

## Templatgesteuerte Synthese eines polymeren, Aminosäuresequenz-spezifischen Rezeptors\*\*

Jens U. Klein, Michael J. Whitcombe,  
Francis Mulholland und Evgeny N. Vulfson\*

Das Konzept des templatgesteuerten Zusammenbaus bei biologischen Systemen wurde erstmals von Linus Pauling vorgestellt, um die Funktionsweise des Immunsystems zu erklären.<sup>[1]</sup> Heute wissen wir, daß diese elegante Hypothese nicht zutrifft, doch das Prinzip der Verwendung eines Zielmoleküls, um dessen eigene Erkennungsstelle zu schaffen, wurde von Chemikern genutzt. Dies führte zur Herstellung künstlicher, polymerer Rezeptoren durch molekulares Imprinting.<sup>[2]</sup> Die entstandenen Materialien weisen Spezifitäten ähnlich denen polyklonaler Antikörper<sup>[3, 4]</sup> auf und binden Liganden mit nur einer Dissoziationskonstante.<sup>[4, 5]</sup> Die Erkennung der Sequenzen von Oligonucleotiden, -sacchariden oder -peptiden wird aber meistens als der eigentliche Test dafür angesehen, ob die künstlichen Antikörper mit ihren natürlichen Analoga Schritt halten können. Wir widmen uns hier dieser Fragestellung und beschreiben die Herstellung von Imprint-Polymeren, die spezifisch für Aminosäuresequenzen sind.

Mehrere Überlegungen wurden beim Design eines für diese Untersuchung geeigneten Oligopeptid-Templats<sup>[6]</sup> in Betracht gezogen: Erstens war ein relativ kurzes Peptid zu bevorzugen, damit dieses auch in der benötigten Menge mit konventionellen Methoden in Lösung synthetisiert werden konnte. Ein relativ kleines Peptid wurde auch wegen notwendiger chemischer Veränderungen sowie der Rückgewinnung und Charakterisierung des Templats bevorzugt. Zweitens würde es uns ein multifunktionelles Oligopeptid ermöglichen, durch Austausch innerhalb der Aminosäuresequenz den Beitrag einzelner Wechselwirkungen und funktioneller Gruppen zu prüfen. Ferner wäre eine Nettoladung von Null vorteilhaft, um mögliche Artefakte auszuschließen, die sich aus unspezifischen „Ionenaustauscher-artigen“ Wechselwirkungen zwischen dem Oligopeptid und dem Rezeptor ergeben. Schließlich sollte der Einbau eines aromatischen Aminosäurerests in die Sequenz die Analyse erleichtern. Es wurde eine Sequenz gewählt, die Lysin (Lys) und Aspartat (Asp) an den terminalen Stellen und einen sperrigen Tryptophan(Trp)-Rest in der Mitte enthält, womit alle oben genannten Anforderungen erfüllt waren.

Das Peptid Lys-Trp-Asp **1** wurde aus rein präparativen Gründen dem Peptid Asp-Trp-Lys vorgezogen. Das Zielmolekül **1** wurde über sieben Stufen in 13 % Gesamtausbeute hergestellt, durch konventionelle Kupplung aktivierter Ester mit geschützten Aminosäurevorstufen. Ein Teil des Tripeptids wurde weiter zum Templat verändert. Die Carboxygruppe

