

## Biomimetik und Bioanalytik

# Molekularer Abdruck oder Selektion bei der Erzeugung biomimetischer Specifyer

MARCUS M. MENGER<sup>1</sup>, AYSU YARMAN<sup>2</sup>, AYSEL OKTAY<sup>2</sup>, FRIEDER W. SCHELLER<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTSTEIL BIOANALYTIK UND BIOPROZESSE (IZI-BB), FRAUNHOFER INSTITUT FÜR ZELLTHERAPIE UND IMMUNOLOGIE, POTSDAM

<sup>2</sup> MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE, FAKULTÄT FÜR NATURWISSENSCHAFTEN, TÜRKISCH-DEUTSCHE UNIVERSITÄT, ISTANBUL, TÜRKIE

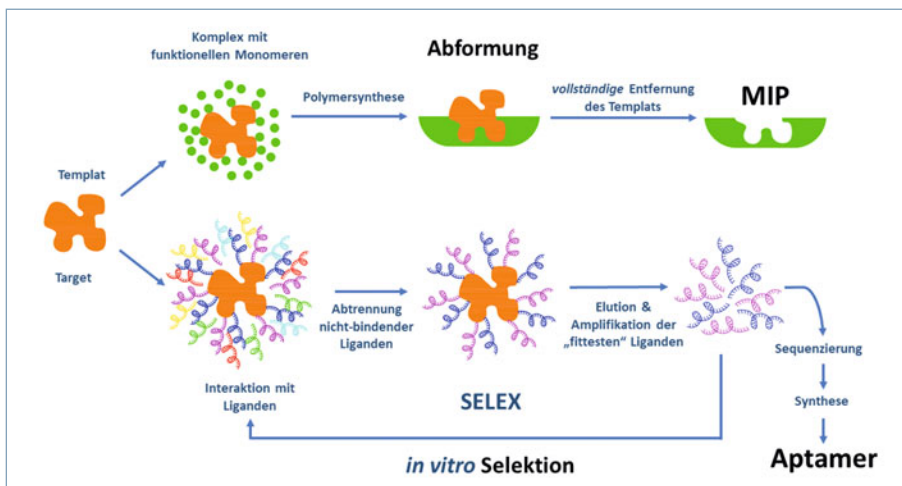
<sup>3</sup> INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE, UNIVERSITÄT POTSDAM

**Aptamers and imprinted polymers (MIPs) for the recognition of low-molecular substances, proteins, nucleic acids, viruses and cells have been developed with the advantage over antibodies of not having to use animals for their production. They can also be generated against toxic substances and structures of low immunogenicity. Their affinities to the target molecules, especially for protein biomarkers, are mostly comparable to those of antibodies. However, the cross-reactivity of highly abundant interferences is still a challenge for MIPs.**

DOI: 10.1007/s12268-023-2064-y  
© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Zum Ersatz oder auch zur Ergänzung von Antikörpern für niedermolekulare Substanzen wie Antibiotika, Umweltgifte und Phar-

maka, aber auch für Proteinbiomarker, Viren und Mikroorganismen in Trennungstechniken, Diagnostik und Therapie, wurden



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Erzeugung von Molekular Geprägten Polymeren (MIPs) im Vergleich mit der Generierung von Aptameren: Beim MIP erfolgt nach der Erzeugung des „Prä-polymerisationskomplexes“ aus Template und funktionellen Monomeren die Synthese des Polymergerüsts um das Template. Danach wird das Template vollständig aus dem Polymer entfernt, sodass sein Abdruck im Polymer zurückbleibt. Bei der Entwicklung von Aptameren wechselwirken verschiedene Liganden eines Nukleinsäure-Pools mit dem Target. Nach Abtrennung nicht-bindender Oligonukleotide erfolgt die Elution Target-bindender Liganden, welche für einen weiteren *in vitro*-Selektionszyklus amplifiziert und in einzelsträngige Sequenzen überführt werden. Dieser iterative Prozess (ca. 8-15 Zyklen) selektiert die „fittesten“ Binder (Aptamere), die nach Sequenzanalyse dann reproduzierbar chemisch synthetisiert werden können.

