. Rhe, Microstructuring of Molecularly Thin Polymer Layers by Photolithography. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 1073.
- [182] Y. Xia, G. M. Whitesides, Softlithographie. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568.
- [183] D. Hegemann, C. Oehr, H. Brunner, Plasma Treatment of Polymers for Surface and Adhesion Improvement. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2003**, *208*, 281.
- [184] S. Wfl, Bio-Chip Technologien. *transkript Laborwelt* **2000**, *4*, 12.
- [185] G. E. M. Tovar, C. Hoffmann, W. Bouschen, B. Spengler, H. Brunner, in *2. Biosensor Symposium, Vol. barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001* (Ed.: G. Gauglitz), Universitt Tbingen, Tbingen, **2001**, pp. Abstr. 183.
- [186] G. E. M. Tovar, T. Schiestel, C. Hoffmann, J. Schmucker, Protein biochips for affinity-MALDI-TOF-mass spectrometry. *Bioforum International* **2001**, *5*, 235.
- [187] G. E. M. Tovar, C. Hoffmann, W. Bouschen, B. Spengler, H. Brunner, in *Gordon Conference on Organic Thin Films*, Newport, Rhode Island, USA, **2001**.
- [188] W. Bouschen, C. Hoffmann, G. Tovar, B. Spengler, in *48th Am. Soc. Mass Spectr.*, Long Beach, California (USA), **2000**.
- [189] W. Bouschen, B. Spengler, C. Hoffmann, G. E. M. Tovar, in *Diskussionstag. Dt. Ges. Massenspekt.*, Berlin, **2000**.
- [190] G. B. Hurst, M. V. Buchanan, L. J. Foote, S. Kennel, Analysis for TNF- Using Solid-Phase Affinity Capture with Radiolabel and MALDI-MS Detection. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4727.
- [191] H. Kuwata, T.-T. Yip, C. L. Yip, M. Tomita, T. W. Hutchens, Bactericidal Domain of Lactoferrin: Detection, Quantitation, and Characterization of Lactoferricin in Serum by SELDI affinity Mass Spectrometry. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *245*, 764.
- [192] G. E. M. Tovar, J. Schmucker, K. Borchers, T. Schiestel, A. Weber, T. Flad, B. Spengler, H. Brunner, in *102. Bunsentagung*, Kiel, **2003**.
- [193] J. Bernhagen, T. Calandra, R. Bucala, Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *Journal of Molecular Medicine* **1998**, *76*, 151.
- [194] J. Schmucker, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *4th International Congress on Biochemical Engineering* (Ed.: H. Brunner), Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart, **2000**, pp. 367.
- [195] J. Schmucker, T. Schiestel, H. Brunner, G. E. M. Tovar, Affinity MALDI-TOF-Mass Spectrometry by using Protein-binding Silica Nanospheres. *Manuscript in preparation*.
- [196] T. Flad, T. Schiestel, H. Brunner, J. Tolson, Q. Ouyang, G. Pawelec, G. A. Mller, C. A. Mller, G. E. M. Tovar, H. Beck, Development of an MHC-class I peptide se-

- lection assay combining nanoparticle technology and MALDI mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* **2003**, 283, 205.
- [197] J. D. Altman, P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, M. M. Davis, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **1996**, 172, 94.
- [198] J. Schmucker, K. Borchers, A. Weber, T. Schiestel, H. Brunner, G. E. M. Tovar, in *Bioanalytical Quantum Steps - Justus Liebig Anniversary Symposium*, Schloss Rauschholzhausen, **2003**.
- [199] A. Weber, K. Borchers, G. E. M. Tovar, Nanopartikeloberflächen für die Protein-Biochip-MALDI-Massenspektrometrie. *transkript Laborwelt* **2003**, 4, 20.
- [200] B. Spengler, M. Hubert, Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (SMALDI) Mass Spectrometry: Instrumentation for Sub-Micrometer Resolved LDI and MALDI Surface Analysis. *American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, 735.
- [201] S. Jons, P. Ries, C. J. McDonald, Porous latex composite membranes: fabrication and properties. *J. Membr. Sci.* **1999**, 155, 79.
- [202] V. Kochkodan, W. Weigel, M. Ulbricht, Thin layer molecularly imprinted microfiltration membranes by photofunctionalization using a coated alpha-cleavage photoinitiator. *Analyst* **2001**, 126, 803.
- [203] S. A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E. V. Piletska, T. A. Thiele, M. Ulbricht, Surface Functionalization of Porous Polypropylene Membranes with Molecularly Imprinted Polymers by Photograft Copolymerization in Water. *Macromolecules* **2000**, 33, 3092.
- [204] O. Brueggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, New configurations and applications of molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A* **2000**, 889, 15.
- [205] A. E. Schneidegger, *Physics Of Flow Through Porous Media*, MacMillan Co., New York, **1960**.

5) Anhang

I) Erklärung

Gemäß §5 der Habilitationsordnung der Universität Stuttgart vom 17. 05. 1999 erkläre ich hiermit, daß ich die vorgelegte Habilitationsschrift selbständig angefertigt habe und daß dabei keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Mit der hier vorgelegten Schrift habe ich mich bei keiner anderen Hochschule beworben.

Der im Rahmen des Habilitationsverfahrens ggf. notwendigen Einbeziehung von Prüfungs- oder Personalakten stimme ich zu.

Stuttgart, 28. Januar 2004

II) Lebenslauf mit wissenschaftlichem Werdegang

von Dr. Günter Elmar Maria Tovar

Persönliche Daten

geboren am 05. 02. 1965 in Ahlen/Westfalen
 wohnhaft in Dachswaldweg 70A, 70569 Stuttgart
 verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

08.1975 - 06.1984 Städtisches Gymnasium Ahlen, *Allgemeine Hochschulreife*

Zivildienst

08.1984 - 03.1986 Mobiler Sozialer Hilfsdienst, Arbeiterwohlfahrt, Kreisverband
 Warendorf

Studium

04.1986 - 09.1988 **Grundstudium Chemie Diplom** an der Technischen Hochschule
 Darmstadt, *Vordiplom*

10.1988 - 09.1989 **Austauschstudium** an der Université de Bordeaux I in der Licence
 de Chimie-Physique,
Hauptvertiefungspraktikum im Fach **Physikalische Chemie** am
 CNRS Laboratoire de Spectroscopie Moléculaire et Cristalline
 (LSMC), Bordeaux zum Thema "Etude de cristaux dopés d'halogé-
 nure d'ammonium NH₄X : Cu, X = Cl, Br par diffusion Raman",
 Betreuung durch Directeur de Recherche Dr. Michel Couzi
 (LSMC) und Prof. Dr. Pineau, Université de Bordeaux I sowie
 Prof. Dr. Alarich Weiß, Institut für Physikalische Chemie, TH
 Darmstadt

10.1989 - 09.1991 **Hauptstudium Chemie Diplom** an der Technischen Hochschule
 Darmstadt, Hauptvertiefung **Physikalische Chemie**, Neben-
 vertiefung **Chemische Technologie**

10.1991 **Diplomprüfungen** in den Fächern **Physikalische Chemie, Orga-
 nische Chemie, Anorganische Chemie** und **Chemische Techno-
 logie**

- 12.1991 – 08.1992 **Diplomarbeit** im Hauptfach **Physikalische Chemie** zum Thema "Strukturelle Untersuchungen an flüssigen Vanadium(V)oxoalkoxiden VO(OR)₃, R = n-Pr, t-Am", durchgeführt am CNRS Centre d'Elaboration des Matériaux et d'Etudes Structurales (CEMES), Toulouse, Frankreich, Betreuung durch Prof. Dr. A. Mosset, CEMES und Prof. Dr. Hartmut Fieß, Institut für Strukturfor- schung, TH Darmstadt
- 08.1992 **Abschluß des Chemiestudiums** (*Dipl.-Ing.*) an der Technischen Hochschule Darmstadt

Dissertation

- 12.1992 - 09.1995 **Dissertation** am Max-Planck-Institut für Polymerforschung zum Thema „Strukturierung und Funktionalisierung von oxidischen Oberflächen mit biologischen und synthetischen Polymeren“, Betreuung durch Prof. Dr. Wolfgang Knoll (MPI), Co-Betreuung durch Prof. Dr. Helmut Ringsdorf, Institut für Organische Chemie, Universität Mainz,
- Promotion** zum Dr. rer. nat. im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg Universität Mainz, Disputation in den Fächern **Physikalische Chemie**, **Organische Chemie** und **Experimentalphysik** (*magna cum laude*)

Auslandsaufenthalte

- 10.1988 - 09.1989 **Austauschstudium** an der Université de Bordeaux I und **Forschungsaufenthalt** am CNRS LSMC, Bordeaux
- 12.1991 - 07.1992 **Forschungsaufenthalt** am CNRS CEMES, Toulouse
- 02.1994 - 04.1994 **Forschungsaufenthalt** am Institute for Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako, Tokio, Japan

Berufliche Tätigkeiten

- 10.1992 - 11.1992 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** im Fachbereich Chemie, Fach- gebiet Strukturforschung, Technische Hochschule Darmstadt, Implementierung der in Frankreich erlernten Methode Wide Angle X-Ray Scattering (WAXS)
- 12.1992 - 09.1995 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz
- 10.1995 – 09.1998 **Wissenschaftlicher Angestellter** am Institut für Grenzflächen- verfahrenstechnik der Universität Stuttgart
- seit 11.1998 **Leiter der Nachwuchsforschergruppe** "Biomimetische Grenzflä- chen" am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfah-

renstechnik und am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, die Fraunhofer-Gesellschaft und das Land Baden-Württemberg

Mitgliedschaft in Verbänden

Deutsche Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie (DBG)
Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)

Tätigkeiten als Gutacher

Begutachtung wissenschaftlicher Publikationen, u.a. für Angewandte Chemie, ChemPhysChem, Macromolecular Rapid Communication, Colloids and Surfaces, Analytica Chimica Acta

Stipendien

1988/89	ERASMUS Stipendium, Austauschstudium in Bordeaux
1991/92	PROCOPE Stipendium, Forschungsaufenthalt für experimentelle Arbeiten zur Diplomarbeit am CNRS CEMES, Toulouse
1997	DFG Reisesachbeihilfe, Kursbesuch der Europäischen Membrangesellschaft, Lissabon
2002	GDCh Reisestipendium, Aktive Teilnahme am Deutsch-Amerikanischen Jungwissenschaftlersymposium „Frontiers of Chemistry“, Durham, New Hampshire

Preise und Auszeichnungen

2002	VCh-Posterpreis des Makromolekularen Kolloquiums, Freiburg
2002	Posterpreis der European Membrane Society, International Congress on Membranes and Membrane Processes, Toulouse, Frankreich
2003	BMBF-Posterpreis des 1. BMBF-Status-Seminars des Förderungsschwerpunktes »Neue effiziente Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse«, Bad Honnef

Hugo-Geiger Preis für Sven Knecht für seine Diplomarbeit zur mikrostrukturierten Anlagerung biofunktionalisierter Nanopartikel

III) Lehrtätigkeiten an der Universität Stuttgart

a) Vorlesungen und Praktika

Vorlesung zum Thema „Membran- und Grenzflächenverfahrenstechnik in der Biomedizin und Biotechnologie“ mit Prof. Dr. Herwig Brunner
WS 1995/96 bis SS 2003

Vorlesung zum Thema „Medizinische Verfahrenstechnik“ mit Prof. Dr. Herwig Brunner und Prof. Dr. Heinrich Planck
WS 1995/96 bis SS 2003

Übungen und Praktika zum Thema „Membran- und Grenzflächenverfahrenstechnik in der Biomedizin und Biotechnologie.“
WS 95/96 bis SS 2003

Praktika zum Thema „Medizinische Verfahrenstechnik“
WS 95/96 bis SS 2003

b) Betreute Diplomarbeiten an Universitäten

- (1) Vaihinger, Dorothea (1997), *Universität Stuttgart, Fakultät Chemie*, Synthese und Untersuchung von molekular geprägten Membranen auf Polyacrylsäurebasis.
- (2) Geray, Jürgen (1998), *Universität Stuttgart, Fakultät Verfahrenstechnik und technische Kybernetik*, Verfahrensentwicklung zur Isolierung von Erythrozyten und dextraninduzierten Erythrozytenaggregaten aus Humanblut mittels oberflächenfunktionalisierter Mikrofiltrationsmembranen.
- (3) Spieth, Arnulf (2000), *Universität Stuttgart, Fakultät Verfahrenstechnik und technische Kybernetik*, Kapillarzonenelektrophorese als Verfahren zur Charakterisierung funktionalisierter Polymerlatices.
- (4) Steitz, Benedikt (2002), *Technische Universität Berlin, Studiengang Biotechnologie*, Präparation und Charakterisierung von ultradünnen Schichten aus biofunktionalisierten Nanopartikeln mittels der Wellenleiterspektroskopie, Ellipsometrie und Rastertkraftmikroskopie.
- (5) Knecht, Sven (2002), *Universität Stuttgart, Fakultät Verfahrenstechnik und technische Kybernetik*, Mikrostrukturierte Anlagerung biofunktionalisierter Nanopartikel mittels Photolithographie, Mikrokontaktstempeln und Mikroarrayer auf Glas-, Silizium- und Goldoberflächen.

c) Betreute Dissertationen

- (1) Hoffmann, Christian (2002), *Universität Stuttgart, Fakultät Chemie*, Selbstorganisierende Organosilansysteme zur Funktionalisierung oxidischer Siliziumoberflächen für die gerichtete Peptid- und Proteinimmobilisierung.

d) Betreute Studienarbeiten an Universitäten

- (1) Zimmermann, Hartmut (1998), *Universität Stuttgart, Fakultät Geo- und Biowissenschaften*, Untersuchung der Abtrennung von Erythrozyten aus Vollblut mittels Tiefenfiltration zum Einsatz in der automatisierten medizinischen Diagnostik.
- (2) Beeh, Markus (2000), *Universität Stuttgart, Fakultät Verfahrenstechnik und technische Kybernetik*, Immobilisierung des Wachstumsfaktors IGF-1 an aminofunktionalisierten Polyurethan-Vliesen für den Einsatz in der Wundheilung.
- (3) Steitz, Benedikt (2002), *Technische Universität Berlin, Studiengang Biotechnologie*, Immobilisierung und Vergleich der Kinetiken von TNF und modifiziertem TNF (Cys-TNF) mit TNF-R1-Fc und TNF-R2-Fc.

e) Betreute Diplomarbeiten (FH)

- (1) Eyb, Hubertus (1998), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Untersuchung der spezifischen Festphasenfunktionalisierung zur Affinitätsadsorption von Nukleinsäuren und Proteinen.
- (2) Della Ducata, Daniela (1998), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Untersuchung der Isolierung von DNA mittels funktionalisierter Mikrobeads.
- (3) Schmucker, Jürgen (1998), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Diplomarbeit zum Thema Funktionalisierung von Mikrofiltrationsmembranen für die spezifische Immobilisierung von Proteinen und Bestimmung der immobilisierten Proteine mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie.
- (4) Traulsen, Dierk (1999), Fachhochschule Lübeck, Studiengang Technische Chemie, Untersuchungen zur Immobilisierung des Wachstumsfaktors IGF-1 mittels des Affinitätssystems Biotin/Streptavidin an porösen Trägerstrukturen“, Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften.
- (5) Kolar, Stefanie (2000), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Darstellung und Untersuchung molekular prägarer Mikrogele mittels inverser Miniemulsionspolymerisation.
- (6) Dettling, Melanie (2001), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Untersuchung der molekularen Prägung von Methacrylsäure-Ethylenglycol-dimethacrylat-Copolymernanopartikeln mit Aminosäurederivaten.
- (7) Storn, Volker (2002), Fachhochschule Albstadt-Sigmaringen, Studiengang Pharmatechnik, Untersuchungen zur Synthese molekular geprägter Nanopartikel mittels Miniemulsionspolymerisation unter Verwendung der Monomere Styrol, Methacrylsäureamid und Ethylmethacrylsäureamid.

- (8) Herz, Marion (2004), Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie, Herstellung molekular geprägter Polymere mittels inverser Miniemulsionspolymerisation

f) Betreute Studienarbeiten und Praxissemester (FH)

- (1) Steinwand, Matthias (1999), *Fachhochschule Mannheim, Studiengang Chemische Technik*, Untersuchungen zur Emulsionspolymerisation als Vorstufe zur Darstellung molekular geprägter Filme.
- (2) Smolka, Silvia (2001), *Fachhochschule Reutlingen, Fachbereich Angewandte Chemie*, Praxissemester.
- (3) Storn, Volker (2003), *Fachhochschule Albstadt-Sigmaringen, Studiengang Biomedical Engineering*, Einschluss von Proteinen in bioabbaubare Nanopartikel – Optimierung des Proteingehaltes und der Morphologie.

IV) Publikationsliste

a) Wissenschaftliche Originalpublikationen

- (1) **Tovar, G. E. M.**, Mosset, A., Fueß, H. Galy, J.
Strukturuntersuchung von flüssigen Vanadium(V)oxoalkoxiden durch Röntgenweitwinkeluntersuchung (LAXS).
Z. Kristallogr., **1993**, 7, 243.
- (2) **Tovar, G. E. M.**, Paul, S., Knoll, W., Prucker, O., Rühle, J.
Patterning Molecularly Thin Films of Polymers - New Methods for Photolithographic Structuring of Surfaces.
Supramol. Science, **1995**, 2, 89-98.
- (3) Bohannon, T., Elender, G., Knoll, W., Köberle, P., Lee, J-S., Offenhaeusser, A., Ringsdorf, H., Sackmann, E., Simon, J., **Tovar, G. E. M.**, Winnik, F.
Neural Cell Pattern Formation on Glass and Oxidized Silicon Surfaces Modified with Poly-N-isopropylacrylamide.
J. Biomater. Sci. Polymer Edn., **1996**, 8, 19-39.
- (4) Prucker, O., Schimmel, M., **Tovar, G. E. M.**, Knoll, W., Rühle, J.
Microstructuring of Molecularly Thin Polymer Layers by Photolithography.
Adv. Mater., **1998**, 10, 1073-76.
- (5) Weisser, M., **Tovar, G. E. M.**, Mittler-Neher, S., Knoll, W., Brosinger, F., Freimuth, H., Lacher, M., Ehrfeld, W.
Specific Bio-Recognition Reactions Observed with an Integrated Mach-Zehnder Interferometer.
Biosens. Bioelectr., **1999**, 14, 405-411.
- (6) Miura, Y., **Tovar, G. E. M.**, Hara, M., Sasabe, H., Knoll, W.
A successive Dry-wet Process for Fabricating Conductive Thin Film of Bis(ethylene-dithio)tetrathiafulvalene Salt.
Thin Solid Films, **2001**, 393, 225-230.
- (7) Vaihinger, D.; Landfester, K.; Kräuter, I.; Brunner, H.; **Tovar, G. E. M.**
Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation.
Macromol. Chem. Phys. **2002**, 203, 1965-1973.
- (8) Weber, A., Dettling, M., Kräuter, I., Brunner H., **Tovar, G. E. M.**,
Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres.
Macromol. Rapid. Commun. **2002**, 23, 824-828.
- (9) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**
Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanospheres composite membranes.
Desalination, **2002**, 149(3), 315-321.
- (10) Herold, M., Brunner, H.; **Tovar, G. E. M.**
Synthesis of novel activated ester surfmers for use in preparation of latexes for bio-conjugation.
Polym. Prepr. **2002**, 43-2, 1003-1004.

- (11) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**
Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen:
Hydrodynamik und Stofftrennung in nanoskaligen Schüttungen.
Chem. Ing. Tech. **2003**, 75, 149-153.
- (12) M. Herold, H. Brunner, **Tovar, G. E. M.**
Polymer nanoparticles with activated-ester surface by using functional surfmers.
Macromol. Chem. Phys. **2003**, 204, 770-778.
- (13) Weber, A., Knecht, S., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.** Modularer Aufbau von Bio-
chips durch mikrostrukturierte Abscheidung von funktionellen Nanopartikeln.
Chem. Ing. Tech. **2003**, 75, 437-441.
- (14) **Tovar, G. E. M.**, Krauser, I., Gruber, C.
Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres as Fully Synthetic Affinity Receptors.
Top. Curr. Chem. **2003**, Vol. 227, 125-144.
- (15) Flad, T., Schiestel, T., Brunner, H., Tolson, J., Ouyang, Q., Pawelec, G., Müller, G.
A., Müller, C. A., **Tovar, G. E. M.**, Beck, H.
Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle
technology and MALDI mass spectrometry.
J. Immunol. Methods **2003**, 283, 205-213.
- (16) Weber, A., Herold, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**
Bioconjugative Polymer Nanospheres Studied by Isothermal Titration Calorimetry.
Thermochim. Acta (**im Druck**).
- (17) Schiestel, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**
Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation
Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles
J. Nanosci. Nanotechn. (**im Druck**).
- (18) **Tovar, G. E. M.**, Weber, A.
Functional Micro-Array Based on Micro-Structured Deposition of Functional
Nanoparticles for Use in Biotechnology.
Ency. Nanosci. Nanotechn., (**im Druck**).

b) Patente und Patentanmeldungen (Auswahl)

- (1) Bernhagen, J., Brunner, H., Eyb, H., Kiesewetter, S., Koch-Pelster, B.,
Tovar, G. E. M.,
Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren.
1997, DE 198 19 889.
- (2) Dobler, H., Kuhn, C., Lindner, H., Kiesewetter, S., Bernhagen, J., Tolle, G.,
Tovar, G. E. M.,
Vorrichtung sowie Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebever-
bund und/oder einer Flüssigkeit.
1997, DE 197 29 028.
- (3) Bernhagen, J., Dobler, H., Güth, A., Kiesewetter, S., Lindner, H., Mischniewski, M.,
Schüle, A., **Tovar, G. E. M.**, Vohrer, U.
Verfahren zur kombinierten Analyse von Zellinhalten, insbesondere den in biologi-
schen Zellen enthaltenen Nucleinsäuren sowie Vorrichtung zur Durchführung des

- Verfahrens.
1997, DE 198 01 730.
- (4) Brunner, H., Walitza, E., Geray, J., Vitzthum, F., **Tovar, G. E. M.**,
 Verfahren zur Isolierung von Erythrozyten.
1998, DE 199 12 120.
 - (5) Dobler, H., Kuhn, C., Lindner, H., Kiesewetter, S., Bernhagen, J., Tolle, G.,
Tovar, G. E. M.,
 Device and method for isolating cell material out of tissue medium and/or liquid.
1998, WO 99/02958. **2002** US 6,358,474.
 - (6) **Tovar, G. E. M.**, Bernhagen, J., Kiesewetter, S., Kuhn, C., Elser, J., Dobler, H.,
 Lindner, H.
 Filtereinheit zur mehrstufigen Separation von biologischen Zellsuspensionen und
 Lösungen.
1998, DE 19817081.5-41.
 - (7) Bernhagen, J., Brunner, H., Vitzthum, F., Elkine, B., Geiger, G., **Tovar, G. E. M.**,
 Electrical integrated nucleic acid isolation, purification and detection.
1998, WO 99/57314.
 - (8) Brunner, H., Walitza, E., Geray, J., Vitzthum, F., **Tovar, G. E. M.**,
 Method for isolating erythrocytes.
1999, WO 00/57181.
 - (9) Bernhagen, J., Brunner, H., Eyb, H., Kiesewetter, S., Koch-Pelster, B.,
Tovar, G. E. M.,
 Method and device for isolating nucleic acids.
1999, WO 99/57313.
 - (10) Elkine, B., **Tovar, G. E. M.**, Kölblin, R., Schüle, A., Güth, A., Vohrer, U., Bern-
 hagen, J., Vitzthum, J.
 Verfahren und Vorrichtung zum Aufschluss biologischer Zellen und zur Extraktion
 und Analyse der Zellinhalte.
1999, DE 197 52 961.
 - (11) Bernhagen, J., Brunner, H., Vitzthum, F., Elkine, B., Geiger, G., **Tovar, G. E. M.**,
 Electrical integrated nucleic acid isolation, purification and detection.
1999, WO 99/57314.
 - (12) **Tovar, G. E. M.**, Bernhagen, J., Kapurniotu, A., Hoffmann, C., Schneider-Fresenius,
 C., Engelhard., M., Seidel, R., Sydor, J., Becker, C., Kent, S.
 Herstellung eines Protein Biosensors mit einer definierten Bindematrix.
2000, DE 100 06 760.
 - (13) **Tovar, G. E. M.**, Vaihinger, D., Kräuter, I., Weber, A., Brunner, H.,
 Verbesserte Mikrogele und Filme.
2000, DE 100 31 003.
 - (14) **Tovar, G. E. M.**, Bernhagen, J., Kapurniotu, A., Hoffmann, C., Schneider-Fresenius,
 C., Engelhard., M., Seidel, R., Sydor, J., Becker, C., Kent, S.
 Production of a protein biosensor with a defined binding matrix.
2001, WO 01/61352
 - (15) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Brunner, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. Hammer,
 A., Grell, M.

Nanopartikel mit daran immobilisiertem biologisch aktivem TNF.
2001, DE 101 44 252.

- (16) **Tovar, G. E. M.**, Vaihinger, D., Kräuter, I., Weber, A., Brunner, H.,
 Improved microgels and films.
2001, PCT/EP01/07525.
- (17) Schiestel, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
 Vorrichtung für die gerichtete Immobilisierung von Proteinen.
2001, DE 101 44 251.
- (18) Schmucker, J., Schiestel, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
 Verbesserte massenspektrometrische Analyse unter Verwendung von Nanopartikeln.
2001, DE 101 44 250.
- (19) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Weber A., Brunner, H.
 Verbessert strukturiert funktionale Bindematrizes für Biomoleküle.
2001, DE 10164309.
- (20) Schmucker, J., Schiestel, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
 Improved mass spectrometric analysis using nanoparticles.
2002, PCT/EP02/09196.
- (21) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Brunner, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Ham-
 mer, A. Grell, M.,
 Nanoparticles comprising biologically active TNF which is immobilised on the same.
2002, PCT/EP02/09185.
- (22) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Weber A., Brunner, H., Flad, T., Müller, C.A.,
 Identifizierung von Antigen-Epitopen.
2003, DE 103 102 61.

c) Proceedings / sonstige Artikel (Auswahl)

- (1) **Tovar, G. E. M.**, (1989) Université de Bordeaux I, Talence, France, Unité de
 Chimie, Rapport de stage (frz.), Etude de cristaux dopés d'halogénure d'ammonium
 $\text{NH}_4\text{X}:\text{Cu}$, X = Cl, Br par diffusion Raman.
- (2) **Tovar, G. E. M.**, (1992) Technische Hochschule Darmstadt, Fakultät Chemie,
 Diplomarbeit, Strukturelle Untersuchungen an flüssigen Vanadium(V)oxoalkoxiden
 $\text{VO}(\text{OR})_3$, R = n-Pr, t-Am.
- (3) **Tovar, G. E. M.**, (1995) Dissertation, Funktionalisierung und Strukturierung von
 oxidischen Oberflächen mit biologischen und synthetischen Polymeren. Johannes
 Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Mainz.
- (4) **Tovar, G. E. M.**, Angermaier, L., Sluka, P., Batz, H. G., Knoll, W.
 Molecular Recognition at Biotin-functionalized Oxidic surfaces: Biofunctional Self-
 Assembly of Proteins.
Am. Chem. Soc., Coll. Surf., **1996**, 212, 12.
- (5) Schmucker, J., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
 Supported Protein Multilayers for Analyte Capturing and Surface Matrix-Assisted
 Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry.
Proc. Biochem. Engin., **2000**, 4, 367-371.

- (6) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Hoffmann, C., Schmucker, J., Protein Biochips for Affinity-MALDI-TOF-Mass Spectrometry. *Bioforum Internatl.*, **2001**, 5, 235-237.
- (7) **Tovar, G. E. M.**, Brunner, H., Biomimetische Grenzflächen: Chemie, Struktur und Funktion. *Chemie in Stuttgart, Sonderausgabe Bunsentagung 2001*, **2001**, 76-79.
- (8) **Tovar, G. E. M.**, Schiestel, T., Hoffmann, C., Schmucker, J., Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie. *Bioforum*, **2001**, 24, 474-477.
- (9) **Tovar, G. E. M.**, Hoffmann, C., Bouschen, W., Spengler, B., Brunner, H. Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie mittels gerichteter Immobilisierung von Proteinrezeptoren an Self-Assembled Monolayers aus Organosilanen. *Proc. Biosens. Symp. online*, (Hrsg. Gauglitz, Günter) Univ. Tübingen, <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001> **2001**, Abs. 183, 1-3.
- (10) Hoffmann, C., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Oligo(ethylenoxid)silan Self-Assembled Monolayer mit proteophoben Eigenschaften an Siliziumoxidoberflächen. *Proc. Biosens. Symp. online*, (Hrsg. Gauglitz, Günter) Univ. Tübingen, <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001> **2001**, Abs. 180, 1-2.
- (11) **Tovar, G. E. M.**, Vaihinger, D., Landfester, K., Brunner, H. Darstellung und Charakterisierung von Mikrogelen für die molekulare Prägung. *17. Stuttgarter Kunststoffkolloquium* (Eds.: H.-G. Fritz, C. D. Eisenbach), Universität Stuttgart, **2001**, pp 5/V2 1-3.
- (12) **Tovar, G. E. M.**, Scheurich, P. Nanotechnologische Werkzeuge für die Immunologie. *Bioworld*, **2002**, 2002-1, 6-7.
- (13) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen für die spezifische Stofftrennung. *Chem. Ing. Tech.* **2002**, 74, 550.
- (14) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, New composite membranes for selective separations. *4th Meeting Network Young Membrains, PhD-EuroConference on Membrane Technology*, Toulouse, **2002**, pp. 40-41.
- (15) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, New composite membrane adsorbers using molecularly imprinted nanospheres as selective phase. *Membrane News* **2002**, 60, 23-26.
- (16) **Tovar, G. E. M.**, Hoffmann, C., Brunner, H. Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinbindung. (Buchbeitrag) *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt – Biosensorik und Zellbiologie*, Beckmann, Meister, Heiden, Eyb (Herausg.) Berlin: Erich Schmidt Verlag, **2002**, 71-80.

- (17) **Tovar, G. E. M.**, Gruber, C., Dettling, M., Sezgin, S., Lehmann, M., Weber, A., Brunner, H.
Molecularly imprinted polymer nanospheres as fully synthetic receptors for biosensoric applications in solution and at surfaces.
3. Biosensor Symposium BSS2003 (Ed.: F. W. Scheller), Universität Potsdam, Potsdam, **2003**, p. 31.
- (18) Herold, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
Aktivester Surfmere-Intelligente Moleküle zur Herstellung neuer Polymernanopartikel für die Biokonjugation.
18. Stuttgarter Kunststoffkolloquium (Eds.: H.-G. Fritz, C. D. Eisenbach), Universität Stuttgart, **2003**, pp. 1V6/1-5.
- (19) **Tovar, G. E. M.**, Gruber, C., Dettling, M., Sezgin, S., Lehmann, M., Weber, A., Brunner, H.
Molekular geprägte Nanopartikel - Neue nanoskalige synthetische Affinitätsrezeptoren.
18. Stuttgarter Kunststoffkolloquium (Eds.: H.-G. Fritz, C. D. Eisenbach), Universität Stuttgart, **2003**, pp. 1/V7.1-4.
- (20) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
Highly specific separation in life sciences: New composite membranes with molecularly imprinted nanospheres as selective phase.
9. Aachener Membran Kolloquium, VDI / GVC, Aachen, **2003**, pp. P6.9/1-6.
- (21) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
Downstream Processing: New Composite Membranes for Highly Specific Separation of Amino Acids.
21. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, DECHEMA, München, **2003**, pp. V18-V19.
- (22) **Tovar, G. E. M.**, Brunner, H.
Biomimetische Grenzflächen: Sphärische Nanopartikel als Mittler zwischen Nano- und Biotechnologie.
Jahr der Chemie, Universität Stuttgart, **2003**.
- (23) Weber, A., Schiestel, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
Bioaktive Mikroarrays durch mikrostrukturierte Anlagerung von funktionellen Nanopartikeln.
11. Heiligenstädter Kolloquium 2002 – Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt, Heiligenstadt (Buchbeitrag, im Druck).
- (24) Weber, A., Schiestel, T., Schmucker, J., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**,
Affine Mikrochips für die spezifische Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.
11. Heiligenstädter Kolloquium 2002 – Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt, Heiligenstadt (Buchbeitrag, im Druck).
- (25) **Tovar, G. E. M.**
Positionsbestimmungen: Grenzflächen und der Blick aufs Ganze.
Nachrichten aus der Chemie, **2003**, 51(09), 929.

d) Vorträge (Auswahl)

- (1) Molecular Recognition at Biotin-functionalized Oxidic surfaces: Biofunctional Self-Assembly of Proteins (1996), 212th Natl. Meeting of the Am. Chem. Soc., 25. - 29. 08., Orlando, Florida.
- (2) Oriented Protein Binding via Silane-SAMs Using His-tagged Proteins (1999), 46th International Symposium Am. Vac. Soc., Biomaterial Interfaces, 24. - 27. 10., Seattle, Washington.
- (3) Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinbindung (2000), BMBF-Statusseminar, Programm Biotechnologie 2000, 16. 02., Stuttgart.
- (4) Silane based fuctionalisation of oxide surfaces for oriented immobilisation of protein receptors (2000), LB9 - Organised Molecular Films., 28. 08. – 01. 09., Potsdam.
- (5) Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinbindung (2000), 10. Heiligenstädter Kolloquium 2000 – Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt, 09. – 11. 10., Heiligenstadt.
- (6) Surface functionalization by silane self-assembly chemistry for oriented immobilization of protein receptors (2000), CSEM, 01.12., Neuchâtel, Schweiz.
- (7) Darstellung und Charakterisierung von molekular geprägten Mikrogelen (2001), 17. Stuttgarter Kunststoff-Kolloquium, 14.-15. 03., Stuttgart.
- (8) Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-MS mittels gerichteter Immobilisierung von Proteinrezeptoren an Self-Assembled Monolayers aus Organosilanen (2001), Biosensor 2001, 02.-04. 04., Tübingen.
- (9) One stage preparation of molecularly imprinted nanospheres (2001), Frontiers of Polymer Colloids, 04.-06. 04., Surrey, Great Britain.
- (10) Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors (2002), Particles 2002 – Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Application of Particle Technology, 20.-23.04., Orlando, FA, USA.
- (11) Affine Oberflächen für die spezifische Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (2002), GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2002, 11.-13.06., Wiesbaden.
- (12) Bioactive Microarrays by Microstructured Deposition of Functional Nanoparticles (2002), 224th Natl. Meeting of the Am. Chem. Soc., 18.-22. 08., Boston, MA, USA.
- (13) Molecularly Imprinted Nanospheres as Synthetic Affinity Material for Biotechnical Application (2002), 224th Natl. Meeting of the Am. Chem. Soc., 18.-22. 08., Boston, MA, USA.
- (14) Polymer Nanoparticles for Bioconjugation by Co-polymerization of Activated-Ester Surfmer (2002), 224th Natl. Meeting of the Am. Chem. Soc., 18.-22. 08., Boston, MA, USA.
- (15) Controlled synthesis of molecularly imprinted polymer spheres as nanoscale synthetic receptors (2002), 2nd Internat. Workshop on Molecularly Imprinted Polymers, 16.-19.09., Montpellier (La Grande Motte), France.
- (16) Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic receptors in coatings for molecular recognition (2002), XXVI FATIPEC Congress, 09.-11.09., Dresden.

- (17) Design by chemistry: Tailoring nanoparticle surfaces for biomedical use (2003), *Nanomed*, 17.-18. 02., Charité, Berlin.
- (18) Biomimetic Surfaces (2003), *RIKEN – The Institute of Physical and Chemical Research, Frontier Research Program*, 25. 02., Wako, Japan.
- (19) Chemical Tailoring of Nanoparticle Surfaces for Biomedical Use (2003), *Nanotech 2003 & Future, Session Nanomedicine*, 26.-28. 02., Tokyo, Japan.
- (20) Molecularly imprinted polymer nanospheres as fully synthetic receptors for biosensoric applications in solution and at surfaces (2003), *3. Biosensor Symposium*, 30. 03. – 01. 04. 2003, Potsdam.
- (21) Molekular geprägte Nanopartikel – Neue nanoskalige synthetische Affinitatsrezeptoren (2003), *18. Stuttgarter Kunststoff-Kolloquium*, 19.-20. 03., Stuttgart.
- (22) Molekular geprägte Nanopartikel als biomimetische Affinitatsrezeptoren für die Sensorik von Biomolekülen (2003), *102. Bunsentagung*, 29.-31.05., Kiel.
- (23) Molecularly imprinted polymer nanospheres for biosensoric applications (2003), *8th International Symposium on Polymer designs for BioSeparation and Nanobio-technology*, 27.-29. 11., Compiègne, Frankreich.
- (24) One-stage Synthesis of MIP Nanospheres (2003), *MRS Fall Meeting*, 01.-05.12., Boston, MA, USA.

e) Konferenzbeitrage / Poster (Auswahl)

- (1) **Tovar, G. E. M.**, Paul, S., Knoll, W., Prucker, O., Ruhe, J., Patterning Molecularly Thin Films of Polymers - New Methods for Photolithographic Structuring of Surfaces (1997), *Organized Molecular Films*, 24. - 29. 8., Asilomar, Kalifornien, USA.
- (2) Traulsen, D., Schmucker, J., Sciaratta, V., Müller, M., Oehr, C., Graeve, T., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Biotin-Streptavidin-Funktionalisierung poroser Tragerstrukturen: Darstellung einer flexiblen biologischen Bindematrix (1998), *Jahrestag. Dt. Ges. Biomaterialien*, 27. - 28. 11., Tübingen.
- (3) Schmucker, J., Traulsen, D., Müller, M., Oehr, C., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Covalent surface functionalization of polymeric and ceramic membranes: Molecular recognition based on the biotin streptavidin affinity system (1998), *Symposium Biochips: Technologien und Anwendungen*, 22. - 23. 10., Reutlingen.
- (4) Vitzthum, F., Dobler, H., Geiger, G., Elkin, B., Kuhn, C., Klumpp, B., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Bernhagen, J., Application of physical sample preparation methods in DNA diagnostics (1998), *Symposium Biochips: Technologien und Anwendungen*, 22. - 23. 10., Reutlingen.
- (5) **Tovar, G. E. M.**, Schmucker, J., Eyb, H., Müller, M., Brunner, H., Covalent surface functionalization of polymeric and ceramic membranes: Molecular recognition based on the biotin streptavidin affinity system (1998), *216th ACS meeting*, 23. - 27. 08., Boston, USA.
- (6) **Tovar, G. E. M.**, Vaihinger, D., Eisenbach, C.D., Brunner, H., Molekular geprägte Polyacrylsaure-Netzwerke als molekulare Selektoren in der Membrantechnik (1998), *97. Bunsentagung*, 21. - 23. 05., Münster/Westfalen.

- (7) **Tovar, G. E. M.**, Weisser, M., Mittler-Neher, S., Knoll, W., Sluka, P., Angermaier, L., Batz, H.G., Brosinger, F., Freimuth, H., Lacher, M., Ehrfeld, W., Molecular Recognition via Biotin-Streptavidin Surface Technology Observed by In-Situ Surface Plasmon Spectroscopy and Integrated Mach-Zehnder Interferometry (**1998**), *Regio Surface II*, 2.-4.03., Freiburg.
- (8) Vaihinger, D., **Tovar, G. E. M.**, Eisenbach, C.D., Brunner, H., Molecular Recognition with Polymeric Membranes: Molecularly Imprinted Polyacrylic Networks (**1998**), *Regio Surface II*, 2.-4. 03., Freiburg.
- (9) Schmucker, J., Bernhagen, J., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Polymeric Supports for Specific Protein Multilayer Formation and Direct Use in MALDI-TOF-Mass Spectrometry (**1999**), *Gordon Research Conference on Polymer Colloids*, 27. 06. - 02. 07., Tilton, New Hampshire, USA.
- (10) **Tovar, G. E. M.**, Schmucker, J., Bernhagen, J., Brunner, H., Protein Binding Supports for Direct Use in MALDI-TOF-MS: Surface Functionalization of Microfiltration Membranes and Microbeads (**1999**), *International Workshop on Biosensors Utilizing Lipid Bilayer Membranes*, 22. - 25. 04., Mainz.
- (11) Vaihinger, D., Landfester, K., Kräuter, I., Weber, A., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Molecularly imprinted microgels – synthesis and film formation (**2000**), *Workshop Tailored Function by Colloidal Assembly*, 24.-25. 11., Ulm. Hoffmann, C., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Oligo(ethylene oxide) silanes for protein repellent self-assembled monolayers on silicon oxide (**2000**), *LB9 – Organised Molecular Films*. 28. 08. – 01. 09., Potsdam.
- (12) Vaihinger, D., Landfester, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Synthesis and characterisation of molecularly imprinted polymeric nanoparticles (**2000**), *LB9 - Organised Molecular Films*. 28. 08. – 01. 09., Potsdam.
- (13) Vaihinger, D., Landfester, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Molecularly imprinted polymer colloids prepared by emulsion polymerization. (**2000**), *1st Intl. Workshop Molec. Imprint. Polym. Sci. Techn.*, 03. - 05. 07., Cardiff, UK.
- (14) Bouschen, W., Hoffmann, C., **Tovar, G. E. M.**, Spengler, B., Analysis of biological samples and functionalized surfaces with MALDI-MS and Scanning Microprobe MALDI-MS (**2000**), *48th Am. Soc. Mass Spectr.*, 11. – 15. 06., Long Beach, California, USA.
- (15) **Tovar, G. E. M.**, Hoffmann, C. Brunner, H., Chelatoroberflächen zur gerichteten Proteinbindung mittels Organosilan-Monolagen (**2000**), *99. Bunsentagung*, 01. - 03. 06., Würzburg.
- (16) Bouschen, W., Spengler, B., Hoffmann, C., **Tovar, G. E. M.**, Identifizierung von Proteinliganden funktionalisierter Oberflächen durch MALDI-MS (**2000**), *Dt. Ges. Massenspekt. - Diskussionstag.*, 27. 02. – 01. 03., Berlin.
- (17) **Tovar, G. E. M.**, Schmucker, J., Brunner, H. Supported Protein Multilayers for Analyte Capturing and Surface Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry (**2000**), *4th International Congress on Biochemical Engineering*, 17. - 18. 02., Stuttgart.
- (18) Vohrer, U., Graeve, T., Oehr, C., Hierlemann, H., Planck, H., Schmucker, J., **Tovar, G. E. M.**, Brunner, H., Immobilisation of the growth factor IGF-1 on plasma-

modified nonwovens for wound healing (2000), 4th International Congress on Biochemical Engineering, 17. - 18. 02., Stuttgart.

- (19) Weber A., Herold M., Brunner H., **Tovar, G. E. M.**, Binding characteristics of active ester surfmer latexes investigated by isothermal titration calorimetry and waveguide spectroscopy (2001), *Molecular Systems & Devices*, 16.-17.11., Ulm.
- (20) Herold M., Brunner H., **Tovar, G. E. M.**, One-step synthesis of protein binding latexes using new active ester surfmers (2001), *Molecular Systems & Devices*, 16.-17.11., Ulm.
- (21) Herold M., Brunner H., **Tovar, G. E. M.**, One-step synthesis of protein binding latexes using new active ester surfmers (2001), *Chemical Nanotechnology Talks II*, , 8.-9.10., DECHEMA, Frankfurt a.M.
- (22) Flad, T., Beck, H., Bogumil, R., Schiestel, T., **Tovar, G. E. M.**, Tolson, J., Ouyang, Q., Pawelec, G., Mueller, G.A., Mueller, C.A., Rapid Analysis of T Cell Epitopes on a Protein Biochip (2001), *Progress in Vaccination Against Cancer (PIVAC)*, 06.-09.07.01, Cambridge, Grossbritannien.
- (23) Vaihinger, D., Dettling, M., Kräuter, I., Weber, A., Landfester, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, One-stage preparation of molecularly imprinted nanospheres (2001), *Gordon Conference on Polymer Colloids*, 01.-06.07., Tilton, New Hampshire, USA.
- (24) Hoffmann, C., Bouschen, W., Spengler, B., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Self-Assembled Monolayer Protein Chip for Affinity MALDI-TOF Mass Spectrometry (2001), *Gordon Conference on Organic Thin Films*, 24.-29.06., Newport, Rhode Island, USA.
- (25) **Tovar, G. E. M.**, Vaihinger, D., Landfester, K., Kräuter, I., Weber, A., Brunner, H., Synthesis and characterisation of microgels for molecular imprinting (2001), *100. Bunsentagung*, 24.-26.05., Stuttgart.
- (26) Hoffmann, C., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Proteophobe Oligi(ethylenoxid)silan-modifizierte Siliziumoxidoberflächen (2001), *100. Bunsentagung*, 24.-26.05., Stuttgart.
- (27) Schiestel, T., Hammer, A., Pfizenmaier, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Synthese und Oberflächenfunktionalisierung von Silica-Nanopartikeln zur Proteinimmobilisierung (2001), *100. Bunsentagung*, 24.-26.05., Stuttgart.
- (28) Kräuter, I., Vaihinger, D., Landfester, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Atomic Force Microscopy of Molecularly Imprinted Polymer Colloids (2001), *Frontiers of Polymer Colloids*, 04.-06. 04., Surrey, Grossbritannien.
- (29) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanospheres compositemembranes (2002), *International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 07.07.-12.07., Toulouse, France.
- (30) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Stofftrennung in der Mikroverfahrenstechnik: Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen (2002), *DECHEMA-Statusseminar Modulare Mikroverfahrenstechnik und DECHEMA-Kolloquium Mikroverfahrenstechnik unter industriellen Aspekten*, 28.02., Frankfurt a.M.

- (31) Lehmann, M., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen für die spezifische Stofftrennung (2002), *GVC/DECHEMA Jahrestagung*, 11.06.-13.06., Wiesbaden.
- (32) Schiestel, T., Hammer, A., Bryde, S., Zimmermann, G., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Silica Nanoparticle Carrier System with Special Bioactivity (2002), *224th Natl. Meeting of the Am. Chem. Soc.*, 18.-22.08., Boston, MA, USA.
- (33) **Tovar, G. E. M.**, Nano-scale particles and layers for biomimetic surfaces (2002), *2nd German and American Symposium Frontiers of Chemistry – Zukunft der Chemie*, 23.-25.08., Durham, NH, USA.
- (34) Weber, A., Schiestel, T., Schmucker, J., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Affine Mikrochips für die spezifische Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (2002), *11. Heiligenstädter Kolloquium 2002 – Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt*, 30.09.-02.10., Heiligenstadt.
- (35) Lehmann, M., Dettling, M., Sezgin, S., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Separation processes in life science: molecularly imprinted nanospheres as selective phase in new composite membranes (2002), *DECHEMA Colloquium Chemical Nanotechnology Talks III*, 9.-11.10., Mannheim.
- (36) Herold, M., Knecht, S., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Facile Preparation of Activated Ester Nano-Particles for Protein Immobilization (2002), *DECHEMA Colloquium Chemical Nanotechnology Talks III*, 9.-11.10., Mannheim.
- (37) Schiestel, T., Hammer, A., Bryde, S., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Nanoparticles modified with membrane-proteins mimicking specific cellular behaviour (2002), *DECHEMA Colloquium Chemical Nanotechnology Talks III*, 9.-11.10., Mannheim.
- (38) Borchers, K., Weber, A., Schiestel, T., Schmucker, J., Gose, T., Ledermann, M., Ganser, A., Geiger, G., Burg-Kentischer, A., Elkin, B., Müller, M., Bernhagen, J., Brunner, H., **Tovar, G. E. M.**, Mikrochip-Oberflächen für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie (2003), *1. BMBF-Status-Seminar des Förderschwerpunktes Neue effiziente Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse*, 12.-14.05., Bad Honnef.
- (39) **Tovar, G. E. M.**, Weber, A., Schiestel, T., Brunner, H., Bioaktive Mikroarrays durch mikrostrukturierte Anlagerung von funktionellen Nanopartikeln (2003), *102. Bunsentagung*, 29.-31.05., Kiel.
- (40) **Tovar, G. E. M.**, Schmucker, J., Borchers, K., Schiestel, T., Weber, A., Flad, T., Spengler, B., Brunner, H., Nanopartikelschichten als sensorische Oberflächen für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie (2003), *102. Bunsentagung*, 29.-31.05., Kiel.

V) Danksagung

Prof. Dr. Herwig Brunner für die fortwährende Unterstützung meiner Arbeit und ein sehr angenehmes und inspirierendes Arbeitsumfeld.

Prof. Dr. Helmut Bertagnolli und Prof. Dr. Emil Roduner für ihre Unterstützung meines Habilitationsvorhabens im Fachbereich und die konstruktiven Gespräche.

Meiner Arbeitsgruppe für ihre vorbildliche und motivierte Mitarbeit an den vorgestellten Forschungsvorhaben, die unzähligen fruchtbaren Diskussionen im weiten Feld der biomimetischen Grenzflächen und ihre Freude an Wissenschaft und Forschung.

PD Dr. Katharina Landfester für methodische Unterstützung bei der Miniemulsionspolymerisation und einzelne Messungen mittels CP-MAS-NMR, AFM und TEM.

Prof. Dr. Peter Scheurich, Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier, Dipl. Biol. Susanne Bryde, Dr. Angela Hammer, Dr. Ingo Grunwald, Institut für Immunologie und Zellbiologie, Universität Stuttgart, für die Bereitstellung der TNF-Mutanten und die zellbiologischen und konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Prof. Dr. Claus D. Eisenbach, Dr. Klaus Dirnberger für die große Anzahl regelmäßig durchgeführter NMR Messungen.

Prof. Dr. Jürgen Bernhagen, Uniklinik Aachen, für die freundschaftliche Zusammenarbeit am IGVT und IGB sowie für die Bereitstellung von MIF und MF2.

Prof. Dr. Franz Effenberger für Messungen mit der Langmuir-Blodgett-Filmwaage und FT-IR.

PD Dr. Martin Engelhard, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, für die Bereitstellung von RBD/Ras-Probenmaterial.

Prof. Dr. Claudia A. Müller, Dr. Thomas Flad, Uniklinik Tübingen, für die Bereitstellung von MHC/HLA-Probenmaterial und molekularbiologische Untersuchungen.

Prof. Dr. Gerhard Müller, Dr. Hermann Beck, Universität Göttingen für die Durchführung von MALDI-TOF-MS Untersuchungen an HLA-beladenen Nanopartikeln.

Prof. Dr. Bernhard Spengler, Dr. Werner Bouschen, Universität Giessen, für die Durchführung von MALDI-TOF-MS Untersuchungen an Ras/RBD/Ni²⁺/NTA-SAM-funktionalisierten Proben.

Prof. Dr. Jörg Wrachtrup, Physikalisches Institut, Uni Stuttgart, für die Bereitstellung von LHC-Proben und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an LHC/Ni²⁺/NTA-SAM-funktionalisierten Proben.

Meinen Kollegen am IGVT und IGB für die gute Zusammenarbeit und zahlreiche fruchtbare Diskussionen, insbesondere Dr. Steffen Rupp und Dr. Nicole Hauser für Experimente zu Untersuchungen an DNA-Chips, Monika Riedl für REM-Aufnahmen und Dr. Uwe Vohrer für XPS-Messungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), der Fraunhofer-Gesellschaft sowie der Universität Stuttgart und dem Land Baden-Württemberg, welche die Möglichkeit für die vorliegende Forschungsarbeit überhaupt erst geschaffen haben.

Meiner Frau und meiner Tochter danke ich von Herzen für ihre Geduld, ihre Liebe und die vielen schönen Stunden, die mir immer wieder neue Energie für meine Arbeit geben.

Besonders danke ich herzlich meinen lieben Eltern – meiner Mutter und anlässlich dieser Habilitation insbesondere meinem Vater für seine stete Unterstützung und sein fortwährendes Interesse an meinem Werdegang.

VI) Kopien eigener Publikationen

- (1) Schiestel, T., Brunner, H., Tovar, G. E. M.* Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechn.* **2004**, *4*, 504-511.
- (2) Tovar, G. E. M.*, Weber, A. Functional Micro-Array Based on Micro-Structured Deposition of Functional Nanoparticles for Use in Biotechnology. *Dekker Ency. Nanosci. Nanotechn.* **2004**, *1*, 277-286.
- (3) Weber, A., Herold, M., Brunner, H., Tovar, G. E. M.* Bioconjugative Polymer Nanospheres Studied by Isothermal Titration Calorimetry. *Thermochim. Acta* **2004**, *415*, 69-74.
- (4) Tovar, G. E. M.*, Kräuter, I., Gruber, C. Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres as Fully Synthetic Affinity Receptors. *Top. Curr. Chem.* **2003**, *227*, 125-144.
- (5) Flad, T.*, Schiestel, T., Brunner, H., Tolson, J., Ouyang, Q., Pawelec, G., Müller, G. A., Müller, C. A., Tovar, G. E. M., Beck, H. Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle technology and MALDI mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* **2003**, *283*, 205-213.
- (6) Herold, M., Brunner, H., Tovar, G. E. M.* Polymer nanoparticles with activated-ester surface by using functional surfmers. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 770-778.
- (7) Lehmann, M., Brunner, H., Tovar, G. E. M.* Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Kompositmembranen: Hydrodynamik und Stofftrennung in nanoskaligen Schüttungen. *Chem. Ing. Tech.* **2003**, *75*, 149-153.
- (8) Vaihinger, D.; Landfester, K.; Kräuter, I.; Brunner, H.; Tovar, G. E. M.* Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by mini-emulsion polymerisation. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1965-1973.
- (9) Tovar, G. E. M.*, Hoffmann, C., Brunner, H., Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinbindung. in *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt – Zellbiologie und Biosensorik* (Eds.: D. Beckmann, M. Meister, S. Heiden, R. Erb), Erich Schmidt Verlag, Berlin, Germany, **2002**, 71-80.
- (10) Lehmann, M., Brunner, H., Tovar, G. E. M.* Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanospheres composite membranes. *Desalination*, **2002**, *149(3)*, 315-321.
- (11) Weber, A., Dettling, M., Kräuter, I., Brunner H., Tovar, G. E. M.*, Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres. *Macromol. Rapid. Commun.* **2002**, *23*, 824-828.

Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles

Thomas Schiestel, Herwig Brunner, and Günter E. M. Tovar*

Laboratory for Biomimetic Surfaces, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering & Biotechnology, and University of Stuttgart, Institute for Interfacial Engineering, Nobelstr. 12, D-70569 Stuttgart, Germany

Silica nanoparticles with a diameter of 100 nm were covalently modified at their surface by adjustable amounts of amine and carboxyl functional groups. Bioconjugation studies of two proteins, streptavidin and streptactin, with the functional nanoparticles resulted in optimum binding of the proteins to a long-chain carboxyl-terminated linker. The surface functionalization of the nanoparticles was monitored by a variety of independent methods, including zeta-potential measurements, dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), particle charge detection titrations (PCD) and elemental analysis. At the surface of the nanoparticles, a functional surface group density of 1.8 amino groups per nm² was realized. The amine functions were quantitatively transferred to carboxyl groups coupled with a linker elongation. Streptavidin was immobilized by covalent binding to the carboxyl linkers and resulted in a protein density at the surface of the nanoparticles that was three times higher than the highest binding densities at nanoparticles published to date. The binding capacity of the streptavidin-covered nanoparticles for ligand biotin was quantified by titration with biotin-4-fluorescein to 2.5 biotin binding sites per 100 nm².

Keywords: Colloid Chemistry, Bioconjugation, Surface Modification, High Capacity Binding Matrix, Molecular Recognition.

1. INTRODUCTION

The use of small solid carriers becomes increasingly important for biomedical research and application. By far, most publications deal with particles of dimensions in the μm range. Such microbeads proved to be valuable tools for binding processes of biological targets from biological samples, e.g., for cell sorting^{1,2} or protein enrichment and purification.³ Microparticles were also conjugated with proteins to bind specifically to target cells.⁴

In contrast to the use of microparticles, the features of nanoparticles enable for new strategies of applying smart materials in biomedicine and biotechnology. A major advantage of nanoparticles, when compared to microbeads, is their smaller size leading to better handling in fluids and to a dramatically increased surface. These properties allow the design of particles with a highly efficient interaction with biological material. Nanoparticles showed to be advantageous when used as carriers for drugs,⁵ proteins⁶ or DNA.⁷ In addition, the core of the nanoparticles can be specifically designed for use as a label in various bioana-

lytical techniques. Fluorescently or superparamagnetically active nanoparticle cores have been used as labels in respective analytical methods^{8,9} or as contrast agents in magnetic resonance imaging.¹⁰

Surface modified silica nanoparticles have received increasing attention in modern biotechnical and biomedical applications.^{11–13} They are an excellent model system for the development of nanoparticulate carrier systems as they are relatively simple and tuneable in particle size, and provide a high flexibility in surface modification reactions by silanization. Furthermore, silica particles are chemically inert over a broad range of conditions and are biocompatible.

The protein streptavidin is very often used in biotechnology as it possesses a uniquely high affinity to its ligand biotin.¹⁴ Biotin, or Vitamin H, is a low molecular weight compound that can easily be conjugated to biomolecules such as proteins. Thereby, obtained biotinylated moieties bind highly selective and strong to surfaces covered by streptavidin. Numerous publications deal with the immobilization of streptavidin on planar or particulate surfaces, e.g., for applications in gene technology,¹⁵ chromatography,¹⁵ sensor technology¹⁶ or material science.¹⁷

*Author to whom correspondence should be addressed.

Only a very limited number of articles describe the immobilization of streptavidin or related proteins to nanoparticle surfaces^{18–21} and little quantitative data on the efficiency of the protein immobilization on nanoparticles have been reported.

Here, we describe the synthesis of silica nanospheres and their controlled surface modification by a sequence of chemical reactions, finally focusing on the immobilization of streptavidin. The density and amount of functional groups introduced to the nanoparticle surface were monitored by a variety of independent methods, including dynamic light scattering (DLS), zeta-potential measurements, scanning electron microscopy (SEM), particle charge detection titrations (PCD), elemental analysis and fluorescence spectroscopy.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals: Tetraethoxysilane (TEOS) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) were purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany). Ammonia (p.a., 25 wt.-%), ethanol (HPLC grade), tetrahydrofuran, succinic anhydride and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) were obtained from SAF (Taufkirchen, Germany). Alexa fluorescence markers and biotin-4-fluorescein were purchased from MoBiTec (Göttingen, Germany). Streptavidin (SAV) was obtained from Roche (Tutzing, Germany). Streptactin²² was purchased from IBA (Göttingen, Germany). All chemicals were used as received.

The buffers used were 100 mM acetate buffer, pH 4.7 (ACB47), 100 mM morpholinoethanesulfonic acid, pH 5.0 (MES50) or 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 (PB70). Water was of Milli-Q grade (<18.2 mΩ/cm). All reactions were conducted at 298 K.

Particle Synthesis: Silica particles were generated by the method of Stoeber.²³ A mixture of 13.7 ml ammonia, 20 ml H₂O and 5 g TEOS in 400 ml ethanol were stirred for 24 h. The resulting particles were cleaned by two washing cycles. They were collected by centrifugation (16000g) and resuspended in water by vortexing and sonification. Subsequently, the particles were dialyzed against water (MW cut-off 10 kDa) and the water was exchanged until the conductivity was below 2 μS/cm. Finally, the particles were filtered through a 0.45 μm filter.

Surface Modification: 100 mg silica particles were suspended in 15 ml water. Then, 1.5 ml ammonia and 20 mg APS were added and the mixture was stirred for 1 h. The resulting particles with amino-functional groups at the surface were cleaned as described above except that ACB47 was used as the washing medium. Carboxylic groups can be coupled to the particle surface according to the following method. 100 mg of the aminosilica particles were suspended in 5 ml THF and 10 mg succinic anhydride were added under sonification. The suspension was shaken for

16 h and the resulting particles with carboxyl-functional groups at their surface were cleaned as described above.

500 μg of the carboxyl-modified particles were mixed with 15 μg protein (streptavidin or streptactin) in 1 ml MES50. 20 μl of a 10 mM EDC solution in MES50 were added and the mixture was shaken for 3 h at RT. The particles were washed twice with MES50 and were resuspended in 1 ml MES50.

Particle Characterization: All dynamic light scattering and ζ-potential measurements were carried out using a Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Malvern, U.K.). All values shown in this work are the average of five measurements. The hydrodynamic diameter was determined at a fixed scattering angle of 90°. The zeta-potential was routinely checked with a latex standard of -55 mV. All measurements were performed with 500 μg particles dispersed in 5 ml buffer. For ζ-potential titration, particles were dispersed in water and a pH of 10.0 was adjusted with NaOH. The titration was carried out with a MPT-1 titrator (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) and 0.1 M HCl.

Scanning electron microscopy was done with a LEO 1500 with a Gemini column. Sample preparation was done using a particle suspension in water by adsorbing the particles to the surface of silicon wafers and letting them dry in ambient atmosphere.

The polyelectrolyte titrations were done with a particle charge detector PCD 03 from Mütek Analytic (Herrsching, Germany). Poly-diallyldimethyl-ammonium chloride (PDA-DMAC) or polyethylenesulfonic acid sodium salt (SPS) were used for titration of anionic or cationic surfaces, respectively. Solutions with a concentration of 0.001 N (referring to monomer concentration) were used (all solutions were from Mütek Analytic, Herrsching, Germany). Titrations were carried out under conditions where complete surface charging could be expected (amino groups in 1 mM ACB47, carboxyl groups in 1 mM PB70). 3–10 mg particles were suspended and titration parameters used are 10 μl steps and 10 s waiting.

Particles were analyzed by combustion analysis using a vario EL III from Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Germany). 30–70 mg dried particles were packed into tin foil and were analysed using CHNS mode.

Streptavidin and streptactin were quantified by quenching the fluorescence of biotin-4-fluorescein.²⁴ The assay described in the literature was transferred to a 96 well plate. 25 μg protein-modified particles suspended in 50 μl buffer or the corresponding volume of the supernatant were put into each well. Various volumes of a 1.34 μM biotin-4-fluorescein solution in MES50 were added and the total volume was adjusted to 200 μl with MES50. The well plate was incubated overnight in the dark and the fluorescence was measured with a TECAN Spectra Fluor Plus (Crailsheim, Germany). Excitation was done at 485 nm, emission was measured at 535 nm. The fluorescence

intensity was plotted as a function of the biotin concentration. The increasing part of this function was linearly fitted and the x-axis intercept was used to quantify the protein (see Figure 5).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Spherical silica nanoparticles with an average diameter of 100 nm were prepared via sol-gel chemistry²³ from tetraethoxysilane (Figure 1). These particles, prepared in the presence of water, dispose a surface which is densely covered by silanol groups. Using organofunctional silanes, organic functions can easily be introduced at the particle surface by a silanization reaction in organic media. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APS) was used to introduce primary amine groups to the particles (Figure 2). The silica particles were characterized by various independent analytical methods prior to and after the surface modification reactions to monitor the amount of introduced amine groups. Table I displays the obtained data.

The zeta-potential measurements at pH 4.7 indicated very clearly the change in surface properties by the reaction with APS. The initial silica particles were negatively charged due to the acidity of the silanol groups. A zeta-potential of -23 mV was observed with the initial silica particles, which was changed drastically to $+47$ mV by the reaction with APS. At a pH of 4.7, primary amines are protonated and, hence, a high positive zeta-potential is the consequence. At pH 7.0 the zeta-potential is only slightly shifted from -23 mV to -17 mV by the reaction as, at a neutral pH, the amines are only partially protonated.

The density of the surface functional groups was controlled by varying the APS concentration. The zeta-potential of silica particles shifted by reaction under variation of the concentrations of APS. When a higher concentration of APS was used, a more positive zeta-potential was observed

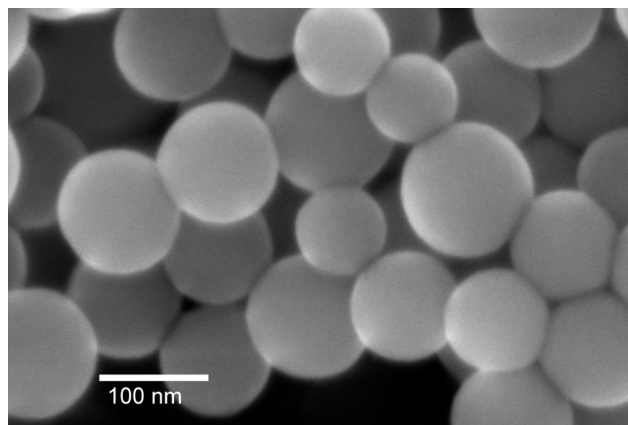


Fig. 1. Scanning electron micrograph of silica nanoparticles prepared by sol-gel synthesis using tetraethoxysilane showing particles with a diameter between 85 nm and 125 nm. The average particle size determined by dynamic light scattering was 101 nm.

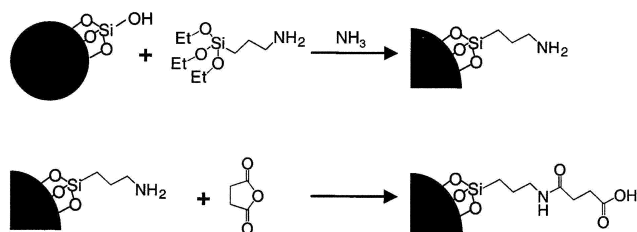


Fig. 2. Reaction scheme of the organo-chemical functionalization of the particle surface: (a) silanization of the silica surface covered by silanol groups with aminopropyltriethoxysilane (APS), (b) reaction of the amine functions with succinic anhydride by a ring opening linker elongation.

(Figure 3). A reaction time of 1 h was chosen to avoid agglomeration of the particles which was induced by the trifunctional silanes at longer reaction times. Thus, it cannot be excluded that there could be a kinetic contribution to the observed dependency. However, the zeta-potential rose to a limit value of 47 mV with the highest modifier concentration, thus indicating a saturation of the particle surface with positive charges. All further experiments were performed with the maximum amount of amine groups introduced.

The mean hydrodynamic diameter of the nanoparticles was obtained by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). The hydrodynamic diameter measured by DLS decreased by 6% with the chemical reaction. The SEM data, however, revealed no change in the diameter of the solid particles. Thus, the DLS data indicated a change in the water shell around the particles.

The efficiency of the organic surface modification was monitored and quantified by Elemental Analysis (EA). The core of the nanoparticles consisted of pure silica and was, thus, inorganic. Only the shell formed by the surface reaction was composed of organic groups and, thus, could be quantified by combustion EA. 284 $\mu\text{mol C}$ and 89 $\mu\text{mol N}$ were found per 1 g particles, with a standard deviation of $\text{SD}_N < 5\%$ and $\text{SD}_C = 10\%$ (Table I). Thus, the *C-to-N ratio* was calculated to 3.3:1 and compared well to the theoretical value of 3:1 for hydrolyzed APS. We assigned this slightly too high relative carbon content to non-hydrolyzed ethoxy-groups of the triethoxy APS headgroup. Using the nitrogen content, the amount of amino functions at the particle surface per mass corresponded to 89 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Thus, under the assumptions of $d_{\text{silica}} = 100$ nm and $D_{\text{silica}} = 2$ g cm^{-3} , a functional surface group density of 1.8 amino groups per nm^2 was introduced by the reaction of silica with APS.

An estimate of the surface charge density was also obtained by polyelectrolyte titration using a particle charge detector (PCD). When the APS-modified particles were titrated with the sodium salt of polyethylenesulfonic acid (SPS), 34 μmol anionic units per 1 g particles had to be titrated to reach the surface charge compensation indicated

Table I. Hydrodynamic diameter by dynamic light scattering, zeta-potential, relative and absolute carbon and nitrogen content by elemental analysis (EA), and particle charge detection by polyelectrolyte titration (PCD) for the initial silica nanoparticles, after reaction of the initial silica nanoparticles with aminopropyltriethoxysilane (APS), and after reaction of the amino-functionalized nanoparticles with succinic anhydride.

	$\langle d_{DLS} \rangle$ [nm]	Zeta-potential [mV]		EA				PCD	
		pH = 4.7	pH = 7.0	Amount [wt.-%]		Amount [$\mu\text{Mol/g}$]		Titrant	IEP at [$\mu\text{Mol/g}$]
				C	N	C	N		
Silica	101	-23	-24	0.010	< 0.01	—	—	DADMAC	33
Amino-silica	96	+47	-17	0.341	0.125	284	89	SPS	34
Carboxyl-silica	121	-26	-32	0.887	0.126	739	90	DADMAC	79

by the isoelectric point (Table I). This value corresponded to only 36% of the amine function density determined by EA. A charge density calculated from a PCD titration experiment depends strongly on, e.g., the molecular structure of the polyelectrolyte used and, therefore, no quantitative data can be obtained by an isolated titration experiment as performed. The remarkably lower charge density obtained by PCD, however, can be interpreted as a hint on a low accessibility of the amine groups for the polyelectrolyte ions at the particle surface. This interpretation would be in agreement with the molecular structure of the APS propyl linker, which is relatively short and, thus, should result in a relatively low flexibility of the position of the amine group at the surface. In consequence, an elongation of the linker should give rise to the accessibility of the amine groups for the polyelectrolyte ions at the particle surface during the PCD titration. When the amine groups were reacted with the cyclic succinic anhydride by a ring opening reaction, a linker elongation and the introduction of a surface carboxyl group instead of the amine should result (Figure 2). After reaction of amino-functionalized silica with succinic anhydride, a PCD titration with polydi-allyldimethyl-ammonium chloride (PDADMAC) resulted

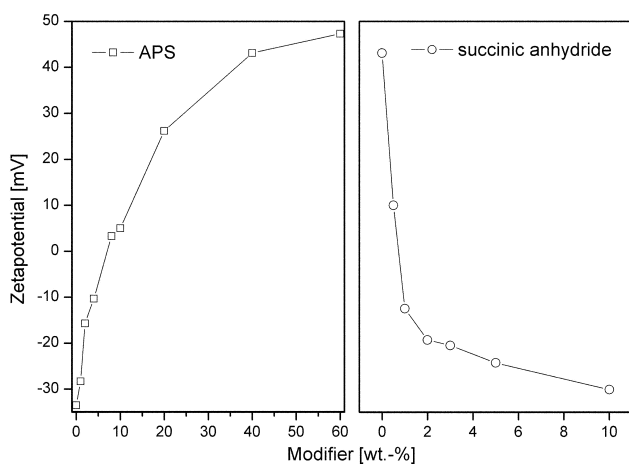
in 79 μmol carboxyl-groups per 1 g particles. Although for the same reasons as stated above, the data resulting from the PCD titration should not be discussed quantitatively, the strong increase in monitored surface density, however, is consistent with a longer and, thus, more flexible linker to the surface charge. However, it cannot be excluded that all observed changes in the PCD data originated mainly from non-stoichiometric symplex formation of the specific pairs of the particular ionic groups at the particle surface and the corresponding polyelectrolyte.

To quantify the reaction of the amino-functionalized silica with succinic anhydride again, a combination of analytical techniques was applied (Table I). Succinic anhydride does not contain nitrogen, thus the *C-to-N ratio* must be further increased by the reaction. After the reaction of amino-functionalized silica with succinic anhydride, EA resulted in 739 μMol carbon and 89 μMol nitrogen per 1 g silica, respectively. This corresponded to a *C-to-N ratio* of 8.2:1, compared to a theoretic ratio of 7:1. Thus, it can be concluded that the reaction of succinic anhydride with the amino-functionalized silica was quantitative. The high value might be explained as indicating an additional reaction of succinic anhydride with free silanol groups of the silica particles.

The degree of conversion of amine groups to carboxyl groups by reaction with succinic anhydride can be controlled by the succinic anhydride concentration in the reaction mixture, comparably to the control of the amine density by the APS concentration in the first reaction. An extremely long reaction time of 16 h was chosen to ensure a complete conversion of the reactable amine groups. Figure 3 shows the shift of the zeta-potential with varying modifier concentration until a limiting value is reached. In the following, all further experiments were done with the maximum concentration of 90 μMol carboxyl groups per 1 g silica introduced by the sequential surface reactions.

The hydrodynamic diameter increased from 96 nm for the amino-functionalized silica to 121 nm after reaction with succinic anhydride. This increase indicated a remarkably larger solvent shell around the particle after the reaction.

The change in surface properties of the particles upon the two surface reactions using APS and succinic anhydride

**Fig. 3.** Zeta-potential as a function of the reactant concentration for silica nanospheres: (-□-) after reaction of the initial silica nanoparticles with aminopropyltriethoxysilane (APS), (-○-) after reaction of the amino-functionalized nanoparticles with succinic anhydride.

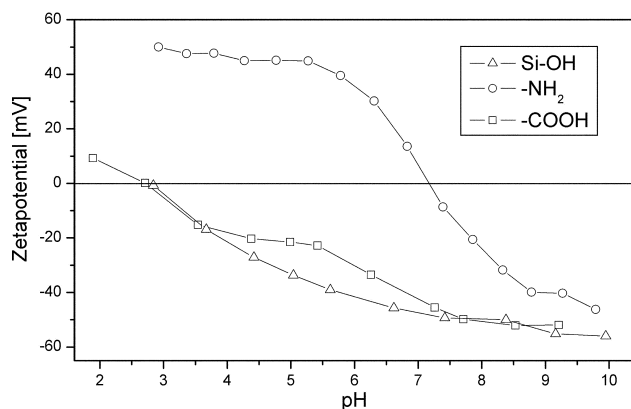


Fig. 4. Zeta-potential as a function of the pH for: (-△-) silanol-covered silica nanoparticles, (-○-) amino-functionalized silica nanoparticles, (-□-) carboxyl-functionalized silica nanoparticles. All samples were titrated from the basic into the acidic pH regime.

was also monitored by zeta-potential measurements as a function of the pH to decide on a useful pH regime for successive bioconjugation reactions. Figure 4 displays the titration curves for the initial silica particles, amino-functionalized silica particles and carboxyl-functionalized silica particles. The point of zero charge for unmodified particles as well as for the carboxyl-functionalized spheres was found for a pH = 3, in contrast to the aminommodified particles, where it was found at pH = 7.

The particles prepared by sequential reaction of APS and succinic anhydride were used to bind the proteins streptavidin or streptactin, a slightly modified derivative of streptavidin which is optimized for binding the peptide strep-Tag. To evaluate the protein binding to the nanoparticles, fluorescence titration experiments were performed using a fluorescently labeled streptavidin ligand, biotin-4-fluorescein.²⁴ Thus, not only the amount of protein reacted with the nanoparticles was quantified, but also the binding capacity of the streptavidin or streptactin covered nanoparticles. When biotin-4-fluorescein binds to streptavidin due to the affinity binding by molecular recognition of its binding site, its fluorescent activity is effectively quenched.²⁴ As the nanoparticles were perfectly suspendable, an easy and elegant quantification of the streptavidin binding properties was performed using only liquid handling and a fluorometer. Therefore, functional nanoparticles were reacted with streptavidin or streptactin under variation of the reaction conditions and then the bioconjugated was quantified as follows: a certain quantity of particles was suspended in buffer and was titrated with a buffer containing biotin-4-fluorescein. After incubating overnight in the dark, the fluorescence was measured and the fluorescence intensity was plotted as a function of the biotin concentration. Figure 5 shows a typical set of titrations. In absence of streptavidin, a linear dependence of the fluorescence intensity from the biotin concentration

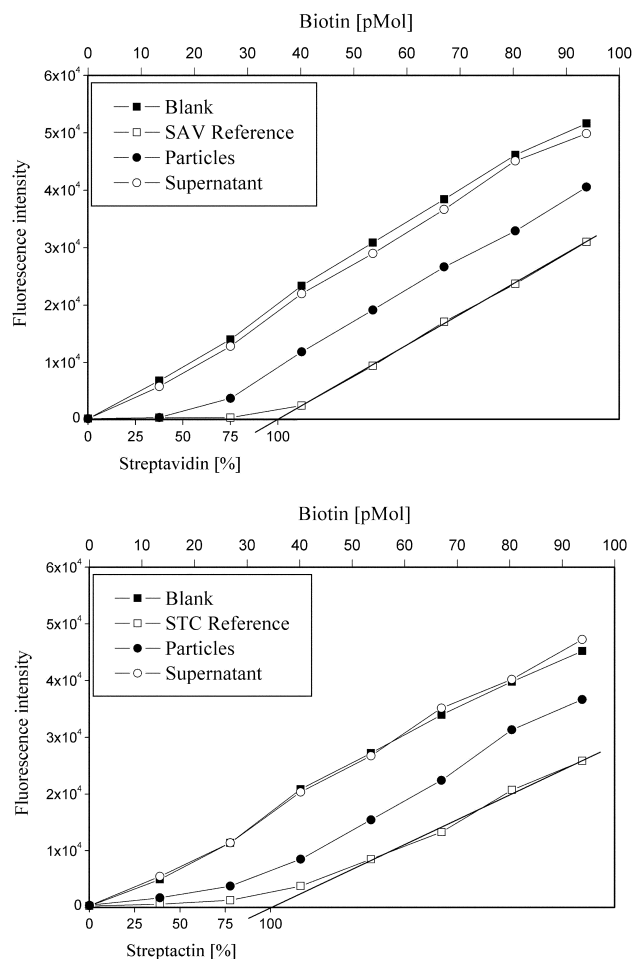


Fig. 5. Fluorescence intensity functions by titration of biotin-4-fluorescein to a set of samples used for determination of the biotin-binding capacity of nanospheres functionalized with (a) streptavidin (SAV) and (b) streptactin (STC). Each set of samples consisted of four different solutions or nanosuspensions: (-■-) a blank probe containing only buffer, (-□-) a buffer containing dissolved SAV or STC, respectively, (-●-) a buffer containing suspended nanoparticles which were functionalized with SAV or STC, respectively, (-○-) the supernatant of the nanoparticle suspension after removal of the nanoparticles. The accessibility of the binding sites of the protein-functionalized nanoparticles was determined as follows: the blank probe resulted in a straight line. The simple protein solutions also resulted in a straight line parallel to the blank probe but shifted by a certain off-set. This off-set was set to 100% of accessible SAV or STC binding sites. The suspension containing the nanoparticle-conjugated proteins and its supernatants contained, in sum, precisely the same amount of protein as in the case of the protein solutions. The function that corresponded to the supernatant was an overlay to the blank probe function both for SAV and STC. Thus, it was concluded that no protein was contained in the supernatant. Hence, all protein disposed for reaction was conjugated to the nanoparticles. Then, the accessibility of the binding sites of the particle-bound proteins was determined. Therefore, the increasing part of the function corresponding to the protein-functionalized nanoparticles was fitted by a straight line in parallel to the 0% and 100% lines, and the resulting off-set at the base line was read out. This value corresponded directly to the accessibility of the binding sites of the particle-bound proteins and resulted in values of 57% ± 5% for streptavidin and 55% ± 10% for streptactin.

was observed up to high concentrations. This line was used as reference line for all further experiments. When, in contrast, a titration was carried out in the presence of dissolved or particle-conjugated streptavidin, zero fluorescence was observed until all biotin binding sites were occupied. From this concentration on, a parallel line to the reference line was observed. From the off-set of the line, the number of biotin binding sites in the streptavidin solution or suspension was calculated.

Streptavidin was conjugated to the nanoparticles by carbodiimide chemistry. A possible bioconjugation route using EDC activation of the acidic amino acids aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu) of the protein and reaction with the amino-functionalized particle surface proved to be highly ineffective. This behavior was observed for all pH regimes, including $6 \leq \text{pH} \leq 7$, when the amino-nanoparticles and streptavidin were contrarily charged, as their isoelectric points exist at 7 (Figure 4) and 5.5,¹⁴ respectively. Possibly, intermolecular streptavidin conjugation occurs due to a higher reactivity of the lysine amino groups of streptavidin as the amine groups of the nanoparticles. Also, the short-chain APS linker might hinder sterically a coupling reaction between the proteins and the particles.

In contrast, binding of streptavidin or streptactin to the long-chain carboxylfunctionalized nanoparticles proved to be highly effective and resulted in nanoparticle-protein conjugates with a high degree of bioactivity of the immobilized proteins. The accessibility of the binding sites of the immobilized streptavidin or streptactin was quantified from the data displayed in Figure 5. Slightly more than half of the binding sites of the immobilized proteins were accessible with $57\% \pm 5\%$ for streptavidin and $55\% \pm 10\%$ for streptactin. Here, the larger error in the values for streptactin is due to the lower affinity between biotin and streptactin, if compared to the affinity system biotin and streptavidin. As the binding sites of both proteins are each situated on the two opposite sites of the molecules, it is already given by simple steric hindrance that about half of the binding sites should be less accessible. Thus, a binding capacity for the nanoparticle-conjugated proteins was found, which corresponds to an optimum value both in case of streptavidin as well as streptactin.

A streptavidin monomer disposes different amine groups at its surface. Most important for bioconjugation reactions are three lysines and the N-terminus. Most effective binding was observed in the pH regime $3.5 \leq \text{pH} \leq 5$ with a high yield and a low particle agglomeration. In this pH regime, the amine groups of streptavidin and the carboxyl-groups at the nanoparticle surface were contrarily charged due to their corresponding isoelectric points. Control experiments carried out without EDC showed a completely different behavior. Streptavidin was initially partially adsorbed at the particle surface, but was easily removed by simple washing with phosphate buffer at pH

= 7.0. Also, in other control experiments, in the absence of particles but while providing EDC, no centrifugeable streptavidin agglomerates were detected. Thus, it was concluded that only the observed binding of streptavidin to the carboxyl-functionalized nanoparticles using EDC carbodiimide chemistry led to a covalent attachment of the proteins to the particles.

When an increasing amount of streptavidin was presented for binding to the nanoparticles, a limit value was observed which indicated saturation of protein binding to the nanoparticle surface. Therefore, experiments under variation of the streptavidin concentration were performed while keeping the EDC-to-protein ratio constant. Streptavidin reacted quantitatively with the nanoparticles and all streptavidin was bound to the particles until a limit value was reached. At about $60 \mu\text{g}$ protein per 1 mg particles, a part of the protein was not immobilized to the particles and was found in the supernatant (Figure 6). In contrast, when $30 \mu\text{g}$ streptavidin per 1 mg nanoparticles were supplied, only traces of the protein were detected in the supernatant. About 57% of the binding sites of streptavidin immobilized under these conditions were accessible at the particle surface for a fluorescently labeled biotin ligand (Figure 5). As the binding sites of streptavidin are arranged as pairs on two opposite sites of the protein, it seems fully understandable that, for steric hindrance, no higher binding capacity could be expected. Thus, under the assumptions of $d_{\text{silica}} = 100 \text{ nm}$ and $D_{\text{silica}} = 2 \text{ g cm}^{-3}$, a functional surface group density of 1.1 streptavidin molecules per 100 nm^2 were introduced by the reaction of the carboxyl-functionalized silica with streptavidin. Or, in other terms, about 365 streptavidin tetramer molecules were bound to one particle and about 800 biotin binding sites were accessible at the surface of a single particle. This corresponds to 2.5 biotin

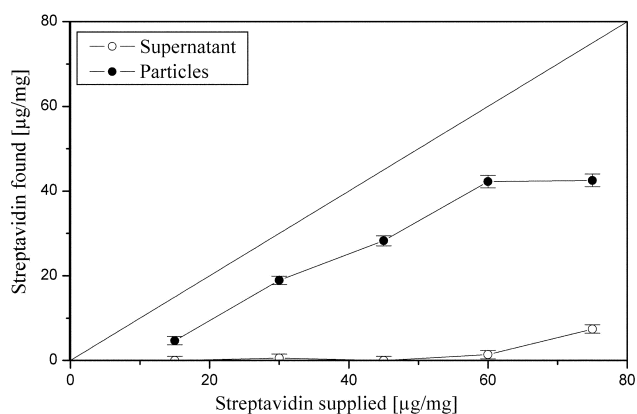


Fig. 6. Amount of streptavidin (●) immobilized to the nanoparticles and (○) in the supernatant (indicating non-reacted and, thus, non-immobilized proteins) in dependence of the overall amount of supplied streptavidin.

binding sites per 100 nm² nanoparticle surface. Thus, the density of immobilized streptavidin was increased by a factor of three if compared to published data.²⁵

4. CONCLUSIONS

Adjustable amounts of amino- and carboxyl-functional groups were covalently coupled to the surface of silica nanoparticles. Two biotin-binding proteins, streptavidin and streptactin, were covalently immobilized at the surface of nanoparticles functionalized by a long-chain carboxyl-terminated linker. The binding capacity of the streptavidin-covered nanoparticles for ligand biotin has been determined by titration experiments using the quenching of the fluorescence upon binding due to molecular recognition. By this covalent conjugation strategy, the density of immobilized streptavidin was tripled in comparison to known preparation routes.²⁵

These new types of streptavidin or streptactin modified silica nanoparticles provide a high density binding matrix for biotinylated or strep-tagged proteins. Biotinylation chemistry is widely applied in protein biochemistry and can be carried out randomly or site-specific.²⁶ A strep-tag is introduced by recombinant methods at a specific site of a protein. Thus, the nanoparticles open an easy route to immobilize proteins in a preferred orientation. This becomes increasingly important when the receptor properties of the protein to be immobilized are evaluated in proteome research (proteomics).

The streptavidin or streptactin modified silica nanoparticles can be directly used in a vast variety of already existing applications in biotechnology and protein analytics. By their small size, the nanoparticles provide an extremely high surface per mass and, thus, a high specific binding capacity. They form stable suspensions and are, therefore, compatible with liquid handling systems, e.g., in (ultra) high-throughput screening techniques. They can be used as suspendable solid carrier systems of protein receptors to capture analytes from biological samples and present them for further analysis, e.g., by MALDI mass spectrometry.²⁷ Thus, biotinylated major histocompatibility complex (MHC) proteins were immobilized at such streptavidin modified silica nanoparticles and used for the binding of their corresponding ligands. The ligands were analyzed by MALDI time-of-flight mass spectrometry by incorporating the nanoparticles in the matrix needed for the MALDI measurement. Here, the small size of the nanoparticles allowed for excellent sensitivity in the ligand analysis.²⁸

Also, the protein-binding nanoparticles can be deposited using a variety of micro-spotting or lithographic processes in micro-structures at solid surfaces while preserving their molecularly defined surface.²⁹ Thus, protein-binding microchips can be prepared in a technologically easy and very flexible way.³⁰

Acknowledgments: The authors thank Nadja Reinhardt for experimental help with the combustion analysis, zeta-potential measurements and dynamic light scattering, and Melanie Dettling for PCD measurements, as well as the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF) and the Land Baden-Württemberg for financial support. G.E.M.T. thanks the BMBF, the Fraunhofer Society and the Land Baden-Württemberg for financial support of a junior research group (“Nachwuchsforschergruppe”) on “Biomimetic Surfaces.”

References and Notes

1. W. Krüger, C. Datta, A. Badbaran, F. Tögel, K. Gutensohn, I. Carrero, N. Kröger, F. Jänicke, and A. Zander, *Transfusion* 40, 1489 (2000).
2. L. Bildirici and D. Rickwood, *J. Immunol. Methods* 252, 57 (2001).
3. G. B. Hurst, M. V. Buchanan, L. J. Foote, and S. Kennel, *Anal. Chem.* 71, 4727 (1999).
4. B. Ertl, F. Heigl, M. Wirth, and F. Gabor, *J. Drug Targeting* 8, 173 (2000).
5. H. S. Yoo, K. H. Lee, J. E. Oh, and T. G. Park, *J. Controlled Release* 68, 419 (2000).
6. A. Lamprecht, N. Ubrich, M. H. Perez, C.-M. Lehr, M. Hoffmann, and P. Maincent, *Int. J. Pharm.* 196, 177 (2000).
7. C. Kneuer, M. Sameti, U. Bakowsky, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, and C.-M. Lehr, *Bioconjugate Chem.* 11, 926 (2000).
8. B. J. Battersby, D. Bryant, W. Meutermans, D. Matthews, M. L. Smythe, and M. Trau, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2137 (2000).
9. J. C. Reece, N. J. Vardaxis, J. A. Marshall, S. M. Crowe, and P. U. Cameron, *Immunol. Cell Biol.* 79, 255 (2001).
10. M. Lewin, N. Carlesso, C.-H. Tung, X.-W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, and R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* 18, 410 (2000).
11. C. Kneuer, M. Sameti, E. G. Haltner, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, and C.-M. Lehr, *Int. J. Pharm.* 196, 257 (2000).
12. S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, and W. Tan, *Anal. Chem.* 73, 4988 (2001).
13. M. Qhobosheane, S. Santra, P. Zhang, and W. Tan, *Analyst* 126, 1274 (2001).
14. D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen, and E. Conklin, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company.
15. J. Manning, M. Pellegini, and N. Davidson, *Biochemistry* 16, 1364 (1977).
16. W. Lukosz, *Sensors Actuators, B* 29, 37 (1995).
17. M. S. Fleming, T. K. Mandal, and D. R. Walt, *Chem. Mater.* 13, 2210 (2001).
18. K. Langer, C. Coester, C. Weber, H. von Briesen, and J. Kreuter, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49, 303 (2000).
19. H. Harma, T. Soukka, and T. Lovgren, *Clin. Chem.* 47, 561 (2001).
20. R. Kotitz, W. Weitschies, L. Trahms, W. Brewer, and W. Semmler, *J. Mag. Mat.* 194, 62 (1999).
21. T. Schiestel, H. Schirra, J. Gerwanner, C. Lesniak, A. Kalaghi-Nafchi, M. Sameti, G. Borchard, E. Haltner, C.-M. Lehr, and H. Schmidt, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 530, 65 (1998).
22. S. Voss and A. Skerra, *Protein Eng.* 10, 975 (1997).
23. W. Stöber and A. Fink, *J. Coll. Interface Sci.* 8, 62 (1968).
24. G. Kada, K. Kaiser, H. Falk, and H. J. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 44 (1999).
25. T. Buranda, G. M. Jones, J. P. Nolan, J. Keij, G. P. Lopez, and L. A. Sklar, *J. Phys. Chem. B* 103, 3399 (1999).
26. C. A. O’Callaghan, M. F. Byford, J. R. Wyer, B. E. Willcox, B. K. Jakobsen, A. J. McMichael, and J. I. Bell, *Anal. Biochem.* 266, 9 (1999).

27. G. E. M. Tovar, T. Schiestel, C. Hoffmann, and J. Schmucker, *Bio-Forum Int.* 5, 235 (2001).
28. T. Flad, T. Schiestel, H. Brunner, J. Tolson, Q. Ouyang, G. Pawelec, G. Tovar, G. A. Müller, C. A. Müller, and H. Beck, submitted for publication.
29. A. Weber, S. Knecht, H. Brunner, and G. E. M. Tovar, *Chem. Ing. Tech.* 75, 437 (2003).
30. G. E. M. Tovar and A. Weber, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, in press.

Received: 1 July 2003. Revised/Accepted: 19 September 2003.

Bio-Microarrays Based on Functional Nanoparticles

Günter E. M. Tovar

Achim Weber

University of Stuttgart, Stuttgart, Germany

INTRODUCTION

Microarray technology is a key factor in today's biotechnology research. There already exists a variety of chip-based polynucleic acids analysis systems. DNA microchips are already commercially available and are widely used in laboratories worldwide. In contrast, new methods are needed for the starting era of proteomics—the investigation of function, structure, and molecular interaction among proteins. Protein microarrays are widely expected to play an outstanding role in this new field of research.

The change of scope from nucleic acids to proteins needs, by far, more than a little change in the technology to be applied. Especially, there is a tremendous need to develop new microarrays with a flexible surface chemistry. Proteins are, by far, more complex in their material properties than polynucleic acids. Whereas DNA is composed of only four different nucleotides, which are chemically quite closely related to one another, proteins consist of 21 different amino acids that can differ drastically in their chemical functionality. Additionally, posttranslational modifications on proteins within organisms create an even larger variety in the chemical properties of naturally occurring proteins and polypeptides. Therefore, intending to establish a protein-oriented microarray technology, there is an immense need for a large variety of different tailor-made surface chemistries.

In our approach described here, we provide a pre-structured microarray for the immobilization of proteins. By adsorbing a patterned layer of nanoparticles with various surface modifications to a substrate, we separate the two steps of chemical tailoring of the surface on a molecular level and the subsequent microstructuring of the chip in two fundamentally independent processes. Thereby, an extremely efficient microarray preparation is realized while providing notably high flexibility in chemical surface structures. In the first step, by means of chemical nanotechnology, tailor-made nanoparticles are prepared. The particle's surface is customized to match the specific demands for the immobilization of a certain kind or class of proteins. In a second step, the nanoparticles are deposited on a chip to render a microstructured monolayer

array of nanoparticles. This microstructure can be achieved by a choice of different lithographic processes. Either photolithography,^[1] microcontact printing,^[2–4] or microspotting^[5] is applied for nanoparticle deposition only at well-defined areas of the substrate. The resulting system is a nanoparticle-based microarray ready for the selective binding of protein ligands.

GENERAL SCHEME OF THE MICROSTRUCTURED SURFACE PREPARATION

To understand the flexibility of the practical approach of preparing nanoparticle-based microarrays, the overall process can be regarded as being composed of four different processes: 1) synthesis of functional nanoparticles; 2) substrate surface activation step; 3) nanoparticle deposition; and 4) lithographic process. Combining these processes in different ways provides the possibility to achieve the patterned deposition of nanoparticles in a direct or an indirect way. The performance of steps (2)–(4) will be described in "Surface Activation." Subsequently, we will introduce a selection of functional nanoparticles (step 1), which are designed to determine the surface chemistry of the resulting microarray. Finally, we will give an example of a microarray based on functional nanoparticles.

Surface Activation

The surface of the solid substrate has to be prepared to bind particles strong enough to withstand common washing procedures. In this approach, charged particles were fixed to an oppositely charged surface. Surface activation was achieved by self-assembly of ultrathin polyelectrolyte monolayers or multilayers on the substrate by applying a simple dipping process. The method used is referred to as layer-by-layer (LbL) technique^[6,7] and was also used to deposit nanoparticles.^[8–11]

According to the LbL technique, solid substrates were coated with ultrathin layers of positively and negatively charged polyions by an alternating adsorption process.

This process, in principle, can be repeated indefinitely; the only condition is a proper alternation of positively and negatively charged components [e.g., here, poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PDADMAC) was used as a polycation and the sodium salt of poly(styrene sulfonate) (SPS) was used as a polyanion]. The resulting polyelectrolyte layers then give rise to adhesive binding of charged nanoparticles by electrostatic forces. Most importantly, surface charge density is increased and homogenized by the LbL procedure (for experimental details, see ‘‘Materials and Methods’’).

Lithographic Microstructuring and Particle Deposition

Patterned nanoparticle deposition on the activated surface can be achieved either in a direct or an indirect way: Spotting or stamping the particles onto an activated surface directly generates a nanoparticle pattern on a homogeneous polyelectrolyte layer.

The photoablation of certain regions of polyelectrolyte layers by deep ultraviolet (DUV) irradiation through a mask leads to well-defined particle deposition only onto undamaged parts of the polyelectrolyte coating. Both methods to prepare a microstructured chip surface will be described in the following.

Microstructuring of the Activated Surface by Photoablation

In structuring the activated surface, a photolithographic technique is employed (e.g., a homogeneously activated

surface is covered with a microstructured mask and is then irradiated with DUV light).^[12] Thereby, the irradiated areas of the LbL film are transformed to become non-adhesive to the nanoparticles during the later nanoparticle adsorption step.

To characterize this photoablation process, first, irradiation of differently activated surfaces was performed without using a mask. The ablation kinetics and the change of the chemical composition of the polyelectrolyte layers during the photoablation process were monitored by ellipsometry and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), respectively.

Ellipsometric measurements showed that material degradation during DUV treatment depends on the duration of radiation. The layer thickness of the LbL polyelectrolyte film d_{LbL} decreased exponentially with the time of DUV irradiation t_{DUV} .

Here, three different samples were prepared: silica substrates coated with one layer of PDADMAC, with a double layer of PDADMAC/SPS, or with a triple layer of PDADMAC/SPS/PDADMAC, and then were exposed to DUV irradiation. Fig. 1 shows the decrease of the thickness of these polyelectrolyte layers plotted against the duration of radiation. In all cases, a simple exponential decrease of layer thickness with the duration of radiation was observed. After 45 min, the depth of the layers depreciated to about 20% of the starting value in each layer system.^[13]

The chemical layer composition before and after exposure to DUV light was determined by XPS measurements (Fig. 2 and Table 1). After DUV irradiation for 45 min, the carbon measurement signal broadened significantly and shifted to a higher bonding energy (286.4–

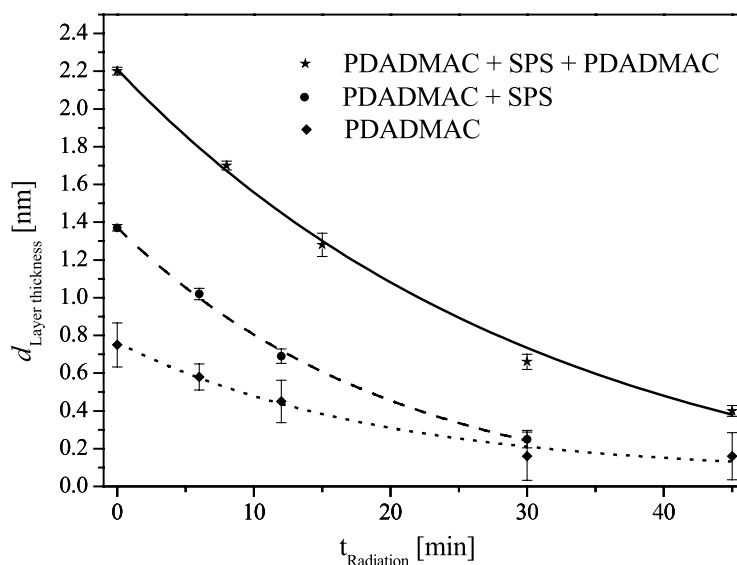


Fig. 1 Decrease of the layer thickness of polyelectrolyte layers on silicon wafer with DUV irradiation time. (From Ref. [13]). (★) Triple layer (PDADMAC/SPS/PDADMAC). (●) Double layer (PDADMAC/SPS). (◆) Monolayer (PDADMAC).



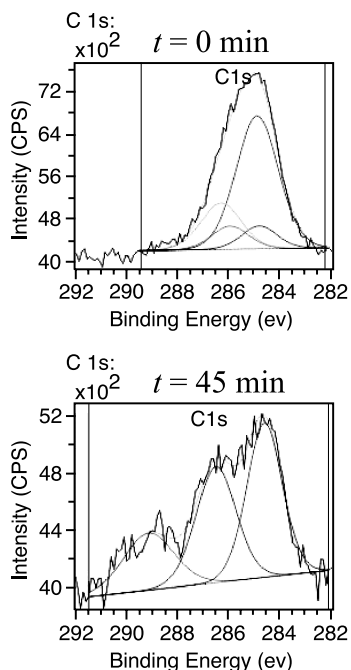


Fig. 2 High-resolution carbon spectra of the XPS of a PDADMAC-coated silicon wafer before (above) and after (below) irradiation with DUV. (View this art in color at www.dekker.com.)

289.2 eV; Fig. 2). This higher bonding energy is the result of the chemical modification of carbon atoms via oxygen atoms. The broadening and displacement of the nitrogen signal (402.0–400.8 eV) originated both from the partial loss of quarternary nitrogen compounds and the loss of positive charges from polyelectrolytes (Table 1).^[13]

Irradiation with DUV in our simple experimental setup does not result in a complete ablation of the polyelectrolyte film. However, the structuring of polyelectrolyte layers on silica functions excellently: Because of the combination of material ablation and chemical modification, the overall charge density in the irradiated sectors of polyelectrolyte layers decreased substantially and thus

electrostatic interactions (essential for the immobilization of particles) diminished decisively.

Nanoparticle Monolayer Array by Dip Coating of Nanoparticles on a Microstructured Activated Substrate

A microstructured activated surface can be used as a substrate for the microstructured deposition of particles by a simple dipping process. Therefore, subsequent to the photolithographic treatment, the chip is dipped in a nanoparticle suspension, taken out, and simply rinsed with water. A microstructured nanoparticle array is thereby formed effectively. Fig. 3 shows a PDADMAC-pretreated and photolithographically patterned silica wafer after coating with silica nanoparticles. After the attachment of particles, a precise cutoff between the irradiated and non-irradiated sectors of the PDADMAC-coated silica surface was observed.

Nanoparticle Monolayer Array by Microspotting or Microcontact Printing on a Nonstructured Activated Substrate

For direct or mask-free structuring of nanoparticle layers, a drop of particle suspension is deposited by a microarray at a defined position of the surface (microspotting), or a patterned particle layer is transferred by means of an elastomeric stamp (microcontact printing).

After vaporescence of the liquid phase, the particles stay as a microstructured film at the initially homogeneously coated substrate. Examples for both routes are described in the following sections.

Microcontact Printing of the Nanoparticle Layer

Microcontact printing is a soft lithographic structuring method. In this technique, a microstructured elastomeric stamp is used to transfer a chemical “ink” to some parts

Table 1 Quantitative analysis of the XPS of a PDADMAC-coated silicon wafer for elements in question before and after DUV irradiation.

Element	Composition [at.%]							
	C	C	C	C	O	N	N	N
Silicon wafer	289.2	286.4	286.2	284.6	531.8	402.1	400.8	397.4
Hydroxylated and coated with PDADMAC	Tr	3.1	1.4	10.7	29.9	1.4	—	1.0
Hydroxylated with PDADMAC and UV-radiated (45 min)	1.8	2.9	—	3.6	35.8	0.7	05.	1.1

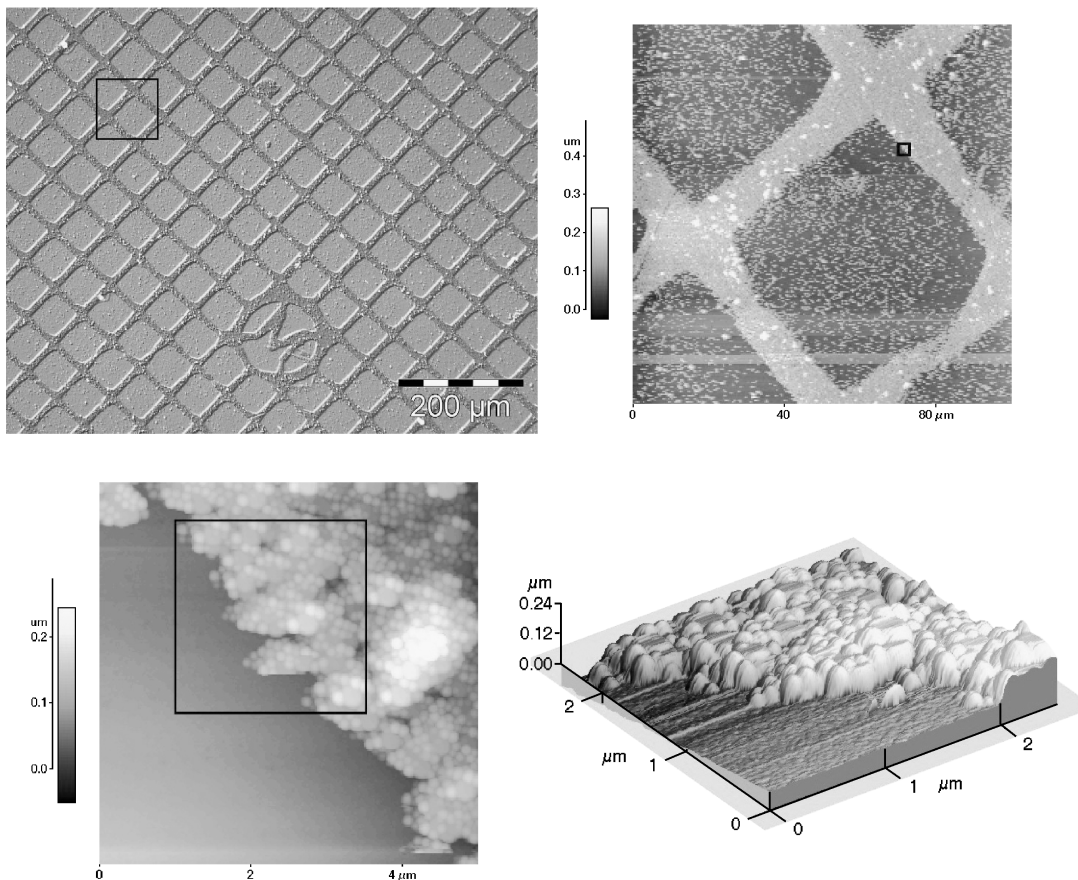


Fig. 3 Light micrograph (upper left) and atomic force microscopy (AFM) images (upper right, lower left and right) of a photolithographically structured PDADMAC layer on a silicon wafer with deposited silica nanoparticles. (View this art in color at www.dekker.com.)

of a surface, which is so subdivided into areas of different chemical properties.

The stamps used here are made from polydimethylsiloxane (PDMS) (Fig. 4). According to the hydrophobic properties of the stamp material, the aqueous particle

suspension does not spread uniformly over the surface of a freshly prepared stamp. Therefore the surface of the stamp was hydrophilized by an oxygen low-pressure plasma.^[14] By this treatment, hydroxyl groups were generated at the PDMS surface, and the interaction of the stamp with water

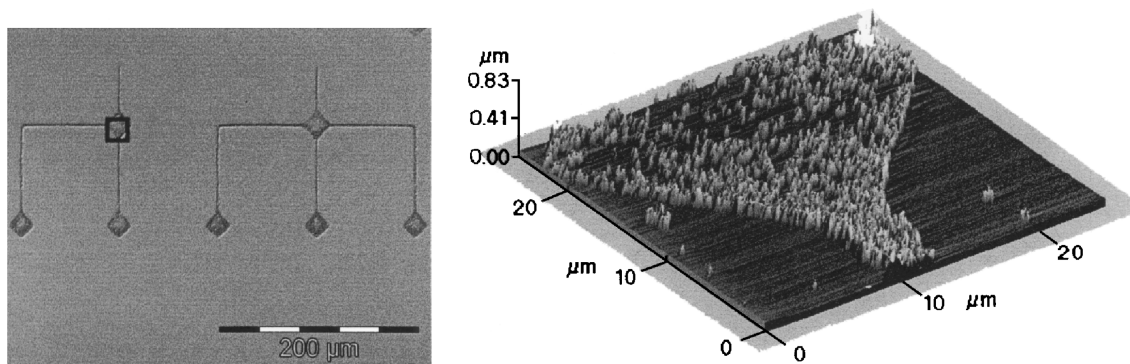


Fig. 4 Light micrograph (left) and AFM image (right) of microcontact-printed silica nanoparticles on a PDADMAC-coated glass slide.

dipoles was substantially increased. The stamp was then coated with one layer of polyelectrolytes by a simple dipping process in a polyelectrolyte solution, rinsed with water, and subsequently dipped into the particle suspension. When the stamp was brought into contact with the activated substrate surface, the particles were effectively transferred to the chip because of the stronger interaction of the charged particles with the activated surface of the substrate.^[15]

Microspotting of the Nanoparticle Layer

Microarrays are computer-driven robots that transfer dropwise a solution or a nanoparticle suspension to precisely defined positions on a substrate. Herewith, any pattern composed of circular spots can be appointed on a planar surface.

The presented structures were printed with a pin-ring spotter. Here, a probe of a nanoparticle suspension was collected from a microtiter plate by dipping a steel ring in the suspension. Thus a thin film of the nanoparticle suspension was spread inside the ring, forming a reservoir for the subsequent spotting process. A steel needle (pin) passed through the liquid film is wetted by the nanoparticle suspension. At a defined position according to the coordinates chosen by the operator, the pin came in contact with the surface of the substrate, and thus a drop of the nanoparticle suspension was deposited. The evaporated liquid and a defined amount of nanoparticles were transferred to the activated substrate (Fig. 5).