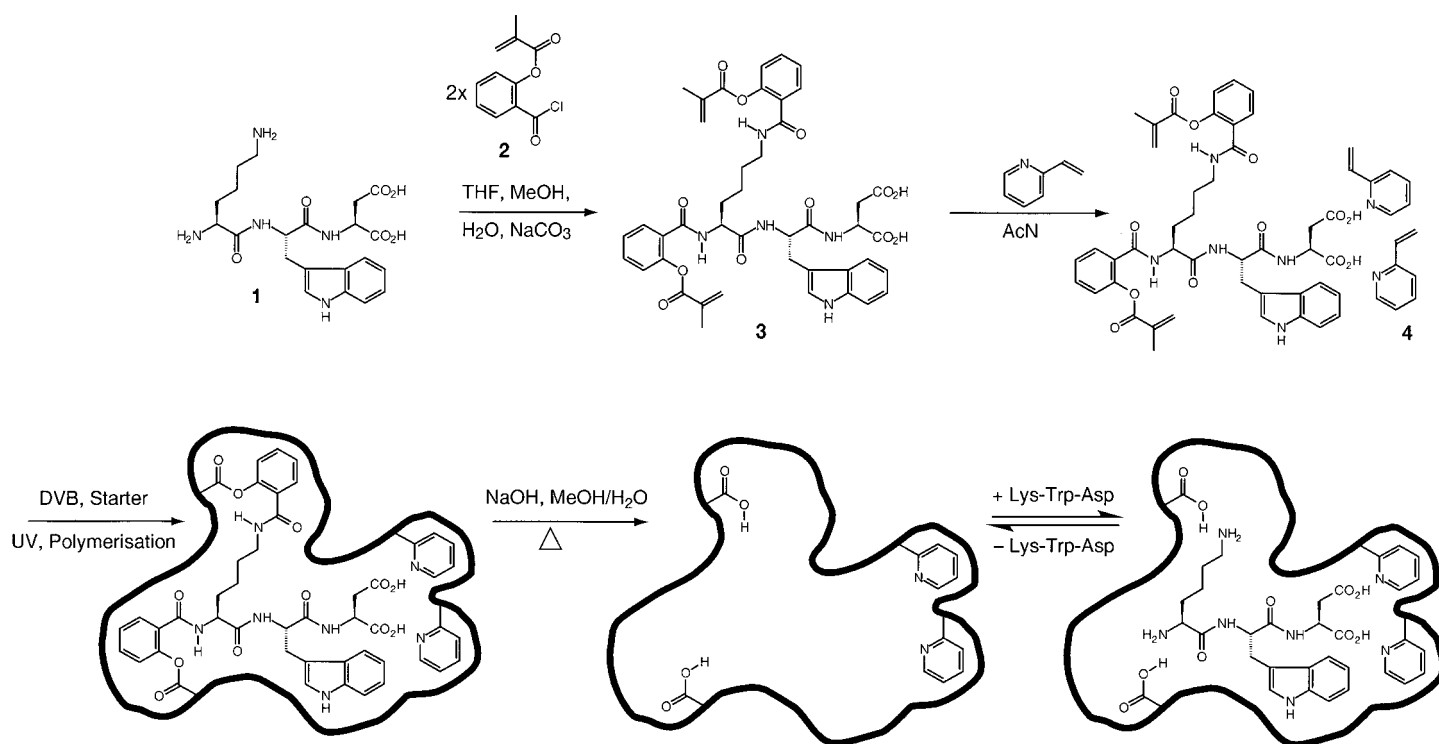
war die beste Wahl für eine Funktionalisierung, um mit den Aminogruppen des Lysinrestes in den Bindungsstellen des Polymers zu interagieren. Daher wurde das Tripeptid **1** mit 2-Methacryloyloxybenzoylchlorid<sup>[7]</sup> **2** zu **3** umgesetzt. Der wesentliche Punkt dieses Ansatzes ist die Anwesenheit einer relativ instabilen Esterbindung zwischen dem Methacrylsäurerest und der Hydroxybenzamid-Einheit. Deren Spaltung würde die Carboxygruppe genau in der richtigen räumlichen Anordnung belassen, um mit dem Zieltripeptid zu interagieren. Ebenso würde eine kleine Lücke im Polymer verbleiben, um die Ablösung des Templats und das Wiederaanbinden von **1** zu erleichtern (Schema 1).