Bindermoleküle auf der Basis von Oligonukleotiden (Aptamere) mittels des SELEX-Verfahrens und voll synthetische „Molekular Geprägte (Imprinted) Polymere“ (MIPs) entwickelt. Diese Specifyer können ohne Versuchstiere hergestellt werden und erreichen zu Antikörpern vergleichbare Affinitäten. Sie konnten bereits in zahlreiche Applikationen transferiert werden, aber ihre Synthesekonzepte – Abformung vs. Selektion – können aufgrund ihrer jeweiligen Molekülbasis unterschiedlicher kaum sein (**Abb. 1**).

### Erzeugung von MIPs

Bereits 1921 entwickelte der russische Wissenschaftler Polyakov das erste synthetische Polymer mit „molekularem Gedächtnis“, aus dem später die „Molekular Geprägten Polymere“ (MIPs) hervorgingen. Das Template wird als molekulare Vorlage bei der Polymerisation von Monomeren in das polymere Netzwerk eingebaut und nachfolgend entfernt. Durch den molekularen Abdruck des Templates entsteht eine stöchiometrische Anzahl von Kavitäten im Polymer, die komplementäre Strukturen bevorzugt binden. Die Entwicklung von geprägten Polymeren wurde maßgeblich von Wulff und Mosbach vorangetrieben [1]. Während zu Beginn MIPs auf kleine Moleküle beschränkt waren, können heute geprägte Polymere für Ionen, Stoffwechselprodukte, Pharmaka, Umwelttoxine, Biomakromoleküle, aber auch Zellen, Viren und synthetische Nanopartikel hergestellt werden. In den jährlichen etwa 1.300 Publikationen dominieren MIPs für niedermolekulare Analyte, aber der Anteil von Protein-MIPs liegt schon bei über zehn Prozent [1]. Im Gegensatz zu Antikörpern, die aus den 20 Aminosäuren aufgebaut sind, werden MIPs aus ein bis fünf Monomeren und u. U. einem Vernetzer (*cross-linker*) hergestellt.

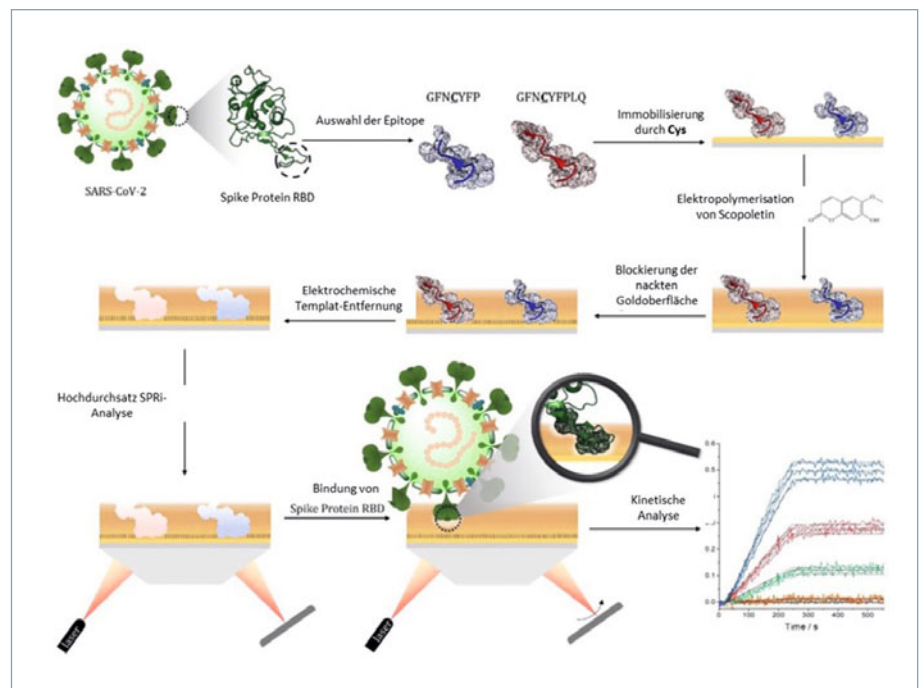
Am Anfang der Entwicklung wurden MIPs als poröse Gele oder Bulk-Polymere durch thermische oder Photopolymerisation von Methacrylsäure-, Vinylimidazol- und Vinylpyridinderivaten hergestellt. Vor der Verwendung in der Stofftrennung oder in Sensoren müssen die Polymerkörper mechanisch