Nanoparticles Applied in the Microarray Preparation

A large variety of spherical nanoparticles, with a diameter from 50 to 300 nm and a molecularly defined surface,

were generated and employed in microarray preparation e.g., surface-modified silica nanoparticles,^[16,17] molecularly imprinted nanoparticles based on the monomer methacrylic acid (MAA) and the crosslinker ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA),^[18–20] or polymer nanoparticles providing an active ester surfmer for easy bioconjugation reactions.^[21,22]

Surface-modified silica nanoparticles are receiving increasing attention in modern biotechnical and biomedical applications.^[23–25] They provide an excellent model system for the development of nanoparticulate carrier systems as they are relatively simple tunable in particle size^[17,23,26] and provide high flexibility in surface modification reactions by silanization (Fig. 6) (e.g., silica nanoparticles with a diameter of 100 nm were covalently modified at their surfaces by adjustable amounts of amine and carboxyl functional groups) (Fig. 7). The protein streptavidin was then conjugated with nanoparticles, thus resulting in biofunctional hybrid particles with optimized protein density at the surface of nanoparticles.^[27] Now the simple biotinylation of a protein prepares it for immobilization at the surface of silica particles, often conserving their full bioactivity.^[28] In contrast, molecularly imprinted polymer nanospheres are examples of fully synthetic receptor nanoparticles. Here, highly crosslinked polymer nanospheres composed of poly(methacrylic acid)-co-(ethylene glycol dimethacrylate) were synthesized by miniemulsion polymerization in the presence of a chiral molecular template, L-Boc-phenylalanine anilid or D-Boc-phenylalanine anilid. By simple extraction of the template, polymer nanoparticles were obtained, which provided binding sites for the recognition of template molecules because of an imprinting process during polymerization. Because of the MAA content in copolymer particles, negative charges are disposed for attachment to polyelectrolyte layer systems. The present paper focuses on polymer nanoparticles composed of a copolymer formed by methylmethacrylate

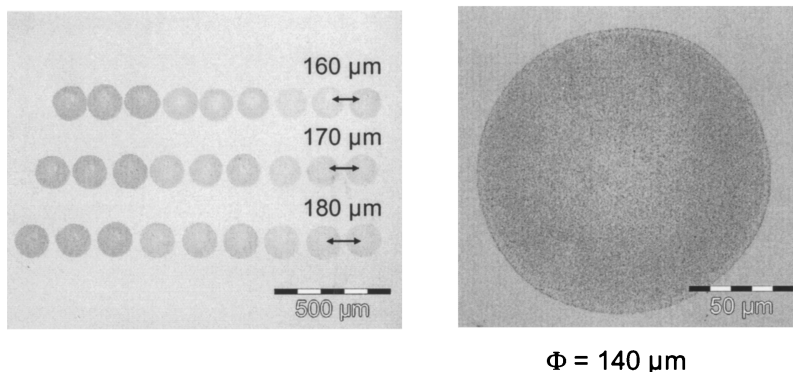
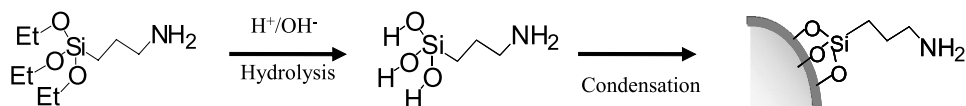


Fig. 5 Left: Light micrograph of silica nanoparticle spots, deposited by a microarrayer on a glass slide. Lines: Different gap widths. Columns: 5, 2, and 1 droplet per spot. Right: Magnified image of a single spot with a diameter of 140 μm .



A) Silanization



B) Derivatization

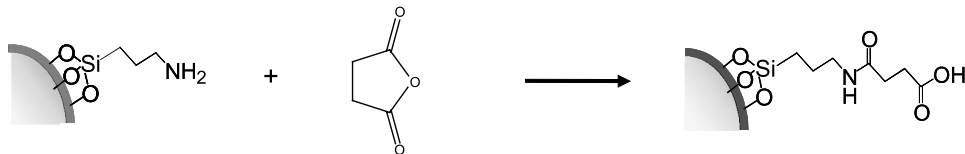


Fig. 6 Schematic of exemplary silanization (A) and derivatization (B) of silica nanoparticles. (View this art in color at www.dekker.com.)

(MMA) with a special polymerizable surfactant bearing an active ester group.

Protein Binding Polymer Nanoparticles Using Activated Ester Surfmer

Polymer nanoparticles with bioconjugation capabilities are an attractive solid-phase carrier system. For bioconjugation with a protein, the particles must provide a specific reactive function on their surface. These functions are traditionally introduced by surface modification of a preformed latex, often by formation of an activated ester.^[21] Activated esters are valuable in bioconjugate chemistry as they react with nucleophilic groups of biomolecules (in proteins, peptides, or dyes) under mild conditions, hence usually preserving biomolecule activity. Here, we used a specific trifunctional active ester surfmer molecule to introduce the active ester function already during the formation of the polymer particle. A surfmer molecule is a polymerizable surfactant. In addition to the copolymerization of the molecule and its

surface activity, here, active ester function is also disposed with the molecule *p*-(11(acrylamido)undecanoyloxy)phenyl dimethylsulfonium methylsulfate (AUPDS, **1**; Fig. 8). Thus nanoscopic polymer particles with a tunable diameter in the range from 120 to 160 nm with an activated ester surface were prepared by copolymerization with MMA (**2**; Fig. 8) in a one-stage reaction using emulsion polymerization.^[22,29]

Microarray Based on Patterned Monolayers of Functional Nanoparticles

The functionality of nanoparticles after deposition determines also the overall performance of the microarray. Qualitative assays of the functional properties of nanoparticles after microarraying were exemplarily performed with active ester surfmer nanoparticles deposited on glass substrates. In biochip technology, fluorescent labels are often used as markers and are detected with a fluorescence scanner. Thus for the demonstration of the reactivity of the active ester function of nanoparticles, a fluorescent dye (5,6-amino-fluorescein) was reacted with nanoparticles before or after deposition in a microarray.^[13]

Glass slides were homogeneously activated by a double layer of polyanion and polycation, and the positively charged surfmer nanoparticles were deposited by a microspotter. The microarray was then incubated with a solution containing the fluorescent dye. Thereby, the amine group of the dye reacted covalently with the active ester group of the assembled surfmer nanoparticles. By scanning the microarray with a fluorescence scanner, the microstructure appeared very clearly, thus indicating effective binding of the marker (Fig. 9). The binding of the dye originated exclusively from the covalent binding

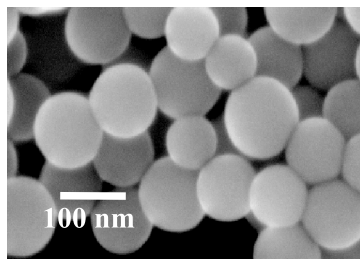


Fig. 7 Scanning electron micrograph of silica nanoparticles. Bar, 100 nm. (View this art in color at www.dekker.com.)



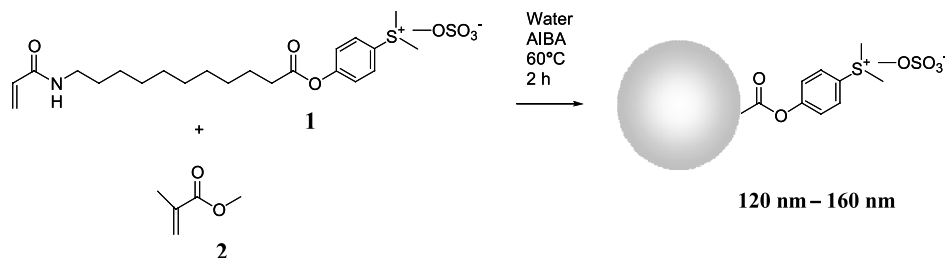


Fig. 8 Reaction scheme of nanoscopic polymer particles (diameter: 120–160 nm) with an optimized ester surface. AUPDS (**1**) is converted with MMA (**2**) as copolymer in a one-stage reaction using emulsion polymerization.

of the dye, and the nonspecific binding of the dye was negligible as was shown by a simple control experiment: When the active ester function was hydrolyzed and the microarray was incubated with the fluorescent dye solution in the same way, no fluorescence was observed.

In contrast, when surfmer ester nanoparticles were reacted with the fluorescent dye prior to deposition in a microarray, fluorescence activity was found again. The fluorescence scanner micrograph of the microarray formed with the fluorescently labeled nanoparticles appears the same as those reacted at the microarray surface (Fig. 9). Thus it was demonstrated that the (bio)conjugation reactivity of active ester surfmer nanoparticles was effectively conserved during the deposition in microarray.

When, instead of the fluorescence dye, for example, a protein receptor is immobilized by reaction with the active ester, or a protein biochip is realized by this simple bioconjugation reaction, all the surface chemistry for conserving the bioactivity of any protein receptor can be developed with the nanoparticles in solution and then a protein biochip can easily be prepared by the new route shown here.

MATERIALS AND METHODS

Layer-by-Layer Technique

The substrates used for the immobilization of nanoparticles are glass slides (76 × 26 × 1 mm in size; Carl Roth, Germany), silica wafers, and gold-coated silica wafers. The polyions used are PDADMAC (low molecular weight) as polycation (Aldrich) and the sodium salt of SPS as polyanion (Sigma).

The slides were cleaned in 2 vol.% glass cleaner (Hellmanex, Germany) at 40°C for 90 min and placed in MilliQ water for ultrasonication for 5 min. Afterward, hydrolyzation took place in a 3:1 (vol/vol) mixture of ammonia (NH₃, 25%; Fluka) and hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%; Merck) for 20 min at 70°C. The hydrophilic surface of slides was rinsed with MilliQ water and cleaned in MilliQ water in an ultrasonic bath for 5 min. The slides were now dipped into a solution of 0.02 M poly(diallyldimethyl ammonium chloride) and 0.1 M NaCl in MilliQ water for 20 min and rinsed with MilliQ water. To obtain a negatively charged surface, the glass slides were

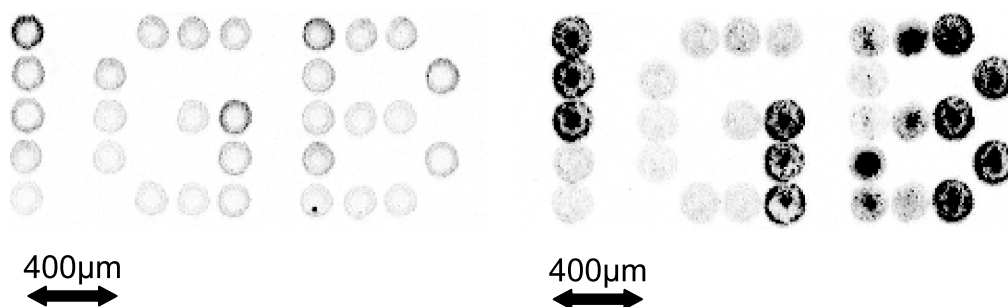


Fig. 9 Illustration of structured and fluorescein–amine conjugated active ester surfmer nanoparticles on a PDADMAC/SPS-coated glass slide; here, cutouts from the 16-bit grayscale picture of the microarray laser scanner (GMS 417 Array Scanner) are shown as 256-color bitmap after color reverse. Left: Dye labeling of beads after spotted deposition. Right: Dye labeling of particles before spotted deposition. Bar, 400 μm.



immersed into a solution of 0.02 M SPS and 0.1 M NaCl in MilliQ water for 20 min after the adsorption of the positively charged polycation. Finally, the slides were placed in MilliQ water in an ultrasonic bath for 5 min to homogenize the polyelectrolyte surface and again rinsed with MilliQ water.

Photolithography

Photoablation of polyelectrolyte layers was performed using a mercury vapor UV lamp (UVP Ultra-Violet Products Limited, Cambridge, UK). The mask used was a copper transmission electron microscopy (TEM) grid "Identigrid M": 400 mesh (400 bars per 25.4 mm; PLANO, Wetzlar, Germany).

After irradiation, the wafers were rinsed with MilliQ water and then incubated with a 0.5% particle suspension.

Microcontact Printing

The elastomeric stamps were made from Sylgard 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Germany). The stamps (line width: 2 μm ; squares: 20 μm ; gaps: 100 μm) used were from A. Offenhusser of the Max-Planck Institute for Polymer-Research (Mainz, Germany; now Research Center Jülich, Germany).

Microarrayer

The microarrayer used is the GMS 417 (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany). It has a fourfold pin-ring unit. The distance between pins is 9 mm. The diameter of the pintip is 125 μm . The spotter has a lateral error of 10 μm .

Analytical Methods

Optical and atomic force microscopy

Optical micrographs are taken using a digital camera mounted on an optical microscope (Olympus BX 60). Scanning force microscopy is performed in noncontact mode with an Autoprobe cp (Park Scientific Instruments, USA).

Photon correlation spectroscopy

Particle size is determined by dynamic light scattering using a Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany).

Ellipsometer

The thickness of polyelectrolyte layers is detected with a computer-supported Multiscope equipped with a HeNe laser (632.8 nm; Optrel GbR, Berlin, Germany).^[31]

X-ray photoelectron spectroscopy measurements

The atomic composition of layers is measured with the Axis Ultra system (Kratos Analytical Ltd., Manchester, UK; monochromatic Al K α pass energy: 160 eV for survey spectra, 40 eV for detail spectra). For peak integration and fitting, the shipped software is used.^[32,33]

CONCLUSION

A large variety of possible options and best fitting procedures were introduced to match the demands of an envisaged protein microarray structure in a most flexible way by employing functional nanoparticles. For a stable linkage of charged particles, the substrates were coated with polyelectrolytes by the LbL technique. For this purpose, hydrophilic or charged surfaces proved to be suitable.

The flexible route to a variety of nanoparticle-based microarrays allows for choosing the appropriate method for a certain kind of application. Spotting particles using a microarrayer allows for placing nanoparticles with different functionalities in different spots of the chip. Using the photolithographic or soft lithographic method, only one kind of particle can be transferred in one process, but user-defined and more complex structures can be generated more easily. However, multifunctional chips can be generated by step-and-repeat processes.

Each of the introduced methods generated microstructured monolayers of nanoparticles with high packing densities and homogenous distribution of nanoparticles. The functional groups at the surface of the nanoparticles thus arrayed keep their functionality after deposition in a microstructure. Thus the large variety of nanoparticles optimized for the binding of a certain kind or class of proteins or peptides can be used for the relatively simple preparation of a biochip. Protein biochips allow for screening of complex interactions and are expected to play an outstanding role in upcoming proteome research (proteomics). One specific example of using these new kinds of protein biochips is to use them as substrates in affinity matrix-assisted laser desorption initiation turnover frequency (MALDI-TOF) mass spectrometry.^[30]



ACKNOWLEDGMENTS

G. E. M. T. thanks the German Federal Ministry BMBF, the Land Baden-Württemberg, and the Fraunhofer-Gesellschaft for financial support of a Junior Research Group (“Nachwuchsforschergruppe”) on “Biomimetic Surfaces” (FKZ 0312180). We thank M. Herold (IGVT), N. Reinhardt, and Th. Schiestel (both IGB) for the preparation of nanoparticles; B. Steitz and S. Knecht (both IGVT) for help with nanoparticle deposition; K. Borchers for help with microstructuring; U. Vohrer (IGB) for XPS measurements; and A. Offenhäusser (Research Center Jülich) for providing microcontact printing stamps.

REFERENCES

- Prucker, O.; Schimmel, M.; Tovar, G.E.M.; Knoll, W.; Rühle, J. Microstructuring of molecularly thin polymer layers by photolithography. *Adv. Mater.* **1998**, *10* (14), 1073–1076.
- Xia, Y.; Whitesides, G.M. Softlithographie. *Angew. Chem.* **1998**, *110* (5), 568–594.
- Kane, R.S.; Takayama, S.; Ostuni, E.; Ingber, D.E.; Whitesides, G.M. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **1999**, *20* (23–24), 2363–2376.
- Michel, B.; Bernard, A.; Bietsch, A.; Delamarche, E.; Geissler, M.; Juncker, D.; Kind, H.; Rnault, J.-P.; Rothuizen, H.; Schmid, H.; Schmidt-Winkel, P.; Stutz, R.; Wolf, H. Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning. *IBM J. Res. Develop.* **2001**, *45* (5), 697–719.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W.; Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **1995**, *270* (5235), 467–470.
- Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277* (5330), 1232–1237.
- Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewsky, A.; Legras, R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: Suitable materials, structure and properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21* (7), 319–348.
- Chen, K.M.; Jiang, X.; Kimerling, L.C.; Hammond, P.T. Selective self-organization of colloids on patterned polyelectrolyte templates. *Langmuir* **2000**, *16* (20), 7825–7834.
- Hua, F.; Shi, J.; Lvov, Y.; Cui, T. Patterning of layer-by-layer self-assembled multiple types of nanoparticle thin films by lithographic technique. *Nano Lett.* **2002**, *2* (11), 1219–1222.
- Hua, F.; Cui, T.; Lvov, Y. Lithographic approach to pattern self-assembled nanoparticle multilayers. *Langmuir* **2002**, *18* (17), 6712–6715.
- Zheng, H.; Rubner, M.F.; Hammond, P.T. Particle assembly on patterned “plus/minus” polyelectrolyte surfaces via polymer-on-polymer stamping. *Langmuir* **2002**, *18* (11), 4505–4510.
- Tovar, G.E.M.; Paul, S.; Knoll, W.; Prucker, O.; Rühle, J. Patterning molecularly thin films of polymers—New methods for photolithographic structuring of surfaces. *Supramol. Sci.* **1995**, *2* (2), 89–98.
- Weber, A.; Knecht, S.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Modularer aufbau von biochips durch mikrostrukturierte abscheidung von funktionellen nanopartikeln. *Chem. Eng. Technol.* **2003**, *75*, 437–441.
- Hegemann, D.; Oehr, C.; Brunner, H. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B* **2003**, *208*, 281–286.
- Weber, A.; Knecht, S.; Schiestel, T.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Bioaktive mikroarrays durch mikrostrukturierte anlagerung von funktionellen nanopartikeln. *Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt-11. Heiligenstädter Kolloq.* **2003**, *11*, 57–64.
- Tovar, G.E.M.; Scheurich, P. Nanotechnologische werkzeuge für die immunologie. *Bioworld* **2002**, *2002-1*, 6–7.
- Stöber, W.; Fink, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *8*, 62.
- Vaihinger, D.; Landfester, K.; Kräuter, I.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203* (13), 1965–1973.
- Tovar, G.E.M.; Gruber, C.; Kräuter, I. Molecularly imprinted polymer nanospheres as fully synthetic affinity receptors. *Top. Curr. Chem.—Colloid Chem.* **2003**, *227*, 125–144.
- Weber, A.; Dettling, M.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23* (14), 824–828.
- Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Synthesis of novel activated ester surfmers for use in preparation of latexes for bioconjugation. *Polym. Prep.* **2002**, *43-2*, 1003–1004.
- Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Polymer nanoparticles with activated-ester surface by using



- functional surfmers. *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 770–778.
23. Kneuer, C.; Sameti, M.; Haltner, E.G.; Schiestel, T.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Lehr, C.-M. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196* (2), 257–261.
24. Qhobosheane, M.; Santra, S.; Zhang, P.; Tan, W. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst* **2001**, *126* (8), 1274–1278.
25. Santra, S.; Zhang, P.; Wang, K.; Tapeç, R.; Tan, W. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4988–4993.
26. Kneuer, C.; Sameti, M.; Bakowsky, U.; Schiestel, T.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Lehr, C.-M. Surface modified silica-nanoparticles can enhance transfection in vitro: A novel class of non-viral DNA vectors. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (6), 926–932.
27. Schiestel, T.; Brunner, H.; Tovar, G.E.M. Controlled surface functionalization of silica nanoparticles by covalent conjugation chemistry and preparation of high density streptavidin nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2003**. *in press*.
28. Flad, T.; Schiestel, T.; Brunner, H.; Tolson, J.; Ouyang, Q.; Pawelec, G.; Tovar, G.; Müller, G.A.; Müller, C.A.; Beck, H. Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle technology and MALDI mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* **2003**. submitted for publication.
29. Tovar, G.E.M.; Herold, M.; Weber, A.; Brunner, H. Herstellung und charakterisierung von aktivesternanopartikeln. *Chem. Eng. Technol.* **2002**, *74*, 717.
30. Tovar, G.E.M.; Schiestel, T.; Hoffmann, C.; Schmucker, J. Protein biochips for affinity—MALDI-TOF-mass spectrometry. *Bioforum Int.* **2001**, *5*, 235–237.
31. Harke, M.; Teppner, R.; Schulz, O.; Orendi, H.; Motschmann, H. Description of a single modular optical setup for ellipsometry, surface plasmons, waveguide modes, and their corresponding imaging techniques including Brewster angle microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, *68* (8), 1–5.
32. Vohrer, U.; Hegemann, D.; Oehr, C. XPS, AES, and AFM as tools for study of optimized plasma functionalization. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 929–934.
33. Vohrer, U.; Hegemann, D.; Oehr, C.; Brunner, H. Charakterisierung plasmamodifizierter polymere mittels SSXPS und XPS-imaging. *Vak. Forsch. Prax.* **2000**, *2*, 118–121.





Bioconjugative polymer nanospheres studied by isothermal titration calorimetry

Achim Weber^a, Marc Herold^b, Herwig Brunner^{a,b}, Günter E.M. Tovar^{a,b,*}

^a *Laboratory for Biomimetic Interfaces, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering & Biotechnology, University of Stuttgart, Nobelstreet 12, D-70569 Stuttgart, Germany*

^b *Institute for Interfacial Engineering, University of Stuttgart, Nobelstreet 12, D-70569 Stuttgart, Germany*

Received 29 April 2003; received in revised form 22 July 2003; accepted 29 September 2003

Available online 27 November 2003

Abstract

Active ester surfmers are polymerizable monomers with a reaction centre for interaction with biomolecules. These molecules enable for the preparation of nanoscale polymer beads (surfmer nanoparticles) via emulsion polymerization of styrene (St) or methyl methacrylate (MMA). The reactivity of such fabricated surfmer nanoparticles was determined by immobilization of remazol-brilliant blue and streptavidin. The interaction of a *p*-(11-(acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (AUPDS) and the surfmer nanoparticle (poly(St-co-AUPDS)) with remazol-brilliant blue was monitored by isothermal titration calorimetry (ITC). The binding properties and hydrolysis stability of surfmer nanoparticles was quantified via (ITC). The enthalpy of the reaction of AUPDS with remazol-brilliant blue amounts to $-32.1 \text{ kJ mol}^{-1}$, the enthalpy of the reaction of poly(St-co-AUPDS) with remazol-brilliant blue to $-38.8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Time and temperature dependence investigations of the surfmer nanoparticles displayed their long-ranging storage stability at 6°C in aqueous solution. The faster hydrolysis of the surfmer nanoparticle surface is the reason for the long-term instability at room temperature.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Isothermal titration calorimetry; Surfmer nanoparticles; Temperature dependence; Streptavidin

1. Introduction

Polymer beads and latex particles have become important tools in modern biotechnology [1–4]. They are used as solid phase carrier displaying a high surface area for immobilization and handling of proteins or peptides. For bioconjugation with a protein, the particles must provide a specific chemical function at their surface. The presently used preparation of polymer colloids for bioconjugation is quite circuitous and vulnerable to failures. Active ester surfmers feature a resort here. Active ester surfmers are polymerizable monomers with a reaction centre for interacting with biomolecules. These molecules make the preparation of nanoscale polymer beads (surfmer nanoparticles) via emulsion polymerization of styrene (St) or methyl methacrylate (MMA) possible. Ultrasensitive isothermal titration calorimetry (ITC) is one technique for thermodynamically monitoring chemical reactions initiated by the addition of a component to a reaction

mixture. ITC has become the technique of choice for characterizing biomolecular interaction and recognizing reactions in this respect. Unlike other techniques, ITC does not require immobilization or modification of the starting reactants. Furthermore, there are no molecular weight restrictions since the heat of binding is a naturally occurring phenomenon. Several papers and books have recently been published which describe the application of isothermal titration calorimetry for the study of biological and biomolecular recognition reactions [5–9]. Only few papers describe the interaction of molecules with specially designed nanoparticles [10,11].

In our earlier publications [12–14], we described a one-stage preparation for nanoparticles with activated ester groups on their surface. These groups are able to react with aromatic or aliphatic amines to the corresponding amide under weakly basic (pH 7.5–8.5) conditions. Up to now the determination of the yield of this acylation reaction and the amount of immobilized compounds is strongly depended on the kind of immobilized compound.

In this work we present a thermo-chemical method, which offers a more general reaction analysis and determines the reactive sites on polymer particles. We will describe

* Corresponding author. Tel.: +49-711-970-4109; fax: +49-711-970-4200.

E-mail address: guenter.tovar@igb.fhg.de (G.E.M. Tovar).

in detail an isothermal titration method in which polymer particles are titrated with the amine-containing compound remazol-brilliant blue at 25 °C. With this method, we will determine the affinity constant K_a , the reaction enthalpy ΔH and the concentration c_S of the functional groups on the surface of the particles. Further interest is focused on the immobilization capacity of the polymer particles. Besides we will show experimental results on temperature dependency of the binding site stability on the polymer surface.

2. Experimental

2.1. Materials

Styrene ($\leq 99\%$, Fluka, Buchs, Switzerland) was distilled before use to remove the inhibitor. The dye remazol-brilliant blue (1-amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4((3-((2-(sulfooxy)ethyl)-sulfonyl)phenyl)-amino)-2-anthracenesulfonic acid disodium salt, Acros Organics, Geel, Belgium) and 2,2'-azobis(2-methyl-propionamidin)-dihydrochlorid ($\geq 98\%$ AIBA, Fluka) were used without further purification. Buffers were prepared by using sodium-hydroxide ($\geq 99\%$, Merck, Darmstadt, Germany) and potassium dihydrogen-phosphate ($\geq 99.5\%$, Merck, Darmstadt, Germany). Streptavidin (SAv) was purchased from Boehringer, Mannheim, Germany. Ultra pure water with a resistance higher than $18.0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ was used.

2.2. Surfmer synthesis

p-(11(Acrylamido)undecanoyloxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (AUPDS, 1) (see Fig. 1) was syn-

thesized starting from 11-acryloylamino-undecanoic acid and 4-hydroxy-phenyl-dimethylsulfonium methylsulfate according to the method previously described [13].

2.3. Latex preparation and characterization

Preparation of the latex was carried out as described elsewhere [13]. The typical procedure of the latex preparation was as follows: A 100 mL three-necked-flask was equipped with a reflux condenser, with a magnetic stirrer bar and with an argon supply-line. A total of 30 ml of water was three times degassed by altering vacuum and argon atmosphere by bubbling argon through the liquid for 30 min.

Hundred milligram AUPDS (0.2 mmol) dissolved in 2 ml degassed water and 2 ml (34 mmol) co-monomer styrene were added by a syringe through a rubber-septum. The emulsion was stirred (400 U min^{-1}) and heated to the reaction temperature of 60 °C when the water soluble initiator was added. After two hours, the latex solution was heated to 65 °C for 10 min., then removed from the heat and the product cooled down to room temperature. The yield was determined by weighing the solid content from a dried aliquot of the latex.

Three times the latex was purified by centrifugation and subsequent redispersion with water before further application. The solid content of the latex was adjusted to 5 wt.-% by controlled dilution at the last redispersion step.

To determine the storage stability of the activated ester functions on the particle surface, two aliquots of freshly prepared poly(St-co-AUPDS) latex were stored either in a refrigerator at 6 °C or in a thermostat with water circulation at 25 °C.

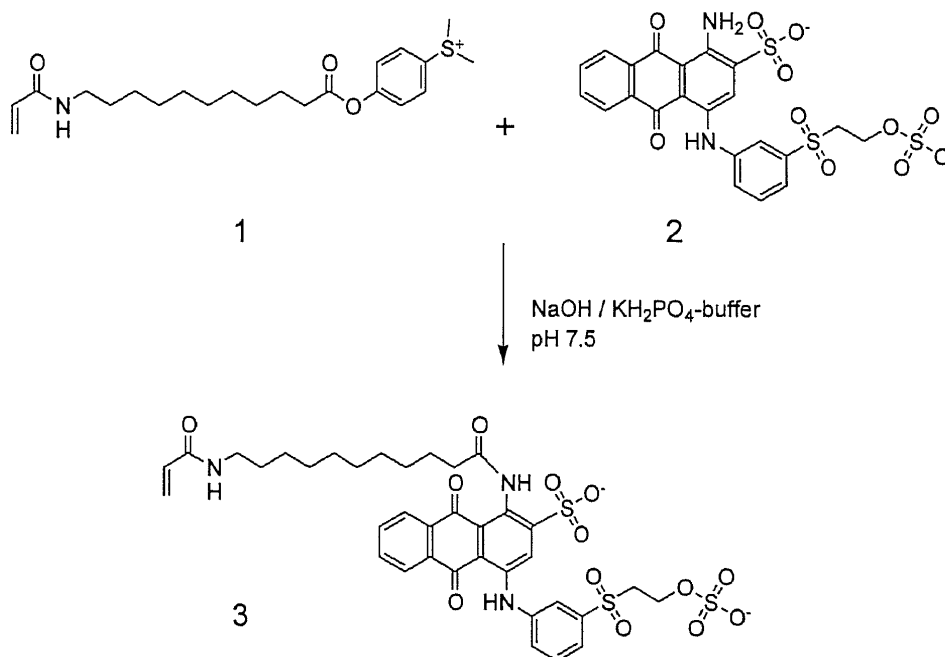


Fig. 1. Reaction scheme of the activated ester surfmer AUPDS (1) with remazol-brilliant blue (2) under aqueous conditions. The reaction product (3) contains a newly built up amide function.

The shape of the particles was determined by using scanning force microscopy (Parc Scientific Instrument SFM with Ultralever tip, radius 10 nm). Therefore we prepared a particle sample on a silicone wafer and scanned in the non contact mode with a rate of 1 Hz.

2.4. Isothermal titration calorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) was performed at 25 °C on a thermal activity monitor calorimeter (Thermometrics AB, Järfälla, Sweden) equipped with a high performance titration unit and a nanowatt amplifier. Prior to each measurement, each solution and suspension was degassed to remove air bubbles. 0.8 ml of the AUPDS solution ($c_{\text{AUPDS}} = 199 \mu\text{mol l}^{-1}$) was titrated by adding $25 \times 3 \mu\text{l}$ aliquots of remazol-brilliant blue in the same buffer ($c_{\text{remazol-brilliant blue}} = 6.09 \text{ mmol l}^{-1}$, see Fig. 2). The same amount of the latex was titrated by adding $30 \times 4 \mu\text{l}$ aliquots of remazol-brilliant blue in the same buffer

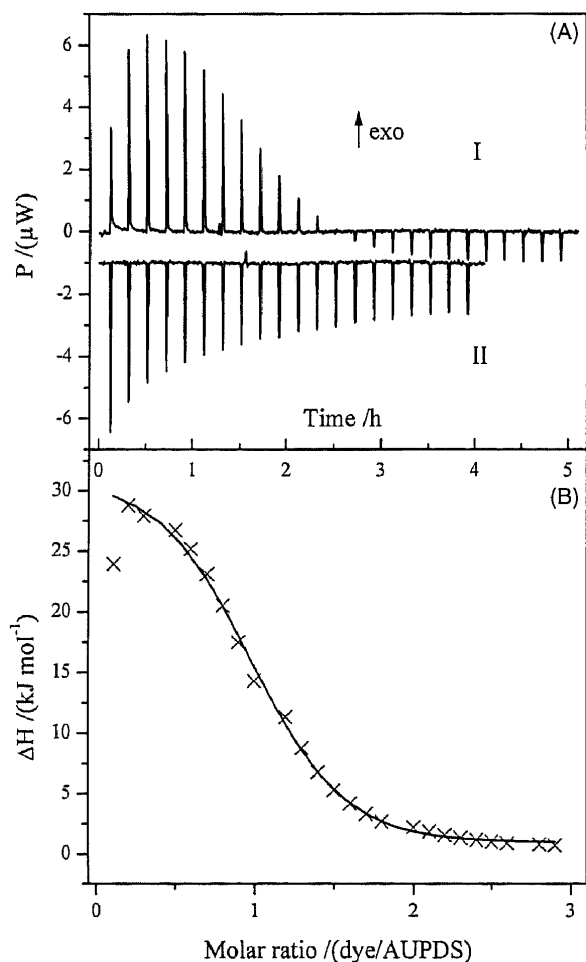


Fig. 2. Experimental titration curve for the titration of the activated ester surfmer AUPDS at 25 °C (I) and the corresponding control dilution experiment (II). (A) Measured heat power versus time. An aqueous solution of 95.42 mg remazol-brilliant blue in 25 ml of a pH 7.5 buffer of sodium hydroxide/potassium dihydrogen phosphate, $c_{\text{phosphate}} = 0.01 \text{ mol l}^{-1}$ was titrated into a solution of $199 \mu\text{mol l}^{-1}$ AUPDS in the same buffer. (B) Observed titration heat q_{obs} vs. molar ratio remazol-brilliant blue to AUPDS (the first value was excluded from analysis).

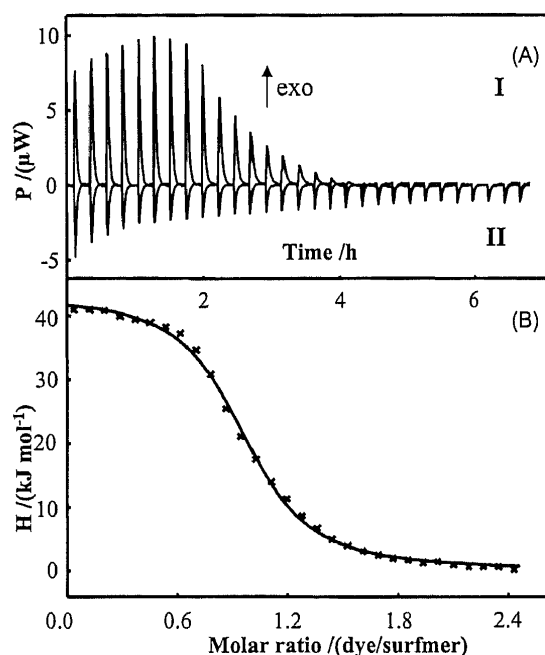


Fig. 3. Experimental titration curves for the titration of the of poly(St-co-AUPDS) latex at 25 °C (I) and the corresponding control dilution experiment (II). (A) Measured heat power versus time. An aqueous solution of 62.85 mg remazol-brilliant blue in 10 ml of a pH 7.5 buffer of sodium hydroxide/potassium dihydrogen phosphate, $c_{\text{phosphate}} = 0.01 \text{ mol l}^{-1}$ was titrated into a suspension of $760 \mu\text{mol l}^{-1}$ poly(St-co-AUPDS) latex in the same buffer. (B) Observed titration heat q_{obs} versus molar ratio remazol-brilliant blue to poly(St-co-AUPDS) latex (the first value was excluded from analysis).

($c_{\text{remazol-brilliant blue}} = 10.04 \text{ mmol l}^{-1}$, Fig. 3). The first aliquot was used to correct volume errors on the first injection, which was caused by inserting the filled syringe into the cell. This injection was taken into consideration in the titrant concentration scale, but the corresponding heat was excluded from the evaluation. The precise shape of the binding isotherm contained all information necessary to completely characterize the binding reaction [15–17]. Data were analyzed using the proprietary software DIGITAM 4.1 supplied by Thermometric AB (Järfälla, Sweden) with the instrument.

2.5. Immobilisation of streptavidin

An experiment was performed by adding $20 \mu\text{l}$ of an aqueous streptavidin solution ($c_{\text{SAV}} = 13.4 \mu\text{mol l}^{-1}$) and $10 \mu\text{l}$ suspension of poly(St-co-AUPDS) nanoparticles were added to $970 \mu\text{l}$ of a pH 7.5 buffer (sodium hydroxide/potassium dihydrogen phosphate, $c_{\text{phosphate}} = 0.01 \text{ mol l}^{-1}$). The particle suspension was shaken over night at room temperature and then separated into solid and aqueous phase by centrifugation. Streptavidin determination was performed as described earlier [12,18].

3. Results

After the preparation of the surfmer, we are able to investigate the reaction between the nucleophilic group of the dye

Table 1

Probe for ITC measurements with remazol-brilliant blue, affinity constants, molar enthalpies, concentration and molality of the activated ester groups per mass of the polymer particles

Sample	K_a (M^{-1})	ΔH ($kJ\ mol^{-1}$)	c_S ($\mu mol\ l^{-1}$)	b_S ($\mu mol\ g^{-1}$)
poly(St-co-AUPDS) latex	96000 ± 9000	38.8 ± 2.1	760 ± 40	15.2 ± 0.8
AUPDS	65000 ± 3000	32.1 ± 1.4	199 ± 12	–

remazol-brilliant blue and the activated ester of the AUPDS (see Fig. 1) by isothermal titration calorimetry.

It was shown by our experimental work that the nucleophilic reaction of the amine group of remazol-brilliant blue with the activated ester group of AUPDS is an exothermic reaction. Fig. 2A (I) shows the heat detected upon gradual injection of a remazol-brilliant blue into an initially pure solution of AUPDS versus time. The corresponding dilution control experiment is shown in Fig. 2A (II). Integration and normalization of the peaks yielded the observed heat per mole of injectant q_{obs} as a function of the molar ratio of the reaction partners (Fig. 2B). The results (ΔH , K_a) of the fit to a 1:1 model are listed in Table 1. The enthalpy ΔH amounts to -32.1 ± 1.2 kJ/mol and the affinity constant K_a to $65,000 \pm 3000$ M^{-1} .

The reaction of the dye remazol-brilliant blue and the activated ester groups on the surface of the poly(St-co-AUPDS) particles was investigated and the results of the ITC experiments indicate a reaction on the particle surface. Fig. 3A shows the heat detected upon gradual injection of remazol-brilliant blue into an initially pure suspension of poly(St-co-AUPDS) latex versus time (Fig. 3A (I), large peaks).

Every injection of $4\ \mu l$ a remazol-brilliant blue solution ($c_{remazol-brilliant\ blue} = 10.04$ mmol l^{-1}) increased the concentration of binding sites on the surface of the nanospheres within the sample cell by about 40 nmol. The corresponding dilution control experiment is shown in Fig. 3A (II, small peaks). The integration of the peaks of the dilution exper-

iment results in decreasing negative values. The integrated peaks of the titration experiment of poly(St-co-AUPDS) latex with remazol-brilliant blue (Fig. 3A (I)) are showing decreasing positive values at the first six injections. After summation and normalization of the integrated values the observed heat per mole of injectant q_{obs} was yielded as a function of the molar ratio of the reaction partners (Fig. 3B). It can be seen that the first seven values of this function are now nearly equal. The solid line was a fit of the above mentioned experimental data, which allowed for the determination of the enthalpy ΔH , the affinity constant K_a and the concentration of the available reaction centres c_S on the nanoparticle. The enthalpy of this reaction was exothermic and corresponded to -38.8 ± 1.7 kJ mol^{-1} for the titration of a poly(St-co-AUPDS) latex with remazol-brilliant blue. The affinity constant K_a yielded to $96,000 \pm 9000$ M^{-1} . We calculated the concentration of the available reaction centres on the nanoparticle surface to 760 ± 40 $\mu mol\ l^{-1}$ in this titration experiment. Regarding the solid content of the titrated latex there are 15.2 ± 0.8 μmol reactive ester groups per 1 g particles.

To investigate the reaction activity and the storage stability against hydrolysis of the activated ester on the surface of the particles, we repeated the titration experiments with samples stored under different conditions. Thus, we divided one sample into two portions. One sample was stored at $25\ ^\circ C$ in a thermostat with water circulation, the other in the refrigerator at $6\ ^\circ C$. After sequent time intervals, shown in Fig. 4, we

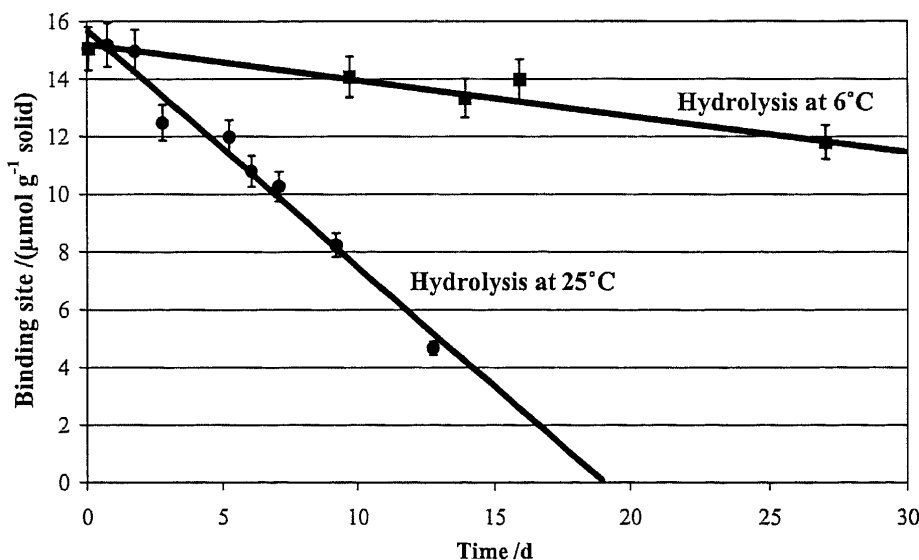


Fig. 4. Temperature and time depending hydrolysis of surfmer binding sites on the particle surface. The stability against hydrolysis increases drastically, if the poly(St-co-AUPDS) latex particles are stored at $6\ ^\circ C$ (squares). There is only a short-term stability at a storage temperature of $25\ ^\circ C$ (circles). The solid lines are linear regressions of the data sets.

titrated an aliquot of the different samples to determine the concentration of the non-hydrolyzed activated ester groups on the particle surface. The method, which was used for the consecutive ITC measurements, is the same method as described above for the titration of poly(St-co-AUPDS). The time dependence of the concentration of available binding sites is shown in Fig. 4. The site concentration of the sample which was stored at 6 °C shows a smaller decrease (squares, Fig. 4) in comparison to the sample stored at room temperature (diamonds, Fig. 4). The solid lines in this Fig. 4 are linear regressions of the data sets and are shown to visualize the gradients of the hydrolysis.

The bioconjugation of poly(St-co-AUPDS) with a protein was carried out as described in materials and methods (Section 2.5). Therefore, streptavidin was immobilised onto freshly prepared poly(St-co-AUPDS). The determination via fluorescence titration yielded a protein amount of 3.0 ± 0.5 mg tetrameric streptavidin per gram particles (details will be published elsewhere).

4. Discussion

The exothermic reaction of the dye remazol-brilliant blue and the activated ester of the AUPDS or the activated ester of the prepared poly(St-co-AUPDS) were monitored by isothermal titration calorimetry. The analyzed values of the enthalpies show small differences for both reactions. The reaction of the poly(St-co-AUPDS) is more exothermic as the reaction of the pure AUPDS with the dye remazol-brilliant blue (Figs. 2 and 3). The reaction was successfully carried out under convenient conditions (25 °C, aqueous pH 7.5-buffer sodium hydroxide/potassium dihydrogen phosphate, $c_{\text{phosphate}} = 0.01 \text{ mol l}^{-1}$) and it was possible to directly detect the reactivity of the surface groups on the particles by ITC. Additionally, the regular shape, the small distribution of size (see Fig. 5) and the sedimentation stability of the poly(St-co-AUPDS) nanoparticles allows ITC measurements.

The stability against hydrolysis of the poly(St-co-AUPDS) nanoparticles was also determined by ITC. The usage of the supplied analysing program DIGITAM 4.1 from Thermometrics AB allows the adjustment of the concentrations of the injected sample or the sample in the vessel if one other parameter is fixed. Therefore, we assumed a stoichiometric one-to-one reaction and fitted the sample concentration in the vessel. The concentration of the active ester groups on the particle surface could be calculated after the different storage times. The experimental conditions of the calorimetric set-up were unaltered over the whole series of experiments. The input of energy into the sample stored at 25 °C is significantly higher in comparison to the poly(St-co-AUPDS) latex stored at 6 °C. This results in a faster hydrolysis of the active ester groups of the poly(St-co-AUPDS) stored at 25 °C, which caused strongly decreasing concentrations of the binding sites c_s in the calculation of the continuing

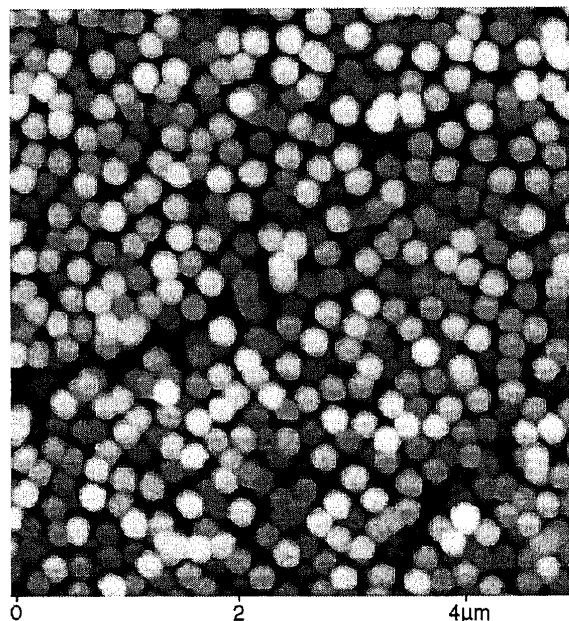


Fig. 5. Scanning atomic force micrograph of poly(St-co-UPDS) particles. The picture shows the nearly monodisperse spherical shape of the particles. The average diameter of the particles is 190 ± 19 nm.

measurements. The poly(St-co-AUPDS) stored at 6 °C kept nearly 90% of its binding activity over 4 weeks, whereas the binding activity of the sample stored at 25 °C is diminished to 50% after 9 days.

The freshly prepared poly(St-co-AUPDS) nanospheres are able to immobilize 3 wt.% of streptavidin, which proves their potential in bioconjugational chemistry.

5. Conclusion

The novel polymerizable surfactant AUPDS is able to react with the nucleophilic dye remazol-brilliant blue under aqueous conditions. A reaction enthalpy ΔH of $-32.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ was determined by ITC. We also presented an ITC-method for the determination of reactive activated ester groups at particle surfaces. This could be realised by the regular shape of the nanoparticles, which built a stable emulsion in the specified buffer. After the successful preparation of poly(St-co-AUPDS) particles, we analyzed the reaction of remazol-brilliant blue at 25 °C with the AUPDS-groups on the particles. A reaction enthalpy ΔH of $-38.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ was determined by ITC. We successfully investigated and quantified the stability against hydrolysis by isothermal titration calorimetry. It is necessary to store freshly prepared latex at 6 °C to prevent hydrolysis of the active ester groups. The surfmer nanoparticles provide capabilities for bioconjugation of proteins with amine groups as shown by the immobilization of streptavidin. The prepared nanoparticles are an interesting new tool in nanobiotechnology for immobilization of amine-containing peptides or proteins.

Acknowledgements

G.E.M.T. thanks the German Federal Ministry BMBF, the Land Baden–Württemberg and the Fraunhofer–Gesellschaft for financial support of a Junior Research Group (Nach-wuchs-forscher-gruppe) on Biomimetic Interfaces (FKZ 0312180). We thank M. Dettling for experimental help with the ITC measurements.

References

- [1] J. Kreuter, in: S. Swarbrick (Ed.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, Marcel Dekker, New York, 1994, p. 353.
- [2] W.E. Rapp, Macro beads as microreactors: new solid-phase synthesis methodology, in: S.R. Wilson, A.W. Czarnik (Eds.), *Combinatorial Chemistry*, Wiley, New York, 1997, pp. 65–94.
- [3] D.C. Sherrington, *Chem. Commun.* 21 (1998) 2275–2286.
- [4] W.M.Z. Wan Yunus, A.B. Shalleh, A. Ismail, K. Ampon, C.N.A. Razak, M. Basri, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36 (1992) 97–105.
- [5] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* 12 (1999) 3–18.
- [6] M. Chellani, *Am. Biotechnol. Lab.* 17 (1999) 14–18.
- [7] M.M. Pierce, C.S. Raman, B.T. Nall, *Methods* 19 (1999) 213–221.
- [8] J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry, *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, Wiley, Chichester, 1998.
- [9] M.L. Doyle, *Anal. Biotechnol.* 8 (1997) 31–35.
- [10] A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G.E.M. Tovar, *Macromol. Rapid Commun.* 23 (2002) 824–828.
- [11] R. Kirchner, J. Seidel, G. Wolf, G. Wulff, J. Inclusion Phenom. *Macrocycl. Chem.* 43 (2002) 279–283.
- [12] M. Herold, H. Brunner, G.E.M. Tovar, in: H.-G. Fritz, C.D. Eisenbach (Eds.), *Stuttgarter Kunststoffkolloquium*, vol. 18, Universität Stuttgart, Stuttgart, 2003, pp. 1/V6.1-5.
- [13] M. Herold, H. Brunner, G.E.M. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.* 204 (2003) 770–778.
- [14] M. Herold, H. Brunner, G.E.M. Tovar, *Polym. Preprints* 43 (2) (2002) 1003–1004.
- [15] M.J. Blandamer, Thermodynamic background to isothermal titration calorimetry, in: J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry (Eds.), *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, Wiley, Chichester, 1998, pp. 5–38.
- [16] L. Indyk, H.F. Fischer, *Methods Enzymol.* 295 (1998) 350–364.
- [17] F.H. Fisher, N. Singh, *Methods Enzymol.* 259 (1995) 194–221.
- [18] H.J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Karl, *Biochim. Biophys. Acta* 1381 (1998) 203–212.

Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres as Fully Synthetic Affinity Receptors

Günter E. M. Tovar*, Iris Kräuter, Carmen Gruber

Laboratory for Biomimetic Interfaces, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology and Institute for Interfacial Engineering, University of Stuttgart, Nobelstrasse 12, 70569 Stuttgart, Germany. *E-mail: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de*

Synthetic polymer spheres with the ability for molecular recognition represent a promising alternative to affinity binding matrices using biological molecules. This chapter describes various methods for the preparation of molecularly imprinted polymer spheres in the colloidal state. The synthesis, characterization, and performance of colloidal dispersions of molecularly imprinted polymer spheres and their application are discussed.

Keywords. Imprinting, Colloids, Microgels, Molecular Recognition, Templates

1	Introduction	125
1.1	General Principle of Molecular Imprinting	126
1.2	Manufacturing of Molecularly Imprinted Materials	127
2	Controlled Synthesis of Colloidal Molecularly Imprinted Polymers	128
2.1	Submicron Scale Molecularly Imprinted Particles by Precipitation Polymerization	128
2.2	Core-Shell Polymer Colloids with a Molecularly Imprinted Shell	130
2.3	One-Stage Preparation of Molecularly Imprinted Nanospheres	134
3	Conclusions	141
	References	143

1 Introduction

Recently there has been increasing interest in the use of synthetic polymers as molecularly imprinted materials for the design of artificial receptor-like binding sites in otherwise non-selective polymeric materials [1–6]. Synthetic polymers with the ability for molecular recognition represent a promising alternative to affinity binding matrices using biological molecules, such as proteins. Proteins themselves are highly functional molecules found in living organisms that have the ability to bind selectively to other molecules, carrying signals from cell to cell or catalyzing chemical reactions. Utilizing these unique properties for medical or biotechnology applications has been a logical outgrowth of proteins' unique chemical structure and functionality.

* Corresponding author.

In medical diagnostics, enzymatic catalysis, or affinity chromatography, proteins are already in widespread use. Modern genetic methods allow for the production of even enhanced properties of various wild-type proteins. There is, however, a limiting factor for using proteins for technical purposes. In a living organism, the lifetime of a functional molecule, such as a protein, is of relatively short duration, often only several hours. Technical processes demand robust materials that are stable over long periods of time in order to be economically viable. Molecular imprinting synthetic polymers to impart the same functionality as biological proteins but with greater stability therefore became a technique of increasing interest.

To prepare molecularly imprinted polymers, a synthetic network is grown during interaction with another molecule. Under certain conditions, the network formed molds to the molecule which thus functions as a template and imprints its 'negative' shape in the growing polymer network. After polymerization, when the template molecules are removed from the polymer network, specific binding sites for the template molecules are imprinted into the synthetic polymer. Usually, such molecularly imprinted polymers are prepared by *bulk polymerization*, resulting in monoliths which must be ground and sieved before using it as functional material.

In this chapter we describe various methods for preparing molecularly imprinted polymers (MIP) in a colloidal state. The resulting materials consist of submicron scale particles dispersed in a liquid acting as fully functional synthetic affinity receptors. The synthesis, characterization, and performance of colloidal molecularly imprinted polymers are described and applications with this new class of affinity receptors is discussed.

1.1

General Principle of Molecular Imprinting

The recognition sites on an MIP are formed in situ during polymerization. Polymers can thus be obtained which are either imprinted by non-covalent or by covalent interaction of an 'imprint' or template molecule with the polymer (Fig. 1). In non-covalent imprinting, a functional monomer and a crosslinker copolymerize with non-polymerizable template molecules [7]. These molecular templates are then incorporated into the growing polymer network and can easily be extracted from the polymer after polymerization is completed. If the imprinting is successful, the polymer network will be left with pores lined with sites having complementary functional groups to those of the template molecules. These functional pore sites are then used for molecular recognition reactions. The imprinted polymer specifically binds molecules by non-covalent interactions, such as hydrogen bonding, van-der-Waals forces, p - π interactions, and, if charged compounds are used, electrostatic interactions. The physical structure of the polymer's receptor-like binding sites are molded by the shape of the template molecules and the three-dimensional arrangement of its functional units, thereby creating polymers that can be enantioselective as well [8].

For covalent imprinting, the template molecule is copolymerized into the polymer network with the monomer and crosslinker. Instead of extracting

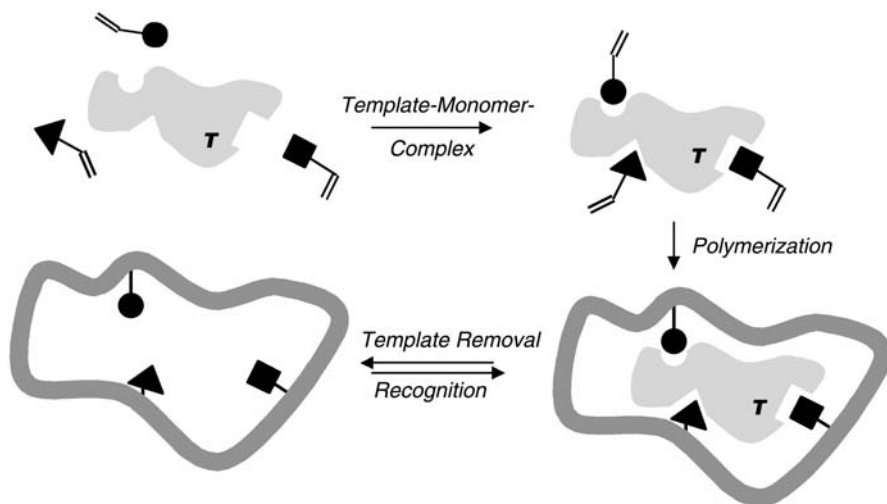


Fig. 1. Schematic diagram of the molecular imprinting process of specific cavities in a crosslinked polymer with the template (T) and functional monomers

the template molecule after polymerization, the template is split from the copolymer network by a chemical reaction step [9]. Requirements for the molecular template and the polymer system are much more stringent in the case of covalent imprinting compared to non-covalent imprinting. Whereas covalent imprinting requires the synthesis of special template derivatives for each polymer system, non-covalent imprinting can generally be used for all miscible molecular templates and monomer systems. Acrylic polymers and copolymers, such as poly(methacrylic acid-*co*-ethylene glycol dimethacrylate), have been successfully molecularly imprinted with a large variety of templates such as chiral amino acids, drugs, fertilizers, biocides, and peptides [10]. MIPs, so far, have been used as effective molecular selectors in liquid chromatography [11], capillary electrochromatography [12, 13], and solid-phase extraction [14–16].