Dieser einfache Ansatz ermöglichte es uns auch, die Carboxygruppen ausschließlich an den Erkennungsstellen zu positionieren, um dadurch unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Liganden und der polymeren Matrix selbst zu minimieren.<sup>[8]</sup> Die Carboxygruppen des Templats **3** wurden – wie in Schema 1 dargestellt – durch nichtkovalente Komplexierung mit 2-Vinylpyridin<sup>[9]</sup> **4** als Target erkannt. Um ein ausreichendes Maß an Komplexierung zu erreichen, wurde **4** in vierfachem molarem Überschuß gegenüber dem Templat **3** eingesetzt, und die Polymerisation wurde in Acetonitril durchgeführt. Die Wahl des Lösungsmittels wurde von der Löslichkeit des Templats mitbestimmt und der Notwendigkeit, H-Brücken-Wechselwirkungen zu stabilisieren, die für ein erfolgreiches Imprinting des Tripeptid-Templats unabdingbar waren. Dies war nicht nur wichtig, um die Bildung des Komplexes zwischen dem Templat **3** und dem Monomer **4** zu fördern, sondern auch, um durch intramolekulare H-Brücken die Konformation der *o*-Hydroxybenzamid-Spacer einzuschränken. Letzteres sollte dabei helfen, die Methacrylsäurereste exakt an der Polymer-Bindungsstelle zu positionieren.<sup>[10]</sup> Divinylbenzol wurde zur Quervernetzung ausgewählt, um sicherzustellen, daß unter den für die Templatentfernung verwendeten Hydrolysebedingungen kein Abbau der Polymermatrix stattfindet. Die Polymere wurden photochemisch bei 4 °C hergestellt (siehe *Experimentelles*). Nicht-Imprint-Polymere (Polymere ohne „Abdruck“) wurden unter denselben Bedingungen hergestellt; das Templat wurde dabei durch zwei Äquivalente Methacrylsäure ersetzt, um sicherzustellen, daß die chemische Zusammensetzung der Polymere zum Schluß identisch war.

Nach der Herstellung wurden die Polymere in Lösungen von **1** in wäßrigem Acetonitril untersucht, um ihre Bindungseigenschaften zu prüfen. Bei allen Verhältnissen von wäßrigem zu organischem Lösungsmittel wurde eine spezifische Bindung (Einschub in Abbildung 1) festgestellt. Die Bindung von **1** an das Polymer fiel aber von 47 % in Acetonitril/Wasser 4:1 auf 28 % in reinem Wasser, in dem das Tripeptid merklich besser löslich war. Die Bindungsstudien wurden daher in 80proz. Acetonitril durchgeführt, worin ein hohes Maß an spezifischer Bindung und ein ausreichender Bereich der Ligandenkonzentration genutzt werden konnte. Die Isothermen wurden dann für zwei Polymerkonzentrationen (15 und 90 mg mL<sup>-1</sup>) bestimmt (Abbildung 1). Es ist zu erkennen, daß das Imprint-Polymer das Peptid selbst bei niedrigen Konzentrationen von 0.02 mM bindet. Dagegen ist die Affinität des Nicht-Imprint-Polymers und des nicht hydrolysierten Imprint-Polymers (Daten nicht gezeigt) für **1** vernachlässigbar

[\*] Dr. E. N. Vulfson, J. U. Klein, Dr. M. J. Whitcombe,  
Dr. F. Mulholland  
Department of Macromolecular Sciences, IFR, Earley Gate  
Whiteknights Road, Reading RG6 6BZ (Großbritannien)  
Fax: (+44) 118-926-7917  
E-mail: janya.vulfson@bbsrc.ac.uk

[\*\*] Die Autoren danken dem BBSRC für die Unterstützung und der FEBS für ein Stipendium für J.U.K.



Schema 1. Kovalente Modifizierung von Lys-Trp-Asp mit 2-Methacryloyloxybenzoylchlorid und Herstellung des Imprint-Polymers.