zerkleinert werden. Um die Template-Entfernung zu erleichtern und die Bindungsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde die Dicke der MIP-Schicht verkleinert, sodass das Template nur partiell in das Polymer eingebettet wird. Durch Oberflächen-Imprinting mittels „Selbstpolymerisation“ von Dopamin oder Elektropolymerisation von aromatischen Monomeren können MIPs direkt auf Elektroden, SPR- oder QCM-Chips präpariert werden (**Abb. 2**). Die Festphasensynthese von MIP-Nanopartikeln wird vor allem bei Proteinen, und Nukleinsäuren erfolgreich eingesetzt. Für Viren und intakte Zellen ist das „Microcontact Imprinting“ die Methode der Wahl. Dabei wird das Template in die weiche Präpolymerisationsschicht „gestempelt“.

Nach der Synthese wird das Template durch Temperaturerhöhung, Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke, Behandlung mit Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln aus dem MIP entfernt. Dieser Prozess ist der kritischste Schritt, weil die Struktur und die Funktionalität der Bindungsstellen erhalten bleiben muss und häufig Schwankungen zwischen Chargen verursacht. Die Affinitäten der meisten MIPs liegen bei milli- bis zu nanomolaren Dissoziationskonstanten.

### Generierung von Aptameren

Aptamere sind kurze einsträngige (ss) DNA- oder RNA-Moleküle, die mittels des 1990 nahezu zeitgleich von drei Forschergruppen vorgestellten SELEX-Verfahrens (Systematic Evolution of Ligand by EXponential Enrichment) selektioniert werden [2]. Dabei wird eine Nukleinsäure-Bibliothek zur Auslese (Selektion) analytbindender Spezies mit dem oft trägerfixierten Analyten (Target) durch Inkubation in Wechselwirkung gesetzt [3]. Die Bibliotheksequenzen besitzen neben einem mittleren variablen Teil von ca. 15–60 Nukleotiden definierte Primersequenzen an beiden Enden für die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Bei einem variablen (randomisierten) Teil von 40 Nukleotiden ergibt sich eine theoretische Variabilität von  $1,2 \times 10^{24}$  Sequenzen, eingesetzt werden im SELEX-Verfahren aber nur ca.  $10^{14}$  bis  $10^{17}$  unterschiedliche Oligonukleotide. Trotzdem enthält eine Startbibliothek damit erheblich mehr Spezies als unser Immunsystem. Gesucht werden dabei die eine oder wenigen „Stecknadeln im Heuhaufen“, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip aufgrund ihrer stereoty-



▲ **Abb. 2:** Schema der Herstellung eines MIP-Arrays [4]: Zwei Peptid-Epitope des Spikeproteins von SARS-CoV-2 werden an die Goldoberfläche des SPR-Chips über das zentrale Cys chemisorbiert. Anschließend wird Scopoletin elektrochemisch auf der Goldschicht polymerisiert und nach der Schichtbildung werden die Peptide durch anodische Pulse entfernt. Dabei entstehen Kavitäten im Polymer, die ein Abdruck der Template-Peptide darstellen und deshalb das Spike-Protein spezifisch erkennen.