1.2 Manufacturing of Molecularly Imprinted Materials

The large-scale production of molecularly imprinted materials is generally limited by the synthetic polymerization method used. Usually, a molecularly imprinted polymer is prepared by *bulk polymerization* which results in a brittle monolithic polymer network. The monolith is subsequently ground in order to expose a larger surface area which is molecularly imprinted. However, the ground particles tend to have extremely broad size and shape distributions. Sieving of the particles typically yields approximately 20% of the original bulk polymer in particles of useful size [17]. The shape of individual particles however remains intrinsically irregular. The previously described preparation

method is not only inefficient but often is difficult to control. However, this procedure has enabled the synthesis of MIP polymers for use as highly selective stationary phases in HPLC separations.

Several approaches have been used to obtain molecularly imprinted particles with a controllable size and shape distribution. For example, *suspension polymerization* has been utilized to obtain monodispersed MIP particles of several microns diameter [18, 19]. Additives are put into the suspension to act as pore inducers thereby increasing the specific surface area and efficiency of the material for chromatographic applications.

Molecularly imprinted polymers with a variety of shapes have also been prepared by *polymerizing monoliths in molds*. This in situ preparation of MIPs was utilized for filling of capillaries [20], columns [21], and membranes [22, 23]. Each specific particle geometry however needs optimization of the respective polymerization conditions while maintaining the correct conditions for successful imprinting. It would be advantageous to separate these two processes, e.g., to prepare a molecularly imprinted material in one step, which then can be processed in a mold process in a separate step to result the desired shape.

Colloidal MIPs may become extremely useful in widening the applicability of MIP material as the colloidal domain offers specific advantages. A major disadvantage of the conventional bulk preparation of MIP networks is that a high amount of imprint molecules stay embedded in the polymer which cannot be extracted. This then leads to a loss of template molecules which may be an expensive substance or possibly uncontrolled leaching of the system in a later application. In any case, potential binding sites are lost for binding of target molecules in an application.

2

Controlled Synthesis of Colloidal Molecularly Imprinted Polymers

Any colloidal material provides an intrinsically favorable accessibility to its surface when compared to bulk material. Therefore, the availability of receptor binding sites should be facilitated by using colloidal MIPs. Submicron scale MIPs were prepared by *precipitation polymerization*, *emulsion polymerization*, and *miniemulsion polymerization*. Precipitation polymerization uses the insolubility of the formed polymer microgel in a certain solvent, whereas emulsion and miniemulsion polymerization employ two solvent phases for the preparation of the colloidal polymer. The latter methods offer the opportunity for tailoring the surface of the colloids exclusively, thereby enhancing the accessibility of the binding sites. Each of the three approaches has their own characteristics and will be described in the following sections.

2.1

Submicron Scale Molecularly Imprinted Particles by Precipitation Polymerization

Even though a particular starting monomer may be soluble in a certain solvent, the polymer formed often is not. The polymer therefore precipitates when the formed polymer reaches a certain molecular weight or size. If the polymer is

crosslinked, a microgel is thus formed. The preparation of MIPs by *precipitation polymerization* might be regarded as the easiest route to obtain nano-scale particles.

The polymerization reaction takes place in the bulk and the formation of discrete particles is a result of the good solubility of the monomer in the solvent and the low solubility of formed particles of a certain size. Because this approach is dependent on the existence of such a kind of a solubility/non-solubility regime for the monomer, crosslinker, template, and polymer network, it might be hard to find the correct combination of compounds needed to interact in the prescribed way. Additionally, there is a high risk of coagulation with this method as no surfactant is added for the stabilization of the interface between the formed polymer and the monomer containing solution.

Mosbach and co-workers developed a method to prepare molecularly imprinted polymers by *precipitation polymerization* [24]. They started from a dilute, homogenous solution of the monomer methacrylic acid (MAA) and the crosslinker trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) or ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA). The polymer formed in the presence of the template molecule 17β -estradiol, theophylline, or caffeine contained a high proportion of discrete spheres of diameter less than a micron. Because the effect of coalescence becomes predominant with higher solid content of the reaction mixture, this approach is limited to solid contents of typically <2 wt%.

Wulff et al. prepared covalently imprinted microgels by *radical solution polymerization* at high dilutions. By choosing different solvents for the polymerization and successive binding experiments, the solubility of certain microgels under recognition conditions was achieved [25]. The microgels consisted of MAA, the model template monomer phenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-bis(4-vinylphenylboronol)- α -D-mannopyranoside 1 (Fig. 2), and a crosslinker. The crosslinker was varied between EGDMA 3, TRIM 4, and 2,5-di-*O*-methacryloyl-1,4,3,6-dianhydro-D-sorbitol 5 (Fig. 2). Also varied was the crosslinker concentration during the polymerization from 50 to 90 wt%. Solvents used for the polymerization were cyclohexanone, cyclopentanone, and *N,N*-dimethylformamide (DMF), and for later recognition experiments DMF and methanol. Microgels with a molecular weight of up to 8×10^4 g mol⁻¹ were thus prepared which showed solubility in certain solvents when the degree of crosslinking was 50% or less. There is a clear advantage to using the soluble microgels for characterization by gel permeation chromatography, viscosimetry, and membrane osmometry. Wulff and co-workers found higher experimental values for the intrinsic viscosity when compared to the theoretical value 2.5 which would be expected for spherical particles following the Einstein theory of viscosimetry. Thus it was concluded that the imprinted particles were not spherical but irregularly shaped.

The template monomer was designed for imprinting by inclusion in the microgels formed, followed by hydrolysis during suspension in methanol/water (1:1, v/v). Thus, the boronic ester was split and phenyl- α -D-mannopyranoside 2 (Fig. 2) was removed, leaving free binding sites in the polymer network.

Molecular recognition experiments were carried out with a racemic mixture of phenyl- α -mannopyranoside 2 (Fig. 2) in a heterogeneous phase as well as in a homogeneous phase depending on the solubility of the microgel in the

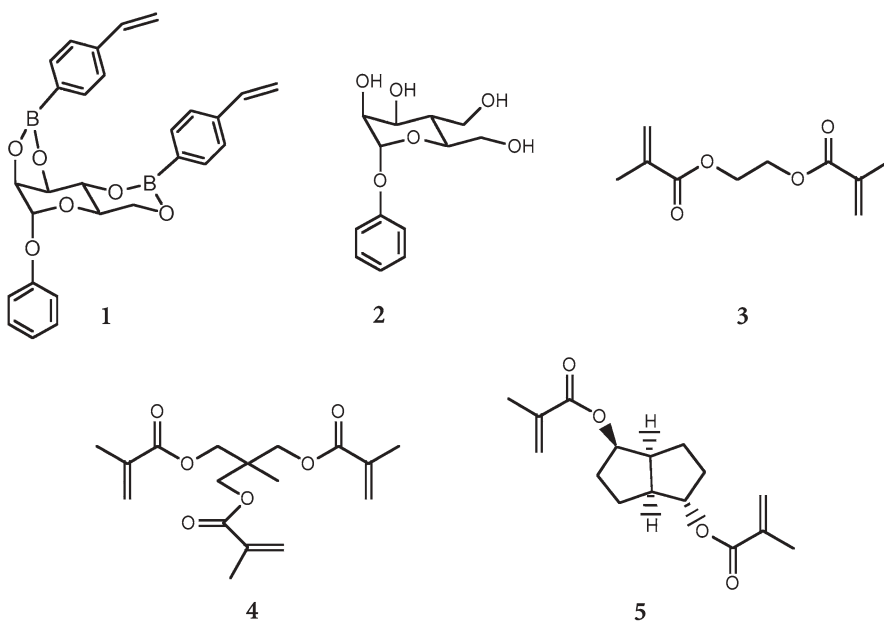


Fig. 2. Phenyl-2,3;4,6-tetra-*O*-bis(4-vinylphenylboronyl)- α -D-mannopyranoside **1**, phenyl- α -D-mannopyranoside **2**, EGDMA **3**, TRIM **4**, and 2,5-di-*O*-methacryloyl-1,4;3,6-dianhydro-D-sorbitol **5**

particular solvent. The separation factor α is the ratio of the distribution coefficients of the D- and the L-form. A strong influence of the recognition properties was found depending on the solvent as well as the degree of crosslinking. In conclusion, the enhanced flexibility of the functional microgel groups needed to assure solubility in a certain solvent lead in consequence to a partial loss of the molecules' recognition capabilities as the "memory effect" of the binding sites was partially lost. However, the soluble microgels showed recognition properties which in some was comparable with insoluble polymer networks.

2.2

Core-Shell Polymer Colloids with a Molecularly Imprinted Shell

Molecularly imprinted core-shell nanospheres were prepared by Whitcombe and co-workers using a two-stage *emulsion polymerization* [26]. The imprinting process involved a specific procedure, referred to as "sacrificed spacer method" [27]. This method is composed of a covalent imprinting step, followed by a reactive cleavage of the imprinting molecule, thus resulting in non-covalent binding sites for the specific recognition of the target molecule. This molecular target, or a close analogue which must be part of the initial imprinting molecule, was left behind by the cleavage or "sacrificed" to leave the imprinted sites.

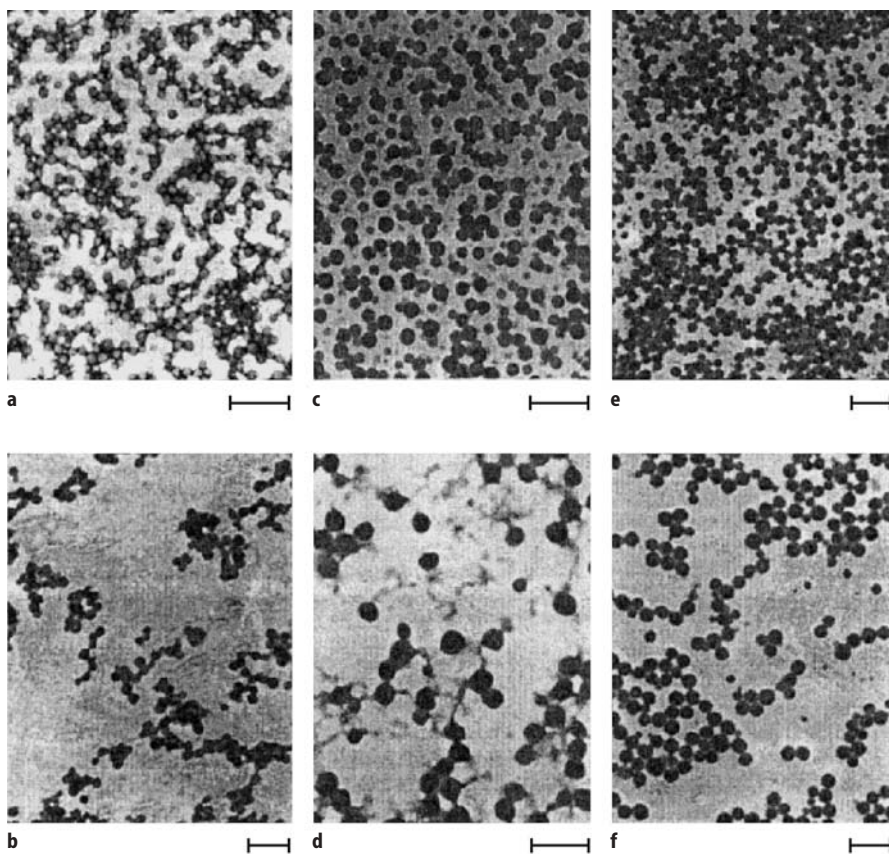


Fig. 3a–f. TEM photographs of polymeric nanoparticles (*scale bars represent 200 nm*) [26]

To use this method for the preparation of imprinted colloids, Whitcombe et al. applied it during the shell preparation. They synthesized a copolymer network shell consisting of poly(EGDMA-*co*-cholesteryl (4-vinyl)phenyl carbonate) using a variety of different seed particles to build the polymer core [26]. The seed particles used were 30–45 nm in diameter and the imprinted p(EGDMA-*co*-CVPC) shell resulted to a thickness of about 15 nm (Fig. 3). The specific BET surface area of the core-shell particles was typically $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

In the next step, the cholesteryl ester entities copolymerized in the shell, were split by carbonate ester hydrolysis. The hydrolysis was carried out in sodium hydroxide in methanol. Thereby, an analogue of cholesterol, the target molecule for later recognition, was removed from the copolymer network. The particles were now ready for non-covalent binding of cholesterol. To quantify the binding behavior of colloidal MIPs, they were mixed with a cholesterol containing solution, separated from the liquid and the cholesterol concentration in the supernatant was quantified by HPLC.

Whitcombe et al. observed a strong decrease of the cholesterol concentration, and hence excellent binding for cholesterol with p(EGDMA-*co*-CVPC) shell/pMMA core particles in isohexane. When the carbonate ester was not hydrolyzed and hence no imprinted sites existed in the shell, only 2.7 μmol cholesterol per g particles were bound corresponding to the non-specifically adsorbed templates. Slightly less cholesterol was adsorbed to particles prepared without CVPC at all thus formed with a pure pEGDMA shell ($<2 \mu\text{mol g}^{-1}$).

A possible application for imprinted colloids is one where the core has a magnetic moment. To this end, Whitcombe and co-workers employed an aqueous ferrofluid containing ferromagnetic particles for inclusion in the core. Here, a p(MMA-*co*-EGDMA), prepared with a molar MMA:EGDMA ratio of 9:1 copolymer, was used to enclose the magnetic particles. Interestingly, when this EGDMA-containing core was equipped with an imprinted shell, very high recognition properties were observed once again. The ferrocolloid itself was also used as seed and allowed for direct preparation of the shell. Only slightly lower binding properties were observed. The major advantage of magnetic molecularly imprinted core-shell particles is an accelerated sedimentation when a magnetic field is applied. Sedimentation was up to 150 times faster than with gravity alone and therefore eased up the separation and purification of imprinted material significantly.

Extending this approach, Whitcombe et al. designed a template-surfactant (TS) which acted as a template and a surfactant at the same time. This approach allowed for the controlled imprinting of the core-shell particles only at the surface of the shell [28]. An example of such a template analogue is given in Fig. 4. It was proposed that the TS molecules concentrated at the water-polymer interface with the hydrophobic template region embedded in the monomer phase and the polar end group looming into the water phase during shell polymerization. The binding between template and polymer here depended principally on hydrophobic interactions instead of hydrogen bonding in contrast to the cholesterol imprinted polymers described above [26].

Whitcombe et al. concentrated on the synthesis of hydrophobic surface imprints in particles with a hydrophilic surface layer. To achieve hydrophilicity of the particles surface they chose divinylbenzene as crosslinker and an additional polymerizable surfactant (PS) (Fig. 4) with a charged end group for the shell polymerization. Thereby, imprinted particles of submicrometer scale, with good monodispersity and high surface area could be prepared. A schematic diagram of the design of hydrophobic surface imprints in particles with a hydrophilic surface layer is shown in Fig. 5.

The removal of template required only ultrafiltration and washes, thereby leaving hydrophobic cavities on the surface of charged particles. The binding properties of the imprinted particles was estimated by HPLC under aqueous conditions. Best results have been obtained using 2.5–7.5% of template-surfactant relative to polymerizable surfactant in the shell.

Following this strategy a better binding of non-polar templates in aqueous media may become possible, thus opening the MIP principle to templates with low solubility. A limitation of this approach, however, may be the fact that it requires the specific synthesis of a template analogue with surfactant properties.

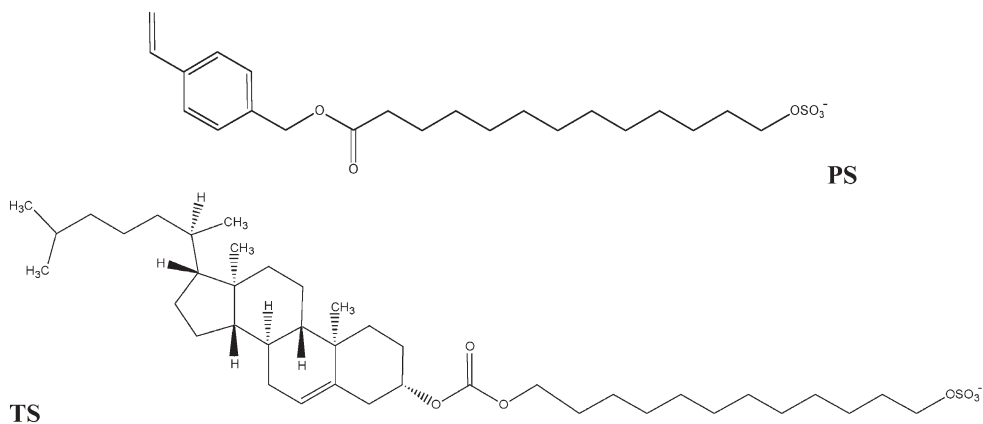


Fig. 4. Structures of the polymerizable surfactant (PS) and the template-surfactant (TS)

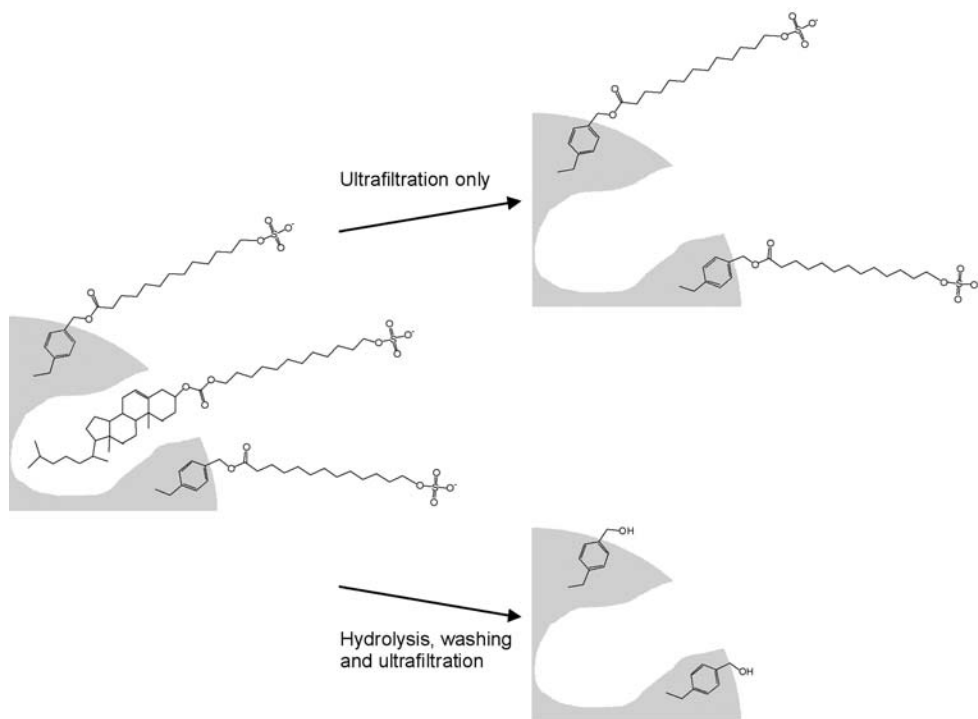


Fig. 5. Schematic diagram of the creation of hydrophobic surface imprints in particles with a hydrophilic surface layer (adapted from [28])

Although today there are different techniques available for the synthesis of MIPs only a few approaches use water soluble templates. Carter and Rimmer recently reported on molecularly imprinted core-shell particles for the selective recognition of caffeine in aqueous media [29]. In the first step a polymer core was formed consisting of styrene and divinylbenzene (1:1). The core particles were then coated with the imprinting monomer mixture oleyl phenyl hydrogen phosphate and EGDMA in the presence of the template molecules caffeine or theophylline. After the polymerization Rimmer and Carter removed essentially 100% of the template by extraction, thereby demonstrating one important advantage; that of more effective extraction of colloidal MIPs when compared to conventional MIPs. The binding behavior of the core-shell MIPs was characterized by Scatchard plots for the recognition of caffeine to caffeine-MIPs and theophylline to theophylline-MIPs (Fig. 6). The observed binding curves were biphasic and binding constants for caffeine and theophylline were calculated from the plots, resulting to $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ and $390 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

In contrast, the binding of caffeine to a theophylline imprinted colloid (Fig. 6c) did not lead to reasonable Scatchard plot binding data, thus indicating a clear difference in the binding behavior. Carter and Rimmer interpreted this finding by a decreased binding strength depending on the more hydrophobic nature of caffeine as compared to theophylline.

When a mixture of caffeine and theophylline was used for binding to caffeine or theophylline imprinted colloids, the caffeine imprinted particles clearly showed a higher selectivity for binding of the original template. The overall performance of the core-shell particles depended on the thickness of the imprinted shell and the best selective binding results were reported for a very thin shell of only 2 nm thickness.

2.3

One-Stage Preparation of Molecularly Imprinted Nanospheres

The principle of molecular imprinting is based on the hypothesis that monomers and templates interact in the liquid phase prior to polymerization. The molecules assume an optimum conformation driven by the gain in free energy during the interaction of complementary functional groups. This conformation is then partially conserved during the polymerization and transformed to the solid phase. A polymerization technique which allows for a simple arrangement of the MIP building blocks in the liquid phase and transforms it to solid nanoparticles would therefore be advantageous. This scenario is realized to a high degree in *mini-emulsion polymerization*. Here, nanodroplets act as small “nanoreactors”, with the monomer and the imprinting molecules already present at the beginning of the polymerization [30]. A potential thermodynamic control for the design of nanoparticles is given with this technique in contrast to the kinetically controlled precipitation and emulsion polymerization. The dictate of kinetics could cause serious problems such as lack of homogeneity or restrictions in the accessible composition of the molecularly imprinted particles. These problems are largely absent in the mini-emulsion procedure.

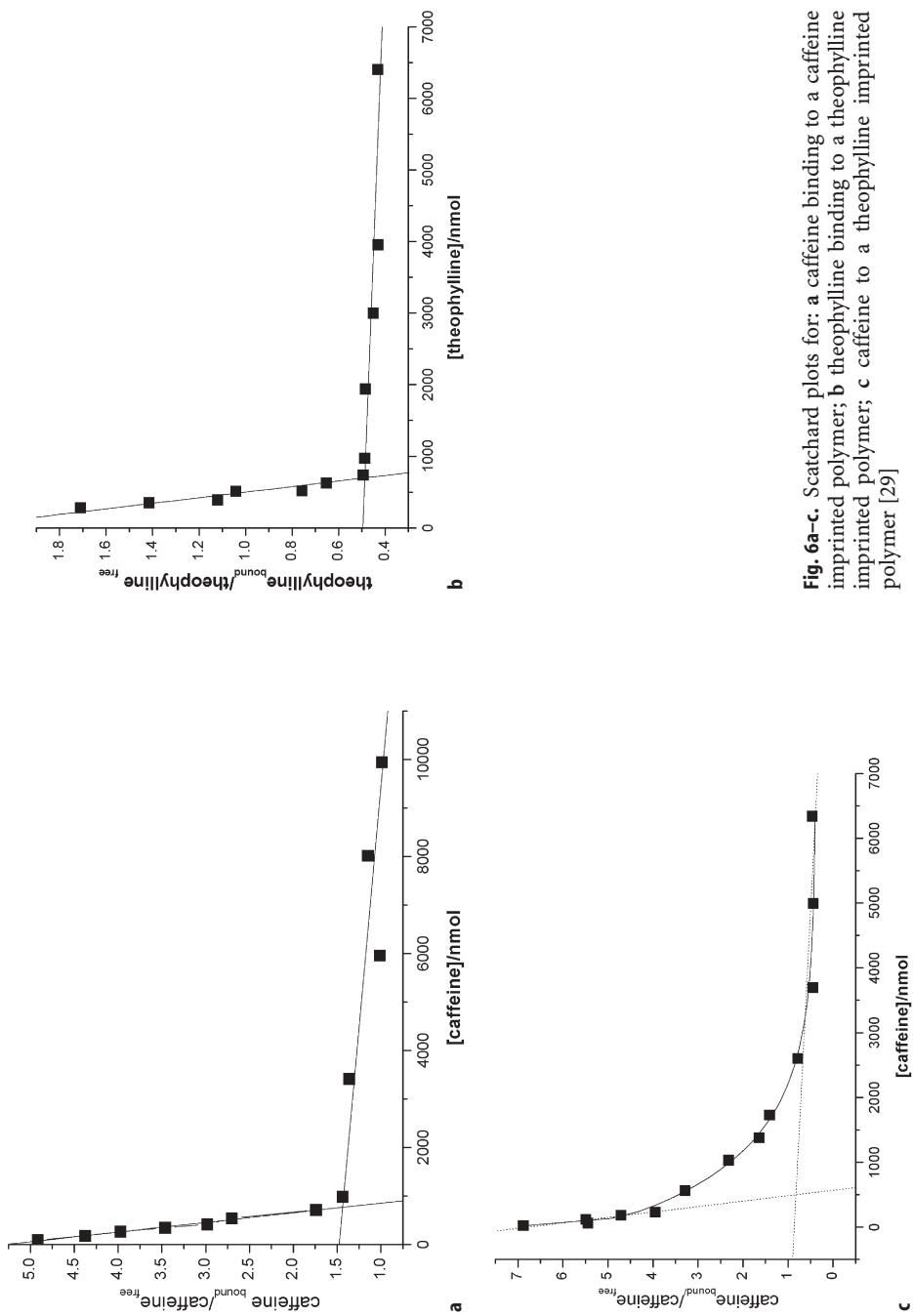


Fig. 6a-c. Scatchard plots for: **a** caffeine binding to a caffeine imprinted polymer; **b** theophylline binding to a theophylline imprinted polymer; **c** caffeine to a theophylline imprinted polymer [29]

Miniemulsion polymerization is a transformation of the suspension polymerization technique with application of high shear forces. As early as 1973, Ugelstad et al. scaled down the monomer droplet size to several hundred nanometers by shearing the suspension [31]. A co-stabilizer was added to the dispersed phase to suppress diffusion processes occurring in the continuous phase in order to create a stable emulsion with homogeneous size, so-called *mini-emulsions*. The nanodroplets are stabilized by a hydrophobic additive against Ostwald ripening during the miniemulsion polymerization. With this technique a nearly 1:1 transfer of monomer nanodroplets into polymerized nanoparticles is possible [32–34]. Miniemulsion polymerization therefore seems to be particularly suited for a one-step preparation of both covalent and non-covalent molecularly imprinted nanospheres. Figure 7 illustrates the general scheme for the preparation of molecularly imprinted nanoparticles (nanoMIPs) and their use for molecular recognition.

The preparation of nanoMIPs using the process of miniemulsion polymerization was first investigated and reported by Tovar and co-workers [30, 35]. Different types of particles, e.g., consisting of hydrophobic ethylene glycol dimethacrylate EGDMA as crosslinker and hydrophilic methacrylic acid (MAA) as functional monomer, were prepared by varying the molar ratio of monomer to crosslinker $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}}$ with different templates. Water-insoluble amino acid derivatives, e.g., L- or D-boc-phenylalanine anilide (BFA) [36] were used as template molecules. With this copolymer system (Fig. 8), stable, coagulation-free dispersions were obtained with a conversion of $98\pm 2\%$ (Fig. 9).

Due to the high water solubility of MAA, partitioning of the MAA in the water phase was expected. After polymerization, the obtained miniemulsions (latexes) and the colloidal nanoMIPs were characterized by gravimetric analysis, dynamic light scattering (DLS), gas adsorption measurements (BET), and transmission electron microscopy (TEM) as shown in Fig. 9.

While dynamic light scattering revealed an average apparent hydrodynamic particle diameter of about 200 ± 20 nm, transmission electron microscopy gave a more realistic image of the shape and the size distribution of the nanoMIPs. Figure 9 shows that spherical particles with a rather broad size distribution were formed. They had a diameter of 50 nm up to 300 nm with an average particle diameter around 110 nm and the absence or presence of the template molecule

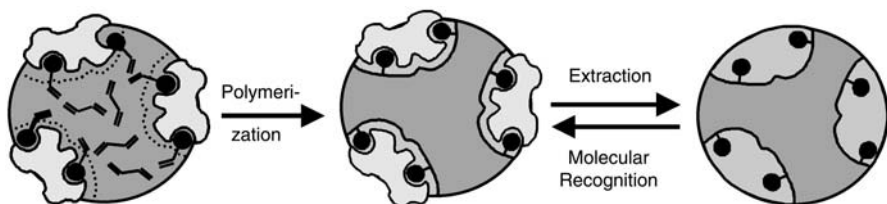


Fig. 7. General scheme for the preparation of molecularly imprinted nanospheres and their use for molecular recognition. Template molecules induce the formation of binding sites during the miniemulsion polymerization. The templates are extracted from the highly crosslinked particles and are molecularly recognized by the nanospheres selective binding sites

during particle preparation appeared to have no influence on the size or morphology of the resulting particles (see Fig. 9a,b, respectively). This finding for the particle morphology was proven by Brunauer-Emmett-Teller nitrogen adsorption measurements (BET) which revealed almost identical values of about $55 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ for the specific surface of p(MAA-co-EGDMA) particles despite their preparation in the presence or absence of template molecules. An extraction of the template from the imprinted particles changed this situation drastically so that the BET-surface was substantially increased to about $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. In contrast, when a non-imprinted latex was treated with a solvent in the same way, no change in the BET-surface was observed. The increase in case of imprinting was interpreted as an indication of the formation of nanopores and a sign of successful imprinting during the polymerization.

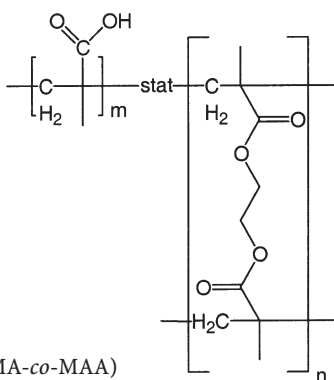


Fig. 8. Structure of p(EGDMA-co-MAA)

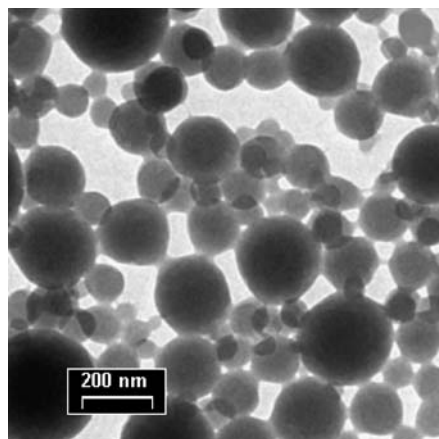
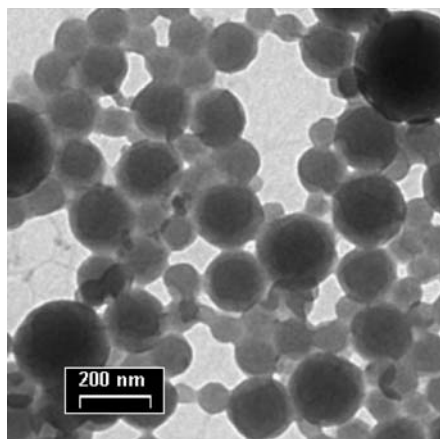


Fig. 9a,b. Transmission electron microscope photograph of MIP nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization: **a** control polymer prepared in absence of template; **b** polymer prepared in presence of template L-BFA [30]

The inclusion of the template during the miniemulsion polymerization and its extraction from the purified imprinted nanoMIPs was also evidenced by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy [30]. Figure 10 shows (a) the molecular structure of the template molecule BFA in THF and the corresponding experimental $^1\text{H-NMR}$ spectra just as (b) the spectrum of the purified BFA imprinted nanospheres suspended in THF. All observed signals in Fig. 10b correspond to the solvent plus the template. Due to the high insolubility and immobility of the crosslinked network, no signal corresponding to the p(MAA-co-EGDMA) network was seen. Figure 10c shows the spectra of the imprinted microgel which was purified from the template BFA before measurement. The signal of BFA was significantly decreased. If the observed spectra is magnified, only traces of the template signals could be seen.

To quantify the concentration of extracted template UV spectroscopy was used. Compared to the absolute amount of template initially contained in the miniemulsion polymerization an extraction rate of up to $95\pm 5\%$ template was observed [35]. Such efficient extraction of the template can be seen as a proof of the postulated advantage of colloidal over bulk MIP material in regard to template recovery.

Of course, the most important feature of the nanoMIPs was their ability for molecular recognition which was quantified by UV spectroscopy and HPLC. The best (enantio)selective molecular recognition properties were reported for p(MAA-co-EGDMA) nanospheres prepared with a molar ratio of the monomer to crosslinker of 0.25:1. Here, the absolute amount of particle-bound L-BFA was four times greater in case of an L-imprinted MIP than in a corresponding non-imprinted polymer and 10 times greater than the binding of the D-enantiomer in the L-imprinted microgels.

Additionally, Tovar and co-workers used microcalorimetry to monitor the heat of binding during the interaction of the nanoparticles with molecular probes. For the first time, the relatively low binding energies involved in this non-covalent interaction were quantified by a purely thermodynamic measurement. A comparison of the heat of binding using the original template or structurally closely related probe molecules showed clearly that the imprinted microgel differentiated between different molecules. Figure 11 displays the corresponding microcalorimetric titration experiment. The interaction of L-BFA **6a** (Fig. 12) with an L-BFA imprinted polymer resulted in the exothermic reaction with a binding energy of $-21.1\pm 1.2\text{ kJ mol}^{-1}$. The enantiomeric counterpart, D-BFA, resulted in notably less energy with $-12.7\pm 1.2\text{ kJ mol}^{-1}$. The heat of binding of three other amino acid derivatives interacting with the microgel showed even lower values with L-boc-phenylalanine ($-5.1\pm 1.0\text{ kJ mol}^{-1}$, L-boc-Phe **6b**), L-boc-tyrosine ($-10.9\pm 0.8\text{ kJ mol}^{-1}$, L-boc-Tyr **6c**), and L-boc-tryptophan ($-2.8\pm 0.7\text{ kJ mol}^{-1}$, L-boc-Trp **6d**). The investigation of the corresponding non-imprinted nanoparticles resulted in essentially zero binding energy within the experimental error.

This study clearly demonstrated the enthalpic basis of chiral molecular recognition by molecularly imprinted polymers.

Furthermore, Tovar and co-workers constituted selective layers and coatings of the nanoMIPs while taking advantage of their uniform spherical shape. For

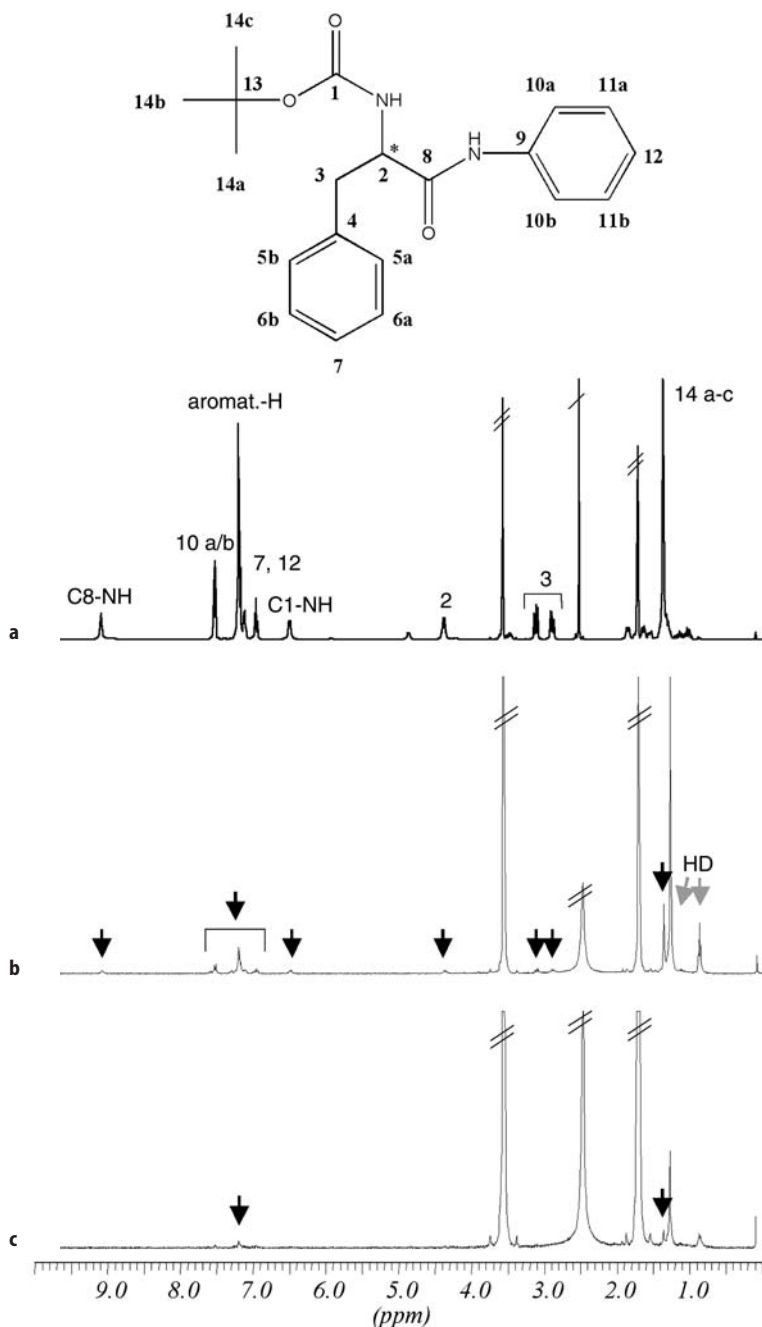


Fig. 10a–c. Molecular structure of BFA and $^1\text{H-NMR}$ spectra of: **a** the pure template BFA; **b** imprinted microgel dispersed in THF- d_8 before extraction showing BFA-signals of high intensity; **c** imprinted microgel after extraction with BFA signals of very low intensity. The *barred signals* are attributed to the solvent THF- d_8 and water [30]

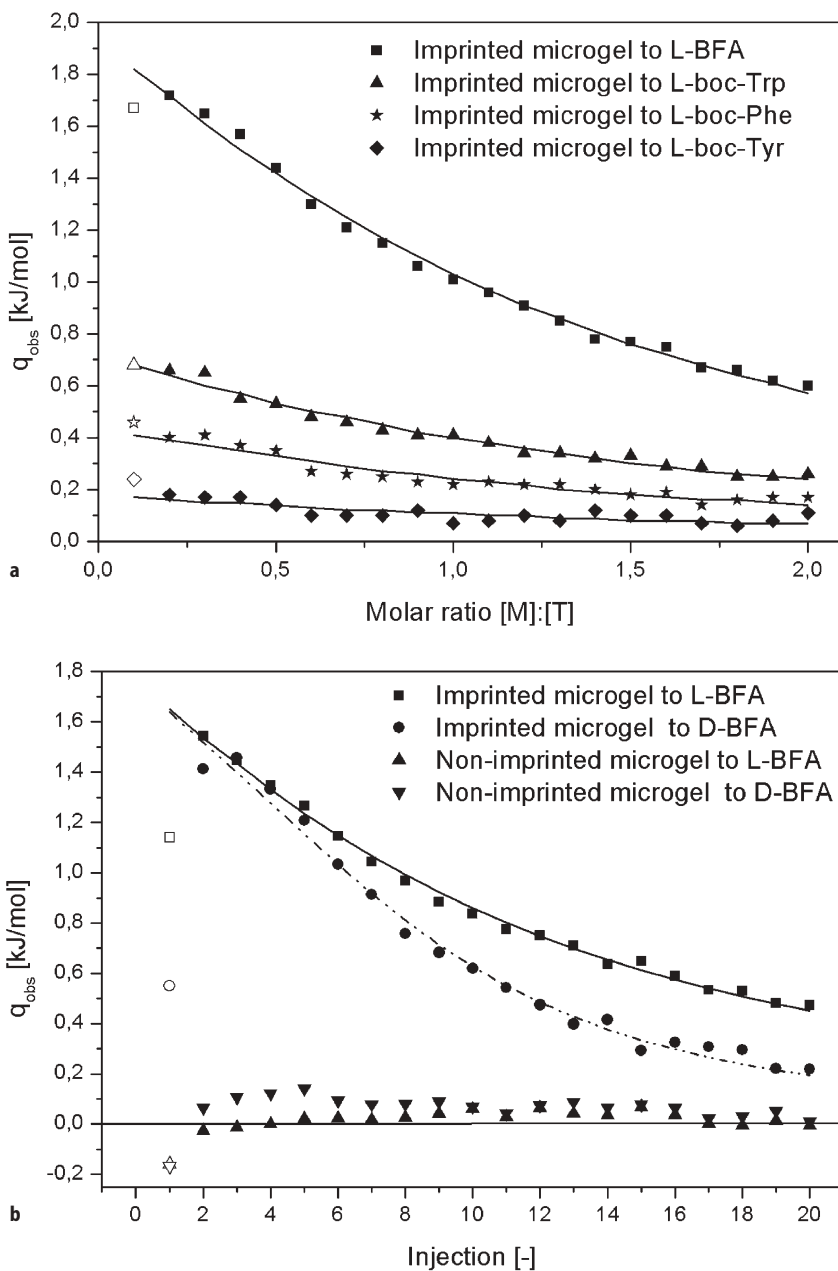


Fig. 11. a Isotherms of raw calorimetric data for the titration of L-BFA imprinted nanoMIPs with L-BFA (*squares*), L-boc-Trp (*triangles*), L-boc-Phe (*stars*) and L-boc-Tyr (*diamonds*) plotted vs the molar ratio of microgel to template [35]; b Isotherms of raw calorimetric data for the titration of L-BFA imprinted nanoMIPs. *Squares* show the binding isotherm of L-BFA, *circles* correspond to D-BFA. The *triangles* show the binding isotherms of the corresponding non-imprinted control polymer with L-BFA (*up-triangle*) and D-BFA (*down-triangle*) [35]

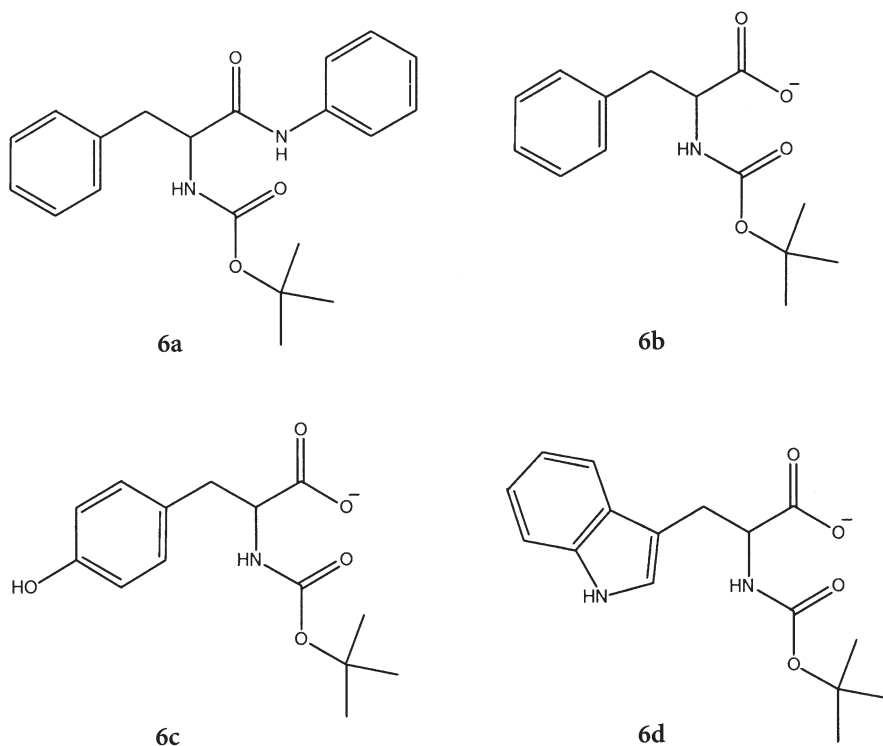


Fig. 12. Structure of the probe molecules 6a–d

example, the usefulness of colloidal MIPs as an affinity selector phase in a new composite membrane configuration was demonstrated [37]. Also, a new type of optical sensor surface was created by coating of an optical waveguide with a monoparticulate layer of MIP nanospheres [38]. Due to the processability of colloidal MIPs, they further enable various useful configurations of layers and coatings and thereby constitute an attractive alternative to affinity surfaces based on rather instable biomolecules.

3 Conclusions

Colloidal MIPs enable for the future use of fully synthetic affinity receptors in possibly a vast range of applications. The attractive concept of generating biomimetic binding sites in chemically and structurally robust polymer materials was to date possibly but limited by the traditional preparation methods of MIPs. Bulk polymerization of the initial reaction mixture containing monomer, crosslinker, and template, followed by crushing of the formed polymer monolith networks and sieving to find the portion of useful sized polymer particles is not the way of choice for the production of technically widely applicable material.

Although this procedure was suitable for the general development of the MIP technology to date, the obtained particles were intrinsically irregularly shaped and of limited use. Forming monoliths into a desired shape is one way to achieve MIP materials for special applications. In contrast to these materials, the formation of MIPs as colloids opens up a whole new range of applications of molecular imprinting science for generating stable synthetic binding site material for use in (bio)technology.

Colloidal MIPs were recently prepared in homogeneous solutions and in emulsions. A general difference between the approaches is that the first process, *precipitation polymerization*, demands the less complex synthetic conditions to start with but often is difficult to control. If, however, for a given copolymer-template system there exists a regime for the interaction of monomers and templates before polymerization in solution and the formation of an insoluble and imprinted polymer, MIP microgels are accessible by this route. The synthesis at high dilutions and the possible occurrence of coagulation has to be accepted with this approach. The advantages might be that soluble microgels can be prepared by this route.

In contrast, *emulsion polymerization* and *miniemulsion polymerization* use a two-phase system where the corresponding interface is stabilized by an emulsifier. Thereby, the already complex reaction mixture for the preparation of MIPs becomes even more complex. What is gained by this method however is control over the interface during the MIP synthesis, thus enabling the fine-tuning of this interface during the process. It is at this interface where the surface of the formed MIP is constructed and functionalized for its specific application. This interface and the minimization of the interfacial energy ensures a uniform spherical morphology of the microgels. Also, the widespread use of emulsion polymerization as the process of choice for the generation of polymers for production scale has the further advantages of a two-phase approach, e.g., the amount of reaction heat generated during binding of template molecules is transported easily through the emulsifying phase which is often water. Hence, the temperature during the polymerization reaction is thereby easily controlled. In the case of molecular imprinting, this may lead to more control over the polymerization reaction in general and in particular in more uniform binding sites formed during the reaction.

Emulsion polymerization was successfully employed for the preparation of nano-scale MIPs by synthesizing core-shell latexes with an imprinted shell. The use of a template with surfactant properties led to enhanced surface imprinting. Magnetic cores were synthesized to render MIPs which could be manipulated by magnetic fields in suspension, thereby facilitating the separation of the colloidal solid phase from the suspending solution.

By employing *miniemulsion polymerization*, molecularly imprinted nanospheres were obtained in a one-stage process. The colloidal MIPs showed excellent recognition properties in suspension and allowed for the first time the proof of the thermodynamic origin of the MIP recognition process using Isothermal Titration Microcalorimetry. The use of colloidal MIPs for membrane and sensor applications looks very promising and takes advantage of the controlled shape of this new class of MIP material. Further exploitation of this approach can lead

to miniaturized parallel assays based on purely synthetic chip surfaces with affinities comparable to those of biomolecules but with a substantially enhanced stability.

All colloidal MIPs present a highly dispersed solid phase with specific binding sites. One unique feature of nanoMIPs in general is the efficient extraction of the template molecules after polymerization and thus a potentially large cost saving as the template is usually the most expensive compound involved in an imprinting process. Most important is that new applications can be envisaged with colloidal MIPs, e.g., they can be used for the highly specific removal of toxic compounds from complex mixtures, preconcentration of analytes for a followed analysis, pseudo-stationary phase in capillary electrochromatography that enables a substantially accelerated separation of specific analytes from a mixture [39]. If catalytically active nanospheres are prepared, they can be used in suspension to provide a very high number of easily accessible catalytic sites at their surface, thus acting as artificial enzymes.

An important advantage of colloidal MIPs might be the fact that they can be processed to surface coatings or membranes and become an attractive alternative to protein-based affinity systems. MIPs as artificial receptors are substantially more stable than typical proteins and therefore a substantial gain in the shelf-life of affinity systems can be envisaged by replacing the biological affinity molecules by nanoMIPs. The recent developments in the generation of biomimetic receptors by colloidal MIPs show just the beginning of exploitation of this new class of material. The interaction of chemical nanotechnology with the life sciences is currently creating an extremely dynamic field of new technology in which colloidal MIPs will play a prominent role.

References

1. Wulff G (1995) *Angew Chem* 107:1958
2. Andersson LI (2000) *J Chromatogr B* 739:163
3. Asanuma H, Hishiya T, Komiyama M (2000) *Adv Mater* 12:1019
4. Sellergren B (2000) *Angew Chem* 112:1071
5. Whitcombe MJ, Vulfson EN (2001) *Adv Mater* 13:467
6. Sellergren B (2001) *Molecularly imprinted polymers*. Elsevier, Amsterdam
7. Kempe M (1996) *Anal Chem* 68:1948
8. Sellergren B, Lepistoe M, Mosbach K (1988) *J Am Chem Soc* 110:5853
9. Wulff G, Schauhoff S (1991) *J Org Chem* 56:395
10. Sellergren B, Hall AJ (2001) In: Sellergren B (ed) *Molecularly imprinted polymers*. Elsevier, Amsterdam, pp 21–57
11. Kempe M, Mosbach K (1995) *J Chromatogr A* 691:317
12. Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S (2001) *Anal Chim Acta* 435:43
13. Vallano PT, Remcho VT (2000) *J Chromatogr A* 887:125
14. Andersson LI, Paprica A, Arvidsson T (1997) *Chromatographia* 46:57
15. Berggren C, Bayouth S, Sherrington D, Ensing K (2000) *J Chromatogr A* 889:105
16. Chen YB, Kele M, Sajonz P, Sellergren B, Guiochon G (1999) *Anal Chem* 71:928
17. Brueggemann O, Haupt K, Ye L, Yilmaz E, Mosbach K (2000) *J Chromatogr A* 889:15
18. Hosoya K, Iwakoshi Y, Yoshizako K, Kimata K, Tanaka N (1999) *J High Resolution Chromatogr* 22:256
19. Mayes AG, Mosbach K (1996) *Anal Chem* 68:3769

20. Heegaard NHH, Nilsson S, Guzman NA (1998) *J Chromatogr B* 715:29
21. Matsui J, Miyoshi Y, Matsui R, Takeuchi T (1995) *Anal Sci* 11:1017
22. Mathew-Krotz J, Shea KJ (1996) *J Am Chem Soc* 118:8154
23. Piletsky SA, Panasyuk TL, Piletskaya EV, Nicholls IA, Ulbricht M (1999) *J Membr Sci* 157:263
24. Ye L, Weiss R, Mosbach K (2000) *Macromolecules* 33:8239
25. Biffis A, Graham NB, Siedlaczek G, Stalberg S, Wulff G (2001) *Macromol Chem Phys* 202:163
26. Pérez N, Whitcombe MJ, Vulfson EN (2000) *J Appl Polym Sci* 77:1851
27. Whitcombe MJ, Rodriguez ME, Villar P, Vulfson EN (1995) *J Am Chem Soc* 117:7105
28. Pérez N, Whitcombe MJ, Vulfson EN (2001) *Macromolecules* 34:830
29. Carter SR, Rimmer S (2002) *Adv Mater* 14:667
30. Vaihinger D, Landfester K, Kräuter I, Brunner H, Tovar GEM (2002) *Macromol Chem Phys* 203:1965
31. Ugelstad J, El Aasser MS, Vanderhoff JW (1973) *J Polym Sci Polym Lett Ed* 11:503
32. Landfester K, Willert M, Antonietti M (2000) *Macromolecules* 33:2370
33. Landfester K, Bechthold N, Förster S, Antonietti M (1999) *Macromol Rapid Commun* 20:81
34. Landfester K, Bechthold N, Tiarks F, Antonietti M (1999) *Macromolecules* 32:5222
35. Weber A, Dettling M, Brunner H, Tovar G (2002) *Macromol Rapid Commun* 23(14):824
36. O'Shannessy DJ, Ekberg B, Mosbach K (1989) *Anal Biochem* 177:144
37. Lehmann M, Brunner H, Tovar GEM (2002) *Desalination* 149:315
38. Tovar GEM, Dettling M, Sezgin S, Lehmann M, Gruber C, Weber A, Brunner H (2002) *Second International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers*, La Grande Motte, France
39. Schweitz L, Spegel P, Nilsson S (2000) *Analyst* 125:1899

Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle technology and matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry

Thomas Flad^{a,*}, Thomas Schiestel^b, Herwig Brunner^b, Jonathan Tolson^a, Qin Ouyang^a,
Graham Pawelec^a, Gerhard A. Mueller^c, Claudia A. Mueller^a,
Guenter E.M. Tovar^b, Hermann Beck^c

^aSection for Transplantation Immunology and Immunoematology, University of Tuebingen, Germany

^bFraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology, Stuttgart, Germany

^cDepartment for Rheumatology and Nephrology, University of Goettingen, Germany

Received 6 March 2003; received in revised form 13 June 2003; accepted 12 September 2003

Abstract

Human leukocyte antigen (HLA)-bound peptides are central for recognition of infected/transformed cells by T cells, and have formed the basis for many immunotherapy strategies. Epitopes from a given protein sequence (e.g. from viral proteins or oncoproteins) can be predicted by algorithms, as individual HLA receptors bind peptides through defined binding motifs. Peptides with the highest predicted binding score are then normally tested for their binding ability in binding assays. However, with the assays already established, only one peptide can be tested for binding per assay. This is certainly not a reflection of the *in vivo* situation, where several peptides generated via the major histocompatibility complex (MHC)-class I processing pathway compete for HLA-receptor binding. Here, we describe the development of a method that can mimic the competition between multiple peptides for binding to a single HLA receptor molecule. We used silica nanoparticles with immobilised HLA-A2 complexes to screen HLA-A2 binder-peptides out of a known peptide mixture. The washed beads were analysed for selectively bound peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) mass spectrometry. The advantage of the system is that the bound peptides can be unambiguously identified without any prior modification (e.g. radioactive or fluorescence labelling), even from complex peptide mixtures.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HLA; MALDI; Mass spectrometry; Nanoparticle; T cell epitope; Binding assay

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; MHC, major histocompatibility complex; PBS, phosphate buffered saline; RP-HPLC, reversed phase high performance liquid chromatography; HPSEC, high performance size exclusion chromatography; TFA, trifluoroacetic acid; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionisation; TOF, time of flight; Re, reflectron; Qq, double quadrupole; Da, dalton; *m/z*, mass-to-charge ratio; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SAV, streptavidin; β_2 -m, beta2-microglobulin.

