Universität Stuttgart
Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik

Fraunhofer IGB

Geprägte Polymernanopartikel zur molekularen Wiedererkennung von Wirkstoffen

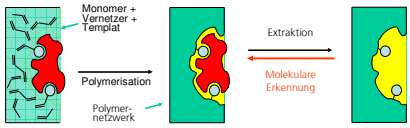
Tino Schreiber[1], Jürgen Riegler[1,2], Carmen Gruber-Traub[2], Thomas Hirth[1,2], Günter Tovar[1,2]

[1] Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik IGVT, Universität Stuttgart,
[2] Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB,
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart, Guenter.Tovar@igb.fraunhofer.de

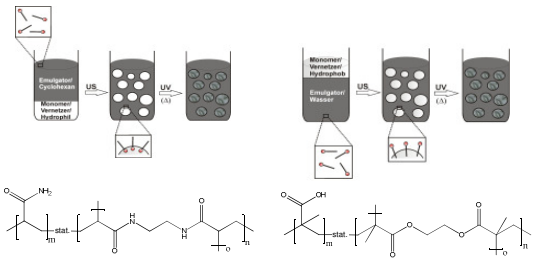
Einführung

Molekulare Erkennung spielt eine entscheidende Rolle in der Natur und ist fundamental für viele Techniken, in denen Detektion und Separation Anwendung finden. Synthetische Polymere mit molekularen Binde- und Erkennungsstellen auf Basis von *molecular imprinted polymers* MIPs stellen eine interessante Alternative zu konventionellen Bindematrizes auf Basis biologischer Moleküle dar. [1-5] MIPs überwinden dabei Einschränkungen in ihrer Handhabung, beispielsweise der limitierten Stabilität von Antikörpern und Enzymen in organischen Lösemitteln und bei extremen pH-Werten. Zusätzlich besitzen sie ökonomische und ökologische Vorteile. Im Vergleich zu beispielsweise monoklonalen Antikörpern, können diese kostengünstig und im besten Fall recycelbar hergestellt werden. Molekulares Prägen von Polymeren verläuft dabei folgendermaßen: Ein molekulares Templat wird im an Monomere gebunden und bildet eine geprägte Vorstufe für eine nachfolgende Polymerisation. Diese Vorstufe kann durch ionische, kovalente oder koordinative Bindung erzeugt werden. Der Monomer-Templat-Komplex wird beispielsweise radikalisch polymerisiert und anschließend das Templat extrahiert – im Idealfall verbleiben spezifische Bindungsstellen für das Templat im Polymernetzwerk. Zur Vergrößerung der nutzbaren Polymeroberfläche und damit zur Erzeugung einer großen Zahl an Prägestellen werden MIPs in Form von Nanopartikeln (NanoMIPs) hergestellt.

Konzept Molekulares Prägen



Synthese NanoMIPs



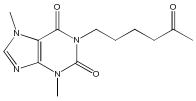
Inverse Miniemulsionspolymerisation

Kontinuierliche Phase: Emulgator + Cyclohexan
Dispergierte Phase: Monomere gelöst in Wasser + Lipophob (PBS-Puffer)

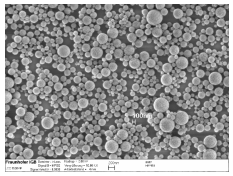
Direkte Miniemulsionpolymerisation

Kontinuierliche Phase: Emulgator + Wasser
Dispergierte Phase: flüssiges Monomer + Hydrophob

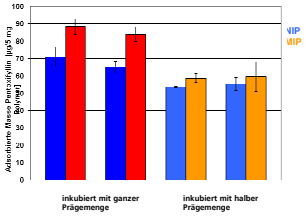
NanoMIPs zur Reinigung von Abwasser



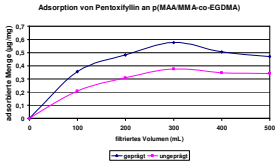
Ein Arzneimittel im klinischen Abwasser - Pentoxifyllin



REM-Aufnahme von Pentoxifyllin-geprägten EGDMA/MAA-Nanopartikeln



Statische Adsorptionsversuche.

