

- [12] M. Di Vaira, L. Sacconi, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 338–351; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 330–343.
 [13] H. Bock, H. Müller, *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4365–4368.
 [14] M. D. Chen, J. T. Li, R. B. Huang, L. S. Zheng, C. T. Au, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *305*, 439–445.
 [15] M. E. Barr, B. R. Adams, R. R. Weller, L. F. Dahl, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3052–3060; M. Scheer, U. Becker, E. Matern, *Chem. Ber.* **1996**, *129*, 721–724.
 [16] C.-H. Hu, M. Shen, H. F. Schaefer III, *Theor. Chim. Acta* **1994**, *88*, 29–33.

Molekular geprägte Polymere mit einem Gedächtnis für kleine Moleküle, Proteine oder Kristalle**

Börje Sellergren*

Einleitung

Molekulare Erkennung gibt es bei biologischen Prozessen wie der Immunantwort, den Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen und der Enzymkatalyse. Dass biologische Wirtsmoleküle eine spezifische, starke Bindung zu einer bestimmten molekularen Struktur eingehen können, ist wesentlich für biologische Abläufe. Beispiele hierfür sind die Empfindlichkeit der Immunantwort,^[1] bei der Antikörper als Reaktion auf sehr kleine Mengen an fremdem Antigen gebildet werden, oder die Energieeinsparung durch Enzyme, die den Übergangszustand der zu katalysierenden Reaktion stabilisieren können.^[2]

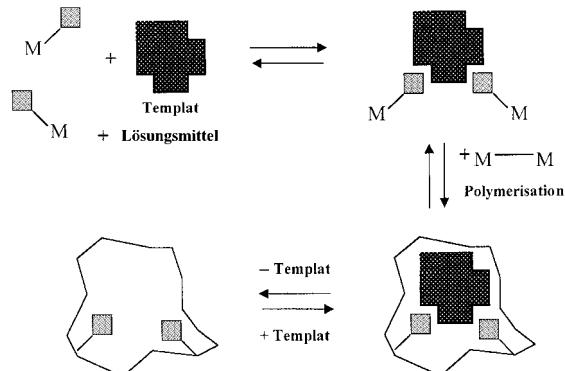
Chemiker hoffen, mit biologischen Modellen diese Eigenschaften für die verschiedensten Anwendungen nachzubilden.^[3–5] So könnten z. B. stabile Strukturerkennungselemente, die eine starke und selektive Bindung zu Molekülen bilden können, als strapazierfähige, empfindliche Methode in der Spurenanalyse von Verbindungen in Matrices eingesetzt werden. Andere Möglichkeiten für den Einsatz solcher Strukturerkennungselemente sind das Abtrennen unerwünschter Verbindungen aus der Nahrung oder aus Körperflüssigkeiten, eine gezielte Freisetzung von Arzneimitteln oder eine bei der industriellen Herstellung von Feinchemikalien notwendige präparative Trennung.

Strapazierfähige Strukturelemente zur molekularen Erkennung mit einer den Antikörpern ähnlichen Fähigkeit, Moleküle oder andere Strukturen zu binden und zu unterscheiden, lassen sich heute mit molekularen Imprinting-Techniken synthetisieren.^[6, 7] Dabei werden in Gegenwart von Templaten (z. B. kleinen Molekülen, Biomakromolekülen, Mikroorganismen oder ganzen Kristallen) quervernetzte Polymere hergestellt (Schema 1).

[*] Dr. B. Sellergren

Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie der Universität
 Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz
 Fax: (+49) 6131-39-22710
 E-mail: borje@ak-unger.chemie.uni-mainz.de

[**] Der Autor dankt Dr. Andrew Hall und Dr. Gunter Büchel für linguistische Ratschläge.



Schema 1. Imprinting vernetzter Polymere mit verschiedenen Templaten. Als Templat können kleine Moleküle, Proteine und sogar ganze Zellen oder anorganische Kristalle dienen.

Funktionelle Monomere können während der Synthese das Templat kovalent oder nichtkovalent an das Monomer oder an das wachsende Polymer binden und nach der Entfernung des Templatums die sich in der Folge einstellenden Wechselwirkungen bilden (Tabelle 1). Wenn man das Templat aus dem entstandenen Polymer entfernt, entsteht eine Struktur, die komplementär zum Templat oder einer analogen Struktur ist. Dieses einfache, attraktive Konzept fasziniert nun schon seit mehr als 50 Jahren.^[8] Chemiker aus verschiedenen Disziplinen bei ihrer Suche nach Lösungen für spezielle Probleme. Gleichwohl sind die Fortschritte bisher gering, und echte, kommerziell verwertbare Anwendungen stehen noch aus.

Im Hinblick auf einige neuere, verheißungsvolle Entwicklungen könnte sich dies aber jetzt vielleicht ändern. Kombinatorische Methoden zur schnellen Parallelsynthese und Untersuchung großer Substanzgruppen verheißen beispielsweise eine wesentlich schnellere Entwicklung neuer Strukturelemente zur molekularen Erkennung.^[9, 10] Darüber hinaus erhielt man durch geschicktes Design von Verbindungselementen, die die funktionellen Gruppen der Bindungsstellen in solchem Abstand positionieren, dass eine nachfolgende Neu-anbindung über elektrostatische Wechselwirkungen möglich

HIGHLIGHTS

Tabelle 1. Möglichkeiten für das Imprinting kleiner Moleküle.^[a]

Synthese	erneute Bindung	Haftstellen	Lit.
kovalent	kovalent		[40]
kovalent	nichtkovalent		[41]
kovalent/nichtkovalent	nichtkovalent		[12]
durch Metallionen vermittelt	durch Metallionen vermittelt		[31]
nichtkovalent	nichtkovalent		[42]
			[11]
			[43]
			[23]

[a] T = Templat, M = polymerisierbare Gruppe.