* Corresponding author. ZMF, University of Tuebingen, Waldhoernlestr. 22 72072, Tuebingen, Germany. Tel.: +49-7071/29-80621; fax: +49-7071/29-5567.

E-mail address: thomas.flad@uni-tuebingen.de (T. Flad).

1. Introduction

Major histocompatibility complex (MHC) molecules are the cornerstone by which the host immune system can recognise cells as being self, foreign, infected or even neoplastically transformed. MHC molecules can be subdivided into two major groups, class I and class II, which span the dominant class I human leukocyte antigen (HLA) subtypes A, B and C, and the major class II HLA subtypes DR, DP and DQ. MHC class I molecules are constitutively expressed on the surface of almost all cell types within the body, and function by presenting a peptide of 8–10 amino acids in length to T cells. These peptides are normally derived from cytoplasmic proteins and are recognised as being “self” by the immune system, but can stimulate an immune response when a “non-self” peptide is encountered on the surface of a cell. Peptides bind to the class I molecules through affinity competition within the endoplasmic reticulum before presentation on the cell surface, and the affinity of a single peptide is directly related to its amino acid sequence and the existence of binding motifs at defined positions within the sequence.

The knowledge of the sequence of such “non-self” peptides would permit the manipulation of the immune system against diseased cells, for example by use of peptide vaccines. However, direct analyses are complicated by factors such as under-representation of relevant epitopes and the highly polymorphic nature of the MHC molecule—an individual can possess up to six different polymorphisms of class I alone, each with differing peptide-binding moieties. Currently, the prediction of potential T cell epitopes makes use of computer algorithms which allocate a binding score to a peptide in association with differing HLA phenotypes; two common programs being SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) and HLA_BIND (Parker et al., 1994). Predicted binder peptides are then tested *in vitro* for binding capacities before further functional studies. Such methods are limited in their efficacy due to their single-dimension approach as far as the number of peptides that can be screened simultaneously is concerned. Here, we describe the development of a method to screen simultaneously the binding capacity of multiple candidate peptide epitopes to HLA-A*0201 by a combination of nanobead

technology and matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) mass spectrometry.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

Peptides were synthesized by the fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) solid phase strategy on a MilliGen 9050 continuous flow synthesizer (Millipore). After reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) purification the peptides were lyophilized and resolved in phosphate buffered saline (PBS) to a concentration of 1 mg/ml.

2.2. Production of soluble biotinylated HLA-A2 monomers

Soluble HLA-A*0201/peptide monomers were produced as described previously (Altman et al., 1996). Briefly, soluble HLA-A*0201 recombinant heavy chains (residues 1–276) and β_2 -microglobulin (β_2 -m) were expressed separately in *Escherichia coli* cells transformed with the relevant expression plasmids. The 3' end of the extracellular domains of the HLA-A*0201 heavy chain sequence was modified with a BirA biotinylation sequence. The HLA-A*0201 and β_2 -m transformed *E. coli* were grown to mid-log phase and induced with 0.5 M isopropyl- β -galactosidase. Inclusion bodies were purified and solubilized in 8 M urea, pH 8.0. HLA-A*0201 heavy chain and β_2 -m were refolded by dilution (100 mM Tris, 2 mM EDTA, 400 mM L-arginine, 5 mM reduced form glutathione, 0.5 mM oxidized form glutathione) with 10 μ M of the peptide LLDFVRFMGV (EBV EBNA-6 pos. 284–293) and incubated for 48 h at 10 °C with gentle stirring. The 45-kDa refolded complexes were concentrated using ultrafiltration with a 10 kDa cut-off membrane (Millipore) and purified by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) using a Superdex G75 HiLoad 26/60 prep grade column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8 as running buffer. After gel filtration the purified monomers were biotinylated with biotin ligase (BirA; Avidity, Denver, USA) and

again purified by HPSEC. The complex was subsequently adjusted to a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ by ultrafiltration as described above.

2.3. Streptavidin modified particles (SAV-nanobeads): synthesis and characterization

The following chemicals were used:

Tetraethoxysilane (TEOS) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) were purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany). Ammonia (p.a., 25 wt.%), ethanol (HPLC grade), tetrahydrofuran, succinic anhydride, morpholinoethane-sulfonic acid (MES) and *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) were from SAF (Taufkirchen, Germany). Streptavidin (SAV) was from Roche (Tutzing, Germany). The buffers used were 100 mM acetate buffer, pH 4.7 (ACB47) and 100 mM MES, pH 5.0 (MES50). Water was of Milli-Q grade ($< 18.2 \text{ m}\Omega/\text{cm}$). All reactions were performed at room temperature.

Silica particles were generated as described previously (Stöber et al., 1968). Briefly, a mixture of 13.7-ml ammonia, 20-ml water and 5-g TEOS in 400-ml ethanol were stirred for 24 h. They were collected by centrifugation ($16000 \times g$) and resuspended in water by vortexing and sonification. Subsequently, the particles were dialysed against water (MW cut-off 10 kDa) and the water was exchanged until the conductivity was below $2 \mu\text{S cm}^{-1}$. Finally the particles were filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ filter. Spherical silica particles with a mean hydrodynamic particle diameter of 100 nm were obtained as determined by dynamic light scattering measurements with a Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany).

One-hundred-milligram silica particles were suspended in 15-ml water. Ammonia (1.5 ml) and APS (20 mg) were added and the mixture was stirred for 1 h. The resulting particles with amino-functional groups at the surface were cleaned as described above except that ACB47 was used as the washing medium. The zeta potential increases from -15 to $+47 \text{ mV}$ by the surface modification as determined with a Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments).

Carboxylic groups were coupled to the particle surface according to the following method. Amino-silica nanoparticles, 100 mg, were suspended in 5-ml THF and 10-mg succinic anhydride was added under sonification. The suspension was shaken for 16 h and

the resulting particles with carboxy-functional surface groups were cleaned as described above. Under such conditions, the zeta potential in ACB47 decreases from $+47$ to -26 mV while a hydrodynamic diameter of 121 nm was measured.

Five-hundred micrograms of the carboxy modified-particles was mixed with $15\text{-}\mu\text{g}$ streptavidin in 1-ml MES50. Twenty microliters of a 10 mM EDC solution in MES50 was added and the mixture was shaken for 3 h at RT. The particles were washed twice with MES50 and were resuspended in 1-ml MES50. Streptavidin was quantified by quenching the fluorescence of biotin-4-fluorescein as described previously (Kada et al., 1999). We could immobilize 30 μg streptavidin per milligram of nanoparticles and around 57% of the theoretic biotin binding sites were accessible at the particle surface. This means under the assumptions $d_{\text{silica}} = 100 \text{ nm}$, $D_{\text{silica}} = 2 \text{ g ml}^{-1}$, $M_{\text{streptavidin}} = 52 \text{ kDa}$, nearly 360 streptavidin tetramer molecules were bound to each particle and 800 biotin binding sites were accessible at the surface. The streptavidin-modified particles were adjusted to a concentration of 0.5 mg ml^{-1} in PBS corresponding to a biotin binding capacity of 650 pmol ml^{-1} .

2.4. HLA-A2 peptide selection assay

All washing steps of the beads were performed by centrifugation at $15000 \times g$ for 10 min, in a temperature-controlled centrifuge at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in 1.5-ml cups and resuspension of the beads using a micropipette. SAV-nanobeads ($55 \mu\text{g}$) and the soluble HLA-A2 complex containing the peptide LLDFVRFMGV (EBV EBNA-6 pos. 284–293; $3.4 \mu\text{g}$) were suspended in $20\text{-}\mu\text{l}$ PBS. The mixture was incubated for 2 h at room temperature in a horizontal shaker to prevent sedimentation (Fig. 1a). After centrifugation for 10 min at $20 \text{ }^\circ\text{C}$, the supernatant was discarded and the beads were washed with $50\text{-}\mu\text{l}$ water. For release of $\beta_2\text{-m}$ and the presented peptide LLDFVRFMGV, beads were incubated with $150\text{-}\mu\text{l}$ stripping buffer (50 mM sodium-citrate pH 3.0) for 90 s (Fig. 1b) and after centrifugation were washed with $150\text{-}\mu\text{l}$ water (Fig. 1c). The beads were then resuspended with $30\text{-}\mu\text{l}$ PBS containing $1.2\text{-}\mu\text{g}$ $\beta_2\text{-m}$ (Sigma, Munich, Germany) and a peptide-mixture consisting of five peptides with the sequences ILME-HIHKL, DQKDHAVE, ALSDHHIYL, VITLVYEK, SNEEPPPPY, $0.072 \mu\text{g}$ of each (Fig. 1d). After incu-

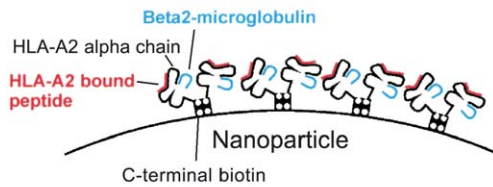
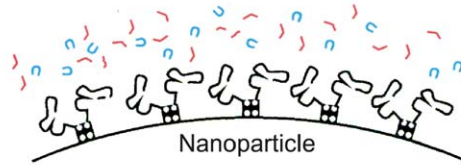
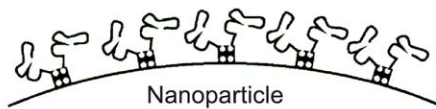
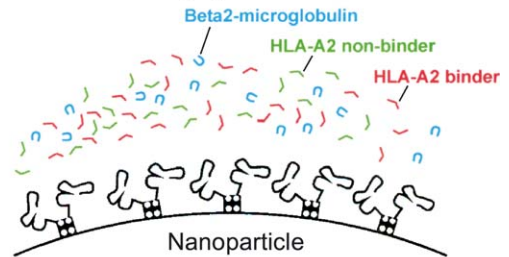
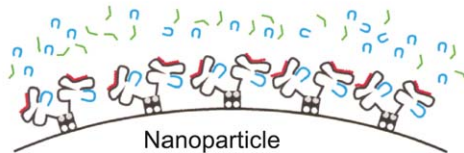
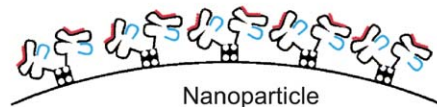
a. Binding of HLA-A2 complexes**b. Acid stripping****c. Removal of β_2 -m and A2-peptide from step a****d. "HLA-A2 peptide selection"****e. Removal of A2-nonbinders and excess β_2 -m****f. MALDI mass spectrometry**

Fig. 1. Scheme for the HLA-A2 peptide selection assay. (a) HLA-A2 complexes containing the peptide LLDFVRFMGV (EBV EBNA-6 pos. 284–293) are immobilised on streptavidin-nanoparticles via the site specific C-terminal biotin. (b) The bound peptide and β_2 -m are removed by short acid treatment at pH 3.0. (c) Removal of the stripped peptide and β_2 -m by washing. (d) "HLA-A2 peptide selection" step: The stripped particles are incubated with a mixture of different HLA-A2 binder and non-binder peptides (in this study the two binder peptides, ILMEHIHKL and ALSDHIIYL, and the three non-binder peptides, DQKDHAVE, VITLVYEK and SNEEPPPPY) and an excess amount of β_2 -m. A competition between the peptides for the HLA-A2 binding groove occurs, i.e. the best binders will bind in higher amounts on the bead surface. (e) Removal of unbound peptides and excess β_2 -m by washing the beads. (f) Matrix is added to the beads and the suspension is transferred to the MALDI-target. Measuring in the MALDI-ReTOF mode gives an overview on the peptides bound to the HLA-receptors. Using MALDI-PSD the peptides can be fragmented and sequenced.

bation for 4 h at 37 °C, beads were pelleted and, after removal of the supernatant, washed with 50- μ l PBS followed by 50- μ l water (Fig. 1e). After a final centrifugation, the beads were resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) and transferred to a MALDI target for analysis using a Voyager DE-STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the positive ion reflectron mode (Fig. 1f). Solutions containing proteins and peptides were mixed on target with equal volume of matrix using a 1:20 dilution of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid or sinapinic acid in 30% acetonitrile/0.3% TFA (v/v). All MALDI spectra were externally calibrated using a

standard peptide mixture containing des-Arg1-Bradykinin ($[M+H]^+$ monoisotopic 904.47 u), Angiotensin I ($[M+H]^+$ monoisotopic 1296.69 u) and Glu1-Fibrinopeptide B ($[M+H]^+$ monoisotopic 1570.68 u).

3. Results

3.1. All components of the biotinylated HLA-A2 complexes can be measured by MALDI-TOF

Whole complexes immobilised onto the SAV particles via biotin could be visualised by MALDI mass

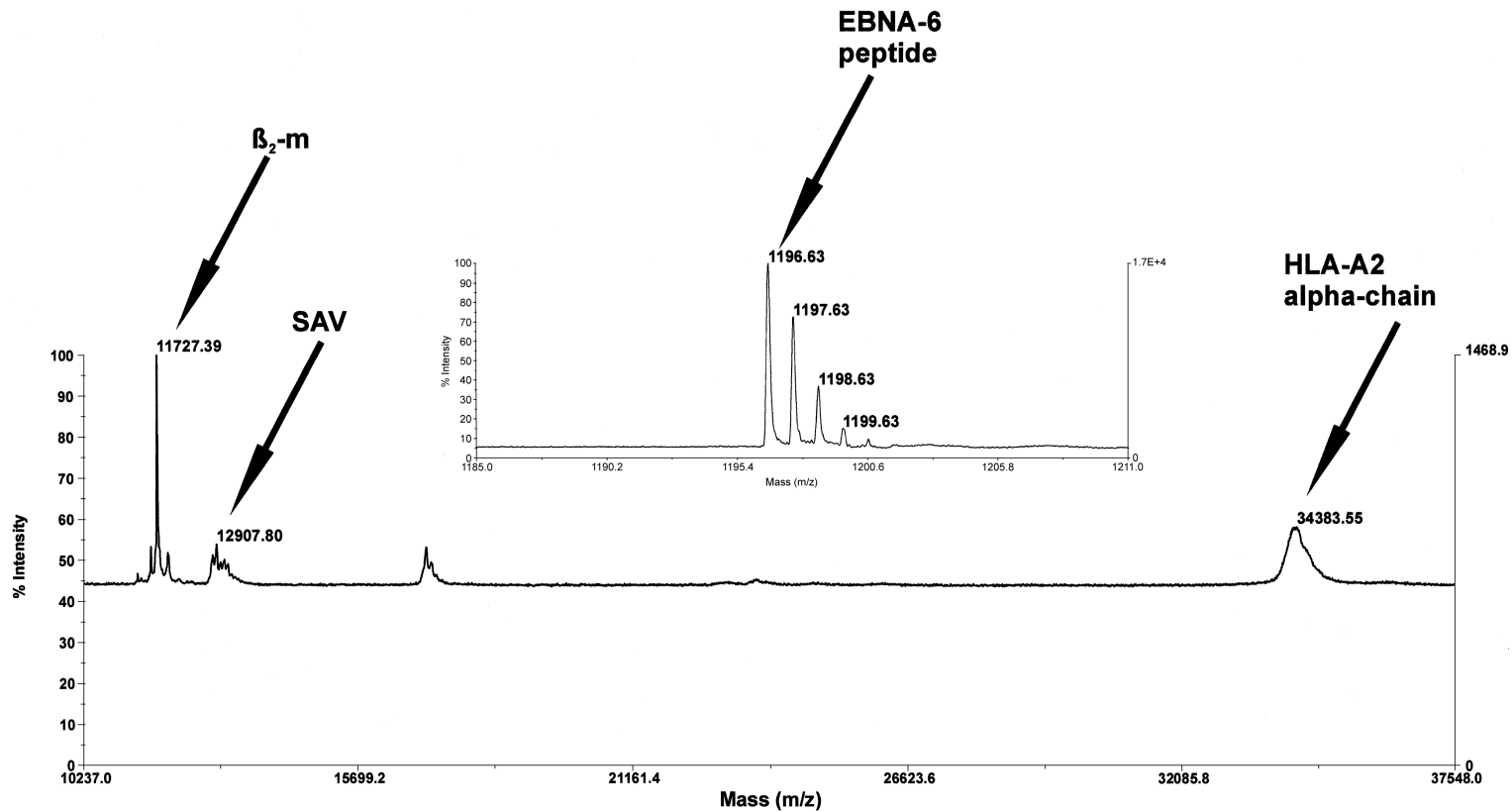


Fig. 2. Visualisation of all molecular components of the HLA-A2 EBNA-6 complex immobilised on SAV-nanoparticles. The insert shows the MALDI spectrum of the EBNA-6 peptide $[M+H]^+$ with the sequence LLDFVRFMGV (theoretical monoisotopic mass $[M+H]^+$ 1196.6502u). The peak at m/z 11727 is β_2 -m, the peaks at ~ 12900 are from SAV in the monomer form, and the peak at 34383 is the biotinylated alpha chain. The peak observed at 17193 is the $[M+2H]^{2+}$ of the biotinylated alpha chain.

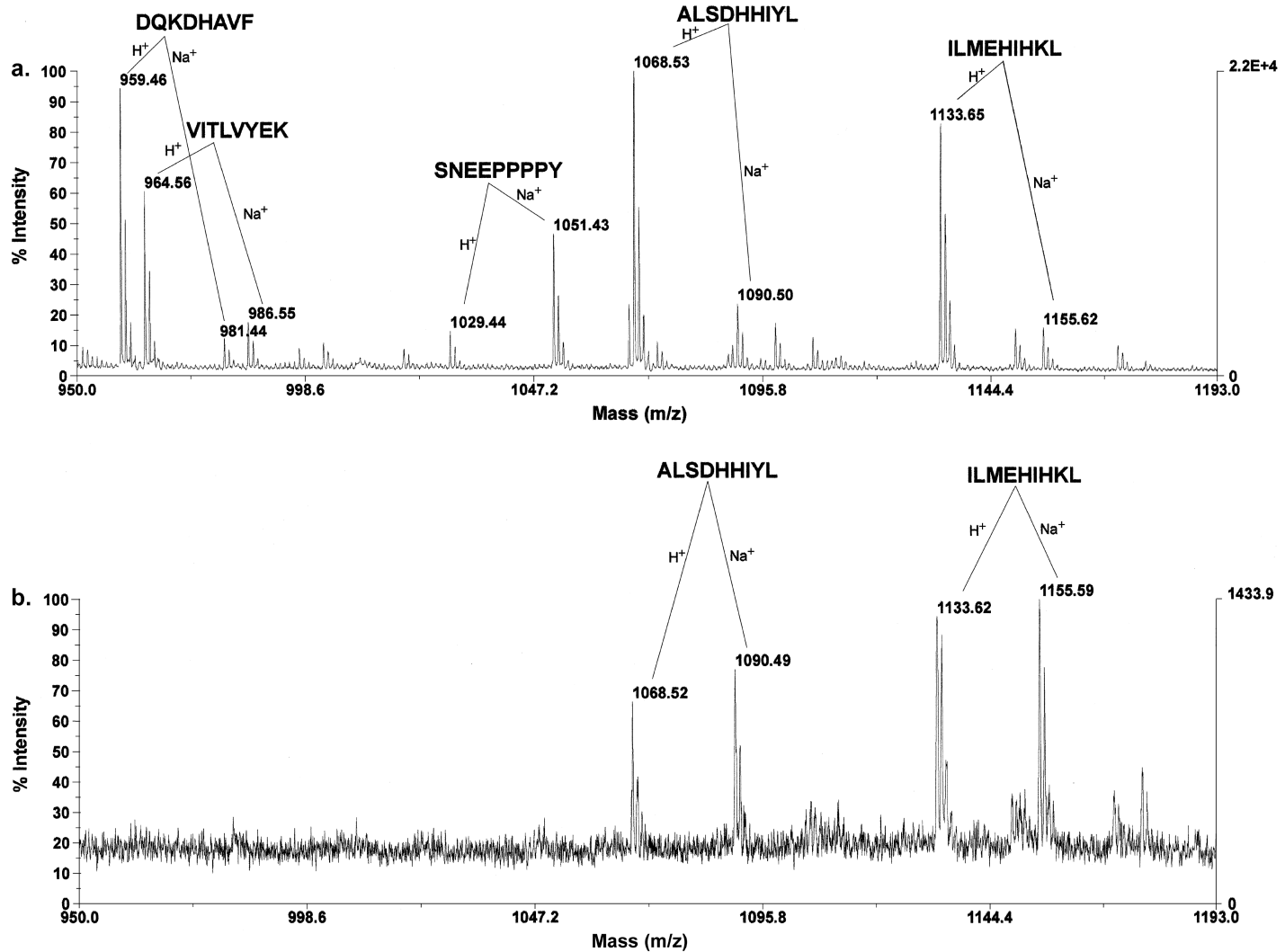


Fig. 3. MALDI-ReTOF spectra of a peptide mixture before and after “selection assay”. (a) Spectrum of a mixture of three HLA-A2 non-binder peptides (DQKDHAVF, VITLVYEK, SNEEPPPY) and two binder peptides [ALSDHHIYL (binding score SYFPEITHI 23) and ILMEHIHKL (binding score SYFPEITHI 32)], ~ 70 pmol of each. The protonated ($[M+H]^+$) and sodiated ($[M+Na]^+$) forms of each peptide are indicated. (b) Spectrum of the HLA-A2 nanoparticles after “selection assay”. Only the two predicted HLA-A2 binder peptides were selected and can be observed in the MALDI spectrum, whereas none of the non-binders were observed.

spectrometry, with the respective mass signals achieved for the biotinylated HLA-A2 alpha chain (34383 Da), β_2 -m (11727 Da) and the streptavidin monomer (12907 Da) as well as the bound peptide LLDFVRFMGV (1196.63 Da) (Fig. 2). Thus we could control the correct properties of the HLA-A2 complex as well as the efficacy of the immobilising process of the biotinylated complex on the SAV beads.

3.2. HLA-A2-complexed SAV nanoparticles selectively bind only HLA-A2 predicted peptides from a peptide mixture

Fig. 3a shows the MALDI spectra of a peptide mixture of two HLA-A2 binder peptides and three non-binder peptides with ~ 70 pmol of each peptide. The predicted binding of the peptides was determined with the SYFPEITHI program, with a score of 32 (very strong binder) for the peptide ILMEHIHKL, 23 (strong binder) for the peptide ALSDHIIYL, and 0 for the three non-binders. The differences in the signal intensities of each peptide in the mixture are due to different ionisation capabilities. We could further confirm the identity of the observed peaks by MALDI-PSD sequencing. After the selection of the peptides by the stripped HLA-receptors, only the signals for the binder peptides remained (Fig. 3b). Therefore, a clear binding specificity of the beads was obtained, while the absence of signal from any non-binder confirmed that no nonspecific interactions were occurring. The spectra obtained displayed the monoisotopic mass of each peptide in the protonated form ($[M+H]^+$) as well as the monoisotope in the sodiated form ($[M+Na]^+$).

4. Discussion

The study of receptor–ligand interaction of MHC complexes has been addressed with several different modes of assay over the years and are based on either cellular or biochemical approaches. The most common cellular assay measures the up-regulation of MHC molecules on the cell surface of processing-defective T2 cells by flow cytometry after incubation of the cells with a single binder peptide added to the culture medium (Baas et al., 1992). However, standardisation of such a cellular assay is difficult due to

the complexity of biological systems. For the accurate and sensitive measurement of binding constants of individual peptides to certain MHC molecules, biochemical assays have been established, based either on the competition of radiolabeled peptides (Buus et al., 1986) or conformational changes of unfolded MHC-receptors after peptide binding, which can be determined by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sylvester-Hvid et al., 2002). Real-time interactions between MHC-receptor molecules and single peptide ligands for the elucidation of binding kinetics and thermodynamics of MHC complexes have also been shown by surface plasmon resonance (Khilko et al., 1993) and fluorescence anisotropy (Binz et al., 2003).

However, the fundamental way in which the assay reported here differs from established methods is that, for the first time, multiple peptides can be screened in a single assay for their binding capacity to HLA receptors through competition, whereas all previous methods have concentrated on a single peptide per assay. Thus, the assay is a closer reflection to the *in vivo* processing of peptide binders to HLA receptors.

The main aim of the assay we have developed was to screen a peptide mixture for binders to a given HLA-receptor. The binding specificity of HLA-class I receptors is strongly dependent upon the proper folding of the alpha chain, the domain structure being supported by disulfide bonds and thus forming the peptide binding groove. The correctly folded, three-dimensional structure can be obtained by mixing unfolded alpha chain, β_2 -m and binder peptide under oxidative conditions. In our assay, we employed a procedure where ready-folded HLA-A2 complexes containing a known HLA-A2 binder peptide (EBNA-4) were immobilised and stripped of their peptide. Refolding of the complex during the competition assay would require a more sophisticated protocol, although this is possible in principle. In the first step of the assay, the biotinylated HLA-A2 complexes are immobilised on SAV nanoparticles and can be washed simply by a centrifugation step. Evaluating the molecular masses of each component of the immobilised complex by MALDI mass spectrometry serves as a quality control of the complex, as only correctly folded HLA molecules will retain signals for β_2 -m and peptide after washing. After immobilisation of the HLA-A2 complexes on the SAV beads, we

performed a mild acid stripping at pH 3.0 to remove the bound peptide in order to obtain empty receptor molecules that maintain a refolded conformation. Stripping at a lower pH value (pH 2.0) would cause loss of peptide binding due to the denaturation of the alpha chain, whereas the use of a higher pH value would not achieve the removal of sufficient EBNA-4 peptide. Therefore, by stripping at pH 3.0, receptors can be emptied of peptide while maintaining their three-dimensional structural integrity and the binding specificity of the alpha chain. The “selection assay” itself was performed with a molecular ratio of approximately 1 (SAV):1 (HLA-A2 alpha chain):1.4 (β_2 -m):1 (peptide). The detection limit of the assay was approximately 70 pmol for binder peptides, though neither the stoichiometry nor sensitivity of the assay has been optimised yet.

The data reported here demonstrate clearly the proof of principle that nanoparticle-immobilised, acid-stripped HLA receptors can still retain peptide-binding specificity which can be utilised for the selection of binders and non-binders from a peptide mixture. To the best of our knowledge, this is the first time that mass spectrometry has been used as a readout system for the binding reaction between a ligand and its HLA receptor. Though quantitation of bound peptides by MALDI mass spectrometry is difficult due to the differing ionisation properties of individual peptides, semi-quantitation is possible by performing standard curves for single peptides. However, accurate quantitation of single peptides, which is achievable with ELISA, was not the aim of this assay. In addition, the reported technique is not only applicable to MALDI-Re-TOF machines but also to MALDI mass spectrometers with a higher potential to sequence peptides, e.g. MALDI-TOF-TOF or MALDI-QqTOF machines. Therefore, very complex peptide mixtures such as protein digests can be analysed by this technology and such work is theoretically only limited by peptides having exactly the same mass. After competition for binding to the nanoparticle-immobilised HLA receptors, the bound ligands can be unambiguously identified by mass spectrometry sequencing.

Here, we have demonstrated the feasibility of this technique using only a limited number of synthetic peptide ligands. Once optimised in the context of stoichiometry and sensitivity, the method will offer a

new tool for the *in vitro* study of MHC class I processing. Such an *in vitro* processing model could consist of components such as: (a) a model antigen (viral protein, oncoprotein); (b) proteasomal digestion components plus ERAAP, the recently described amino peptidase that trims peptides to their fully processed binding length (Serwold et al., 2002); (c) nanoparticle-immobilised HLA receptors (β_2 -m added), which serve as the receptor for the competition peptide binding, and can be analysed at any time point by MALDI mass spectrometry. We envisage that such an *in vitro*, self-contained MHC class I processing compartment would empower the researcher's ability to determine novel T cell epitopes from a given antigen. Moreover, this technology, demonstrated here for the HLA-receptor system, could be extended using similar approaches for the analysis of a variety of biochemical receptor–ligand systems.

Acknowledgements

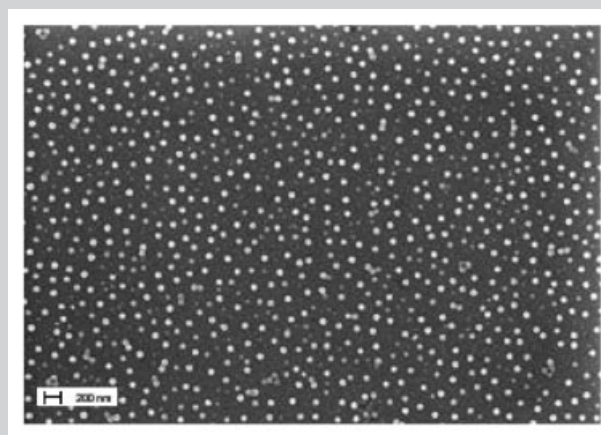
We thank Stefan Stevanovic for critical discussion, Hubert Kalbacher for providing synthetic peptides and Juergen Schmucker for technical advice. This work was supported by BMBF grant FKZ:0312834C.

References

- Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M., 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94–96.
- Baas, E.J., van Santen, H.M., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., Peters, P.J., Ploegh, H.L., 1992. Peptide-induced stabilization and intracellular localization of empty HLA class I complexes. *J. Exp. Med.* 176, 147–156.
- Binz, A., Rodriguez, R.C., Biddison, W.E., Baker, B.M., 2003. Thermodynamic and kinetic analysis of a peptide-class I MHC interaction highlights the noncovalent nature and conformational dynamics of the class I heterotrimer. *Biochemistry* 42, 4954–4961.
- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Jenis, D.M., Grey, H.M., 1986. Isolation and characterization of antigen–Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 47, 1071–1077.
- Kada, G., Kaiser, K., Falk, H., Gruber, H.J., 1999. Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 44–48.
- Khilko, S.N., Corr, M., Boyd, L.F., Lees, A., Inman, J.K., Margulies,

- D.H., 1993. Direct detection of major histocompatibility complex class I binding to antigenic peptides using surface plasmon resonance. *J. Biol. Chem.* 268, 15425–15434.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan, J.E., 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152, 163–175.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., Stevanovic, S., 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213–219.
- Serwold, T., Gonzales, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N., 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480–483.
- Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., 1968. Controlled growth of monodisperse Silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62–69.
- Sylvester-Hvid, C., Kristensen, N., Blicher, T., Ferre, H., Lauemoller, S.L., Wolf, X.A., Lamberth, K., Nissen, M.H., Pedersen, S., Buus, S., 2002. Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide MHC class I interaction. *Tissue Antigens* 59, 251–258.

Full Paper: Two new polymerizable surfactants (surfmers), *p*-[11-(acrylamido)-undecanoyloxy]phenyldimethylsulfonium methylsulfate (AUPDS) and *p*-[11-(methacrylamido)undecanoyloxy]phenyldimethylsulfonium methylsulfate (MUPDS), were synthesized and used for the preparation of functional polymer nanoparticles. The surfmers were characterized ($cmc_{AUPDS} = 6.0 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $cmc_{MUPDS} = 3.2 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and employed in emulsion polymerization with methyl methacrylate as a comonomer. Depending on the surfmer-to-comonomer ratio, the resulting particles had a dynamic light scattering diameter between 109 nm and 167 nm. Scanning electron microscopy confirmed a very narrow size distribution. The particles showed a ζ -potential of 20 to 24 mV as measured by micro-electrophoresis, corresponding to the electrostatic stabilization by the positively charged sulfonium group of the surfmer. The reactivity of the particle bound active ester was determined by titration of the latex with a fluorescent probe and subsequent fluorescence analysis. 6-Aminofluoresceine was immobilized from 0.8 μmol to 9.6 μmol per 1 g particles depending on the AUPDS starting concentration in emulsion polymerization.



Scanning electron microscopy images of poly(MMA-co-AUPDS) particles (sample PA 6, 0.25 mol-% AUPDS) showing the narrow size distribution over a larger sample area.

Polymer Nanoparticles with Activated Ester Surface by Using Functional Surfmers

Marc Herold, Herwig Brunner, Günter E. M. Tovar*

Fraunhofer-Institute for Interfacial Engineering & Biotechnology and University of Stuttgart, Institute for Interfacial Engineering, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany

Fax: +49 (0) 711 970 4200; E-mail: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de

Keywords: emulsion polymerization; fluorescence; functionalization of polymers; latexes; polymerizable surfactants

Introduction

Polymer beads and latex particles have become important tools in modern biotechnology research.^[1–5] They are mainly used as solid phase carriers for handling proteins or peptides. Their high surface area allows for the creation of a high number of binding sites for immobilization of the protein of interest. At the same time, they can also be used in fluid handling systems, e.g. microdispensers; which allows for relatively easy use.

In order to bioconjugate with a protein, the particles must have a specific chemical function on their surface that is capable of binding with a functional group present on the surface of the protein molecule of interest. These functional groups must react chemically with each other under mild conditions to ensure that the protein's 3-dimensional structure and hence its biological activity are retained.

Several routes to produce polymer particles displaying a chemically reactive surface for bioconjugation are in use today. One way is to synthesize a latex by batch copolymerization of a principal monomer and another monomer bearing a functional side group. The surface-bound groups can then be modified in a further reaction to render a large variety of particles with various functionalities. Another way is to generate core-shell polymer particles with a functional shell.^[6–8] For example a shell containing methacrylic acid introduces a carboxyl surface function. This functional group can then be activated for bioconjugation by forming an activated ester, using 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) or other reagents.^[9] Activated esters are a common reactive group in bioconjugative systems.^[10–12] The activated ester can then react with nucleophilic groups on the protein under mild conditions.^[13]

Both strategies outlined above have certain disadvantages for preparing bioconjugating particles, such as the need for multiple reaction steps to obtain a surface-activated polymer particle or the introduction of functional groups that are limited to certain types of polymers having otherwise unfavorable binding characteristics. For example polystyrene, which is often used as a bioconjugation material, can promote non-specific adsorption of proteins to an high extent. Even if core-shell polymer latexes are prepared using a larger variety of monomers with various functional groups, this approach also has its serious limitations. Since surfactant molecules are required to stabilize the latex during polymerization, these surfactants stay physically adsorbed at the particle surface even after intense removal efforts. These surfactant molecules often can also give rise to non-specific adsorption of proteins observed in the polystyrene case.

Alternative routes to polymer particles for bioconjugation with fewer reaction steps and without the need to use particle stabilizing surfactants would be very attractive. One way to achieve this is to use polymerizable surfactants or surfmers, bearing specific chemical functional groups for bioconjugation. Even though there are currently publications^[14–16] that describe latex preparation by copolymerization of surfmer and comonomer, only very little experimental work to date has been published on the aim of bioconjugative latexes.

Nagai et al. opened a potentially attractive route by using surfmers bearing an activated ester function.^[13,17–19] They copolymerized dialkyl fumarates with *p*-(10-undecenyl-oxy)phenyldimethylsulfonium methylsulfate (UPDS) on the surface of polystyrene microbeads having a diameter of 4.2 μm . The resulting core-shell particles featured an activated ester group at the surface. Reaction of this group with 2-methoxyethylamine led to the formation of an amide functional surface.

The disadvantage of the UPDS strategy is the very low polymerization rate of the alkenyl group under the reported conditions, even when alternating copolymerization with dialkyl fumarates. Additionally, efforts in our own laboratory to transfer the experimental results of Nagai with UPDS to a nanoparticle system did not succeed.

In the present work, we tried to simplify the multi-step routes using surface activation or core-shell particle synthesis by developing the approach of Nagai et al. a step further. The aim was to prepare nanosized polymer particles with an optimized activated ester surface in a one-stage reaction using emulsion polymerization with multi-functional polymerizable surfactants. Two new potential surfmer molecules **4** and **5** (Figure 1), were thus synthesized. Each molecule combined the following functions: (a) introducing a polymerizable end group for copolymerization and hence covalent binding to particles; (b) stabilizing the colloidal system by electrostatic and steric effects; and (c) introducing an activated ester group as a reaction center for bioconjugation directly at the resulting nanoparticle surface.

The copolymerization behavior of **4** and **5** with methyl methacrylate (MMA) in emulsion polymerization was studied and the resulting particles and the reactivity of their activated ester surfaces were characterized by photon correlation spectroscopy, micro-electrophoresis, ¹H NMR spectroscopy, scanning electron microscopy, elemental analysis, and fluorescence spectrometry.

Experimental Part

Materials

Acetonitrile (99.5% Fluka) and methylene chloride (99.5% Merck) were dried over molecular sieve UOP A4 (Fluka); MMA, stabilized with hydroquinone (99% Fluka), was purified by washing with a 10% sodium hydroxide solution, drying over CaCl₂, followed by distillation; acrylic acid

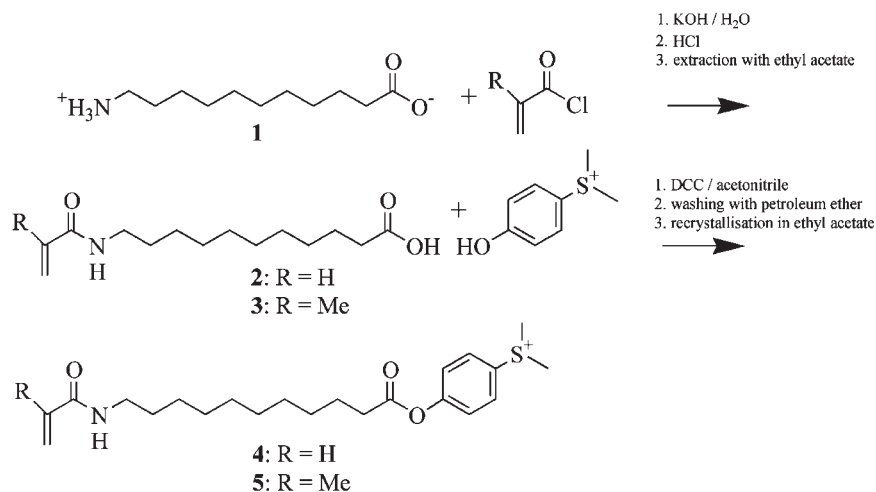


Figure 1. Synthesis and structure of AUPDS (**4**) and MUPDS (**5**).

chloride stabilized with thiodiphenylamine (97% Fluka), was purified by distillation; 2,2'-azobis-(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AIBA, Fluka), *p*-hydroxyphenyl-dimethylsulfonium methylsulfate (Sanceler DSP, Sanshin Chemical Industrial Co. Ltd.), dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Fluka), 6-aminofluoresceine (95% Fluka), and 11-aminoundecanoic acid (**1**; Acros Organics) were used without further purification. Ultrapure water with a resistance higher than 18,0 M Ω ·cm⁻¹ was used for the preparation of all colloidal dispersions. Polyelectrolyte solutions of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC 0,001 mol·L⁻¹) and the sodium salt of poly(ethylsulfonic acid) (PES 0,001 mol·L⁻¹) were purchased from Müttek (Herrsching) and used as received. Deuterated solvents trifluoroacetic acid-*d*₁ (TFA), dimethylsulfoxide-*d*₆ (DMSO) and acetone-*d*₆ were purchased from DEUTERO (Kastellaun, Germany).

Analytical Methods

¹H NMR spectra of the prepared surfmers were recorded with an Avance DPX 250 (250 MHz) NMR spectrometer (Bruker, Billerica, USA) by using dimethylsulfoxide-*d*₆ solutions of the compounds. To yield spectra of the poly(MMA-*co*-AUPDS), 2 mL of the prepared latexes were freeze-dried and the remaining polymer was dissolved in acetone-*d*₆/TFA-*d*₁ (5:1). Spectra of the solutions were obtained with the same equipment as stated above. The amount of bioactive ester groups was determined by integration of the signals at 7.5–8.1 ppm (4 H, activated ester phenyl group) and 3.6 ppm (3 H, -OCH₃). Calculation of the integral ratio was used to calculate the percentile fraction of surfmer amount in the polymer sample.

IR spectra of the prepared surfmers were recorded by a Perkin Elmer (Shelton, USA) FT-IR "Spectrum 1000" using KBr pellets.

The amount of sulfur in the dried latex particles was determined by a Vario EL elemental analyzer (ELEMENTAL, Hanau, Germany). 4–20 mg of solid were folded in tin foil and ashed at 1200 °C in an oxygen atmosphere.

The particle size (ζ average), \bar{d}_{DLS} in water was determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer HS 3000[®] (Malvern, Herrenberg, Germany). ζ -Potential measurements were carried out with redispersed particles (phosphate buffer, pH 7.0, $c = 0.005$ mol·L⁻¹) in a Malvern Zetasizer HS 3000[®].

Determination of the critical micelle concentration (*cmc*) according to the Wilhelmy plate method was performed with a K 12 tensiometer (Krüss, Hamburg, Germany) equipped with a Dosimat 765 (Metrohm, Herisau, Switzerland).

We performed an experiment in which a two-fold excess (calculation based on the theoretical surfmer concentration) of 6-aminofluoresceine in water ($c = 25$ μ mol·L⁻¹) was added to a 0.25 wt.-% suspension of poly(MMA-*co*-AUPDS) nanoparticles in a pH 7.5 buffer (potassium dihydrogenphosphate, $c = 0.01$ mol·L⁻¹). The particle suspension was shaken over night at room temperature and purified by centrifugation and redispersion of the sediment in phosphate buffer (pH 7.0, $c = 0.005$ mol·L⁻¹). The resulting fluorescent particles were diluted and analyzed in a "Spectra Fluor Plus" fluorescence reader (Tecan, Crailsheim, Germany) at 485 nm extinction and

535 nm emission wavelength. The amount of the surface-bound activated ester groups was calculated from the data.

A "LEO 1500" HREM (Leo, Cambridge, UK) with a Gemini column was used for scanning electron microscopy.

Polyelectrolyte titration of the purified latexes was carried out using a PCD 3 PH (Müttek, Herrsching, Germany) particle charge detector. The titration of the purified and positively charged latexes (PA 6, 8 and 9) were carried out in phosphate buffer ($c = 0.005$ mol·L⁻¹) at pH 7.0 with a PES solution. Hydrolysis of the activated ester groups was performed by stirring 5 mL of the latex with 20 mL phosphate buffer ($c = 0.1$ mol·L⁻¹) at pH 7.5. The resulting latex was purified by centrifugation and dispersion in water. Titration with PDADMAC solution was carried out in a phosphate buffer ($c = 0.005$ mol·L⁻¹) at pH 7.5. In deviation of this procedure the blank latex PA 0 was titrated with PES solution in an acetate buffer ($c = 0.005$ mol·L⁻¹) at pH 4.7.

Synthesis

Synthesis of 11-(Acryloylamino)undecanoic Acid (**2**) and 11-(Methacryloylamino)undecanoic Acid (**3**)

2 and **3** were prepared by the reaction of **1** with acryloyl chloride and methacryloyl chloride, respectively, according to the method described by Mashelkar^[20] but by replacing the sodium hydroxide with potassium hydroxide^[21] (see Figure 1).

Synthesis of AUPDS (**4**) and MUPDS (**5**)

2 (15.7 mmol) was dissolved in 150 mL methylene dichloride and added to a solution of 4-hydroxyphenyldimethylsulfonium methylsulfate (15 mmol) in 350 mL acetonitrile. The mixture was cooled to 0 °C and stirred while DCC (17 mmol) in 100 mL acetonitrile was added. After 15 min the solution was allowed to reach room temperature and stirred overnight. The precipitated dicyclohexyl urea was filtered off and washed three times with acetonitrile. The solution was evaporated to remove solvent and the slightly yellowish residue was washed with petroleum ether to remove unreacted DCC. The resulting solid was recrystallized twice from ethyl acetate. The synthesis yielded 6.0 g (80%) of the white solid AUPDS (**4**). MUPDS (**5**) was prepared in the same way using **3** instead of **2**.

AUPDS: ¹H NMR (DMSO-*d*₆): $\delta = 1.20$ – 1.42 (m, H^{5–11}), 1.63 (m, H¹²), 2.63 (t, H⁴, $J_{4,5} = 7.5$ Hz), 3.10 (m, H¹³), 3.27 (s, H¹), 3.38 (s, H¹⁷), 5.55 (dd, H¹⁶, $J_{14,16} = 17$ Hz, $J_{15,16} = 2.5$ Hz), 6.04 (dd, H¹⁵, $J_{14,15} = 9.7$ Hz), 6.21 (dd, H¹⁴), 7.51 (d, H³, $J_{2,3} = 8.5$ Hz), 8.14 (d, H²).

IR (KBr): 3310 (s, NH), 3027 (m, PhH), 2920, 2852 (s, CH), 1756 (s, C=O), 1654 (s, C=O, amide 1), 1628 (s, C=C) 1588, 1479 (m, Ph), 1537 cm⁻¹ (s, NH, amide 2).

C₂₃H₃₇NO₇S₂ (503.67): Calcd. C 54.85, H 7.40, N 2.78, S 12.73; Found C 54.05, H 6.90, N 2.71, S 12.93.

MUPDS: ¹H NMR (DMSO-*d*₆): $\delta = 1.20$ – 1.45 (m, H^{5–11}), 1.64 (m, H¹²), 1.83 (s, H¹⁶), 2.63 (t, H⁴, $J_{4,5} = 7.3$ Hz), 3.08 (m, H¹³), 3.27 (s, H¹), 3.38 (s, H¹⁷), 5.30 (s, H¹⁵), 5.62 (s, H¹⁴), 7.51 (d, H³, $J_{2,3} = 8.5$ Hz), 8.14 (d, H²).

IR (KBr): 3326 (s, NH), 3025 (m, PhH), 2918, 2852 (s, CH), 1762 (s, C=O), 1653 (s, C=O, amide 1), 1609 (s, C=C), 1589, 1498 (m, Ph), 1525 cm⁻¹ (s, NH, amide 2).

$C_{24}H_{39}NO_7S_2$ (517.7): Calcd. C 55.68, H 7.59, N 2.71, S 12.39; Found C 55.60, H 7.63, N 2.98, S 12.1.

Preparation of the Latex

Preparation of the latex was carried out in a 100 mL three-necked flask equipped with a reflux condenser, magnetic stir bar, and an argon supply line. 30 mL of water were degassed by altering vacuum and argon atmosphere three times and bubbling argon through the liquid for 30 min. Surfmer dissolved in 2 mL degassed water and monomer were added with a syringe through a rubber septum. The emulsion was stirred (400 U/min) and heated to the reaction temperature of 60 °C at which point the water soluble initiator was added. After 2 h the latex solution was heated to 65 °C for 10 min, then removed from the heat and the product allowed to reach room temperature. The yield was determined by weighing the solid content from a dried aliquot of the latex. The latex was purified by centrifugation and redispersion three times with water before further application. AUPDS-concentration-dependent emulsion polymerization (PA 0–12) was carried out with $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($36 \mu\text{mol}/34 \text{ mL}$) AIBA, an MMA concentration of $0.47 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($1.8 \text{ mL}/34 \text{ mL}$), and surfmer concentrations between 0–49.9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Particle diameters and particle numbers are listed in Table 1.

Results and Discussion

Two new molecules were designed and synthesized to function as polymerizable surfactants providing an activated ester group which could be used for bioconjugation. A two-step synthesis strategy was chosen, reflecting the modular design of the molecules. In the first step, the reaction of **1** with acryloyl chloride or methacryloyl chloride yielded acids **2** and **3**, respectively. In the second step the carboxylic acid groups of the two latter compounds were reacted with *p*-hydroxyphenyldimethylsulfonium

Table 1. AUPDS (**4**) concentrations (c_{AUPDS}), comonomer ratio ($c_{\text{AUPDS}}/c_{\text{MMA}}$), mean hydrodynamic particle diameters (\bar{d}_{DLS}) and calculated particle numbers (N_c) for emulsion polymerizations of samples PA 0 to PA 12.

Sample	c_{AUPDS}	$100 \times c_{\text{AUPDS}}/c_{\text{MMA}}$	\bar{d}_{DLS}	N_c
	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	%		
PA 0	0	–	601 ± 30	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^{14}$
PA 1	0.5	0.1	161 ± 4	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{16}$
PA 2	1.5	0.3	167 ± 5	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{16}$
PA 3	2.1	0.56	152 ± 4	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{16}$
PA 4	2.5	0.5	156 ± 4	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{16}$
PA 5	4.0	0.8	142 ± 3	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^{16}$
PA 6	5.0	1	132 ± 5	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^{16}$
PA 7	7.5	1.5	123 ± 4	$(4.5 \pm 0.5) \times 10^{16}$
PA 8	10.0	2	120 ± 3	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^{16}$
PA 9	15.0	3	116 ± 4	$(5.8 \pm 0.7) \times 10^{16}$
PA 10	25.0	5	113 ± 3	$(6.8 \pm 0.7) \times 10^{16}$
PA 11	40.0	8.0	110 ± 3	$(8.2 \pm 0.8) \times 10^{16}$
PA 12	49.9	10	109 ± 4	$(9.1 \pm 1.2) \times 10^{16}$

methylsulfate and DCC, resulting in the two surfmers AUPDS (**4**) and MUPDS (**5**) which are depicted in Figure 1. Overall yields were 60% for MUPDS and 55% for AUPDS. The $^1\text{H NMR}$ data showed a purity higher than 90% for each compound.

Surface Activity of AUPDS and MUPDS

Surface activity for both **4** and **5** was clearly shown by tensiometry. MUPDS and AUPDS lowered the surface tension of water at the air-water interface to $58.5 \pm 0.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ and $40.5 \pm 0.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, respectively (Figure 2). Both molecules formed micelles displaying a *cmc* of $3.2 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in case of MUPDS and $6.0 \pm 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for AUPDS. The lowering of the water surface tension and the micelle formation clearly revealed the amphiphilic character of both synthesized molecules. Hence a surfactant character was proven for both new compounds.

When comparing the surface activity of the two compounds, it is important to note that AUPDS showed a *cmc* which is nearly twice the corresponding value observed for MUPDS. The only difference in their molecular structure was the substitution of one acrylate proton in AUPDS by a methyl group in MUPDS. This finding is in agreement with the general behavior of surfactants e.g. for a homologous series of hydrocarbon surfactants. The *cmc* is generally reduced to approximately one half of its previous value with an addition of any additional methylene group.^[22]

We decided to use AUPDS instead of MUPDS in the further experiments as its water solubility is $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ compared to only $1.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for MUPDS. This higher solubility allowed emulsion polymerization experiments for the employment of the surfmer in a broader range of surfmer concentrations.

Copolymerization of AUPDS (**4**) and MMA

The copolymerization of MMA with AUPDS and the conservation of the surface active ester group during the

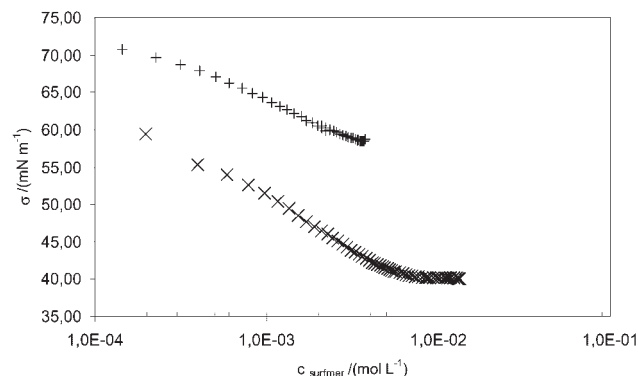


Figure 2. Surface tension measured by the Wilhelmy plate method at the air-water interface of surfmer solutions of AUPDS (x) and MUPDS (+).

Table 2. Surfmer ratios in feed stock and polymer particles as determined by integration of the ^1H NMR and elemental analysis and ζ -potential of aqueous particle dispersions. The samples were prepared by AIBA-initiated emulsion polymerization with methyl methacrylate and AUPDS as comonomers.

Sample	Feed stock AUPDS	Polymer particles AUPDS ratio (recovery rates /%)		ζ -Potential
	mol-%	mol-% ^1H NMR ^{a)}	elemental analysis	mV
PA 1	0.1	n.d. ^{b)}	0.11 ± 0.04 (110)	20 ± 2
PA 6	1	0.25 ± 0.06 (25)	0.25 ± 0.05 (25)	22 ± 2
PA 8	2	1.40 ± 0.08 (70)	0.50 ± 0.03 (25)	20 ± 2
PA 10	5	1.41 ± 0.08 (28)	1.60 ± 0.02 (32)	23 ± 2
PA 11	8	6.80 ± 0.44 (85)	6.30 ± 0.10 (79)	24 ± 3

^{a)} Solvent: acetone- d_6 /trifluoroacetic acid- d_1 (5:1).

^{b)} Not determined.

preparation of the latex was proven by ^1H NMR spectroscopy. We prepared a series of polymer particles with varying concentrations of AUPDS (Table 1 and 2).

The choice for the radical starter used (AIBA) was influenced by the studies of Nagai et al. These studies ascertained that AIBA is a suitable initiator for the copolymerization of the also cationic surfmer *p*-(10-undecenyl)dimethylsulfonium methylsulfate with dialkyl fumarates in water.^[13] This result was explained by decreased radical recombination of the polar and positively charged azo initiator in the outer sphere of the copolymerizing nanoparticles which are also positively charged.

The polymerizations initiated by AIBA led to a high yield, (90% to 96%) of particles with a narrow size distribution. The high monodispersity of the particles is depicted for a sample of poly(MMA-*co*-AUPDS) (PA 6) in Figure 3. Dynamic light scattering revealed a mean hydrodynamic particle diameter for this sample of (132 ± 5) nm.

The resulting polymers listed in Table 2 were washed with water, freeze-dried, and then dissolved in a mixture of trifluoroacetic acid- d_1 and acetone- d_6 . Figure 4 shows a typical ^1H NMR spectrum of the polymer sample PA 11.

The peaks indicating the aromatic protons at 8.1–8.2 ppm were characteristic of the activated ester surfmer. Any signal for protons in unpolymerized acrylic acid groups would appear in the region from 5.0 to 6.0 ppm, but were not observed. Hence, we concluded that the surfmer was copolymerized in contrast to a mere physisorption at the particle surface.