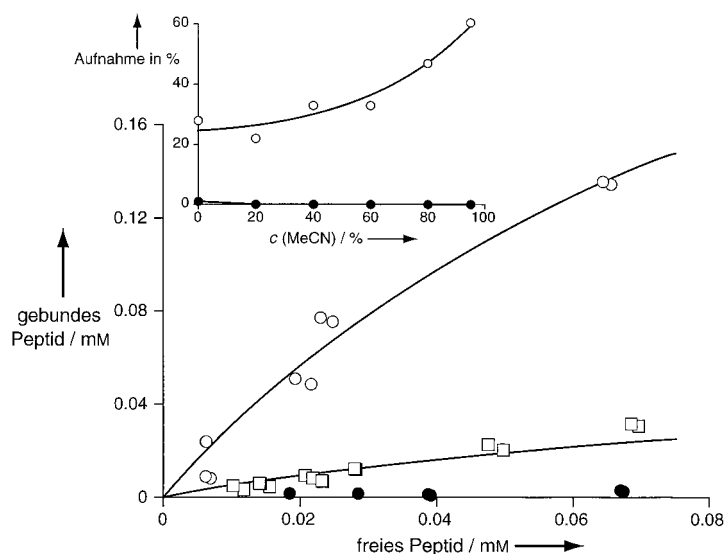


Abbildung 1. Bindungseigenschaften des Polymers in Acetonitril/Wasser-Gemischen. Hauptabbildung: Isotherme für die Bindung von Lys-Trp-Asp an Imprint- (15 und 90 mg mL<sup>-1</sup>, □ bzw. ○) und Nicht-Imprint-Polymere (15 mg mL<sup>-1</sup>, ●) in Acetonitril/Wasser 4:1. Die Kurven wurden mit folgenden Parametern berechnet:  $K_d = 113 \mu\text{M}$  und Kapazität =  $4.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Einschub: Abhängigkeit der Bindung von der Zusammensetzung des Lösungsmittels in Acetonitril/Wasser-Gemischen für Lys-Trp-Asp (0.1 mM), das mit Imprint- (○) und Nicht-Imprint-Polymeren (●) bei 90 mg mL<sup>-1</sup> inkubiert worden war (siehe Experimentelles für die Beschreibung der Bindungsexperimente).

klein. Das Nicht-Imprint-Polymer zeigte bei 90 mg mL<sup>-1</sup> eine leicht „negative Aufnahme“, was dem Quellen des Polymers in der Inkubationsmischung zugeschrieben wurde.<sup>[5]</sup> Durch Regressionsanalyse der Isothermendaten wurden die Bin-

dungsparameter ermittelt ( $K_d = 113 \pm 47 \mu\text{M}$  bei einer Kapazität von  $4.1 \pm 1.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ).

Danach prüften wir die Selektivität des Polymers mit Strukturanaloga des Tripeptids **1**. Diese wurden mit konventionellen Methoden der Festphasen-Peptidsynthese hergestellt, durch HPLC gereinigt und durch Hochauflösungsmassenspektrometrie charakterisiert. Zunächst wurden die drei Tripeptide **5–7** hergestellt, bei denen das N-terminale Lysin durch Arginin, Leucin bzw. Glutamin ersetzt wurde (Tabelle 1). Die Bindung dieser Tripeptide relativ zu **1** sollte Informationen liefern über die Bedeutung und den relativen Beitrag der beiden Carboxygruppen, die an der Erkennungsstelle durch kovalente Bindung eingeführt worden waren. Leucin und Glutamin wurden gewählt, weil Leucin eine nichtfunktionalisierte Seitenkette von ähnlicher Größe wie

Tabelle 1. Sequenzspezifisches Binden von Peptiden an Lys-Trp-Asp-Imprint-Polymer.

Peptid	Sequenz	gebundener Anteil <sup>[a]</sup>	
		Imprint-Polymer	Nicht-Imprint-Polymer
<b>1</b>	Lys-Trp-Asp	43 %	11 %
<b>5</b>	Arg-Trp-Asp	24 %	9 %
<b>6</b>	Leu-Trp-Asp	< 2 %	6 %
<b>7</b>	Gln-Trp-Asp	< 2 %	< 2 %
<b>8</b>	Lys-Phe-Asp	4 %	< 2 %
<b>9</b>	Lys-Trp-Glu	5 %	3 %
<b>10</b>	Lys-Trp <sup>[b]</sup>	35 %	17 %
<b>11</b>	Lys-Phe <sup>[c]</sup>	9 %	5 %
<b>12</b>	Lys-Val <sup>[c]</sup>	15 %	4 %

[a] Die Peptide (1 mM in Acetonitril/Wasser 4:1) wurden mit dem Polymer (30 mg mL<sup>-1</sup>) wie unter Experimentelles beschrieben inkubiert. [b] Bezogen von Bachem. [c] Bezogen von Sigma.