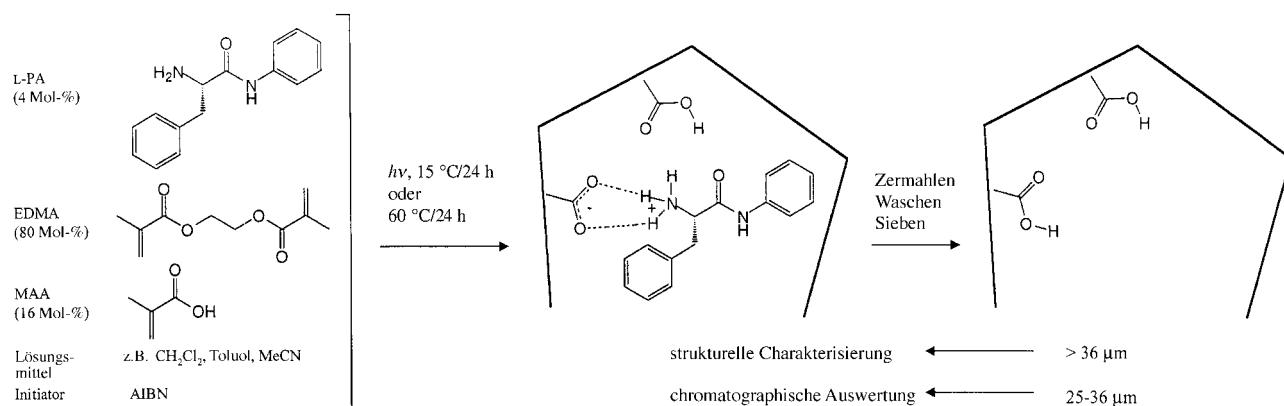
wird, Substanzen mit ausgezeichneten Erkennungseigenschaften für hoch interessante Zielmoleküle wie Peptide^[11] und Steroide.^[12]

Auch größere Moleküle wie Proteine lassen sich nun durch Oberflächen-Imprintingtechniken erkennen.^[13] Templat-Imprinting ist also nicht auf niedermolekulare Ziele beschränkt. In neueren Beiträgen wurde gezeigt, dass sogar beim Imprinting ganzer Zellen^[14] und anorganischer Kristalle^[15] Strukturen entstehen, die die entsprechenden Templatstrukturen wirksam zu erkennen vermögen. Schließlich sind auch das Imprinting von Metallionen zur Maskierung oder zum Einsatz als Sensor^[7] und molekular geprägte Enzymmodelle^[24] aufblühende Gebiete, die aber thematisch außerhalb dieses Beitrags liegen. Hier sollen die verheißungsvollsten der neueren Entwicklungen zur Herstellung von Bindungsstellen in Templaten aufgeführt und Verbindungen zu möglichen Anwendungen dargestellt werden.

Nichtkovalentes Imprinting zur Erkennung kleiner Moleküle

Die erfolgreichsten nichtkovalenten Imprinting-Systeme basieren auf käuflichen Acryl- und Methacrylmonomeren, die mit Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) quervernetzt sind. Wie man an den zahlreichen Literaturbeispielen sehen kann, ist Methacrylsäure (MAA) bis heute das am häufigsten verwendete funktionelle Monomer.^[7, 16] Das meistangewendete Verfahren beim Imprinting mit L-Phenylalaninanilid (L-PA) ist in Schema 2 dargestellt.^[17, 18]

Dass MAA als funktionelles Monomer so vielseitig verwendbar ist, liegt daran, dass die Carboxygruppe dabei als guter H-Brückendonator und -acceptor sowie als Protonendonator dienen kann.^[19] In aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril bilden Carbonsäuren und Amine H-verbrückte Kontaktaggregate, in denen die Stärke der Wechselwirkung bei konstanter Säurestärke mit der Basenstärke zunimmt.^[20]



Schema 2. Schematische Darstellung des Imprintingprozesses zur Erkennung von L-Phenylalaninanilid (L-PA). AIBN = Azobisisobutyronitril, EDMA = Ethylenglycoldimethacrylat, MAA = Methacrylsäure.

Darum sind Template mit Brønsted-Basen oder H-Brückenbildnern als funktionellen Gruppen potentiell geeignete Template für das MAA/EDMA-System.^[16-18] Außerdem können sich cyclische H-Brücken mit Templaten bilden, die als funktionelle Gruppen Säure^[21] oder Amidgruppen^[22] oder funktionalisierte N-Heterocyclen^[23, 24] enthalten, wobei die letzten beiden stabiler sind. Das Templat sollte allerdings auch in den Lösungsmitteln oder Monomeren, die man am häufigsten beim Imprintingsschritt verwendet, löslich sein, es sollte in präparativen Mengen verfügbar und unter den Polymerisationsbedingungen stabil sein, und es sollte nicht mit freien Radikalen reagieren. Sind diese Kriterien erfüllt, dann zeigen die erhaltenen molekular geprägten Polymere (MIPs) in der Regel deutlicheres und selektiveres Wiederbinden des Templat (das am Ende der Polymerisation herausgelöst wurde) als nicht geprägte Kontrollpolymere.

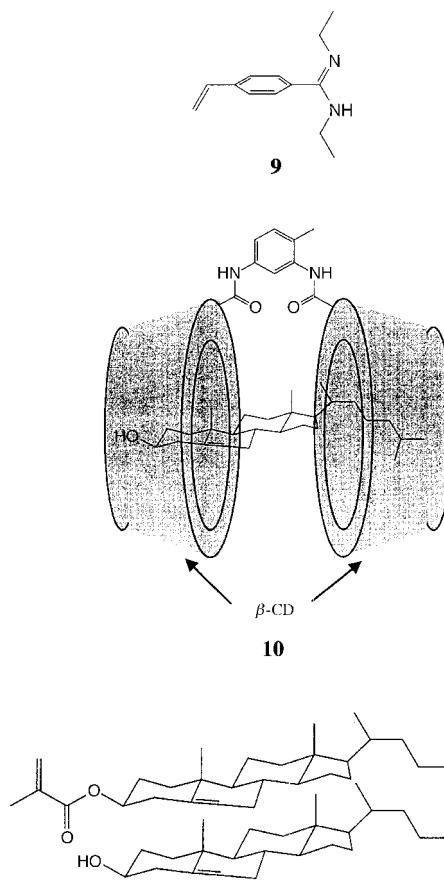
Das Potential eines gegebenen monomeren Templatpaars zur Bildung schablonenartiger Bindungsstellen lässt sich durch Messung der Stabilitätskonstanten vorhersagen; diese bestimmt man z.B. spektroskopisch in einer homogenen Lösung, mit der man die Monomeremischung vor der Polymerisation nachbildet.^[17, 25] Dies kann man schließlich auch als erstes Screeningverfahren für die Suche nach geeigneten funktionellen Monomeren einsetzen. Mit 9-Ethyladenin **8** (Tabelle 1) als Templat kann man die Komplexstabilitätskonstante in Lösung mit der Bindungskonstante und Dichte der Bindungsstellen vergleichen, wie man sie bei Bindungsstudien mit der molekular geprägten Substanz im Batchverfahren erhält. 9-Ethyladenin assoziiert mit Buttersäure in Chloroform an drei Stellen, die geschätzten Assoziationskonstanten betragen hierfür 114, 41 bzw. 5 M^{-1} .^[26]

