forschen.
vernetzen.
anwenden.

Innovationsreport 2022

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 20781 N

Verfahrensentwicklung zur Bestimmung der Proteinkonformation auf Basis der oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie am Beispiel monoklonaler Antikörper

Laufzeit:

01.08.2019 – 28.02.2022

Beteiligte Forschungsstelle(n):

Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V.
Forschungsabteilung Forschungsanalytik & Miniaturisierung

AMO GmbH Gesellschaft für Angewandte Mikro- und Optoelektronik
Aachen

Industrielle Gemeinschaftsforschung

Schlussbericht vom 25.08.2022

zu IGF-Vorhaben Nr. 20781 N

Thema

Verfahrensentwicklung zur Bestimmung der Proteinkonformation auf Basis der oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie am Beispiel monoklonaler Antikörper (Kurztitel: SERS-PC - Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Protein Conformation)

Berichtszeitraum

01.08.2019 bis 28.02.2022

Forschungsvereinigung

Umwelttechnik

Forschungseinrichtung(en)

FE 1: Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA)

FE 2: Gesellschaft für Angewandte Mikro- und Optoelektronik mbH (AMO)

Forschungsnetzwerk Mittelstand

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung des Projekts ... 9

2 Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele ... 10

2.1 Analytik von Formulierungen monoklonaler Antikörper mit konventioneller Raman-Spektroskopie: Potential und Limitationen ... 10

2.2 Simulation zur Definition angepasster SERS-Nanoantennen ... 14

2.3 Lithographie von periodischen Nanostrukturen ... 16

2.4 Strukturübertragung in Oberflächen mittels trockenchemischem Ätzen ... 18

2.5 Materialdeposition für plasmonische Funktionsschicht ... 20

2.6 Charakterisierung und Funktionstests ... 24

2.7 SERS-Experimente und chemometrische Datenanalyse ... 31

2.7.1 Raman-Setup ... 31

2.7.2 Charakterisierung des Raman-Setups ... 32

2.7.3 Durchführung von SERS-Messungen ... 35

2.7.4 SERS-Substrate ... 35

2.7.5 Datenanalyse ... 37

2.8 Herstellung und Referenzanalytik von Antikörper-Aggregaten ... 40

2.8.1 UV-Zelle für Stressexperimente ... 40

2.8.2 Analytik von Proteinlösungen mit SEC und RPC ... 41

2.8.3 Aggregationsexperimente ... 42

2.8.4 Fraktionierung ... 43

2.8.5 Quantifizierung der Aggregat-Fraktion mit LC-SEC/UV und LC/UV ... 45

2.8.6 Bindungsverhalten der Monomere/Aggregate von Bevacizumab an Protein CysAG ... 46

2.9 Direkte Proteindetektion ... 48

2.9.1 Tröpfchendeposition mit anschließendem Trocknen ... 48

2.9.2 Immersion ... 53

2.10 Indirekte Detektion von Antikörpern und ihren Aggregaten mit SERS ... 56

2.10.1 Aufbau des Immuno-SERS-Sensors ... 57

2.10.2 Funktionalisierung der SERS-Substrate ... 57

2.10.3 Charakterisierung des Sensors ... 58

2.10.4 Immuno-SERS-Assay: Vorexperiment ... 68

2.10.5 Immuno-SERS-Assay: Hauptexperiment ... 69

3 Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele ... 71

3.1 Herstellung von Nanostrukturen ... 71

3.2 Direkte Proteindetektion ... 71
3.3 Indirekte Detektion von Antikörpern und ihren Aggregaten mit SERS ... 72
4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten ... 74
5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft ... 76
5.1 Informationen der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses ... 76
5.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA ... 76
5.3 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen ... 76
5.4 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen ... 76
5.5 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts ... 78
6 Verwendete Zuwendungen ... 79
6.1 Forschungsstelle I (IUTA e. V.) ... 79
6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) ... 79
6.1.2 Geräte (Einzelsatz B des Finanzierungsplans) ... 79
6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) ... 79
6.2 Forschungsstelle II (AMO) ... 79
6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans) ... 79
6.2.2 Geräte (Einzelsatz B des Finanzierungsplans) ... 79
6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) ... 79
7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit ... 80
Literaturverzeichnis ... 81
Anhang ... 85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Raman-Spektren von Avastin® (oben) sowie des Rückstands bzw. Filtrats (unten), nach Filtration von Avastin®. Die Proben wurden als Drop Coating auf einem goldbeschichteten Objektträger mit einem 785 nm Raman-Spektrometer gemessen. 11
Abb. 2 Raman-Spektren der in Avastin® enthaltenen Hilfsstoffe. Die Proben wurden auf einer Edelstahlplatte mit einem 785 nm Raman-Spektrometer gemessen. 11
Abb. 3 Raman-Spektrum von Bevacizumab (Rückstand aus Abb. 1). 12
Abb. 4 Raman-Spektren von bovinem Serumalbumin (BSA) als Lösung in 1x-PBS-Puffer (oben) und als Lyophilisat (unten), aufgenommen mit einem 785 nm Raman-Spektrometer. 13
Abb. 5 Simulationsumgebung des FDTD-Solvers. Dargestellt ist die Simulationsumgebung mit den platzierten Monitoren und der Anregungsquelle. Das Testobjekt ist eine metallische Zylinderstruktur auf einem Glasträger. 14
Abb. 6 Spektrale Lage des Streuungsmaximums durch (oben) Veränderung von Strukturperiode, (Mitte) Strukturdurchmesser und (unten) Strukturhöhe. 15
Abb. 7 Darstellung der Einfallswinkel zweier Wellenfronten und der resultierenden Interferenzerscheinung der Intensität in einer Lackschicht. 16
Abb. 8 REM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach der Belichtung. 17
Abb. 9 AFM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach der Belichtung. 17
Abb. 10 Schematische Darstellung einer Prozesssequenz zur Herstellung der SERS-Oberfläche. 18
Abb. 11 AFM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach Strukturübertragung mittels Ätzprozess. 19
Abb. 12 REM- und AFM-Aufnahme der statistisch verteilten Nanostruktur auf der Oberfläche eines Si-Substrates. 19
Abb. 13 Realteil (links) und Imaginärteil (rechst) der Dielektrizitätsfunktion von Silber und Gold extrahiert aus einem FDTD-Solver. 20
Abb. 14 REM- und AFM-Aufnahmen der ersten SERS-Teststruktur (K2-Chip). 21
Abb. 15 REM- und AFM-Aufnahmen der zweiten Teststruktur. 22
Abb. 16 Mikroskopaufnahme der SERS-Oberfläche nach der Bedampfung. 23
Abb. 17 SERS-Messungen auf K2-Substraten in drei verschiedenen Testarealen: (links) sauber ohne Funktionalisierung, (Mitte) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM. 24
Abb. 18 SERS-Messungen auf P300-Substraten mit drei Au-Dicken (30 nm, 70 nm, 100 nm): (links) sauber ohne Funktionalisierung, (Mitte) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM. 25
Abb. 19 SERS-Messungen auf K2-Substraten in drei verschiedenen Testarealen: (links) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM. 25
Abb. 20 SERS-Messungen einer Thiophenol SAM in drei Testarealen auf: (links) K2-Substrat und (rechts) P300-Substrat. 26
Abb. 21 SERS-Messungen einer 4-MBA SAM in mehreren Testarealen auf: (links) Black-Si-Substrat und (rechts) P300-Substrat. 26
Abb. 22 SERS-Messungen einer 4-MBA SAM in mehreren Testarealen auf: (links) Black-Si-Substrat und (rechts) P300-Substrat. 27
Abb. 23 SERS-Messungen einer mehrere Mikrometer dicken BSA-Schicht. 28
Abb. 24 SERS-Messungen in verschiedenen Testarealen nach Plasmareinigung. 28
Abb. 25 SERS-Messungen einer Thiophenol-SAM in verschiedenen Testarealen. 29
Abb. 26 SERS-Messungen einer Thiophenol-SAM in verschiedenen Testarealen nach der Plasmareinigung. 30
Abb. 27 Schematischer Aufbau des Raman-Setups. 31

Abb. 28 Oben: Ermittlung des fokalen Strahldurchmessers über die an unterschiedlichen Positionen z im Laserstrahl bestimmten Strahldurchmesser. Unten: Knife Edge-Scan zur Bestimmung des Strahldurchmessers an einer bestimmten Position z im Laserstrahl. 33
Abb. 29 Raman-Spektren der Standards PET und Silizium für die Untersuchung der Wellenlängengenauigkeit und Intensitätsstabilität des Raman-Spektrometers. 34
Abb. 30 Lampenspektrum mit Etaloning-Effekt (schwarze Kurve). Anpassung mit einem Polynom 9ten Grades (rote Kurve). 35
Abb. 31 UV/Vis-Spektrum des SERS-Substrats AMO-P300-70, welches in Transmission aufgenommen wurde. 36
Abb. 32 Performance der Substrate SERStrate-Gold (Fa. Silmeco) und P300-70 (AMO GmbH) für oberflächen-gebundenes 4-MBA. Das Signal/Untergrund-Verhältnis (S/B) nimmt mit der Performance der Substrate zu. 37
Abb. 33 Schematische Darstellung des Workflows für die Datenvorverarbeitung von SERS-Spektren. 38
Abb. 34 Schema für die Ermittlung von Bandenparametern. 39
Abb. 35 Photos der demontierten UV-Zelle (oben) und des LED-Controllers (unten). 41
Abb. 36 SEC-Chromatogramme von Avastin® nach unterschiedlicher Stressexposition. 43
Abb. 37 Chromatogramme der Fraktionierung der gestressten Antikörperlösung, der Aggregat-Fraktion, der Monomer-Fraktion sowie von ungestresstem Avastin®. 44
Abb. 38 Zeitliche Entwicklung einer gestressten MVASI®-Lösung (links) und der nach Fraktionierung der frisch gestressten MVASI®-Lösung gewonnenen Aggregat-Fraktion (rechts). 44
Abb. 39 Kalibrierreihe einer verdünnten MVASI®-Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Monomer und Aggregat). 45
Abb. 40 SEC-Chromatogramme der Mischungsexperimente der CysAG-Lösung mit der Monomer (M)- bzw. Aggregat-Fraktion (AGG). 46
Abb. 41 Raman-Spektren von Lysozym als Lösung, Drop Coating, Lyophilisat und einer Fibrille des Lysozyms. 50
Abb. 42 DCDR-Spektren von Bevacizumab (PBS) und einer Fibrille, die sich bei der UV-Bestrahlung von MVASI® bildet. 51
Abb. 43 SEC-Chromatogramme der aufkonzentrierten Aggregat- und Monomer-Fraktion, einer Bevacizumab-Probe nach Pufferaustausch und Avastin (Referenz). 52
Abb. 44 SNV-Spektren der Proteinproben (Fra1: Aggregat-Fraktion, Fra3: Monomer-Fraktion, Nat: Bvcz in PBS). Loadings-Plot (unten links) und Score-Plot (unten rechts) der beiden ersten Hauptkomponenten der Faktoranalyse. 53
Abb. 45 SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats vor und nach der Immersion in einer Lösung von L-Phenylalanin. 54
Abb. 46 SERS-Spektren (schwarze Kurven, Differenzspektren) und Raman-Spektren (rote Kurven) von Protein CysAG, L-Phenylalanin und L-Tyrosin. 55
Abb. 47 Sandwich-Assay-Technik (links) und Frequency-Shift-SERS-Technik (rechts) für die indirekte Detektion von Biomolekülen. Entnommen aus Ref. [37]. 56
Abb. 48 Immuno-SERS-Sensor für die Detektion von monoklonalen Antikörpern. 57
Abb. 49 Funktionalisierung der SERS-Substrate. 58
Abb. 50 SERS-Spektrum einer Monolage von 4-MBA auf einem P300-70 Goldsubstrat von AMO (oben), Raman-Spektrum einer pulverförmigen Probe von 4-MBA (unten). Berechnete Schwingungsmoden der intensivsten Banden im Spektrum(rechts). 59
Abb. 51 Adsorptionskinetik von 4-MBA an ein AMO P300-70 Substrat (oben). Veränderung der ν(C=C)- (Mitte) und Ring-Breathing-Bande (unten). 61
Abb. 52 Effekt der Laserleistung auf die 4-MBA-Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage bei unterschiedlichen Laserleistungen. 61

Abb. 53 Effekt des pH-Werts auf die 4-MBA Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage, gemessen in einer 1x PBS-Lösung bei verschiedenen pH-Werten. 62
Abb. 54 Einfluss der Pufferkonzentration auf die 4-MBA Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage, gemessen in PBS-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. ... 63
Abb. 55 SERS-Spektren der 4-MBA-Monolage vor und nach der Funktionalisierung mit dem Liganden CysAG. Die Spektren sind gemittelte Spektren aller Messpunkte mehrerer SERS-Chips. 64
Abb. 56 Effekt einer bereits oberflächengebundenen Substanz auf die 4-MBA-Monolage. 65
Abb. 57 Scatter-Plot der ersten beiden Hauptkomponenten für die 4-MBA- und 4-MBA+CysAG-Stufe. 66
Abb. 58 Loadings-Plots der ersten beiden Hauptkomponenten. 67
Abb. 59 Bandenparameter Peak-Position und Halbwertsbreite der Banden ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande in cm^{-1} für eine Verdünnungsreihe von Zirabev® (Formulierung von Bevacizumab). 68
Abb. 60 Scatter-Plot der Bandenparameter für alle Proben des Immuno-SERS-Assays: Aggregate (rot), Antikörper (schwarz), Kontrolle (blau, PBS/PBS2: 1x-PBS-Puffer, HS: Hilfsstofflösung, BSA: Lösung von bovinem Serumalbumin). Numerische Labels bezeichnen die Konzentration in µg mL^{-1}..... 69
Abb. 61 Loadings-Plot der Hauptkomponente 1 zeigt, dass Oberflächenbelegung durch Verunreinigung und Banden-Shift der ν(C=C)-Bande von 4-MBA korrelieren. 85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Bestandteile der Biopharmazeutika Avastin® und MVASI®. 10
Tab. 2 Übersicht der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten SERS-Substrate..... 36
Tab. 3 Messsystem und Methoden für die Größenausschlusschromatographie und Reversed-Phase-Chromatographie, welche in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden..... 42
Tab. 4 Übersicht der wichtigsten Peaks des SERS-Spektrums und ihre Zuordnung mit Hilfe der Literatur..... 59
Tab. 5 Variabilität des SERS-Chips vor der Applikation des Analyten. Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD)..... 67
Tab. 6: Auflistung aller durchgeführten sowie aller über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen..... 77

Abkürzungsverzeichnis

4-MBA	4-Mercaptobenzoesäure
AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
API	Active Pharmaceutical Ingredient (aktiver pharmazeutischer Wirkstoff)
BSA	Bovines Serumalbumin
Bvcz	Bevacizumab (monoklonaler Antikörper)
Cys	Cystein
CysAG	Rekombinantes Fusionsprotein aus den Antikörper-bindenden Proteinen A und G, mit einem Cystein-Tag am N-Terminus.
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCDR	Drop Coating Deposition Raman
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FDTD	Finite Difference Time Domain (Finite-Differenzen-Methode)
FWHM	Full Width at Half Maximum (volle Halbwertsbreite)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MSC	Multiplicative Scatter Correction (Multiplikative Streukorrektur)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphate-Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PDMS	Polydimethylsiloxan
Phe	Phenylalanin
PVD	Physical Vapour Deposition (physikalische Gasphasenabscheidung)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RPC	Reverse-Phase Chromatography (Umkehrphasenchromatographie)
SAM	Self-Assembled Monolayer (selbstorganisierende Monolage)
SEC	Size-Exclusion Chromatography (Größenausschluss-Chromatographie)
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie)
SNV	Standard Normal Variate
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

1 Einleitung und Zielsetzung des Projekts

Mit der zunehmenden Bedeutung der Biopharmazeutika ist das Interesse an der Aufklärung von Aggregationsmechanismen gewachsen. Vor diesem Hintergrund sollte in diesem Projekt ein kostengünstiges Verfahren auf Basis einer bereits bestehenden Geräteplattform entwickelt werden, das neue Erkenntnisse zur Detektion und Analyse von monoklonalen Antikörpern auf Basis der Raman-Spektroskopie erlaubt. Die große Schwäche der Raman-Spektroskopie liegt dabei in der geringen Nachweisempfindlichkeit. Innerhalb dieses Projektes sollte daher ein Chip entwickelt werden, dessen nanostrukturierte Oberfläche durch Laserlicht angeregt wird, wodurch der Streulichtquerschnitt plasmonisch erhöht und letztendlich die Empfindlichkeit des Verfahrens gesteigert wird. Die technischen Herausforderungen hierbei lagen in einer präzisen, reproduzierbaren Anordnung der Chipnanostrukturen und der gerichteten Annäherung des Analyten an die Chipoberfläche. Innerhalb dieses Projektes sollten hierfür mehrere technische Lösungsansätze erarbeitet und umgesetzt werden. Der hier entwickelnde Chip sollte auf therapeutische Antikörper anwendbar sein. Dabei stand die Entwicklung eines Chips zur Kontrolle der Produktsicherheit von monoklonalen Antikörpern auf Basis der oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie (SERS, Surface Enhanced Raman Spectroscopy) im Vordergrund. Der Chip sollte Nanostrukturen mit plasmonischer Funktionalität auf der Oberfläche tragen. Diese Nanostrukturen sollten derart gestaltet werden, dass zum einen pro Struktur mehrere Hot-Spots möglich sind und zum anderen die antikörperbindenden Proteine als auch die Antikörper in deren Nähe gebracht werden können. Bei den Berechnungen wurde dementsprechend eine stark periodische Strukturanordnung vorausgesetzt. Diese sollte insbesondere den Vorteil einer möglichst gleichförmigen, reproduzierbaren und ortsunabhängigen SERS-Verstärkung bieten. Des Weiteren sollte die Nanostruktur mit den gängigen Geräteplattformen auf dem Markt kompatibel sein, sodass die Ergebnisse leichter in den Markt zu transferieren wären. Die eigentliche Messmethode erfolgte unter Verfolgung zweier konzeptioneller Ansätze (indirekte und direkte SERS), die es ermöglichen sollten, Aggregate bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt identifizieren zu können. Hierbei sollten die Strukturinformationen im Fingerprint-Bereich des verstärkten Raman-Spektrums genutzt werden, um (i) eine Konformationsänderung durch Bandenverschiebung, (ii) eine Aggregatbildung durch sterische Hinderung und statistischer Umverteilung, oder (iii) um eine verringerte Affinität und (vi) eine Änderung des Dipolmoments des Chemosensors anzuzeigen.

2 Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1 Analytik von Formulierungen monoklonaler Antikörper mit konventioneller Raman-Spektroskopie: Potential und Limitationen

Pharmazeutika weisen neben dem aktiven pharmazeutischen Wirkstoff (API: *Active Pharmaceutical Ingredient*) Formulierungshilfsstoffe auf, welche das API stabilisieren sollen. Laut Packungsbeilage enthalten die in der vorliegenden Studie eingesetzten Pharmazeutika Avastin® und MVASI® neben dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Bvcz) die Hilfsstoffe α,α-Trehalose-Dihydrat, Polysorbat-20 und Phosphatpuffer sowie Wasser. Tab. 1 gibt eine Zusammenfassung der Bestandteile von Avastin® und MVASI® und ihrer Funktionen.[1,2]

Tab. 1 Bestandteile der Biopharmazeutika Avastin® und MVASI®.

Substanz	**Stoffgruppe**	**Funktion**
Bevacizumab	monoklonale Antikörper	Wirkstoff (API)
α,α-Trehalose-Dihydrat	Zucker (Disaccharide)	Kryoprotektor, Stabilisator, Isotonisierungsmittel, Lyoprotektor
Polysorbat-20	nichtionische Tenside	Verdrängung von Proteinmolekülen von der Luft-Wasser-Grenzfläche zur Verhinderung der Aggregation
Natriumphosphat	Puffer	Stabilisierung des pH-Werts. Stabilisierung der sekundären und tertiären Proteinstruktur.
Wasser	Lösungsmittel	Lösungsmittel

Raman-Spektroskopie ist als struktursensitive Methode hervorragend für die Strukturaufklärung und Identifikation von Stoffen geeignet. Um zu untersuchen, welche Informationen ein Raman-Spektrum über o. g. Pharmazeutika liefern kann, wurde in der vorliegenden Arbeit Avastin® mit Hilfe eines Zentrifugenfilters (50 kDa Cut-off) filtriert, sodass das Protein als gelöster Rückstand und die restlichen Inhaltsstoffe des Pharmazeutikums als Filtrat vorlagen. Die Proben wurden mit einem 785 nm Raman-Spektrometer als Drop Coating (siehe auch Abschn. 2.9.1.2) auf einem unstrukturierten Goldsubstrat gemessen. Dieses bildete sich nach Verdampfen des Lösungsmittels der als Tröpfchen aufgetragenen Proben. Abb. 1 zeigt das Raman-Spektrum von Avastin® (oben) sowie die Raman-Spektren der aufgetrennten Bestandteile nach Filtration (unten), welche entsprechend ihres Beitrags zum Gesamtspektrum skaliert wurden. Es ist leicht zu erkennen, dass der Hauptbeitrag zu dem Raman-Spektrum von Avastin® von den Formulierungshilfsstoffen stammt. Nur der Bereich zwischen 1500 und 1800 cm^{-1} wird durch Banden des Proteins dominiert. Die Beobachtung ist im Einklang mit einer während der Laufzeit des Projektes erschienenen Studie über die Unterscheidung und Quantifizierung von Antikörperformulierungen mit Raman.[3] Sie zeigt, dass Merkmale von monoklonalen Antikörpern in multivariaten Modellen nicht dominierend sind und dass die Hilfsstoffe alleine für die Unterscheidbarkeit der Formulierungen verantwortlich sind und jene zumeist zur Bestimmung der Konzentrationen der untersuchten Biopharmazeutika herangezogen werden.

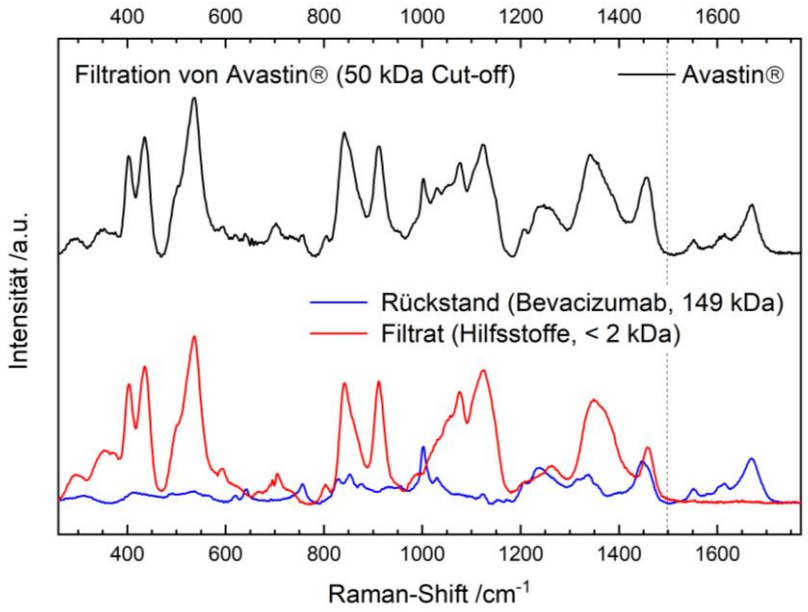

Abb. 1 Raman-Spektren von Avastin® (oben) sowie des Rückstands bzw. Filtrats (unten), nach Filtration von Avastin®. Die Proben wurden als Drop Coating auf einem goldbeschichteten Objektträger mit einem 785 nm Raman-Spektrometer gemessen.

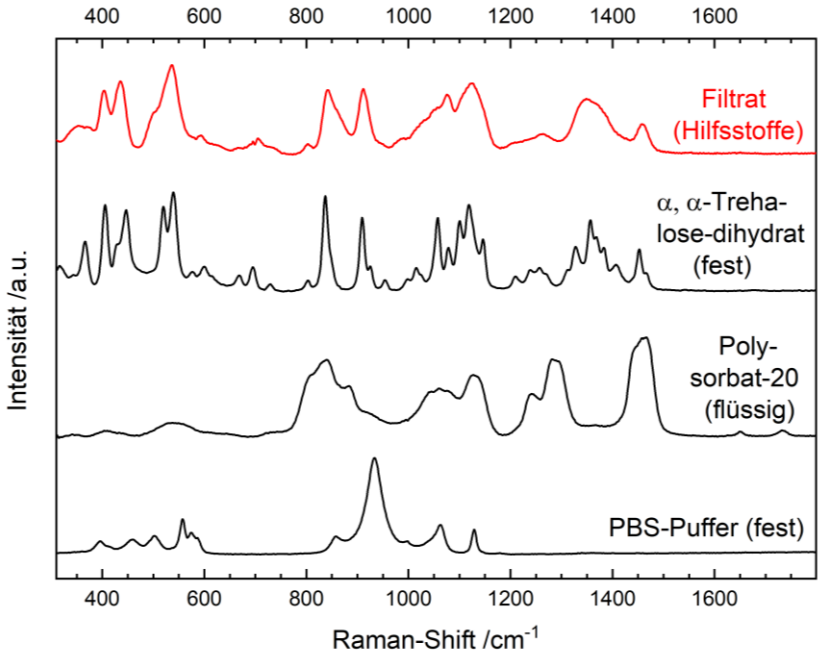

Abb. 2 Raman-Spektren der in Avastin® enthaltenen Hilfsstoffe. Die Proben wurden auf einer Edelstahlplatte mit einem 785 nm Raman-Spektrometer gemessen.

Für eine genauere Analyse des Filtrats wurden Raman-Spektren der in Tab. 1 aufgelisteten Hilfsstoffe aufgenommen (Abb. 2). Das α,α-Trehalose-Dihydrat, welches als Feststoff gemessen wurde und im Raman-Spektrum feiner aufgelöste Merkmale aufweist als im Drop Coating des Filtrats, zeigt unter den Hilfsstoffen den größten Beitrag. Im Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} treten bis auf zwei schwache Banden des Polysorbats keine Banden auf, sodass hier etwaige Informationen zur Proteinstruktur ungestört ermittelt werden könnten.

In Abb. 3 ist das Raman-Spektrum des Rückstands (Bevacizumab) nochmals vergrößert und mit einigen Banden-Zuordnungen dargestellt. Das Raman-Spektrum von Bevacizumab weist viele Marker auf, welche zur Charakterisierung der Primär-, Sekundär sowie Tertiärstruktur des Proteins genutzt werden können und somit eine Auskunft über seine Funktionalität geben. Für eine erschöpfende Darstellung der einzelnen Struktur-Marker wird auf einschlägige Literatur verwiesen (siehe auch Abschn. 2.9.1.2).[4]

Neben den Hilfsstoffen ist die Darreichungsform des Pharmazeutikums ein entscheidendes Kriterium für die Analytik mit Raman-Spektroskopie. In Abb. 1 wurden Raman-Spektren gezeigt, welche von einem Arzneimittelkonzentrat nach Verdampfen des Lösungsmittels aufgenommen wurden. Oftmals sind solche Arzneimittellösungen wie im Fall von Infusionen stark verdünnt. Hier weisen alle Inhaltsstoffe insgesamt ein geringeres Streusignal auf und zusätzlich dominiert das Spektrum des eher schwachen Raman-Streuers Wasser. Abb. 4 verdeutlicht dies anhand der Verdünnungsreihe einer wässrigen Lösung von bovinem Serum-Albumin. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist wesentlich schlechter als bei der Messung einer festen Probe, wodurch längere Aufnahmezeiten nötig werden und Fluktuationen im Gesamtsignal sich stärker auf das Analyt-Signal auswirken.

Insgesamt ergeben sich bei der Untersuchung von verdünnten wässrigen Formulierungen mit konventioneller Raman-Spektroskopie Hürden durch die geringe Analytkonzentration sowie durch die Überlagerung des Spektrums durch Hilfsstoffe. Im vorliegenden Projekt wird oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie als fortschrittliche Methode eingesetzt werden. Diese besitzt einerseits den Vorteil, dass die Raman-Streuung oberflächennaher Analyten verstärkt werden kann. Andererseits können Analyten (monoklonale Antikörper) selektiv angebunden und unter Minimierung von Störeinflüssen durch andere Analyten nachgewiesen werden.

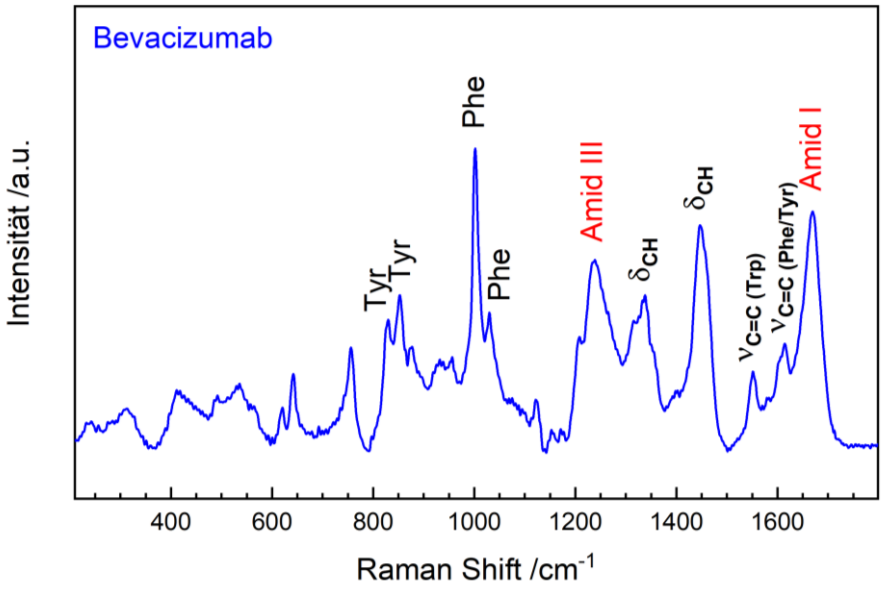

Abb. 3 Raman-Spektrum von Bevacizumab (Rückstand aus Abb. 1).

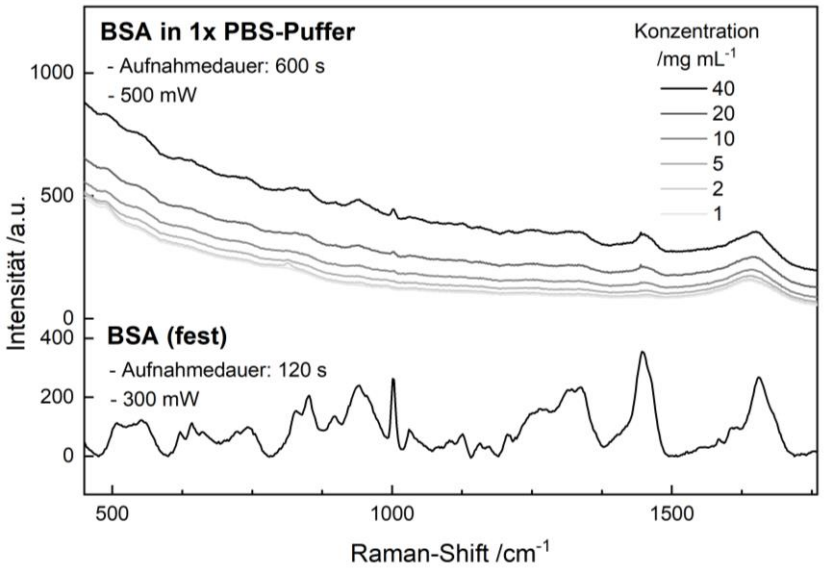

Abb. 4 Raman-Spektren von bovinem Serumalbumin (BSA) als Lösung in 1x-PBS-Puffer (oben) und als Lyophilisat (unten), aufgenommen mit einem 785 nm Raman-Spektrometer.

2.2 Simulation zur Definition angepasster SERS-Nanoantennen

In diesem Forschungsprojekt wurden Simulationen auf Basis eines Finite-Difference-Time-Domain-(FDTD)-Ansatzes durchgeführt. Das Programm errechnet über die Maxwell-Gleichungen die elektromagnetischen Felder in jedem Raumpunkt einer Umgebung (Mesh) und eignet sich besonders für die Simulation nanoskopischer Effekte. Es wurde eine Streulichtsimulation angewandt, um die plasmonischen Effekte an einer Nanostruktur zu simulieren. Durch die kollektive Schwingung der Elektronen, infolge der Anregung durch Licht, bilden sich in Metallstrukturen Felderhöhungen bei bestimmten Anregungsfrequenzen aus. Diese Felderhöhungen gehen in der vierten Potenz in die Signalverstärkung der Raman-Messung ein. Die spektrale Lage der höchsten Felderhöhung wird durch eine Zunahme der Streuung an der Oberfläche berechnet und ausgewertet. In Abb. 5 ist die Simulationsumgebung für eine Au-Nanostruktur auf einem SiO_2-Träger dargestellt. Im Verlauf der Simulation wird die Struktur als periodisch in x- und y-Achsen angenommen. Um die Resonanzfrequenzen bestimmen zu können, wird eine breitbandige Wellenfront auf die Struktur in z-Richtung emittiert und die Feldveränderungen dreidimensional aufgezeichnet.

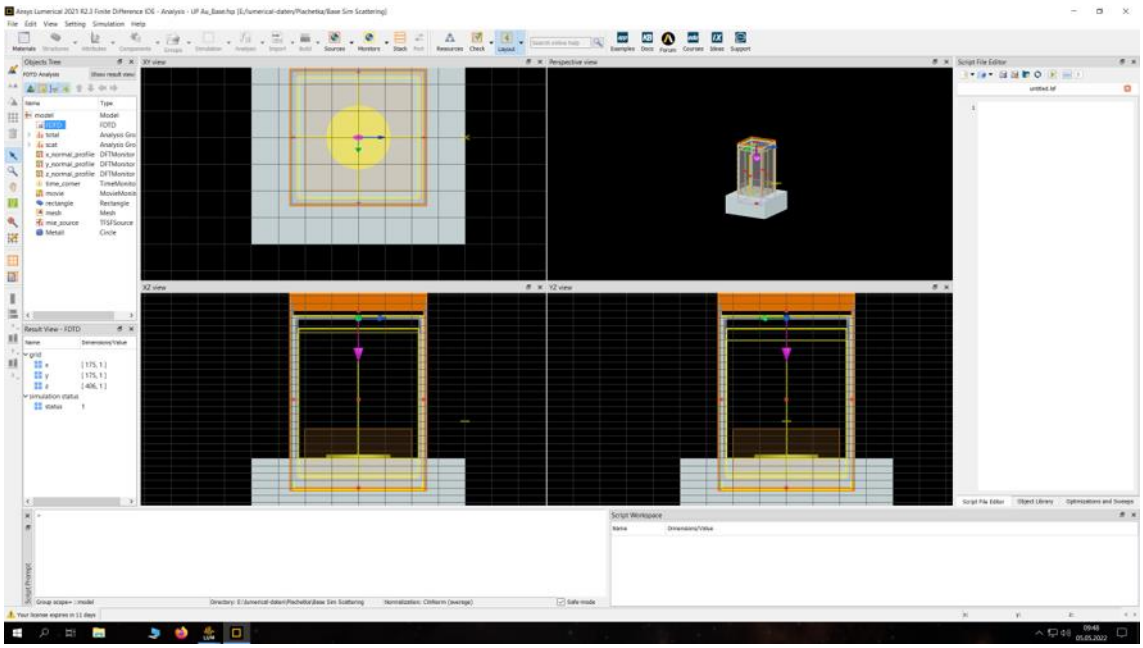

Abb. 5 Simulationsumgebung des FDTD-Solvers. Dargestellt ist die Simulationsumgebung mit den platzierten Monitoren und der Anregungsquelle. Das Testobjekt ist eine metallische Zylinderstruktur auf einem Glasträger.

In Abb. 6 ist die Auswirkung der Strukturperiode (350 nm – 550 nm), des Strukturdurchmessers (155 nm – 195 nm) und der Strukturdicke (30 nm – 100 nm) auf die spektrale Position des Streuungsmaximums dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die spektrale Lage des Maximums verändert. Dabei wurden für Periode, Durchmesser und Dicke Parameter gewählt, die technologisch auch umsetzbar sind. Ziel der Simulation war es, eine Nanostruktur zu entwerfen, deren Streuungsmaximum bei der Anregungswellenlänge des Raman-Lasers von 785 nm liegt, da hier mit der höchsten SERS-Verstärkung gerechnet werden kann. Diese geometrischen Parameter dienen dann als Vorlage für die Herstellung der Nanostrukturen. Hierbei ist ein genereller Trend der Parameter erkennbar: Mit Zunahme der Periode, des Durchmessers und der Strukturdicke verschiebt sich das Streuungsmaximum zu kürzeren Wellenlängen (blue-shift).