Lysin hat und weil die  $\gamma$ -Amidgruppe von Glutamin H-Brücken zu Carbonsäuren bilden kann. Die Bindungsstudien wurden bei Tripeptid-Konzentrationen von 1 mM durchgeführt, da bei dieser Konzentration alle Liganden in 80proz. Acetonitril löslich waren.

Die in Tabelle 1 gezeigten Ergebnisse lassen erkennen, daß der Austausch von Lysin gegen Arginin zu einer deutlichen Verringerung der Bindung von 43 auf 24 % führt; gleichwohl erkannte das Polymer das Peptid noch immer relativ gut. Dies ist kein allzu großer Unterschied zur Spezifität von Enzymen und Antikörpern, die oft nicht ausreichend zwischen Sequenzen diskriminieren, die sich in diesen beiden Aminosäuren unterscheiden. Wurde aber das Polymer mit den Leucin oder Glutamin enthaltenden Peptiden **6** bzw. **7** konfrontiert, in der Absicht, die Wechselwirkung zwischen einer der Carboxygruppen und der Seitenkette von Lysin auszuschalten, so war die Bindung vernachlässigbar schwach. Dieses Ergebnis bestätigte, daß die starke Bindung von **1** an das Imprint-Polymer zumindest teilweise auf die kooperative Wechselwirkung zwischen den Aminogruppen von Lysin und den beiden Carboxygruppen an den Erkennungsstellen zurückzuführen war. Liganden, die nur eine dieser Wechselwirkungen eingehen konnten, weisen eine deutlich geringere Affinität zum Polymer auf.

Danach ersetzten wir den Tryptophanrest durch Phenylalanin (Tripeptid **8**) – die Bindung war wiederum drastisch verringert (Tabelle 1). Die Größe des Effekts war jedoch etwas überraschend, da vom mittleren Aminosäurerest nicht erwartet wurde, daß er maßgeblich an Wechselwirkungen funktioneller Gruppen beteiligt ist. Daher wurde keine große Selektivität an der zweiten Position vorausgesagt. Vielleicht kann der kleinere Phenylalaninrest von **8** keine geeignete Konformation einnehmen, die es ihm ermöglicht, den „Platz“ einzunehmen, der von der offensichtlich viel sperrigeren Seitenkette von **1** geschaffen wurde. Da die Indolylgruppe von Tryptophan über den Pyrrolring verknüpft ist, ist es möglich, daß die im Polymer geschaffene Lücke einfach keinen Benzolring aufnehmen kann. Wenn ein derartiger „tight fit“ auch unwahrscheinlich ist, würde es die festgestellte Selektivität erklären. In diesem Fall könnte eine Wechselwirkung zwischen dem Indol-N-Proton und Vinylpyridin die Ursache dafür sein. Derartige Wechselwirkungen sind zwischen 4-Vinylpyridin und Indoltemplaten bei der Herstellung von Imprint-Polymerkatalysatoren für die Isomerisierung von Benzisoxazol beschrieben worden.<sup>[11]</sup>

Der Austausch des Aspartatrests am C-Terminus durch das strukturell sehr ähnliche Glutamat (Tripeptid **9**) führte ebenfalls zu einer drastischen Verringerung der Bindungsstärke. Zwei Erklärungen können herangezogen werden für den Unterschied des Bindungsverhaltens zwischen dem Templat **1** und dem glutamathaltigen Tripeptid **9**: Erstens könnte das schwache Binden von **9** einfach am Verlust der H-Brücke zwischen der Carboxygruppe der Seitenkette und des entsprechenden polymergebundenen Pyridinrests liegen.<sup>[12]</sup> Alternativ dazu könnten andere, subtilere Effekte mit im Spiel sein. So könnte das Binden des etwas größeren Glutamatrests in der Aspartat-Bindungstasche den Lysin- oder Tryptophanrest (oder beide) davon abhalten, ihre Positionen in der Imprinting-Stelle zu besetzen, denn das

