# Abschlussbericht zum Verbundprojekt

## Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien

## Akronym: BiGRUDI

### Teilprojekt: Validierung von Aptameren

**Zuwendungsempfänger:** PD Dr. Andreas Kage

FAK. III – Prozesswissenschaften Institut für Biotechnologie
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie c/o Tempelhofer Weg 11/12
10829 Berlin

**Förderkennzeichen:** 13N9599

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.05.2008 – 31.12.2011 (incl. kostenneutrale Verlängerung)

## I. Zusammenfassende Darstellung

### 1. Aufgabenstellung

Als Folge der Anschläge mit Anthraxsporen in den USA im Oktober 2001 häuften sich weltweit, auch in Deutschland, vorgetäuschte Anschläge, bei denen eine Vielzahl von Sendungen mit der Drohung verschickt wurde, Anthraxsporen zu enthalten. Allein im Herbst 2001 mussten in den USA deshalb 120.000 Proben, in Deutschland bereits 5000 Proben untersucht werden. Solche Untersuchungen sind aufwändig, da die Palette der zu BT-Zwecken missbrauchbaren Agenzien Bakterien, Viren und Toxine umfasst, deren Nachweis schwierig ist. Derzeit können die meisten BT-Agenzien verlässlich nur einzeln und in Speziallaboratorien detektiert werden; eine Vor-Ort-Diagnostik ist kaum möglich. Im geplanten Projekt sollen vorhandene Einzelnachweise für BT-Agenzien zu einem automatisierbaren, multiplexfähigen und mobilen Detektionssystem zusammengefasst werden. Kombiniert mit spektroskopischen Nachweismethoden soll eine Diagnostikplattform entstehen, die den simultanen, schnellen und sensitiven Nachweis BT-relevanter Agenzien auch fachfremdem Personal (*first responder*) erlaubt.

• ***Wissenschaftliche bzw. technische Arbeitsziele, angestrebte Innovationen***

Im beantragten Projekt soll erstmals eine schnelle, einfach zu bedienende Diagnostikplattform zur Risikobewertung von BT-verdächtigen Proben entwickelt werden. Zusätzlich werden Methoden zur Sicherung und Asservierung forensischer Proben entwickelt. Aufbauend auf empirischen sozialwissenschaftlichen Methoden wird ein Konzept entwickelt, das den *first responder* im Umgang mit den anfallenden sensiblen Informationen trainiert und ihm eine adäquate Risikokommunikation ermöglicht. Für eine erste, schnelle Risikobewertung vor Ort soll die Matrixsubstanz verdächtiger Proben mittels eines portablen Raman-Spektrometers innerhalb weniger Minuten identifiziert werden. Anschließend sollen vor Ort spezifische Detektionssysteme zum simultanen Nachweis unterschiedlicher BT-Agenzien (Bakterien, Viren, Toxine) aus einer Probe eingesetzt werden, wie das APPROVE-B System von Zenteris, das ABICAP System (Antibody Immuno Column for Analytical Processes) des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie (FZMB) und die MALDI-TOF Massenspektroskopie (MS). Erstere Plattformen sind für den Nachweis einzelner Krankheitserreger bereits evaluiert, letztere für Toxine. Als Detektionsreagenzien für die Multiplex-fähigen Plattformen werden spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper (mAK, IgY) sowie Aptamere (DNA, RNA) neu entwickelt. Da die Aptamer-Selektion ein *in vitro* Prozess ist, können sehr schnell spezifische Detektionsreagenzien für schwach immunogene, neu auftretende oder modifizierte BT-Agenzien entwickelt werden. Die Umsetzung der entwickelten Detektionsreagenzien auf multiplexfähige Detektionsplattformen erfordert zuerst die biophysikalische und biologische Charakterisierung des Bindungsverhaltens der jeweiligen Detektionsreagenzien. Daraus werden Vorhersagealgorithmen abgeleitet, die die Auswahl von optimalen Bindungspartnern für die multiple Detektion weiterer BT-Agenzien beschleunigen soll. Schließlich sollen auch die in den letzten Jahren am RKI entwickelten PCR-basierten Methoden zum Nachweis von BT-Agenzien in die neu entwickelten Nachweissysteme integriert werden. Durch die Generierung verlässlicher, bislang limitierter, eigener Detektionsreagenzien für BT-Agenzien wird für Deutschland die Unabhängigkeit in der Versorgung sicher gestellt.