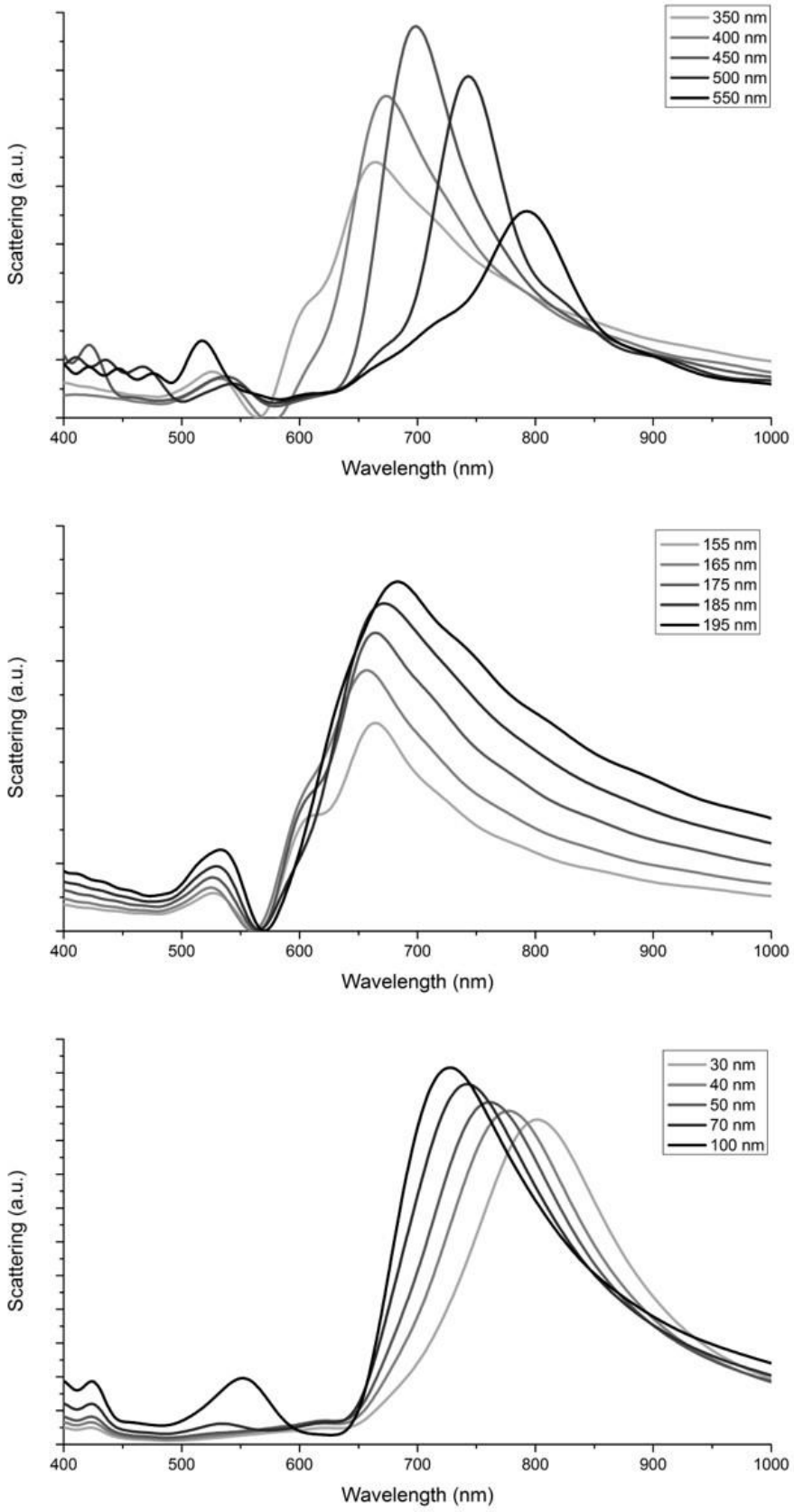

Abb. 6 Spektrale Lage des Streuungsmaximums durch (oben) Veränderung von Strukturperiode, (Mitte) Strukturdurchmesser und (unten) Strukturhöhe.

2.3 Lithographie von periodischen Nanostrukturen

Der Großteil der Arbeiten für AMO im Projekt SERS-PC bestand in der Herstellung der Nanostrukturen und der plasmonischen Beschichtung. Die Simulationen aus AP 1 (Abschn. 2.2) gaben Aufschluss über die Abmaße der erforderlichen Nanostruktur. Um die periodische Struktur herzustellen, wird bei AMO die Laserinterferenzlithographie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine maskenlose Belichtung, bei der zwei Laserwellenfronten mit einer Wellenlänge von 256 nm unter einem definierten Winkel auf einem belackten Substrat zur Interferenz gebracht werden. In dem UV-sensitiven Lack entsteht durch optische Interferenz der beiden Wellenfronten ein periodisches Intensitätsprofil mit sinusoidem Intensitätsverlauf in dem UV sensitiven Lack (Abb. 7). Der Winkel zwischen den beiden Laserfronten bestimmt dabei die gitterförmige Periode der Struktur. Um entsprechende Säulenmuster erzeugen zu können, wird der Wafer um 90° gedreht und ein weiteres Mal belichtet. Das sinusoide Intensitätsmuster wird über den chemisch verstärkten Lack und eine nasschemische Entwicklung in eine binäre Lackmaske umgewandelt.

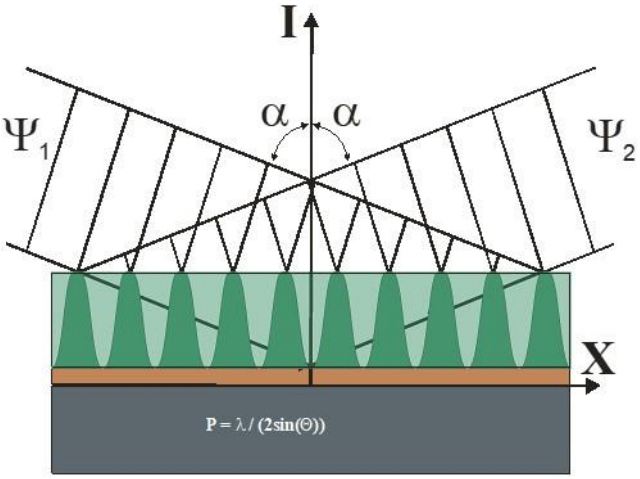

Abb. 7 Darstellung der Einfallswinkel zweier Wellenfronten und der resultierenden Interferenzerscheinung der Intensität in einer Lackschicht.

In Abb. 8 ist eine REM-Aufnahme (Draufsicht) der Lackmaske auf dem Wafer dargestellt. Hierbei lässt sich die periodische Anordnung deutlich erkennen.

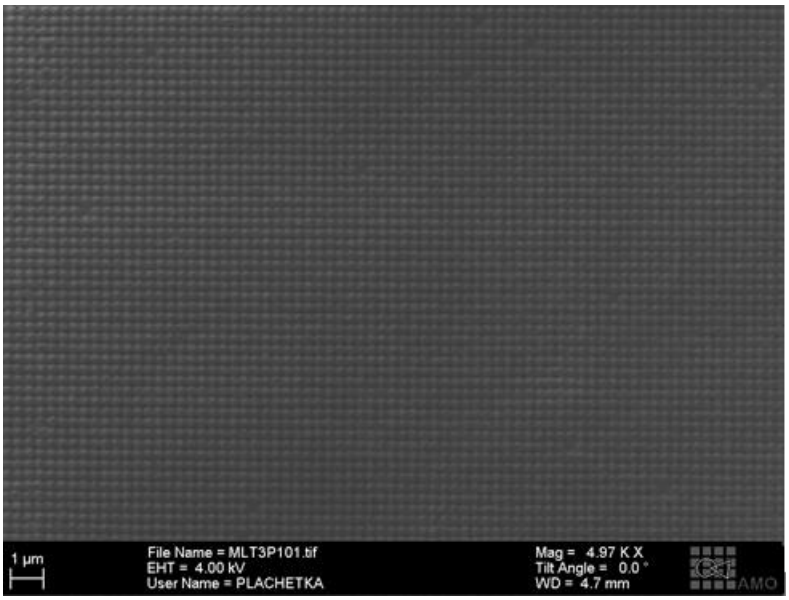

Abb. 8 REM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach der Belichtung.

In Abb. 9 ist das Lackprofil und ein Segment der strukturierten Oberfläche abgebildet. In der AFM-Aufnahme ist die Periodizität der Nanostruktur sichtbar.

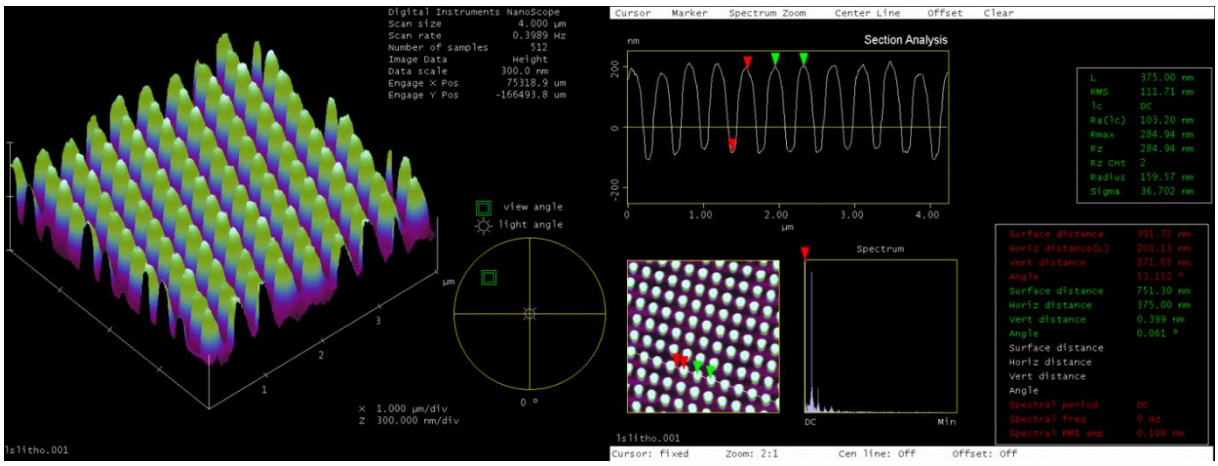

Abb. 9 AFM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach der Belichtung.

Die Lackmasken werden zur Übertragung der Struktur in das Zielsubstrat verwendet und während des anisotropen Ätzprozesses aufgebraucht.

2.4 Strukturübertragung in Oberflächen mittels trockenchemischem Ätzen

Das Muster aus Abb. 9 und Abb. 10 wird anschließend in einem Plasmaätzschritt mit SF_6-Gas weitgehend anisotrop in das Substrat unter der Lackmaske geätzt. Nach Entfernung des Lackes kann nun die entsprechende Säulenstruktur in einen entsprechenden Si-Wafer übertragen werden. Dieser strukturierte Si-Wafer wird verwendet, um ein Werkzeug herzustellen, das für die eigentliche Replikation verwendet wird. Dazu wird ein C_4F_8-Plasma auf der Oberfläche gezündet, das eine dünne teflonartige Schicht von wenigen Nanometern auf der Oberfläche zurücklässt, die als Antihaftbeschichtung wirkt. Auf diese Oberfläche wird dann eine flüssige Silikonmasse (PDMS, Polydimethylsiloxan) aufgegossen, im Vakuum entgast und thermisch polymerisiert. Nachfolgend wird dieser erstarrte Silikonstempel von dem Si-Wafer abgezogen und zur Replikation der Nanostrukturen verwendet.

Diese Herstellung besteht aus Beschichtungen, lithographischen Prozessen und Ätzschritten und ist in Abb. 10 dargestellt. Als Zielsubstrat wird ein SiO_2-Wafer verwendet. Auf diesen wird eine etwa 50 nm dicke Al-Schicht mittels Elektronenstrahlverdampfung aufgebracht. Die Al-Schicht dient später als Hartmaske in der Ätzung. Auf die Metallschicht wird ein Prägelack (AMONIL) aufgeschleudert. Dann wird der PDMS-Stempel in den noch flüssigen Lack gedrückt. Sobald der Lack die Vertiefungen des Stempels ausgefüllt hat, wird er durch den transparenten Stempel hindurch mittels UV-Licht polymerisiert. Danach wird der Stempel entformt und kann wiederverwendet werden. Die nun strukturierte Lackmaske wird bis auf das unterliegende Al mittels BCl_3-Plasma geöffnet. Im Anschluss wird die strukturierte Lackmaske mittels BCl_3/Cl_2-Plasma anisotrop in das Al geätzt. Das Al dient während der Plasmaprozessierung mittels CHF_3-Gas in das SiO_2-Zielsubstrat als Ätzmaske. Zuletzt werden die Reste des Lackes und des Al nasschemisch entfernt; zurück bleibt eine saubere Nanostruktur in SiO_2. Abschließend muss dann die plasmonische Materialschicht auf die Oberfläche gebracht werden.

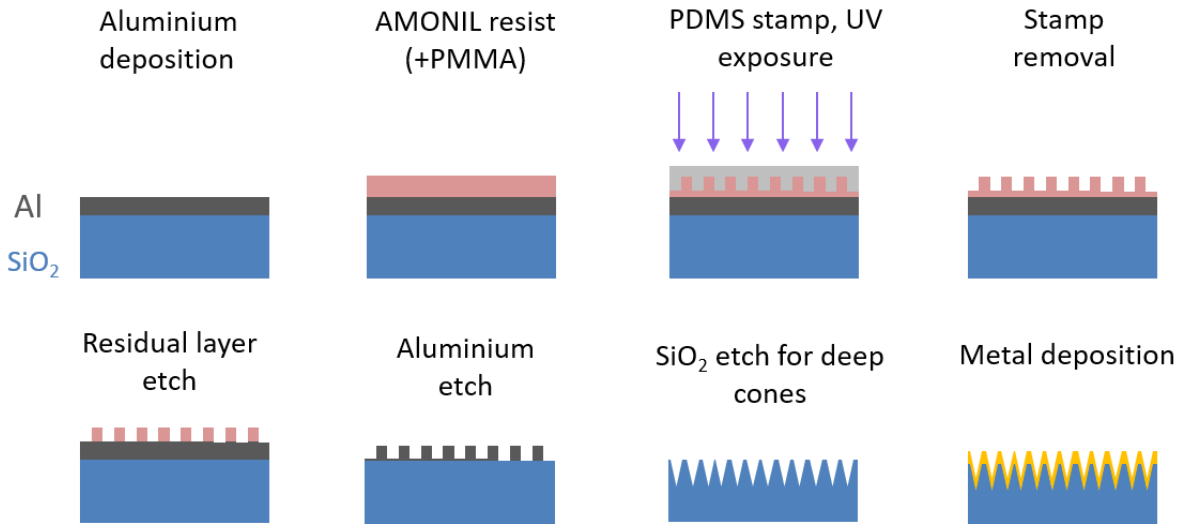

Abb. 10 Schematische Darstellung einer Prozesssequenz zur Herstellung der SERS-Oberfläche.

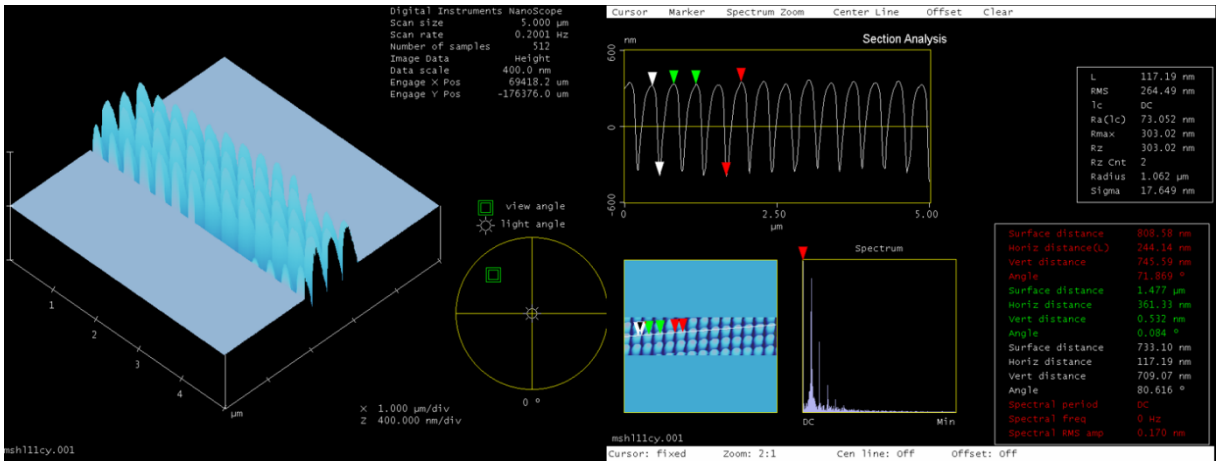

Abb. 11 AFM-Aufnahme der Nanostruktur auf der Oberfläche nach Strukturübertragung mittels Ätzprozess.

Zusätzlich zu diesen periodischen SERS-Strukturen wurden auch solche mit einer statistischen Verteilung hergestellt. Diese sollen dem Nachweis dienen, dass die Verstärkung einer periodischen Struktur einer statistisch verteilten Struktur überlegen ist. Für diese Proben wird keine aufwendige Lithographie benötigt, sondern sie werden in einem maskenlosen Ätzverfahren in einen Si-Wafer mit einem SF_6-basierten Plasmaätzprozess erzeugt. In Abb. 12 sind die REM- und AFM-Aufnahmen der resultierenden sog. Black Si-Oberfläche abgebildet. Die Nanostrukturen haben eine Tiefe von ca. 1 µm und einen Säulendurchmesser kleiner als 240 nm. Die Nanostrukturen wurden ebenfalls mit einer dünnen Au-Schicht belegt, funktionalisiert, gemessen und in der Funktion mit den P300-Proben verglichen (siehe Beschreibung Arbeitspaket 5).

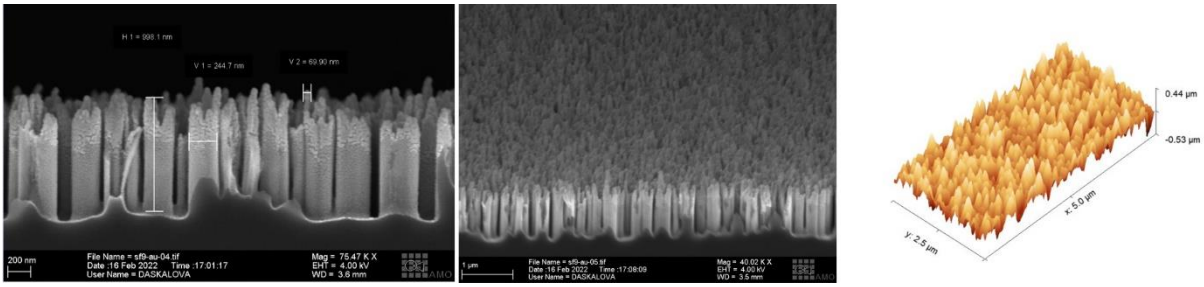

Abb. 12 REM- und AFM-Aufnahme der statistisch verteilten Nanostruktur auf der Oberfläche eines Si-Substrates.

2.5 Materialdeposition für plasmonische Funktionsschicht

Die Wahl für die plasmonische Funktionsschicht erfolgt aus den Bedingungen, die für die Plasmonik notwendig sind, orientiert sich allerdings auch an den Notwendigkeiten der im Rahmen der Antragsstellung definierten Zielapplikation. Die plasmonische Funktionalität lässt sich aus der Dielektrizitätsfunktion ablesen. Die Nanostruktur an sich soll bei einer Anregung von 785 nm für SERS-Verstärkungen verwendet werden können, um mit gängigen Raman-Systemen auf dem Markt kompatibel zu sein. In Abb. 13 sind der extrahierte Real- und Imaginärteil der dielektrischen Funktionen von Silber (Ag) und Gold (Au) aus der Simulationsdatenbank abgebildet.

Der Realteil (jeweils links) zeigt auf, bis zu welcher Minimalwellenlänge noch Plasmonen in einem Material angeregt werden können. Dazu muss der Realteil deutlich im negativen Bereich liegen. Für Au ist dies bis zu einer Wellenlänge von etwa 510 nm der Fall. Bei Anregungen mit kürzeren Wellenlängen eignet sich Gold nicht mehr für plasmonische Baugruppen, da die Absorption im Material deutlich ansteigt. Der Realteil von Ag ist bis in den UV-A-Bereich (ca. 320 nm) negativ und würde sich bis dahin für plasmonische Anwendungen eignen. Auf der anderen Seite gibt der Imaginärteil der Funktion (rechts) Aufschluss über die dielektrischen Verluste im Material. Diese sollten möglichst klein sein. Hier ist für Ag zu erkennen, dass die Verluste bei Wellenlängen über 400 nm deutlich ansteigen. Hingegen sind die Verluste für Au von etwa 550 nm bis 850 nm sehr klein. In diesem Bereich eignet sich Au besonders für die Plasmonik.

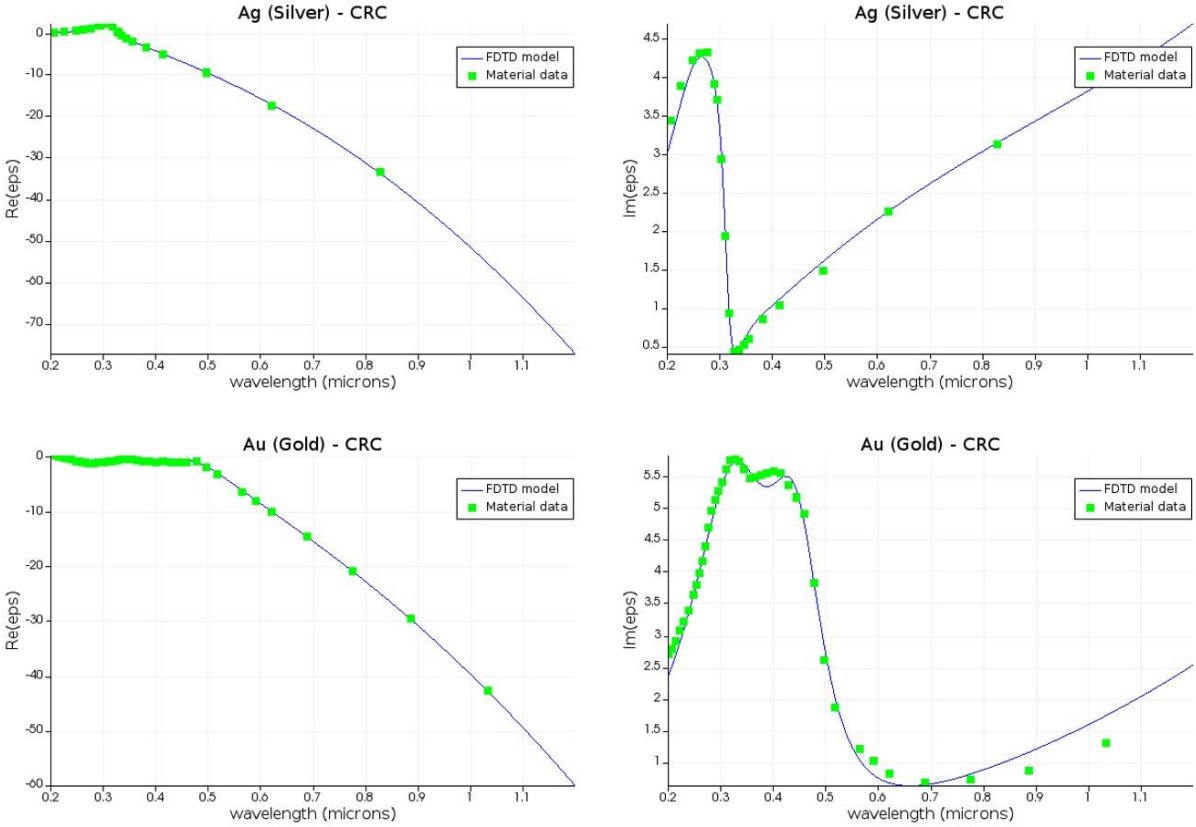

Abb. 13 Realteil (links) und Imaginärteil (rechst) der Dielektrizitätsfunktion von Silber und Gold extrahiert aus einem FDTD-Solver.

Zusätzlich sind Bedingungen, die durch die Zielapplikation vorgegeben werden, zu berücksichtigen. In diesem Projekt sollen Proteine mit und ohne Oberflächenfunktionalisierung auf dem SERS-Chip analysiert werden. Ag hat hier mehrere entscheidende Nachteile: Zum einen oxidiert Ag und verändert

dadurch die Oberflächenchemie, weshalb es u. a. weniger Funktionalisierungsansätze gibt als beispielsweise mit Au. Weiter erfüllt Ag nicht die Bedingungen der Biokompatibilität, sondern wirkt sich schädlich auf Mikroorganismen aus. Au hat diese Nachteile nicht. Des Weiteren sollten im Projektverlauf Tests durchgeführt werden, ob die SERS-Substrate wiederverwendbar sind. Hierzu sollten nasschemische als auch plasmabasierte Prozesse eingesetzt werden. Auch hier hat Au gegenüber Ag deutliche Vorteile in punkto Stabilität. Vor diesem Hintergrund wurde festgelegt, die metallische Beschichtung mit Au auszuführen.

Dazu wurden verschiedene Prozesse verwendet und unterschiedliche Materialdicken getestet. Für die erste Generation von Proben wurde eine deutlich zu dünne Au-Schicht aus einem PVD-Prozess (Physical Vapour Deposition) auf der strukturierten Oberfläche deponiert. Die entsprechenden REM- und AFM-Aufnahmen sind in Abb. 14 abgebildet. Die SiO_2-Unterstruktur ist deutlich zu erkennen, allerdings sind selbst nach einer zusätzlichen Ni-Schicht Aufladungseffekte sichtbar. Das deutet auf eine sehr dünne oder nicht geschlossene Au-Schicht hin.

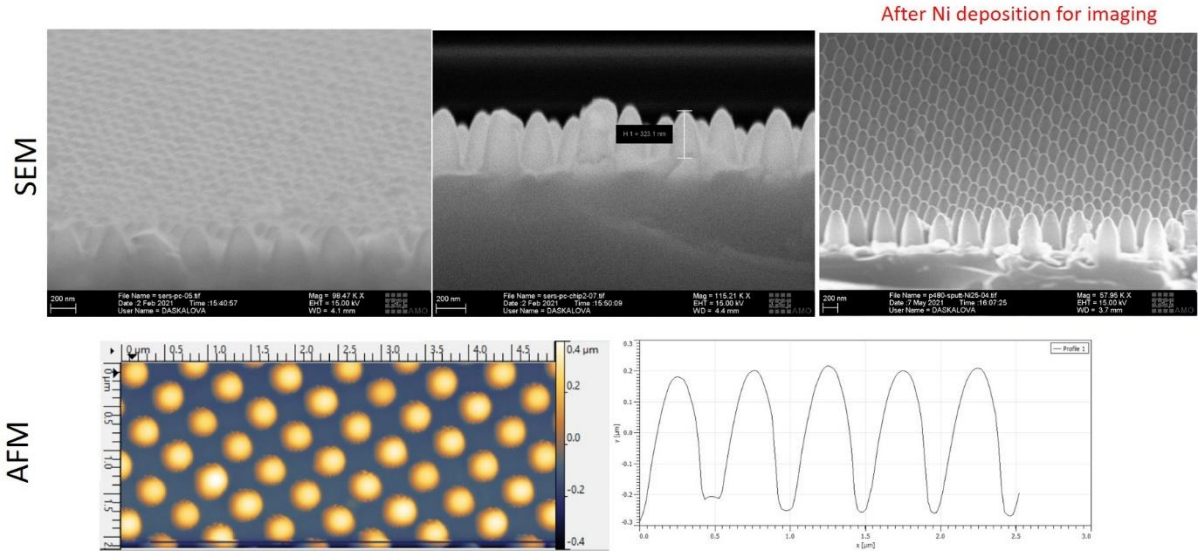

Abb. 14 REM- und AFM-Aufnahmen der ersten SERS-Teststruktur (K2-Chip).

Raman-Messungen an diesen Oberflächen (Abschn. 2.6) zeigten nur eine mäßige plasmonische Funktion und damit eine geringe Verstärkung. Für die nächste Probengeneration wurden unterschiedliche Au-Dicken mit einem Elektronenstrahlverdampfer aufgetragen. Danach wurden die Proben im REM und AFM inspiziert, gefolgt von einem SERS-Test mit einem Testmolekül (siehe auch Abschn. 2.6).

In Abb. 15 (oben) sind die REM-Aufnahmen der mit Au-bedampften SiO_2-Nanostruktur abgebildet. Die drei Schichtdicken 30 nm, 70 nm und 100 nm wurden deponiert und die Auswirkungen auf die Oberfläche gemessen. In der REM-Aufnahme ist zu erkennen, dass die Nanostruktur bei 30 nm Au-Dicke noch aufgelöst ist und die Tiefenmessung mit dem AFM eine Maximaltiefe zwischen den Strukturen von 340 nm ergibt. Auch die Nanostrukturen mit einer 70 nm Beschichtung sind noch vollständig aufgelöst, jedoch zeigt sich in der AFM-Analyse, dass die Tiefe auf 300 nm reduziert wurde. Die Schicht ist also schon so dick, dass die Zwischenräume der Nanostrukturen teilweise durch das Au geschlossen werden. Bei 100 nm sind die Zwischenräume der Nanostrukturen durch die Beschichtung nur noch schlecht zu erkennen und die maximale Strukturtiefe sinkt auf 220 nm ab.

Um zu bewerten, welchen Einfluss die Veränderung der Nanostruktur auf die Raman-Messungen hat, wurden die entsprechenden Tests durchgeführt (Abschn. 2.6). Hier zeigte sich, dass die Beschichtung

mit 70 nm die höchste Verstärkung ergab und entsprechend wurden die weiteren SERS-Oberflächen mit dieser Dicke versehen. In Abb. 16 ist eine Mikroskopaufnahme einer solchen Au-bedampften Oberfläche abgebildet.

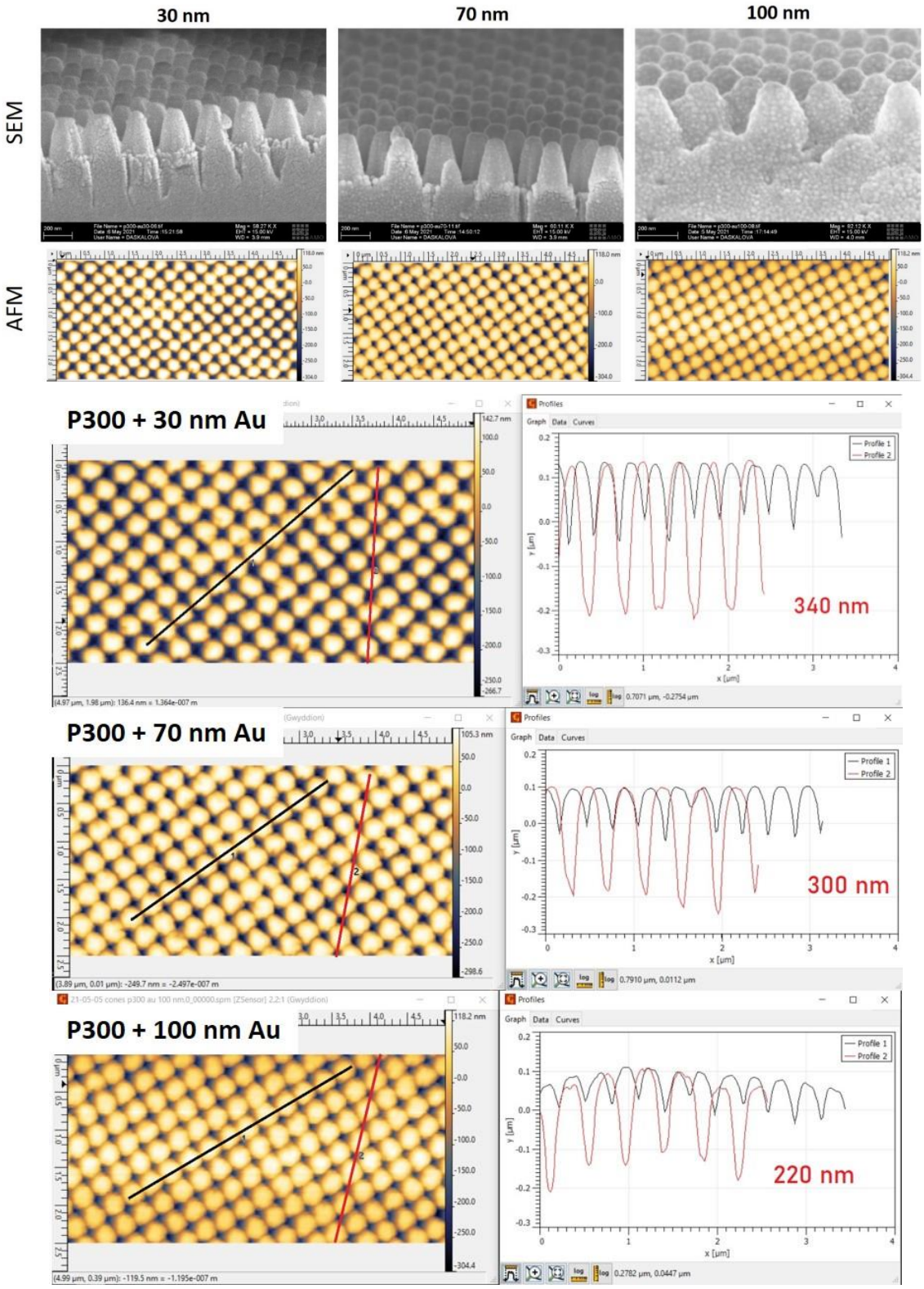

Abb. 15 REM- und AFM-Aufnahmen der zweiten Teststruktur.

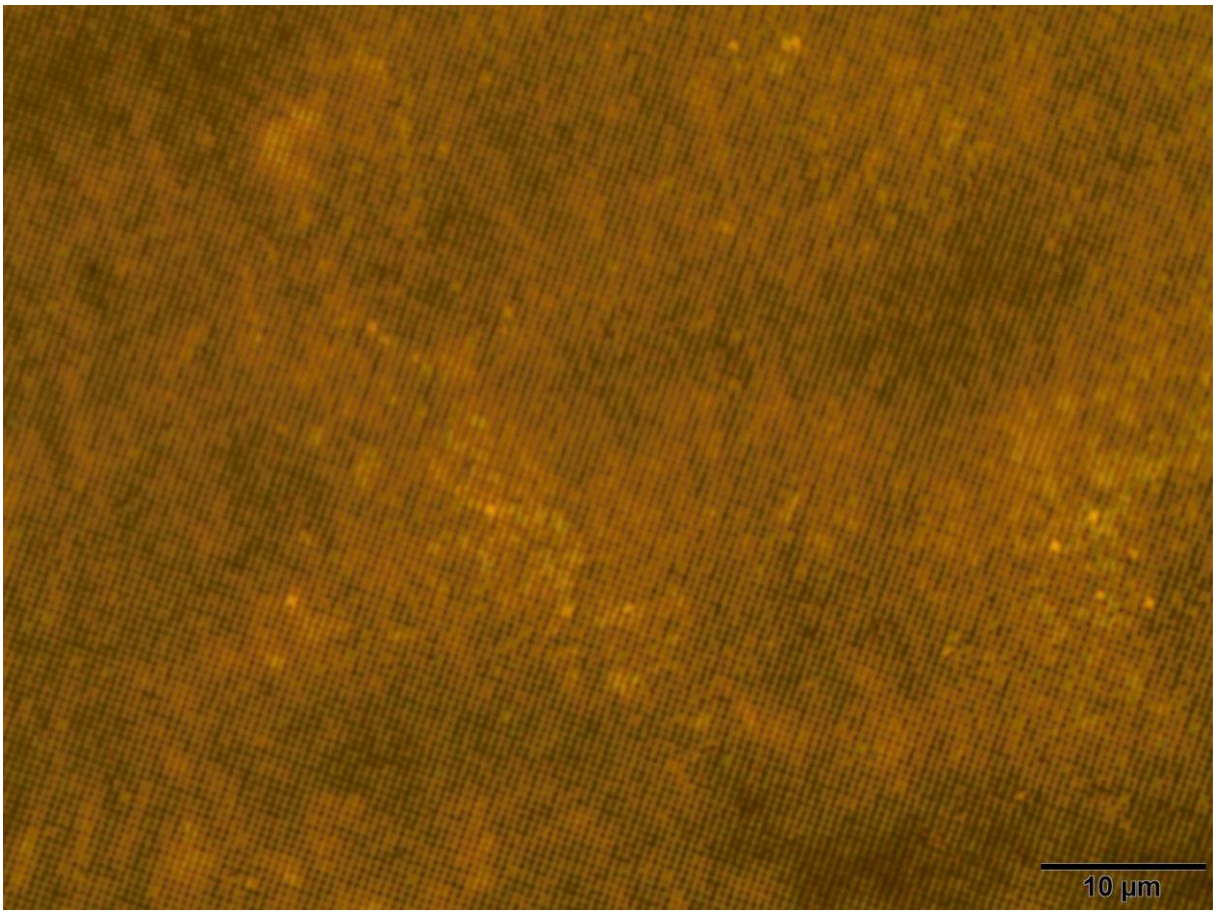

Abb. 16 Mikroskopaufnahme der SERS-Oberfläche nach der Bedampfung.

2.6 Charakterisierung und Funktionstests

Die Funktionsmessungen wurden auf den verschiedenen SERS-Substraten durchgeführt. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurde eine alternative Methode zur Fokuseinstellung auf der Testoberfläche angewandt. Anstatt die Oberfläche optisch scharf zu stellen oder das Laserbild der nullten Beugungsdisc im Durchmesser zu minimieren wurde ein automatisches Fokusmapping entlang der z-Achse durchgeführt. Dabei wird der gemessene Spektralbereich auf einen der bekannten Testpeaks reduziert, um das Mapping in nur 1-2 Minuten durchzuführen. Dann wird der Fokus in 200 nm Schritten entlang der z-Achse verschoben. Bei dem z-Wert, bei dem das Maximum des Testpeaks erreicht wird, werden dann die Folgemessungen durchgeführt. Für Testmessungen wurden sowohl Thiophenol als auch 4-MBA verwendet, da beide Moleküle eine SAM (Self Assembled Monolayer) auf einer Au-Oberfläche ausbilden. 4-MBA kommt allerdings eine höhere Bedeutung im Projekt SERS-PC zu, da es als erste Funktionalisierung für die gezielte Proteinanlagerung verwendet werden sollte. In Abb. 17 sind die Raman-Messungen auf einer Chipoberfläche ohne deponierten Analyten und auf jeweils mit den beiden Testmolekülen behandelten Oberflächen zu erkennen. Hier wurde der K2-Chip verwendet (vgl. Abb. 14) und es wurden jeweils drei Testareale angefahren.