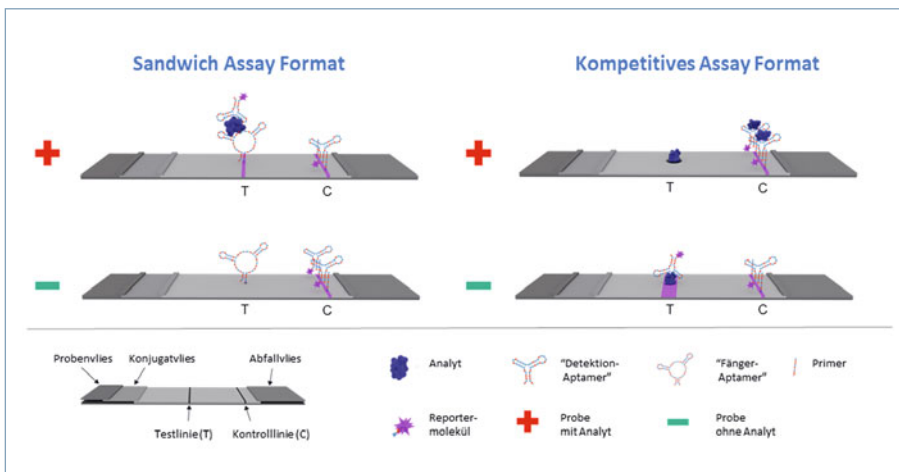
pische 3D-Struktur perfekt zu dem Analyten passen. Nicht bindende Spezies werden unter stringenten Bedingungen abgetrennt und danach die am Target gebundenen Oligonukleotide freigesetzt, mittels PCR vervielfältigt und erneut in ssDNA bzw. RNA überführt. Diese angereicherten Target-affinen („fitten“) Spezies werden in einem neuen Selektionszyklus eingesetzt. Nach ca. 8–15 iterativen Selektionsrunden können mittels Sequenzierung und bioinformatischer Analyse Aptamer-Sequenzen identifiziert werden (**Abb. 1**), deren Affinitäten und Spezifitäten mit diversen analytischen Methoden, z. B. Fluoreszenz-basierten Screeningverfahren und der Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie, überprüft und quantifiziert werden. Die Dissoziationskonstanten (KD) von Aptameren erlangen dabei nicht selten nano- bis pikomolare Konzentrationen. Durch optionale Sequenzverkürzung kann das Molekulargewicht der ca. 15–120 nt langen Aptamere dann bei ca. 5–43 kDa liegen [2].

### Besondere Herstellungsverfahren

Die MIPs-Erzeugung gegen größere Makromoleküle kann durch das „Imprinting“ von

Epitopen, Tags und Labeln erfolgen. Wie bei der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung erkennen MIPs, die eine Substruktur als Template benutzen, das gesamte Makromolekül [4]. Am häufigsten werden N- oder C-terminale Peptide, aber auch exponierte „Epitope“ mit vier bis 20 Aminosäuren, für MIPs zur Bindung von Proteinen eingesetzt (**Abb. 2**, [4]). Eine Herausforderung sind dabei die Unterschiede in der Konformation des Peptids im Template und im Target-Protein. Das Epitope-Konzept wurde erfolgreich auf rekombinante Proteine mit Tags (z. B. His6-, FLAG-Chery-, Strep-Tag) [2], Farbstoff-Labeln von Nukleinsäuren, Oberflächenproteinen oder Zuckern von Viren und Zellen erweitert. Dieses Konzept profitiert von der höheren Stabilität, dem niedrigeren Preis und der leichteren Entfernung des Templates von kleinen Molekülen.

Neue Entwicklungen im SELEX-Verfahren und die Nutzung von Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) konnten Aptamer-Generierungen in der Vergangenheit deutlich verbessern. Bei der Capture-SELEX wird beispielsweise anstelle des Targets der jeweilige Nukleinsäure-Pool einer Selektionsrunde an ein Trägermaterial gebunden.