1. **Voraussetzung, unter denen das Projekt durchgeführt wurde**
2. **Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das beantragte Projekt wurde von den KMU **Zenteris**, **Scienion, GenExpress** und **FZMB** sowie den Forschungsinstitutionen Technische Fachhochschule Wildau (TFHW), zwei Instituten der **HU Berlin**, der **FU Berlin,** der **PU Marburg** und dem **RKI** durchgeführt. RKI, FU Berlin, HU Berlin, PU Marburg, TFHW und GenExpress waren zuständig für die Entwicklung und Charakterisierung der Detektionsreagenzien. Zenteris, Scienion und FZMB etablierten die ausgewählten Detektionssysteme mit Schwerpunkt Multiplexfähigkeit bei Verwendung der entwickelten Detektionsreagenzien. Wegen besonderer Sicherheitsvorkehrungen für den Umgang mit den zu testenden BT-Agenzien (BSL-3) übernahm das RKI die biologische Charakterisierung der Detektionsplattformen. Als Endnutzer definierten BBK (in Zusammenarbeit mit BKA und LGA) und RKI die technischen Anforderungen an die Plattformen und begleiteten die Realisierung unter den Gesichtspunkten der Alltagstauglichkeit. Einsatzstrategien für *first responder* werden entwickelt, die die Probennahme sowie Risiko- und Krisenkommunikation sachgerecht und problembezogen ermöglichen. Die Koordinierung des Projektes wurde vom RKI übernommen, welches als Bundesoberbehörde des BMG in Berlin für die Untersuchung von Gefahrenproben in Bundeseinrichtungen, Botschaften und jüdischen Einrichtungen verantwortlich und damit auch Endnutzer der zu entwickelnden Detektionsplattformen ist.

**4. wissenschaftlicher und technischer Stand zum Zeitpunkt des Projektbeginns**

Der wissenschaftliche und technische Stand war zum Zeitpunkt des Projektbeginns wir folgt:

**Detektionsplattformen.** Derzeit können BT-Agenzien nur **einzeln** schnell und sicher detektiert werden. Zur **simultanen Detektion** mehrerer Agenzien **aus einer komplexen Probe** bietet sich die Microarray-Technologie an, die derzeit noch umfangreiches Laborequipment und hochspezialisiertes Personal benötigt. Für den Vor-Ort-Nachweis von BT-Agenzien soll die innovative **Array-fähige APPROVE-B Plattform** (Zenteris) sowohl für Nukleinsäure-als auch Aptamer-und Antikörper-basierte Assays ausgerüstet werden. Parallel werden diese Detektionsreagenzien in die **ABICAP-Plattform** (Antibody Immuno Column for Analytical Processes) implementiert und zur automatisierten Multiplex-Messung von BT-Agenzien ausgebaut.

Mit der **Laser-Raman-Spektroskopie** können Umweltproben direkt und innerhalb von Sekunden analysiert werden. Portable Geräte sind kommerziell erhältlich und können

Mikroorganismen in Reinkultur identifizieren. **Spektren-Referenzdatenbanken** wichtiger BSL-2-Erreger sind am RKI bereits verfügbar. Die spektroskopische Technik ist multiplexfähig und für den automatisierbaren Hochdurchsatz geeignet.