Peptid als Ganzes kann keine Konformation einnehmen, die allen Bindungswechselwirkungen genügt. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das Polymer mit dem Dipeptid Lys-Trp **10** getestet. Sollte der Affinitätsverlust vorwiegend aufgrund der Spaltung von H-Brücken eingetreten sein, dann müßte **10** nach unserer Annahme ein ebenso schwacher Ligand für das Polymer sein wie **9**. Wenn aber die Gesamtgröße und/oder -konformation die Ursache für das schwächere Binden von **9** war, dann müßte das Dipeptid merklich besser als **9** binden, aber nicht so gut wie **1**. Wir stellten fest, daß die Aufnahme von Lys-Trp **10** nur etwas schwächer war als die von **1**. Dies bestätigte, daß die Komplexierung durch Vinylpyridingruppen einen signifikanten, aber etwas geringeren Beitrag zur Gesamtbindungsenergie lieferte und unterstreicht den Vorteil der „Opfer-Spacer“-Methode.

Schließlich bestimmten wir die Aufnahme zweier weiterer Dipeptide, Lys-Phe **11** und Lys-Val **12**, die ausgewählt wurden, um die Aufnahme in die hydrophobe Tasche der Bindungsstelle des Polymers zu prüfen. Im Einklang mit unserem vorigen Ergebnis führte der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin zu einer deutlichen Abnahme der Bindungsstärke. Im Fall von **12** nahm aber die Aufnahme leicht zu, vermutlich, weil die Seitenkette von Valin sterisch weniger anspruchsvoll ist als die von Phenylalanin. Deshalb paßt **12**, etwas locker gebunden, in die Bindungsstelle.

Wir haben also gezeigt, wie leicht polymere Materialien hergestellt werden können, die zwischen sehr ähnlichen Aminosäuresequenzen unterscheiden können, und dies mit einer Selektivität, die an die von Antikörpern und anderen biologischen Rezeptoren heranreicht. Polymere dieser Art könnten ihre Anwendung in Affinitäts-Trennmethode zur Reinigung biologisch aktiver Oligopeptide natürlicher Herkunft und als Sensoren in biomedizinischen Geräten finden.<sup>[13]</sup>

## Experimentelles

**Synthese des Templats:** Lys-Trp-Asp · 2CF<sub>3</sub>COOH · H<sub>2</sub>O (520 g, 0.75 mmol) wurde in 30proz. wäbrigem Methanol (15 ml) gelöst, das Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 mg) enthielt, und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Die Mischung wurde bei 0 °C zu einer Lösung von 2-Methacryloyloxybenzoylchlorid (505 mg, 2.25 mmol) in THF (15 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und HCl (0.1 N) wurde zugegeben, um das Produkt auszufällen. Der Feststoff wurde abgesaugt, in Ethylacetat gelöst und mit einem Ethylacetat-Extrakt des Filtrats vereinigt. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit Wasser (2 ×), HCl (0.1 N, 3 ×) und Wasser (3 ×) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde mit präparativer HPLC gereinigt; Ausbeute 49 %.

**Synthese des Polymers:** In einem Probenröhrchen, das mit einem Absperrhahn verschlossen war, wurden das Templat (116.4 mg), 2-Vinylpyridin (74.3 mg), Divinylbenzol (technisch, 80 %, 809.3 mg) und Azobiscyclohexanarbonitril (29.8 mg) in Acetonitril (2 mL) gelöst. Die Polymerisationsmischung wurde durch dreimaliges Einfrieren, Abpumpen und Auftauen entgast und 48 h bei 4 °C photochemisch (366 nm) polymerisiert. Das Polymer wurde mit einem elektrischen Mörser auf eine mittlere Teilchengröße von 30 µm zermahlen. Das Templat wurde durch Erhitzen unter Rückfluß mit NaOH (7.5 N) in Methanol entfernt (Entfernung 58 % gemäß Aminosäureanalyse). Das Referenzpolymer wurde auf gleiche Weise hergestellt, wobei das Templat durch Methacrylsäure (27.4 mg) ersetzt wurde.