Wenn man von ähnlichen Assoziationskonstanten zwischen MAA und diesem Templat vor der Polymerisation ausgeht, dann sollte der größere Teil des Templat in komplexierter Form vorliegen. Das in Chloroform hergestellte, entsprechend geprägte Polymer zeigte eine Adsorptionsisotherme, die sich durch ein Bi-Langmuir-Adsorptionsmodell beschreiben ließ. Dabei erhielt man eine Klasse von Bindungsstellen hoher Bindungsstärke mit einer Bindungskonstanten K_a in Chloroform von 76000 M^{-1} . Die Bindungsstärke lag in der gleichen Größenordnung wie für synthetische Rezeptoren, die man für dasselbe Molekül entwickelt hat.^[23] Es ist darüber

hinaus auch interessant, dass mehr als 30% des zugegebenen Templat zu Bindungsstellen mit hoher Bindungsaaffinität führen (Bindungstellendichte $n = 20\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$). Üblicherweise ist die Ausbeute allerdings beträchtlich geringer, oft liegt sie im Bereich von nur wenigen Prozent. Bildet man die Differenz zwischen der Bindung an ein mit Benzylamin geprägtes Bezugspolymer und der Bindung an ein mit 9-Ethyladenin geprägtes Polymer, so erhält man eine Mono-Langmuir-Isotherme ($K_a = 79000\text{ M}^{-1}$). Dies deutet darauf hin, dass die in diesem Experiment untersuchten Bindungsstellen voneinander unabhängig und relativ gleichmäßig verteilt sind. Die restlichen Bindungsstellen gehen eine unselektive Wechselwirkung mit Carboxygruppen bindenden, gelösten Teilchen ein und begrenzen so das Ausmaß der zu erreichenden Trennung.

Obwohl das eingesetzte MAA als funktionelles Monomer eine Reihe wichtiger Zielstrukturen gut erkennen kann, erfordert die Erkennung eines beliebigen Zielmoleküls doch den Zugang zu funktionellen Monomeren, die auf strukturelle Merkmale bestimmter Verbindungen oder Verbindungsklassen ausgerichtet sind. Wenn man von strukturellen Merkmalen solcher Template ausgeht, die im MAA-System zu guten Bindungsstellen führen, ergibt sich eine interessante Möglichkeit dadurch, dass man diese Strukturen zur Erkennung von Carbonsäuren in neue funktionelle Monomere einbaut. Dieses Konzept ähnelt in gewisser Weise dem Reziprozitätskonzept beim Aufbau chiraler stationärer Phasen. So synthetisierten Wulff et al. *N,N*'-Diethyl-*p*-vinylbenzamidin **9** und zeigten, dass man dieses Monomer zur Erzeugung sowohl von Bindungsstellen einsetzen kann, die Carbonsäuren sehr zuverlässig erkennen, als auch von solchen, die katalytische Aktivität für die Esterhydrolyse zeigen.^[27] Die Bindung ist in diesem Fall stark genug, um in wässrigen Medien eine effiziente Erkennung zu ermöglichen. Außerdem ist die unspezifische Bindung auf ein Minimum reduziert, da das funktionelle Monomer vor der Polymerisation quantitativ mit dem Templat abgesättigt ist.

Ein Hauptgesichtspunkt bei der Wahl des funktionellen Monomers ist darum die Komplementarität der funktionellen Gruppen. Sind Template nur schwach polar und haben nur wenige funktionelle Gruppen, die mit dem funktionellen Monomer wechselwirken können, dann kann es von Vorteil



sein, wenn man amphiphile Monomere verwendet, die die monomeren Templatgruppierungen durch hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte stabilisieren. In diesem Sinne wurden bisher Cyclodextrine **10** zur Erzeugung schablonenartiger Bindungsstellen für Cholesterin (β -CD = β -Cyclodextrin)^[28] oder zur Erhöhung der Selektivität beim Imprinting von Aminosäuren eingesetzt.^[29] Monomere auf der Basis von Gallensäuren oder Cholesterin (**11a**) nutzte man bisher ebenfalls, um Bindungsstellen für Cholesterin **11b** zu erhalten.^[30] Unter einer Reihe üblicher Adsorbentien zeigten diejenigen, die mit Cholesterin geprägt waren, die größte Aufnahme von Cholesterin aus Modellflüssigkeiten für Verdauungssäfte bei physiologischen Konzentrationen.

Insgesamt lassen sich durch einfaches Mischen und Polymerisieren molekulare Erkennungselemente für eine große Zahl kleiner Moleküle erzeugen. Die molekulare Prägung größerer, komplexer Biomoleküle bleibt allerdings nach wie vor eine große Herausforderung.

Molekulare Erkennung von Oligopeptiden

Auf Aminosäuresequenzen und Peptidisomere zugeschnittene molekulare Erkennungselemente lassen sich möglicherweise bei notwendigen Trennungen von Peptidmischungen, in Peptidsensoren, bei therapeutischen Anwendungen oder als biologische Modellsysteme einsetzen. Bisher wurden Aminosäureamide und kleinere Peptide als Template bei MAA/EDMA-Versuchen (Schema 2) eingesetzt; dabei erhielt man Substanzen, die Aminosäuren und Peptide als Zielmoleküle