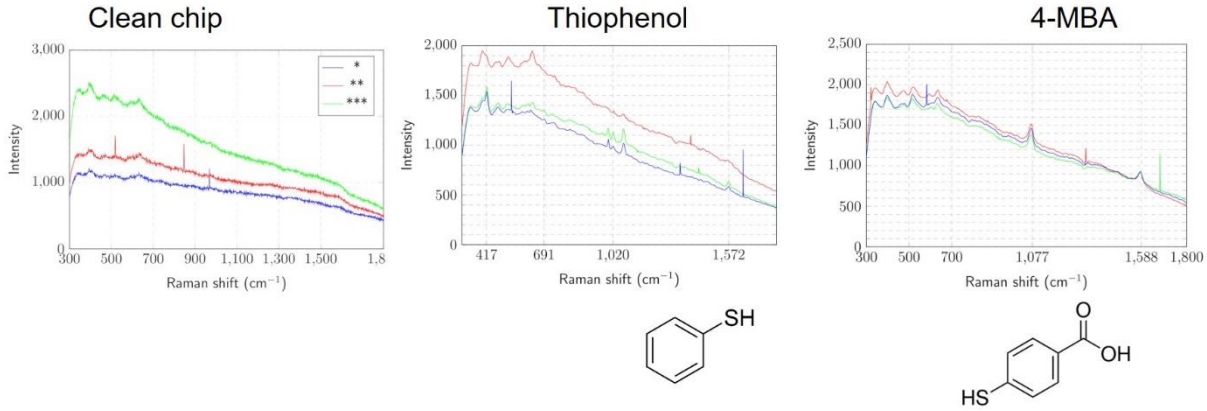

Abb. 17 SERS-Messungen auf K2-Substraten in drei verschiedenen Testarealen: (links) sauber ohne Funktionalisierung, (Mitte) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM.

Es zeigt sich, dass auf dem sauberen Chip leichte Rückstände vorhanden sein können (rote Messkurve). Bei den Thiophenolmessungen fällt auf, dass das Testmolekül nur an zwei Positionen einwandfrei erkannt werden kann (blaue und grüne Kurve). Die Substanz 4-MBA konnte an allen Testpunkten korrekt aufgezeichnet werden. In Abschn. 2.5 wurde bereits darauf hingewiesen, dass bei den K2-Chips die Au-Beschichtung womöglich nicht geschlossen ist und örtlich variiert. Das führt zu Fehlmessungen und auch falschen Messsignalen, da die Verstärkung variiert und spektrale Informationen des Substratmaterials von unter der Metallschicht miterfasst werden können.
In Abb. 18 sind Messungen zu dem P300-Chip dargestellt. Hier wurde die Au-Dicke (Abb. 15) in drei Schritten variiert.

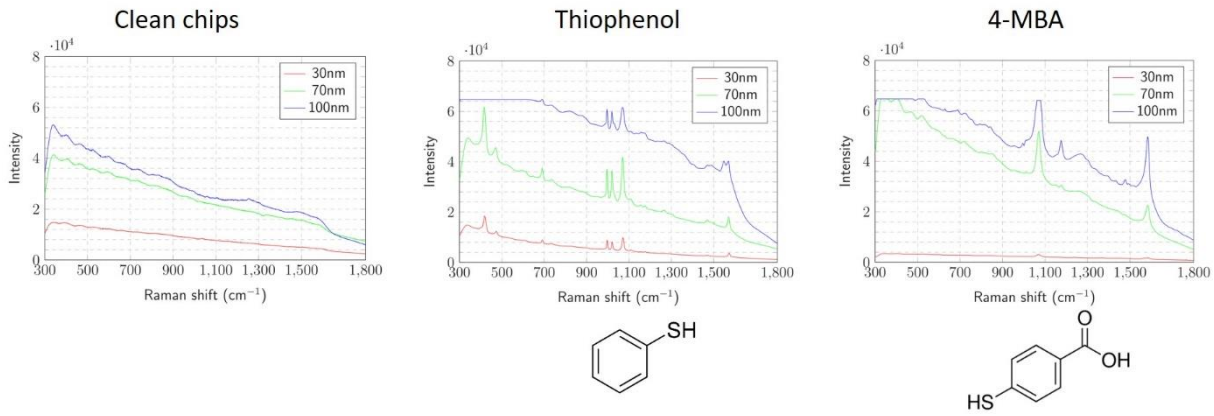

Abb. 18 SERS-Messungen auf P300-Substraten mit drei Au-Dicken (30 nm, 70 nm, 100 nm): (links) sauber ohne Funktionalisierung, (Mitte) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM.

Die drei Testmessungen der sauberen Chips sind unauffällig, zeigen aber, dass der Signaluntergrund von der Schichtdicke abhängt. Mit zunehmender Goldbeschichtung nimmt der Untergrund zu. Bei allen drei Messungen konnte das Testmolekül Thiophenol eindeutig identifiziert werden. Es zeigt sich jedoch, dass die Einzelpeaks des Spektrums bei einer Schichtdicke von 70 nm die höchste Messintensität haben. Ebenfalls ist ersichtlich, dass der Untergrund bei allen Messungen gleichgeblieben ist. Dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Chips als auch des Messverfahrens. Bei der Verwendung von 4-MBA ist der Trend ähnlich, jedoch zeigt die Messung bei einer Schichtdicke des Golds von 30 nm kein Spektrum mehr. Zudem lässt sich erkennen, dass der hohe Untergrund bei den Proben mit einer Schichtdicke von 100 nm (blaue Messkurven) dazu führt, dass bei Wellenzahlen unter 600 cm^{-1} der Detektor in die „Sättigung“ gelangt und die Peaks bei niedrigen Wellenzahlen nicht mehr ausgewertet werden können.
Entsprechend diesen Testmessungen wurden alle P300-Oberflächen mit einer Au-Dicke von 70 nm bedampft. Bei dieser Dicke konnte von den Testmolekülen der eindeutigste spektrale Fingerabdruck gemessen werden und der Untergrund befindet sich in einem akzeptablen Bereich. In Abb. 19 wurden die Testmessungen an den zwei Testsubstanzen in drei Testarealen bei diesen Chips wiederholt.

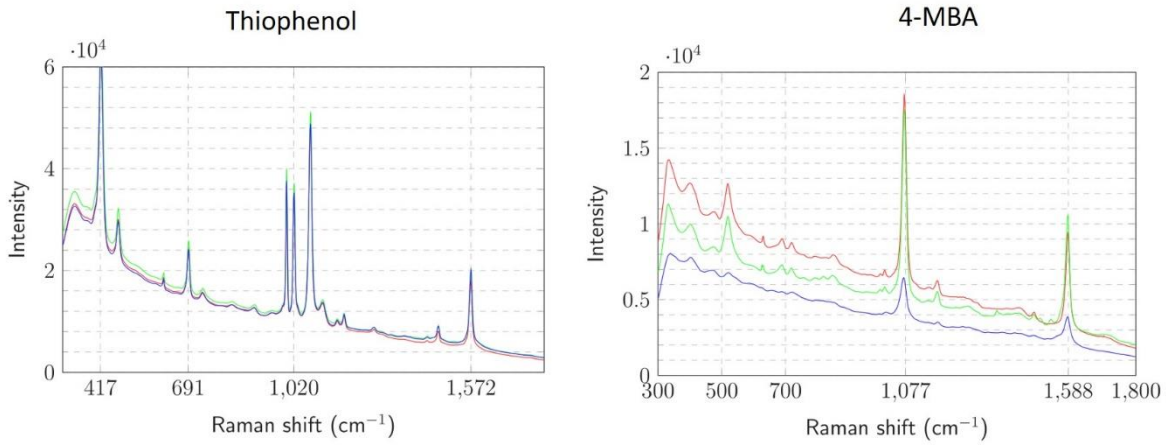

Abb. 19 SERS-Messungen auf K2-Substraten in drei verschiedenen Testarealen: (links) mit Thiophenol-SAM, (rechts) mit 4-MBA-SAM.

Es ist ersichtlich, dass die Messungen bei den Thiophenolproben ideal übereinanderliegen. Ähnlich sieht es bei den 4-MBA-Testmessungen aus, wobei hier eine der drei Messkurven abweicht. Trotzdem sind die Testmoleküle im Spektrum deutlich zu erkennen.
In Abb. 20 sind die Messungen an einem K2- und am P300-Substrat direkt gegenübergestellt. Der qualitative Unterschied ist sofort zu erkennen. Bei quantitativer Bewertung der einzelnen Spektrallinie wird deutlich, dass sich beim K2-Chip die einzelnen Peaks nur 100 Counts vom Untergrund aus erheben. Bei gleichen Messparametern erheben sich die Spektrallinien bei dem P300-Chip etwa 40000 Counts vom Untergrund. Damit ist die Sensitivität des SERS-Substrates innerhalb des Projektes deutlich verbessert worden.

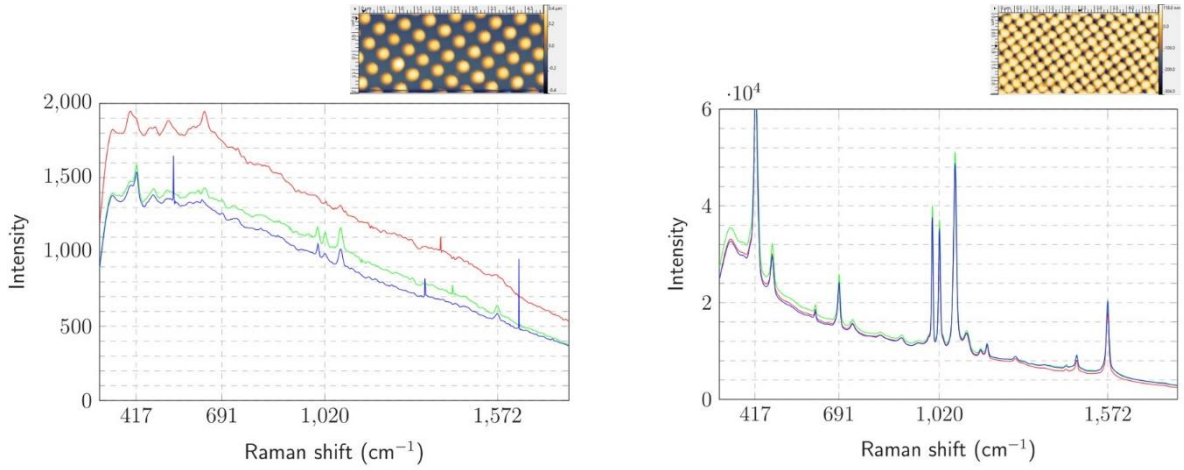

Abb. 20 SERS-Messungen einer Thiophenol SAM in drei Testarealen auf: (links) K2-Substrat und (rechts) P300-Substrat.

Zusätzlich wurden die Black Si-Substrate in ihrer SERS-Funktionalität mit den P300-Substraten verglichen. Als Testmolekül wurde hier wieder 4-MBA verwendet. In Abb. 21 sind die entsprechenden SERS-Spektren dargestellt. Die Black Si-Substrate zeigen eine doppelt so hohe Signalintensität als die P300-Substrate.

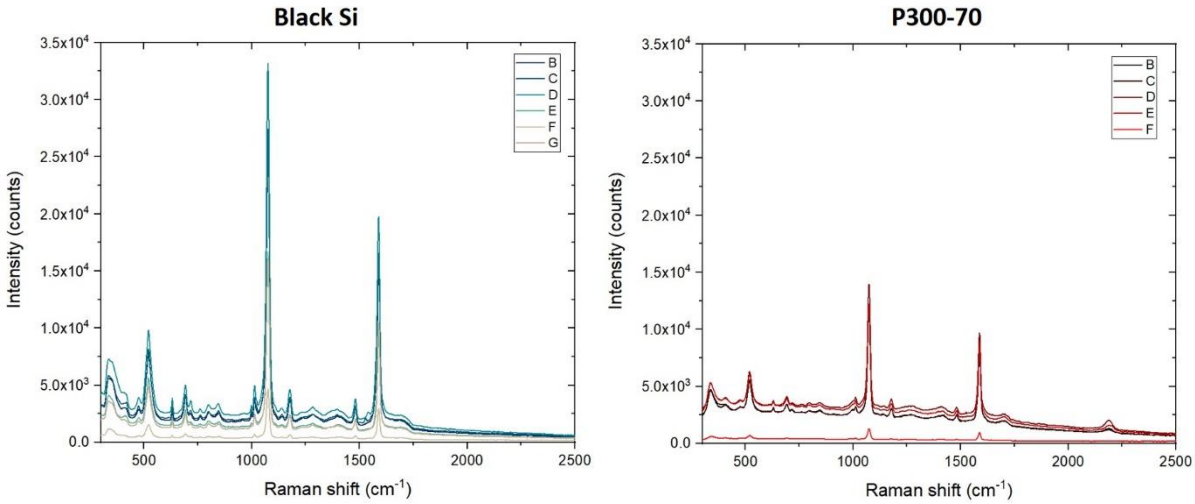

Abb. 21 SERS-Messungen einer 4-MBA SAM in mehreren Testarealen auf: (links) Black-Si-Substrat und (rechts) P300-Substrat.

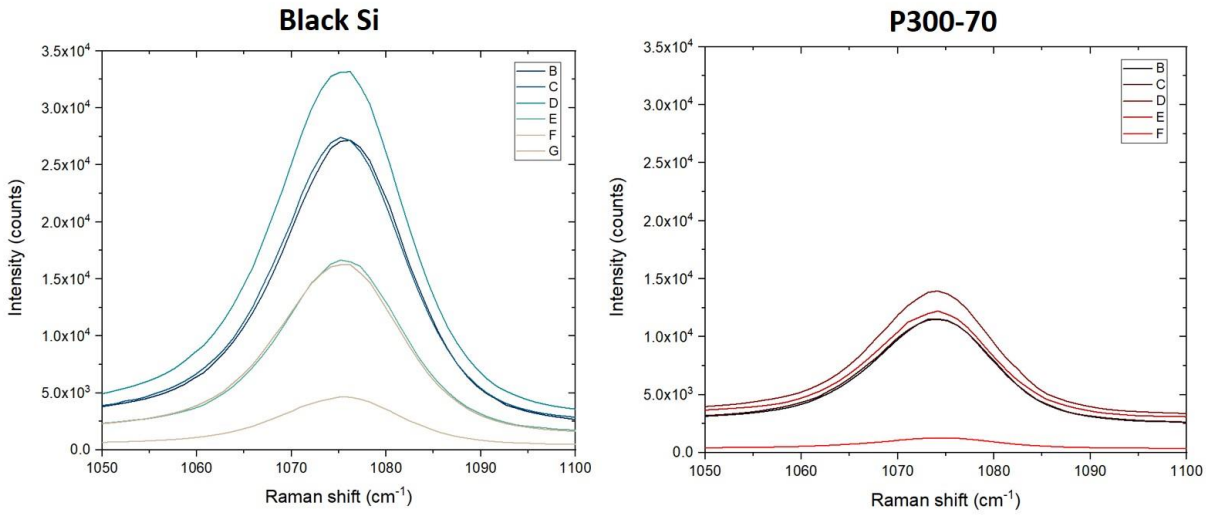

Abb. 22 SERS-Messungen einer 4-MBA SAM in mehreren Testarealen auf: (links) Black-Si-Substrat und (rechts) P300-Substrat.

Bei Betrachtung einzelner Peaks (z. B. bei 1075 cm^{-1}), die in verschiedenen Testarealen gemessen wurden, wird deutlich, dass die Signalintensität bei den Black Si-Substraten deutlich stärker variiert als bei den P300-Oberflächen (Abb. 22). Somit ist die Verstärkung der statistischen Black-Si-Substrate zwar höher, jedoch wird eine Quantifizierung hier offensichtlich erschwert. Der Grund in der Varianz liegt in der statistischen Verteilung und den damit einhergehenden unterschiedlichen Abständen zwischen den Au-beschichteten Nanostrukturen (vgl. Abb. 12). Die unterschiedlichen Abstände erzeugen unterschiedlich hohe plasmonische Resonanzen in veränderlichen spektralen Bereichen. Bei der periodischen Nanostruktur sind Abstände, Durchmesser und Belegung konstant. Damit ergibt sich eine deutlich kleinere Varianz des Messsignals.

Für Anwender der SERS-Technologie ist es von Interesse, ob die SERS-Oberflächen wiederverwendet werden können. Eine nass- oder trockenchemische Reinigung, die die SERS-Substrate nicht beschädigt, wäre ein enormer Vorteil. Im Projekt wurden rein organische Substanzen gemessen. Mit den richtigen Ätzlösungen oder Ätzgasen können organische Rückstände entfernt werden. Allerdings handelt es sich bei der SERS-Messmethode um ein sehr sensitives Verfahren, das besonders geeignet ist, um Spurenstoffe noch detektieren zu können. Dementsprechend eignen sich nur Methoden, die die Analyten restlos entfernen können, ansonsten werden nachfolgende Messungen durch die Reststoffe beeinträchtigt. Bei der Vorgehensweise wurden zwei unterschiedliche Fälle der Belegung getestet. Zum einen wurden mehrere Mikrometer dicke Schichten von Bovine Serum Albumin (BSA) durch Tropfdeposition mit Kaffeeringbildung auf die Oberfläche gebracht. In dem zweiten Fall wurde wiederum eine Monolage von Thiophenol verwendet.

Als nasschemische Reinigungslösung wurden H_2O_2, H_2O_2 / H_2SO_4 (1/1) und NH_4OH / H_2O_2 / H_2O (1/2/5) getestet. Leider konnte nach 10 min Einwirkung aller drei Reinigungslösungen eine deutliche Degradation der Oberfläche und teilweise eine Ablösung der Au-Schicht beobachtet werden, sodass dieses Reinigungskonzept bei der Materialkonzeption des SERS-Chips aus SiO_2-Träger und Au-Schicht verworfen wurde. Die Einzelmaterialien werden zwar nicht geätzt, aber die Adsorption zwischen den beiden Materialien ist nicht ausreichend.

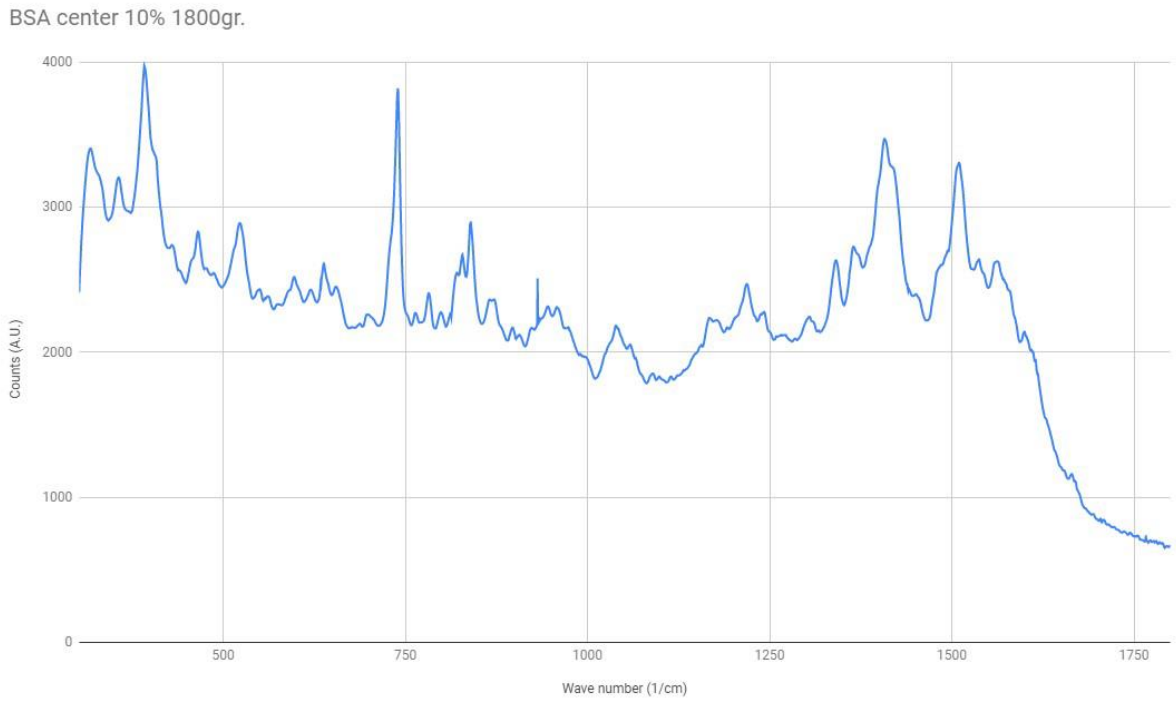

Abb. 23 SERS-Messungen einer mehrere Mikrometer dicken BSA-Schicht.

Beim zweiten Reinigungsansatz wurde ein Sauerstoffplasma in einem Verascher (Standard-Barrelreaktor) mit 200 mL/min O_2 und 200 W Leistung verwendet. In Abb. 23 ist das Raman-Signal der mehrere Mikrometer dicken BSA-Schicht dargestellt.

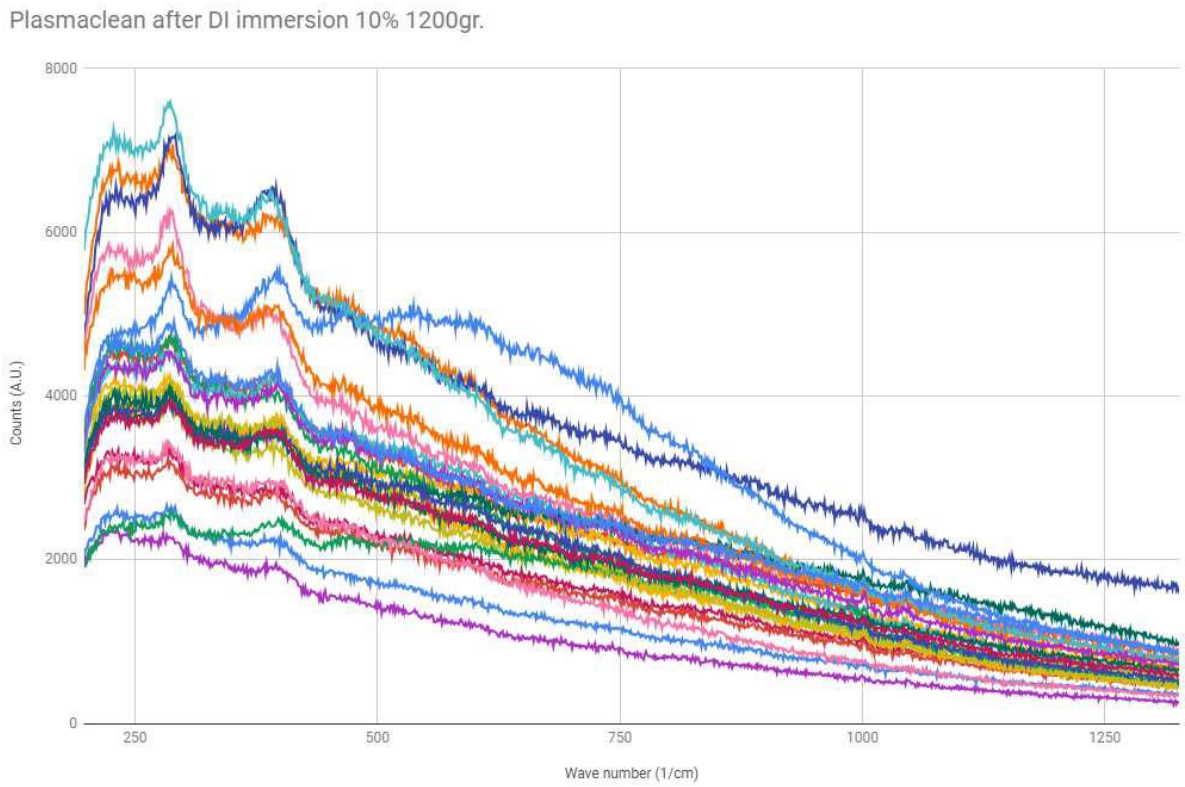

Abb. 24 SERS-Messungen in verschiedenen Testarealen nach Plasmareinigung.

Danach wurde das SERS-Substrat in den Plasmareaktor gebracht. Das Ergebnis der Reinigung ist in Abb. 24 dargestellt. Hier wurden multiple Messungen in verschiedenen Testarealen durchgeführt. Das Spektrum von BSA ist hier nicht mehr zu erkennen, jedoch gibt es, abhängig von der Position, noch einzelne Peaks von Überresten auf dem Chip. Auch bei einer längeren Plasmaeinwirkzeit von bis zu 20 min konnten diese nicht restlos entfernt werden.
In Abb. 25 ist die Messung der Thiophenol-SAM in verschiedenen Bereichen eines SERS-Substrates abgebildet. Das eindeutige Spektrum des kovalent angebundenen Testmoleküls ist gut zu erkennen.

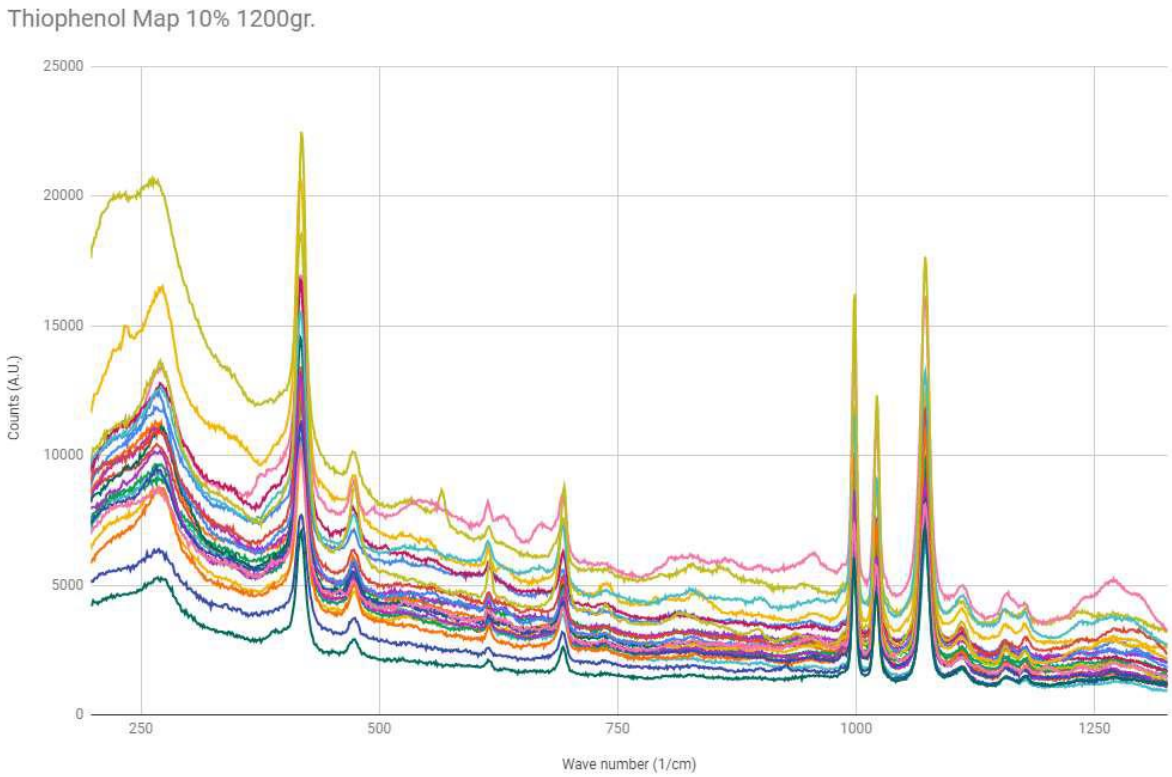

Abb. 25 SERS-Messungen einer Thiophenol-SAM in verschiedenen Testarealen.

Abb. 26 zeigt die Messung auf dem gleichen SERS-Substrat. Der spektrale Fingerabdruck des Thiophenols ist an allen gemessenen Stellen nicht mehr nachzuweisen.

Das bedeutet für das Messverfahren generell, dass eine Abreinigung von mehreren Mikrometern einer organischen Substanz nicht zu einer ausreichenden Reinigungswirkung führt. Insgesamt ist eine solche massive Belegung mit einem Analyten auch für das Messverfahren nicht vorgesehen. Die Entfernung der Monolagen durch das Plasma stellt ein Testprofil dar, das dem Einsatzzweck in diesem Projekt deutlich näher kommt. Hier konnte eine effektive Reinigung erfolgreich demonstriert werden. Um Thiophenol von der Oberfläche zu entfernen, müssen sogar die kovalenten Bindungen zwischen Au und Testmolekül aufgebrochen worden sein.

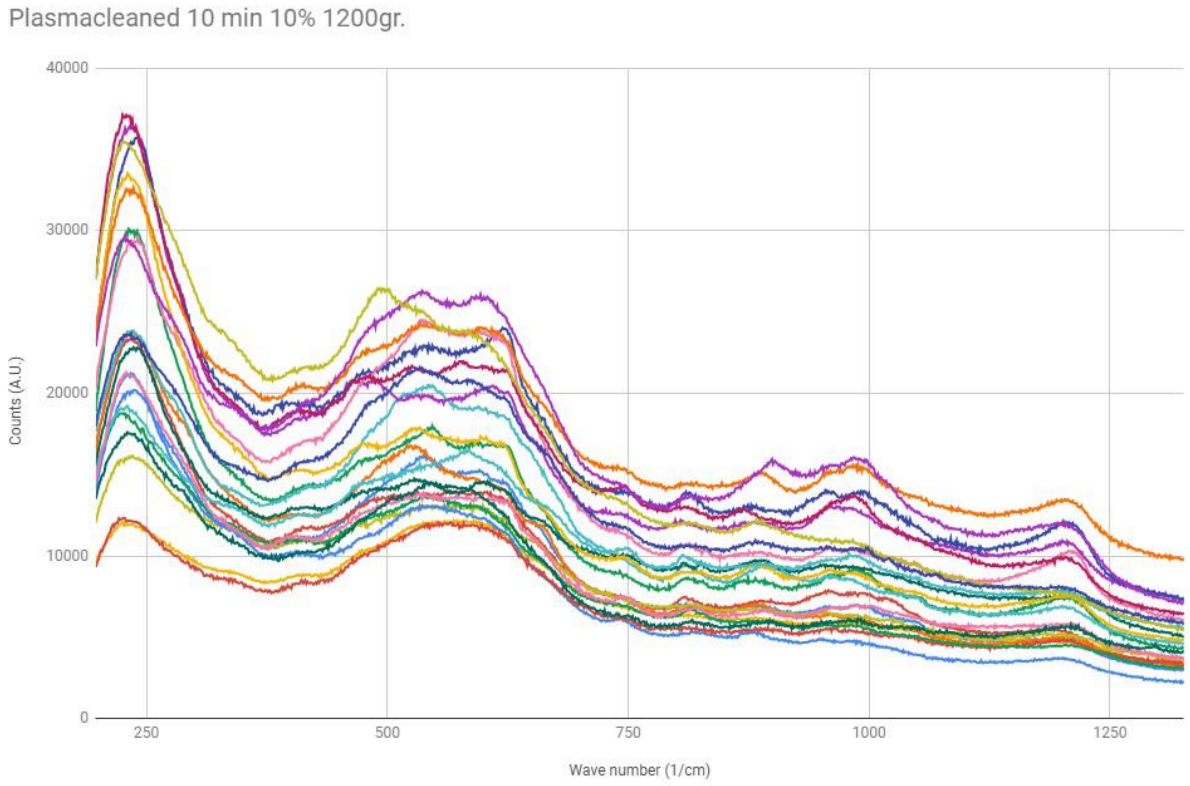

Abb. 26 SERS-Messungen einer Thiophenol-SAM in verschiedenen Testarealen nach der Plasmareinigung.

2.7 SERS-Experimente und chemometrische Datenanalyse

2.7.1 Raman-Setup

Alle Raman-Messungen wurden mit einem Raman-Spektrometer der Fa. *FISCHER GmbH - Raman Spectroscopic Services* durchgeführt (Abb. 27). Das Spektrometer in Backscattering-Anordnung besteht aus einem 785 nm Dauerstrichlaser (*Cobolt 08-NLDM-785nm*, Fa. *Hübner*) für die Probenanregung und einem Peltier-gekühlten CCD-Spektrometer (*AvaSpec-ULS2048x64TEC-EVO*, Fa. *Avantes*) für die Detektion der Streustrahlung. Die aus dem fasergekoppelten (*M43L02*, Fa. Thorlabs, Kerndurchmesser = 105 µm) Multimode-Laser austretende Strahlung wird durch einen Clean-Up-Filter (*VPFHT-25C-7850*, Fa. *OptoSigma*) von Nebenemissionen der Laserdiode befreit und für den stabilen Betrieb bei niedrigen Laserleistungen durch einen OD1-Neutraldichtefilter abgeschwächt. Über einen dichroitischen Beam-Splitter (*LPD02-785RU-25*, Fa. *Semrock*) wird die Anregungsstrahlung in Richtung der Probe reflektiert und mit Hilfe einer Sammellinse (*C240TMD-B*, Fa. *Thorlabs*, f = 8 mm, NA = 0.5) auf die Probe fokussiert. Die durch die Linse kollimierte Streustrahlung passiert den Beam-Splitter, welcher nur für das Rayleigh-Streulicht reflektiv wirkt und dieses somit abtrennt. Schließlich wird das verbleibende Rayleigh-Streulicht durch einen Longpass-Edge-Filter (*LP02-785RU-25*, Fa. *Semrock* vollständig entfernt. Über ein Glasfaserbündel (*BFL105LS02*, Fa. *Thorlabs*) wird die verbliebene Streustrahlung zum CCD-Spektrometer geleitet. Die Ausrichtung der Probe sowie die Justage des Fokus wird manuell über eine xyz-Stage mit einer Skalenteilung von 5 µm (1 µm Einstellempfindlichkeit) vorgenommen (*MVT 40C-XYZ-FGS*, Fa. *OWIS*).

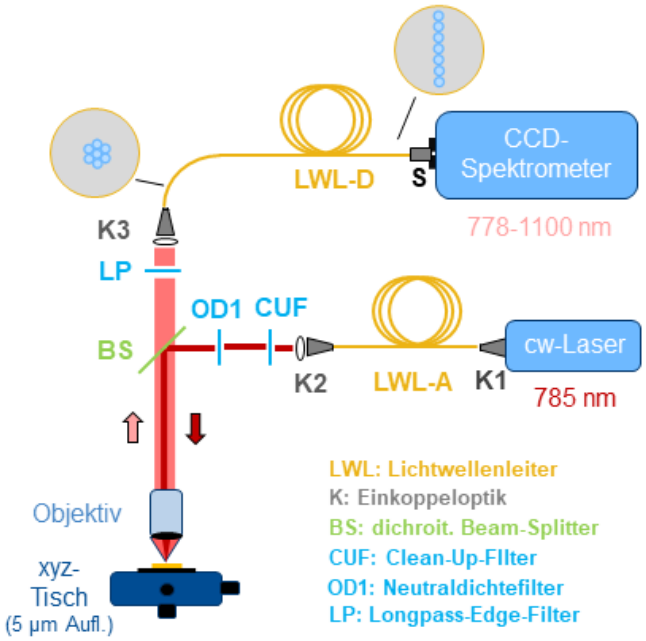

Abb. 27 Schematischer Aufbau des Raman-Setups.

Das *Avaspec* CCD-Spektrometer deckt nach Herstellerangaben einen Frequenz-Shift-Bereich von 100-3650 cm^{-1} mit einer durchschnittlichen Auflösung von ca. 7 cm^{-1} ab. Für SERS-Experimente besitzen die Strahlcharakteristika des Anregungslasers eine große Relevanz (Hot-Spot-Selektion,

Mittelungseffekte). Zudem spielt die Wellenlängen/Intensitäts-Stabilität des Spektrometers eine wichtige Rolle, insbesondere, wenn geringfügige Peak-Shifts detektiert werden sollen. Diese Parameter wurden experimentell bestimmt, siehe Abschn. 2.7.2.1 und 2.7.2.2. Bei der Detektion breitbandiger Strahlung (z.B. bei Lumineszenzuntergrund) tritt zudem in den Spektren eine Bandenstruktur auf, die sich vornehmlich auf Interferenzeffekte zurückführen lässt (Etaloning) und kleine Signale überdecken kann. Zur Abschwächung dieser Banden wurde eine einfache Korrekturfunktion ermittelt, siehe Abschn. 2.7.2.3.