Quantitative Analysis of Surfmer Amount in Particle Copolymers

The copolymer composition was derived from an integration of the activated ester ^1H NMR signals (7.5 to 8.1 ppm) and from the results of the elemental analysis, independently. In the latter, special advantage was taken of the fact that sulfur is contained only in the surfmer molecules, and hence could be used as an elemental marker. The sulfur content in the polymer and the calculated surfmer recovery rates are listed in Table 2.

In the range from 1 mol-% to 5 mol-% of surfmer content in the feed stock, the recovery rates spanned a range from 25 mol-% to 32 mol-%. The quantitative results of both

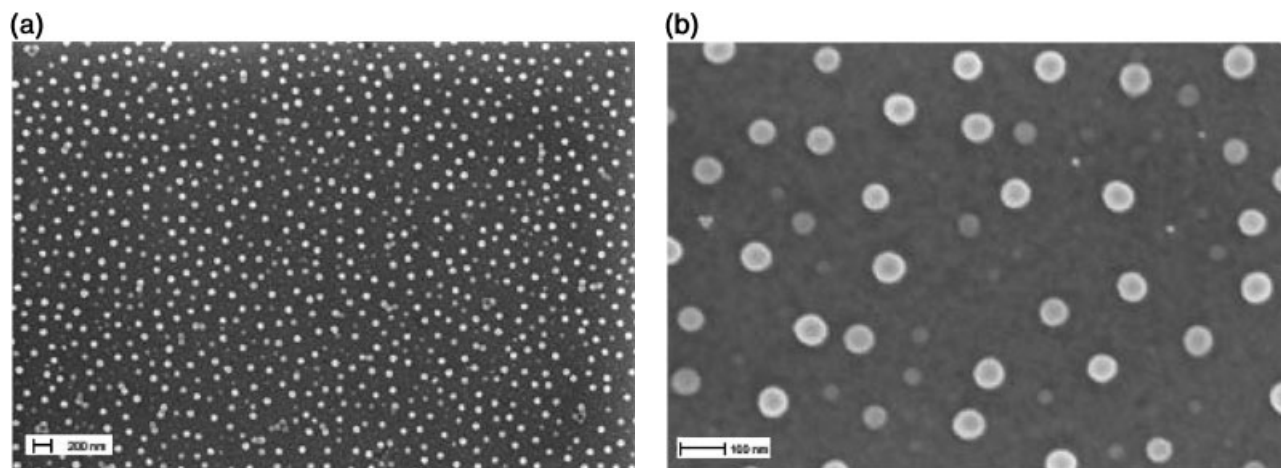


Figure 3. Scanning electron microscopy images of poly(MMA-*co*-AUPDS) particles (sample PA 6, 0.25 mol-% AUPDS) showing the narrow size distribution (a) over a larger sample area and (b) in detail.

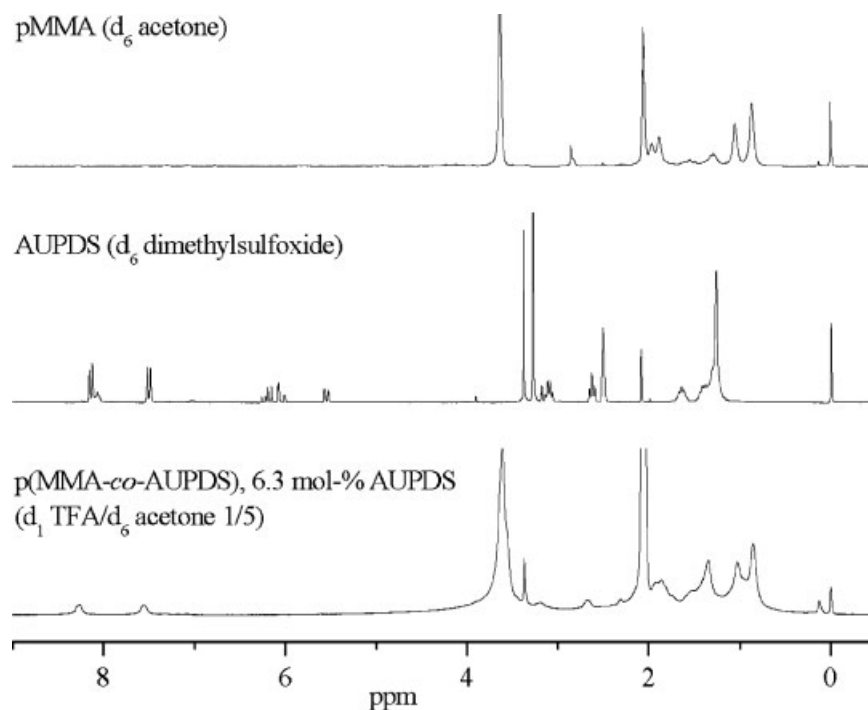


Figure 4. ^1H NMR spectra of poly(MMA), AUPDS and poly(MMA-co-AUPDS) particles (sample PA 11, 6.3 mol-% AUPDS). The spectrum of the copolymer particles contains the signals present in the poly(MMA) spectrum and additionally the characteristic signals of the active ester phenyl group ($\delta = 7.5$ and 8.2 ppm).

analytical methods corresponded well, despite the finding of significantly different recovery rates for sample PA 8. This could occur from the different measurement principles of ^1H NMR and elemental analysis by combustion: in ^1H NMR spectroscopy only the dissolved sulfonium groups contributed to the signal intensity, whereas in combustion analysis the whole sulfur content in the ashed sample contributed to the figure. Despite the fact that we tested various solvent combinations, a better consistency of combustion and NMR analysis could not be obtained.

The amount of copolymerized AUPDS surfmer at 8 mol-% feed achieved a value of 6.8 mol-% (^1H NMR) and 6.3 mol-% (elemental analysis), which represents an absolute recovery ratio of $(80 \pm 5)\%$. This recovery value was therefore approximately three times higher compared to the surfmer recovery in the range from 1 mol-% to 5 mol-% surfmer content in the feed. To fully understand this nonlinear behavior of the copolymer system would need further work out of the focus of this study. However, we assume that increased micellar radical entry in the polymerization and subsequent surfmer incorporation in the particles could be responsible for the differing results in the lower and higher surfmer content regime.

In addition, we determined the particle size and the calculated particle number (N_c) of the polymerization product at surfmer concentrations from 1.5 mmol-% to 75 mmol-%. The resulting graph (Figure 5) maps the

dependence of N_c on the AUPDS concentration (c_{AUPDS}). At a surfmer concentration below the *cmc*, the particle number increased with ascending surfmer amount. This trend continued to a concentration above the *cmc*, but with a less steep slope.

The occurrence of different slopes could be caused by an increase of micellar nucleation above the *cmc* as it is

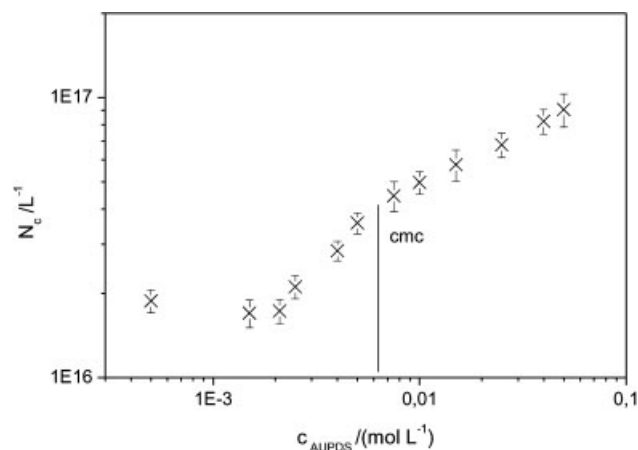


Figure 5. N_c of poly(MMA-co-AUPDS) particles obtained by AIBA-initiated emulsion polymerization versus c_{AUPDS} in the feed stock.

known both for polymerizable and non-polymerizable surfactants.^[23]

All poly(MMA-*co*-AUPDS) nanoparticles which were characterized by micro-electrophoresis had a positive ζ -potential. The source of this positive potential could be either positively charged polymer end groups originated from the amidinium function of the initiator AIBA or the sulfonium group containing activated ester surfmer.

To quantify the fraction of both positively charged species, we stirred the particles under conditions where the activated ester is hydrolyzed, and determined the residual carboxylic acid groups.

The charge density on the particle surfaces were determined by polyelectrolyte titration which is in this case based on the attractive forces between positively charged surfaces and negatively charged polyelectrolytes. An endpoint determination is thereby managed by registration of the streaming potential of the polymer particles.

Taking advantage of the different pK_a of a carboxylic acid ($pK_a = 4$ to 5) and an amidinium group ($pK_a = 11$), it is possible to differentiate the compounds at a chosen pH value. At pH 7.5 the carboxylic acid group is deprotonated and therefore negatively charged, whereas the amidinium group remains protonated and positively charged.

The final surface characterization was carried out in a two step procedure: First we determined the amount of positive charges on the purified particles. Then the particles were hydrolyzed and the residual carboxylic groups were quantified. The result of these measurements are listed in Table 3.

The particle charge before hydrolysis of the particles with a surfmer feed content of 1%, 2% and 3% increased with increasing surfmer contents. The total amounts were 15 to 30 times higher than the corresponding value of the blank sample PA 0 which was the product of a surfmer-free polymerization of MMA and AIBA. This high difference between the charge in surfmer-free or surfmer-containing polymerization and the surfmer-dependent absolute charge density is a clear evidence for the presence of the sulfonium group surfmer at the particle surface.

Further experiments with the hydrolyzed active ester groups resulted in the same magnitude of negative charge

Table 3. Results of the polyelectrolyte titration of purified poly(MMA-*co*-AUPDS) particles before and after hydrolysis of their activated ester function.

Sample (mol-% AUPDS in feed)	Amount of positive charges	Amount of negative charges after hydrolysis
	$\mu\text{eq/g}$	$\mu\text{eq/g}$
PA 0(0)	3 ± 1.5	24 ± 3
PA 6(1)	48 ± 4	67 ± 5
PA 8(2)	71 ± 5	80 ± 17
PA 9(3)	95 ± 8	121 ± 12

density, as compared to their positively charged starting materials. Here we noted a relatively high background of negative charges for the blank sample which might be due to additional carboxyl groups originating from hydrolyzed MMA. In conclusion, the experiments with the hydrolyzed particles were less precise, but confirmed the determined charge contribution by copolymerization of the surfmer.

The accessibility of the activated ester at the surface of the copolymer spheres was determined by conjugation with a fluorescent label. 6-Aminofluoresceine was used as an *N*-nucleophile for direct reaction with the ester.^[24] The amount of surface-bound fluorescent dye was calculated from the fluorescence activity of the particles, and hence the reactive amount of activated ester groups was determined. Figure 6 shows the concentration of surfmer in the poly(MMA-*co*-AUPDS) particles. Their reactive fraction calculated from the result of the fluorescence analysis is listed in Table 4.

As expected, an increasing amount of reactive surfmer sites at the particles were observed with increasing AUPDS concentration during the emulsion polymerization. A beginning saturation of covalent fluorescence dye immobilization could be noticed in the range of the last two data points in Figure 6.

From the results of the different analytical methods, there appeared to be a trend where more surfmer was copolymerized with increasing surfmer content in the reactive mixture. As seen in the data from elemental analysis, the surfmer built-in covered a range from 0.25–1.6 mol-% when the AUPDS content was increased from 1 to 5 mol-%. Hence a decrease in the particle diameter from 132 nm to 113 nm occurred and a larger surface area was generated. This surface enlargement lead to an increased immobilization of fluorescent dye. When the AUPDS content reached 8 mol-% a minimum particle diameter seemed to be

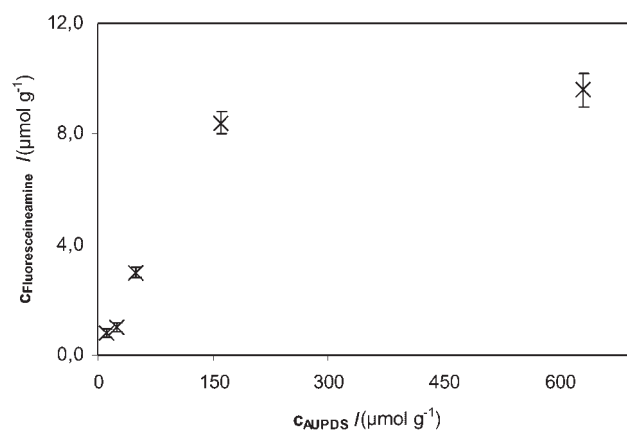


Figure 6. Amount of 6-aminofluoresceine reacted with the surface bound active ester versus the surfmer content C_{AUPDS} in poly(MMA-*co*-AUPDS) particles. The C_{AUPDS} was determined via elemental analysis.

Table 4. Amount of 6-aminofluoresceine immobilized on the particle surface versus c_{AUPDS} in poly(MMA-*co*-AUPDS) particles. The c_{AUPDS} was determined via elemental analysis (see also Table 2).

Sample	c_{AUPDS}	$c_{\text{immob. aminofluoresc.}}$	AUPDS recovery rate ($c_{\text{immob. aminofluoresc.}}/$ c_{AUPDS})
	$\mu\text{mol/g}$	$\mu\text{mol/mL}$	%
PA 1	11 ± 4	0.8 ± 0.14	7.3
PA 6	25 ± 5	1.0 ± 0.16	4.0
PA 8	50 ± 3	3.0 ± 0.2	6.0
PA 10	160 ± 2	8.4 ± 0.4	5.3
PA 11	631 ± 10	9.6 ± 0.6	1.5

obtained (see Table 1 and Figure 5). Also a saturation in the fluoresceine immobilization was observed with a surfmer amount of 8 mol-%.

Conclusions

The present article describes a straightforward synthetic route to two new surfmers, AUPDS and MUPDS, bearing activated ester groups. The chosen synthetic procedure proved to require only relatively simple reactions and resulted in the target molecules in high yield. This synthetic route opens the way to a flexible choice of spacer length by choosing a ω -aminocarboxylic acid and an easy adoption for a large variety of polymerizable groups by varying the polymerizable acid chlorides. Thereby, the limitation of the existing route to the only known activated ester surfmer UPDS^[13] using a non-interchangeable alkenyl group with low reactivity, was overcome by an attractive alternative.

The stability of the *p*-phenyldimethyl sulfonium group containing molecules against hydrolysis in aqueous media makes them useful for particle preparation by emulsion polymerization.

The determination of the surface activity and the critical micelle concentration (*cmc*) for MUPDS and AUPDS showed that AUPDS lowered the air-water surface tension to $40.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, whereas MUPDS was less surface active ($58.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$). Micelle formation occurs at surfmer concentrations of 3.2 and $6.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for MUPDS and AUPDS, respectively.

AIBA was found to work well as an initiator in emulsion polymerization of the two examined surfmers in copolymerization with MMA. The size of the resulting polymer particles was adjustable by the choice of a certain concentration of surfmer in the feed stock. Thereby particles were accessible in the range of a mean hydrodynamic light scattering diameter (\bar{d}_{DLS}) of about 109 nm to 167 nm. The particles showed a ζ -potential in the range from 20 to 24 mV as analyzed by micro-electrophoresis which corresponded

to the electrostatic stabilization by the positively charged sulfonium group of the surfmer. The surfmer groups were differentiated from initiator end groups by polyelectrolyte titration and proved to be the determining charge containing species.

Additionally the particles showed an almost monodisperse size distribution as determined by scanning electron microscopy.

25 to 85% of the surfmer employed in the emulsion polymerization was copolymerized with the comonomer, and about 1.5 mol-% to 7.3 mol-% of these surfmer molecules reacted with 6-aminofluoresceine as a nucleophile. This corresponded to a concentration of reactive sites of up to $9.6 \mu\text{mol}$ fluorescent dye per 1 g particles.

The prepared nanoparticles could be an interesting new tool in nanobiotechnology for immobilization of amine-containing peptides or proteins. They exhibit a substantially larger surface than commercial microparticles or microbeads and hence a dramatically increased binding capacity. The surfmer nanoparticles would therefore be of great value for use in bioconjugative chemistry and especially for protein immobilization.

Probably even more important is the easy control of the density of reactive surface function on the nanoparticles simply by choosing a certain surfmer concentration in feed. A simple one stage emulsion polymerization and easy purification routine directly results in bioconjugative nanoparticles with a controlled binding surface.

The further exploitation of the interesting new class of surfmers for the preparation of bioconjugative latexes may ask for a variation of the molecular constitution of the surfmers. The modular design of the presented surfmers offers an easy route for the optimization of the spacer length or the polymerizable group.

Acknowledgement: The authors thank *M. Riedel* (IGB) for the scanning electron micrographs, *T. Schiestel* (IGB) for his help with the fluorescence analysis, *C. D. Eisenbach* and *C. Rost* (both University of Stuttgart) for NMR measurements and *C. Mirley* (Boston, USA) and *K. Tauer* (MPI for colloids and surfaces, Golm) for helpful discussions. G.E.M. Tovar thanks the *BMBF*, the *Fraunhofer-Gesellschaft* and the *Land Baden-Württemberg* for financial support for a junior research group on "Biomimetic Interfaces" (FKZ 0312180).

Received: July 26, 2002

Revised: December 18, 2002

Accepted: February 19, 2003

[1] D. C. Sherrington, *Chem. Commun.* **1998**, 2275.

[2] W. E. Rapp, in: *Combinatorial Chemistry*, S. R. Wilson, A. W. Czarnik, Eds., John Wiley & Sons, New York 1997, p. 65.

- [3] J. Kreuter, in: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, S. Swarbrick, Ed., Marcel Dekker, New York 1994, p. 353.
- [4] B. R. Pieters, R. A. Williams, C. Webb, M. A. Longo-Gonzalez, in: *Adv. Meas. Control Colloidal Processes*, R. A. Williams, N. C. De Jaeger, Eds., Butterworth-Heinemann, Oxford, UK 1991, p. 172.
- [5] E. Piskin, M. Kiremitci, E. B. Denkbass, I. Gurhan, W. R. Gombotz, A. S. Hoffmann, *Clinic. Mater.* **1992**, *11*, 171.
- [6] P. H. Wang, P. C. Y. Pan, *Colloid Polym. Sci.* **2001**, *279*, 98.
- [7] J. W. Vanderhoff, in: *Future Direct. Polym. Colloids*, Vol. 138, M. S. El-Aasser, R. M. Fitch, Eds., Martinius Nijhoff, Dordrecht 1987, p. 23.
- [8] K. B. Thurmond, T. Kowalewski, K. L. Wooley, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6656.
- [9] M. Qhogosheane, S. Santra, P. Zhang, W. Tan, *Analyst* **2001**, *126*, 1274.
- [10] K. Kouge, T. Koizumi, H. Okai, T. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2409.
- [11] T. Seki, K. Aoi, M. Okida, Y. Shiogai, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 439.
- [12] K. Miyamoto, M. Tokita, T. Komai, *Prot. Pept. Lett.* **2001**, *8*, 231.
- [13] K. Nagai, K. Takahashi, M. Suzuki, J. Kido, N. Kuramoto, *Polymer* **1995**, *36*, 4675.
- [14] J. M. Asua, H. A. S. Schoonbrood, *Acta Polym.* **1998**, *49*, 671.
- [15] H. A. S. Schoonbrood, J. M. Asua, *Macromolecules* **1997**, *30*, 6034.
- [16] M. J. Unzué, H. A. S. Schoonbrood, J. M. Asua, M. A. Goni, D. C. Sherrington, K. Stähler, K.-H. Goebel, K. Tauer, M. Sjöberg, K. Holmberg, *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 1803.
- [17] K. Takahashi, K. Nagai, *Polymer* **1996**, *37*, 1257.
- [18] K. Takahashi, J. Kido, N. Kuramoto, K. Nagai, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *172*, 63.
- [19] K. Nagai, K. Okada, J. Kido, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1992**, *30*, 1187.
- [20] M. V. Badiger, A. K. Lele, V. S. Bhalerao, S. Varghese, R. A. Mashelkar, *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 1175.
- [21] B. Gallot, B. Marchin, *Liq. Cryst.* **1989**, *5*, 1729.
- [22] D. Myers, in: *Surfactant Science and Technology*, VCH, Weinheim 1988, p. 107.
- [23] R. G. Gilbert, "Emulsion Polymerisation: A Mechanistic Approach", Academic, San Diego, CA, London 1995.
- [24] H. J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Kaiser, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1381*, 203.

Molekular geprägte Nanopartikel als selektive Phase in Komposit- membranen: Hydrodynamik und Stofftrennung in nanoskaligen Schüttungen

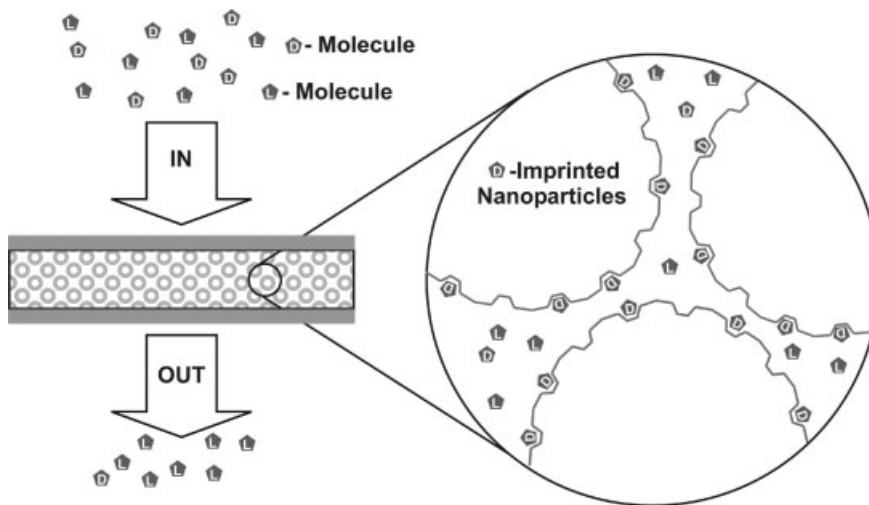
MATHIAS LEHMANN, HERWIG BRUNNER UND
GÜNTER E. M. TOVAR *

1 Problemstellung

Die spezifische Abtrennung einer einzelnen Komponente aus einem Gemisch zählt zu den Schlüsselfragen sowohl im Downstream Processing als auch in der chemischen Sensorik. Die Trennung chiraler Komponenten gewinnt besonders in der pharmazeutischen Industrie eine immer größer

* Dr. rer. nat. G. TOVAR,
(E-mail: guenter.tovar@igb.fhg.de),
Prof. Dr. techn. H. BRUNNER, Fraunhofer
Institut für Grenzflächen- und Bioverfah-
renstechnik (IGB), Nobelstraße 12,
D-70569 Stuttgart, Germany;
Dipl.-Ing. M. LEHMANN, Institut für
Grenzflächenverfahrenstechnik,
Universität Stuttgart, Nobelstraße 12,
D-70569 Stuttgart, Germany.

Abbildung 1.
Schematischer Aufbau und Funktionsweise der Kompositmembran



werdende Bedeutung. Enantiomere bewirken häufig völlig unterschiedliche Reaktionen im Organismus. Daher müssen medizinisch wirksame Stoffe enantiomerenrein dargestellt werden. Aber auch die Aufarbeitung von Produkten, z. B. Aminosäuren, aus Biosyntheseverfahren erfordert höchste Reinheitsgrade. Je nach Anwendungsfall und Maßstab existieren bereits verschiedene komplexe Verfahren zur Auftrennung und -reinigung von Stoffgemischen, die allerdings mit einem hohen materiellen und finanziellen Aufwand verbunden sind.

Ziel des hier beschriebenen Ansatzes ist die Entwicklung einer effizienten und einfachen Alternative zu den herkömmlichen Verfahren, um aus kleineren Probenvolumina spezifische Substanzen selektiv abzutrennen. Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen steht eine Kompositmembran, welche aus zwei herkömmlichen und kommerziell erhältlichen Polymermembranscheiben besteht, wobei sich zwischen diesen beiden Membranscheiben eine selektive Schicht aus molekular geprägten Polymer-Nanopartikeln befindet (s. Abb. 1). Die Partikel weisen einen Durchmesser von 100 – 220 nm auf.

Die Technologie des molekularen Prägens findet derzeit beständig zunehmende Verbreitung und wird in Übersichtsartikeln intensiv betrachtet [1 – 4]. Die Erzeugung molekular geprägter Polymere als kolloidale Partikel ist in jüngster Zeit erfolgreich gelungen [5 – 8]. In der oberflächennahen Schicht der sphärischen Nanopartikel sind spezifische molekulare Prägestellen zugänglich, welche nach dem Prinzip der molekularen Erkennung die abzutrennende Substanz aus dem Gemisch binden, wenn dieses durch die Kompositmembran strömt. Entscheidende Vorteile unseres modularen Ansatzes gegenüber Verfahren zur Erzeugung direkt molekular geprägter oder funktionalisierter Membranen [9] sind die einfache Herstellung der Kompositmembran und die extrem hohe Oberflächendichte der Prägestellen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die grundlegende Machbarkeit dieses Ansatzes untersucht werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei zunächst auf der theoretischen und experimentellen Untersuchung der Hydrodynamik in der selektiven Nanopartikelschicht sowie der Bestimmung der Haupteinflussparameter, die bereits teil-

weise beschrieben wurden [10]. Des Weiteren sollen erste Experimente die Trennleistung dieser Kompositmembran zeigen.

2 Grundlagen

Betrachtet man die Hydrodynamik eines flüssigen Stoffgemisches, welches durch die Nanopartikelschicht der Kompositmembran strömt, so kann man den klassischen einphasigen Strömungsvorgang in Schüttungen zugrunde legen. Eine Fragestellung ist, ob sich die entsprechenden Modelltheorien ohne weiteres auch auf eine nanoskalige Schüttung übertragen lassen. Um die Durchfluss-

charakteristik der Schüttung zu bestimmen, wurde auf das Kapillarmodell zurückgegriffen [11]. Hierbei werden die intrapartikulären Zwischenräume (Zwickel) der Schüttung auf ein System von parallel geschalteten Kapillaren reduziert, welche das Haufwerk regelmäßig durchziehen. Ein Vorteil dieser Modellvorstellung ist die Anwendbarkeit der Gesetze zur Bestimmung der Widerstandscharakteristik der laminaren Strömung in Rohren bzw. Kapillaren mit kreisförmigen Querschnitt. Bei Vernachlässigung der Gravitation sowie der Ein- und Auslaufeffekte gilt das Gesetz von Hagen-Poiseuille¹⁾:

$$\xi Re = 64 \quad (1)$$

Die beiden dimensionslosen Variablen Widerstandsbeiwert ξ und Reynolds-Zahl Re müssen nun mit den charakteristischen Größen der Schüttung angepasst werden. Das hieraus abgeleitete und in der Literatur beschriebene Kapillarmodell lässt sich im Falle schleicher Strömung durch die Carman-Kozeny-Gleichung beschreiben [11]:

$$2\mu = \frac{\Delta p \varepsilon^3}{\bar{v} (1-\varepsilon)^2 S_{(V)}^2 H \eta} \quad (2)$$

Dabei dient der dimensionslose Umwegfaktor μ der Anpassung der Haufwerkshöhe an die theoretische Kapillarlänge, da die Kapillaren im Allgemeinen nicht parallel zur Hauptströmrichtung verlaufen. Diese Größe ist abhängig vom Druckverlust Δp über der Schüttung, der Porosität ε , welche das Verhältnis von Hohlraumvolumen zum Gesamtvolumen der Schüttung darstellt, der mittleren Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} in einer Kapillare, der Haufwerkshöhe H , der Viskosität des Fluids η und der volumenspezifische Oberfläche $S_{(V)}$. Der Umwegfaktor μ muss experimentell bestimmt werden, wobei der Wert typischerweise zwischen 2 und 2,5 liegt [12]. Die Gl. (2) wird mit folgenden Annahmen und Vereinfachungen an die Parameter des nanoskaligen Haufwerks angepasst:

1) Eine Zusammenstellung der Formelzeichen befindet sich am Schluss des Beitrags.

- monodisperse Größenverteilung der Nanopartikel im Haufwerk,
- Haufwerksstruktur entspricht einer kubisch- bzw. hexagonal dichtesten Kugelpackung [13].

Die Haufwerkshöhe kann mit Hilfe geometrischer Beziehungen wie folgt substituiert werden:

$$H = \frac{24 m_p \cos^3(30^\circ)}{\rho_p \pi^2 d_F^2} \quad (3)$$

Die Haufwerkshöhe H ist abhängig von der Partikelmasse der selektiven Schicht in der Kompositmembran m_p und deren Dichte ρ_p . Der Durchmesser der runden Filterscheiben wird mit d_F eingeführt. Nach Anwendung aller Substitutionen kann Gl. (2) umformuliert werden zu:

$$\dot{V} = \frac{1}{(R_F + R_H + R_F)} \frac{A_F}{\eta} \Delta p \quad (4)$$

Zielgröße in Gl. (4) ist der Volumenstrom \dot{V} des Fluids durch die Kompositmembran. Dieser ist abhängig von der Querschnittsfläche der Filterscheibe A_F und den einzelnen spezifischen Widerständen der beiden Filterscheiben R_F und des Haufwerks R_H , welche in der Summe den Gesamtwiderstand der Kompositmembran ergeben. Im Gegensatz zu den experimentell bestimmten Widerständen der Filterscheiben wird der Haufwerkswiderstand im Laufe der Umformulierung von Gl. (2) und Gl. (3) wie folgt dargestellt:

$$R_H = \frac{2 \mu (1-\epsilon)^2}{\epsilon^3 d_p^2 \rho_p \pi^2 d_F^2} 864 m_p \cos^2(30^\circ) \quad (5)$$

Bei experimenteller Messung des Druckverlustes Δp und des Volumenstroms \dot{V} kann mit Hilfe von Gl. (4) und (5) die Porosität und die Permeabilität der Kompositmembran bestimmt werden. Zur Beurteilung der Anwendbarkeit von Gl. (1) kann das vorherrschende Strömungsregime in der Schüttung mit Hilfe der Kennzahl Re wie folgt bestimmt und abgeschätzt werden:

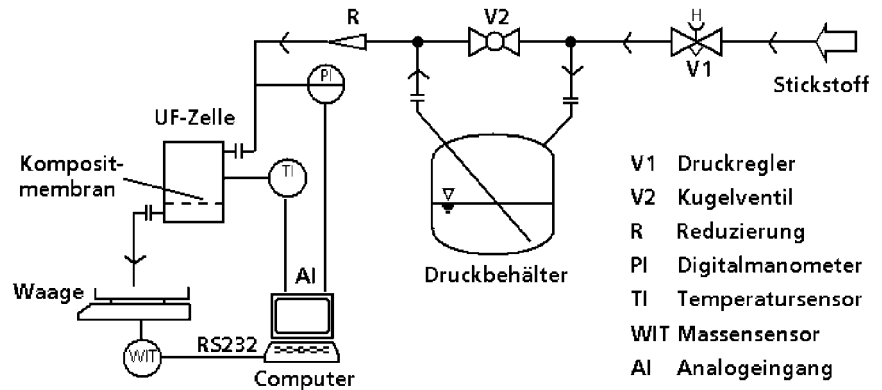
$$Re = \frac{8 \dot{V} d_p \rho}{3 \pi d_F (1-\epsilon) \eta} \quad (6)$$

Bereits bei der Herstellung der Kompositmembran kann mit den obigen Gln. (4) und (5) der Parameter Porosität theoretisch erfasst werden. Dabei handelt es sich um eine klassische Mikrofiltration im Dead-End-Betrieb. Die Nanopartikelsuspension wird dabei auf der unteren Membranfilterscheibe ähnlich einem Filterkuchen abgeschieden.

3 Material und Methoden

Die molekular geprägten Nanopartikel wurden mittels Miniemulsionspolymerisation synthetisiert. Die genauen Synthesevorschriften sind ausführlich beschrieben [7] und werden daher hier nur kurz skizziert. Vor Beginn der eigentlichen Polymerisation wurden durch Ultraschallein-

Abbildung 2. Experimenteller Messaufbau zur Herstellung der Kompositmembran und Erfassung relevanter Parameter.



trag starke Scherkräfte in der Reaktionslösung induziert, welche die Monomertröpfchen in Nanotröpfchen mit einem Durchmesser von 50 bis 300 nm zerteilen. In diesen nanoskaligen Monomertröpfchen befand sich außerdem das Aminosäurederivat Boc-L-Phenylalaninamid (BFA), welches als Prägemolekül fungierte. Durch die Polymerisation wurden aus den flüssigen Monomertröpfchen dann feste Polymerpartikel gebildet. Die Größenverteilung der Partikel entsprach dabei der Größenverteilung der ursprünglichen Tröpfchen in der Emulsion. Aus diesen Polymerkügelchen wurden anschließend die Prägemoleküle mit einem Lösungsmittel extrahiert. Die so gebildeten molekular geprägten Nanopartikel wurden umfassend charakterisiert [7] und ihre Bindeeigenschaften mittels UV-VIS, HPLC und Mikrokolorimetrie [14] analysiert.

Bei der Herstellung der Kompositmembranen dienten Polyamidmembranen (Ultipor N66, PALL) mit einem Porendurchmesser von 100 nm als Support- und Deckmembran. Bei der Beschichtung der Supportmembran kam das Membranverfahren Dead-End-Filtration zum Einsatz. In einer Ultrafiltrationszelle wurden 50 mL Nanopartikelsuspension bei einem konstantem Druck von 0,14 bar mit Stickstoff durch die Membran filtriert. Ein empfindlicher Messaufbau erfasste dabei während der Herstellung der Kompositmembran und den Permeationsexperimenten exakt und online die Größen Volumen- bzw. Massenstrom, Fluidtemperatur und Druckverlust (s. Abb. 2).

Die Daten der Messaufnehmer und Sensoren wurden mittels einer Messkarte und der Software LabVIEW (NATIONAL INSTRUMENTS) erfasst, gespeichert und ausgewertet. Nach der Beschichtung der Membran erfolgte die Trocknung der Nanopartikelschicht bei kontrollierter relativer Luftfeuchte von 65 %. Anschließend wurde die Deckmembran aufgebracht und am Rand mit der Supportmembran verklebt und so die Nanopartikelschicht fest eingeschlossen.

4 Ergebnisse

Ein entscheidender Faktor in Bezug auf die Permeabilität der Kompositmembran ist die Porosität der selektiven Nanopartikelschicht. Um schon bei der Herstellung der

Kompositmembran die Porosität der sich bildenden Nanopartikelschicht abzuschätzen, wurde der Volumenstrom online bei konstantem Druck durch die Supportmembran gemessen. Hierfür wurden 50 mg extrahierte Nanopartikel in 50 mL Wasser gerührt. Diese Suspension wurde bei konstantem Druck von 0,14 bar mittels Stickstoff durch die Supportmembran filtriert. Zunächst wurde mit Gl. (6) die Reynolds-Zahl für verschiedene Massen der selektiven Beschichtung abgeschätzt (s. Abb. 3).

Deutlich zu erkennen ist, dass sich das Strömungsregime im laminaren Bereich befindet und die für die Anwendbarkeit der Carman-Kozeny-Gleichung notwendige schleichende Strömung vorausgesetzt werden kann. In Abb. 4a ist der gemessene Volumenstrom als Funktion der Beschichtungsdauer aufgetragen. Innerhalb der 40 min Beschichtungsdauer sinkt der Volumenstrom von anfänglich 0,10 mL s⁻¹ auf 0,01 mL s⁻¹, da die wachsende Partikelschicht einen größer werdenden spezifischen Widerstand R_H erzeugt.

Abbildung 3.
Reynolds-Zahl als Funktion der Masse der selektiven Nanopartikelbeschichtung.

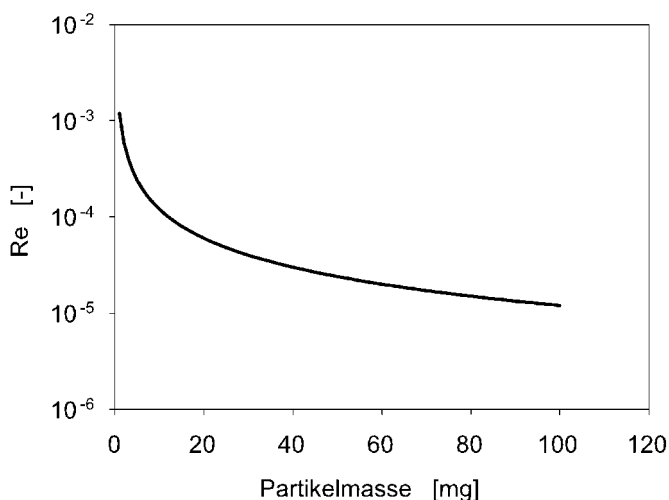
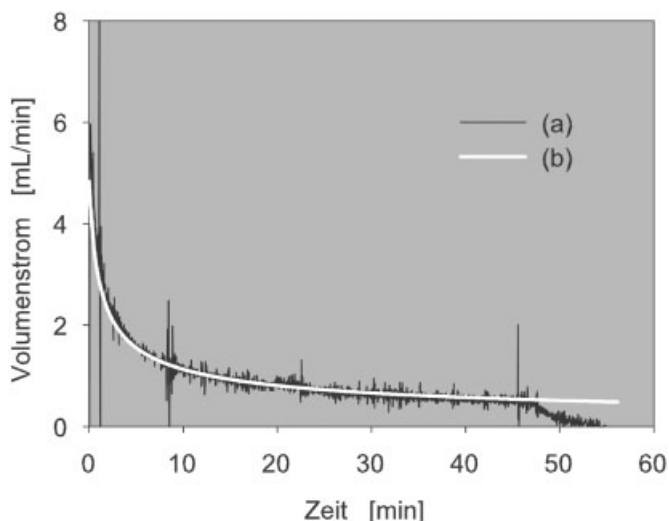


Abbildung 4.
Volumenstrom als Funktion der Beschichtungsdauer (a) experimentell und (b) modelliert.

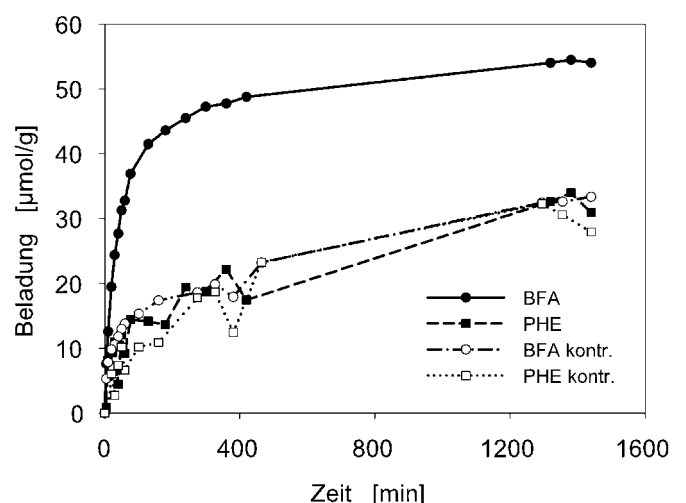


Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der Gln. (4) und (5) der Volumenstrom \dot{V} berechnet und durch Änderung der Porosität ε an den experimentellen Verlauf angepasst (s. Abb. 4b). Das beste Ergebnis wurde mit der Porosität $\varepsilon = 0,38$ erzielt. Die so ermittelte Größe stellt gegenüber der Porosität der in Abschnitt 2 angenommenen dichtesten Kugelpackung von $\varepsilon = 0,26$ einen sinnvollen Wert dar, da durch die reale, nicht monodisperse Größenverteilung der Nanopartikel Unregelmäßigkeiten bzw. Defekte in der Schicht auftreten. Für Wasser als Medium liegt die finale Permeabilität der kompletten Kompositmembran bei 70 kg m⁻² h⁻¹ bar⁻¹.

Zur Überprüfung der Trenneigenschaften wurden 100 mL Methanol/Wasser-Gemisch (75:25, v/v) mit 50 μ M Prägemolekül L-BFA und 50 μ M Kontrollmolekül PHE kontinuierlich zirkulierend durch die Kompositmembran geleitet. Das Kontrollmolekül PHE stellt die unterivatisierte Form von BFA dar. Die bei PHE fehlende Anilid-Gruppe erzeugt einen sterischen Unterschied zwischen beiden Molekülen. In diskreten Zeitabständen wurden Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. In Abb. 5 ist die Beladung der Kompositmembran in Stoffmenge pro Masse Nanopartikel als Funktion der Zirkulationsdauer dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist die favorisierte Beladung der BFA-geprägten Kompositmembran mit dem Molekül BFA (Graph: BFA). Hingegen zeigen die Daten der Kontrollexperimente PHE an BFA-geprägten Membranen (Graph: PHE) sowie von BFA oder PHE an ungeprägte Membranen (Graphen: BFA/PHE kontr.) identisch flache Verläufe, so dass von einem geringen Grad unspezifischer Bindung gesprochen werden kann. Es wurde ein finaler Trennfaktor $\alpha = 2$ erreicht, wobei die maximale Beladung der Kompositmembran bei 2,5 μ mol BFA lag. Nach der Beladung der Kompositmembran kann diese durch Wechsel des Lösungsmittels auf 100 % Methanol wieder entladen bzw. extrahiert werden, um sie für den nächsten Ladezyklus bereit zu stellen.

Abbildung 5.
Beladung der Kompositmembran in Stoffmenge pro Masse Nanopartikel als Funktion der Zirkulationsdauer.



5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Eignung von molekular geprägten Nanopartikeln als stationäre Phase in Kompositmembranen wurde durch Experimente und theoretische Abschätzungen gezeigt. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen der Hydrodynamik in einer Nanopartikelschüttung und der resultierenden Permeabilität der Kompositmembran untersucht. Weiterhin wurden erfolgreiche Experimente zur Stofftrennung mit dieser Kompositmembran durchgeführt.

Die Beschichtung der Supportmembran mit der Nanopartikelsuspension hatte eine signifikante Verringerung der Permeabilität der Kompositmembran zur Folge. Aufgrund der geringen Durchmesser der Nanopartikel entstand ein sehr dichtes Gefüge, welches mit einer kubisch-oder hexagonal dichtesten Kugelpackung vergleichbar ist. Mit Hilfe der klassischen Methoden zur Bestimmung und Modellierung der Hydrodynamik in Schüttungen konnte die Carman-Kozeny-Gleichung an das Partikelsystem angepasst werden. Es wurde eine höhere Porosität von $\varepsilon = 0,38$ berechnet, welche auf die nicht ideale Größenverteilung der molekular geprägten Nanopartikel zurückzuführen ist und sich positiv auf die Permeabilität der Kompositmembran auswirkt.

Einfache Versuche zur Abtrennung eines Aminosäurederivates aus einem Stoffgemisch sind erfolgreich durchgeführt worden. Hierbei wurde die Kompositmembran im Dead-End-Betrieb kontinuierlich zirkulierend vom Stoffgemisch durchströmt. Die finale Selektivität der Kompositmembran konnte zu $\alpha = 2$ bestimmt werden, wobei die maximale Bindekapazität bei ca. 50 μmol BFA pro g Partikelmasse liegt.

Die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse zeigen die grundsätzliche Machbarkeit unseres Ansatzes. Die Kompositmembran fungiert in Bezug zu bestehenden Trennverfahren als eine Kombination von Festphasenextraktion und affiner Membran. Bislang bekannte molekular geprägte Polymere konnten aufgrund ihrer Partikelgröße (typischerweise $>20 \mu\text{m}$) nur als stationäre Phase in der HPLC-Analytik eingesetzt werden [15]. Die in unserem Ansatz neu entwickelten Nanopartikel wurden hingegen auf höhere Porosität und einen Durchmesser nicht größer als 220 nm optimiert. Eine Anwendung als Säulenpackung ist ausgeschlossen, da extrem hohe Drücke und entsprechend niedrige Flussraten erzeugt werden würden. Aus dem gleichen Grund ist auch die Höhe der selektiven Schicht in der Kompositmembran begrenzt. Von großem Vorteil sind hier der geringe Partikeldurchmesser und die hohe innere Porosität der Partikel, da somit eine sehr hohe spezifische Oberfläche von ca. 60 m^2 pro g Partikel erreicht wird. Schon bei sehr geringen Schichtdicken können dadurch akzeptable Trennleistungen bzw. Bindekapazitäten realisiert werden. Das Problem der insgesamt niedrigen Trennkapazität pro Zeit beruht auf der Gegenläufigkeit von hoher spezifischer Trennleistung und hoher Permeabilität. Da bei biotechnologischen Trennproblemen in erster Linie eine hochspezifische Selektivität gefordert ist, kann man die benötigten Flussraten bzw. Durchsätze durch Numbering-Up, d. h. Parallelisierung, erreichen.

In weiteren Untersuchungen soll der Stofftransport in der Kompositmembran mit verschiedenen Diffusionsmodellen aus der Membrantechnologie und den Messungen von Adsorptionsisothermen abgeschätzt, modelliert und mit der Hydrodynamik verknüpft werden.

Eingegangen am 12. September 2002 [K 3124]

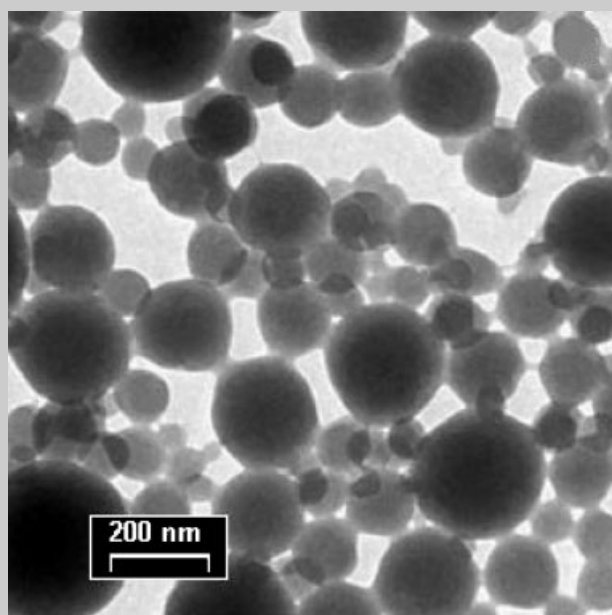
Formelzeichen

α	[-]	Trennfaktor
A_F	$[\text{m}^2]$	Filterfläche
d_F	[m]	Filterdurchmesser
d_P	[m]	Partikeldurchmesser
ε	[-]	Porosität
η	$[\text{Pa s}]$	Viskosität
H	[m]	Haufwerkshöhe
μ	[-]	Umwegfaktor
m_P	[g]	Partikelmasse
ξ	[-]	Widerstandsbeiwert
Δp	[bar]	Druckdifferenz
ρ	$[\text{kg}/\text{m}^3]$	Dichte des Fluids
ρ_P	$[\text{kg}/\text{m}^3]$	Dichte der Partikel
R_H	$[\text{m}^{-1}]$	spezifischer Haufwerks-Widerstand
R_F	$[\text{m}^{-1}]$	spezifischer Filterscheiben-Widerstand
Re	[-]	Reynolds-Zahl
$S_{(V)}$	$[\text{m}^2/\text{m}^3]$	volumenspezifische Oberfläche
\bar{v}	[m/s]	mittlere Geschwindigkeit
\dot{V}	$[\text{mL}/\text{s}]$	Volumenstrom

Literatur

- [1] G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958.
- [2] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467.
- [3] B. Sellergren, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1071.
- [4] L. I. Andersson, *J. Chromatogr. B* **2000**, *739*, 163.
- [5] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1851.
- [6] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 830.
- [7] D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1965.
- [8] S. R. Carter, S. Rimmer, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 667.
- [9] S. A. Piletsky, T. L. Panasyuk, E. V. Piletskaya, I. A. Nicholls, M. Ulbricht, *J. Membr. Sci.* **1999**, *157*, 263.
- [10] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Desalination* **2002**, *149*, 315.
- [11] A. E. Schneidegger, *Physics Of Flow Through Porous Media*, MacMillan Co., New York **1960**.
- [12] P. C. Carman, *Trans. Inst. Chem. Eng.* **1937**, *15*, 150.
- [13] S. Jons, P. Ries, C. J. McDonald, *J. Membr. Sci.* **1999**, *155*, 79.
- [14] A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G. Tovar, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 824.
- [15] K. Haupt, *Analyst* **2001**, *126*, 747.

Full Paper: Highly crosslinked polymer nanospheres composed of poly[(methacrylic acid)-*co*-(ethylene glycol dimethacrylate)] and poly(EGDMA) have been synthesised by miniemulsion polymerisation in presence of a chiral molecular template, L- or D-Boc-phenylalanine anilid. The miniemulsions and the resulting microgels were characterised by surface tension measurements, gravimetric analysis, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, ^1H and ^{13}C CP-MAS NMR, and Brunauer-Emmett-Teller gas adsorption measurements. The efficiency of the non-covalent molecular imprinting was examined by binding experiments and quantified by UV absorption. The miniemulsions were converted to coagulate-free and stable latexes with a conversion of $98 \pm 2\%$ and an apparent hydrodynamic particle diameter of 200 ± 20 nm. Molecular imprinting was most effective when a miniemulsion of molar ratio $n_{\text{MAA}}/n_{\text{EGDMA}} = 0.25:1$ was used for the microgel preparation. Enantioselective binding of the templates to the particles was observed. Binding of the L-enantiomer was four times greater in the L-imprinted polymer than in the non-imprinted polymer and 10 times than binding of the D-enantiomer in the L-imprinted microgels. This new method allows for a one-stage preparation of fully synthetic affinity receptors with a defined spherical shape and a high specific surface area due to their nanoscopic dimension.



Transmission electron microscope photograph of particles of polymer **6**, prepared in presence of template.

Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres as Synthetic Affinity Receptors Obtained by Miniemulsion Polymerisation

Dorothea Vaihinger,¹ Katharina Landfester,² Iris Kräuter,¹ Herwig Brunner,¹ Günter E. M. Tovar*¹

¹Laboratory for Biomimetic Interfaces, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology & Institute for Interfacial Engineering, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, D-70569 Stuttgart, Germany
Fax: +49 711 970 4200; E-mail: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de

²Max-Planck-Institute for Colloids and Interfaces, Am Mühlenberg 1, D-14476 Golm, Germany

Keywords: colloids; interfaces; microgels; molecular recognition; templates

Introduction

Recently, there has been increasing interest in the use of synthetic polymers as molecularly imprinted materials for the design of artificial receptor-like binding sites in otherwise non-selective polymeric materials.^[1–5] Synthetic polymers with the ability for molecular recognition represent a promising alternative to affinity binding matrices using biological molecules. For example, the limited stability of proteins such as antibodies or enzymes is often the weakest point in functional bioreactive systems using

affinity reaction steps, such as separation, purification or analytical lines or biosensors.

The recognition sites on a molecularly imprinted polymer (MIP) are formed in situ during polymerisation. Polymers can thus be obtained which are either imprinted by non-covalent or by covalent interaction of an ‘imprint’ or template molecule with the polymer. In non-covalent imprinting, a functional monomer and a cross-linker co-polymerise with non-polymerisable template molecules.^[6] These templates are then incorporated into the growing polymer network and can easily be extracted from the polymer after

polymerisation is completed. If the imprinting is successful, the polymer network will be left with pores lined with sites having complementary functional groups to those of the template. These functional pore sites are then used for molecular recognition reactions. The imprinted polymer specifically binds molecules by non-covalent interactions, H-bonding, van-der-Waals forces, π - π interactions, and, if charged compounds are used, electrostatic interactions. The physical structure of the polymers receptor-like binding sites are molded by the shape of the template molecules used and the three-dimensional arrangement of its functional units. Thereby, creating polymers that can be enantioselective as well.^[7]

For covalent imprinting, the template molecule is copolymerised into the polymer network with the monomer and cross-linker. Instead of extracting the template molecule after polymerisation, the template is split from the copolymer network by a chemical reaction step.^[8]

Requirements for the molecular template and the polymer system are much more stringent in the case of covalent imprinting compared to non-covalent imprinting. Whereas covalent imprinting requires the synthesis of special template derivatives for each polymer system, non-covalent imprinting can generally be used for all miscible molecular templates and monomer systems. Acrylic polymers and copolymers, such as poly[(methacrylic acid)-*co*-(ethylene glycol dimethacrylate)], have been successfully molecularly imprinted with a large variety of templates such as chiral amino acids, drugs, fertilisers, biocides, and peptides.^[9] MIP's, so far, have been used as effective molecular selectors in liquid chromatography,^[10] capillary electrochromatography,^[11] and solid-phase extraction.^[12]

The large-scale production of molecularly imprinted materials is perhaps limited by the synthetic polymerisation method used. Usually, a molecularly imprinted polymer is prepared by bulk polymerisation, resulting in a brittle monolithic polymer network. The monolith is subsequently ground in order to create a large surface area which is molecularly imprinted. However, the ground particles tend to extremely broad size distribution and shape distribution. Sieving of the particles typically yields approximately 20% of the original bulk polymer in particles of useful size.^[13] The shape of the particles remains intrinsically irregular.

The previously described preparation method is not only inefficient but often is difficult to control. However, this procedure has enabled the synthesis of MIP polymers for use as highly selective stationary phases in HPLC separations. Several approaches have been used to obtain molecularly imprinted particles with a controlled size and shape distribution. For example, suspension polymerisation has been utilised to obtain monodispersed MIP particles of several microns diameter.^[14,15] Additives put in at the beginning of the polymerisation can act as pore inducers, thereby increasing the specific surface area and efficiency of the material. Molecularly imprinted polymers with a

variety of shapes have been prepared by polymerising the MIP in specially shaped moulds. This in situ preparation of MIP's is most convenient for the filling of capillaries,^[16] columns,^[17] or membranes.^[18,19] Each desired geometry however needs optimisation of the respective polymerisation conditions without loosing the right conditions for successful imprinting. It would be advantageous to separate these two processes e.g. to prepare a molecularly imprinted material in one step, which is then processed in a separate step in a mould process resulting in a desired shape.

The more conventional approaches to the preparation of bulk polymer networks have other disadvantages as well: If the imprinting molecules are embedded in the polymer, their ability to be extracted and then rebound to the polymer is difficult. With decreasing size of imprinted particles their specific surface is intrinsically increasing. Therefore, the preparation of MIP's in the colloidal domain is desirable.

Colloidal MIP's are discrete particles of submicron size, prepared in a defined way, which may be very useful for a wider range of applications as the accessibility of the binding sites would be facilitated by colloidal MIP's. Their submicron scale diameter assures a high specific surface area and is a major advantage for this approach.^[20] The MIP can be used in a dispersed state or processed further to obtain films or surface coatings. Furthermore, colloidal MIP's can be used in dispersions to capture specific target analytes. By depositing colloidal MIP's onto a support of any defined geometry, a coating is formed having a thin functionalised surface layer. Functional surfaces with separating, catalysing, or biosensing properties can thus be prepared. To obtain more robust films, the colloidal assembly can be stabilised, e.g. by inter-particle cross-linking.