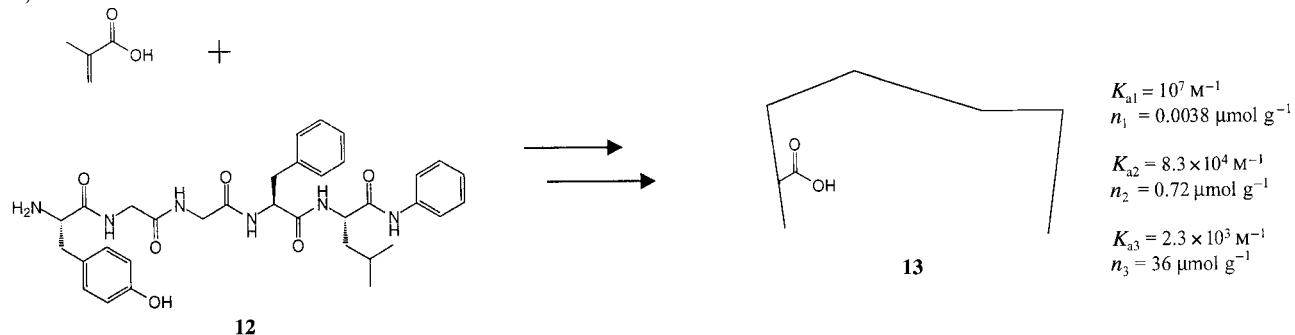
stark und selektiv zu binden vermögen. Auf diese Weise erhielt man beim molekularen Imprinting von Leu-Enkephalinanilid **12** eine Bindungsstelle für Leu-Enkephalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH **13**).^[22] Die dabei erhaltene Substanz wies für **13** in organischen und in organisch/wässrigen Lösungsmitteln hohe Bindungskonstanten auf (Schema 3A). Die hohe Affinität für Peptide als Zielmoleküle macht es möglich, diese Substanzen als Antikörperersatz in kompetitiven Assays oder für andere analytische Anwendungen einzusetzen.

Allerdings ist, wie bereits erwähnt, die unspezifische Bindung bei diesen Substanzen beträchtlich und die Dichte der Bindungsstellen mit starker Bindung gering, was ihren Einsatz bei analytischen Anwendungen wesentlich einschränkt. Die Löslichkeit ist ein zusätzliches Problem. Viele Peptide sind in den üblicherweise verwendeten Monomer-Lösungsmittel-Systemen nur wenig löslich. Darum kann es nötig sein, dass man vor der Polymerisation polare Lösungsmittel zugibt oder löslichere Analoga verwendet. Im ersten Fall erzielt man eine Destabilisierung der durch elektrostatische Wechselwirkungen gebundenen Aggregate aus funktionellem Monomer und Templat und eine geringere Ausbeute an schablonenartigen Bindungsstellen. Im letzteren Fall ist es möglich, dass die entstehende Bindungsstelle nicht komplementär zum Peptid als Zielmolekül ist.

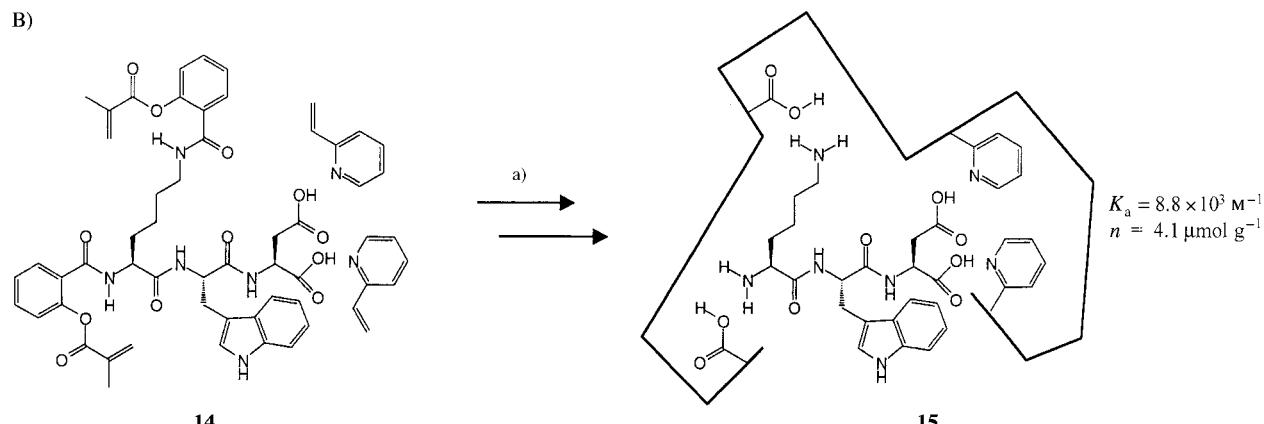
Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, besteht darin, das Templat kovalent an das funktionelle Monomer zu binden und nach Polymerisation und Entfernung des Templat das Templat bei der erneuten Bindung nichtkovalent zu assoziieren (siehe oben). Dies ist im Fall von hydrolisierbaren Estern (z.B. **4**, Tabelle 1),^[31] Amid- oder Iminbindungen^[32] möglich; hier erfolgt die nachfolgende erneute Anbindung über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Amin und der entsprechenden Carbonsäure. Nach enttäuschenden Ergebnissen bei der Entfernung des Templat, bei der Messung der Bindungsfähigkeit und der Selektivität wurde dieser Ansatz nicht mehr weiter verfolgt. Gründe hierfür waren die intrinsische Stabilität der Bindungen zwischen Monomer und Templat und die Positionierung der funktionellen Gruppe, die für eine optimale nichtkovalente Erkennung ungeeignet war. Ein Weg zur Lösung dieser Probleme stammt von der Arbeitsgruppe von Whitcombe und Vulfson.^[12] Sie verwendeten leicht spaltbare „Opfer-Spacer“ zwischen Monomer und Templat (**3**, Tabelle 1) um die funktionellen Gruppen für die erneute Anbindung korrekt zu positionieren.