2.7.2 Charakterisierung des Raman-Setups

2.7.2.1 Fokale Laser-Spot-Größe

Die Strahlausbreitung vieler Laser (TEM_{00}-Mode) lässt sich mit Hilfe des Konzepts von Gauß-Strahlen beschreiben. Ein Gauß-Strahl weist als transversales Intensitätsprofil eine Gauß-Kurve auf, deren Breite ausgehend von der Strahltaille in Ausbreitungsrichtung zunimmt. Der Strahlradius w an einer bestimmten Position z im expandierenden Gauß-Strahl kann mit Gleichung (1) beschrieben werden,

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z - z_1}{z_0}\right)^2} \tag{1}$$

wobei w_0 den Strahlradius an der Strahltaille, z_1 die Position der Strahltaille im Gauß-Strahl und z_0 die Rayleigh-Länge bezeichnet. Somit kann durch Ermittlung des Strahlradius/Strahldurchmessers an verschiedenen Positionen entlang eines fokussierten Strahls der Strahlradius (w_0)/Strahldurchmesser ($Ø_{Fokus}$) im Fokus ermittelt werden (Abb. 28 oben).[5]

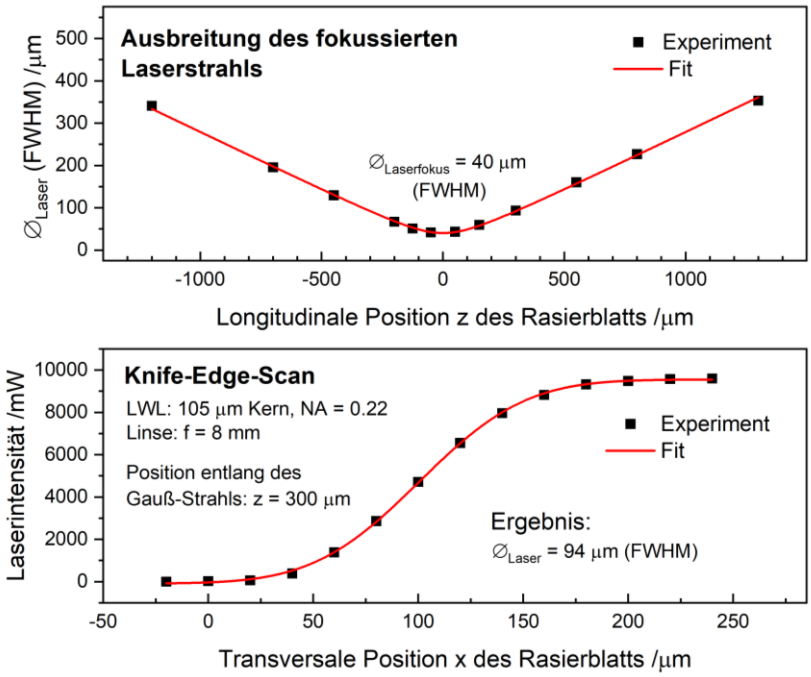

Abb. 28 Oben: Ermittlung des fokalen Strahldurchmessers über die an unterschiedlichen Positionen z im Laserstrahl bestimmten Strahldurchmesser. Unten: Knife Edge-Scan zur Bestimmung des Strahldurchmessers an einer bestimmten Position z im Laserstrahl.

Der Strahlradius kann mit Hilfe eines Knife-Edge-Scans bestimmt werden.[6] Bei einem Knife-Edge-Scan wird eine Rasierklinge transversal durch einen Laserstrahl gefahren und die transmittierte Intensität als Funktion ihrer Position gemessen (Abb. 28 unten). Aus dem Intensitätsprofil kann über einen Fit mit einer Fehlerfunktion der Strahlradius w (Abstand zwischen der Strahlachse x_0 und der Position x an der $I = 1/e^2 \cdot I_0$) bestimmt werden, siehe Gleichung (2),

$$P = P_0 + \frac{P_{max}}{2}\left(1 + \mathrm{erf}\left(\frac{\sqrt{2}(x - x_0)}{w}\right)\right) \qquad (2)$$

wobei P_0 den Leistungsoffset, P_{max} die maximale Leistung, x die Position der Rasierklinge, x_0 die Position der Rasierklinge bei halber Leistung und erf die Standardfehlerfunktion bezeichnet. Für die fokale Laserspot-Größe (Strahldurchmesser) bei Fokussierung mit einer Sammellinse (f = 8 mm, NA = 0,5) wurde ein FWHM-Wert von 40 µm ($FWHM = 2w \cdot \sqrt{(\ln(2)/2)}$) bestimmt. Dies ist ein Vielfaches des Abstandes SERS-aktiver Stellen (Hot-Spots, siehe hierzu Simulationen bzw. AFM von AMOP300-70) und bedeutet, dass mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Setup stets über einen großen Bereich gemittelte SERS-Spektren gemessen werden. Entgegen der in der Literatur weit verbreiteten Methode des Hot-Spot-Pickings mit Hilfe konfokaler Mikroskope, war diese Messmethode im Projektantrag so konzipiert worden, um mit Hilfe eines *Mid-Budget*-Raman-Systems gleichförmige, gemittelte SERS-Spektren zu erhalten (siehe auch Abschn. 2.7.4).

2.7.2.2 Wellenlängen-/Intensitäts-Stabilität des Raman-Spektrometers

Zur Kontrolle der Spektrometerkalibrierung wurden an jedem Messtag vor und nach den Probenmessungen Raman-Spektren der Referenzstandards PET und Silizium gemessen. Um die Spektrometerstabilität zu bestimmten, wurden im Rahmen der Immuno-SERS-Assay-Haupt-experimente insgesamt 40 PET/Silizium-Spektren aufgenommen. Die Messungen erfolgten unter vergleichbaren Bedingungen wie die SERS-Experimente. Für die insgesamt 6 im Fingerprintbereich von

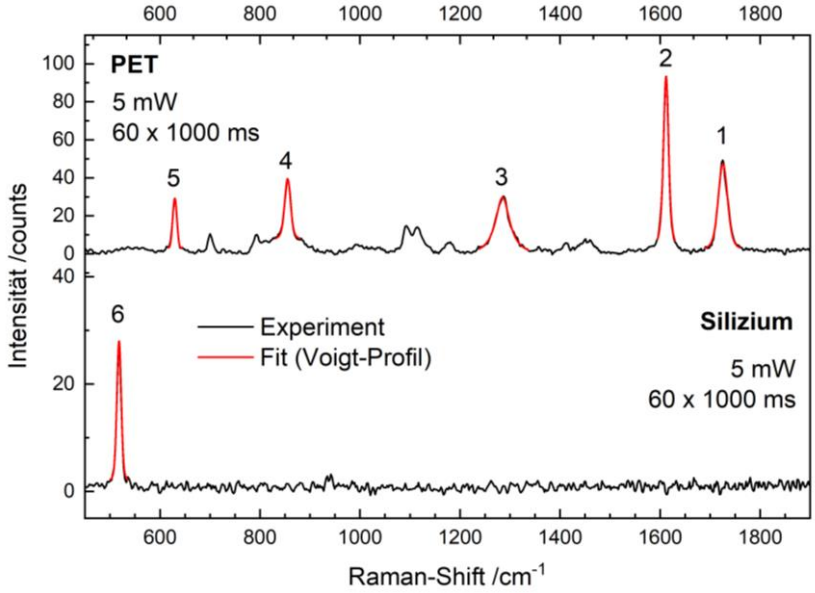

Abb. 29 Raman-Spektren der Standards PET und Silizium für die Untersuchung der Wellenlängengenauigkeit und Intensitätsstabilität des Raman-Spektrometers.

600-1800 cm^{-1} gefitteten Peaks (Voigt-Profil) betrug die mittlere Standardabweichung der Peaks s = 0,13 cm^{-1} und die mittlere relative Peak-Intensität < 3%. Das Ergebnis zeigt, dass das Spektrometer für die Messung sehr kleiner Banden-Shifts, wie es für die *Frequency-Shift-SERS*-Technik erforderlich ist, stabil genug ist. Das Ergebnis stellt ein oberes Limit für die Spektrometerstabilität dar, da die unter vergleichbaren Messbedingungen aufgenommenen SERS-Spektren ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis aufwiesen.

2.7.2.3 Etaloning-Effekt des Raman-Spektrometers

Beim Etaloning handelt es sich um einen Interferenzeffekt, der durch Mehrfach-Reflexionen der Strahlung in der absorbierenden Schicht von rückseitig belichteten CCD-Detektoren verursacht wird.[7,8] Der Etaloning-Effekt ist störend, wenn in einem Raman-Spektrum das Signal-Untergrund-Verhältnis gering ist, da hier die Etaloning-Struktur Banden der Probe im Spektrum stark überlagert. Zudem erschwert er die chemometrische Datenanalyse, wenn in einem Satz Spektren das Untergrundsignal nicht einheitlich ist (variierende Fluoreszenzintensität, Photo-Bleaching-Effekt). Bei den in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen SERS-Spektren mit AMO-P300-70-Substraten lag das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis in der Größenordnung von ~ 0,6, sodass eine Korrektur als erforderlich erachtet wurde (Abb. 32).

Mit Hilfe eines schwarzen Strahlers, dessen emittiertes, breitbandiges Spektrum keine Absorptionsbanden im Detektionsbereich des CCD-Spektrometers aufweist, kann eine Korrekturfunktion näherungsweise ermittelt werden. Für diesen Zweck wurde eine Halogen-Niedervoltlampe ohne Reflektor (Osram 64225, 10 W, 6 V, Farbtemperatur 3200 K) als Low-Cost-Kalibrierlampe eingesetzt. Die Lampe wurde analog zu einer streuenden Probe im Strahlengang des Raman-Spektrometers platziert. Das Lampen-Spektrum $S(\tilde{\nu})$ mit der Etaloning-Struktur wurde mit einem Polynom 9ten Grades gefittet $P(\tilde{\nu})$, siehe Abb. 30. Die Korrekturfaktoren $f(\tilde{\nu})$ werden nach Gleichung (3) berechnet:

$$f(\tilde{\nu}) = \frac{\mathrm{P}(\tilde{\nu})}{S(\tilde{\nu})} \tag{3}$$

Der Effekt der Korrektur wird in Abb. 33 ersichtlich. Kleine Banden können erst nach Etaloning-Korrektur herausgearbeitet werden.

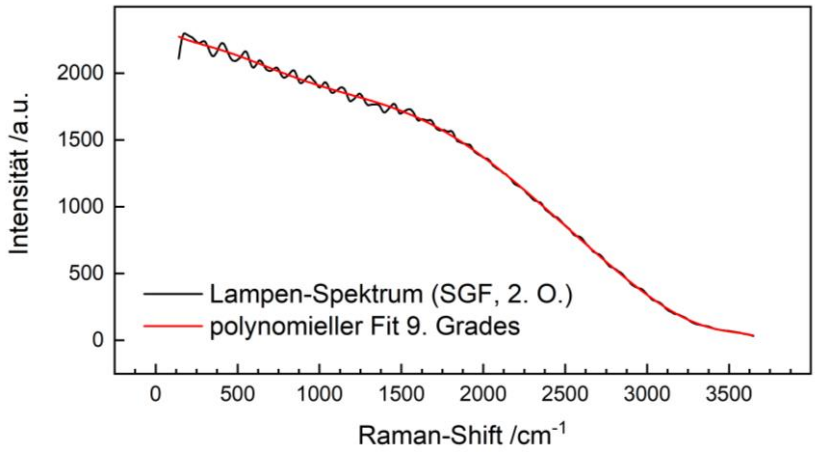

Abb. 30 Lampenspektrum mit Etaloning-Effekt (schwarze Kurve). Anpassung mit einem Polynom 9ten Grades (rote Kurve).

2.7.3 Durchführung von SERS-Messungen

Wenn nicht anders beschrieben wurden die Goldsubstrate auf einem Probenträger aus Edelstahl gemessen, wobei die Goldseite der von oben bestrahlten Substrate nach oben zeigte. Dabei wurde eine Laserleistung von 5 mW, eine Belichtungszeit von 1000 ms und einer Aufnahmedauer von 60 Sekunden angewandt, um ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. Um die On-Chip-Variation zu berücksichtigen, wurde pro Chip an 6 verschiedenen Positionen gemessen. In der Regel wurde jeder Messpunkt zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses vor der eigentlichen Messung für 60 Sekunden bei 5 mW photo-gebleicht. Die Justage des Laserfokus erfolgte manuell auf die Signalintensität von Banden bzw. des Untergrunds in der Mitte des Fingerprintbereichs (~1100 cm^{-1}).

2.7.4 SERS-Substrate

Die in Abschn. 2.9 und 2.10 beschriebenen Hauptuntersuchungen wurden mit den von AMO im Verlauf des Projektes entwickelten SERS-Chips P300-70 durchgeführt. Für Vorexperimente sowie als

Vergleichsbasis wurde eine geringe Anzahl von kommerziellen Substraten untersucht. Tab. 2 zeigt eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten SERS-Substrate.

Tab. 2 Übersicht der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten SERS-Substrate

Name	Hersteller	Träger	Beschichtung	Struktur	Experiment
H12	AMO GmbH	SiO_2	Gold	Nanokegel	Vorexperimente, direkte Protein-Detektion
K1	AMO GmbH	SiO_2	Gold	Nanokegel	Performance-Test
K2	AMO GmbH	SiO_2	Gold	Nanokegel	Performance-Test
P300-70	**AMO GmbH**	**SiO_2 (TiO_2-Adhäsions-schicht)**	**Gold**	**Nanokegel**	**Hauptexperimente, direkte/indirekte Proteindetektion**
SERStrate-Gold	Silmeco	Silizium	Gold	Nanosäulen	Vorexperimente, direkte/indirekte Proteindetektion
SERStrate-Silver	Silmeco	Silizium	Silber	Nanosäulen	Performance-Test
MatoS	Integrated Optics	Silicat-Glas	Gold	Stochastische Nanostruktur	Vorexperimente, direkte Protein-Detektion

Zur näheren Charakterisierung der Oberflächenplasmonresonanz des Substrats AMO-P300-70 wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen (Abb. 31). Die Spektren der semitransparenten Substrate (Träger ist Glas) wurden mit einem NanoColor UV/Vis II Spektrometer in Transmission gemessen. Für diesen Zweck wurde ein Probenhalter für SERS-Substrate entwickelt (3D-Druck aus geschwärztem PLA), welcher in den Standard-Küvettenhalter (für 10x10 mm Küvetten) des Spektrometers platziert werden kann. Die UV/Vis-Spektren zeigen eine breite Absorption zwischen 600 und 950 nm, welche nahe der Anregungswellenlänge des Lasers ein Maximum bei ca. 750 nm aufweist.
Zur Untersuchung der Funktionalität der SERS-Substrate wurden diese mit einer 4-MBA-Monolage beschichtet (Immersion für 1 h in einer 1 mM Lösung von 4-MBA in EtOH), siehe Abb. 32. Silmeco-Goldsubstrate weisen hier das größte SERS-Signal auf. Zu erkennen ist, dass das Signal-/Untergrund-Verhältnis mit der Größe des SERS-Signals korreliert. Eine Ursache hierfür könnte die Anzahl der effektiven Hot-Spots sein (*Long-Tail*-Verteilung[9–11]). Je mehr Hot-Spots sich im Laser-Fokus befinden,

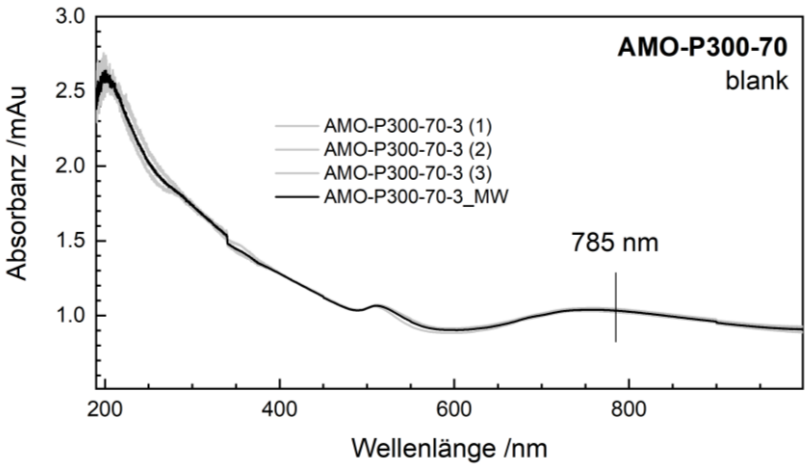

Abb. 31 UV/Vis-Spektrum des SERS-Substrats AMO-P300-70, welches in Transmission aufgenommen wurde.

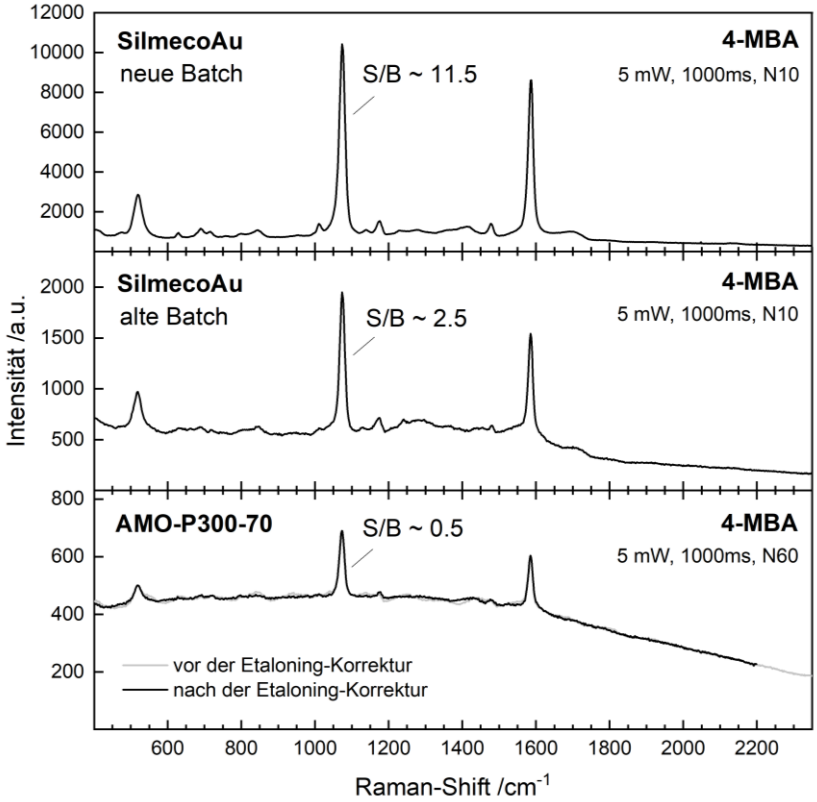

Abb. 32 Performance der Substrate SERStrate-Gold *(Fa. Silmeco) und P300-70 (AMO GmbH) für oberflächen-gebundenes 4-MBA. Das Signal/Untergrund-Verhältnis (S/B) nimmt mit der Performance der Substrate zu.*

umso größer ist das SERS-Signal des Analyten, wodurch der allgemein vorhandene Lumineszenz-Untergrund weniger ins Gewicht fällt. Weitere Untersuchungen betrafen die „Zerstörschwelle“ bzw. die Schwelle bis zur Induktion des Blinking-Effekts und die Veränderung der 4-MBA-Spektren in Abhängigkeit der angewandten Laserleistung sowie der Effekt der Laser-Spot-Größe (Verwendung eines LWL mit kleinerem Kerndurchmesser). Manche Substrat-Chargen zeigten bei den blanken Substraten bereits Peaks, die auf Verunreinigungen hindeuten. Ergebnisse der weiteren Untersuchung sowie der Plasmareinigung der Substrate werden an anderer Stelle behandelt (Abschn. 2.6).

2.7.5 Datenanalyse

Alle SERS-Spektren wurden einer gemeinsamen Prozedur für die Datenvorverarbeitung unterzogen. Abb. 33 zeigt schematisch den Workflow der Datenvorverarbeitung. Die Rohspektren wurden zunächst von kosmischen Spikes/Hot Pixels befreit. Anschließend wurde die in Abschn. 2.7.2.3 beschriebene Etaloning-Korrektur durchgeführt und die resultierenden Spektren über einen Savitzy-Golay-Filter 2. Ordnung geglättet sowie interpoliert. Für die Basislinien-Korrektur wurde der Polyfit-Algorithmus nach

Lieber und Mahadevan-Jansen[12] angewandt, wobei sich hier ein Fit mit einem Polynom 7ter Ordnung über einen Raman-Shift-Bereich von ca. 200-1900 (2300) cm^{-1} als sinnvoll erwies.

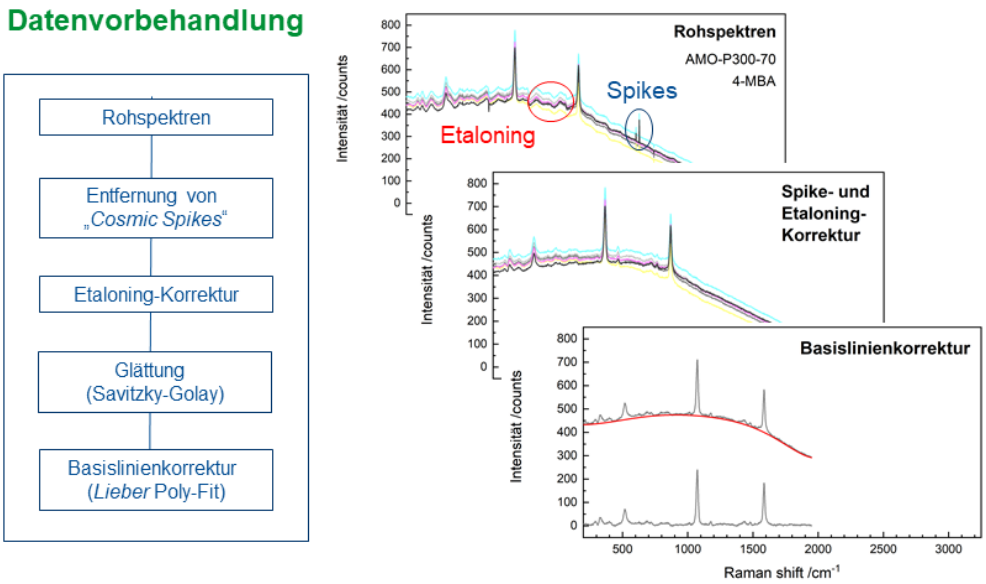

Abb. 33 Schematische Darstellung des Workflows für die Datenvorverarbeitung von SERS-Spektren.

Für die Bestimmung von Banden-Parametern, welche für die Evaluation bei der *Frequency-Shift-SERS*-Technik erforderlich sind, wurden die zwei intensivsten Peaks herangezogen. Die Banden sind nicht symmetrisch, was auf Beiträge mehrerer Schwingungen hinweist und einen präzisen Banden-Fit erschwert. Multipeak-Fitting („Dekonvolution") der Banden wurde im Hinblick auf die Anforderungen an die Präzision bei der *Frequency-Shift-SERS*-Technik als ungeeignet erachtet, zumal die Positionen der einzelnen Subbanden nicht konstant bleiben. Informationen zu Peak-Position und Peak-Breite wurden deshalb separat ermittelt. Die Peak-Position wurde mit Hilfe eines Voigt-Fits überwiegend an die rechte Flanke der Banden ermittelt. Die Peak-Breite wurde näherungsweise über die Raman-Shifts bei halber Intensität bestimmt (Abb. 34).

Für die explorative Datenanalyse wurden die vorbehandelten Spektren normiert (i. d. R. SNV, aber auch MSC, l1-Norm, max. Peak), einer Mittelwertzentrierung unterzogen und anschließend mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) untersucht. Für eine überwachte multivariate Datenanalyse erwies sich der Datensatz als zu klein.

Die chemometrischen Tools wurden in der Programmiersprache Python 3 unter Zuhilfenahme von Python-Bibliotheken für numerische Programmierung (Numpy), maschinelles Lernen (Scikit Learn), Datenanalyse (Pandas) und das Plotten von Graphen (Matplotlib) von Grund auf entwickelt. Für die Basislinienkorrektur wurde der Polyfit-Algorithmus von Lieber und Mahadevan-Jansen[12] in Python implementiert.

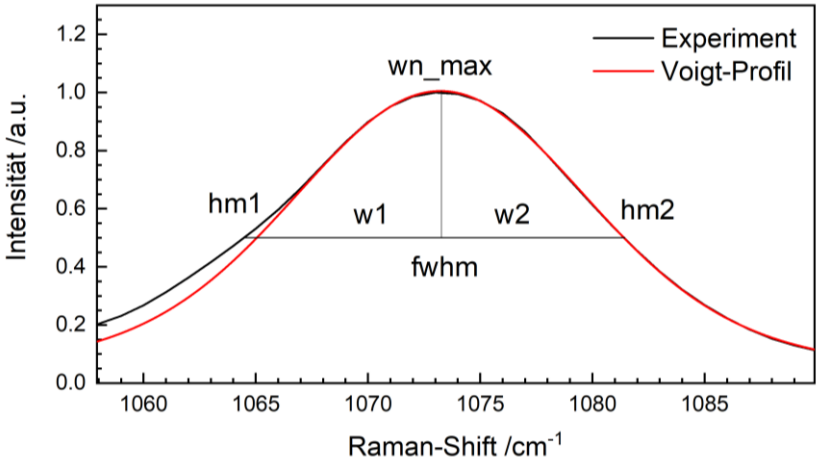

Abb. 34 Schema für die Ermittlung von Bandenparametern.

2.8 Herstellung und Referenzanalytik von Antikörper-Aggregaten

Ziel des Projektteils war die Herstellung, Isolierung und Quantifizierung von löslichen Antikörper-aggregaten für den Einsatz in der spektroskopischen Methodenentwicklung mit SERS (bzw. Raman-Spektroskopie). Antikörperlösungen in ihren Formulierungen sind relativ stabil und zeigen unter vielen Stressbedingungen nur eine geringe Aggregation.[13] Hingegen aggregieren Antikörper nach Entfernung der Formulierungsstoffe (z. B. mit Zentrifugenfiltern) nach eigenen Erfahrungen bereitwillig und bilden bevorzugt das Dimer in hoher Konzentration. Hierbei wirken möglicherweise auch Scherkräfte bei der Zentrifugation als Stressor auf die Proteine, die zur Entfaltung und anschließend zur Aggregation führen. Diese Dimer-Bildung ist jedoch reversibel. Sobald die Antikörperkonzentration durch Verdünnung verringert wird, nimmt die Aggregatkonzentration auf einer relativ kurzen Zeitskala deutlich ab, was eine Methodenentwicklung verkompliziert.
Vor diesem Hintergrund wurde nach einer effizienten Methode gesucht, die zu einer möglichst hohen Konzentration kovalent gebundener, höherer Aggregate führt. Mehrere Autoren konnten in kürzlich publizierten Arbeiten zeigen, dass die Einwirkung von Licht bzw. UV-Strahlung einen der effizientesten Reaktionspfade bei der Bildung von Antikörper-Aggregaten darstellt.[13] Bei Bestrahlung mit UVB-Strahlung werden insbesondere aromatische Aminosäuren wie Tryptophan oder Tyrosin sowie Disulfid-Brücken angeregt. Disulfid-Brücken werden dabei photolytisch gepalten.[14,15] Die entstehenden Thiylradikale können in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion mit Disulfidbrücken anderer Moleküle reagieren, sodass dies zu einer Disulfid-vermittelten Aggregation führt.[16] Nach Absorption von 280 nm Strahlung tritt Tryptophan entweder als angeregte (Trp*) oder photoionisierte Spezies (Trp^{*+}) auf und kann Radikalreaktionen oder Elektronentransferreaktionen eingehen. Durch Elektronentransfer kann Tryptophan Disulfid-Brücken reduzieren und damit die Disulfid-vermittelte Aggregation unterstützen. Dies ist speziell unter anaeroben Bedingungen der Fall, da sich in Anwesenheit von Sauerstoff Photooxidationsprodukte wie Kynurenin oder 5-Hydroxy-Tryptophan bilden können.[17] Aufgrund der Effizienz der UV-Stressmethode sowie den Hinweisen, dass sich bevorzugt kovalent gebundene und damit stabile Aggregate bilden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine UV-Zelle für Stressexperimente entwickelt. Für die Fraktionierung des Monomer-/Aggregat-Gemischs wurde eine Methode mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie entwickelt, welche auch als Referenzmethode für die Quantifizierung der Aggregatkonzentration eingesetzt wurde.

2.8.1 UV-Zelle für Stressexperimente

Für die Durchführung der Aggregationsexperimente mit UV-Strahlung wurde eine UV-Zelle entwickelt (Abb. 35). Küvettenhalter (Grundkörper), Deckel sowie LED-Halter wurden additiv aus geschwärztem PLA gefertigt. Der Küvettenhalter ermöglicht die Aufnahme von Standard-10x10mm-Quarzküvetten (*HL100-10-40*, Fa. *Hellma*). Als Strahlungsquelle wurde eine UVC-LED (*XST-3535-UV-40mW*, Fa. *Luminous*) mit einer Emission im Bereich von 275-280 nm eingesetzt. Die LED wurde in den 3D-gedruckten LED-Halter eingeklebt. Für die Ansteuerung der LED wurde ein LED-Controller entwickelt. Dieser bestand für die Stromversorgung aus einem 350 mA Konstantstrom-Step-Down-LED-Treiber (*LDD-350L*, Fa. *Mean Well*), dessen PWM-Dimmkontrolle (PWM: Pulsweitenmodulation) über einen Mikrocontroller (*Arduino Nano*) mit einer PWM-Frequenz von 490,2 Hz angesteuert wurde. Über einen Drehregler kann der Arbeitszyklus der PWM und damit die Strahlungsleistung der LED gesteuert werden. Um eine Überhitzung der luftgekühlten LED zu vermeiden, wurde sie bei niedrigen Leistungen

Abb. 35 Photos der demontierten UV-Zelle (oben) und des LED-Controllers (unten).

(1-2 mW nominelle optische Strahlungsleistung) betrieben. Diese Leistung war für die Herstellung hoher Aggregatkonzentrationen auf der Zeitskala von mehreren Stunden ausreichend. Der Versuchsaufbau befand sich aus Sicherheitsgründen während der Messungen in einem Laserschrank.

2.8.2 Analytik von Proteinlösungen mit SEC und RPC

Für die Fraktionierung sowie Analytik der gestressten Antikörperlösungen wurde Größenausschluss-chromatographie (SEC: *Size Exclusion Chromatography*) eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Chromatographie-Verfahren, bei dem Moleküle aufgrund ihrer Größe bzw. genauer, ihres hydrodynamischen Volumens, getrennt werden. Als Chromatographie-Säulen werden poröse Materialien eingesetzt. Der Trennungseffekt beruht auf unterschiedlichen verfügbaren Diffusionsvolumina für unterschiedlich große Moleküle. Antikörper-Monomere weisen einen kleineren hydrodynamischen Radius auf als Antikörperdimere bzw. höhere Aggregate. Diese dringen deshalb tiefer in das poröse Säulenmaterial ein und werden später eluiert.[18] Da bei der Größenausschlusschromatographie näherungsweise keine Wechselwirkungen zwischen Analyt und Säule auftreten sowie wässrige Puffer als Laufmittel eingesetzt werden, können Proteine ohne eine Veränderung ihrer nativen Sekundär- bzw. Tertiärstruktur aufgetrennt und analysiert werden. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl die Konzentration als auch der Aggregat-Anteil von Proteinlösungen bestimmt werden.
Die Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer RP-LC/UV-Methode (RPC: *Reversed-Phase Chromatography*) überprüft. Der Trenneffekt der Reverse-Phase-Chromatographie

beruht auf einer Wechselwirkung zwischen dem hydrophoben Säulenmaterial und den Analyten. Hydrophobe Analyten retardieren stärker, d. h. werden später eluiert als polare. Bei der Reverse-Phase-Chromatographie werden polare Laufmittel eingesetzt, die in der Regel als Gradient mit steigendem Organik-Anteil (zunehmende Hydrophobizität des Laufmittels) gefahren werden. Bei der RPC-LC/UV-Analytik von Proteinen wird davon ausgegangen, dass das Protein unter den angewandten Bedingungen (Temperatur, Lösungsmittel) denaturiert.
Tab. 3 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Messsysteme und die für die quantitative Analyse eingesetzten Methoden.

Tab. 3 Messsystem und Methoden für die Größenausschlusschromatographie und Reversed-Phase-Chromatographie, welche in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

Größenausschlusschromatographie	
LC-System	LC-10 (*Shimadzu*)
SEC-Säule	YMC-MAB, 300 x 4,6 mm (25 nm, 3 µm) (*YMC*)
Trennmethode	isokratisch, RT, Laufmittel: 1x PBS-Puffer (+ 0,05% NaN_3), Flussrate: 0,3 mL min^{-1}
Injektionsvolumen	1-2 µL bei konzentrierten Lösungen (25 mg mL^{-1}), 40 µL bei verdünnten Fraktionen (~0,1-2 mg mL^{-1})
Detektion	190-800 nm (DAD), SEC-Trace für die Quantifizierung: 280 (300) nm
Reversed-Phase-Chromatographie	
LC-System	1260 Infinity II (*Agilent*)
Reversed-Phase-Chromatographie -Säule	Zorbax 300 SB-C8 Narrow-Bore 2,1 x 150 mm, 5 µm (*Agilent*)
Trennmethode	Gradientenlauf, 80 °C, Laufmittel: LMA = Wasser + 0,1% Ameisensäure, LMB = IPA:$H_2$0:ACN = 70:10:20, Flussrate: 0,5 mL min^{-1}
Gradient	0 min: 95% LMA + 5% LMB 2 min: 95% LMA + 5% LMB 3 min: 50% LMA+ 50% LMB 6 min: 50% LMA+ 50% LMB 6,5 min: 90% LMA + 10% LMB 10 min: Ende
Injektionsvolumen	10 µL
Detektion	190-900 nm (DAD), LC-Trace für die Quantifizierung: 280 nm

2.8.3 Aggregationsexperimente

Abb. 36 zeigt SEC-Chromatogramme von Avastin® (Bevacizumab-Konzentration: 25 mg mL^{-1}), welche nach unterschiedlichen UV-Expositionszeiten unter aeroben Bedingungen aufgenommen wurden. In dem Referenz-Chromatogramm, welches vor der Bestrahlung aufgenommen wurde, dominiert der Monomer-Peak (rote Kurve). Ein kleiner Peak bei kleineren Elutionsvolumina weist auf das Dimer des Antikörpers hin, welches mit dem Monomer in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht steht. Nach Bestrahlung der Lösung mit UV-Strahlung bei einer Leistung von 1-2 mW (nominelle optische Strahlungsleistung, siehe Abschn. 2.8.1) nimmt die Konzentration an Dimer sowie höherer Aggregate auf der Zeitskala von Stunden deutlich zu. Der Aggregat-Anteil erreicht nach 8 Stunden Bestrahlung einen Wert von ca. 25%. Bei dem UV-Stressprotokoll fällt nur eine geringe Menge von unlöslichen

Aggregaten (Fibrillen) aus, i. d. R. als dünner Film an der bestrahlten Küvettenwand. Es wurde kein wesentlicher Unterschied für das Aggregationsverhalten der beiden Pharmazeutika Avastin® und MVASI® beobachtet.
Eine visuelle Inspektion der gestressten Formulierungen ergab, dass diese im Wesentlichen farblos blieben. Nur das ausgefallene Protein zeigte einen leichten Gelbstich. Laut einer neuen Studie können Farbänderungen nach Nah-UV/Vis-Stress chemischen Modifikationen des Antikörpers zugeordnet werden. Dabei handelt es sich vor allem um Oxidationsprodukte des Tryptophans, N-Formylkynurenin (NFK) und Hydroxytryptophan (OH-Trp). Deren Absorptionswellenlängen weisen eine Rotverschiebung in der Reihenfolge OH-Trp < NFK < Kyn auf.[19] Die leichte Verfärbung der Lösung könnte ein Hinweis darauf sein, dass oxidative Reaktionsprodukte eine Nebenrolle spielen.

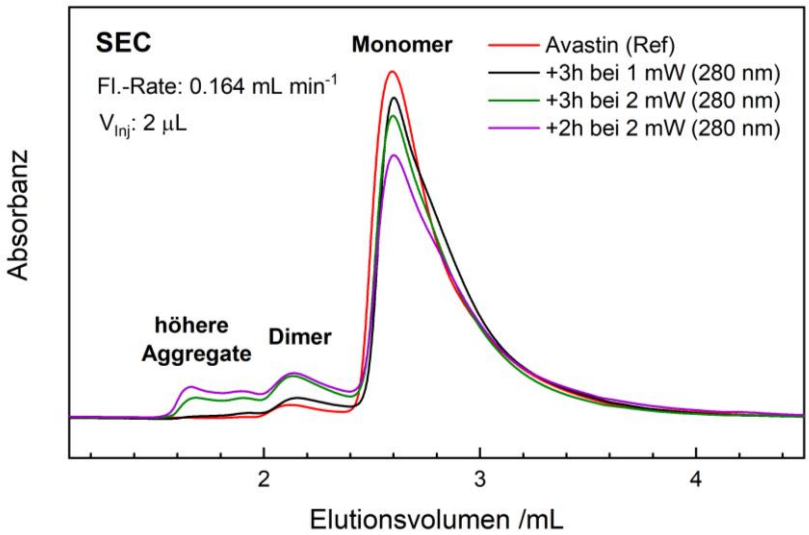

Abb. 36 SEC-Chromatogramme von Avastin® nach unterschiedlicher Stressexposition.