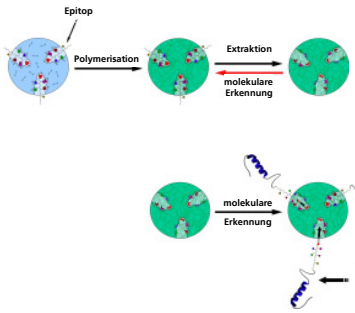


Dynamische Adsorptionsversuche

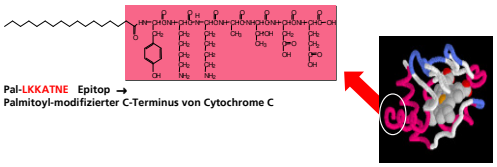
Molekulare Erkennung von Pentoxifyllin in Wasser

Epitop-Ansatz

Cytochrom C als Modell für einen Proteinwirkstoff. [6]

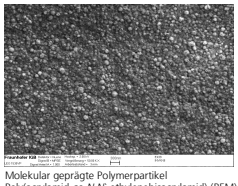


Epitop-Prägen zur Wiedererkennung von Cytochrome C

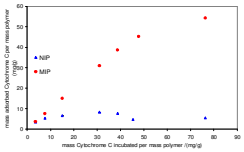


Pal-LKKATNE Epitop →
Palmitoyl-modifizierter C-Terminus von Cytochrome C

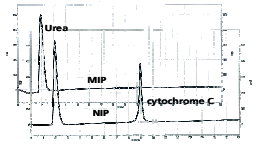
Cytochrome C



Molekular geprägte Polymerpartikel
Poly(acrylamid-*co*-*N*,*N*'-ethylenebisacrylamid) (REM)



Vergleich der Adsorption von Cytochrome C auf NIPs vs. MIPs bei konstanter Temperatur



HPLC-Chromatogramme von NIP- und MIP ausgesetztem Cytochrom C

Vorversuche zum Prägen eines Proteins

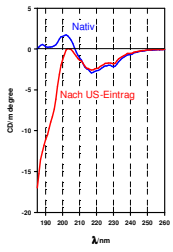
Proteine wurden bislang erst selten zum molekularem Prägen eingesetzt. [7] Die definierte Grenzfläche zwischen polymerisierendem Partikel und kontinuierlicher Phase könnte das Prägen von Proteinen ermöglichen. Dazu wurde zunächst der Einfluss des Eintrags von Scherkräften per Ultraschall untersucht.

Technische Daten zur Erzeugung einer MiniemusIsion via Ultraschallstab

- Digital Sonifier 450-D Branson; 20 kHz (US)
Power output through cavitation 30 W
- 2 min, 10 s/5 s Pause

Unter Emulgierbedingungen wird das Protein denaturiert.

Alternative Ansätze zur Erzeugung von MIPs werden derzeit etabliert:



CD-Aufnahmen eines bei Emulgierbedingungen denaturierten Proteins

Zusammenfassung und Ausblick

✓ Pentoxifyllin-geprägte Nanopartikel wurden erfolgreich hergestellt. Im Durchflussverfahren wird dabei der Prägeeffekt besonders sichtbar.
✓ Cytochrom C als Modellprotein für Wirkstoffe auf Proteinbasis konnte erfolgreich durch MIPs erkannt werden.

Nächste Schritte:
➢ Alternativer Emulgiermethoden werden entwickelt, um die Struktur der Template bei der Prägung nicht zu verändern.
➢ Zur besseren Abtrennung werden magnetisierbare molekular geprägte Polymernanopartikel entwickelt.

Literatur

[1] Sellergren, B. *Molecularly imprinted polymers*; 1 ed.; Elsevier: Amsterdam, **2001**.
[2] Landfester, K. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 765-768.
[3] Vaihinger, D.; Landfester, K.; Kräuter, I.; Brunner, H.; Tovar, G. Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203 (13)*, 1965-1973.
[4] Weber, A.; Dettling, M.; Brunner, H.; Tovar, G. Isothermal titration calorimetry of MIP nanospheres, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *14*.
[5] Lehmann, M.; Dettling, M.; Brunner H.; Tovar G. Affinity parameters of amino acid derivative binding to molecularly imprinted nanospheres consisting of poly[ethylene glycol dimethacrylate-co-methacrylic acid], J. Chromatogr. **2004**, 43, 808.
[6] Gruber-Traub C.; Weber, A.; Dettling M.; Herz M.; Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, G.; NANOCYTES-inverse miniemulsion polymerization technology for specific protein recognition; *Polymer Preprints*, **2006**, *47*, 901-902.
[7] Shi, H.; Tsai, W.-B.; Garrison, M. D.; Ferrari, S.; Ratner, B. D.; Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition; *Nature* **1999**, 398, 593-597.

Danksagung

Die Autoren dieses Posters danken Monika Riedl (Fraunhofer IGB) für REM-Aufnahmen, Dr. Uwe Gerken (Universität Hohenheim) für Aufnahmen von CD-Spektren und Klaus Niedergall (Universität Stuttgart, IGVT) für technische Unterstützung.

Weiterhin danken wir dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die im Projekt AKNanoMIP (0312036B) und dem Umweltministerium des Landes Baden-Württemberg für die im Projekt Micropollutants (BUT 006) zur Verfügung gestellten Mittel.