Multiplex-fähige Detektionssysteme, die auf dem US-Markt produziert werden, können die kontinuierliche Versorgung Deutschlands nicht sicherstellen und sind zu teuer für den flächendeckenden Einsatz bei *first respondern*. Eine unabhängige Versorgung der Bundesrepublik mit biochemischen BT-Nachweisreagenzien, z.B. Antikörper gegen BT-Agenzien, zur Vorbereitung auf mögliche B-Gefahrenlagen ist momentan nicht gegeben. Hochspezifische und hochaffine Antikörper sind Voraussetzung für immunologische Nachweisverfahren von BT-Agenzien. Einige BT-Agenzien erkennende Antikörper sind am RKI entwickelt worden und einsatzfähig.

**Aptamere**, kurze DNA-oder RNA-Oligonukleotide, die an 3-dimensionale Strukturen im Zielmolekül binden, werden zunehmend als Alternative zu Antikörpern verwendet. Die Selektion von Aptameren erfolgt über verschiedene Selektionsprinzipien *in vitro* (SELEX, MonoLex). Es wurden Aptamere für die Erkennung von sehr kleinen Strukturen (z.B. Aminosäuren, Peptide) sowie sehr komplexen Strukturen wie Viren entwickelt (z.B. Influenzavirus). Ansätze für die Aptamer-basierte Detektion von Partikeln mittels Chip-Plattformen sind bereits publiziert. Die Real-Time **PCR** eignet sich zum ultrasensitiven Nachweis von Erregergenomen in unter einer Stunde. Für viele BT-Erreger sind am RKI verlässliche PCR-Teste für den Einsatz in Expertenlaboratorien entwickelt worden.

• ***Bestehende Schutzrechte (eigene und Dritter)*** Die **Zenteris GmbH** hat für die bestehenden Nachweissysteme und die **APPROVE-B**-Plattform internationale Patente angemeldet und besitzt für relevante vorbestehende Rechte die exklusive Lizenz. Die **AptaRes AG** besitzt die weltweit alleinigen Anwendungsund Nutzungsrechte der **MonoLex™**-Technologie zur Selektion von Aptameren. Die **SELEX-**Technologie wurde am 11.06.1990 in den USA als Patent angemeldet (US5270163), das noch während der Projektlaufzeit erlischt. Das **ABICAP®**-Verfahren wird von mehreren internationalen Patenten der **Senova GmbH** geschützt. Eine Lizenzvereinbarung mit der Senova GmbH einschließlich aller dazu gehörigen Nutzungsbedingungen erlaubt dem **FZMB** die Weiterentwicklung des ABICAP®-Verfahrens. Die **Scienion AG** besitzt ein internationales Schlüsselpatent für das "**Liquid Handling with Piezoelectronic Actuators**". Dieses Patent deckt den zentralen Teil der **sciFLEXARRAYER**-Technologie zur Herstellung von Biochips ab. Die Silanisierungs-und Photografting-Technologie zur Oberflächenfunktionalisierung ist für die geplanten Anwendungen lizenzfrei.

***Bisherige Arbeiten der Antragsteller***

| | |
|---|---|
| Partner RKI PUM BBK | Bisherige Arbeiten Detektion, Charakterisierung und Bekämpfung von BT-relevanten Bakteien, Viren und Toxinen, Methodenentwicklung, Risikokommunikation im BT-Gefahrenfall Molekularbiologische und Virologische Untersuchungen an Filoviren Arbeiten an hochpathogenen Erregern unter L4 Bedingungen Umsetzung der „Neuen Strategie zum Schutz der Bevölkerung in Deutschand“, Erarbeitung von Grundlagen für den Einsatz chemischer und bioloischer Task Forces |
| + | |
| | Management bioterroristischer Ereignisse |
| LGA<br>BKA | Strafverfolgung, wenn die innere oder äußere Sicherheit der Bundesrepublik Deutschland bedroht ist (z.B. BT-Gefahrenfall) |
| Zenteris<br>Scienion AG<br>GenExpress | Etablierung der Detektionsplattform APPROVE B zum automatisierten Einzelnachweis von Krankheitserregern Entwicklung hochqualitativer Biochips für Anwendungen im Mikroarraybereich Serviceleistungen auf dem Gebiet der Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen |
| Charité (Drs. Kage,Erdmann, Fürste) Schade, Charité<br>FZMB<br>TFHW | Design von Aptamerbibliotheken, Selektion hochaffiner Aptamere, neue Selektionsstrategien für Aptamere Entwicklung der IgY-Antikörpertechnologie Entwicklung der ABICAP-Technologie zur Detektion von Krankheitserregern mittels Immunfiltrationstechnologie Entwicklung und Charakterisierung von Sensoren für Proteine, DNA, Signalmoleküle und reaktive Spezies |