2.8.4 Fraktionierung

Für die spektroskopische Untersuchung von Antikörper-Monomeren bzw. -Aggregaten wurden diese mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie isoliert. Dabei wurde die SEC-Säule mit großen Injektionsvolumina (40 µL) der konzentrierten UV-gestressten Antikörperlösung (25 mg mL^{-1}) beladen. Abb. 37 zeigt Chromatogramme der Fraktionierung sowie der Monomer- und Aggregat-Fraktion. Das Chromatogramm der gestressten Antikörperlösung zeigt trotzt hoher Beladung der Säule eine Basislinientrennung für den Monomer- und Dimer-Peak. Die Chromatogramme der gewählten Fraktionen bestätigen die Eignung der Methode für die Isolierung von Antikörperaggregaten. Die Aggregatfraktion weist nur einen minimalen Monomer-Anteil auf. Vermutlich steht eine geringe Menge an Dimer mit dem Monomer im dynamischen Gleichgewicht. Die Monomer-Fraktion weist hingegen sogar einen geringeren Dimer-Anteil auf als die Avastin®-Referenzlösung, was vermutlich auf ihre starke Verdünnung bei dem chromatographischen Verfahren zurückzuführen ist.
Proteinlösungen sind instabil, d. h. die Proteine können mit der Zeit ihre Struktur ändern, aggregieren oder aus der Lösung ausfallen, was die in Formulierungen zugegebenen Hilfsstoffe verhindern sollen (Abschn. 2.1). Für die spektroskopische Methodenentwicklung musste deshalb geklärt werden, auf welcher Zeitskala die erhaltenen Aggregat- bzw. Monomer-Fraktionen stabil sind. Abb. 38 zeigt die

zeitliche Entwicklung einer UV-gestressten MVASI®-Lösung (links) und der (nach Fraktionierung der frisch UV-gestressten MVASI®-Lösung gewonnenen) Aggregat-Fraktion (rechts). Die UV-gestresste Formulierung (Proteinkonzentration ~ 25 mg mL^{-1}) ist auf der Zeitskala von Tagen stabil und der

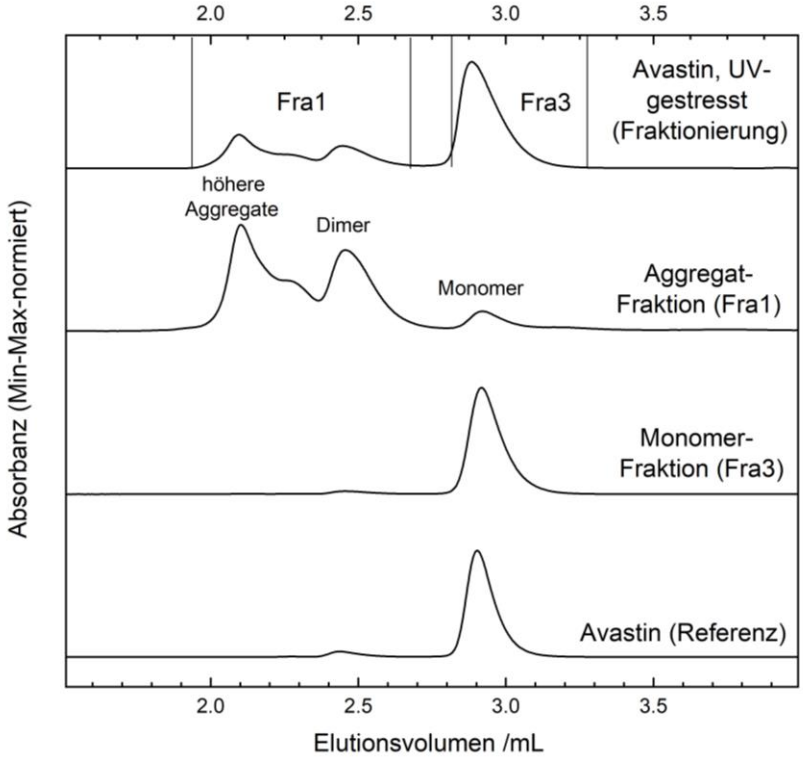

Abb. 37 Chromatogramme der Fraktionierung der gestressten Antikörperlösung, der Aggregat-Fraktion, der Monomer-Fraktion sowie von ungestresstem Avastin®.

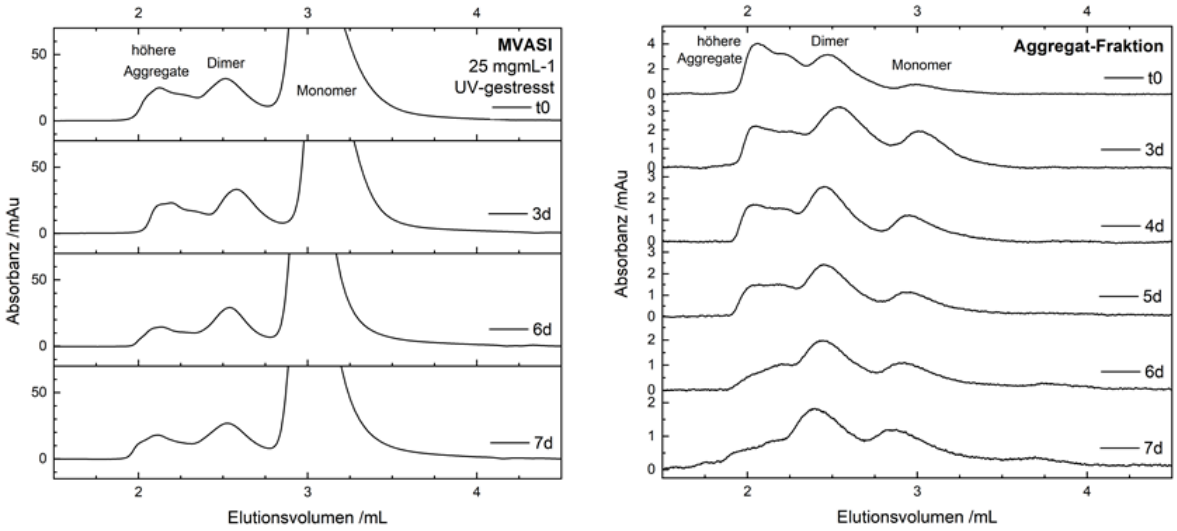

Abb. 38 Zeitliche Entwicklung einer gestressten MVASI®-Lösung (links) und der nach Fraktionierung der frisch gestressten MVASI®-Lösung gewonnenen Aggregat-Fraktion (rechts).

Aggregat-Anteil nimmt nur geringfügig ab. Hier scheinen die in der Formulierung enthaltenen Hilfsstoffe die löslichen Aggregate zu stabilisieren. In der Aggregat-Fraktion (Proteinkonzentration ~ 1 mg mL^{-1}) nimmt hingegen der Anteil an hochmolekularen Spezies auf der Zeitskala von mehreren

Tagen deutlich ab. Möglicherweise bildet sich mit der Zeit unlösliches Aggregat. Die im Immuno-Assay eingesetzten verdünnten Fraktionen (Konzentrationsbereich: 4-107 µg mL^{-1}) wurden simultan zur Durchführung des Immuno-Assays mittels LC-SEC analysiert und bestätigten die Anwesenheit von Aggregaten. Somit ist die oben beschriebene Methode geeignet, um Kalibrier-Lösungen für die Durchführung eines Immuno-Assays zur Detektion von Antikörper-Aggregaten herzustellen (Abschn. 2.10.5).

2.8.5 Quantifizierung der Aggregat-Fraktion mit LC-SEC/UV und LC/UV

Für den SERS-Immuno-Assay wurden Verdünnungsreihen der Monomer- bzw. Aggregat-Fraktion von Bvcz im Konzentrationsbereich von 4 bis 107 µg mL^{-1} eingesetzt (≙ 30-720 nM in Bezug auf monomeres Bvcz). Die Quantifizierung der Monomer- und Aggregat-Fraktion erfolgte mittels LC-SEC/UV (Detektion bei 280 nm) und einer Kalibrierreihe der nativen MVASI®-Lösung im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 nM (≙ 15-75 µg mL^{-1}, Abb. 39). Bei der Kalibrierung wurde die Gesamtmenge an Protein in den Lösungen berücksichtigt, weshalb über den gesamten Elutionsbereich der Monomere und Aggregate integriert wurde.

Die Quantifizierung der Aggregat-Fraktion mit der Kalibrierreihe für monomere Antikörper impliziert einen identischen spezifischen Extinktionskoeffizienten ε [$g^{-1}cm^2$] für Monomer und Aggregat (bei 280 nm). Allgemein setzt sich der Extinktionskoeffizient eines Proteins parametrisch aus den Extinktionskoeffizienten der absorbierenden Aminosäuren (hier aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken) zusammen.[20] Hier wurde angenommen, dass sich unter UV-Bestrahlung der monomeren Antikörper nur ein geringer Bruchteil chemisch umwandelt und sich der spezifische Extinktionskoeffizient, in den sich ausbildenden Aggregaten, nicht wesentlich verändert (siehe Abschn. 2.8.3 und Ref. [15–17]). In den Verdünnungsreihen von Monomer und Aggregat ist die Massenkonzentration gleich gewählt. Die Molarität der Aggregat-Fraktion ist jedoch wesentlich niedriger als die der entsprechenden Monomer-Fraktion.

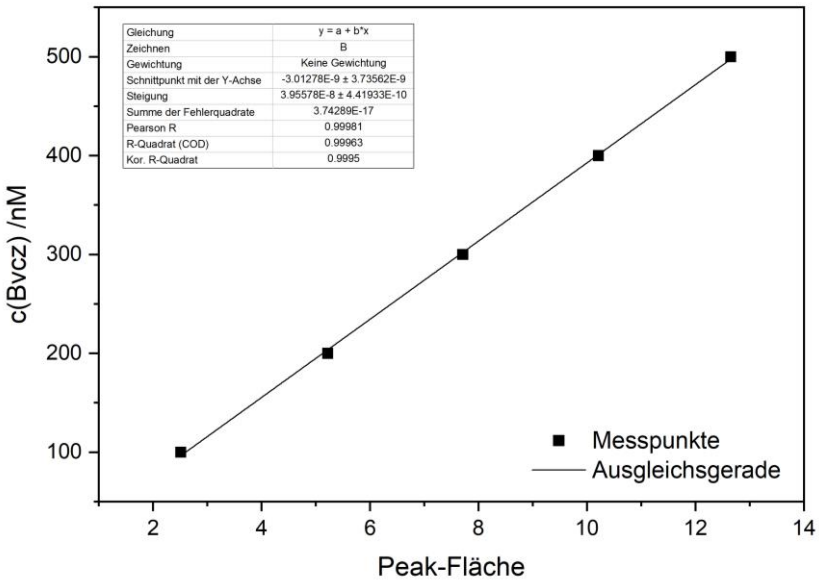

Abb. 39 Kalibrierreihe einer verdünnten MVASI®-Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Monomer und Aggregat).

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe einer LC/UV-Methode überprüft. Die Messung von Kalibrierreihen sowie Proben der Monomer- und Aggregat-Fraktion wurden mit einer Reversed-Phase-Chromatographie-Säule (Zorbax 300 SB-C8 Narrow-Bore 2,1 x 150 mm, 5 µm) in einem Gradientenlauf durchgeführt (LMA: Wasser + 0,1% Ameisensäure, LMB: IPA:$H_2$0:ACN = 70:10:20, Flussrate: 0,5 mL min^{-1}, Gradient (LMB): Start: 5%, 3,0 Min.: 50%, 6,5 -10,0 Min.: 10%, Injektionsvolumen: 10 µL). Der Mittelwert der anhand von je zwei Messungen ermittelten Konzentrationen ergab für die Aggregat-Fraktion einen um 29% größeren Wert als für die SEC-Methode und für die Monomer-Fraktion einen um 13% größeren Wert. Für die Durchführung des SERS-Immuno-Assays, bei dem der Konzentrationseffekt über etwa 2 Größenordnungen untersucht wurde, ist die Genauigkeit ausreichend (Abschn. 2.10.4 und 2.10.5).
Der Aggregat-Anteil der Fraktionen wurde mittels LC-SEC als Fläche des Aggregat-Peaks geteilt durch die Gesamtfläche von Monomer- und Aggregat-Peak bestimmt. Er betrug 60% für die Aggregat-Fraktion und weniger als 3% für die Monomer-Fraktion.

2.8.6 Bindungsverhalten der Monomere/Aggregate von Bevacizumab an Protein CysAG

Neben der Referenzanalytik der Antikörper bzw. Antikörperaggregate wurde im Rahmen der Herstellung des Immuno-SERS-Assays deren Wechselwirkung mit dem Antikörper-bindenden Protein CysAG mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie untersucht. Dafür wurden Mischungs-experimente durchgeführt, in denen eine 0,2 mg mL^{-1} Lösung von CysAG in 1x PBS-Puffer jeweils mit

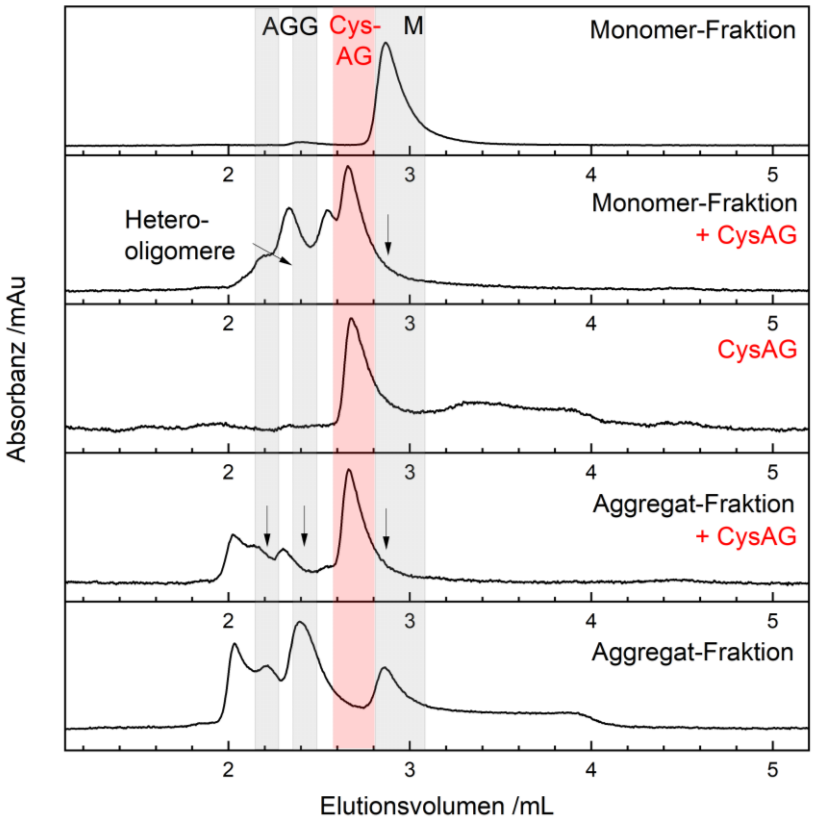

Abb. 40 SEC-Chromatogramme der Mischungsexperimente der CysAG-Lösung mit der Monomer (M)- bzw. Aggregat-Fraktion (AGG).

der verdünnten Monomer- bzw. Aggregat-Fraktion (0,055 mg mL^{-1} in PBS) vermischt und unmittelbar danach die Analytik mittels LC-SEC durchgeführt wurde. In Abb. 35 sind die SEC-Chromatogramme der CysAG-Lösung (Spur 3), der Monomer- und Aggregat-Fraktionen (Spur 1 und Spur 5) sowie der Mischungen (Spur 2 und Spur 4) gezeigt. An den abnehmenden Peaks für Antikörper-Monomer und Antikörper–Dimer (siehe nach unten gerichtete Pfeile) sowie an den neu hinzukommenden Peaks ist zu erkennen, dass CysAG sowohl mit dem Antikörper-Monomer als auch mit dem Dimer/den Aggregaten wechselwirkt und Heterodimere bzw. Heterooligomere bildet. Dies bestätigt den Einsatz von CysAG als antikörperbindenden Ligand im Immuno-SERS-Assay. Ungeklärt bleibt, warum CysAG (47,8 kDa) früher eluiert als der Antikörper (149 kDa), was aufgrund seiner geringeren Molekülmasse nicht zu erwarten ist. Eventuell spielt hier die Faltung des Proteins eine Rolle, welche sich direkt auf seinen hydrodynamischen Radius auswirkt. Alternativ könnte CysAG selbst bereits als Dimer/Oligomer vorliegen, oder es weist im Gegensatz zu dem monoklonalen Antikörper geringere Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auf.

2.9 Direkte Proteindetektion

Ein Ziel des Forschungsprojekts war die Aufnahme von SERS-Spektren von Proteinen, aus denen Rückschlüsse auf die Proteinstruktur gezogen werden sollten. Dafür standen nanostrukturierte Substrate (AMO-K12, SilmecoAu) und ein 785 nm Raman-Spektrometer mit breitem Laserspot zur Verfügung (Abschn. 2.7.2.1). In Vorexperimenten wurden zwei verschiedene Sampling-Formen für die SERS-Experimente getestet. Bei der Auftragung des Proteins über eine Tröpfchendeposition mit anschließendem Trocknen wird das Protein in quantitativer Menge als Schicht (*Kaffeering*, siehe unten) auf das Substrat aufgebracht. Bei der Immersion des Substrats in eine Proteinlösung wird hingegen die Bildung einer Monolage des Proteins auf der Goldoberfläche angestrebt. Zur Unterstützung der Wechselwirkung zwischen Protein und Goldoberfläche, welche für den SERS-Effekt essentiell ist, wurde außerdem ein Cystein-getagtes Protein eingesetzt, welches eine kovalente Gold-Schwefelbindung mit den Substraten ausbilden kann und hier ebenfalls direkt detektiert wurde.

2.9.1 Tröpfchendeposition mit anschließendem Trocknen

2.9.1.1 Deposition auf SERS-Substraten

Alle verwendeten nanostrukturierten Goldsubstrate zeigten bei der Deposition einer wässrigen Lösung hydrophobe Eigenschaften. Beim Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich ein kleiner Ring (*Kaffeering-Effekt*), in dem der Analyt in konzentrierter Form vorliegt.
Je nach Dicke des Rings wird nicht nur eine auf der Oberfläche adsorbierte Monolage gemessen, sondern mehrere/viele Schichten,[21,22] sodass das resultierende Signal eine Kombination aus oberflächenverstärkter und nicht-verstärkter Raman-Streuung ist. Die Sampling-Technik bietet aufgrund des geringen Signal/Untergrund-Verhältnisses bei der Messung der Proteine nach eigenen Erfahrungen hier keinen Vorteil gegenüber der Immersion (Abschn. 2.9.2), insbesondere weil sich das Hintergrundspektrum schlechter korrigieren lässt. Da sich die Analytkonzentrationen der Antikörperlösungen in der Größenordnung von 1 mg mL^{-1} bewegen, ist eine direkte Raman-Messung der Probe auf nicht-verstärkenden Goldsubstraten bei höheren Leistungen eine mögliche Alternative (Abschn. 2.9.1.2).

2.9.1.2 DCDR-Raman auf nicht-verstärkenden Gold-Substraten

Nachdem sich die direkte Detektion eines Proteins auf einer nano-strukturierten Goldfläche aufgrund des starken Lumineszenz-Untergrunds als nicht praktikabel erwies, wurde als alternative Methode für die direkte Messung eines Raman-Spektrums *DCDR*-Spektroskopie (DCDR: *Drop Coating Deposition Raman*) angewandt. DCDR stellt eine Sampling- bzw. Messtechnik dar, mit welcher die Empfindlichkeit der linearen (nicht-verstärkten) Raman-Spektroskopie deutlich verbessert werden kann. Ihr Prinzip beruht auf der tropfenweisen Auftragung einer Analyt-Lösung auf eine (super)hydrophobe Oberfläche, auf der sich nach Verdampfung des Lösungsmittels der Analyt in einem winzigen Kaffeering oder Punkt aufkonzentriert. Dadurch wird es möglich, Analyten aus nativ stark verdünnten Lösungen mit Verstärkungsfaktoren von bis zu 1000 zu messen und Nachweisgrenzen im nM-Bereich zu erreichen.[23,24] Weitere Vorteile von DCDR sind die geringen eingesetzten Probenvolumina, die Minimierung des Spektren-Untergrunds (Lösungsmittel, Fluoreszenz) sowie die Möglichkeit, Verunreinigungen abzusondern oder Komponenten aus Mischungen zu trennen. Darüber hinaus hat diese Methode das Potential, mit Chromatographie-Methoden wie HPLC gekoppelt zu werden.

Wie in Abschn. 2.1 beschrieben weisen Formulierungen monoklonaler Antikörper ein spektrales Fenster im Raman-Shift-Bereich von 1500-1800 cm^{-1} auf, in dem die Proteinstruktur ohne Störung durch Hilfsstoffe untersucht werden kann. Die im Folgenden vorgestellten DCDR-Untersuchungen dienten deshalb einerseits zu Ermittlung von Strukturunterschieden zwischen Monomer und UV-induziertem Aggregat und andererseits als Vorexperimente für eine alternative, bezüglich des Samplings der SERS-Spektroskopie verwandten Technik zur direkten Detektion von Antikörperaggregaten.

2.9.1.2.1 DCDR am Beispiel von Lysozym

Raman-Spektren von Proteinen im Drop Coating und in Lösung weisen nach Ortiz et al. geringfügige Unterschiede auf. Die Sekundärstruktur im Drop Coating bleibt jedoch weitgehend erhalten.[22] Darüber hinaus bleiben Proteine im Drop Coating großteils hydratisiert. Insgesamt hat DCDR deshalb Potential für die Protein-Diagnostik.

Die DCDR-Technik wurde für den Einsatz in der Antikörperanalytik zunächst am Beispiel des Modell-Proteins Lysozym untersucht. Abb. 41 zeigt Spektren von Lysozym (in 1x PBS-Puffer), die unter Verwendung verschiedener Sampling-Methoden mit einem 532 nm Raman-Spektrometer aufgenommen wurden. Das Spektrum des noch glasigen Drop-Coatings (zweite Spur) nimmt eine Mittelstellung zwischen dem Spektrum der konzentrierten Lysozym-Lösung (20 mg mL^{-1}, oberste Spur, hier wurde zur Untergrund-Korrektur das Raman-Spektrum von Wasser abgezogen) und dem für das Ansetzen der Lösungen verwendeten Lyophilisat des Proteins (dritte Spur) ein. Es ähnelt jedoch insgesamt stark dem Spektrum der Proteinlösung. Während die Sekundärstruktur bei den drei Proben nur geringe Unterschiede aufweist (Amid I, Amid III), ist an den Markern wie der Disulfidbrücke bei ~500 cm^{-1} zu erkennen, dass sich die Tertiärstruktur beim Übergang vom gelösten zum festen Zustand ändert. Die unterste Spur in Abb. 41 zeigt das Raman-Spektrum einer Fibrille von Lysozym, die nach thermischem Stress der phosphatgepufferten Lysozym-Lösung als ausgefallener Feststoff erhalten wurde. Im Vergleich zu den Raman-Spektren der nicht gestressten Proben von Lysozym ist u. a. die Amid I-, Amid III-, δ_{CH}- sowie ν(SS)-Region deutlich verändert. Die Amid I Bande weist eine Verschiebung von 1654 cm^{-1} nach 1663 cm^{-1} auf, was auf eine Entfaltung von α-Helix-Strängen und die Bildung von β-Faltblattstrukturen hinweist.[25] Weitere Vorteile von DCDR, wie der Effekt der

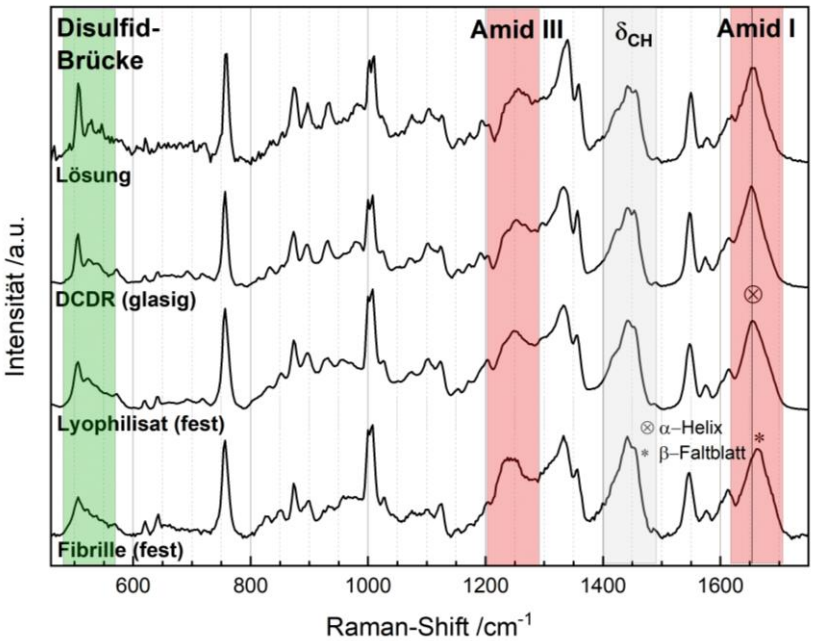

Abb. 41 Raman-Spektren von Lysozym als Lösung, Drop Coating, Lyophilisat und einer Fibrille des Lysozyms.

Aufkonzentrierung verdünnter Lösungen sowie die Segregation einzelner Komponenten bei salzhaltigen Lösungen, konnten in vorläufigen Experimenten für verdünnte Puffer-Lösungen von Lysozym (1 mg mL^{-1}) ebenfalls bestätigt werden. Nachfolgend wurde DCDR eingesetzt, um Monomer- und Aggregat-Fraktion der UV-gestressten Antikörper-Lösung im Hinblick auf strukturelle Unterschiede zu untersuchen.

2.9.1.2.2 Untersuchung von Strukturänderungen bei der Aggregation von Bevacizumab

Bei den UV-Stressexperimenten mit MVASI® und Avastin® bildete sich neben den löslichen Aggregaten auch eine geringe Menge unlösliches Protein (Aggregat), welches sich als weiße Schicht an der Küvettenwand abschied. In Abb. 42 sind die Basislinien-korrigierten und auf das Signal im Bereich zwischen 1150 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} Flächen-normierten Raman-Spektren von Bevacizumab und des ausgefallenen Feststoffs, das sich in MVASI® nach UV-Stress bildete, dargestellt. Das Raman-Spektrum des Feststoffs weist ein geringes Signal/Rausch-Verhältnis auf und enthält möglicherweise Artefakte, welche durch den großen Lumineszenz-Untergrund hervorgerufen werden (hier nicht gezeigt). Anzeichen für eine deutliche Änderung der Proteinstruktur sind der Peak-Shift (1671 cm^{-1} -> 1663 cm^{-1}) und die Verbreiterung der Amid-I-Bande sowie die veränderten Intensitäten der δ(CH)-Bande und der ν(C=C)-Banden der aromatischen Aminosäurereste Trp/Phe/Tyr. Die Bande bei ~1550 cm^{-1} ist nach Zhang et al. einziger sensitiver Marker für die Quantifizierung von thermisch erzeugten Aggregaten in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten.[26] Oftmals wird sie fälschlicherweise der Amid-II Bande zugeschrieben,[26] jedoch soll diese bei nicht-resonanter Anregung im Raman-Spektrum nicht beobachtbar sein.[27,28] Hier wird sie, wie weitere Banden im Bereich von 1550-1620 cm^{-1} Ringschwingungen der aromatischen Aminosäuren zugeordnet. Diese absorbieren stark im UVB-Bereich, sodass ein Teil der Änderungen in der ν(C=C)-Region vermutlich mit der Entstehung von Photoprodukten[29] zusammenhängt. Ähnliche Veränderungen wie in Abb. 42 beobachteten Bueno et al. bei thermisch gestresstem Rituximab, jedoch für monomere Proteine, welche sie nach Entfernen der Aggregate aus der Lösung erhielten.[30] Sie interpretierten den Shift der Amid-I-Bande als eine

Zunahme an ungeordneter Struktur in den gestressten Proteinen. Für unlösliche Aggregate (Fibrillen) würde hingegen ein erhöhter Anteil an β-Faltblatt-Strukturen erwartet werden, da Fibrillen in der Regel eine ausgeprägte Cross-β-Struktur aufweisen. Der für die Fibrille beobachtete Banden-Shift lässt sich möglicherweise mit der Entfaltung und Ausbildung bestimmter β-Faltblatt-Strukturen erklären.[31,32]

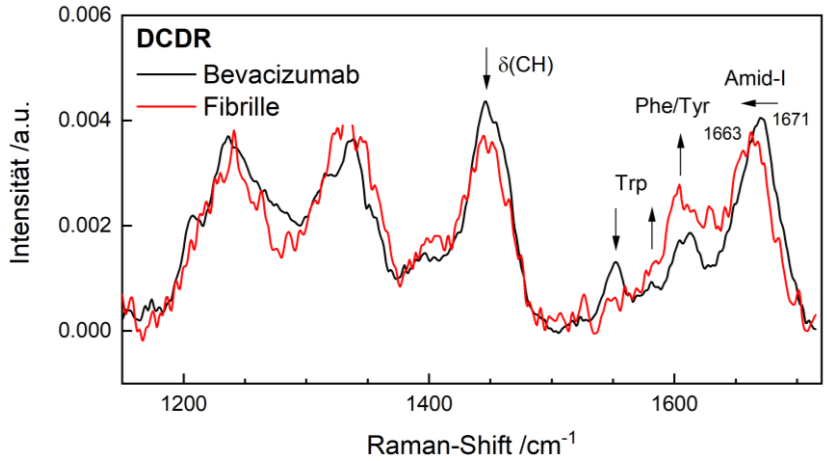

Abb. 42 DCDR-Spektren von Bevacizumab (PBS) und einer Fibrille, die sich bei der UV-Bestrahlung von MVASI® bildet.

Zur Untersuchung von Veränderungen der Proteinstruktur bei der Bildung von löslichen Aggregaten sowie ihrer Nachweisbarkeit wurden die bei der Fraktionierung der UV-gestressten Avastin®-Lösung separierten Monomer- und Aggregat-Fraktionen mit DCDR untersucht. Die Fraktionen aus der SEC-Fraktionierung lagen stark verdünnt vor und wurden für die einfachere Durchführung der DCDR-Messungen mit Hilfe von Zentrifugen-Filtern (50 kDa Cut-Off) aufkonzentriert. Ergänzend wurde für eine ungestresste Avastin®-Probe in analoger Weise durch Zentrifugation ein Puffer-Austausch vorgenommen, sodass Bevacizmab wie bei der Monomer- und Aggregat-Fraktion als konzentrierte Proteinlösung in 1x PBS-Puffer vorlag. Abb. 43 zeigt die SEC-Chromatogramme der drei Proben und von Avastin®(Referenz). Die Aggregat-Fraktion weist ein ähnliches Aggregat/Monomer-Verhältnis wie vor der Aufkonzentrierung auf (Abschn. 2.8.4). Monomer-Fraktion und Bevacizumab-Lösung (1x PBS) zeigen neben dem dominierenden Monomer-Peak hingegen einen deutlichen Anteil Dimer sowie einen geringen Anteil höherer Aggregate, welcher vor der Zentrifugation nicht beobachtbar war. Nach der Zentrifugation ist aufgrund der hohen Proteinkonzentration (evtl. auch aufgrund von Stress durch Scherkräfte[33]) das Gleichgewicht der reversiblen Aggregation stärker auf die Aggregat-Seite verschoben. Dennoch ist der Aggregat-Anteil in der Aggregat-Fraktion wesentlich größer als in den beiden anderen Proben, sodass DCDR-Analytik zur Untersuchung von Strukturänderungen angewandt wurde.

Für die Raman-Untersuchung wurden die Proben als 10 µL-Tröpfchen auf einer planaren Goldfläche aufgetragen und in Lösung sowie nach Trocknen als Drop Coating gemessen. Die basislinienkorrigierten und SNV-normierten Spektren zeigen nur eine geringe Variation (Abb. 44 oben). Die zweite Hauptkomponente der Faktoranalyse der mittelwertzentrierten Spektren mit orthogonaler Varimax-Rotation trennt die Proben der Aggregat-Fraktion von den Proben der Monomer-Fraktion sowie der nativen Bevacizumab-Lösung. Features im Loadings-Plot der zweiten Hauptkomponente

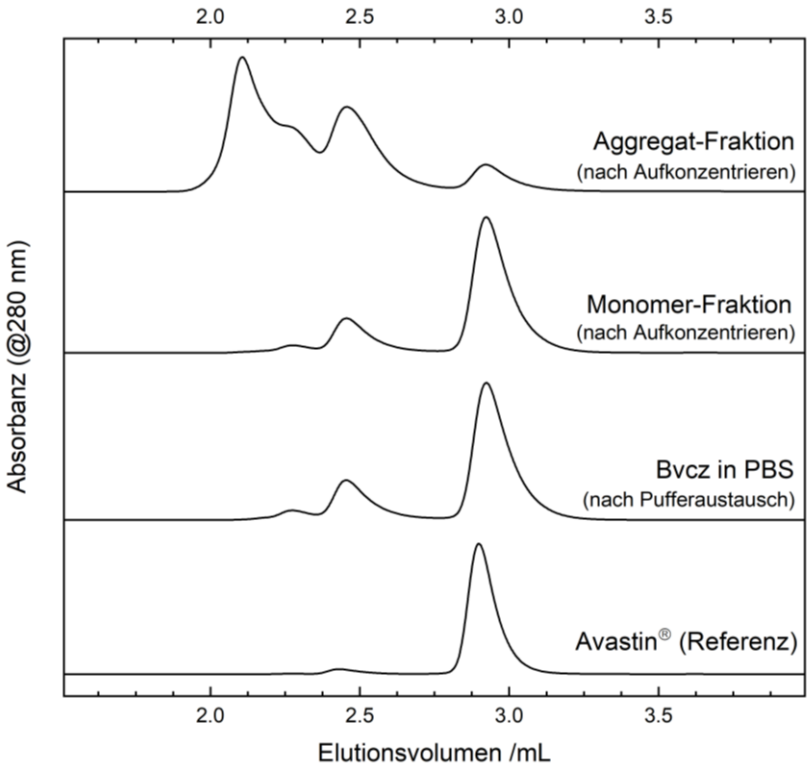

Abb. 43 SEC-Chromatogramme der aufkonzentrierten Aggregat- und Monomer-Fraktion, einer Bevacizumab-Probe nach Pufferaustausch und Avastin (Referenz).

sind im Wesentlichen Intensitätsänderungen von Raman-Banden des Antikörpers. Ähnlich wie bei der Fibrille nimmt die Intensität der Amid-I-Bande, der ν(C=C)-Bande bei 1550 cm^{-1} und der ν(CH)-Bande bei 1450 cm^{-1} ab, während sie bei der ν(C=C)-Bande ~1600 cm^{-1} sowie (C=H)-Bande bei 1400-1430 cm^{-1} zunimmt. Positive Features um 1690 cm^{-1} können möglicherweise mit der Bildung von β-Faltblattstrukturen in Verbindung gebracht werden. Auch bei Beschränkung des Spektralbereichs auf 1500-1720 cm^{-1} sind die Proben in der Faktoranalyse unterscheidbar, sodass die Anwesenheit der Formulierungsstoffe nicht stören sollte. Jedoch sind die Unterschiede durch die Normierung auf den kleinen spektralen Bereich marginal und vermutlich nicht für die Quantifizierung geeignet.
Ähnlich zu dem Vorgehen in der vorliegenden Arbeit führten McAvan et al. Stressexperimente mit IgG und solarer Strahlung (VIS/UVA) durch und nahmen Raman-Spektren von Fraktionen mit hohem bzw. niedrigem Aggregatgehalt auf. Auch sie konnten Proben der aggregatreichen und aggregatarmen Fraktion mittels Hauptkomponentenanalyse unterscheiden, wobei die Variation größer war als die in der vorliegenden Arbeit beobachtete. Im Loadings-Plot der relevanten Hauptkomponente (PC1) zeigte sich, dass die erklärte Varianz durch Intensitätsänderungen einzelner Banden hervorgerufen wird (laut Autoren eventuell kritisch wg. Untergrund), während Banden-Shifts nur marginal auftreten.[13]
Insgesamt zeigt sich, dass die geringe Variabilität in den Spektren löslicher Aggregate den Einsatz der Raman-Spektroskopie für die Unterscheidung von nativen und UV-gestressten Antikörperlösungen erschwert.

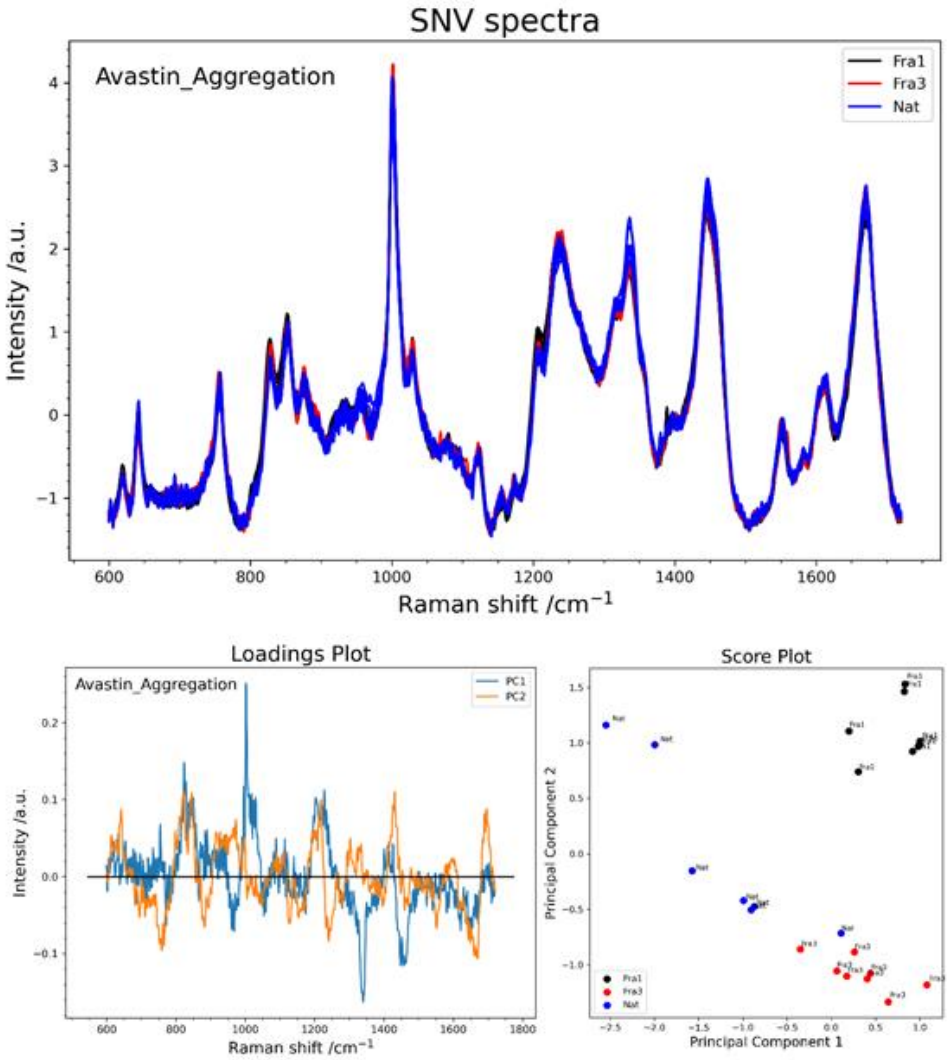

Abb. 44 SNV-Spektren der Proteinproben (Fra1: Aggregat-Fraktion, Fra3: Monomer-Fraktion, Nat: Bvcz in PBS). Loadings-Plot (unten links) und Score-Plot (unten rechts) der beiden ersten Hauptkomponenten der Faktoranalyse.