Bis jetzt konnte man mit diesem Ansatz Erkennungselemente für Cholesterin, polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Peptide erhalten. So wurde z.B. das Tripeptid Lys-Trp-Asp **15** (Schema 3B) als Templat eingesetzt^[11] und kovalent an MAA gebunden, und zwar über zwei Salicylgruppen, die wiederum mit den Aminogruppen des Lysinrests und der Carboxygruppe von MAA verknüpft waren (**14**). Die Labilität dieses Linkers sollte es ermöglichen, dass das Templat beim Herauslösen größtenteils wiedergewonnen werden kann und alle Carboxygruppen zu schablonenartigen Bindungsstellen werden. Intramolekulare H-Brücken zwischen der Amid- und der Estergruppe des Linkers sollten die Aminogruppe an einer Stelle positionieren, so dass sie nach Abspaltung des Templat

A)



B)



Schema 3. Synthese von Polymeren, die selektiv für Peptide sind, nach A) Andersson et al.^[22] und B) Klein et al.^[11], wobei vor der Polymerisation nichtkovalente bzw. kovalente Bindungen zwischen den MAA-Gruppen und dem Templat geknüpft werden. Assoziationskonstanten K_a und die Dichte n der Bindungsstellen stammen aus Gleichgewichtsbindungsstudien im Batchverfahren mit A) Leu-Enkephalin **13** (in EtOH/20 mM Natriumcitrat (pH 4.5) 10:90) oder B) **15** (in Acetonitril/Wasser 4:1). a) Reaktionsbedingungen: 1. Divinylbenzol (DVB), Initiator, 2. UV, Polymerisation, 3. NaOH, MeOH/H₂O, 4. Zugabe von Lys-Trp-Asp.

zur Carboxygruppe auf H-Brückendistanz steht. Man nahm außerdem an, dass die Arylgruppe des Linkers den für die Ablösung und erneute Anbindung des Templatnotwendigen Raum erzeugen würde. Schließlich wurde die Kovalente-Bindungen-Strategie zur Erkennung der Lysingruppe mit der Zugabe von 2-Vinylpyridin kombiniert, die damit als Gegenstück zu den Carboxygruppen der Aspartatseitenketten fungierten. Mit UV-Licht wurde dann die Copolymerisation der Aggregate, die aus diesen Monomeren gebildet wurden, mit einem Überschuss an Divinylbenzol (DVB) ausgelöst. Anschließend wurde das Polymer in einer MeOH/H₂O-Lösung von NaOH unter Rückfluss erhitzt, um so das Templat vom Polymer zu lösen; dabei konnten 58% des Templat entfernt werden. Dann wurde im Batchverfahren die Fähigkeit des Polymers zur erneuten Bindung bis zur Einstellung des Gleichgewichts überprüft und mit einem Kontrollpolymer verglichen, in dem das Templat durch eine äquimolare Menge an MAA ersetzt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dieser Strategie eine Schablone dieses Peptids hergestellt werden konnte. Besonders eindrucksvoll war in wässrig/organischen Lösungsmitteln der Anteil an gebundenem Templat im Vergleich zu strukturell ähnlichen Peptiden. Allerdings sollte man die Ergebnisse im Hinblick auf den bei den angewandten Konzentrationen beobachteten Betrag der Bindung an das Kontrollpolymer vorsichtig interpretieren. Der vom Kontrollpolymer

unspezifisch adsorbierte Anteil korreliert in gewissem Ausmaß mit dem Anteil, der von dem geprägten Polymer adsorbiert wurde – wenngleich er viel geringer ist als die Menge, die an das durch das Peptid geprägte Polymer adsorbiert war.

Es ist interessant, diese Imprinting-Strategie, die kovalente Bindungen nutzt, mit der weiter oben beschriebenen Strategie unter Nutzung nichtkovalenter Bindungen zu vergleichen. Obwohl die mit der erstenen Strategie synthetisierten Polymere das Templatpeptid ausgesprochen deutlich wiedererkennen, bleibt es doch unklar, ob in ihnen Bindungsstellen vorhanden sind, die das Templat mit der gleichen Affinität zu binden vermögen, wie man sie bei den Substanzen aus der letzteren Strategie beobachtet. Dies kann entscheidend für die analytische oder präparative Anwendung der entsprechenden Substanzen sein.

Molekulare Erkennung von Proteinen

Das Design stabiler molekularer Erkennungselemente für Proteine ist wegen der Komplexität dieser Makromoleküle eine schwierige Aufgabe, jedoch reizvoll im Hinblick auf ihren großen Bedarf in der Biotechnologie im Weiterverarbeitungsprozess, zur Freisetzung von Arzneimitteln, bei der Bioanalyse für Sensoren und schließlich in der Diagnostik.^[5] Eine Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Affinität ist mit

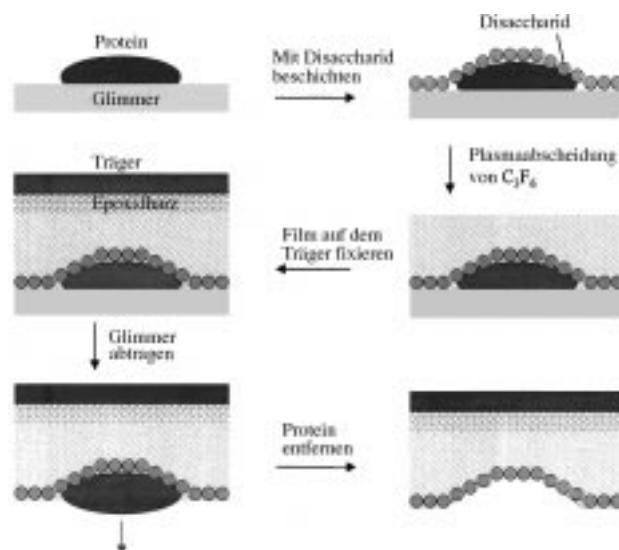
solchen Antikörpern, Enzymen oder Rezeptoren möglich, die Epitope in Proteinen erkennen können. Allerdings verhindert die begrenzte Stabilität dieser Erkennungselemente die Entwicklung strapazierfähiger und billiger Methoden zur Erkennung oder Auftrennung in dieser Verbindungsklasse. Dass man kürzlich stabile quervernetzte Peptiderkennungselemente beim Screening von Peptidbibliotheken aus Phagen herstellen konnte, dürfte dabei eine Ausnahme sein.

Andere Proteintrennungen mit nichtbiologischen Affinitätsmethoden beruhen auf der Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen. Auf diese Weise lassen sich Thiole auf der Oberfläche von Proteinen, Imidazole, Diole in Glycoproteinen oder hydrophobe Aminosäureseitenketten mit Hilfe von Liganden aufspüren, die an festen Trägermaterialien immobilisiert sind.^[5] Ob man diese Substanzen von anderen unterscheiden kann, hängt davon ab, inwieweit diese funktionellen Gruppen auf der Oberfläche exponiert sind. Für nahe verwandte Proteine sind diese Techniken allerdings nicht geeignet. Hier würde molekulares Imprinting es ermöglichen, die funktionellen Gruppen räumlich so zu verteilen, dass ihre Lage komplementär zur Verteilung der funktionellen Gruppe auf der Proteinoberfläche wäre. Struktur und Funktion von Proteinen reagieren allerdings empfindlich auf das Lösungsmittel, die Temperatur, den pH-Wert und die Ionenstärke. So müssen neue Imprintingtechniken entwickelt werden, die diese Faktoren berücksichtigen.