Submicron scale MIP's have been prepared by precipitation and emulsion polymerisation. Mosbach and co-workers prepared molecularly imprinted polymers by precipitation polymerisation from very dilute monomer solutions.^[21] The polymer formed contained a high proportion of discrete microspheres of diameter less than a micron. Because the effect of coalescence becomes predominant with higher solid content of the reaction mixture, this approach is limited to low solids content typically < 2 wt.-%.

Molecularly imprinted core-shell nanospheres were prepared by Whitcombe and co-workers using a two-stage emulsion polymerisation with a covalent imprinting process.^[22] A cross-linked poly(styrene) core was prepared and used as seed latex for second stage synthesis of a MIP shell. The shell was formed by copolymerisation of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and a polymerisable template, cholesteryl (4-vinyl)phenyl carbonate. In the next step, the cholesteryl ester was split by hydrolysis and a fragment of the template was thus removed. The core-shell particles prepared possessed non-covalent binding sites for a template analogue, in this case cholesterol. The core-shell particles were imprinted in the outer shell only, the core remaining inactive in regard to imprinting. Thereby, the

efficiency of extracting the template should be increased. Extending this approach, the authors designed and synthesised a template analogue with surfmer function (acts as surfactant and monomer) which imprinted the core-shell particles only at the surface of the shell.^[23]

The precipitation and emulsion polymerisation steps are kinetically controlled. Because of the dictate of kinetics, serious disadvantages such as lack of homogeneity and restrictions in the accessible composition of the molecularly imprinted particles have to be accepted. Therefore, it is of great interest to take advantage of a potential thermodynamic control for the design of nanoparticles. This is realised by having small “nanoreactors” as the essential ingredient for the formation of the nanoparticles, with the monomer and the imprinting molecules already present at the beginning of the polymerisation. The idea of polymerisation in microreactors can be realised by using suspension polymerisation, where droplets in the micrometer range are created, which can be polymerised.^[24] However, such particles, if molecularly imprinted, are rather big in size and therefore exhibit only a relatively small interface with accessible template molecules.

As early as 1973, suspension polymerisation was used as a technique to obtain smaller droplet sizes by Ugelstad et al.,^[25] who scaled down the droplet size to several hundred nanometers by shearing the suspension. A co-stabiliser added to the disperse phase suppressed diffusion processes in the continuous phase in order to create a stable emulsion with a homogeneous size, so-called miniemulsions. Nanodroplets are stabilised by a hydrophobic agent against Ostwald ripening during the miniemulsion polymerisation. With this technique, a nearly 1:1 transfer of colloidal monomer droplets into polymerised latices is possible.^[26] Therefore, miniemulsion polymerisation is particularly suited for one-step preparation of molecularly imprinted nanospheres. Both covalent and non-covalent imprinting can be approached in this manner. Figure 1 illustrates the preparation of such molecularly imprinted nanospheres and their use for molecular recognition.

In this paper, we focused on the preparation of non-covalent molecularly imprinted particles consisting of EGDMA as crosslinker and methacrylic acid (MAA) as

functional monomer using the process of miniemulsion polymerisation. Many different types of particles were prepared by varying the molar ratio of monomer to crosslinker $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}}$ and by the addition or absence of a molecular template, the chiral amino acid derivative, L- or D-boc-phenylalanine anilid (L- or D-BFA).^[27] Sodium dodecyl sulfate (SDS) was used as the surfactant and hexadecane as the hydrophobic agent to prevent Ostwald ripening of the miniemulsion. The miniemulsions and the obtained latexes were characterised by surface tension measurements, gravimetric analysis, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, ¹H NMR and ¹³C CP-MAS NMR spectroscopy, and Brunauer-Emmett-Teller (BET) gas adsorption measurements. The efficiency of the molecular imprinting effect was examined by binding experiments and quantified by UV absorption.

Experimental Part

MAA (Aldrich) was distilled under reduced pressure before use. EGDMA (Sigma) was washed with 10% NaOH, dried over MgSO₄, and distilled prior to use. 2,2'-Azo(2-methylbutyronitrile) (Fluka), sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck), and hexadecane (Fluka) were used without further purification. D- and L-boc-phenylalanine was purchased from Novabiochem (Switzerland) and used for the synthesis of D- and L-boc-phenylalanine anilid (BFA).^[27]

Polymer particles were prepared by mixing 6.0 g of a mixture of EGDMA and MAA, 250 mg (1.11 mmol) hexadecane, and 120 mg (0.625 mmol) of 2,2'-azo(2-methylbutyronitrile) (AMBN) with 50 mL water, containing 72 mg (0.25 mmol) dissolved sodium dodecyl sulfate (SDS). The molar ratio of the monomer-to-crosslinker was 0.45:1, 0.25:1, or 0:1, corresponding to 1 g (11.62 mmol) MAA and 5.0 g (25.22 mmol) EGDMA, 0.6 g (6.97 mmol) MAA and 5.4 g (27.24 mmol) EGDMA, or 6.0 g (30.27 mmol) EGDMA, respectively. In the case of imprinting, 495 mg (1.4 mmol) BFA was added to the monomer phase. The two phases were dispersed by stirring vigorously for 1 h at room temperature followed by sonicating for 2 min (Branson Digital Sonifier, Model 450-D, 60% power). The polymerisation was carried out at 80 °C with a total reaction time of 16 h. The microgel particles obtained were cleaned by diafiltration (Amicon 8400 ultrafiltration cell, polysulfone membrane).

All surface tension measurements of the latexes were performed with the K12 processor-tensiometer from Krüss employing the DuNöuy-Ring method. The radius of the Pt-Ir-ring RI12 was 9.545 mm and the wire had a radius of 0.185 mm.

The particle size by dynamic light scattering was determined using a Zetasizer 3000 HSA, Malvern Instruments (Herrenberg, Germany). Diafiltrated particles were suspended in ultrapure water and measured at a fixed scattering angle of 90°. TEM measurements were performed with a Zeiss EM 902 microscope.

Liquid ¹H NMR spectra were recorded with a Bruker DPX400 using THF-*d*₈ and CDCl₃ as solvents. The ¹H NMR and ¹³C CP-MAS NMR spectra were recorded on a Bruker



Figure 1. General scheme for the preparation of molecularly imprinted nanospheres and their use for molecular recognition: Template molecules induce the formation of binding sites during the miniemulsion polymerisation. The templates are extracted from the highly cross-linked particles and are molecularly recognised by the nanospheres selective binding sites.

AM400 spectrometer with a standard Bruker ^1H - ^{13}C double resonance MAS probe head, using 90° ^1H and 90° ^{13}C pulse lengths of $4\ \mu\text{s}$. The samples were spun at frequencies of 4 kHz. Typically, 128 scans for the ^1H and 512 scans for the ^{13}C were collected with a repetition time of typically 2 s. The samples were purified by diafiltration to separate low molecular weight compounds, e.g. surfactant and excessive template and freeze-dried prior to the NMR measurements.

The specific surface area of the microgels was determined by gravimetric nitrogen gas adsorption measurements using a IGA-001, HIDEN Analytical (Koche/Ried, Germany) equipped with a gravimetric analyser following the BET method.^[28]

For template extraction, 400 mg of cleaned and dried microgel was suspended in 20 mL THF, centrifugated and the supernatant decanted. This step was repeated a total of five times. The template concentration in the supernatant was measured by UV absorption (Spectramax Plus, Molecular Devices). For binding studies 50 mg extracted and dried microgel were suspended in 5, 10, or 20 mL of a 0.001 M BFA solution in methanol/water (1:1, v/v). After sitting over night (20 h), the suspension was separated by ultracentrifugation (20 000 rpm, 35 min), and the amount of template in the supernatant was quantified by UV absorption.

Results and Discussion

As a first set of experiments, stable miniemulsions with the hydrophobic ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as only monomer and mixtures of this crosslinker with the hydrophilic methacrylic acid (MAA) with a molar ratio of $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}}$ of 0.25:1 or 0.45:1 were prepared. Due to the high water solubility of MAA, partitioning of the MAA in the water phase was expected. However, after polymerisation, coagulate-free and stable dispersions were obtained with a conversion of $98 \pm 2\%$.

The TEM images shown in Figure 2, revealed that spherical particles with a rather broad size distribution were formed. In order to obtain imprinted particles, the water-insoluble template molecules, L- or D-boc-phenylalanine anilid, were added to the monomer phase prior to miniemulsification. The absence or presence of the template molecule during particle preparation did not appear to influence the size of the resulting particles (see Figure 2 (a) and Figure 2 (b), respectively). In both cases, particles with a diameter of 50 nm up to 300 nm diameter were formed with the average particle diameter equal to approximately 110 nm.

The apparent hydrodynamic diameter of the particles was determined by dynamic light scattering (DLS) at a fixed angle (for the characteristics see Table 1). The reported values from the DLS measurement represent the average particle diameter considering that DLS at a fixed angle does not allow for the exact determination of the particle size distribution. However, the data showed that the average hydrodynamic particle diameter was 200 ± 20 nm regardless of the composition of the initial miniemulsion. Additionally, the presence or absence of the template molecules

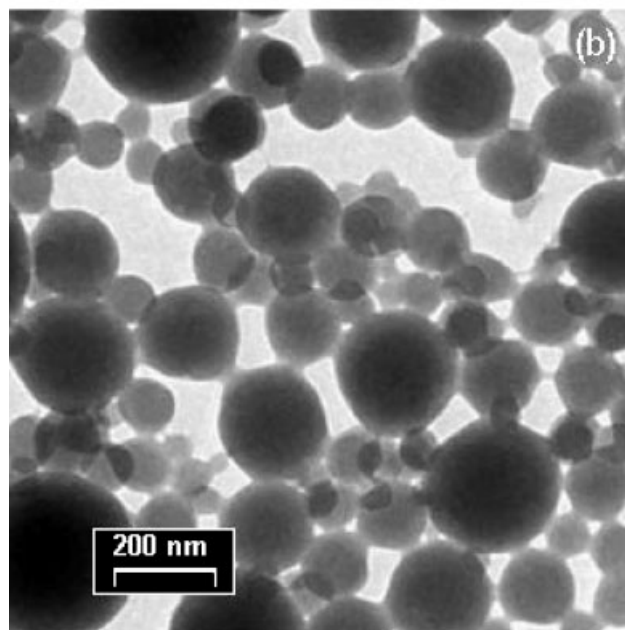
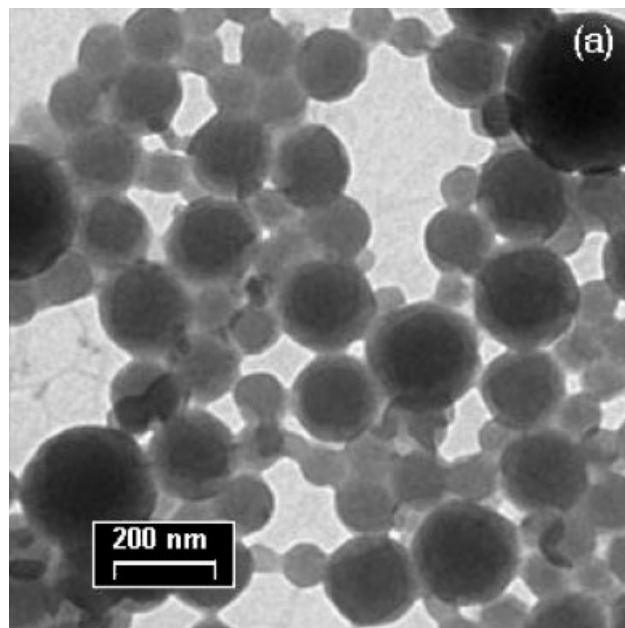


Figure 2. Transmission electron microscope photograph of particles: (a) polymer **3**, prepared in absence of template and (b) polymer **6**, prepared in presence of template.

did not result in any changes in the stability of the particles or of the particle size.

In order to suppress homopolymerisation of MAA in the water phase, the hydrophobic initiator AMBN was used for initiation exclusively inside the droplets. The high conversion of the miniemulsions to latexes suggests that no *homo*-PMAA is formed. Furthermore, NMR measurements failed to detect any free MAA or dissolved *homo*-PMAA in the

Table 1. Molar composition of the miniemulsion, solid content of the latex by gravimetric analysis, apparent average particle size after polymerisation by dynamic light scattering, and specific surface area of cleaned and dried, but not extracted particles by BET nitrogen adsorption measurement.

μ -Gel	Composition	Molar ratio	Template	Solid content	Particle size	Specific surface area
				wt.-%	nm	$\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
1	EGDMA	1	none	11.4	210	n.d. ^{a)}
2	MAA/EGDMA	0.25:1	none	11.6	205	53.2 ± 3
3	MAA/EGDMA	0.45:1	none	11.3	185	58.9 ± 3
4	MAA/EGDMA	0.25:1	L-BFA	12.0	220	57.1 ± 3
5	MAA/EGDMA	0.25:1	D-BFA	12.0	215	57.9 ± 3
6	MAA/EGDMA	0.45:1	L-BFA	12.1	215	56.9 ± 3
7	MAA/EGDMA	0.45:1	D-BFA	11.9	205	n.d. ^{a)}

^{a)} n.d.: not determined.

water phase of the final latex indicating that the MAA was copolymerized and incorporated in the particles. This situation is very similar to the formation of amphiphilic copolymers from the miniemulsified state where one monomer forms the droplets and the other is entirely soluble in the continuous phase.^[29]

Surface tension measurements indicated the effectiveness of the surfactant for the formation of the particle surface. It is known for miniemulsion systems, that before and after polymerisation the surfaces of the particles are not completely covered by surfactant molecules. This results in surface tensions above the surface tension of SDS at its critical micelle concentration (CMC) since there is an equilibrium between the surfactant molecules on the particle surface, in the water phase (molecularly dissolved or as micelles), and at the air/water interface.^[30] In the case of an ideal miniemulsion, the surface tension is expected to stay almost constant during the reaction process due to the stability of the particle's surface hydrophobicity and size of the droplets. Table 2 summarises the surface tensions of the EGDMA miniemulsions before and after polymerisation with different amounts of MAA and with or without the presence of the template molecule. Since the particle sizes were very similar, the surface tension of latexes were only affected by the chemical nature or the topology of the

particle surface. The surface tension of the unreacted miniemulsions did not change with increasing MAA content or addition of the template. However, in the case of the final latexes the surface tension was significantly lowered by the presence of the template. This observation clearly shows a strong effect of the template on the latex surface composition. The lower surface tension at the air-water interface indicates a lower interfacial free energy at the particle-serum interface. Hence, the particle surfaces are clearly changing with the template used during the polymerisation. This change may either be a morphological one or a chemical one at the particle's surface, or a combination of both. These are most likely the MAA units which are expected to be close to the particle surface providing stability and substituting SDS molecules.

It was shown, that the specific surface of the particles is almost unaffected by their chemical composition (see Table 1). Nitrogen adsorption BET measurements reveals almost identical values of 57.1 or $53.2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ for poly-(MAA-co-EGDMA) particles prepared in the presence (sample 4) or absence of template molecules (sample 2), respectively. However, extraction of the template substantially increased the specific surface of particles prepared in the presence of template drastically. Extraction of particles 4 with THF, an excellent solvent for the template, increased the specific surface to $79.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. If a non-imprinted latex is treated with THF in the same way, no change in the BET-surface is observed. The increase in case of imprinting indicates the formation of nanopores when the BFA included during the particle preparation is extracted. The volume of the BFA molecules was larger than the volume of nitrogen molecules. Therefore, the space in the copolymer occupied by the BFA molecules leads to free space after their extraction and nitrogen can then adsorb in this space.

The copolymerisation of the functional monomer MAA and the crosslinker EGDMA as well as the inclusion of the template BFA during the miniemulsion polymerisation process was evidenced by solid state ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy. Figure 3 (a) shows the appropriate spectra of

Table 2. Surface tension of the miniemulsions after stirring and sonicating, and of the final latexes.

μ -Gel	Miniemulsion surface tension, stirred	Miniemulsion surface tension, sonified	Latex surface tension
	$\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	$\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	$\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$
1	33.4 ± 2	41.0 ± 2	62.1 ± 2
2	33.5 ± 2	38.4 ± 2	59.7 ± 2
3	32.5 ± 2	37.8 ± 2	59.8 ± 2
4	32.7 ± 2	38.2 ± 2	43.6 ± 2
6	32.5 ± 2	38.1 ± 2	44.6 ± 2

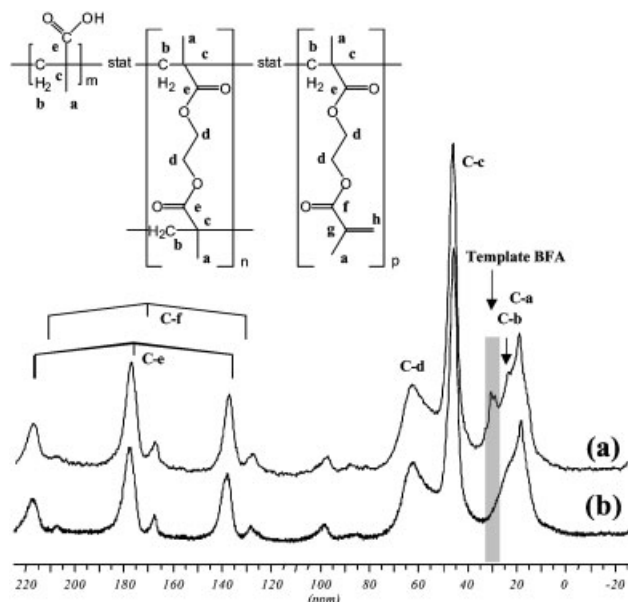


Figure 3. Solid-state ^{13}C CP-MAS NMR spectra of (a) microgel **4** before extraction, and (b) microgel **4** after extraction. The signals C-a to C-f are assigned to the corresponding carbons in the copolymer. The signal at 28 ppm corresponds to the template BFA and is present only in (a).

particles **4**. The particles were prepared in presence of the template, diafiltrated, but not extracted. The strong signal at 18.6 ppm corresponds to the methyl groups of both MAA and EGDMA (C-a). The shoulder at 23 ppm is evoked by the methylene groups (C-b), thereby indicating reacted double bonds. The sharp and intensive signal at 45.7 ppm is caused by the quaternary carbons (C-c) and indicates the polymerisation reaction, too. The carbons of the ethylene glycol unit appear at 62.4 ppm (C-d). The strong signal at 176.8 ppm is accorded to the carbonyl carbons of MAA and EGDMA (C-e). The weaker signal at 168 ppm and its equidistant spinning side-bands refer to carbonyl groups of EGDMA in vicinity to a non-reacted double bond (C-f). The presence of non-polymerised double bonds in the latex was confirmed by a simple bromine test. Br_2 solution added to the latex was discoloured. Thereby, a quantification of the two differing carbonyl signals at 176.8 ppm (C-e) and 168 ppm (C-f) by integration allows for an estimation of the amount of unsaturated double bonds in the polymer network. We calculated that 16% of the initially contained double bonds in the polymerisation mixture was still unreacted after the miniemulsion polymerisation. Assuming a quantitative polymerisation, it is concluded that 36% of the EGDMA monomers still contain in addition to a reacted double bond a free one which is still potentially available for other chemical reactions. In other words, 64% of the crosslinker is reacted with both polymerizable groups, thereby indicating the high degree of crosslinking within the particles. The signal at 97 ppm was assigned to

the reacted initiator. The signal at 30 ppm corresponds to the methyl carbons of the *t*-butyl group of BFA thus indicating the incorporation of the template into the crosslinked particles.

Figure 3 (b) shows the corresponding ^{13}C CP-MAS NMR-spectra of imprinted particles **4**, which were extracted with THF. The only difference in the spectra is the absence of the signal at 28 ppm thus illustrating the successful extraction of the template.

The inclusion of the template during the miniemulsion polymerisation and the extraction of the template from the strongly crosslinked microgels by THF was also proved by ^1H NMR spectroscopy. Figure 4 (a) shows the molecular structure of BFA and the corresponding experimental

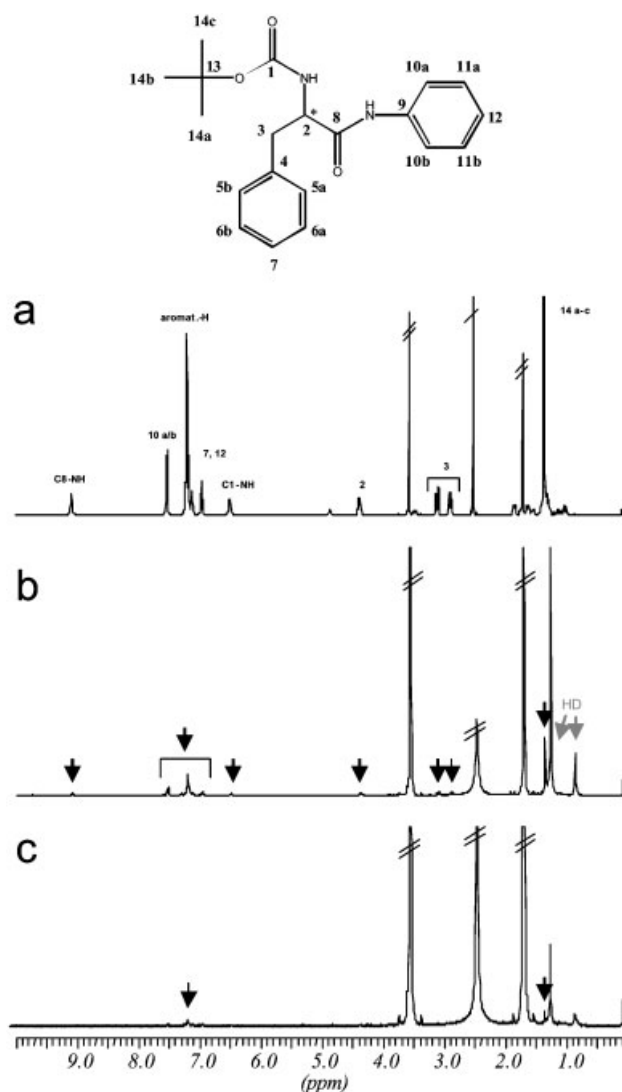


Figure 4. Molecular structure of BFA and ^1H NMR spectra of (a) the pure template BFA, (b) microgel **4** dispersed in THF before extraction showing BFA-signals of high intensity, and (c) microgel **4** after extraction with BFA signals of very low intensity. The barred signals are attributed to the solvent THF and water.

^1H NMR spectra. The protons of the *t*-butyl-group (H-14) give a sharp and intensive singlet signal at a chemical shift of $\delta = 1.35$ ppm. The signals at $\delta = 6.90\text{--}7.35$ ppm correspond to the aromatic protons of the phenyl rings (H-5-7, H10-12). The two multiplets at $\delta = 3.12$ ppm and $\delta = 2.90$ ppm result from the stereotopic interaction of the methylene protons (H-3) with the single proton (H-2) of the asymmetric centre.

Polymer particles **4**, prepared in presence of the template, were diafiltrated, freeze dried, suspended in THF, and measured by ^1H NMR (Figure 4 (b)). All observed signals correspond to the solvent plus the template. Due to the high insolubility and immobility of the crosslinked network, no signal corresponding to the poly(MAA-*co*-EGDMA) network was seen. Figure 4 (c) shows the spectra of microgels **4**, which were extracted with an excess of THF. The signal of BFA was significantly decreased. If the observed spectrum is magnified, only traces of the template signals could be seen. The set of ^1H NMR experiments clearly showed the inclusion of the template during the microgel preparation, as well as the extraction of most of the template with THF.

The concentration of extracted template molecules was quantified by UV absorption. Cleaned particles with the template included were suspended in a small volume of THF. The particles were then separated from the serum by centrifugation and the template concentration in the serum was measured by UV absorption. This procedure was repeated five times to remove as much of the template as possible. The concentration of template molecules in each of the extracts from the particles was summed up and compared to the absolute amount of template initially contained in the miniemulsion. $75 \pm 5\%$ of the initial template molecules added to the miniemulsion was extracted from the particles **4** and **5** indicating that at least 75% of the template was incorporated into the copolymer during the polymerisation. The other 25% may have been included as well but been bound deeply in the core of the particles not being accessible by extraction. About 80% of the regained template was extracted in the first extraction step; 95% were extracted in three steps. From polymer particles **6** or **7** only $56 \pm 5\%$ were extracted with THF. This considerably lower values indicate a less effective imprinting process for these copolymer network systems.

Rebinding of the Template

The most important feature of the copolymer network particles after extraction of the template was their ability to selectively rebind molecular species which were quantified by simple partition experiments. Extracted particles were suspended in an enantiopure template solution and separated by centrifugation. The template concentration before and after particle suspension was measured by UV absorption. The concentration of missing template in the solution

after suspension and removing of the particles was assigned as that portion being bound to the particles. The amount of particle-bound template was plotted as a function of the total amount of template. Figure 5 (a) displays the binding data of particles composed of poly(MAA-*co*-EGDMA) with a molar ratio of $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}} = 0.45:1$. Non-imprinted microgel **3** and L-BFA-imprinted microgel **6** were titrated with L-BFA. The imprinted polymer was also titrated with its counterpart, the D-enantiomer. The binding of the D-enantiomer and the binding to the non-imprinted polymer can be regarded as control experiments. With increasing amount of template molecules in the suspension an increasing discrimination in the binding properties is seen. The adsorption of L-BFA to the non-imprinted microgel **3** and the binding of D-BFA to L-imprinted

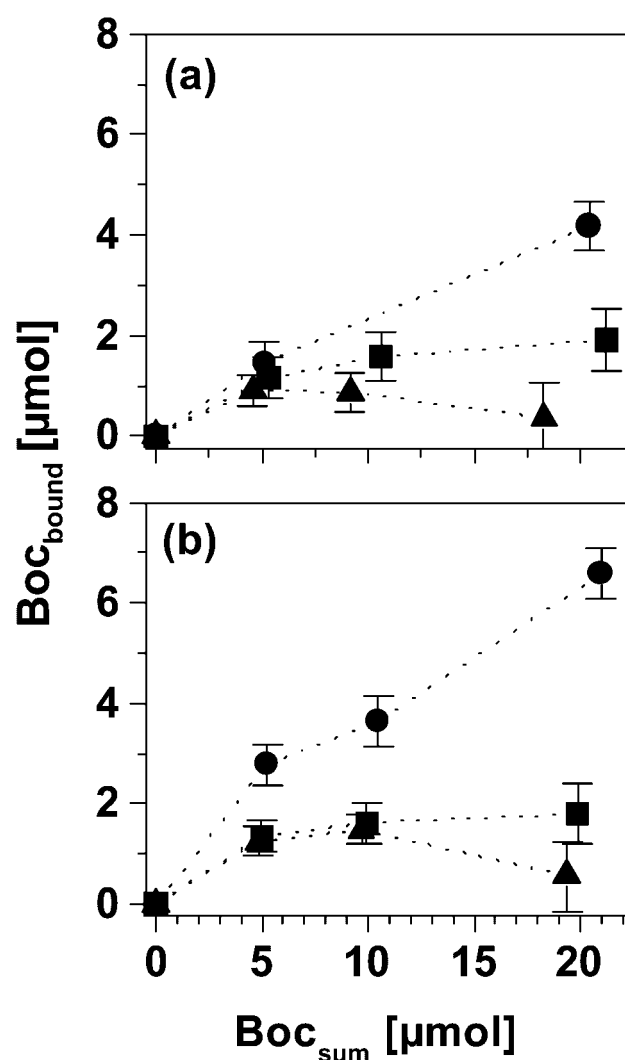


Figure 5. Rebinding of BFA to microgels: (a) binding of L-BFA to microgel **6** (●), binding of D-BFA to microgel **6** (▲), and binding of L-BFA to microgel **3** (■); (b) binding of L-BFA to microgel **4** (●), binding of D-BFA to microgel **4** (▲), and binding of L-BFA to microgel **2** (■).

polymer **6** remained at values well beyond 2 μmol BFA regardless the overall concentration of BFA in the suspension. At low concentration in BFA, the binding of the L-enantiomer to the L-imprinted polymer was about the same, but with higher concentration the situation changed. When 20 μmol BFA is contained in the suspension (corresponding to 2.94 μmol BFA per mg particles), the amount of adsorbed L-enantiomer was more than 10 times the amount of bound D-BFA and about twice higher than the amount of L-BFA bound to non-imprinted polymer.

The differences in the binding properties of the template to poly(MAA-co-EGDMA) with a molar ratio of $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}} = 0.25:1$ was pronounced even stronger (Figure 5 (b)). Here all binding in the control experiments remained below 2 μmol bound BFA as well. The L-enantiomer was bound to the L-imprinted polymer **4** with 10-fold abundance if compared to the binding of the D-enantiomer, and 4-fold if compared with the binding to the non-imprinted polymer.

Partition experiments with L-imprinted and non-imprinted polymers clearly showed a different binding behaviour for the L-enantiomer compared to the D-enantiomer. Binding of the D-template to L-MIP's or binding of any template to non-imprinted polymers was attributed to non-specific adsorption. In contrast, specific binding due to molecular recognition of the template could be assumed for the L-template with the L-MIP's because the amount of binding for this "correct" pairing was substantially higher. This high binding might partially be due to non-specific adsorption as in the other pairings, so that the L-enantiomer binds to the L-MIP both by specific and non-specific interaction.^[31] In conclusion, selectivity can only be found when specific binding is the predominant mechanism as using the "correct" pairing of MIP's and template. One would, however, expect differences in the free binding energy for specific and non-specific binding. Therefore, we are currently performing microcalorimetric studies to gain further insight into the thermodynamics during the binding.^[32]

Conclusion

Microgel particles composed of poly(MAA-co-EGDMA) and poly(EGDMA), were synthesised by miniemulsion polymerisation allowing direct non-covalent imprinting of a chiral amino acid derivative. The best enantioselective molecular recognition properties were found for poly(MAA-co-EGDMA) nanospheres with a molar ratio of the monomer to crosslinker $n_{\text{MAA}}:n_{\text{EGDMA}} = 0.25:1$. This new one-stage process for the preparation of molecularly imprinted polymers with a high specific surface area and defined shape may allow for the exploitation of new affinity processes using fully synthetic receptors.

The preparation of MIP's by miniemulsion polymerisation is highly efficient both in regard to the yield of useful particles as well as in recycling of the templates. The MIP

nanospheres have a high specific surface area and can be used for specific capturing of a substance from dilute solutions for sampling of analytes or specific removal of toxic reagents. If catalytically active nanospheres are prepared, they could be used in suspension to provide a very high number of easily accessible catalytic sites at the colloidal surface. Deposition of the microgels will also enable the production of coatings for sensor surfaces or membranes.^[33] Additionally, if the deposition process is not geometrically restricted, analytical or medical devices in any desired shape or geometry can be functionalized by molecularly imprinted polymer nanospheres.

Acknowledgement: The authors thank V. Sciaratta (Fraunhofer IGB) for the BET measurements, K. Dirnberger and C. D. Eisenbach for NMR measurements of the template, and C. Mirley and W. Richtering for helpful discussions. D. V. thanks the Land Baden-Württemberg for a "Doktorandenstipendium" by the "Landesgraduiertenförderung". G. T. thanks the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF), the Fraunhofer Society, and the Land Baden-Württemberg for financial support of a junior research group ("Nachwuchsforscherguppe") on biomimetic interfaces.

Received: October 31, 2001

Revised: March 28, 2002

Accepted: May 27, 2002

- [1] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467.
- [2] [2a] G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958. [2b] G. Wulff, "Templated Synthesis of Polymers – Molecularly Imprinted Materials for Recognition and Catalysis", in: *Templated Organic Synthesis*, 1st edition, F. Diederich, P. J. Stang, Eds., Wiley-VCH, Weinheim 2000, p. 39 ff.
- [3] B. Sellergren, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1071.
- [4] L. I. Andersson, *J. Chromatogr. B* **2000**, *739*, 163.
- [5] H. Asanuma, T. Hishiya, M. Komiyama, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1019.
- [6] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1948.
- [7] B. Sellergren, M. Lepistoe, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853.
- [8] G. Wulff, S. Schauhoff, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395.
- [9] B. Sellergren, "Fundamental aspects on the synthesis and characterization of imprinted network polymers", in: *Molecularly imprinted polymers*, B. Sellergren, Ed., Elsevier, Amsterdam 2001, chapter 2.
- [10] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 317.
- [11] P. T. Vallano, V. T. Remcho, *J. Chromatogr. A* **2000**, *887*, 125.
- [12] [12a] L. I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia* **1997**, *46*, 57; [12b] C. Berggren, S. Bayoudh, D. Sherrington, K. Ensing, *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 105; [12c] Y. B. Chen, M. Kele, P. Sajonz, B. Sellergren, G. Guiochon, *J. Anal. Chem.* **1999**, *71*, 928.
- [13] O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **2000**, *889*, 15.

- [14] K. Hosoya, Y. Iwakoshi, K. Yoshizako, K. Kimata, N. Tanaka, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 256.
- [15] A. G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3769.
- [16] [16a] S. Nilsson, L. Schweitz, L. I. Andersson, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 884; [16b] O. Brueggemann, R. Freitag, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 43.
- [17] J. Matsui, Y. Miyoshi, R. Matsui, T. Takeuchi, *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 1017.
- [18] J. Mathew-Krotz, K. J. Shea, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8154.
- [19] S. A. Piletsky, T. L. Panasyuk, E. V. Piletskaya, I. A. Nicholls, M. Ulbricht, *J. Membr. Sci.* **1999**, *157*, 263.
- [20] M. Antonietti, C. Kresge, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1998**, *3*, 149.
- [21] L. Ye, R. Weiss, K. Mosbach, *Macromolecules* **2000**, *33*, 8239.
- [22] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1851–1859.
- [23] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 830.
- [24] J. V. Dawkins, “*Aqueous Suspension Polymerisation in Comprehensive Polymer Science*”, G. Allen, J. C. Bevington, Eds., Pergamon Press, Oxford 1989, p. 231.
- [25] J. Ugelstad, M. S. El-Aasser, J. W. Vanderhoff, *Polym. Lett. Ed.* **1973**, *11*, 503.
- [26] [26a] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222; [26b] K. Landfester, N. Bechthold, S. Förster, M. Antonietti, *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 81; [26c] K. Landfester, M. Willert, M. Antonietti, *Macromolecules* **2000**, *33*, 2370.
- [27] D. J. O’Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 144.
- [28] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.
- [29] M. Willert, K. Landfester, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, in press.
- [30] K. Landfester, N. Bechthold, F. Tiarks, M. Antonietti, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2679.
- [31] K. Haupt, A. Dzgoev, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 628.
- [32] A. Weber, M. Dettling, H. Brunner, G. Tovar, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 824.
- [33] M. Lehmann, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Desalination* **2002**, *149*, 315.

9 Funktionalisierung von Oxidoberflächen zur gerichteten Proteinimmobilisierung

G. E. M. Tovar, C. Hoffmann, H. Brunner

9.1 *Self-Assembled Monolayers* zur Proteinimmobilisierung

Oxidische Materialien bilden in der Chiptechnologie und bei optischen Sensoren häufig die Grenzflächen zur organischen Phase. Organosilanmoleküle können sich an einer Oxidoberfläche zu nanoskopisch dünnen hochorganisierten monomolekularen Molekülschichten, den sog. *Self-Assembled Monolayers* (SAM), anordnen.¹ Mit einer solchen, wenige Nanometer dünnen Beschichtung können die Oberflächeneigenschaften des Trägermaterials der Anwendung angepasst werden.

Proteine werden für sensorische oder katalytische Anwendungen an festen Trägern immobilisiert. Für eine optimale Funktionalität der Proteine ist häufig ihre unmittelbare chemische Umgebung von entscheidender Bedeutung. Die Oberfläche technischer Substrate wird daher für eine Immobilisierung von Proteinen durch chemische Funktionalisierung vorbereitet. Sollen die immobilisierten Proteine eine sterisch anspruchsvolle Funktion erfüllen, beispielsweise als molekulare Rezeptoren andere Proteine binden, so ist ihre Orientierung ein kritischer Parameter für diese Funktionalität. Die Effektivität molekularer Erkennungsreaktionen an einer solchen Proteinrezeptoroberfläche wird wesentlich von der Orientierung der Proteinbindestelle beeinflusst.

Oxidische Oberflächen sollten mittels SAM, die proteinbindende Gruppen tragen, für die Proteinimmobilisierung vorbereitet werden können. Um eine Vorzugsorientierung der zu immobilisierenden Proteine zu induzieren, müssen die proteinbindenden Gruppen an der SAM-Oberfläche spezifisch mit speziellen funktionellen Gruppen der Proteine wechselwirken. Dabei müssen weitere, nicht ortsgerichtete attraktive Wechselwirkungen wie elektrostatische Anziehung oder hydrophobe Wechselwirkung möglichst gering gehalten werden. Solche, oft unter dem Begriff nichtspezifische Bindung (NSB) zusammengefassten Wechselwirkungen mindern die spezifische Ausrichtung der zu immobilisierenden Proteine und induzieren häufig sogar eine Denaturierung sowie den damit einhergehenden vollständigen Funktionsverlust der Proteine.

9.1.1 Experimenteller Ansatz

Unsere Arbeiten haben zum Ziel, Proteine, die ihrerseits Rezeptorfunktion zur Bindung ihres Bindepartners haben, über eine gerichtete Wechselwirkung mit eigens funktionalisierten Oberflächen zu immobilisieren. Dazu funktionalisierten wir Oxidoberflächen mit Self-Assembled Monolayers aus funktionellen Organosilanmolekülen (Abbildung 1).

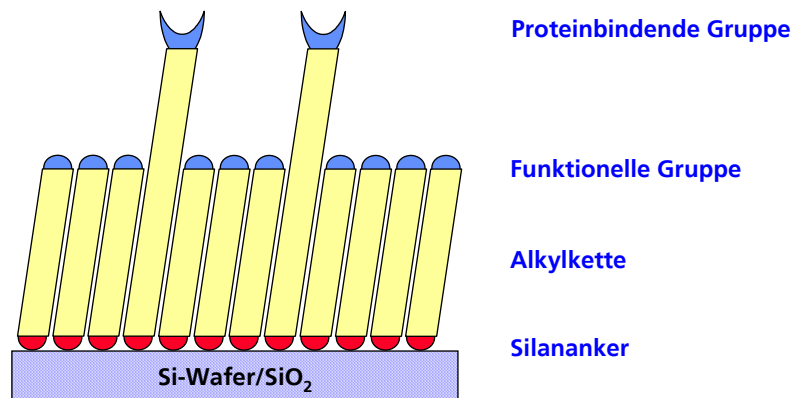


Abbildung 1: *Self-Assembled Monolayer* zur Proteinimmobilisierung.

Durch chemische Umsetzungen an den SAM-Oberflächen wurden Nitrilotriessigsäure (NTA)-Gruppen eingeführt. Die oberflächengebundenen NTA-Gruppen sollen Bestandteile gemischter Nickel-Chelatkomplexe zwischen Oberfläche und *His-tag* Proteinen sein und damit die Proteine ortsgerichtet binden (Abbildung 2). Die unspezifische Bindung (NSB) soll durch die Immobilisierung von eigens synthetisierten Oligoethylenglycol-silanen vermindert werden.

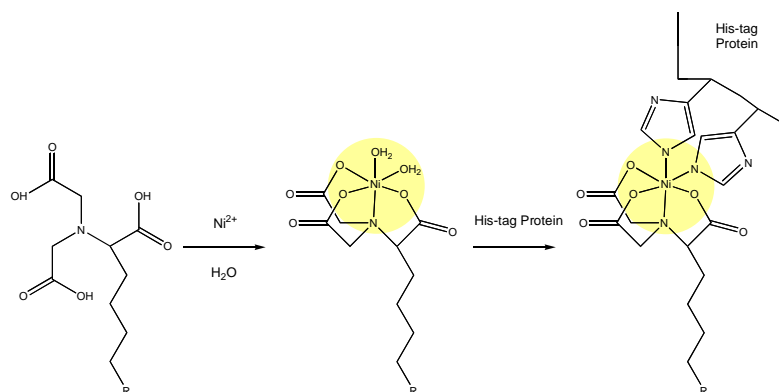


Abbildung 2: Gemischte Nitrilotriessigsäure-Nickel-*His-Tag* Protein-Chelatkomplexe.

Wir synthetisierten dazu Nitrilotriessigsäurederivate² zur direkten Umsetzung mit Epoxidsilanschichten an Si-Wafern. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an den Wafer-Oberflächen zu verringern, synthetisierten wir Organosilanderivate mit Oligoethylenoxidendgruppen. Ähnliche Moleküle minderten als Thiolat-SAM an Goldoberflächen die unspezifische Bindung zahlreicher Proteine.³ Wir untersuchen die SAM-Bildung der Oligoethylenoxidsilane in gemischten Monolagen mit alkylterminierten Silanen und quantifizierten die unspezifische Proteinbindung.

9.1.2 Material und Methoden

Die Silanfunktionalisierung und die Proteinbindung an Oberflächen wurde mittels Kontaktwinkelmessung, Ellipsometrie, Röntgenphotoelektronenspektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.

9.2 Ergebnisse und Diskussion

Die natürliche Oxidoberfläche von Siliziumwafern wurde mittels Ammoniak-Wasserstoffperoxidlösung bei 75°C hydrophilisiert und eine reine Silanolgruppenoberfläche erzeugt (Abbildung 3). Die so aktivierte Oberfläche wurde mit (3-Glycidoxypropyl)dimethylethoxysilan in Toluol umgesetzt. Die Substrate wurden in einer Soxhletapparatur mit siedendem Methylenechlorid extrahiert und die Schichtdicke der Silanschicht wurde mit Ellipsometrie zu $8.5 \pm 3 \text{ \AA}$ bestimmt (Tabelle 1). Dies entspricht einer dichten Monolage der Organosilanmoleküle.⁴ Das synthetisierte NTA-Derivat N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure wurde in einem Dimethylformamid-Methanol-Gemisch unter Zugabe von Triethylamin als Katalysator bei 60 °C umgesetzt. Diese Oberflächenreaktion führte zu einer Schichtdickenzunahme von $4 \pm 3 \text{ \AA}$, entsprechend einer Ausbeute von 70 %. Durch Überführung der Substrate in wässrige Nickelsulfatlösung wurden an der Oberfläche Ni^{2+} /NTA-Chelatkomplexe gebildet.

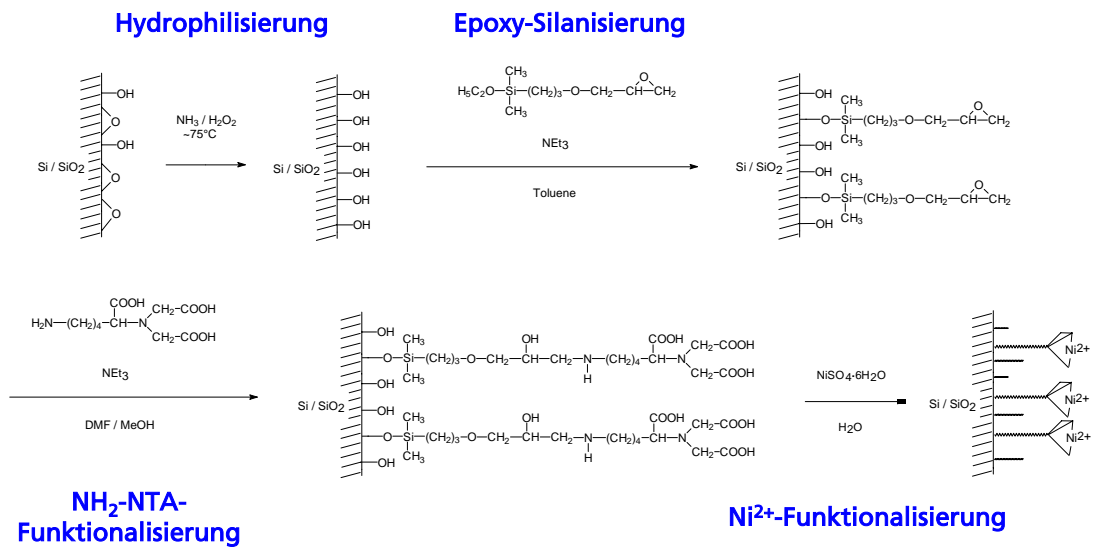


Abbildung 3: Oberflächenreaktion mit den Schritten a) Hydrophilisierung, Erzeugen dicht gepackter Silanolgruppen, b) Epoxy-Silanisierung, c) Einführen der Nitrilotriessigsäuregruppen und d) Bildung von Ni²⁺-Chelatkomplexen an der Oberfläche.

Tabelle 1: Ellipsometrie- und Kontaktwinkelmessungen zur Quantifizierung der sequentiellen Oberflächenreaktion.

Reaktionsstufe	Ellipsometry	Kontaktwinkel	
	Δd [Å]	θ_a [°]	θ_r [°]
hydrophil. SiO ₂	0	17 ± 2	< 10
Epoxyasilan.	8.5 ± 2	64 ± 2	37 ± 2
NH ₂ -NTA	4 ± 3	60 ± 2	37 ± 2
Ni ²⁺	2.5 ± 2	59 ± 2	36 ± 2
His ₃	8 ± 3	63 ± 3	32 ± 3
His-Tag RBD	24 ± 3	70 ± 3	24 ± 3

Neben ellipsometrischen Messungen wurde die Oberflächen-Reaktionsfolge mit Kontaktwinkelmessungen kontrolliert (Tabelle 1). Diese Messungen sind mit der Einführung der entsprechenden funktionellen Gruppen an der Oberfläche gut vereinbar. Mittels Elektronenspektroskopie zur Chemischen Analyse (ESCA) konnte die Einführung von Stickstoff und Ni²⁺ an der Oberfläche eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 4). Zudem ist die Einführung und die Abreaktion der Epoxyfunktion mit den Kohlenstoff-C1s-Spektren zu belegen (Abbildung 5).

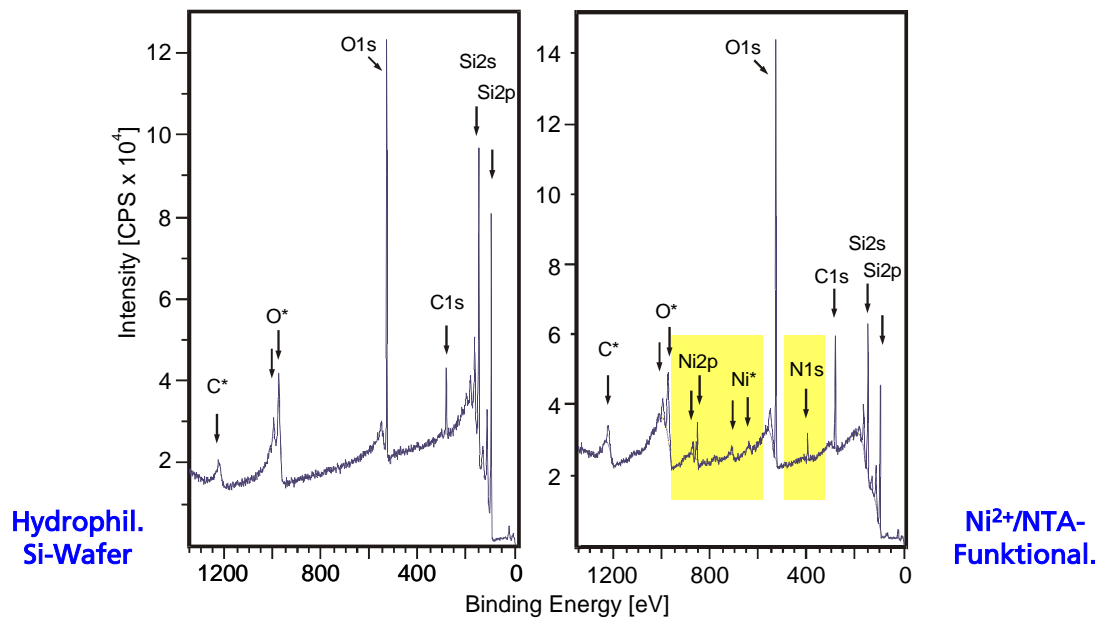


Abbildung 4: Elektronenspektroskopische Messungen zur Chemischen Analyse (ESCA) belegen die Einführung von Stickstoff und Nickel an der Oberfläche.

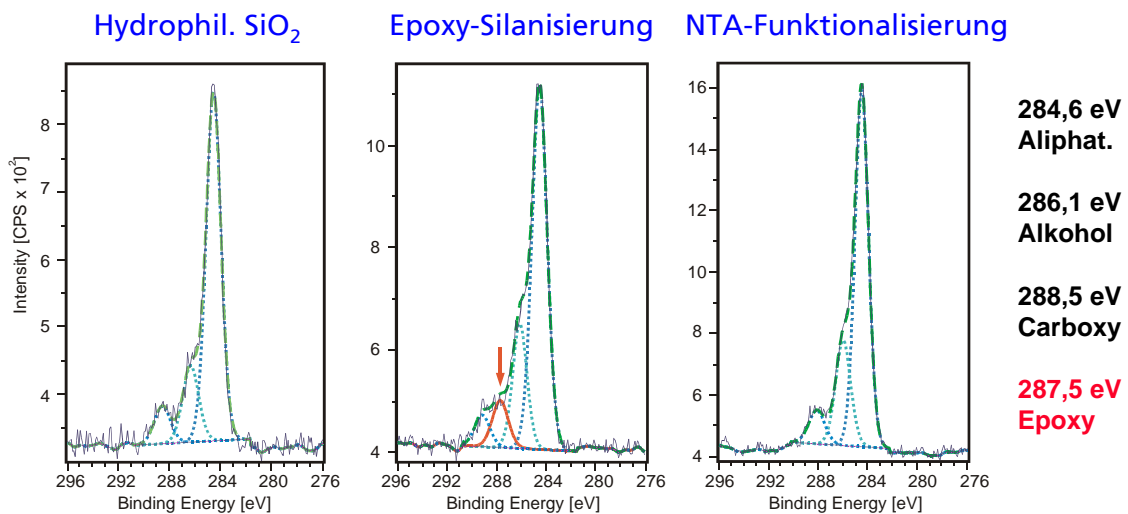


Abbildung 5: Kohlenstoff-C1s-Detailspektren der Elektronenspektroskopie zur Chemischen Analyse (ESCA) weisen die Einführung und Abreaktion der Epoxyfunktionen an der Oberfläche nach.

Die Adsorption von einem *His-Tag*-modifizierten Proteins, der *Ras Binding Domain* (RBD), wurde mittels einer eigens konstruierten Messzelle *in situ* durch ellipsometrische Messungen verfolgt (Abbildung 6). Der zeitliche Verlauf der Adsorption von *His-Tag*-RBD an die funktionalisierte Oberfläche deutet auf eine diffusionskontrollierte Adsorptionskinetik (Abbildung 7).

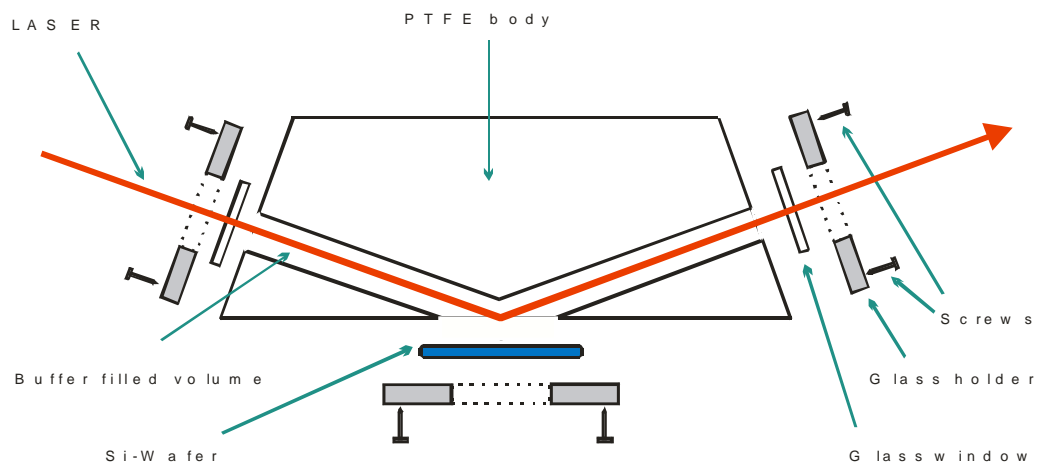


Abbildung 6: Messzelle zur *In situ* Ellipsometrie.

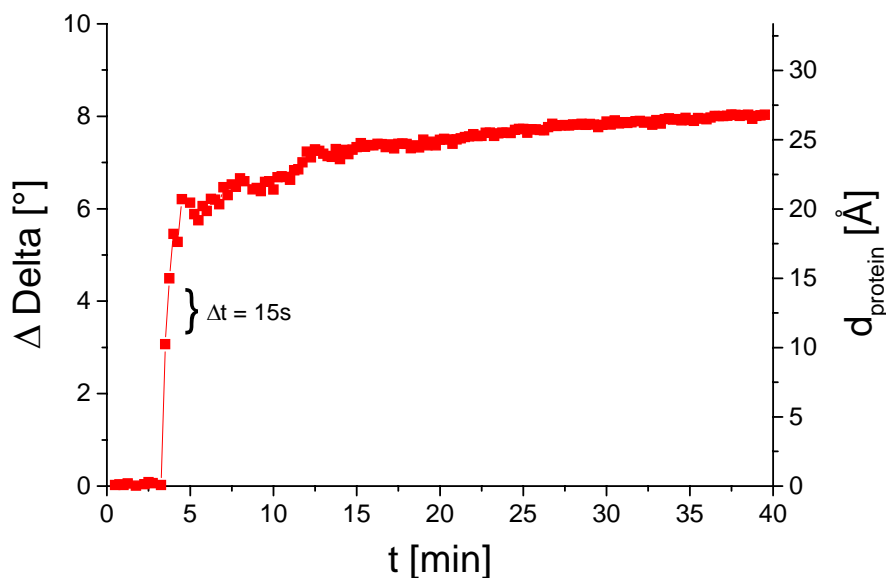


Abbildung 7: Messung der Adsorption von *His-Tag*-RBD an die Ni²⁺/NTA-funktionalisierte Oberfläche durch *In situ* Ellipsometrie.