2.9.2 Immersion

Als alternative Sampling-Methode zur Tröpfchendeposition mit anschließendem Eintrocknen wurden Immersionsexperimente zur gezielten Herstellung einer Protein-Monolage durchgeführt. In Abschn. 2.10.3.2 wurde gezeigt, dass für ein kleines aromatisches Molekül, welches kovalent über eine Gold-Schwefel-Bindung an die Goldoberfläche der AMO-P300-Substrate bindet (4-MBA), die Belegung der Oberfläche auf einer Zeitskala von ca. einer Stunde erfolgt und die SERS-Messungen intensive SERS-Signale liefern. Deshalb wurde hier ein Protein mit einem Cystein-Tag eingesetzt, um die Bindung an die Goldoberfläche zu unterstützen. Die Aminosäure Cystein (Cys) weist eine freie Thiolgruppe auf, welche an die Goldoberfläche binden kann, sodass Cystein-Tags allgemein ein bewährtes Mittel für die geordnete Immobilisierung von Proteinen an Goldoberflächen darstellen.[34]

Als Modellprotein für die SERS-Experimente wurde das Fusionsprotein CysAG[35] verwendet, das wesentliche Sequenzen der antikörperbindenden Proteine A und G enthält und als Ligand für die selektive Bindung von monoklonalen Antikörpern dient. Zusätzlich wurden SERS-Spektren der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin aufgenommen, um die Bandenzuordnung zu erleichtern. Alle SERS-Spektren weisen ein sehr geringes Signal zu Untergrund Verhältnis auf (S/B <

1,7%), was in Abb. 45 exemplarisch für Phenylalanin gezeigt wird. In Abb. 46 sind die SERS-Spektren von CysAG, Phenlyalanin und Tyrosin dargestellt (schwarze Kurven, basislinienkorrigierte Differenzspektren der Substrate nach Immersion bzw. vor Immersion) sowie für die Spektreninterpretation die Raman-Spektren von Feststoffproben der drei Analyten (rote Kurven). Die SERS-Spektren zeigen intensive Banden im Bereich von 800 bis 1100 cm^{-1} (Ringschwingungen) sowie 1500-1600 cm^{-1} (ν(C=C)-Streckschwingung im aromatischen Ring). In SERS-Spektren oft beobachtet werden Banden von amorphem Kohlenstoff[36] (adsorbierte Kohlenwasserstoffe/ Fragmente) bei ~1350 cm^{-1} sowie ~1580 cm^{-1}, die hier eventuell auch einen gewissen Beitrag leisten. SERS-Spektren von Protein CysAG (Messung von 2 Proben) zeigen die Ring-Breathing-Bande von Phenylalanin bei ca. 1000 cm^{-1}, sowie angedeutet die oben beschriebenen Schwingungen. Dies bedeutet, dass sich das Protein in der Nähe der Oberfläche befindet. Die Amid I-Bande tritt hier nicht/bzw. nur schwach auf, was auch in anderen SERS-Studien beobachtet wurde.[28] Proteine und Aminosäuren sind amphotere Moleküle. Sie weisen an ihrem isoelektrischen Punkt (PI) keine Nettoladung auf, unter stärker sauren bzw. basischen Bedingungen eine positive oder negative Nettoladung. Dies kann die Wechselwirkung mit der neutralen bzw. schwach negativ geladenen Goldoberfläche zusätzlich beeinflussen. Um zu testen, ob die Ladung einen Einfluss auf die Oberflächenbindung sowie das SERS-Spektrum hat, wurde die Immersion für Phenylalanin unter sauren Bedingungen (pH = 5) durchgeführt, zeigte jedoch keine wesentliche Signaländerung im Vergleich zu den neutralen Bedingungen (hier nicht gezeigt).
Die gravierenden Signalunterschiede für Protein/Aminosäuren und 4-MBA trotz ähnlicher Analytkonzentrationen sowie Immersionszeiten können auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. 4-MBA bindet kovalent über eine Gold-Schwefelbindung an die Oberfläche. Dabei wird vermutlich eine selbstorganisierende Monolage gebildet, in der die Moleküle dicht gepackt angeordnet sind und sich in großer Anzahl in der Verstärkungsregion befinden. Durch die kovalente Bindung spielt neben dem elektromagnetischen Verstärkungseffekt (*through space)* auch die chemische Verstärkung (*Charge-Transfer*) eine wichtige Rolle. Für die aromatischen Aminosäuren sowie das Makromolekül CysAG ist eine solche Bindung/Organisation aufgrund geladener Molekülteile sowie fehlender Thiolgruppen nicht in dem Ausmaß möglich wie für 4-MBA. Insgesamt führt dies für 4-MBA zu einem ausreichend intensiven SERS-Signal bei einem Signal/Untergrund-Verhältnis von ~0.5:1, während Protein und aromatische Aminosäuren ein um den Faktor > 50 schlechteres Signal/Untergrund-Verhältnis aufweisen.

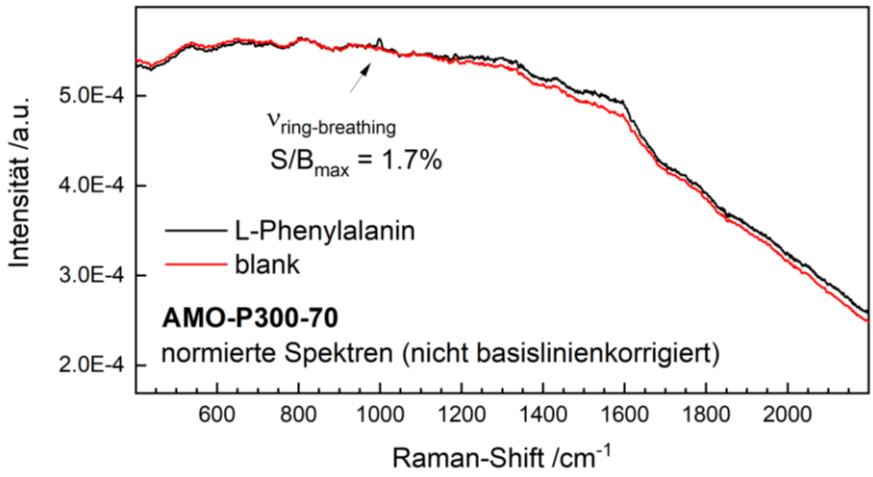

Abb. 45 SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats vor und nach der Immersion in einer Lösung von L-Phenylalanin.

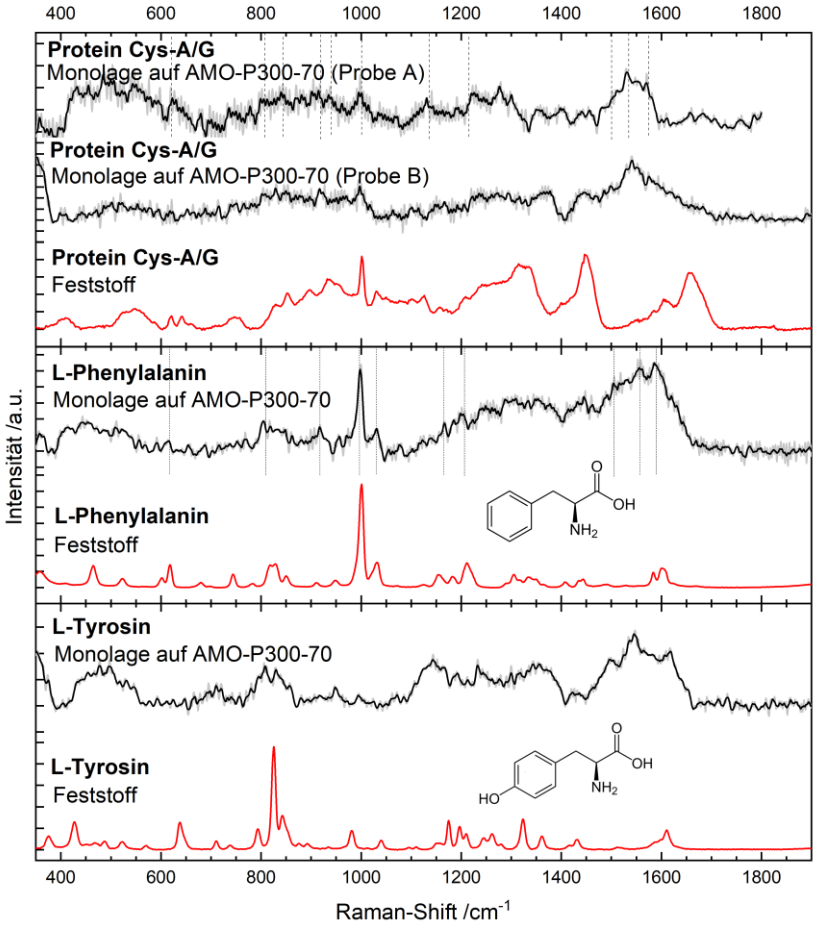

Abb. 46 SERS-Spektren (schwarze Kurven, Differenzspektren) und Raman-Spektren (rote Kurven) von Protein CysAG, L-Phenylalanin und L-Tyrosin.

Das Signal/Untergrund-Verhältnis erweist sich hier als kritischer Punkt. Durch den breiten Laser-Spot des Raman-Systems können keine Hot-Spots mit großem Signal/Untergrund-Verhältnis selektiert werden. Auch wenn die Projektidee war, reproduzierbare Substrate mit einem *Long-Range*-SERS-Effekt zu entwickeln, bestätigen die Ergebnisse hier die in einem Großteil der SERS-Studien beobachteten *Long-Tail*-Verteilung[11]: Eine geringe Anzahl sehr effektiver Hot-Spots liefert den Hauptbeitrag zum SERS-Signal. Dies scheint kritisch für die Aufnahme von SERS-Spektren mit geringem Untergrund zu sein. Aufgrund dessen wurde beschlossen, den Weg der direkten Proteindetektion mit SERS mit den gegebenen Substraten und einem *Medium-Cost* Raman-System mit großem Laserspot im Rahmen des Projekts nicht weiter zu verfolgen.

2.10 Indirekte Detektion von Antikörpern und ihren Aggregaten mit SERS

Für die indirekte Detektion von Biomolekülen mit oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie gibt es im Wesentlichen zwei Herangehensweisen, die traditionelle, häufig angewandte *Sandwich-Assay*-Technik und die erst seit kurzer Zeit bekannte *Frequency-Shift-SERS*-Technik (Abb. 47).
Bei einem *Sandwich-Assay* bringt der Analyt durch Wechselwirkung mit Nanopartikel-gebundenen Liganden zwei oder mehrere Nanopartikel in räumliche Nähe und erzeugt einen SERS-Hot-Spot. In diesen Hot-Spots wird das Raman-Signal eines Nanopartikel-gebundenen Raman-Reporters (kleines aromatische Molekül mit großem Raman-Streuquerschnitt) enorm verstärkt und detektierbar. Bei einem Sandwich-Assay korreliert die Analytkonzentration mit dem SERS-Signal. Diese Technik erfordert mehrere bewegliche Bindungspartner (z. B. Nanopartikel) und ist mit nanostrukturierten Substraten, wie sie im Rahmen dieses Projektes eingesetzt wurden, alleine nicht durchführbar.[37]
Bei der *Frequency-Shift-SERS*-Technik wird hingegen der Zustand einer Monolage gemessen, der sich unter Anbindung eines Analyten verändert. Basis für einen *Frequency-Shift*-Sensor bildet die Monolage eines Raman-Reporters auf einem Nanopartikel oder nanostrukturierten Substrat. Die Bindung des Analyten an den Reporter, einen Reporter-gebundenen Liganden oder die Substratoberfläche beeinflusst die mechanische, chemische oder dielektrische Umgebung des Reporters, was zu Frequenz-Shifts bestimmter Schwingungsbanden führt. Das Ausmaß der Shifts korreliert mit der Analytkonzentration.[37] Da *die Frequency-Shift-SERS*-Technik erst in den letzten Jahren aufgekommen ist, wurde sie bisher nur sporadisch mechanistisch untersucht.[38] Die Abhängigkeit der Shifts von wesentlichen experimentellen Faktoren (Reporter/Ligand/Analyt-System, Lösungsmittel etc.) ist daher nicht bekannt. In den folgenden Abschnitten wird die Entwicklung eines Immuno-SERS-Sensors für die Detektion von monoklonalen Antikörpern und ihren Aggregaten beschrieben.

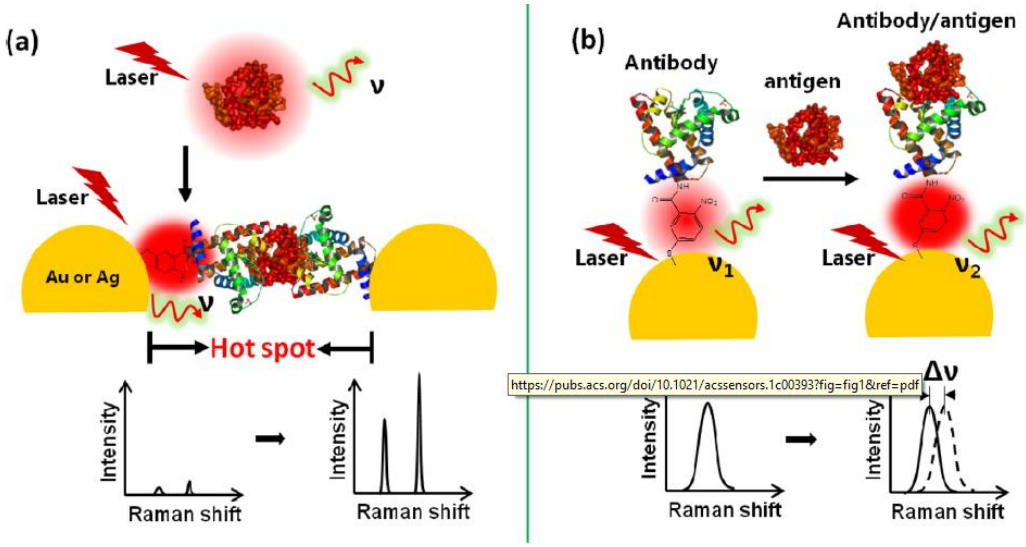

Abb. 47 Sandwich-Assay-Technik (links) und Frequency-Shift-SERS-Technik (rechts) für die indirekte Detektion von Biomolekülen. Entnommen aus Ref. [37].

2.10.1 Aufbau des Immuno-SERS-Sensors

Der Immuno-SERS-Sensor besteht in Anlehnung an Arbeiten von Olivo[39,40] und Hutchison[41,42] aus dem Raman-Reporter 4-MBA, über dessen SERS-Spektrum die Anbindung des monoklonalen Antikörpers indirekt detektiert wird, sowie dem Liganden CysAG, welcher den monoklonalen Antikörper selektiv bindet (Abb. 48). Die Basis des Immuno-SERS-Sensors bildet der Raman-Reporter 4-MBA, welcher über seine Thiolgruppe kovalent an die Goldschicht des SERS-Substrats bindet und eine selbstorganisierende Monolage bildet. An die Carboxylgruppe von 4-MBA wird über EDC/NHS-Chemie das Antikörperbindende Protein CysAG kovalent gebunden. Protein CysAG[35] ist ein Fusionsprotein (47.8 kDa), welches 5 IgG-bindende Regionen von Protein A (E-D-A-B-C) und 2 IgG-bindende Regionen von Protein G (C1-C3) aufweist. Es bindet an die Fc-Region des Antikörpers (149 kDa).

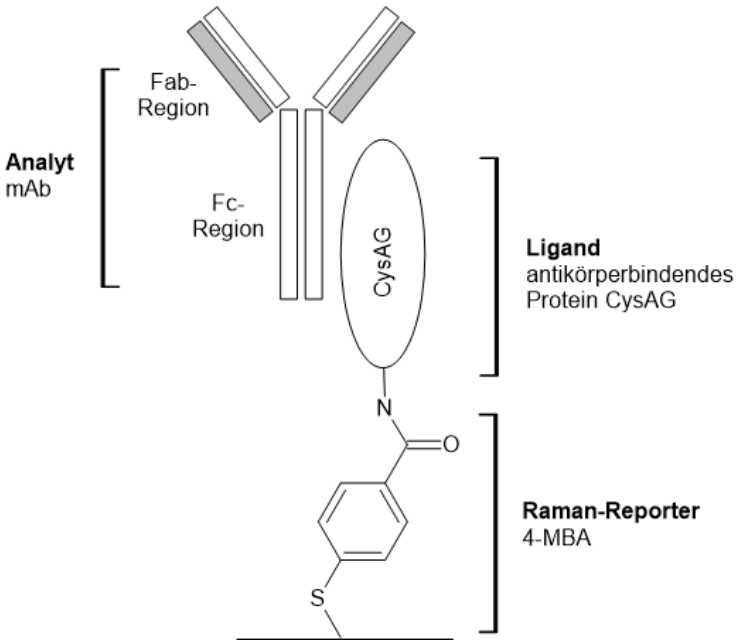

Abb. 48 Immuno-SERS-Sensor für die Detektion von monoklonalen Antikörpern.

2.10.2 Funktionalisierung der SERS-Substrate

Abb. 49 zeigt die einzelnen Funktionalisierungsschritte für den Aufbau des Immuno-SERS-Sensors. Die blanken SERS-Substrate wurden vor der Funktionalisierung mit Ethanol gewaschen. Für die Anbindung von 4-MBA an die Goldschicht wurden die Substrate für 1 Stunde mit einer 1 mM 4-MBA-Lösung (EtOH) versetzt und anschließend 3x mit Ethanol gewaschen, um ungebundenes 4-MBA zu entfernen. Die Immobilisierung von CysAG an die 4-MBA-funktionalisierten Substrate erfolgte in einer zweistufigen Synthese. Im ersten Schritt reagieren die Substrate zur Aktivierung der Säuregruppe von 4-MBA mit einer 10 mM EDC/5 mM Sulfo-NHS Lösung (MES-Puffer, pH = 6.0) für 20 Minuten auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Substrate je einmal mit MES- bzw. 1x-PBS-Puffer gewaschen. Direkt im Anschluss wurden die Substrate mit einer 1 mg mL^{-1} CysAG-Lösung (1x PBS) versetzt und für 2 h auf dem Schüttler platziert. Schließlich wurde die Lösung 30 min mit einer 10 mM Glycin-Lösung (1x PBS) gequencht. Die Substrate wurden mit 1x PBS-Puffer gewaschen und trocken im Kühlschrank gelagert.

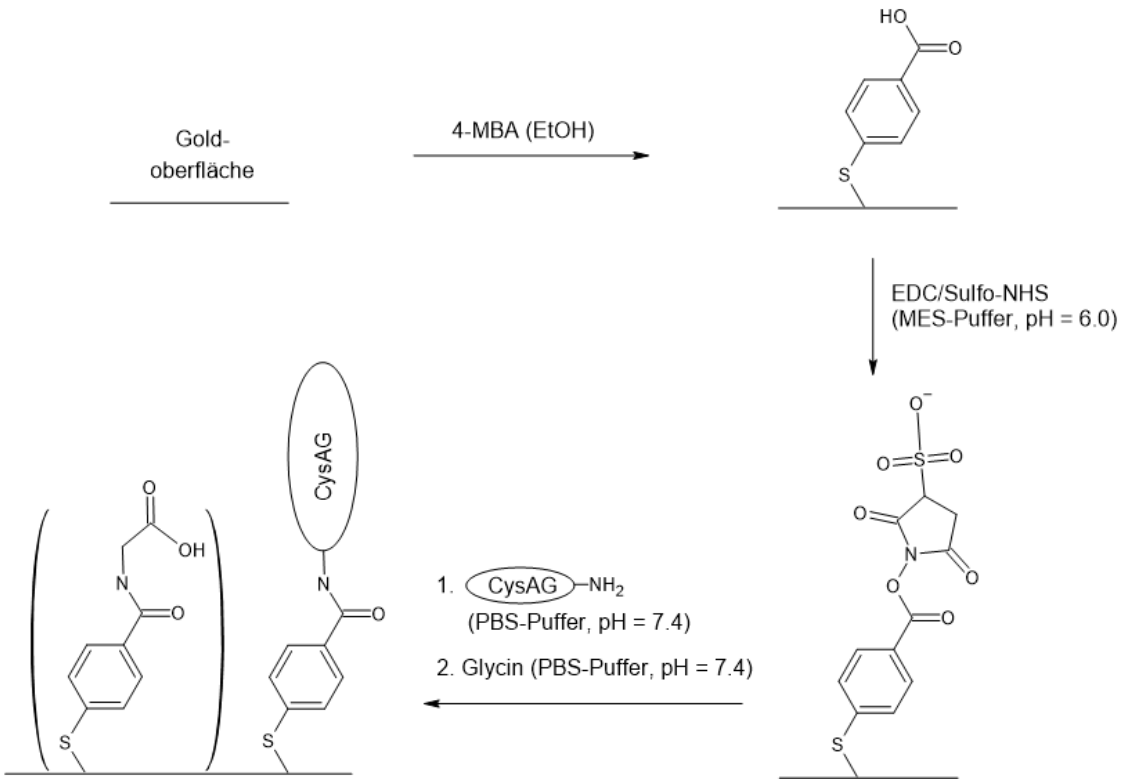

Abb. 49 Funktionalisierung der SERS-Substrate.

2.10.3 Charakterisierung des Sensors

Das SERS-Spektrum des Raman-Reporters dient bei der Frequenz-Shift-Technik als Basis für die Charakterisierung des Zustands des Immuno-SERS-Sensors (z. B. die Anbindung des Analyten). Folgender Abschnitt befasst sich mit der Charakterisierung von 4-MBA-Monolagen auf Goldsubstraten mit SERS. Eine 4-MBA-Monolage ist im Vergleich zum Immuno-SERS-Sensor mit seiner komplexeren, funktionalisierten 4-MBA-Monolage ein einfacheres System, um das Verhalten des Reportermoleküls zu studieren. Es wurden Effekte untersucht, die neben der Bindung des Analyten Einfluss auf die 4-MBA-Monolage und damit auf das SERS-Spektrum nehmen, wie Laserintensität, pH-Wert, Lösungsmittel und Verunreinigungen. Zudem wurde eine Chip-Statistik zur Bestimmung der On-Chip- bzw. Chip/Chip-Variation durchgeführt, um die Grenzen der Frequenz-Shift-Technik bei der gegebenen technischen Ausstattung zu bestimmen.

2.10.3.1 SERS-Spektrum von 4-MBA

Der Raman-Reporter 4-MBA ist ein kleines aromatisches Molekül, welches als funktionelle Einheiten eine Carbonsäuregruppe (pK_s = 4,79) und eine Thiolgruppe (pK_s = 6,80) aufweist.[43] Abb. 50 zeigt das SERS-Spektrum von 4-MBA, das als Monolage auf einem AMO-P300-70 Goldsubstrat vorliegt (oben), sowie das Raman-Spektrum der Bulk-Probe (unten). Das Spektrum von oberflächengebundenem 4-MBA ist wesentlich schlichter als das Raman-Spektrum, mit nur zwei intensiven Banden bei 1586 cm^{-1} und 1073 cm^{-1}. Dabei handelt es sich um eine ν(C=C)-Schwingung und eine Schwingung mit

Anteilen der ν(C-S)- und der Ring-Breathing-Koordinate. Beide Schwingungsmoden weisen als

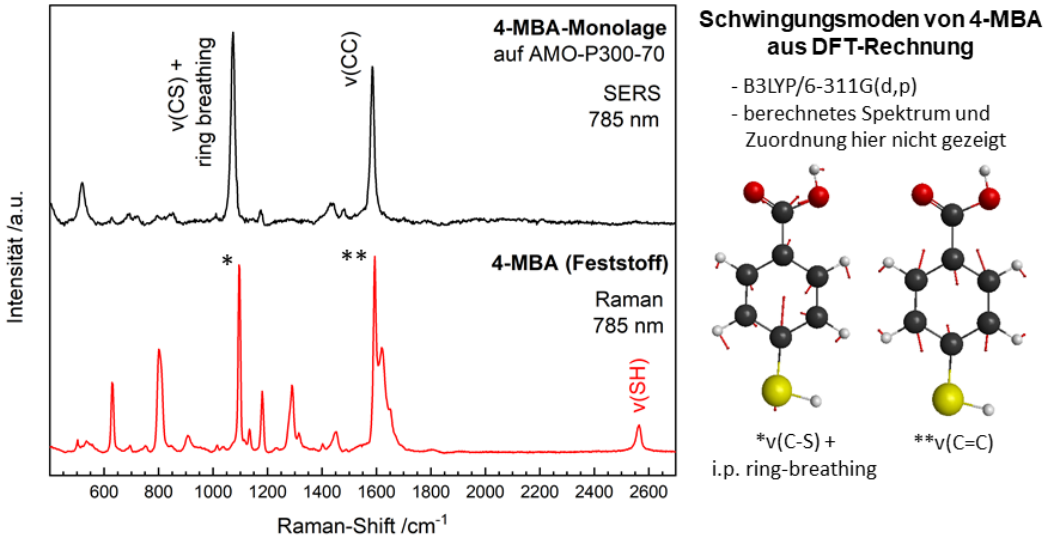

Abb. 50 SERS-Spektrum einer Monolage von 4-MBA auf einem P300-70 Goldsubstrat von AMO (oben), Raman-Spektrum einer pulverförmigen Probe von 4-MBA (unten). Berechnete Schwingungsmoden der intensivsten Banden im Spektrum(rechts).

Tab. 4 Übersicht der wichtigsten Peaks des SERS-Spektrums und ihre Zuordnung mit Hilfe der Literatur.

Experiment [cm^{-1}]	Literatur [cm^{-1}]	Bandenzuordnung	Autor
1698	1710	ν(C=O) (neutral)	Capocefalo2019[44]
1586	**1586**	**ν_{8a}: Ring-Breathing (ν(C=C))***	Capocefalo2019[44]
1476	1480-1483	δ(C-H)	Williams2016[45]
1430- 1390	1428- 1370	ν(COO-) ν(COO-Au)	Capocefalo2019[44], Michota2003[46]
1136	1143	ν(CCOO-) + ν(C-S)	Capocefalo2019[44]
1073	**1078**	**ν_{12}: Ring-Breathing (Ring-Breathing + ν(C-S))***	**Williams2016[45]**
1008	1011	Ring-Deformation	Capocefalo2019[44]
795	801	In-plane-Deformation	Williams2016[45]
718	718	γ(CCC)	Michota2003[46]
691	697	δ(OCO)	Williams2016[45]
627	631	ν_{6b}	Capocefalo2019[44]
519	525	ν(C-S)	Capocefalo2019[44]

* Zuordnung in der vorliegenden Arbeit anhand DFT-Rechnung/Raman-Spektrum

Ringschwingungen bereits einen großen Raman-Querschnitt auf. Durch ihre Orientierung senkrecht zur Oberfläche erfahren sie gemäß der Oberflächenauswahlregeln bei Anregung eine ausgeprägte Verstärkung. Eine visuelle Darstellung der beiden Schwingungen für das ungebundene 4-MBA findet sich auf der rechten Seite von Abb. 50. Sie wurden mit Hilfe der DFT-Theorie auf dem B3LYP/6-311G(d,p)-Niveau mit dem Quantenchemie-Paket *GAMESS(US)*[47] berechnet und mit *dem Molecular Modeling* Programm *Avogadro* dargestellt. Einen Hinweis auf die kovalente Bindung von 4-MBA an die Goldoberfläche unter der Ausbildung einer Au-S-Bindung gibt das Verschwinden der ν(S-H)-Bande bei 2564 cm^{-1} im SERS-Spektrum. Die deutliche Rotverschiebung der Ring-Breathing-Bande (mit ν(C-S)-Anteil) könnte ein weiterer Hinweis darauf sein. Die ν(C=C)- und Ring-Breathing-Schwingungsmode sind empfindlich gegenüber mechanischen sowie Charge-Transfer-Effekten und spielen deshalb abgesehen von ihrem dominierenden Signal für die Frequenz-Shift-Technik eine zentrale Rolle.[38,39] Weitere SERS-Banden von 4-MBA sowie ihre Zuordnung mit Hilfe der Literatur sind in Tab. 4 aufgelistet.

2.10.3.2 Adsorptionskinetik von 4-MBA an die Goldoberfläche

Die Adsorptonskinetik von 4-MBA (1 mM in EtOH) an AMO P300-70-Substrate wurde durch Messung der Peak-Intensität der Ring-Breathing-Bande im Zeitraum von 1-150 min bestimmt (Abb. 51 oben). Bereits nach 60 min ist der Sättigungsbereich erreicht (94% der maximalen Signalintensität $I_{150\ min}$), d. h. fast die komplette Substratoberfläche ist mit einer Monolage aus 4-MBA-Molekülen belegt. Bei der Entstehung der Monolage weist die ν(C=C)-Bande eine leichte Verschiebung des Peaks zu höheren Wellenzahlen auf (Abb. 51 Mitte). Die Ring-Breathing-Bande zeigt in Abhängigkeit der Oberflächenbelegung eine leichte Verbreiterung (Abb. 51 unten). Die SERS-Spektren nach 60 min und 150 min weisen keine Unterschiede auf. Falls nicht explizit beschrieben betrug die Reaktionszeit für die Herstellung der 4-MBA-Monolage bei der Entwicklung des Sensors 60 min.

2.10.3.3 Einfluss der Laserleistung auf die 4-MBA-Monolage

Zur Ermittlung der optimalen Messparameter für die Frequenz-Shift-Technik wurde der Einfluss der Laserleistung auf die mit 4-MBA funktionalisierten AMO-P300-70-Substrate untersucht (Abb. 52). Während die Laseranregung mit einer höheren Leistung aufgrund der Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses des Raman-Signals und der beschleunigten Photobleichung des spektralen Untergrunds allgemein wünschenswert ist, kann dies unter Umständen zu einer Veränderung von Proben führen. Abb. 52 zeigt SERS-Spektren der 4-MBA-Monolage, welche mit Leistungen von 5, 10, 20 und 50 mW an jeweils derselben Position auf dem Substrat aufgenommen wurden. Mit zunehmender Laserleistung weisen die ν(C=C)- und die Ring-Breathing-Bande eine Rotverschiebung auf, die bei 10 mW geringfügig, ab 20 mW jedoch deutlich auftritt. Ab einer Laserleistung von 50 mW sind auch weitere Banden des SERS-Spektrums stark verändert, was auf eine Umstrukturierung der 4-MBA-Monolage hinweist. Die irreversible Veränderung der Monolage (für P = 50 mW) wurde auch bei benetzten Substraten (1x PBS) beobachtet. Um den Monolayer nicht zu verändern, wurden deshalb bei allen SERS-Messungen des Immuno-SERS-Assays niedrige Leistungen von 5 mW angewandt.

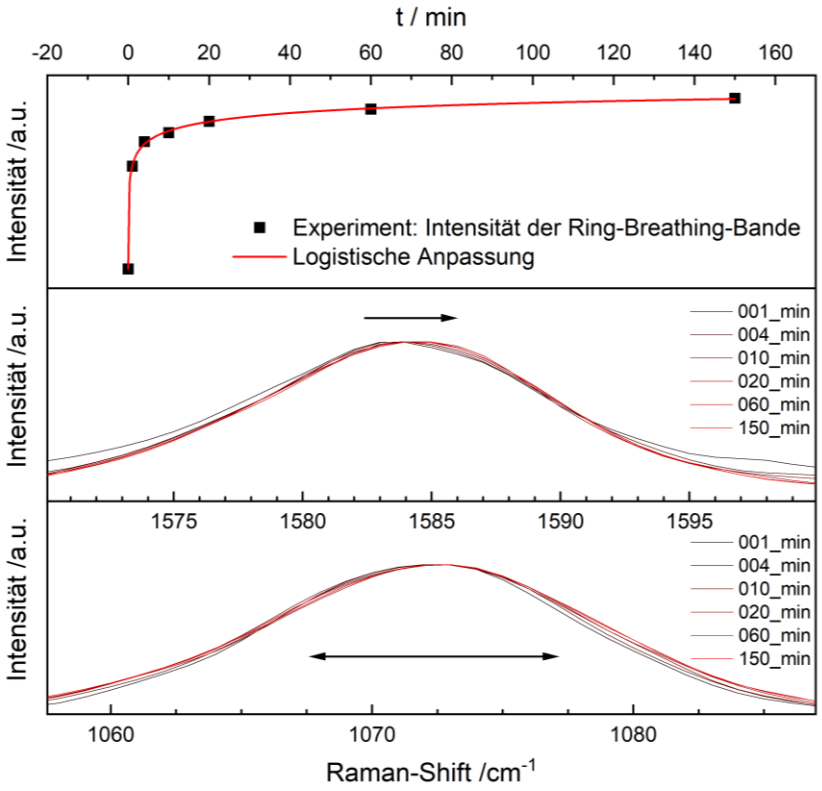

Abb. 51 Adsorptionskinetik von 4-MBA an ein AMO P300-70 Substrat (oben). Veränderung der ν(C=C)- (Mitte) und Ring-Breathing-Bande (unten).

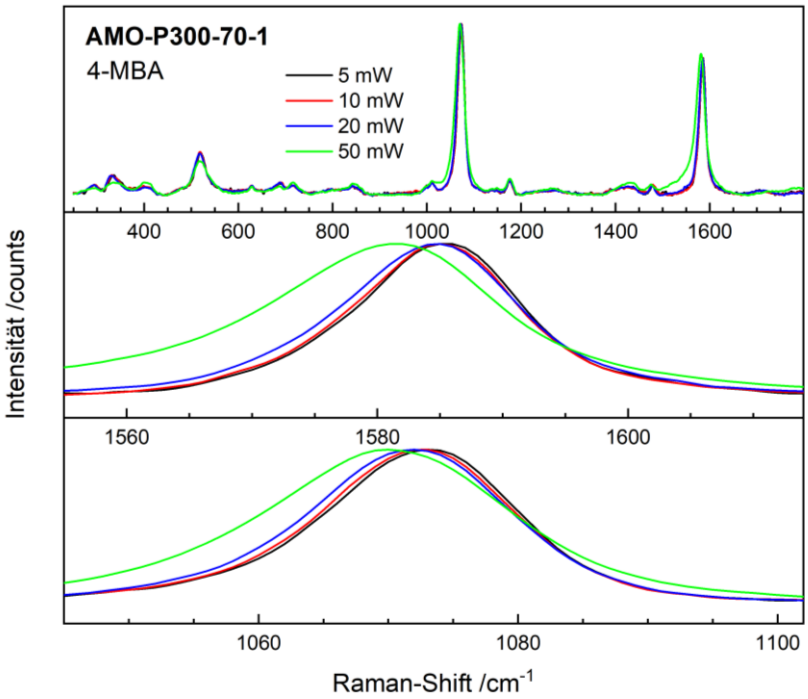

Abb. 52 Effekt der Laserleistung auf die 4-MBA-Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage bei unterschiedlichen Laserleistungen.