Früher entwickelte Methoden zur Herstellung von Gelen oder Schichten,^[33] die mit Proteinen geprägt wurden, sind im Hinblick auf Selektivität, Bindungskapazität, Zugänglichkeit der Bindungsstellen und Robustheit begrenzt.

Ein interessanter Ansatz zur Beschränkung der geprägten Bindungsstellen auf biokompatible hydrophile Oberflächen veröffentlichte kürzlich die Arbeitsgruppe von Ratner.^[13] Dabei wurde das als Templat dienende Protein (Plasmaproteine: Rinderserumalbumin (BSA), Immunglobulin G (IgG) oder Fibrinogen oder Enzyme: Ribonuclease (RNase) oder Lysozym (LSZ)) auf eine Glimmeroberfläche adsorbiert, die gewählt wurde, weil sie atomar eben ist und die Proteine bei der Adsorption nur minimal denaturieren und sich kaum Konformationsänderungen ergeben. Auf diese Weise verursacht nur das Templatprotein Änderungen in der Oberflächentopographie. Anschließend wurde durch Spin-Coating eine 1–5 nm dicke Schicht eines nichtreduzierenden Disaccharids auf die Oberfläche und danach eine 10–30 nm dicke Schicht eines Fluorpolymers mit Hilfe eines Plasmas aufgebracht (Schema 4).

Der so entstandene Film wurde mit einem Epoxidharz auf Glas geklebt, die Glimmerschicht abgelöst und das Protein durch Behandlung der Oberfläche in NaOH/NaOCl-Lösung entfernt. Man erhielt so mit Zucker überzogene Oberflächen mit schablonenartigen Einbuchtungen. Mit Methoden zur Oberflächenanalyse, die auf die elementare Zusammensetzung (ESCA) und die Masseverteilung (TOF-SIMS) ansprechen, wurde gezeigt, dass das Protein nach dieser Behandlung erfolgreich entfernt worden war. Bei der Vermessung der entstandenen Oberflächen mit der Kraftfeldmikroskopie (AFM) ergaben sich Einbuchtungen, die nach Größe und Gestalt ungefähr dem als Templat verwendeten Protein gleichkamen. Außerdem bevorzugten die Oberflächen bei



Schema 4. Oberflächen-Imprintingtechnik für Proteine auf der Basis von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.

kompetitiven Adsorptionsmessungen das als Templat eingesetzte Protein. Wenngleich alle mit Schablonen versehenen Oberflächen alle Proteine unspezifisch adsorbieren, konnten die als Templat verwendeten Proteine erst bei höheren Konzentrationen des konkurrierenden Proteins verdrängt werden (Tabelle 2). Da man lediglich ein Verfahren zur Synthese all der mit Schablonen versehenen Oberflächen einsetzte, wird diese Technik vielleicht zum Imprinting von Proteinen allgemein angewendet werden.

Tabelle 2. Ergebnisse kompetitiver Adsorptionsversuche.^[a]

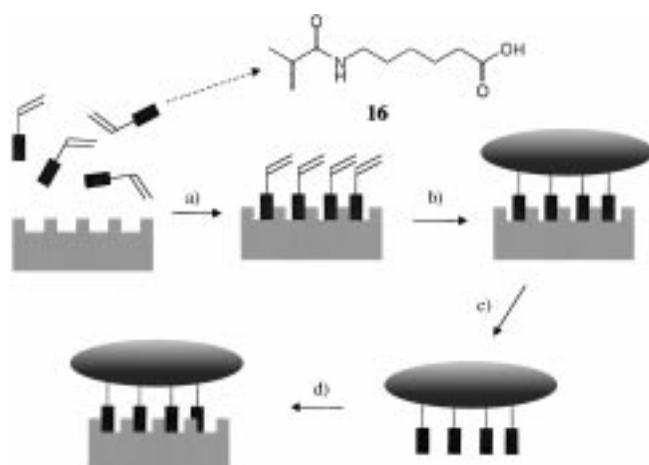
Substrat	verdrängendes Agens	verdrängendes Agens: Substrat bei 50 % Verdrängung			
		geprägtes BSA	geprägtes IgG	geprägtes LSZ	geprägte RNase
BSA	IgG	30.2	3.1	–	–
IgG	BSA	0.9	3.4	–	–
RNase	LSZ	–	–	0.2	4.0
LSZ	RNase	–	–	31.0	1.2

[a] Verhältnis von konkurrierendem Protein zum Protein, das als Substrat fungiert und radioaktiv markiert ist, für den Fall, dass die Bindung des Substrats auf 50 % reduziert ist.

Prägung von Kristallen zur Kristallkeimbildung für gezielte Strukturen

In der Natur beobachtet man, wie durch proteinartige Template bei der Kristallisation anorganischer Substanzen Strukturen entstehen, die sonst bei der spontanen Kristallisation nicht auftreten.^[34] Wenn man diese Template nachbildet, ließe sich vielleicht eine neue Klasse von Biomaterialien mit verbesserten Eigenschaften erschließen.^[35] Kürzlich berichtete die Arbeitsgruppe von Vulfson, dass ein Imprinting anorganischer Kristalle zu polymeren Templayen führt, die die Kristallisation zu Strukturen steuern kann, die sich in Lösung nicht bilden würden.^[15] So wurde durch eine radikalische Polymerisation ein vernetztes Copolymer aus Divinylbenzol (DVB) und 6-Methacryloylamidohexansäure **16** in

Gegenwart von in Chloroform suspendierten Calcitkristallen (rhomboedrisch, ca. 4 μm) hergestellt (Schema 5).



Schema 5. Imprinting von Kristallen mit nachfolgendem Eisatz des Polymers zur gezielten Kristallkeimbildung von CaCO_3 . a) Inkubation in Chloroform; b) DVB, Polymerisation; c) HCl , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, Entfernung des Templat; d) übersättigte CaCO_3 -Lösung.