Die gemessene Dicke der *His-Tag*-RBD-Schicht deutet auf die Bildung einer dicht gepackten Proteinmonoschicht unter Ausbildung eines gemischten NTA/Ni²⁺/*His-Tag*-Chelatkomplexes an der Oberfläche hin. Die Aktivität des Oberflächen-gebundenen RBD als Rezeptor für die Ras-Bindung konnte mittels Matrix-unterstützter Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) in Zusammenarbeit mit Spengler und Bouschen nachgewiesen werden.⁵

Da Kontrollmessungen an nicht modifizierten oder mit anderen Silanen funktionalisierten Oberflächen zeigten, dass die unspezifische Adsorption von *His-Tag*-RBD nicht *per se* vernachlässigbar ist, wurde eine über das bisherige Konzept hinausgehende Strategie zur Verhinderung unspezifischer Proteinadsorption an Organosilan-funktionalisierten Oberflächen verfolgt. In Analogie zu Untersuchungen mit Thiolat-SAM an Goldoberflächen wurde ein Syntheseplan zur Darstellung eines neuartigen Oligoethylenglycolsilans aufgestellt (Abbildung 8).

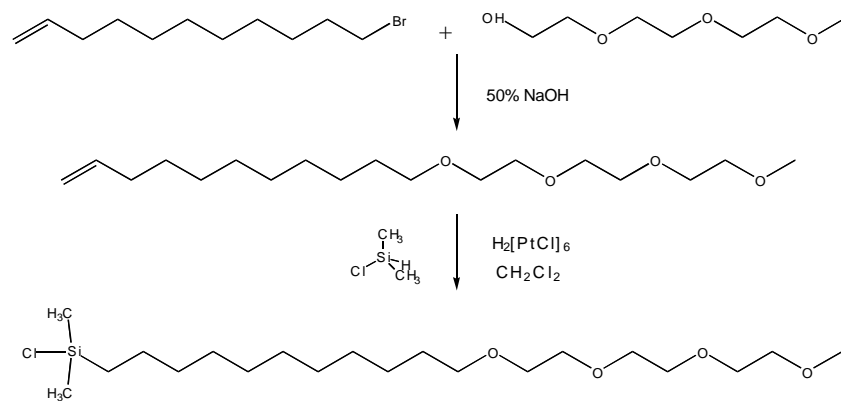


Abbildung 8: Reaktionsschema zur Synthese von Methoxytriethylglycolundecenyl-dimethylchlorosilan.

Aus Methoxytriethylglycolundecenyl-dimethylchlorosilan und Dodecyl-dimethylchlorosilan wurden binär gemischte SAM synthetisiert und in mit Ellipsometrie- und Kontaktwinkelmessungen charakterisiert (Abbildung 9). Durch die Wahl der Zusammensetzung der Silanisierlösung ist die Zusammensetzung der erhaltenen SAM steuerbar. Adsorptionsexperimente mit *His-Tag*-RBD an den binär gemischten SAM zeigen eine hohe unspezifische Adsorption an Silan-Monolagen mit hohem Anteil an alkylterminierten Molekülen auf (Abbildung 10). Oberhalb eines kritischen Anteils an Oligoethylenglycolsilan-Gehalt in der Silanisierlösung ($X_{EG} > 0.8$) wird die unspezifische Adsorption von *His-Tag*-RBD vollständig verhindert.

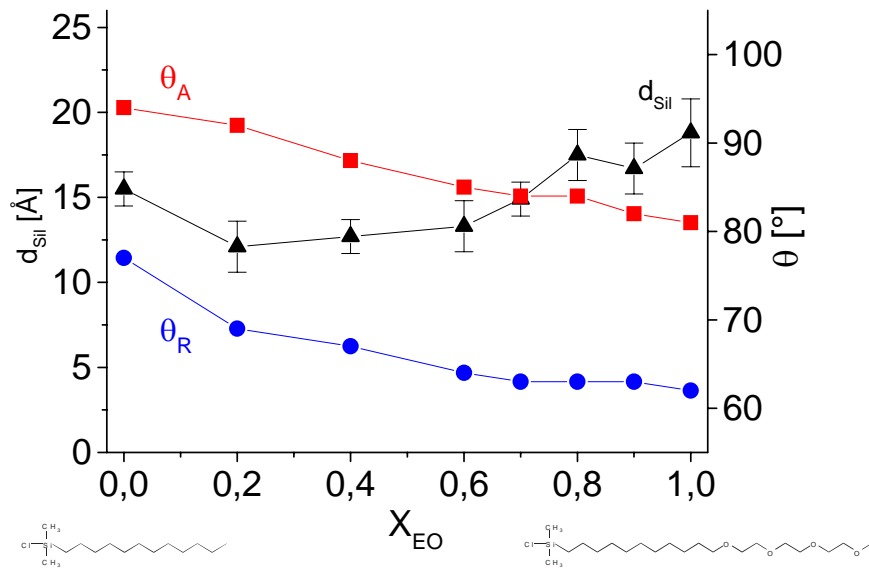


Abbildung 9: Ellipsometrische Schichtdicke und Wasser-Kontaktwinkel binär gemischter SAM aus Methoxytriethylenglycolundecenyl dimethylchlorsilan und Dodecyldimethylchlorsilan in Abhängigkeit des Molenbruchs.

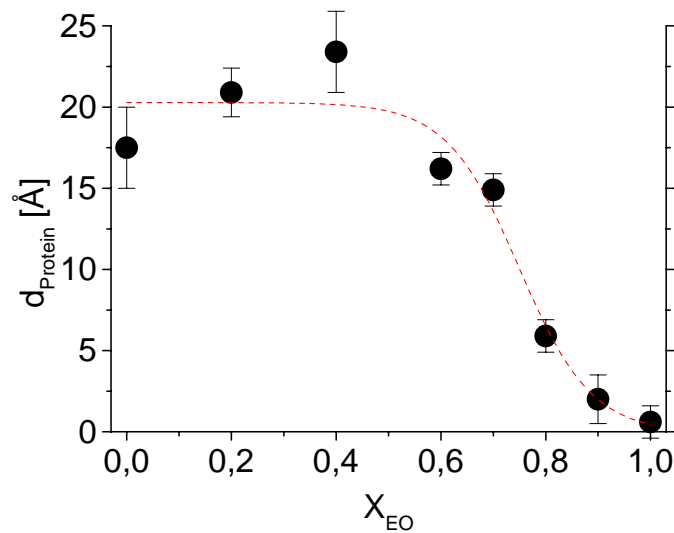


Abbildung 10: Unspezifische Adsorption von *His-Tag*-RBD an binär gemischte SAM aus Methoxytriethylenglycolundecenyl dimethylchlorsilan und Dodecyldimethylchlorsilan als ellipsometrische Schichtdicke in Abhängigkeit des Molenbruchs.

9.3 Schlußfolgerung

Die Funktionalisierung von Oxidoberflächen mit Ni^{2+} /NTA-Komplexen ist durch sequentielle Oberflächenreaktionen auf der Basis von Epoxysilanen möglich. Ein *His-Tag*-funktionalisierter Proteinrezeptor konnte an den so funktionalisierten Oberflächen in aktiver Form gebunden werden. Die Synthese von maßgeschneiderten Oligoethylenglycolsilanen ist durch Hydrosilylierung zugänglich. Mit Oligoethylenglycolsilanen funktionalisierte Oberflächen verhindern die unspezifische Adsorption des Proteinrezeptors vollständig. Bei Bildung binärer SAM ist eine Verdünnung der Ethylenglycolgruppen mit bis zu 20 % ohne Verlust der proteophoben Wirkung möglich. Eine zukünftige, optimierte Struktur von SAM zur Proteinbindung könnte durch die Co-Immobilisierung von Oligoethylenglycolsilanen mit maßgeschneiderten Silanen mit Oligoethylenglycol-element und Protein-bindender Funktion bestehen (Abbildung 11).

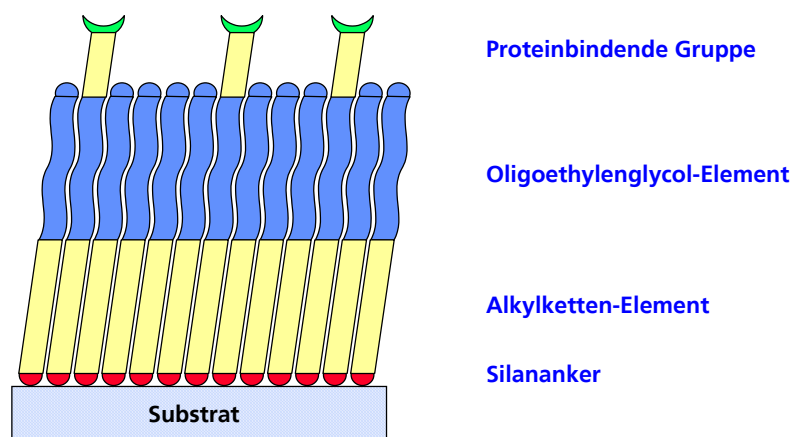


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Oberfläche aus binär gemischtem SAM aus Oligoethylenglycolsilanen und Protein-bindende Gruppen tragenden Silanen.

Wir danken dem BMBF für die Förderung des Verbundprojektes FKZ 0310993 und unseren Verbundpartnern M. Engelhard, R. Seidel und C. Becker, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, für RBD, U. Vohrer, J. Mayer und C. Oehr vom Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart, für ESCA-Messungen sowie J. Bernhagen und C. Schneider-Fresenius, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, für hilfreiche Diskussionen.

9.4 Literatur

- ¹ (a) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films – From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*. **1991**, Academic Press, New York. (b) Ulman, A. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1533-1554.
- ² (a) Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A., *J. Chromatogr.*, **1987**, *411*, 177-184. (b) Dietrich, C., Schmitt, L., Tampe, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 9014-9018. (c) Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G.M., *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 490-497. (d) Liley, M., Keller, T.A., Duschl, C., Vogel, H., *Langmuir*, **1997**, *13*, 4190-4192. (e) Schmid, E.L., Keller, T.A., Dienes, Z., Vogel, H., *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 1979-1985.
- ³ (a) Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M., Laibinis, P.E., *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102*, 426-436. (b) Prime, K.L., Whitesides, G.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10714-10721.
- ⁴ Tsukruk, V.V., Luzinov, I., Julthongpipit, D., *Langmuir*, **1999**, *15*, 3029-3032.
- ⁵ (a) Bouschen, W., Spengler, B., Hoffmann, C., Tovar, G., "Identifizierung von Proteinliganden funktionalisierter Oberflächen durch MALDI-MS", *Dt. Ges. Massenspekt. - Diskussionstag.*, 27. 02. – 01. 03. **2000**, Berlin. (b) Bouschen, W., Hoffmann, C., Tovar, G., Spengler, B., "Analysis of biological samples and functionalized surfaces with MALDI-MS and Scanning Microprobe MALDI-MS", *48th Am. Soc. Mass Spectr.*, **2000**.

Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach using molecularly imprinted nanosphere composite membranes

M. Lehmann, H. Brunner, G.E.M. Tovar*

*Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology and Institute for Interfacial Engineering,
University of Stuttgart, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany
Tel. +49 (0) 711 / 970-4109; Fax +49 (0) 711 / 970-4200; email: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de*

Received 1 February 2002; accepted 15 February 2002

Abstract

A new approach of selective membrane-based separation has been developed by coating molecularly imprinted nanoparticles onto the surface of a membrane disc whereby a selective composite membrane shall be realized. The imprints at the surface of the nanoparticles are comparable to footprints of specific molecules. These molecules are present during the synthesis of the particles and serve as a molecular template, thus imprinting their shape in the forming particle. The selectivity of the nanoparticles was shown in particle suspension using an enantiomeric model template. The permeability and porosity of the nanoparticle layer were determined by experiments for investigation of feasibility under hydrodynamic aspects. The Carman–Kozeny equation was modified and validated as an applicable theoretical model. The combination of a cost-efficient membrane disc as support for an selective nanoparticle layer can provide an efficient way in purification and sensing processes.

Keywords: Selective separation; Imprinted nanoparticle; Composite membrane; Molecular recognition

1. Introduction

Specific separation of a single compound from a mixture is a key issue in downstream processing as well as in chemical sensing. For example, separation of racemic mixtures is of increasing importance in the pharmaceutical techniques are associated with high economic

industry. Often the two enantiomers of a chiral substance have completely contrary properties. Today a variety of separation techniques exist which differ, e.g., in the quantity of racemic mixture to be treated. For larger amounts crystallization is often used, whereas in laboratory scale, preparative high-pressure liquid chromatography (HPLC) is often applied. These and personnel efforts. The approach described

*Corresponding author.

Presented at the International Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM), Toulouse, France, July 7–12, 2002.

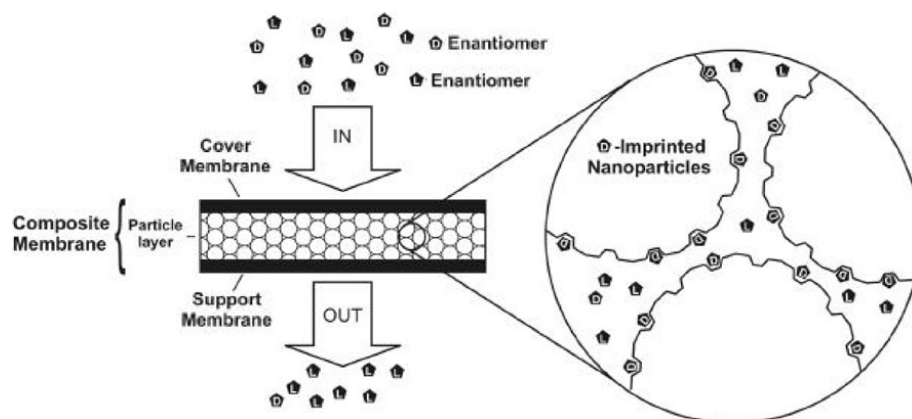


Fig. 1. Functional principle of enantioselective separations using a molecularly imprinted nanoparticle composite membrane.

below can be an efficient and easy alternative compared to the established methods for separation of small quantities of specific substances. The intention is that, e.g., a racemic mixture is run continuously or in batch mode through a composite membrane, which selectively retains one of both enantiomers. Such composite membranes consist of a common polyamide membrane disc as support and a selective coating by deposited molecularly imprinted nanospheres (Fig. 1). The technology on molecularly imprinted polymers is described in excellent reviews [1–6]. To avoid any loss of particles during the separation process, the coated membrane is covered by a second identical membrane disc and both membranes are clotted together.

Here we investigate the feasibility of this approach both by experiments and modeling. The principal hydrodynamic properties of the composite membrane set-up are evaluated by flow experiments. The Carman–Kozeny equation is modified corresponding to the experimental set-up. The modified equation is validated by calculation. The selectivity of the nanoparticles is determined in suspension.

2. Materials and methods

2.1. Nanoparticle preparation and synthesis

The nanoparticles were synthesized by mini-emulsion polymerization. This polymerization

corresponds to a suspension polymerization using strong shear forces to transform the oil droplets to nanodroplets of the size range of 50 to 300 nm diameter. The nanodroplets serve as nano-reactors, thereby a nearly 1:1-copy of nanodroplets to solid nanoparticles is realized. The imprinting effect was made by adding a chiral amino acid derivative to the reaction mixture as a molecular template. After the polymerization the template is removed by extraction.

The synthesis is described elsewhere [7]. Briefly, polymer particles were prepared by mixing 0.6 g MAA (monomer), 5.4 g EGDMA (cross-linker), 0.25 g hexadecane (solvent) and 0.120 g of AMBN (initiator) with 50 mL water, containing 0.072 g dissolved SDS (surfactant). In the case of imprinting, 0.495 g L- or D-BFA (template) was added to the monomer phase. The two phases were dispersed by stirring vigorously for 1 h at room temperature followed by sonicating for 2 min (Branson Digital Sonifier, Model 450-D, 60% power). The polymerization was carried out at 80°C with a total reaction time of 16 h. The nanoparticle suspension obtained was cleaned by diafiltration (Amicon 8400 stirred ultrafiltration cell, Millipore, Eschborn, Germany) with a polyethersulfone membrane (SUPOR 100, Pall, Dreieich, Germany).

The particle size was determined by dynamic light scattering using a Zetasizer 3000 HAS (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany). Diafil-

trated particles were suspended in ultrapure water and measured at a fixed scattering angle of 90°.

For template extraction, 0.4 g of cleaned and dried nanoparticles were suspended in 20 mL THF (solvent), centrifuged and the supernatant decanted. This step was repeated five times. The template concentration in the supernatant was measured by UV absorption (Spectramax Plus, Molecular Devices, Ismaning, Germany). For binding studies 50 mg extracted and dried nanoparticles were suspended in 5, 10, or 20 mL of a 1 µmol/mL BFA solution in methanol/water (1:1, v/v). After sitting over night (20 h), the suspension was separated by ultracentrifugation (20,000 rpm, 35 min) and the amount of template in the supernatant was quantified by UV absorption [7].

2.2. Composite membrane preparation

Polyamide membranes (ULTIPOR N66, Pall, Dreieich, Germany) with a diameter of 44 mm and a pore size of 0.1 µm were used as support and cover of the composite membrane. For coating the support, a membrane technique itself is used: the dead-end cake filtration. A 50 mL suspension of 0.05 g nanoparticles in ultrapure water was filled in a ultrafiltration cell (Amicon 8050, Millipore, Eschborn, Germany) with the installed support membrane. The suspension was pressed through the support membrane by nitrogen at a constant pressure of 0.14 bar, thereby depositing the particles onto the surface of the membrane. The pressure loss, the temperature, and the mass flow through the membrane was measured online during the coating procedure (see Fig. 2). For data acquisition, a digital manometer (Leitenberger, Kirchentellinsfurt, Germany), a temperature sensor Pt1000 (RS Components, Mörfelden, Germany), and a high-precision balance PRECISA Series 300 (Precisa Instruments AG, Dietikon, Switzerland) were connected to a multifunction I/O-Card (PCI-6032E, National Instruments, München, Germany) and linked with the computer. The data

visualization and storage were done with a self-programmed routine using a graphical programming software (LabVIEW 6i, National Instruments, München, Germany). After drying the coated membrane, the nanoparticle layer was covered by a second membrane and clotted at the borders with conventional two-compound glue.

2.3. Theory of the hydrodynamics of the nanoparticle layer

For describing and modeling of the flow characteristics inside the nanoparticle layer, we used the capillary model. In this model the irregular pathways inside the nanoparticle layer is reduced to a system of parallel capillaries. With this presumption it is possible to reproduce the flow characteristics of the particle array to tubular flow. Here we are in the range of laminar flow, thus the capillary model is described by the Carman–Kozeny equation [8]:

$$2 \cdot \mu = \frac{\Delta p \cdot \varepsilon_p^3}{\bar{v} \cdot (1 - \varepsilon_p)^2 \cdot S_{(v)}^2 \cdot H \cdot \eta} \quad (1)$$

where Δp , ε_p and H are the pressure loss, volume porosity, and height of the particle layer, respectively; μ is the dimensionless loop way factor; and \bar{v} and η are the medial flow velocity and the viscosity of a fluid inside the capillary, respectively. The volume specific surface $S_{(v)}$ is the inner surface of the particle layer in relation to its volume. To apply Eq. (1) to our composite membrane, some presumptions and substitutions are necessary. The medial flow velocity in a capillary is the volume flow \dot{V} in relation to the membrane surface A_M . Furthermore, we assume that the nanoparticles are monodisperse and spherical with a narrow pore size distribution so that the particle layer can be considered as a regular crystalline array like hexagonal or cubic closest packing [9]. The height of the particle layer can be calculated with geometric relations in such a closest packing. The modified and final equation

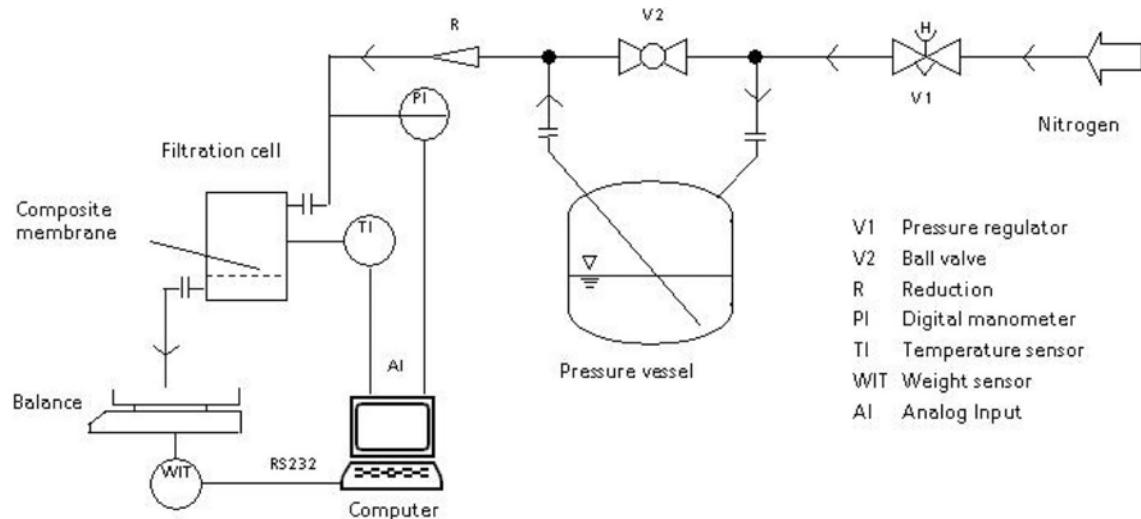


Fig. 2. Scheme of experimental set-up for the preparation of the composite membrane and the measurement of its hydrodynamic properties.

is then defined as:

$$\dot{V} = \frac{1}{(R_M + R_P + R_M)} \cdot \frac{A_M \cdot \Delta p}{\eta} \quad (3)$$

where R_M is the membrane resistance, determined experimentally, and R_P is the particle layer resistance as follows:

$$R_P = \frac{2 \cdot \mu \cdot (1 - \varepsilon_p)^2 \cdot 864 \cdot m_p \cdot \cos^3(30^\circ)}{\varepsilon_p^3 \cdot d_p^2 \cdot \rho_p \cdot \pi^2 \cdot d_M^2} \quad (4)$$

where d_M is the composite membrane diameter; m_p , ρ_p , and d_p are the mass, the density, and the diameter of the nanoparticles coated onto the support membrane.

With inserting Eq. (3) into Eq. (2), we get a linear relation between the volume flow \dot{V} through the composite membrane and the pressure loss Δp . Both parameters can be measured on-line. All other parameters are known except for the volume porosity. Therefore, the porosity is the only parameter to fit the theoretical model to the experimental data.

3. Results and discussion

3.1. Nanoparticles — efficiency of molecular imprinting

The actual separation will be based on the high affinity of one enantiomer molecule to the imprint at the surface of the nanoparticles which was quantified by simple partition experiments [7]. Extracted particles were suspended in an enantiopure template solution and after a defined period of time separated by centrifugation. The template concentration before and after the particle suspension was measured by UV absorption. The difference in amount of template in the solution before and after suspension was assigned as that portion being bound to the particles. The amount of particle-bound template BFA_{bound} was plotted as a function of the total amount of template before suspension, BFA_{sum} (see Fig. 3). L-BFA-imprinted particles were titrated with L-BFA and also with its enantiomeric counterpart, D-BFA. Another control experiment was the binding of the L-enantiomer to a non-imprinted polymer. The experiments conclude as follows: with increasing amount of template molecules in

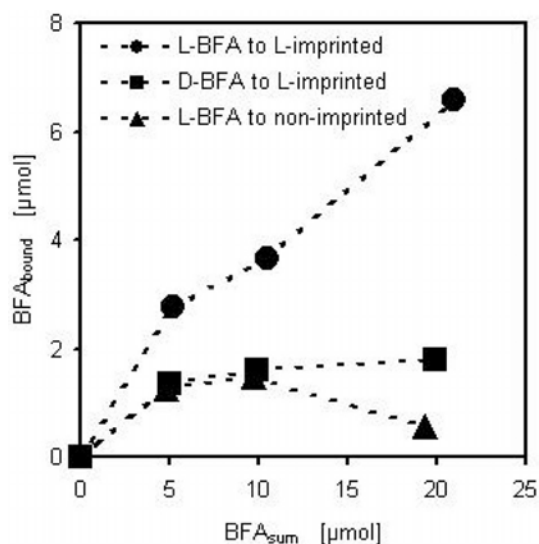


Fig. 3. Amount of particle-bound template BFA_{bound} as a function of the total amount of template BFA_{sum} before suspension displaying the specific binding (L-BFA) and the controls (D-BFA and non-imprinted).

the suspension, an increasing discrimination in the binding properties can be seen. The adsorption of L-BFA to the non-imprinted particles and the binding of D-BFA to L-imprinted particles remained at values well beyond 2 μmol BFA regardless of the overall concentration of BFA in the suspension. At low concentration in BFA_{sum} , the binding of the L-enantiomer to the L-imprinted particles was about the same, but with higher concentration the situation changed. When 20 μmol BFA is contained in the suspension, the amount of adsorbed L-enantiomer was more than four-fold the amount of bound D-BFA and about 10 times higher than the amount of L-BFA bound to non-imprinted polymer.

The large specific surface of the particle suspension enables a high density of imprints and is therefore an important factor for the separation performance of the composite membrane with the particles as the selective coating. To reach an almost complete and effective rebinding, a chemical equilibrium has to be established by further enhancing the selectivity of the particles.

3.2. Composite membrane — hydrodynamic characterization and modeling

For an exact information about the structure of the particle layer and its characteristics like porosity and permeability, a sensitive measuring equipment was installed. From these data various parameters can be calculated and modeled with Eq. (2). First results with water as fluidic medium have shown that the modified Carman–Kozeny equation is applicable and the hydrodynamic properties in the nanoscale within the composite membrane are well determinable. Therefore, the volume flow and the pressure loss during the coating process were measured. We used 50 mL suspension of 0.05 g nanoparticles in ultrapure water at a constant pressure loss of 0.14 bar. Fig. 4 shows the volume flow and the volume porosity as a function of the coating time. During the 40 min of coating time, the volume flow decreases from 0.10 to 0.01 mL/s because the growing nanoparticle layer generates an increasing resistance R_p . Now, we calculated the volume flow with help of Eq. (2) by inserting the constant pressure loss and fitted the result to the experimental data by modification of the volume porosity, ϵ_p . The strong coincidence of the resulting modeled volume flow is seen in Fig. 4a. The best fit was determined with a volume porosity of about 0.38. For a closest packing the theoretical value is about 0.26. The difference between the modeled porosity and that of a close packing of monodisperse particles can be explained by two different factors: (I) non-perfect packing and (II) poly-dispersity of the particles.

Intrinsically, the molecularly imprinted particles show a rather broad size distribution [7]; therefore, we assume factor (II) is predominant. Nevertheless, the excellent fit shows the applicability of the model using an apparent porosity of 0.38.

In a second step, we calculated the volume porosity by inserting the measured data of volume flow in Eq. (2). Thereby the porosity was

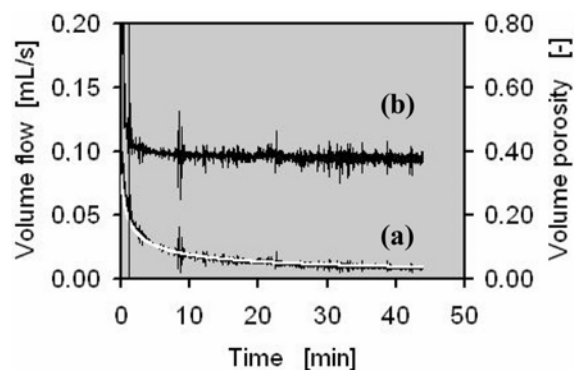


Fig. 4. (a) Experimental volume flow, modeled volume flow (white line), and (b) volume porosity during the coating process.

calculated by using a Newton iteration for each data point [see Fig. 4 (b)]. At the beginning of the coating process the value decreases steeply to a relative constant plateau. This sharp decline is explainable because the first monolayers of nanoparticles cause only a small resistance R_p . Therefore, the Newton iteration produces a very high apparent value of porosity at the beginning of the coating process. When the nanoparticle coating increases, the porosity becomes independent from the height of the layer and remains constant at a value of 0.38.

Along with the advantage of the large specific surface of the particle layer of about $22.9 \text{ m}^2/\text{g}$, the low porosity is associated with decreased permeability. The resulting permeability of a composite membrane coated with 0.05 g of nanoparticles is about $4.3 \text{ mL}/\text{min}/\text{bar}$ with water as fluidic medium. At a constant pressure of 2 bar , it is possible to run approximately $0.15 \text{ L}/\text{h}$ of methanol/water solution (1:1, v/v) through the ready-made composite membrane.

4. Conclusions

Nanoparticles composed of poly(MAA-co-EGDMA) were synthesized by mini-emulsion polymerization allowing direct non-covalent imprinting of a chiral amino acid derivative. The

enantioselective molecular recognition properties were validated in suspension rebinding experiments. For estimation of reasonability under hydrodynamic aspects, the permeability of the composite membrane was experimentally determined. The Carman–Kozeny equation was modified to fit the experimental set-up and then successfully applied as a theoretical model to describe the hydrodynamic properties inside a nano-scale particle layer.

The results show, as expected, that the dense particle layer causes a low flow rate. This low rate is advantageous as the establishment of the chemical equilibrium due to the selective rebinding is a time-consuming step. Even by using only small quantities of imprinted nanoparticles, the composite membrane provides a large imprinted surface with a high selective potential due to the small size of the nanospheres.

To engineer the optimal operating point for maximum flow rate and selective rebinding of the desired enantiomer, further investigations and experiments must be carried out.

5. Symbols

A_M	—	Membrane surface, m^2
d_M	—	Membrane diameter, m
d_p	—	Particle diameter, m
H	—	Height of particle layer, m
m_p	—	Mass of particle layer, g
Δp	—	Pressure loss, bar
R_M	—	Membrane resistance, m^{-1}
R_p	—	Particle layer resistance, m^{-1}
$S_{(v)}$	—	Volume specific surface, m^2/m^3
\bar{v}	—	Medial flow velocity, m/s
\bar{V}	—	Volume flow, m^3/s

Greek

ε_p	—	Volume porosity of particle layer
μ	—	Loop way factor, $=25/12$
η	—	Viscosity, $\text{kg}/\text{s}/\text{m}$
ρ_p	—	Density of nanoparticle, kg/m^3

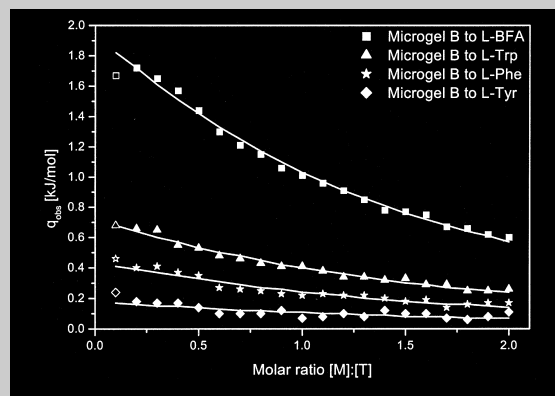
Acknowledgements

We thank M. Dettling for experimental help with the polymer preparation and characterization. G.T. thanks the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF), the Fraunhofer Society, and the Land Baden-Württemberg for financial support of a junior research group (Nachwuchsforschergruppe) on “Biomimetic Interfaces”.

References

- [1] M.J. Whitcombe and E.N. Vulfson, *Adv. Mater.*, 13 (2001) 467–477.
- [2] G. Wulff, *Angew. Chem.*, 107 (1995) 1958–1979.
- [3] G. Wulff, Templated synthesis of polymers — molecularly imprinted materials for recognition and catalysis, in: *Templated Organic Synthesis*, 1st ed., F. Diederich and P.J. Stang, eds., Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [4] B. Sellergren, *Angew. Chem.*, 112 (2000) 1071–1078.
- [5] L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B*, 739 (2000) 163–173.
- [6] H. Asanuma, T. Hishiya and M. Komiyama, *Adv. Mater.*, 12 (2000) 1019–1030.
- [7] D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner and G. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.*, accepted for publication.
- [8] R. Rautenbach, *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*, Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- [9] S. Jons, P. Ries and C.J. McDonald, Porous latex composite membranes: fabrication and properties; *J. Membr. Sci.*, 155 (1999) 79–99.

Communication: Ultrasensitive isothermal titration calorimetry was used to generate thermodynamic data to assess the binding properties of molecularly imprinted polymer microgels. Microgels were imprinted using L-boc-phenylalanine anilide (L-BFA) and then utilized in binding experiments with a variety of probe molecules, structurally closely related to the template molecule. Significant differences were observed between the binding enthalpy of the original template L-BFA and those of D-BFA, L-boc-phenylalanine, L-boc-tryptophane, and L-boc-tyrosine.



Resultant isotherms of raw calorimetric data for the titrations of $20 \times 20 \mu\text{L}$ of a suspension of microgel B (21.1 mg in 400 μL methanol/water 1:1, v/v) in 2 mL L-boc-phenylalanine anilide (\blacksquare , 1.002×10^{-3} M), L-boc-tryptophane (\blacktriangle , 1.001×10^{-3} M), L-boc-phenylalanine (\star , 1×10^{-3} M) and L-boc-tyrosine (\blacklozenge , 1×10^{-3} M) each at 25 °C, produced by integration with respect to time (observed titration heat q_{obs} versus molar ratio microgel to template).

Isothermal Titration Calorimetry of Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres

Achim Weber, Melanie Dettling, Herwig Brunner, Günter E. M. Tovar*

Laboratory for Biomimetic Interfaces, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering & Biotechnology, and Institute for Interfacial Engineering, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany
Fax: +49 711 970 4200; E-mail: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de

Keywords: colloids; microgels; molecular recognition; templates; thermodynamics

Introduction

Nowadays, submicron-sized affinity polymer nanoparticles that are capable of binding biologically active molecules, such as amino acids or drugs, selectively and colloidally solubilized can be prepared via molecular imprinting techniques.^[1–5] One type of imprinting technique, so-called non-covalent imprinting of polymers, essentially involves three steps: (i) self-assembly of functional monomers and a template in solution, (ii) “freezing in” the resultant monomer assemblies by copolymerization with a crosslinker, and (iii) the subsequent removal of the template by solvent extraction. Molecular imprinting technology has now reached a stage where the commercial use of imprinted polymers is being tested mostly for separation or sensing applications, requiring the strong and selective binding of small molecules. In general, the mechanisms of imprinting and molecular recognition seem to be fairly well understood from a structural

point of view based on extensive experimental studies.^[6–9]

However, there is still no data available elucidating the thermodynamics of selective recognition for non-covalently imprinted polymer materials. Kirchner et al. reported thermodynamic data in the more specialized case of a covalently imprinted block copolymer system based on 4-vinylphenylboronic acid and phenyl- α -D-mannopyranoside as templates.^[10]

Ultrasensitive isothermal titration calorimetry (ITC) is a technique for thermodynamically monitoring chemical reactions initiated by the addition of a component to a reaction mixture. ITC has become the technique of choice for the characterization of biomolecular interaction and recognition reactions in this respect. Unlike other techniques, ITC does not require immobilization and/or modification of the starting reactants. Furthermore, there are no molecular weight restrictions since the heat of binding is

a naturally occurring phenomenon. Several articles and books have recently been published, which describe the application of isothermal titration calorimetry for the study of biological and biomolecular recognition reactions.^[11–15]

The aim of the present study has been to investigate the thermodynamics of binding for non-covalently imprinted and extracted nanospheric microgels^[5] utilizing microcalorimetry. The binding properties of BFA-imprinted and non-imprinted microgels were investigated with L- and D-BFA molecules and structurally related molecular probes (L-boc-phenylalanine (L-boc-Phe), L-boc-tyrosine (L-boc-Tyr), and L-boc-tryptophane (L-boc-Trp)) and the corresponding enthalpies of reaction were compared.

Experimental Part

Samples

Four different polymers were used: Microgel A was imprinted with 0.212 mmol L-BFA as the template per g particle and polymerized by thermally initiated miniemulsion polymerization.^[5] Approximately 80% of the template were removed by solvent extraction with tetrahydrofuran (THF). Microgel B was imprinted with 0.203 mmol template per g particle and polymerized by photo-chemically initiated miniemulsion polymerization. Approximately 95% of the template were removed by extraction with methanol. The extraction grade of the methanol was determined by means of UV-vis spectroscopic measurements as described below. Microgels C and D were polymers that were not imprinted but polymerized as microgels A and B, respectively.

Molecular recognition properties of microgels A and C were investigated using L- and D-BFA, while those of microgels B and D were studied with L-BFA, L-boc-Trp, L-boc-Phe, and L-boc-Tyr. L-boc-Trp (Fluka, $\geq 99\%$) and L-boc-Tyr (Fluka, $\geq 98\%$) were purchased commercially. All microgels were stored at 4 °C until use. Methanol ($\geq 99.8\%$), THF ($\geq 99.5\%$) and the photo-initiator 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) were purchased from Fluka and used as received. Deionized water (conductivity = 1.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$) was used throughout.

Synthesis of D/L-BFA

D-boc-Phe and L-boc-Phe (Fluka, $\geq 99\%$) were used for the synthesis of D- and L-BFA. The synthesis of BFA according to Mosbach et al.^[16] was optimized by using THF instead of *N,N*-dimethylformamide (DMF) as the solvent and by controlling the reaction by thin-layer chromatography. The final product was purified by recrystallization in propanol/heptane (9:1, v/v) both from Fluka and stored at 4 °C until use.

Synthesis of the Microgels

The microgels were prepared in two different ways: (i) by thermally initiated miniemulsion polymerization (microgel A and C) as described by Tovar et al.^[5] and (ii) by using a modification of this synthesis (microgel B and D). Preparation of the latter was achieved by photo-chemically initiated

miniemulsion polymerization. Reaction conditions were the same for both pathways, except for the use of DMPA (0.62 mmol) as a photo-initiator and that the reaction mixture was polymerized at room temperature. Reaction was carried out in a UV reactor system (UV-RS-2, Heraeus Noblelight GmbH, Kleinostheim, Germany) that contained a medium-pressure mercury-vapor lamp with a broad emission spectrum in the UV range above 190 nm.

Methods

ITC was performed at 25 °C on a thermal activity monitor calorimeter (Thermometrics AB, Järfälla, Sweden) equipped with a high-performance titration unit and a nanowatt amplifier. All measurements were conducted at least three times. Prior to each measurement, each solution and suspension was degassed to remove air bubbles. 2 mL of the amino acid derivative solution (1×10^{-3} M and 0.75×10^{-3} M in concentration) was titrated by adding 20 \times 20 μL aliquots of a microgel suspension in the same buffer. The microgel suspension was prepared by sonication in methanol/water (1:1, v/v). This procedure was sufficient to avoid precipitation of the microgel within the injection syringe. The first aliquot was used to correct volume errors on the first injection, which was caused by inserting the filled syringe into the cell. This injection was taken into consideration in the titrant concentration scale, but corresponding heat was excluded from evaluation.

The relatively low aqueous solubility of the ligand (here: the templates) had to be considered in order to reach the relatively high concentrations required for ITC experiments. So we designed the experiment in a different way by first using a mixture of methanol and water (1:1, v/v) for both titrand and titrant. In this way, a solubility of 1×10^{-3} M was reached for the template solution. A suspension of the imprinted or non-imprinted microgel was then injected into the template solution.

Concentrations of the binding sites for the imprinted microgels were determined by means of UV spectroscopy (Spectramax Plus, Molecular Devices, Ismaning, München). For this determination, the purified and dried microgel was suspended in methanol (10 mg/mL) and then the microgel was separated from the serum by centrifugation or filtration. The concentration of the supernatant or filtrate was finally measured by UV spectroscopy. These data allowed directly the calculation of the amount of binding sites during a titration experiment.

The precise shape of the binding isotherm contained all information necessary to completely characterize the binding reaction.^[17–19] The data were analyzed using the proprietary software DIGITAM 4.1 supplied by Thermometric AB (Järfälla, Sweden) with the instrument.

The heat absorbed or evolved during a calorimetric titration is proportional to the fraction of bound ligand. The amount of heat evolved upon addition of the ligand can be represented by Equation (1)

$$Q = V_0 \cdot \Delta H_b \cdot [T]_t \cdot K_a \cdot [M] / (1 + K_a \cdot [M]) \quad (1)$$

where V_0 is the volume of the cell, ΔH_b the enthalpy of binding per mol ligand, $[T]_t$ the total template concentration

bound and dissolved, K_a the binding constant, and $[M]$ is the calculated concentration of the free binding sites, which takes into account the results of the UV measurements of the extraction rate.

The cumulative heat of binding can be described by Equation (2):

$$Q = V_0 \cdot [T]_t \cdot \sum (n_i \cdot \Delta H_i \cdot K_{ai} \cdot [M]) / (1 + K_{ai} \cdot [M]) \quad (2)$$

Prior to peak integration, the heat of binding is normalized as a function of the concentration of the binding sites provided by the microgel. Additionally, a volume correction was done due to dilution of the ligand during each injection. The area under the peak is integrated using the ThermoMetrics software package. To determine the number of binding sites (n), association constant (K_a) and binding enthalpy (ΔH°) Equation (2) was recast in terms of the binding constant and total microgel concentration $[M]_T$ to obtain the following quadratic Equation (3):

$$Q = n \cdot [T]_t \cdot \Delta H_b \cdot V_0 / 2 \cdot \left\{ \frac{1 + [M]_t / n \cdot [T]_t + 1 / (n \cdot K_a \cdot [T]_t) - \left[(1 + [M]_t / n \cdot [T]_t + 1 / (n \cdot K_a \cdot [T]_t))^2 - 4 \cdot ([M]_t / n \cdot [T]_t) \right]^{1/2}}{2} \right\} \quad (3)$$

Furthermore, parameters n , K_a , and ΔH_b were optimized by using the standard Marquardt method (non-linear fitting). A more detailed discussion of the derivation of Equation (1)–(3) is presented elsewhere.^[17,18]

Results and Discussion

Figure 1A shows the heat detected upon gradual injection of a suspension of microgel A into an initially pure solution of L-BFA (7.67×10^{-4} M) versus time (I, large peaks). Every injection of 20 μ L microgel A suspension increased the concentration of binding sites within the sample cell by about 250 nmol. The corresponding dilution control experiment is shown in Figure 1A (II, small peaks). The heat of dilution experiment is shifted in the vertical offset (2 μ W). Integration and normalization of the peaks yielded the observed heat per mole of injectant, q_{obs} , as a function of the molar ratio of the template and the binding sites of microgel A (Figure 1B). The solid line is a fit of the experimental data mentioned above, which allowed the determination of the enthalpy. The enthalpy of this reaction is exothermic and corresponds to -21.1 ± 1.7 kJ \cdot mol $^{-1}$ for the titration of L-BFA with L-BFA-imprinted microgel. A comparison of this result with accurately investigated inclusion phenomena of other interesting hollow macromolecules shows good agreement with the corresponding enthalpies. Wenz et. al. determined similar exothermic enthalpies for host/guest interactions of α/β -cyclodextrins with a variety of adamantyl guests (-11.8 to -29.2 kJ \cdot mol $^{-1}$) and derivatives of benzoic acid (-20.1 kJ \cdot mol $^{-1}$).^[20,21]

In Figure 2 the resulting isotherms of titration experiments using L-imprinted microgel A and non-imprinted microgel C in L- and D-BFA were compared with each

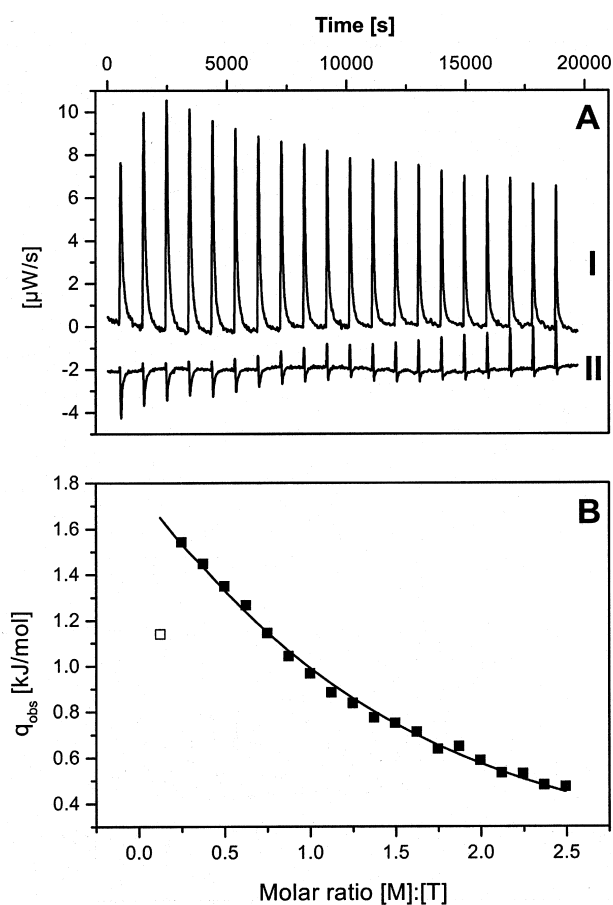


Figure 1. (A) Experimental titration curves for the titration of L-BFA-imprinted and -extracted microgel A at 25 °C (I) and the corresponding control dilution experiment (II). Measured heat power versus time. A suspension of 20.52 mg of microgel A in 400 μ L methanol/water (1:1, v/v), which is equivalent to 4.97 mmol binding sites in microgel A, was titrated into a 7.67×10^{-4} M solution of L-BFA in the same buffer. (B) Observed titration heat q_{obs} versus molar ratio microgel to template (the first value was excluded from analysis).

other. In this case, a suspension of 20.52 mg of microgel A and 20.51 mg of microgel C was prepared for the titration experiment, each in 400 μ L methanol/water (1:1, v/v). The ligand solution was 2 mL in volume and 7.67×10^{-4} M in the case of L-BFA and 7.70×10^{-4} M for D-BFA. Non-imprinted microgel C showed nearly no heat generation during the injection in L- or D-BFA (see Table 1). Both titration experiments of microgel A in L-BFA and D-BFA significantly showed a relatively large amount of heat generated. We noted a substantial increase in enthalpies for the binding of an imprinted polymer (microgel A) to the imprint template, as compared with that of a non-imprinted polymer (microgel C) to the same template.

Additionally, there was a difference in the heat of binding observed for the two enantiomers. The enthalpy of the reaction with L-BFA was -21.1 ± 1.7 kJ \cdot mol $^{-1}$, while that of the reaction with D-BFA was only -12.7 ± 1.2 kJ \cdot mol $^{-1}$.

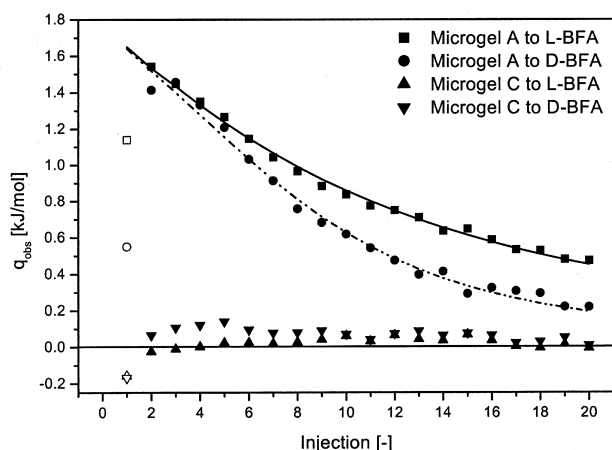


Figure 2. Resultant isotherms of raw calorimetric data for the titration of microgels A and C in L- and D-boc-phenylalanine anilide at 25 °C, produced by integration with respect to time (observed titration heat q_{obs} versus injection number): binding isotherm of the titration of 20 aliquots of microgel A (each 1.026 mg) into 2 mL of a 7.67×10^{-4} M solution of L-BFA (■), same microgel titrated into 2 mL of a 7.70×10^{-4} M solution of D-BFA (●), binding isotherms of non-imprinted microgel C titrated into 2 mL of a 7.67×10^{-4} M solution of L-BFA (▲) and a 7.70×10^{-4} M solution of D-BFA (▼) each in methanol/water (1 : 1, v/v).

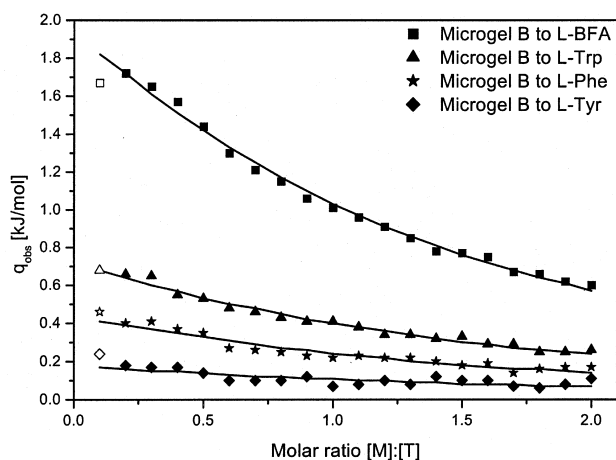


Figure 3. Resultant isotherms of raw calorimetric data for the titrations of $20 \times 20 \mu\text{L}$ of a suspension of microgel B (21.1 mg in 400 μL methanol/water 1 : 1, v/v) in 2 mL L-boc-phenylalanine anilide (■, 1.002×10^{-3} M), L-boc-tryptophane (▲, 1.001×10^{-3} M), L-boc-phenylalanine (★, 1×10^{-3} M) and L-boc-tyrosine (◆, 1×10^{-3} M) each at 25 °C, produced by integration with respect to time (observed titration heat q_{obs} versus molar ratio microgel to template).

In Figure 3 the resulting isotherms of titration experiments using microgel B in 2 mL L-BFA (1.002×10^{-3} M), L-boc-Trp (1×10^{-3} M), L-boc-Phe (1.001×10^{-3} M) and L-boc-Tyr (1×10^{-3} M) are compared with each other. The resulting enthalpies are also listed in Table 1. The enthalpy of the reaction between photo-initiated microgel C and L-BFA ($-20.7 \pm 2.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) was comparable to that of thermally initiated microgel A to L-BFA (see Fig-

Table 1. Microgel description, initial template during the imprinting, molecular probe for ITC measurements and molar enthalpies.

Microgel	Template	ITC probe	ΔH $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
A	L-BFA	L-BFA	-21.1 ± 1.7
A	L-BFA	D-BFA	-12.7 ± 1.2
C	none	L-BFA	-0.5 ± 0.6
C	none	D-BFA	0.7 ± 1.1
B	L-BFA	L-BFA	-20.7 ± 2.1
B	L-BFA	L-boc-Trp	-10.9 ± 0.8
B	L-BFA	L-boc-Phe	-5.1 ± 1.0
B	L-BFA	L-boc-Tyr	-2.8 ± 0.7

ure 2 and Table 1), indicating that the initiation variation had no significant influence on the observed heat of binding.

The comparison of the heat of binding of the four amino acid derivatives interacting with the microgel reveals significant differences if the original imprint molecule L-BFA or one of the other molecules was used. The heat was found to be significantly lower for L-boc-Phe, L-boc-Tyr, and L-boc-Trp with $-5.1 \pm 1.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $-10.9 \pm 0.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, and $-2.8 \pm 0.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectively. Interestingly, the highest value was not found for the closest structural analog to L-BFA, L-boc-Phe, where only the anilide group is missing, but for L-boc-Tyr, where, in addition to the missing anilide, a proton of the benzylamino acid side group was substituted with a hydroxy group. The polarity of this group may be the reason for the stronger interaction with the microgel. In contrast, L-boc-Trp, which contained the larger indolyl group within its side group instead of the phenyl group, showed an even lower heat of binding compared to L-boc-Phe.

The investigation of non-imprinted microgel D in consideration of the amino acid derivatives yielded enthalpies of only about $\pm 1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Therefore, within the experimental error, there appeared to be no thermodynamically based binding effect on the non-imprinted microgel D, as already seen for microgel C (Figure 2).

Conclusions

ITC was proven to be a suitable method to investigate the thermodynamics of molecular recognition reactions of non-covalently imprinted polymers and to be an excellent tool to assess the efficiency of the initial molecular imprinting process, in particular the generation of specific binding sites. The enthalpies of the reactions of non-imprinted microgels C and D with amino acid derivatives studied are very low in comparison to those of imprinted microgels A and B, which show a significant heat during titration. Additionally, the enthalpy of binding for the initial template molecule was significantly higher than that of any other probe, including its stereoisomer.

Thereby, a mechanism of molecular and even chiral recognition with non-covalently imprinted polymers was proven for the first time by a direct thermodynamic characterization method. Systematic calorimetric investigations are promising measurements to gain further insight in the mechanism involved in the molecular imprinting of synthetic polymers.

Acknowledgement: G. T. thanks the German Federal Ministry BMBF, the Land Baden-Württemberg and the Fraunhofer-Gesellschaft for financial support of a Junior Research Group (Nachwuchsforschergruppe) on Biomimetic Interfaces (FKZ 0312180). We thank I. Kräuter for experimental help with the polymer preparation.

Received: August 13, 2002
Accepted: September 3, 2002

- [1] N. Pérez, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 830.
- [2] L. Ye, R. Weiss, K. Mosbach, *Macromolecules* **2000**, *33*, 8239.
- [3] A. Biffis, N. B. Graham, G. Siedlaczek, S. Stalberg, G. Wulff, *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 163.
- [4] S. R. Carter, S. Rimmer, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 667.
- [5] D. Vaihinger, K. Landfester, I. Kräuter, H. Brunner, G. E. M. Tovar, *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1965.
- [6] B. Sellergren, "Molecularly Imprinted Polymers", 1st ed., Elsevier, Amsterdam 2001.
- [7] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 467.
- [8] L. I. Andersson, *J. Chromatogr. B* **2000**, *739*, 163.
- [9] G. Wulff, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812.
- [10] R. Kirchner, J. Seidel, G. Wolf, G. Wulff, *J. Inclusion Phenom.* **2002**, in press.
- [11] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3.
- [12] M. Chellani, *Am. Biotechnol. Lab.* **1999**, *14*.
- [13] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods* **1999**, *19*, 213.
- [14] "Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences", J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, Eds., John Wiley & Sons, Chichester 1998.
- [15] M. L. Doyle, *Anal. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31.
- [16] D. J. O'Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 144.
- [17] M. J. Blandamer, "Thermodynamic Background to Isothermal Titration Calorimetry", in: *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*; J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, Eds., John Wiley & Sons, Chichester 1998, p. 5 ff.
- [18] L. Indyk, H. F. Fischer, *Methods Enzymol.* **1998**, *295*, 350.
- [19] F. H. Fisher, N. Singh, *Methods Enzymol.* **1995**, *259*, 194.
- [20] M. Weickenmeier, G. Wenz, *Macromol. Rapid. Commun.* **1996**, *17*, 731.
- [21] T. Höfler, G. Wenz, *J. Inclusion Phenom.* **1996**, *25*, 81.