▲ **Abb. 3:** Prinzip von Aptamer-basierten Streifentests. Beim Sandwich-Assay-Format (**links**) bindet das auf der Testlinie (T) fixierte „Fänger-Aptamer“ das in der Probe enthaltene Analyt-Molekül (+ Zeile) und die weitere Bindung eines zweiten mit einem Reporter-molekül versehenen „Detektion-Aptamers“ erzeugt dann ein Signal auf der Testlinie (Analyt muss hier zwei unabhängige Aptamer-Bindungsstellen besitzen). Im kompetitiven Assay-Format (**rechts**) bindet ein mit einem Reporter-molekül versehenes Aptamer nur in Abwesenheit des Analyten in der Probe (- Zeile) an auf der Testlinie fixierte Moleküle des Analyten. Enthält die Probe jedoch den Analyten (+ Zeile), bindet dieser an das mit einem Reporter-molekül versehene Aptamer, sodass dieses nicht mehr an den auf der Testlinie fixierten Analyten binden kann (Analyt muss nur eine Aptamer-Bindungsstelle besitzen). In beiden Assay-Formaten entsteht zusätzlich immer, also mit und ohne Analyten in der Probe (+ und - Zeile), ein Signal auf der Kontrolllinie (C) durch Bindung des mit einem Reporter-molekül versehenen Aptamers mittels Hybridisierung an ein kurzes Oligonukleotid (Primer). Bild: © W. Sabrowski und S. Wieser, Fraunhofer IZI-BB.

Dies wird insbesondere für Aptamer-Selektionen gegen niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) angewendet, z. B. bei der posttranskriptionellen Beeinflussung der Genexpression durch Riboswitches. Des Weiteren konnte mittels magnetischer Partikel als Trägermaterial der SELEX-Prozess teil- bis vollautomatisiert werden, was parallele und schnellere Aptamer-Selektionen erlaubt. Neben XNA-Aptameren und Spiegelmeren, bestehend aus den Nuklease-resistenten unnatürlichen L- anstatt D-Nukleinsäuren, sind die ebenfalls chemisch modifizierten Varianten SOMAMers („Slow Off-rate Modified Aptamers“) und Clickmers zu nennen. Letztere erlauben schon im SELEX-Verfahren den gezielten Einbau bzw. die Kopplung von zusätzlichen hydrophilen oder hydrophoben Resten an spezifische Nukleinbasen und können dadurch die Affinitäten und Spezifitäten von Aptameren deutlich verbessern [5].

### Anwendungen von MIPs und Aptameren

MIPs werden bereits in der Chromatographie und Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt und stehen vor der Routineanwendung in der Analytik von niedermolekularen Substanzen,

wie Antibiotika, Umweltgifte und Pharmaka, aber auch für Proteinbiomarker, Viren und Mikroorganismen. Die Auslese der MIP-Sensoren und Arrays benutzt die gleichen Methoden und Assay-Formate wie Immunsensoren oder DNA-Chips. Die „Querempfindlichkeit“ in „Realproben“ wie Serum oder Abwasser ist immer noch eine Herausforderung für den Routineeinsatz.

Die chemische Stabilität der MIPs erlaubt den Einsatz in organischen Lösungsmitteln, z. B. in Extrakten, und bei erhöhten Temperaturen. Außerdem ist der Preis im Vergleich zu Antikörpern niedriger. Trotz dieser offensichtlichen Vorteile haben MIPs bisher nur einen beschränkten kommerziellen Erfolg erzielt.

Aptamere konnten ebenfalls erfolgreich in unterschiedlichste Anwendungsgebiete und einige kommerzielle Produkte transferiert werden. Insbesondere analytische Applikationen dominieren diesen Transfer bisher, wie langjährige Publikationsanalysen zu Aptameren belegen. Im Jahr 2022 behandelten ca. 1.000 der ca. 2.800 erschienenen Aptamer-Publikationen das Thema „Aptasensor“ bzw. „Aptamer-basierter Biosensor“. Diese Aptasensoren nutzen Aptamere als Rezeptoren in Verbindungen mit elektroche-

mischen, mechanischen oder optischen Wandlern (*transducer*) [6]. Nicht erst seit der Covid-19-Pandemie wurden Aptamere auch in Streifentests (LFA, *lateral flow assay*) oder Mikrotiterplatten-basierten Laboranalysen in kompetitiven oder Sandwich-Assay-Format eingesetzt (**Abb. 3**, [7, 8]). Mehrere kommerzielle Aptamer-Produkte sind schon am Markt zu finden, z. B. für Image-Verfahren die FLAPs („Fluorescent Light-up Aptamers“), bekannt auch als Spinach, Broccoli, Mango und Corn. Seit langen gibt es auch eine Hot-Start-Polymerase von New England Biolabs, deren Enzymaktivität mittels Aptamer bis zu einer Temperatur von 45 °C blockiert wird [9].