Es wurden auch zwei Kontrollpolymere synthetisiert, das eine in Abwesenheit von Kristallen, das andere in deren Anwesenheit, jedoch ohne funktionelles Monomer. Ansonsten waren die Herstellungsbedingungen für die Kontrollpolymere dieselben wie für das Polymer, das mit dem Kristall geprägt war. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Polymer zu Partikeln mit einer Größe von ca. 100 μm zermahlen. Der als Templat dienende Kristall wurde durch Waschen der Polymere mit angesäuertem wässrigem Methanol abgelöst. Danach konnte man mit der Rasterelektronenmikroskopie (SEM), mit Röntgenpulverbeugungsmessungen oder IR-spektroskopisch keine an das Polymer gebundenen Calcitkristalle mehr nachweisen. Mit diesem Waschverfahren konnten die Kristalle demnach erfolgreich entfernt werden.

Für die Versuche zur Bildung von Kristallkeimen wurden wässrige Lösungen von Na_2CO_3 (0.8 mm) und CaCl_2 (1.0 mm) gemischt und 24 h aufbewahrt. Dann wurden die Polymeroberflächen mit Wasser gewaschen und anschließend durch SEM untersucht. Auf der Oberfläche des geprägten Polymers befanden sich beträchtlich mehr Calcitkristalle als auf der der Kontrollpolymere. Außerdem unterschied sich ihre Morphologie von der des in Lösung spontan gebildeten Kristalls und ähnelte der ursprünglichen Templatmorphologie. Röntgenpulveraufnahmen bestätigten, dass die Kristalle aus mehr als 96 % Calcit bestehen. Sogar unter Bedingungen, die die Bildung von Aragonit als alternativer Struktur begünstigen (95 °C), wird interessanterweise auf den geprägten Stellen immer noch Calcit gebildet. Potentiometrische Titrationen zeigten, dass die Zahl der zugänglichen Carboxygruppen im geprägten Polymer ($39 \mu\text{mol g}^{-1}$) weit höher ist als im Kontrollpolymer ($10 \mu\text{mol g}^{-1}$), jedoch niedriger als der theoretische Wert ($79 \mu\text{mol g}^{-1}$). Außerdem konnte man zeigen, dass die Kristalle in Chloroform eine große Menge an sauren funktionellen Monomeren adsorbierten. Man kann darum annehmen, dass sich die schablonenartigen Stellen mit frei zugänglichen Carboxygruppen angereichert haben.

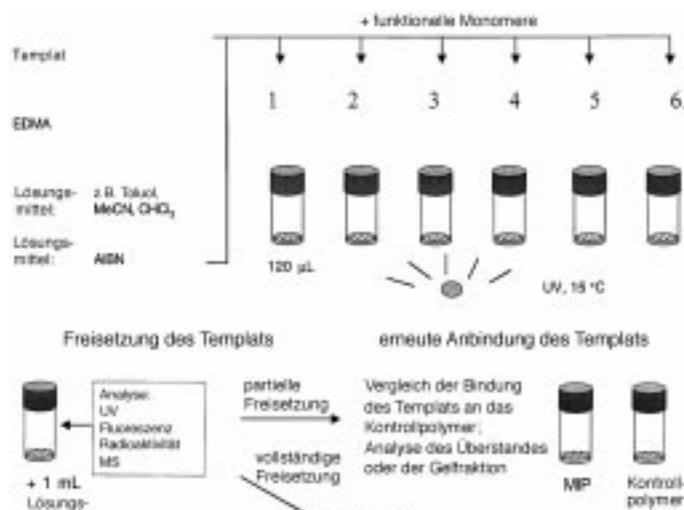
In welchem Maße können frei zugängliche, dicht gepackte Säuregruppen die Struktur im selben Sinne in eine Richtung steuern? In einer früheren Arbeit berichteten Tremel und Mitarbeiter, dass durch Selbstorganisation auf Gold gebildete Monoschichten von Alkanthiolen, die in ω -Stellung durch Carboxy- und Sulfonylgruppen funktionalisiert waren, ein ähnliches Ausmaß an struktureller Kontrolle ausüben können.^[36] Leider erhöhen nach der Arbeit von Vulfson et al. mit Aragonit geprägte Polymere die Kristallkeimbildung von Aragonit nicht, was den vorgeschlagenen Mechanismus sonst stark untermauern würde.

Im Zusammenhang mit dem Kristall-Imprinting-Konzept erkennt man einige Ähnlichkeiten mit einem kürzlich erneut aufgekommenen Vorschlag^[37] für den Erkennungsmechanismus durch nichtkovalent geprägte Polymere.^[38] Danach soll das Templat, das nach der Templatentfernung im Polymer zurückbleibt, bei der erneuten Templatbindung als Kristallkeimbildungsstelle für das Templat wirken können. Auf diese Weise sind die tatsächlichen Bindungsstellen komplementär zu kleinen Templatclustern. Mit dieser interessanten Theorie lässt sich das Adsorptionsverhalten in einigen Systemen erklären (man achte besonders auf den Einsatz von Cholesterin-Monomeren zur Prägung für Cholesterin **11**),^[30] speziell bei niedriger Besetzung der Bindungsstellen. Allerdings lassen im Unterschied hierzu die üblicherweise beobachteten Bi- oder Tri-Langmuir-Adsorptionsisothermen^[39] ein echtes Rezeptorverhalten erkennen (beispielsweise im Fall von **8**).^[23]

Schnelle Synthese und Screening großer Gruppen von Polymeren

Ein Schlüssel zur Entwicklung neuer geprägter Polymere ist die Identifizierung und Optimierung der wichtigsten Faktoren, die die Struktur und die Fähigkeit zur molekularen Erkennung der Substanzen beeinflussen. Dies können die Art der Monomere oder das Verhältnis von funktionellem zu quervernetzendem Monomer sein, der Polymerisationsinitiator, Temperatur, Druck oder das Lösungsmittel für die Polymerisation.^[16] Das augenblicklich angewandte Monolith-Verfahren – d.h. die Synthese des Polymers als Block, der dann zermahlen und gesiebt werden muss – ist zeitaufwändig, so dass eine sorgfältige Optimierung aller Faktoren, die die Substanzeigenschaften beeinflussen, nicht möglich ist.