2.10.3.4 Effekt des pH-Werts

Die Protonierung der Säuregruppe von 4-MBA hat einen direkten Einfluss auf seine Bindung an bzw. seine Orientierung gegenüber der Metalloberfläche und wirkt sich zudem auf die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den 4-MBA-Molekülen in der Monolage aus.[46] In mehreren kürzlich erschienenen Studien wurde 4-MBA als pH-SERS-Sensor untersucht.[44,45,48] In der Folge wurde das Konzept des pH-SERS-Sensors auch auf biologische Mikroumgebungen (Zellen, Biomoleküle) angewandt, welche sich bei natürlichem bzw. anomalem Zustand in ihrem pH-Wert unterscheiden können.[49]

Aus den pH-abhängigen Veränderungen der SERS-Spektren werden in der vorliegenden Arbeit Informationen für die Banden-Zuordnung sowie über Banden-Shifts ermittelt, die bei der Evaluation des Immuno-SERS-Sensors hilfreich sein können. Abb. 53 zeigt SERS-Spektren von 4-MBA auf einem AMO-P300-70 Substrat, gemessen in einer 1x PBS-Lösung bei verschiedenen pH-Werten zwischen 3,9 und 10,3. Die folgende Spektren-Interpretation wurde im Einklang mit den Referenzen in Tab. 4 vorgenommen. Bei niedrigem pH-Wert liegt die Carbonsäuregruppe in protonierter Form vor, sodass bei einem pH-Wert von 3,9 das ungeladene 4-MBA dominieren sollte (pK_s(COOH) = 4,79). Hier tritt eine Bande bei ca. 1700 cm^{-1} auf, welche bei hohem pH-Wert nicht beobachtbar ist. Sie kann der ν(C=O) - Schwingung der protonierten Carbonsäure zugeordnet werden. Umgekehrt nimmt unter basischen Bedingungen das Signal der $\nu(COO^-)$ Streckschwingung des Carboxylats bei ca. 1410 cm^{-1} stark zu. Ihre Intensität und Schwingungsfrequenz ändert sich - abgesehen vom pH-Wert - in der vorliegenden Arbeit auch bei anderen experimentellen Bedingungen, was laut Literatur u. a. mit der Orientierung der Säuregruppe des Moleküls gegenüber der Metalloberfläche und Wechselwirkungen der Säuregruppe mit der Metalloberfläche erklärt werden kann.[46] Das bei hohen pH-Werten beobachtete Kippen

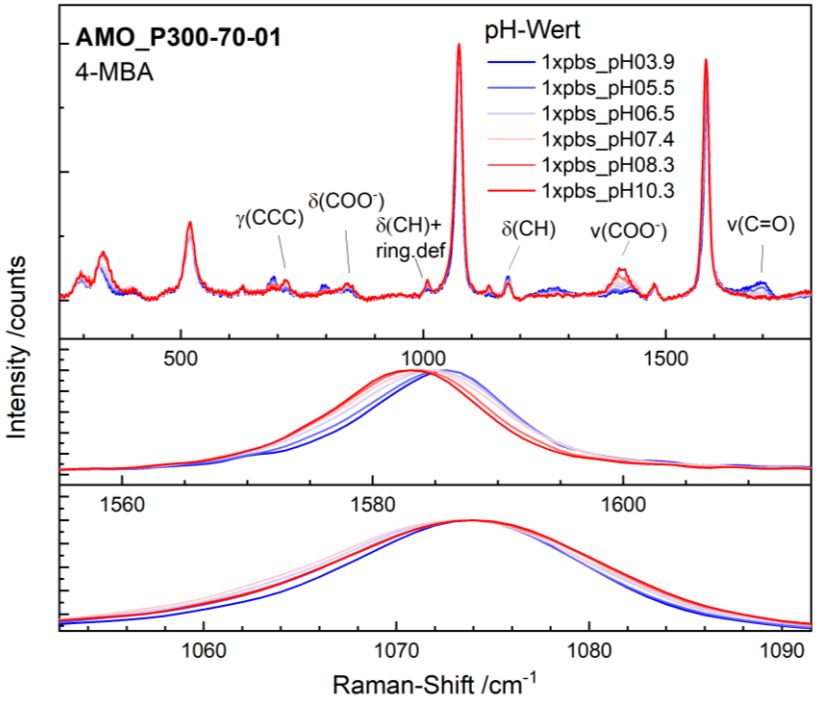

Abb. 53 Effekt des pH-Werts auf die 4-MBA Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage, gemessen in einer 1x PBS-Lösung bei verschiedenen pH-Werten.

von 4-MBA, welches zu einer Annäherung der Säuregruppe an die Oberfläche führt, wird auch durch die γ(CCC) Out-of-Plane-Schwingung deutlich, die aufgrund der Oberflächenauswahlregeln nun an Intensität gewinnt.[46] Die beiden Frequenz-Shift-Marker ν(C=C) und Ring-Breathing weisen beim Übergang von niedrigem zu hohem pH-Wert eine deutliche Rotverschiebung von 3 cm^{-1} bzw. eine Veränderung der Bandenbreite auf. Dies unterstreicht, dass ein Frequenz-Shift-SERS-Sensor auf 4-MBA-Basis eine exakte Einhaltung des pH-Werts erfordert.

2.10.3.5 Einfluss des Lösungsmittels und der Pufferkonzentration

Banden-Shifts bei der Frequenz-Shift-Technik sind relativ klein, sodass neben der gewünschten Wirkung des Analyten hier weitere Einflussfaktoren eine Rolle spielen können. Ein wichtiger Einflussfaktor ist das Medium, in dem sich die 4-MBA-Monolage befindet.[38] In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Peak-Positionen/-Breiten für die ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande in Abhängigkeit davon beobachtet, ob die Substrate trocken, in wässriger oder alkoholischer Lösung gemessen wurden (hier nicht gezeigt). Für monoklonale Antikörper wird oftmals PBS-Puffer als Lösungsmittel eingesetzt. Deshalb wurde der Einfluss der Puffer-/Salzkonzentration auf die SERS-Spektren der 4-MBA-Monolage untersucht (

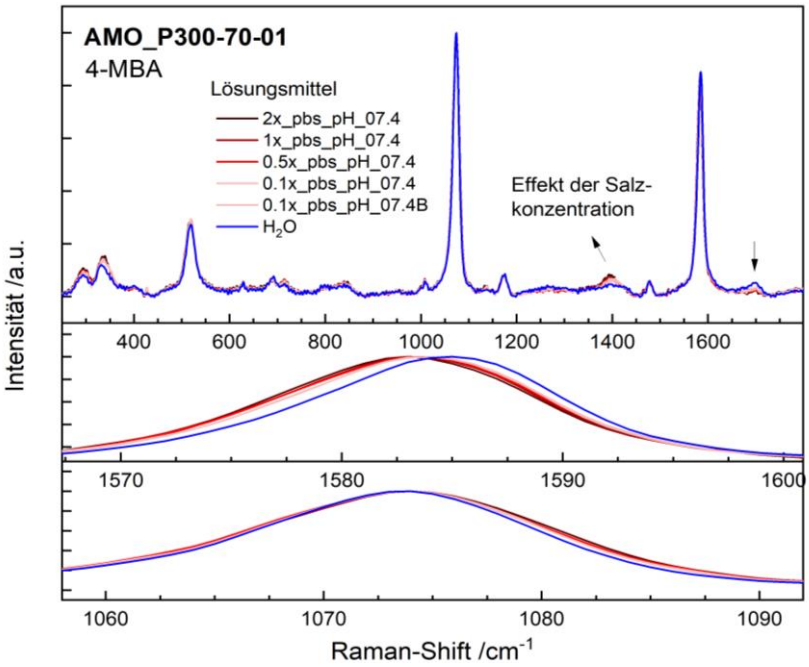

Abb. 54). Der pH-Wert der Lösungen (0,1x, 0,5x, 1x und 2x PBS) wurde vor der Messung mit einem pH-Meter (Mikroprozessor pH-Meter CG 840B, Fa. Schott, Elektrode B121015022) auf pH = 7,4 eingestellt. Tendenziell zeigt die ν(C=C)-Bande eine Rot-Verschiebung mit zunehmender Puffer-/Salzkonzentration, während die Ring-Breathing-Bande nur eine geringe Veränderung aufweist. Die Banden-Shifts bei zunehmender Puffer-/Salzkonzentration ähneln tendenziell den Shifts bei Erhöhung des pH-Werts (Abschn. 2.10.3.4). Die Erhöhung der Ionenkonzentration hat möglicherweise einen Einfluss auf intermolekulare Wechselwirkungen in der 4-MBA-Monolage oder Wechselwirkungen zwischen 4-MBA und Goldoberfläche bzw. auf Charge Transfer-Prozesse.

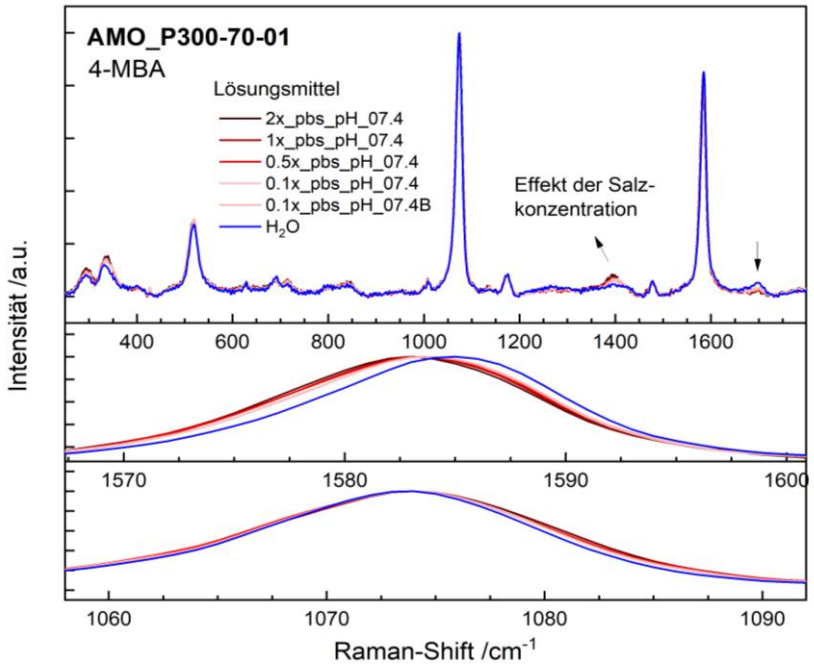

Abb. 54 Einfluss der Pufferkonzentration auf die 4-MBA Monolage. SERS-Spektren eines AMO P300-70 Substrats mit 4-MBA Monolage, gemessen in PBS-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

2.10.3.6 Charakterisierung der 4-MBA+CysAG-Monolage

Nach der Funktionalisierung der 4-MBA-Monolage mit dem Ligand CysAG mit Hilfe von EDC/NHS-Chemie zeigt das SERS-Spektrum der trocken gemessenen Substrate nur geringfügige Änderungen, wie eine Abnahme/Verschiebung der $\nu(COO^-)$-Bande sowie eine Zunahme des Signals bei 1670 cm^{-1} (Abb. 55). Dies könnte ein Hinweis auf die Anbindung des Proteins unter der Ausbildung einer Amid-Bindung (ν(Amid-I)~1660 cm^{-1}) zwischen der Säuregruppe von 4-MBA und einer Aminogruppe des Proteins sein.[50] Insgesamt sind in dem Spektrum keine Banden beobachtbar, die auf einen direkten Beitrag des Proteins zu dem SERS-Spektrum hinweisen. Das Protein ist im Vergleich zu dem kovalent an die Oberfläche gebundenen Raman-Reporter ein wesentlich schlechterer SERS-Streuer (Abschn. 2.9). Insgesamt zeigt die ν(C=C)-Bande eine Rotverschiebung und die Ring-Breathing-Bande eine Blauverschiebung nach der Funktionalisierung, was indirekt auf die Anbindung des Proteins hinweisen könnte.

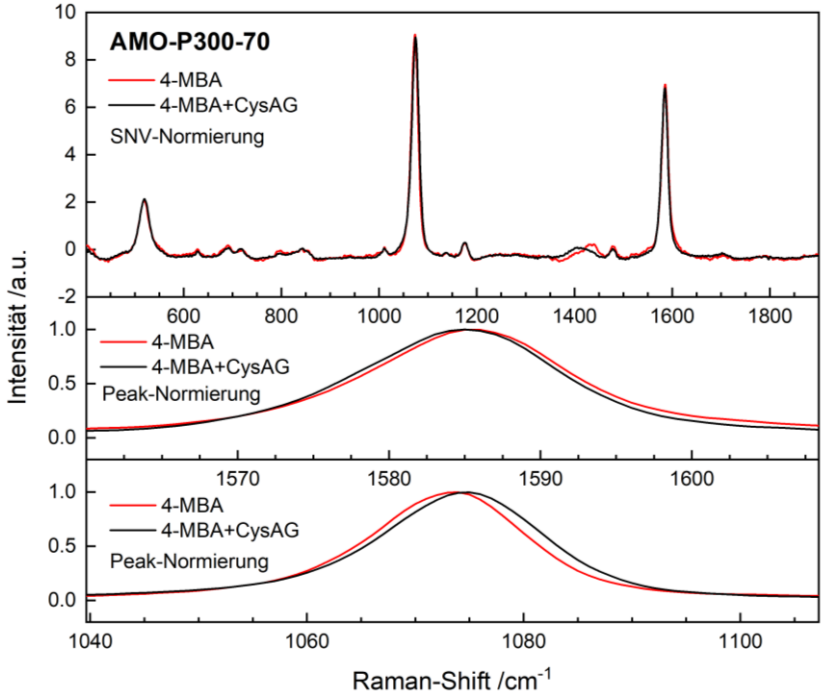

Abb. 55 SERS-Spektren der 4-MBA-Monolage vor und nach der Funktionalisierung mit dem Liganden CysAG. Die Spektren sind gemittelte Spektren aller Messpunkte mehrerer SERS-Chips.

2.10.3.7 Banden-Shift bei Adsorption von Verbindungen (Verunreinigungen)

Neben oben dargestellten Einflüssen auf die Monolage ist für die Herstellung eines Frequenz-Shift-Sensors insbesondere die Wirkung von oberflächengebundenen oder mit der Monolage wechselwirkenden Analyten, Zusatzstoffen und Verunreinigungen relevant. Eine Charge der AMO P300-70-Substrate (nachfolgend als AMO P300-70X bezeichnet) wies nach ihrer Fabrikation im SERS-Spektrum bereits Banden einer Verunreinigung auf, die sich durch Waschen mit Ethanol nicht entfernen ließ. Auf diesen Substraten wurde - wie in Abschn. 2.10.2 beschrieben - eine 4-MBA-Monolage hergestellt, die nun zusätzlich zu den 4-MBA-Banden auch die Störpeaks der Verunreinigung aufwies (Abb. 56 oben). Bei der Verunreinigung handelt es sich vermutlich um oberflächengebundenes Cyanid, auf das Banden bei 2135 cm^{-1} und 2178 cm^{-1} hinweisen (ν(C≡N) in Au(CN) und $[Au(CN)_2]^-$).[51]

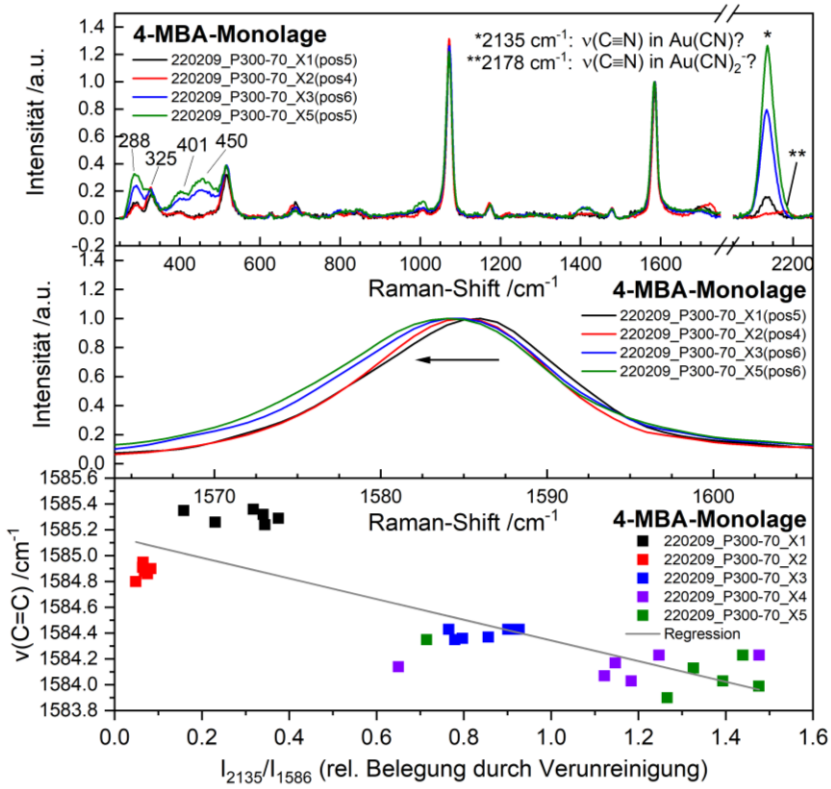

Abb. 56 Effekt einer bereits oberflächengebundenen Substanz auf die 4-MBA-Monolage.

Da bei den SERS-Messungen in der vorliegenden Arbeit ein großer Laserspot eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass 4-MBA und Verunreinigung bei der SERS-Messung gleichermaßen erfasst wurden. Zur Abschätzung des Grades der Verunreinigung wurde deshalb die relative Signalintensität der Bande bei 2135 cm^{-1} (Verunreinigung) im Verhältnis zur ν(C=C) Bande bei 1584 cm^{-1} (4-MBA) herangezogen. Eine Hauptkomponentenanalyse aller auf die Signalintensität der ν(C=C)-Bande bei 1584 cm^{-1} normierter Spektren zeigte in der ersten Hauptkomponente (erklärte Varianz: 96%), dass die Bandenposition der ν(C=C)-Bande von 4-MBA mit der Oberflächenkontamination korreliert (Abb. 61, Anhang). Abb. 56 Mitte illustriert den beobachtbaren Banden-Shift durch Vergrößerung des relevanten Bereichs des Raman-Spektrums. Die Korrelation zwischen dem relativen Anteil der unbekannten oberflächengebundenen Substanz und dem Peak-Shift (Δ_{max} ~ 1.4 cm^{-1}) der ν(C=C)-Bande ist für alle Spektren in dem Scatter-Plot in Abb. 56 unten dargestellt. Das Ergebnis bestätigt zunächst das Funktions-Prinzip eines Frequenz-Shift-Sensors, welcher auf die Bindung einer Substanz in Abhängigkeit der Konzentration mit einer Banden-Verschiebung reagiert. Bei sorgfältiger Kontrolle und Reinigung der Gold-Substrate (Abschn. 2.6) können produktionsbedinge Verunreinigungen minimiert werden. Die irreversible Bindung einer Substanz an die Oberfläche während des Funktionalisierungsprozesses ist jedoch auch möglich. Beispielsweise wurde bei der Aktivierung der Säuregruppe von 4-MBA durch EDC/NHS-Chemie bei einer hohen Konzentration der Reagenzien eine zusätzliche Bande bei 1760 cm^{-1} beobachtet, welche auf die Einlagerung von Spezies in die bestehende 4-MBA-Monolage hinweist (nicht gezeigt). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit moderate EDC/NHS-Konzentrationen eingesetzt (Abschn. 2.10.2).

2.10.3.8 Variation der Monolage und Chip-Statistik

Um Informationen über die Variation der SERS-Messungen zu erhalten, wurden alle Spektren der sukzessiven 4-MBA- und 4-MBA+CysAG-Funktionalisierung (14 SERS-Chips, je 6 Messpunkte) einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) unterzogen. Abb. 57 zeigt den Score-Plot der beiden Hauptkomponenten mit der größten erklärten Varianz PC1 (56%) und PC2 (9%), welche für die Analyse des Fingerprintspektrums im Bereich 400-1800 cm^{-1} erhalten wurden. PC1 unterscheidet alle Spektren der 4-MBA-Stufe von den Spektren der 4-MBA+CysAG-Stufe. Der Loadings-Plot von PC1 zeigt entsprechend Peak-Shifts für die ν(C=C)-, Ring-Breathing- und $\nu(COO^-)$-Bande (siehe auch Abschn. 2.10.3.6). Die zweite Hauptkomponente verdeutlicht, dass die Chip-Chip-Variation im Vergleich zur On-Chip-Variation überwiegt. Im Loadings-Plot korrelieren eine Abnahme von ν(C=O) sowie eine Zunahme von $\nu(COO^-)$ mit der Peak-Verbreiterung von ν(C=C) und der Ring-Breathing-Mode. Dies könnte eventuell mit Unterschieden in der Mikroumgebung (z. B. Feuchtigkeit, Temperatur etc.) der trocken gemessenen Proben zusammenhängen. Die Chip-Chip-Variation ist vermutlich nicht produktionsbedingt, da für ein Substrat (siehe Farbcodierung) die Koordinaten der 4-MBA- und 4-MBA+CysAG-Stufe entlang der PC2-Achse nicht korrelieren.

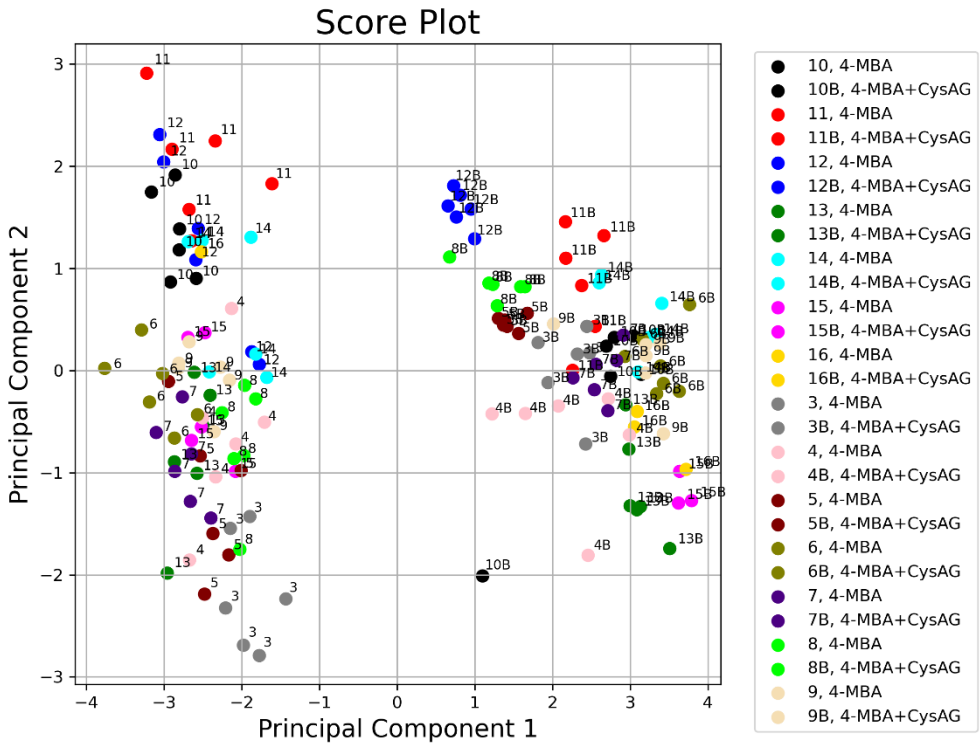

Abb. 57 Scatter-Plot der ersten beiden Hauptkomponenten für die 4-MBA- und 4-MBA+CysAG-Stufe.

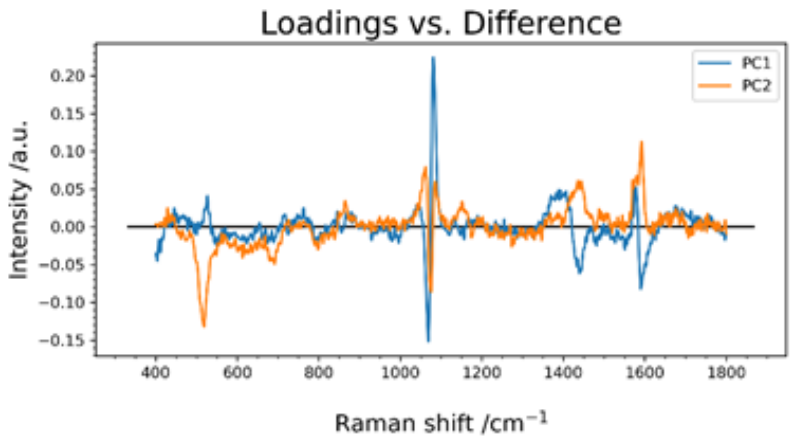

Abb. 58 Loadings-Plots der ersten beiden Hauptkomponenten.

Für die quantitative Bestimmung der mittleren On-Chip- sowie der Chip/Chip-Variabilität des zu entwickelnden Sensors wurde die Standardabweichung der Peak-Position und Bandenbreite für die ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande berechnet (Tab. 5). Insgesamt sind die Werte für die mittlere On-Chip-Variation kleiner als die der Chip/Chip-Variation. Das liegt möglicherweise daran, dass die funktionalisierten SERS-Chips in ihrer Beschaffenheit variieren oder die SERS-Chips nicht unter exakt gleichen Bedingungen gemessen wurden. Die für die sensorische Messung kritische Chip/Chip-Variabilität von 4-MBA+CysAG beträgt 0,23/0,33 cm^{-1} für die Peak-Position und 0,21/0,31 cm^{-1} für die Peak-Breite. Diese Werte sind für typische Shift-Spannen von 1-2 cm^{-1} relativ groß, aber mit Literaturwerten vergleichbar (siehe Diskussion).[50]

Tab. 5 Variabilität des SERS-Chips vor der Applikation des Analyten. Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD).

Peak-Position		**4-MBA**		**4-MBA+CysAG**	
		Peak (MW) /cm^{-1}	SD /cm^{-1}	Peak (MW) /cm^{-1}	SD /cm^{-1}
Mittlere On-Chip-Variation	ν(C=C) bei 1586 cm^{-1}	NA	0.11	NA	0,11
	Ring-Breathing bei 1074 cm^{-1}	NA	0.15	NA	0,11
Chip/Chip-Variation	ν(C=C) bei 1586 cm^{-1}	1585,53	0,16	1584,93	0,23
	Ring-Breathing bei 1074 cm^{-1}	1073,36	0,14	1074,56	0,33

Peak-Breite		**4-MBA**		**4-MBA+CysAG**	
		FWHM (MW) /cm^{-1}	SD /cm^{-1}	FWHM (MW) /cm^{-1}	SD /cm^{-1}
Mittlere On-Chip-Variation	ν(C=C) bei 1586 cm^{-1}	NA	0,24	NA	0,14
	Ring-Breathing bei 1074 cm^{-1}	NA	0,21	NA	0,18
Chip/Chip-Variation	ν(C=C) bei 1586 cm^{-1}	16,06	0,39	16,06	0,21
	Ring-Breathing bei 1074 cm^{-1}	17,08	0,40	17,77	0,31

2.10.4 Immuno-SERS-Assay: Vorexperiment

In Anlehnung an Kho et al.[39] wurde der oben beschriebene SERS-Sensor (hier basierend auf Gold-Substraten von Silmeco) im Hinblick auf seine Antwort auf eine Verdünnungsreihe von Zirabev® (Formulierung des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab) in 1x-PBS-Puffer im Konzentrationsbereich von 30 bis 240 nM untersucht. Die SERS-Substrate wurden für 5 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert, mit 1x-PBS-Puffer und Wasser gewaschen und anschließend direkt nach dem Trocknen im Stickstoffstrom mit dem Raman-Spektrometer gemessen. Abb. 59 stellt die ermittelten Banden-Parameter in einer Scatter-Plot-Matrix dar. Parameter, die sich deutlich mit der Konzentration ändern und die Proben im Scatterplot voneinander trennen, sind die Halbwertsbreiten der ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande (roter umrandeter Scatter-Plot). Die maximale Änderung zwischen der Blindprobe (1x PBS) und der Probe mit der maximalen Konzentration von Bevacizumab (240 nM) beträgt ~ 0.8 cm^{-1}. Die Peak-Positionen zeigen hingegen keinen eindeutigen Trend. Das Vorexperiment verdeutlicht, dass der Sensor in dem gewählten Konzentrationsbereich anspricht. Die maximal beobachtbare Auslenkung ist jedoch gering im Vergleich zu der On-Chip- sowie der Chip/Chip-Variabilität des Sensors (siehe auch Abschn. 2.10.3.8).

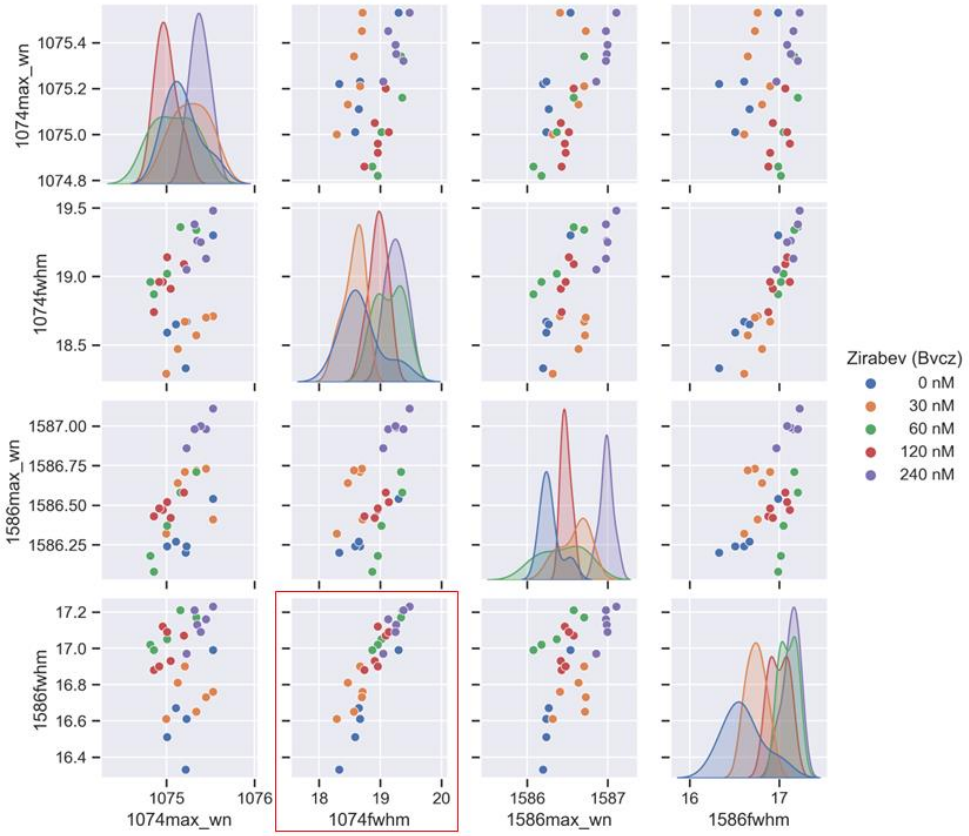

Abb. 59 Bandenparameter Peak-Position und Halbwertsbreite der Banden ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande in cm^{-1} für eine Verdünnungsreihe von Zirabev® (Formulierung von Bevacizumab).

2.10.5 Immuno-SERS-Assay: Hauptexperiment

Für den Immuno-SERS-Assay wurden 14 funktionalisierte SERS-Substrate (Abschn. 2.10.1), bestehend aus AMO-P300-70 als SERS-Substrat, 4-MBA als Reporter und Protein CysAG als Ligand eingesetzt. Es wurden folgenden Probelösungen untersucht:

- Analyten:
  - **Monomer-Fraktion (< 3% AGG)** aus MVASI®: 4; 9; 18; 36; 107 µg mL^{-1} (30; 60; 120; 240; 720 nM)
  - **Aggregat-Fraktion (~60% AGG)** aus MVASI®: 4; 9; 18; 36; 107 µg mL^{-1}
- Kontrolle:
  - 1x PBS-Puffer
  - BSA-Lösung (240 nM, 1x PBS)
  - Hilfsstoff-Lösung (HS, äq. zu 240 nM MVASI)

Die SERS-Substrate wurden für 8 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert, mit 1x-PBS-Puffer und Wasser gewaschen und anschließend direkt nach dem Trocknen im Stickstoffstrom mit dem Raman-Spektrometer gemessen. Zur Evaluation der SERS-Spektren wurden Bandenparameter der ν(C=C)- und Ring-Breathing-Bande herangezogen. In Abb. 60 sind die Parameter Halbwertsbreite (Mittelwert beider Banden) und Peak-Shift (1074 cm^{-1} Bande) für die Monomer-Fraktion (schwarz), die Aggregat-Fraktion (rot) und die Kontrolle (blau) aufgetragen. Die Proben bilden drei leicht überlappende Cluster,

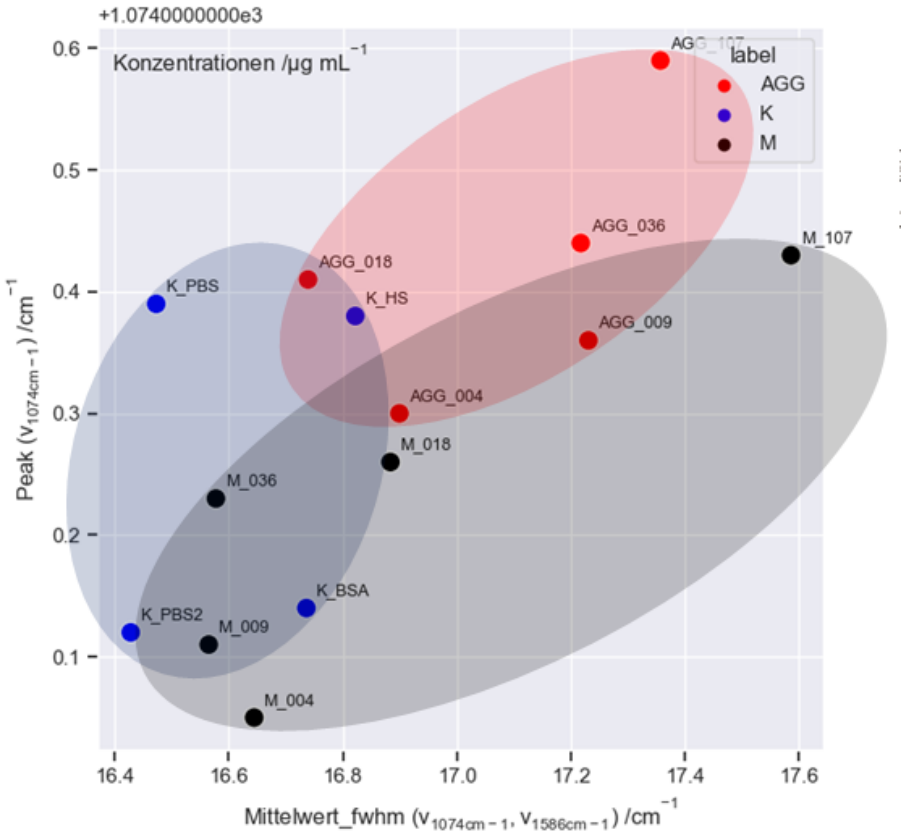

Abb. 60 Scatter-Plot der Bandenparameter für alle Proben des Immuno-SERS-Assays: Aggregate (rot), Antikörper (schwarz), Kontrolle (blau, PBS/PBS2: 1x-PBS-Puffer, HS: Hilfsstofflösung, BSA: Lösung von bovinem Serumalbumin). Numerische Labels bezeichnen die Konzentration in µg mL^{-1}.

über die sich Aggregat-Fraktion, Monomer-Fraktion und Kontrolle unterscheiden lassen. Sowohl Monomer-Fraktion als auch Aggregat-Fraktion zeigen tendenziell eine mit der Konzentration zunehmende Bandenbreite, welche sich maximal um $\Delta = 1\ cm^{-1}$ verbreitert. Somit zeigt der Immuno-SERS-Assay-Sensor eine spezifische Antwort auf Antikörper(aggregate). Die Banden-Verbreiterung scheint bei der Antikörper-Fraktion bereits bei niedrigen Konzentrationen deutlicher ausgeprägt zu sein als bei der Monomer-Fraktion. Prinzipiell sind Frequenz-Shift-Sensoren besonders effektiv, wenn unter der Bindung des Analyten viele Reportermoleküle der Monolage beeinflusst werden.[37] Eine Bandenverbreiterung ergibt sich möglicherweise durch statistisch verteilte Bereiche in der Monolage mit unterschiedlicher Beschaffenheit (z. B. gebundener Analyt/freie Monolage etc.). Die Anbindung des Aggregats könnte aufgrund seiner größeren Dimensionen einen stärkeren Effekt auf die Monolage ausüben. Aufgrund der geringeren Teilchenanzahl könnte somit insgesamt die Bandenverbreiterung forciert werden. Insgesamt sind die ermittelten Parameter stark gestreut (siehe auch Abschn. 2.10.3.8). Die beobachteten Tendenzen müssen mit größeren Datensätzen statistisch belegt werden.

3 Darstellung des durch die Förderung erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

3.1 Herstellung von Nanostrukturen

Der Ansatz zur Entwicklung einer plasmonischen Nanostruktur im Projekt beruht auf der Erzeugung eines streng periodischen Musters. Hierzu wurden numerische Berechnungen durchgeführt, die die Auswirkung der geometrischen Parameter auf die spektrale Lage des Streuungsmaximums der Nanostrukturen auf der Oberfläche definierten. Der Ansatz im Projekt sollte kompatibel sein mit den meisten Geräteplattformen auf dem Markt, um einen einfacheren Transfer in die Wirtschaft zu erreichen. Das Gros der Raman-Spektrometer, insbesondere der günstigeren Kategorie, verwendet Laserwellenlängen im Bereich von 785 nm. Entsprechend wurde die Oberfläche der SERS-Substrate für diese Wellenlänge ausgelegt. Vor diesem Hintergrund und aus den abgeleiteten Randbedingungen, wie z. B. Materialstabilität, wurde eine Materialkombination aus SiO_2-Träger und Au-Beschichtung für die Nanostrukturen ausgewählt. Die dielektrische Funktion der plasmonischen Au-Schicht wurde mit der Zielanregungswellenlänge der Raman-Plattform (785 nm) abgeglichen und entsprechende Berechnungen wurden durchgeführt. Danach erfolgte die Umsetzung bei AMO mittels lithographischer und halbleitertechnischer Verfahren. Erste Chips (K2-Substrate) zeigten zwar den SERS-Effekt, jedoch waren die Messungen auf diesen Substraten nicht reproduzierbar. Nach einer Fehleranalyse wurde ein zweiter Typ (P300-Substrate) von AMO gefertigt. Dieser zweite Chiptyp verfügte nach umfangreichen Optimierungsschritten über eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit und Verstärkung. Zusätzlich wurde ein SERS-Chip mit statistisch verteilten Nanostrukturen umgesetzt und mit den anderen periodischen Chips verglichen. Testmessungen wurden mit Thiophenol und 4-MBA durchgeführt. Beide Substanzen bilden auf der Au-Schicht auf den Nanostrukturen kovalent angebundene Monolagen, sodass sie sich zur Analyse der plasmonischen Funktion besonders eignen. Den Messungen mit 4-MBA kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da dieses Molekül als Vorbereitung für die nachfolgende Proteinanlagerung verwendet werden kann und sich somit dem Applikationsfall deutlich annähert. Die SERS-Funktion konnte im Verlaufe des Projektes bei 785 nm nachgewiesen werden und es konnte sogar der Beweis geführt werden, dass diese periodische Nanostrukturanordnung einer statistischen Anordnung in der Reproduzierbarkeit überlegen ist, so wie dies in der Antragsstellung angenommen wurde. Weiter konnte gezeigt werden, dass die SERS-Substrate bei einer applikationsnahen Belegung mit wenigen Molekülschichten unter Verwendung eines Sauerstoffplasmas gereinigt werden können. Auch dieser Aspekt erleichtert den Transfer der Ergebnisse in die Wirtschaft.