Im Bereich der therapeutischen Aptamere sind das erste bereits 2004 von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zugelassene Macugen zur Behandlung von Erwachsenen mit „feuchter“ altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) und das 2023 FDA-zugelassene Izervay zur Behandlung von geografischer Atrophie (GA) zu nennen. Neben diesen modifizierten kurzen RNA-Aptameren befinden sich weitere vielversprechende Aptamer-Kandidaten in den klinischen Phasen 1–3 [9], z. B. aktuell auch das Autoantikörper-bindende BC007-Aptamer, das schwerste Symptome von vier Long-Covid-Patienten verschwinden ließ.

Für Aptamere wird derzeit insgesamt ein Weltmarkt von 2,16 Milliarden Dollar für 2023 mit einer Wachstumsrate von 23 Prozent in den nächsten fünf Jahren erwartet [10].

### Danksagung

Wir bedanken uns beim PTJ und BMBF für die Unterstützung (03RU1U111D und 03RU1U115D von M.M.M.) und bei der Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen der Exzellenz-Strategie (EXC 2008–390540038 von A.Y. und F.W.S.). ■

### Literatur

- [1] Zhang X, Yarman A et al. (2023) Imprinted Polymers on the route to plastibodies for biomacromolecules (MIPs), viruses (VIPs) and cells (CIPs). *Trends in Biosensing Research: Advances, Challenges and Applications*. Springer Nature, doi: 10.1007/10\_2023\_234
- [2] Menger M, Yarman A, Erdosy J et al. (2016) MIPs and Aptamers for Recognition of Proteins in Biomimetic Sensing. *Biosensors (Basel)* 6: 35
- [3] Wochner A, Menger M, Orgel D et al. (2008) A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Anal Biochem* 373: 34–42
- [4] Bognár Z, Supala E, Yarman A et al. (2022) Peptide epitope-imprinted polymer microarrays for selective protein recognition. Application for SARS-CoV-2 RBD protein. *Chem Sci* 13: 1263–1269
- [5] Mayer G, Menger MM (2023) *Nucleic Acid Aptamers*. 2. Aufl. Humana New York, NY

[6] Kleinjung F, Klussmann S, Erdmann VA et al. (1998) High-Affinity RNA as a Recognition Element in a Biosensor. *Anal Chem* 70: 328–331

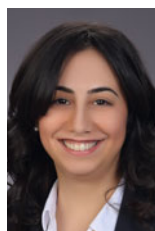
[7] Majdinasab M, Badea M, Marty JL (2022) Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals (Basel)* 15: 90

[8] Dreyman N, Sabrowski W, Danso J, Menger MM (2022) Aptamer-Based Sandwich Assay Formats for Detection and Discrimination of Human High- and Low-Molecular-Weight uPA for Cancer Prognosis and Diagnosis. *Cancers (Basel)* 14: 5222

[9] Kaur H, Bruno JG, Kumar A, Sharma TK (2018) Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* 8: 4016–4032

[10] The Business Research Company (2023) Aptamers Global Market Report 2023. [www.researchandmarkets.com/report/aptamer](http://www.researchandmarkets.com/report/aptamer)

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Marcus M. Menger, Aysu Yarman, Aysel Oktay und Frieder W. Scheller (v. l. n. r.)

**Korrespondenzadresse:**

Prof. Dr. Frieder W. Scheller  
 Institut für Biochemie and Biologie  
 Universität Potsdam  
 Karl-Liebknecht-Straße 25-26  
 D-14476 Potsdam  
[frieder.scheller@uni-potsdam.de](mailto:frieder.scheller@uni-potsdam.de)