Ein Weg, dieses Problem zu umgehen, besteht, wie in zwei neueren Mitteilungen der Arbeitsgruppen von Takeuchi^[9] und Sellergren^[10] vorgeschlagen, darin, die Substanzmenge auf etwa 50 mg zu verringern und die Synthese in kleinen Gefäßen durchzuführen, die eine automatisierte Probenhandhabung ermöglichen (Schema 6). Da bei dieser Substanzmenge das Polymer als Schicht auf dem Boden des Reaktionsgefäßes bleibt, ist die Diffusion des Templat zwischen den Schichten schnell genug, um das Polymer *in situ* ohne Aufarbeitung zu analysieren. Dies beschleunigt die Synthese und die Substanzzanalyse beträchtlich. Automatisiert man dieses Verfahren mit einer einfachen Ausrüstung für die Handhabung der Proben, so lassen sich schätzungsweise über 100 Substanzen innerhalb von 24 Stunden parallel verarbeiten und analysieren. Die Methode ist nach früheren Versuchen



Schema 6. Zur Automatisierung geeignete kombinatorische Imprinting-technik.

reproduzierbar, und man konnte durch einen Vergleich der Selektivität des Ansatzes im kleinen Maßstab mit Ansätzen für entsprechende Substanzen im normalen Maßstab feststellen, dass sie funktioniert. Ein vernünftiger Syntheseansatz für MIPs lässt sich darum vielleicht bald verwirklichen.

Schlussbemerkung

Unter den hier diskutierten Systemen ist das Imprinting kleiner Moleküle bis heute am weitesten ausgereift. Gleichwohl gibt es einige Beschränkungen, die echte Anwendungen dieser Substanzen verhindern. Eine hiervon ist die Erkennung von Templayen bei niedriger oder hoher Polarität. Im ersten Fall liegt das Problem darin, dass es keine Monomere gibt, die hinreichend stabile Monomer-Templat-Anordnungen bilden. Im zweiten Fall kann man nur eine geringe Löslichkeit in den üblicherweise verwendeten organischen Monomer-Lösungsmittelsystemen erwarten. Dies trifft für eine ganze Reihe wichtiger Biomoleküle zu, die als Target dienen. Weitere Probleme sind die geringe Ausbeute an Bindungsstellen hoher Affinität und die daraus folgende unspezifische Bindung, eine schlechte Zugänglichkeit der Bindungsstellen und das Fehlen praktischer und preiswerter Methoden zur Herstellung der Substanzen. Selbst wenn man diese Probleme schließlich lösen kann, bleibt noch die Konkurrenz mit biologischen oder synthetischen Erkennungselementen. Der eigentliche Test für diese molekular geprägten Materialien wird darin bestehen, ob man sie bei vergleichbaren Erkennungseigenschaften preiswerter und schneller herstellen kann als ihre Gegenstücke.

- [1] R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips, R. J. Poljak, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1987**, *16*, 139–159.
 [2] A. Fersht, *Enzyme structure and mechanism*, W. H. Freeman, New York, 1985.

- [3] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347–1362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304–1319.
 [4] P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 327–336.
 [5] G. Street (Hrsg.), *Highly Selective Separations in Biotechnology*, Blackie, Glasgow, 1994.
 [6] G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958–1979; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812–1832.
 [7] R. A. Bartsch, M. Maeda, *ACS Symp. Ser.* **1998**, *703*.
 [8] F. H. Dickey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1949**, *35*, 227–229.
 [9] T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 285.
 [10] F. Lanza, B. Sellergren, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2092–2096.
 [11] J. U. Klein, M. J. Whitcombe, F. Mulholland, E. N. Vulfson, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2100–2103; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2057–2060.
 [12] M. J. Whitcombe, M. E. Rodriguez, P. Villar, E. N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105–7111.
 [13] H. Shi, W.-B. Tsai, M. D. Garrison, S. Ferrari, B. D. Ratner, *Nature* **1999**, *398*, 593–597.
 [14] C. Alexander, E. N. Vulfson, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 751–755.
 [15] S. M. D'Souza, C. Alexander, S. W. Carr, A. M. Waller, M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, *Nature* **1999**, *398*, 312–316.
 [16] B. Sellergren, *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 164–174.
 [17] B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853–5860.
 [18] B. Sellergren, K. J. Shea, *J. Chromatogr.* **1993**, *635*, 31.
 [19] M. H. Abraham, P. P. Duce, D. V. Prior, D. G. Barrat, J. J. Morris, P. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 1355–1375.
 [20] G. Albrecht, G. Zundel, *Z. Naturforsch. A* **1984**, *39*, 986–992.
 [21] L. I. Andersson, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 313–322.
 [22] L. I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4788–4792.
 [23] K. J. Shea, D. A. Spivak, B. Sellergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368–3369.
 [24] G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, *361*, 645–647.
 [25] M. J. Whitcombe, L. Martin, E. N. Vulfson, *Chromatographia* **1998**, *47*, 457–464.
 [26] G. Lancelot, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7037.
 [27] G. Wulff, T. Gross, R. Schönfeld, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2050–2052; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1962–1964.
 [28] H. Asanuma, M. Kakazu, M. Shibata, T. Hishiya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **1997**, 1971–1972.
 [29] S. A. Piletsky, H. S. Andersson, I. A. Nicholls, *Macromolecules* **1999**, *32*, 633–636.
 [30] B. Sellergren, J. Wieschemeyer, K.-S. Boos, D. Seidel, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 4037–4046.
 [31] B. Sellergren, L. I. Andersson, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3381–3383.
 [32] K. J. Shea, G. J. Stoddard, D. M. Shavelle, F. Wakui, R. M. Choate, *Macromolecules* **1990**, *23*, 4497–4507.
 [33] Ein früher beschriebenes Beispiel findet sich bei M. Glad, O. Norrlöw, B. Sellergren, N. Siegbahn, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 11–23.
 [34] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, *271*, 67–69.
 [35] S. Mann, *Nature* **1993**, *365*, 499–505.
 [36] J. Küther, R. Seshadri, W. Knoll, W. Tremel, *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 641–650.
 [37] J. L. Morrison, M. Worsley, D. R. Shaw, G. W. Hodgson, *Can. J. Chem.* **1959**, *37*, 1986–1995.
 [38] A. Katz, M. E. Davis, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4113–4121.
 [39] Y. Chen, M. Kele, P. Sajonz, B. Sellergren, G. Guichon, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 928–938.
 [40] G. Wulff, W. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 2799–816.
 [41] K. J. Shea, T. K. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1091–1093.
 [42] B. Sellergren, K. J. Shea, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1403.
 [43] P. K. Dahl, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7417–7418.