3.2 Direkte Proteindetektion

Ein Ziel war die direkte Detektion von Proteinen sowie Änderungen ihrer höheren Struktur mittels nanostrukturierter Substrate nachzuweisen. Es wurden verschiedene Sampling-Methoden untersucht und Vergleichsmessungen mit relevanten Molekülen vorgenommen.

Mit AMO-P30-70-Substraten konnten SERS-Spektren von Proteinen aufgenommen werden, wenn Immersion als Sampling-Methode verwendet wurde. Die SERS-Spektren zeigten jedoch ein geringes Signal/Untergrund-Verhältnis (< 0,5%), welches für den praktischen Einsatz und die strukturelle Unterscheidung von Proteinen unzureichend erschien. Für das geringe Signal/Untergrund-Verhältnis sind vermutlich mehrere Faktoren verantwortlich. Trotz struktureller Ähnlichkeit weisen kleine

aromatische Moleküle wie 4-MBA und 1H-Benzotriazol ein gutes Signal/Untergrund-Verhältnis (~0,5/1) auf, aromatische Aminosäuren hingegen ein schlechtes (< 1%). Dies kann einerseits mit dem Fehlen einer kovalenten Bindung an die Goldoberfläche und somit einer fehlenden chemischen Verstärkung (EF ~100) erklärt werden, andererseits mit einer schlechteren Organisation der Monolage. Im Rahmen der Untersuchungen wurden deshalb Proteine wie in der Literatur beschrieben über ein Cystein-Tag kovalent an die Oberfläche gebunden. Dies konnte jedoch das Signal/Untergrund-Verhältnis (< 0,5%) nicht verbessern (aromatische Aminosäuren machen nur einen Bruchteil im Protein aus).
Als Alternative zu SERS wurde DCDR mit nicht-verstärkenden Goldsubstraten untersucht. Die Messtechnik eignet sich für die gegebene Fragestellung gut, da sie auch bei typischen Analytkonzentrationen von Antikörper-Infusionen (~ 1 mg mL^{-1}) angewandt werden kann. In Vorexperimenten wurden so Strukturänderungen bei der Aggregation von Lysozym detektiert. Ähnlich wurden deutliche Strukturänderungen bei der Bildung von unlöslichen Fibrillen in UV-gestressten Antikörperlösungen beobachtet. DCDR-Spektren von Antikörperlösungen mit hohem Anteil löslicher Aggregate konnten von solchen mit niedrigem Aggregat-Anteil mit Hilfe einer Faktoranalyse unterschieden werden. Die Unterschiede in den DCDR-Spektren waren jedoch subtil.

3.3 Indirekte Detektion von Antikörpern und ihren Aggregaten mit SERS

Ziel dieser Untersuchungen war die Herstellung eines Immuno-SERS-Sensors für die indirekte Detektion von Antikörper-Aggregaten mit SERS basierend auf dem *Frequency-Shift-SERS*-Prinzip. Es konnte gezeigt werden, dass mit AMO-P300-70 Nanostrukturen und einem Raman-Spektrometer mit großem Laser-Spot gleichförmige SERS-Spektren von 4-MBA-Monolagen gemessen werden können. Dies stellt die Voraussetzung für den Aufbau von Frequenz-Shift-Sensoren auf Basis des Reporter-Moleküls 4-MBA dar. Für die Auswertung der SERS-Spektren wurde ein Datenanalyse-Workflow in der Programmiersprache Python entwickelt, der es erlaubt, einerseits Banden-Parameter zu extrahieren, andererseits die Spektren multivariat zu analysieren. Der Immuno-SERS-Sensor wurde über eine 2-stufige Funktionalisierung der Goldsubstrate aufgebaut und der Herstellungsprozess schrittweise mit SERS-Spektroskopie verfolgt. In systematischen Experimenten wurden Einflussfaktoren untersucht, die einerseits die Funktionsweise eines solchen Frequenz-Shift-Sensors bestätigen, andererseits die Evaluation des Sensors stören können. Die 4-MBA-Monolage ist empfindlich gegenüber Faktoren wie Laserleistung, pH-Wert, Lösungsmittel sowie Verunreinigungen, was eine strenge Kontrolle der experimentellen Bedingungen erforderlich macht. Dabei erwiesen sich die ν(C=C)- und die Ring-Breathing-Schwingung als sensible Indikatoren des Zustands der 4-MBA-Monolage. Die partielle Belegung (Verunreinigung) der Gold-Substrate mit einer unbekannten Verbindung (vermutlich Cyanid-Spezies) führte bei der nachfolgenden Herstellung der 4-MBA-Monolage zu Frequenz-Shifts in Abhängigkeit des Belegungsgrades. Somit konnte das Frequenz-Shift-Prinzip für auf dem SERS-Chip adsorbierte Substanzen demonstriert werden.
Die Funktionsweise des Immuno-SERS-Sensors wurde mit Konzentrationsreihen nativer/gestresster Antikörperlösungen im nM-Konzentrationsbereich untersucht. Der Sensor spricht selektiv und in Abhängigkeit von der Analytkonzentration auf die Bindung von Antikörperlösungen an. Wesentliche Änderung in den SERS-Spektren ist dabei die Verbreiterung der ν(C=C)- und der Ring-Breathing-Bande. Zudem konnte tendenziell eine Clusterung von Proben mit hohem/niedrigem Aggregat-Anteil beobachtet werden. Die Streuung der Messwerte ist jedoch relativ groß und aufgrund der geringen Datenmenge nicht signifikant. Eine Bestimmung des Aggregat-Anteils auf wenige Prozent genau, wie

es mit Größenausschluss-Chromatographie möglich ist, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich.

In der Literatur wurde das *Frequency-Shift-SERS*-Prinzip bereits mit unterschiedlichen Raman-Reportern, Liganden und Analyten untersucht.[37] Als Immuno-SERS-Assays fungierende Sensoren weisen typischerweise einen Antikörper als Ligand auf.[39–41] Als Reportermolekül werden funktionalisierbare aromatisch gebundene Thiolgruppen verwendet wie 4-Aminothiophenol (4-ATP), Mercaptopurin (6-MP), DSNB (5,5-Dithiobis(succinimidyl-2-nitrobenzoat)) und das im Rahmen des Projektes verwendete 4-MBA. Bei den Aryl-basierten Sensoren ist die beobachtete und für die Evaluation verwendete Veränderung des Spektrums, z. B. Banden-Shifts einer/mehrerer Banden, Verbreiterung der Banden, das Ausmaß der Shifts etc. in jeder Publikation unterschiedlich. M. Olivo erwartet dies bei unterschiedlichen Reporter/Ligand/Analyt-Systemen.[40] Gemeinsam ist ihnen jedoch eine relativ große Schwankung der Bandenparameter, sodass solche Sensoren bisher vermutlich eher als Proof-of-Concept dienen.[40,50]

Mit der Frequenz-Shift-Technik wird in der Regel pro Reporter/Ligand-System ein Analyt adressiert. Im vorliegenden Projekt sollten mit den 4-MBA+CysAG-funktionalisierten Gold-Substraten Antikörperaggregate neben Antikörpermonomeren in therapeutischen Proteinlösungen detektiert werden. Eine einzelne Studie konnte mit dem Frequenz-Shift-Prinzip Aggregate nachweisen, wobei hier Peptide zunächst auf einem Substrat immobilisiert und erst nachträglich thermisch zur Aggregation gebracht wurden.[52] Dies ist mit der analytisch relevanteren Vorgehensweise im Rahmen dieses Projektes nicht vergleichbar. Es bleibt festzuhalten, dass solche Sensoren vielversprechend für die Detektion von Analyten im Nano- bzw. Picomol-Bereich sind.[37]

Eine große Herausforderung der Frequenz-Shift-Technik stellt wie oben erwähnt die Schwankung der für die Evaluation verwendeten Bandenparameter dar. Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Stabilität des Raman-Spektrometers bestimmt (< 0,13 cm^{-1}) sowie eine Chip-Statistik für den Sensor ohne Analyt durchgeführt (Chip/Chip-Variation für Peak-Position und Peak-Breite ~0,2-0,3 cm^{-1}). Die Variation ist im Vergleich zu typischen Banden-Shifts von 1-2 cm^{-1} relativ groß. Andere Forschungsgruppen berichten eine empirische Spektrometer-Stabilität von 0,03 cm^{-1}, wobei Instrumenten-Hersteller sogar noch niedrigere Werte angeben (0,022 cm^{-1}).[42] Die Spektrometer-Stabilität scheint im Rahmen unserer Untersuchungen jedoch nicht den limitierenden Faktor darzustellen. Vermutlich sind Unterschiede in den Mikroumgebungen der Substrate für die relativ große Chip/Chip-Variation verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Substrate aus praktischen Gründen (größeres Signal etc.) nach Immersion in der Antikörperlösung und Waschen in Puffer und Wasser trocken gemessen. Messungen unter stabileren Bedingungen wie in einer Puffer-Lösung waren am Ende des Projekts nicht mehr möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden wesentliche Entwicklungsschritte für die Herstellung von *Frequency-Shift-SERS*-Sensoren basierend auf nanostrukturierten Substraten erarbeitet. Folgeprojekte und eine wirtschaftliche Nutzung sind denkbar. In zukünftigen Projekten müsste der Fokus noch stärker auf der Kontrolle der Substrat-Reproduzierbarkeit, der Funktionalisierung und der Stabilisierung der Messbedingungen liegen.

4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines SERS-Sensors für die Bestimmung der Sekundär-/Tertiärstruktur und damit Funktionalität von Proteinen in niedrigkonzentrierten Lösungen. Als Applikation wurde die Detektion von Antikörperaggregaten in Formulierungen (Infusionen) monoklonaler Antikörper für die Qualitätssicherung in Apothekenverbünden angestrebt. Als spezielles Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann zusammengefasst werden, dass der entwickelte SERS-Sensor spezifisch und quantitativ auf monoklonale Antikörper/Antikörperaggregate im nM-Konzentrationsbereich anspricht. Aufgrund der geringen Menge an Sensoren, die im Rahmen der Projektlaufzeit hergestellt und getestet wurden, konnte nur die Sensor-Funktion gezeigt, jedoch aber keine umfassende Statistik durchgeführt werden. Die tendenziell unterscheidbare Antwort des Sensors auf Antikörperlösungen mit hohem (60%) und niedrigem (< 3%) Aggregat-Anteil, welche die Detektion von fehlerhaften Medikamenten erlauben könnte, müsste in weiteren Untersuchungen geprüft werden und könnte bei ihrer Bestätigung zu einer Weiterentwicklung der Sensor-Technologie genutzt werden. Auf der aktuellen Stufe kann diese Technologie nicht kommerziell eingesetzt werden und wird bezüglich der Nachweisgrenze vermutlich auch nach weiterer Optimierung nicht das Niveau einer LC-SEC-Methode erreichen können (siehe unten).

Im Rahmen des Projektes wurden Teilergebnisse erarbeitet, die darüber hinaus einen wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzen für KMU darstellen. Die auf Basis der Laserinterferenzlithographie hergestellten Gold-Nanoantennen zeigen deutliche Verstärkungseffekte für die Messung von SERS-Spektren kleiner (oberflächengebundener) aromatischer Moleküle mit Hilfe eines einfachen, kommerziellen Raman-Systems mit großem Laserspot. Aufgrund der periodischen Nanostruktur weisen diese Substrate gleichförmige, reproduzierbare SERS-Spektren auf. Diese lassen sich insbesondere für die Detektion und Quantifizierung kleiner aromatischer Moleküle (intensitätsbasiertes Verfahren) oder für die Anwendung der *Frequency-Shift-SERS*-Technik einsetzen (siehe unten). Funktionalisierte oder gebrauchte Substrate lassen sich zudem mit Hilfe eines Sauerstoff-Plasmas reinigen (kovalente SAM eines SERS-Reporters, mehrere Proteinlagen), sodass Hinweise auf ihre Wiederverwertbarkeit gegeben sind.

Zudem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das in Deutschland bisher noch nicht verbreitete Sensor-Konzept *Frequency-Shift-SERS* untersucht. Dieses innovative Sensorkonzept verwendet nicht die Raman-Streuintensität als Messgröße, sondern den Banden-Shift eines oberflächengebundenen Raman-Reporters. Dadurch ist diese Technik nicht abhängig von der Reproduzierbarkeit der SERS-Signalintensität, was oftmals die Limitation bei intensitätsbasierten Verfahren darstellt. Insgesamt konnte das Frequenz-Shift-Prinzip mit den o. g. SERS-Substraten sowohl für die in der vorliegenden Arbeit avisierte spezifische Bindung von Antikörpern/Aggregaten als auch für verschiedene Einflussgrößen nachgewiesen werden, darunter pH-Wert, Lösungsmittel sowie oberflächengebundene Spezies. Darüber hinaus wurde ein Datenanalyse-Workflow für die parametrische und multivariate Datenanalyse erarbeitet, der unterstreicht, dass die mit o. g. Substraten aufgenommenen SERS-Spektren gleichförmig genug für eine solche Datenanalyse sind. Aktuelle Limitationen wie eine relativ große Schwankung der Banden-Parameter im Verhältnis zu dem maximal erreichbaren Banden-Shift können künftig technisch optimiert werden. Insgesamt ergibt sich hiermit ein großes Potential für die Entwicklung neuer Sensoren auf Basis der o. g. Nano-Antennen und des *Frequenz-Shift*-Prinzips.

Für die Herstellung von Antikörperaggregaten in Antikörperformulierungen wurde eine effektive, kostengünstige Methode entwickelt. Die Bestrahlung von Antikörperformulierungen mit UV_{280}-Strahlung führt innerhalb von wenigen Stunden zu hohen Antikörperkonzentrationen (> 20%), wobei die entstehenden, löslichen Aggregate auf einer Zeitskala von Tagen stabil sind. Es wurde eine 3D-gedruckte UV-Stresszelle auf Basis einer UV-LED implementiert, die als kostengünstige Methode zur Herstellung von Aggregaten (evtl. auch von anderen Proteinen/Peptiden) für die Methodenentwicklung genutzt werden kann.

Von den hier erzielten Ergebnissen profitieren wirtschaftlich in erster Linie mittelständisch geprägte Hersteller aus dem Bereich der Materialwissenschaften. Jene können zum einen von der Weiterentwicklung und den systematischen Untersuchungen des *Frequency-Shift*-Ansatzes partizipieren. Dieses Verfahren ermöglicht es monoklonale Antikörper in einem sehr einfachen und kostengünstigen Bindungsassay zu detektieren und ist daher für diese Unternehmen bedeutsam. Ebenso können Gerätehersteller die hier gewonnenen Erkenntnisse nutzen, um die ermittelten Anforderungen an leistungsstarke low-cost Raman-Detektoren zu prüfen und in weiteren Entwicklungsplänen zu berücksichtigen.

5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Informationen der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder entstammen vor-wiegend den Branchen der Analysen- und Labortechnik. Während der Projektlaufzeit wurden vier Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt.

5.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA

Während der Projektlaufzeit konnten aufgrund der SARS-CoV-2-Pandemie Unternehmen nicht gezielt auf nationalen Fachtagungen und Messen angesprochen werden. Alle fachspezifischen Veranstaltungen wurden in den Jahren 2020/2021 abgesagt und sollen in den Jahren 2022 und 2023 nachgeholt werden. Die Informationen sollen daher nach bereits erfolgtem Projektabschluss in diesem, als auch im nächsten Jahr auf diesen Veranstaltungen präsentiert werden. Alternativ wurden on-line Veranstaltungen zur Ansprache und zur Präsentation von Projektinhalten und Ergebnissen genutzt.
Als weitere Maßnahme wurden ebenfalls zahlreiche on-line Beratungsgespräche innerhalb der Projektlaufzeit umgesetzt.

5.3 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte hauptsächlich in Form von Vorträgen auf online Veranstaltungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen können der in Tabelle Tab. 6 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

5.4 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass viele der für 2020/2021 geplanten Transfermaßnahmen nicht wie geplant durchgeführt werden konnten. Aufgrund der Corona-Krise wurden viele Messen, Tagungen und Kongresse zunächst verschoben bzw. für das laufende Jahr komplett abgesagt. Einzelne Maßnahmen wurden im ersten Halbjahr 2020 aber bereits umgesetzt, diese sind in Tab. 6 dargestellt. Die Durchführung weiterer in der Tab. 6 spezifizierten Maßnahmen wird derzeit angestrebt, jedoch bleibt die Umsetzung aufgrund einer weiterhin angespannten Infektionslage ungewiss.

Tab. 6: Auflistung aller durchgeführten sowie aller über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
05.11.2019	Vortrag	Vorstellung des Projektes im Rahmen des 2. ZytostatikaTags am IUTA in Duisburg.
15.11.2019	Vortrag	Vorstellung des Projektes im Rahmen einer Fortbildungsveranstaltung zum Sicheren Umgang mit Zytostatika bei der Fa. Berner International in Hamburg
10.03.2020	Erste Sitzung des PBA	Es erfolgte eine Vorstellung des Projektes sowie bisheriger Arbeiten auf dem Gebiet der Proteinanalytik mit Gastvorträgen zum Stand der Technik.
24.09.2020	Vortrag	Vorstellung des Projektes im Rahmen des ZIM-Netzwerks LocaSenz
11.11.2020	Vortrag	Vorstellung des Projektes im Rahmen einer Fortbildungsveranstaltung zum Sicheren Umgang mit Zytostatika des IUTA e. V. in Duisburg
10.12.2020	Zweite Sitzung des PBA	Es erfolgte eine Vorstellung der ersten Projektergebnisse mit Gastvorträgen zu weiteren projektrelevanten Themen.
30.06.2021	Dritte Sitzung des PBA	Vorstellung weiterer Projektergebnisse mit Gastvorträgen zu weiteren innovativen Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen u. a. auf Basis von Raman.
05.10.2021	Vortrag	Im Rahmen eines online-Seminars zum Thema „Herausforderungen und Lösungsansätze in der BioLC“, das die Fa. YMC Europe und die Fa. PSS Polymer Services veranstalteten, wurden Projektergebnisse präsentiert.
24.02.2022	Vierte Sitzung des PBA	Vorstellung der finalen Projektergebnisse mit Gastvorträgen zu weiteren innovativen Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen.
Datum/Zeitraum	**Maßnahmen nach Projektende**	**Erläuterung**
27/28.09.2022	Vortrag	Präsentation der Ergebnisse im Rahmen des zweiten Bio-LC-Seminars der Firmen YMC Europe und PSS Polymer Services.
Januar 2023	Publikation	Veröffentlichung von Teilergebnissen in „Analytical and Bioanalytical Chemistry“.
11-14.04.2023	Vortrag	Teilergebnisse werden auf der Anakon in Wien, einer deutschsprachigen Fachmesse, präsentiert.
August 2022	Seminar/Vortrag	Öffentliches Doktorandenseminar der RWTH
September 2022	Poster & Publikation	Eine Präsentation der Ergebnisse wird auf der MNE 2022 gezeigt werden. Danach wird das Thema als Publikation eingereicht.

5.5 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden die Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtungen zahlreiche Maßnahmen unternommen wurden und auch zukünftig unternommen werden, um eine breite Öffentlichkeit zu erreichen. Das Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. verfügt über ein großes interdisziplinäres wissenschaftliches Netzwerk und arbeitet im Rahmen von Innovationsprogrammen als auch im Bereich der Qualitätskontrolle von Pharmazeutika eng mit kleinen und mittleren Unternehmen zusammen.

Es wird angestrebt, im Rahmen einer weiteren FuE-Maßnahme die hier erzielten Erkenntnisse zu vertiefen, um der technischen Entwicklung eines Demontrators näher zu kommen. Es konnten innerhalb dieses Forschungsvorhabens wichtige Erkenntnisse getroffen werden, die als Grundlage für markorientierte Forschungsbestrebungen (z. B. über INNO-KOM MF) genutzt werden können. Aufgrund der teils langjährigen Erfahrungen und Arbeiten in Kooperation mit KMU besteht hier ein ausgezeichnetes Netzwerk, das eine optimale Unterstützung bei weiteren Forschungsbestrebungen bietet.

Abschließend ist zu konstatieren, dass das ursprüngliche Transferkonzept in weiten Teilen entsprechend der im ursprünglichen Forschungsantrag dargelegten Strategie nicht umgesetzt werden konnte, da aufgrund der Corona-Krise zahlreiche Veranstaltungen ersatzlos gestrichen wurden. Es wird daher nach Möglichkeit angestrebt den Transfer der Ergebnisse nach Projektabschluss zu intensivieren – unter dem Vorbehalt möglicher coronabedingter Terminänderungen bzw. Absagen.

6 Verwendete Zuwendungen

6.1 Forschungsstelle I (IUTA e. V.)

6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Es wurden Angestellte mit wiss. Ausbildung (HPA-A) über 25,70 Personenmonate eingesetzt.

6.1.2 Geräte (Einzelsatz B des Finanzierungsplans)

1 Stück Raman-Spektrometer (785 nm)

6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

entfällt

6.2 Forschungsstelle II (AMO)

6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden Angestellte mit wiss. Ausbildung (HPA-A) über 27,91 Personenmonate wie geplant eingesetzt.

6.2.2 Geräte (Einzelsatz B des Finanzierungsplans)

1 Stück Ultimaker 3 3D-Drucker

6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

entfällt

7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag, d. h. die geleisteten Arbeiten waren für den Projekterfolg notwendig und angemessen.

Literaturverzeichnis

(1) Frieß, W.; Ruberg, E.-M. Proteinarzneistoffe: Sensibel und stressanfällig. *Pharmazeutische Zeitung online* No. 50/2011, https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-502011/sensibel-und-stressanfaellig/ (accessed 2022-05-20).

(2) Schiffter-Weinle, H. A. Damit Nichts Bricht. *DAZ.online* **2016**, No. 40/2016, https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2016/daz-40-2016/damit-nichts-bricht (accessed: 2022-05-31).

(3) Makki, A. A.; Bonnier, F.; Respaud, R.; Chtara, F.; Tfayli, A.; Tauber, C.; Bertrand, D.; Byrne, H. J.; Mohammed, E.; Chourpa, I. Qualitative and Quantitative Analysis of Therapeutic Solutions Using Raman and Infrared Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2019**, *218*, 97–108. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.056.

(4) Wen, Z. Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, *96* (11), 2861–2878. https://doi.org/10.1002/jps.20895.

(5) Seite „Gauß-Strahl“. *In Wikipedia – Die freie Enzyklopädie*; Bearbeitungsstand: 4. Februar 2022, 20:19 UTC. URL: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Gau%C3%9F-Strahl&oldid=219872728 (accessed: 2022-08-09).

(6) Suzaki, Y.; Tachibana, A. Measurement of the Mm Sized Radius of Gaussian Laser Beam Using the Scanning Knife-Edge. *Appl. Opt., AO* **1975**, *14* (12), 2809–2810. https://doi.org/10.1364/AO.14.002809.

(7) *Spectral Response Correction: The Effect of Etaloning*. AZoM.com. https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=14009 (accessed 2020-12-20).

(8) *Optical Etaloning in Charge Coupled Devices - Andor Learning Centre*. Oxford Instruments. https://andor.oxinst.com/learning/view/article/optical-etaloning-in-charge-coupled-devices (accessed 2020-12-20).

(9) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G.; Meyer, M. Enhancement Factor Distribution around a Single Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spot and Its Relation to Single Molecule Detection. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (20), 204701. https://doi.org/10.1063/1.2390694.

(10) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Phenomenological Local Field Enhancement Factor Distributions around Electromagnetic Hot Spots. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130* (18), 181101. https://doi.org/10.1063/1.3138784.

(11) Etchegoin, P. G.; Le Ru, E. C. Basic Electromagnetic Theory of SERS. In *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*; Schlücker, S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010; pp 1–37. https://doi.org/10.1002/9783527632756.ch1.

(12) Lieber, C. A.; Mahadevan-Jansen, A. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra: *Applied Spectroscopy* **2016**. https://doi.org/10.1366/000370203322554518.

(13) McAvan, B. S.; Bowsher, L. A.; Powell, T.; O’Hara, J. F.; Spitali, M.; Goodacre, R.; Doig, A. J. Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (15), 10381–10389. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00627.

(14) Schöneich, C. Photo-Degradation of Therapeutic Proteins: Mechanistic Aspects. *Pharm Res* **2020**, *37* (3), 45. https://doi.org/10.1007/s11095-020-2763-8.

(15) Zhao, Z.; Poojary, M. M.; Skibsted, L. H.; Lund, M. N. Cleavage of Disulfide Bonds in Cystine by UV-B Illumination Mediated by Tryptophan or Tyrosine as Photosensitizers. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (25), 6900–6909. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01760.

(16) Zhao, Z.; Engholm-Keller, K.; Poojary, M. M.; Boelt, S. G.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Skibsted, L. H.; Davies, M. J.; Lund, M. N. Generation of Aggregates of α-Lactalbumin by UV-B Light Exposure. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (24), 6701–6714. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00757.

(17) Zhao, Z.; Li, R.; Poojary, M. M.; Nielsen, S. B.; Lund, M. N. Effect of Addition of Tryptophan on Aggregation of Apo-α-Lactalbumin Induced by UV-Light. *Foods* **2021**, *10* (7), 1577. https://doi.org/10.3390/foods10071577.
(18) Seite „Größenausschluss-Chromatographie“. *In: Wikipedia – Die freie Enzyklopädie*; Bearbeitungsstand: 24. Mai 2022, 12:04 UTC. URL: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Gr%C3%B6%C3%9Fenausschluss-Chromatographie&oldid=223127975 (accessed: 2022-08-09).
(19) Li, Y.; Polozova, A.; Gruia, F.; Feng, J. Characterization of the Degradation Products of a Color-Changed Monoclonal Antibody: Tryptophan-Derived Chromophores. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (14), 6850–6857. https://doi.org/10.1021/ac404218t.
(20) Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **1995**, *4* (11), 2411–2423. https://doi.org/10.1002/pro.5560041120.
(21) Christou, Konstantin. Markierungsfreie Proteinanalytik mit oberflächenverstärkter Ramanspektroskopie. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, 2009.
(22) Ortiz, C.; Zhang, D.; Xie, Y.; Ribbe, A. E.; Ben-Amotz, D. Validation of the Drop Coating Deposition Raman Method for Protein Analysis. *Analytical Biochemistry* **2006**, *353* (2), 157–166. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.025.
(23) Zhang, D.; Xie, Y.; Mrozek, M. F.; Ortiz, C.; Davisson, V. J.; Ben-Amotz, D. Raman Detection of Proteomic Analytes. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (21), 5703–5709. https://doi.org/10.1021/ac0345087.
(24) Zhang, D.; Mrozek, M. F.; Xie, Y.; Ben-Amotz, D. Chemical Segregation and Reduction of Raman Background Interference Using Drop Coating Deposition. *Appl Spectrosc* **2004**, *58* (8), 929–933. https://doi.org/10.1366/0003702041655430.
(25) Dolui, S.; Mondal, A.; Roy, A.; Pal, U.; Das, S.; Saha, A.; Maiti, N. C. Order, Disorder, and Reorder State of Lysozyme: Aggregation Mechanism by Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (1), 50–60. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b09139.
(26) Zhang, C.; Springall, J. S.; Wang, X.; Barman, I. Rapid, Quantitative Determination of Aggregation and Particle Formation for Antibody Drug Conjugate Therapeutics with Label-Free Raman Spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1081*, 138–145. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.007.
(27) Ortiz, C.; Zhang, D.; Ribbe, A. E.; Xie, Y.; Ben-Amotz, D. Analysis of Insulin Amyloid Fibrils by Raman Spectroscopy. *Biophysical Chemistry* **2007**, *128* (2), 150–155. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.03.012.
(28) Kurouski, D.; Postiglione, T.; Deckert-Gaudig, T.; Deckert, V.; Lednev, I. K. Amide I Vibrational Mode Suppression in Surface (SERS) and Tip (TERS) Enhanced Raman Spectra of Protein Specimens. *Analyst* **2013**, *138* (6), 1665. https://doi.org/10.1039/c2an36478f.
(29) Kumamoto, Y.; Taguchi, A.; Smith, N. I.; Kawata, S. Deep UV Resonant Raman Spectroscopy for Photodamage Characterization in Cells. *Biomed. Opt. Express* **2011**, *2* (4), 927. https://doi.org/10.1364/BOE.2.000927.
(30) Bueno, J.; Long, D.; Kauffman, J. F.; Arzhantsev, S. Deep-Ultraviolet Resonance Raman (DUVRR) Spectroscopy of Therapeutic Monoclonal Antibodies Subjected to Thermal Stress. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (15), 7880–7886. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01606.
(31) Kurouski, D.; Van Duyne, R. P.; Lednev, I. K. Exploring the Structure and Formation Mechanism of Amyloid Fibrils by Raman Spectroscopy: A Review. *Analyst* **2015**, *140* (15), 4967–4980. https://doi.org/10.1039/C5AN00342C.
(32) Flynn, J. D.; Lee, J. C. Raman Fingerprints of Amyloid Structures. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (51), 6983–6986. https://doi.org/10.1039/C8CC03217C.
(33) Bee, J. S.; Stevenson, J. L.; Mehta, B.; Svitel, J.; Pollastrini, J.; Platz, R.; Freund, E.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. Response of a Concentrated Monoclonal Antibody Formulation to High Shear. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *103* (5), 936–943. https://doi.org/10.1002/bit.22336.

(34) Lee, J. M.; Park, H. K.; Jung, Y.; Kim, J. K.; Jung, S. O.; Chung, B. H. Direct Immobilization of Protein G Variants with Various Numbers of Cysteine Residues on a Gold Surface. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (7), 2680–2687. https://doi.org/10.1021/ac0619231.
(35) Prospec-Tany Technogene Ltd. *Protein Cys-A/G*. https://www.prospecbio.com/protein_cys_a-g (accessed 2022-06-15).
(36) Kudelski, A. Some Aspects of SERS Temporal Fluctuations: Analysis of the Most Intense Spectra of Hydrogenated Amorphous Carbon Deposited on Silver. *Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38* (11), 1494–1499. https://doi.org/10.1002/jrs.1799.
(37) Zhu, W.; Hutchison, J. A.; Dong, M.; Li, M. Frequency Shift Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Sensing: An Ultrasensitive Multiplex Assay for Biomarkers in Human Health. *ACS Sens.* **2021**, *6* (5), 1704–1716. https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00393.
(38) Ma, H.; Liu, S.; Zheng, N.; Liu, Y.; Han, X. X.; He, C.; Lu, H.; Zhao, B. Frequency Shifts in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Immunoassays: Mechanistic Insights and Application in Protein Carbonylation Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (15), 9376–9381. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02640.
(39) Kho, K. W.; Dinish, U. S.; Kumar, A.; Olivo, M. Frequency Shifts in SERS for Biosensing. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 4892–4902. https://doi.org/10.1021/nn300352b.
(40) Owens, P.; Phillipson, N.; Perumal, J.; O'Connor, G. M.; Olivo, M. Sensing of P53 and EGFR Biomarkers Using High Efficiency SERS Substrates. *Biosensors* **2015**, *5* (4), 664–677. https://doi.org/10.3390/bios5040664.
(41) Tang, B.; Wang, J.; Hutchison, J. A.; Ma, L.; Zhang, N.; Guo, H.; Hu, Z.; Li, M.; Zhao, Y. Ultrasensitive, Multiplex Raman Frequency Shift Immunoassay of Liver Cancer Biomarkers in Physiological Media. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 871–879. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06007.
(42) Zhu, W.-F.; Cheng, L.-X.; Li, M.; Zuo, D.; Zhang, N.; Zhuang, H.-J.; Xie, D.; Zeng, Q.-D.; Hutchison, J. A.; Zhao, Y.-L. Frequency Shift Raman-Based Sensing of Serum MicroRNAs for Early Diagnosis and Discrimination of Primary Liver Cancers. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (17), 10144–10151. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01798.
(43) Hiramatsu, H.; Osterloh, F. E. PH-Controlled Assembly and Disassembly of Electrostatically Linked CdSe−SiO_2 and Au−SiO_2 Nanoparticle Clusters. *Langmuir* **2003**, *19* (17), 7003–7011. https://doi.org/10.1021/la034217t.
(44) Capocefalo, A.; Mammucari, D.; Brasili, F.; Fasolato, C.; Bordi, F.; Postorino, P.; Domenici, F. Exploring the Potentiality of a SERS-Active PH Nano-Biosensor. *Front. Chem.* **2019**, *7*. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00413.
(45) Williams, A.; Flynn, K. J.; Xia, Z.; Dunstan, P. R. Multivariate Spectral Analysis of PH SERS Probes for Improved Sensing Capabilities. *Journal of Raman Spectroscopy* **2016**, *47* (7), 819–827. https://doi.org/10.1002/jrs.4910.
(46) Michota, A.; Bukowska, J. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of 4-Mercaptobenzoic Acid on Silver and Gold Substrates. *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, *34* (1), 21–25. https://doi.org/10.1002/jrs.928.
(47) Barca, G. M. J.; Bertoni, C.; Carrington, L.; Datta, D.; De Silva, N.; Deustua, J. E.; Fedorov, D. G.; Gour, J. R.; Gunina, A. O.; Guidez, E.; Harville, T.; Irle, S.; Ivanic, J.; Kowalski, K.; Leang, S. S.; Li, H.; Li, W.; Lutz, J. J.; Magoulas, I.; Mato, J.; Mironov, V.; Nakata, H.; Pham, B. Q.; Piecuch, P.; Poole, D.; Pruitt, S. R.; Rendell, A. P.; Roskop, L. B.; Ruedenberg, K.; Sattasathuchana, T.; Schmidt, M. W.; Shen, J.; Slipchenko, L.; Sosonkina, M.; Sundriyal, V.; Tiwari, A.; Galvez Vallejo, J. L.; Westheimer, B.; Włoch, M.; Xu, P.; Zahariev, F.; Gordon, M. S. Recent Developments in the General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152* (15), 154102. https://doi.org/10.1063/5.0005188.
(48) Liu, Y.; Yuan, H.; Fales, A. M.; Vo-Dinh, T. PH-Sensing Nanostar Probe Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS): Theoretical and Experimental Studies. *Journal of Raman Spectroscopy* **2013**, *44* (7), 980–986. https://doi.org/10.1002/jrs.4302.

(49) Scarpitti, B. T.; Morrison, A. M.; Buyanova, M.; Schultz, Z. D. Comparison of 4-Mercaptobenzoic Acid Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Methods for PH Determination in Cells. *Appl Spectrosc* **2020**, *74* (11), 1423–1432. https://doi.org/10.1177/0003702820950768.
(50) Apontti, L. J. Highly Sensitive SERS Immunosensor via Extrinsic Nano-Stress Sensing. Master's thesis, University of California, Riverside, 2018.
(51) Lauridsen, R. K.; Rindzevicius, T.; Molin, S.; Johansen, H. K.; Berg, R. W.; Alstrøm, T. S.; Almdal, K.; Larsen, F.; Schmidt, M. S.; Boisen, A. Towards Quantitative SERS Detection of Hydrogen Cyanide at Ppb Level for Human Breath Analysis. *Sensing and Bio-Sensing Research* **2015**, *5*, 84–89. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.07.002.
(52) Zhu, W.; Wang, Y.; Xie, D.; Cheng, L.; Wang, P.; Zeng, Q.; Li, M.; Zhao, Y. In Situ Monitoring the Aggregation Dynamics of Amyloid-β Protein Aβ42 in Physiological Media via a Raman-Based Frequency Shift Method. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1* (3), 814–824. https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00257.

Anhang

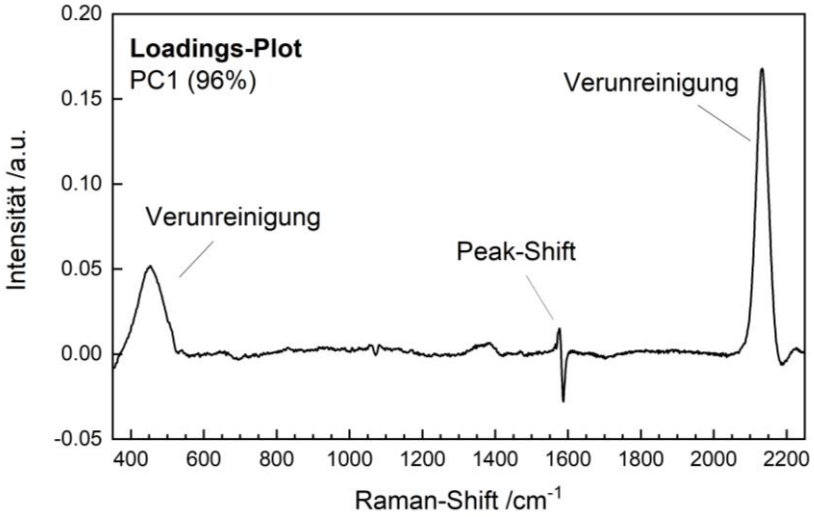

Abb. 61 Loadings-Plot der Hauptkomponente 1 zeigt, dass Oberflächenbelegung durch Verunreinigung und Banden-Shift der ν(C=C)-Bande von 4-MBA korrelieren.