Legende: EN. Endnutzer, KMU: Kleines/Mttleres Unternehmen, WE: wiss. Einrichtung

i

| Firma | Ansprechpartner | Straße, Nr./ Postfach | PLZ, Ort | e-mail |
|---|---|---|---|---|
| Robert Koch-Institut (RKI) | Dr. Heinz Ellerbrok | Nordufer 20 | 13353 Berlin | ellerbrokh@rki.de<br>www.rki.de |
| Philipps-Universität Marburg | Prof. Stephan Becker | Hans Meerwein Str. 2 | 35037 Marburg | becker@staff.uni-marburg.de |

## 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Nachfolgend finden sich die Mitglieder des Verbundprojekts. Mit allen Partner fand ein regelmäßiger Austausch der Arbeitsergebnisse statt.

| Firma | Ansprechpartner | Straße, Nr./ Postfach | PLZ, Ort | e-mail |
|---|---|---|---|---|
| Bundesamt für Bevölkerungs-schutz und Kata-strophenhilfe (BBK) | Dr. Karsten Michael | Provinzialstr. 93 | 53127 Bonn | Karsten.Michael@bbk.bund.de<br>www.bbk.bund.de |
| Bundeskriminal-amt (BKA) | Dr. Uwe Schleenbecker | Thaerstrasse 11 | 65193 Wiesbaden | Uwe.schleenbecker@bka.bund.de;<br>http://www.bka.de |
| Landesgesund-heitsamt Baden-Württem-berg (LGA) | Dr. Günther Pfaff | Nordbahnhofstr. 135 | 70191 Stuttgart | günther.pfaff@rps.bwl.de<br>www.gesundheitsamt-bw.de |
| Zenteris GmbH | Dr. Claudia Gluch | Göschwitzer Str. 25 | 07743 Jena | claudia.gluch@jenoptik.com<br>www.jenoptik.com |
| Scienion AG | Dr. Wilfried Weigel | Volmerstr. 7b | 12489 Berlin | 030 63921700 |
| GenExpress | Ute Böttcher | Eresburgstr. 22-23 | 12103 Berlin | info@genexpress.de<br>www.genexpress.de |
| Charité / Inst. f. Laborato-riumsmedizin und Pathobiochemie | Dr. Andreas Kage | Spandauer Damm 130 | 14050 Berlin | simone.lombardi-borgia@charite.de<br>www.charite.de |
| FZMB GmbH | Peter Münster<br>Dr. Peter Miethe | Geranienweg 7 | 99947 Bad Langensalza | pmuenster@fzmb.de<br>www.fzmb.de |
| Freie Universität Berlin | Dr. Jens P. Fürste<br>Prof. Volker A. Erdmann | Thielallee 63 | 14195 Berlin | fuerste@chemie.fu-berlin.de<br>erdmann@chemie.fu-berlin.de<br>www.fu-berlin.de |
| Charité / Institut für Pharmakologie | Prof. Rüdiger Schade | Dorotheenstr. 94 | 10117 Berlin | Ruediger.schade@charite.de<br>www.charite.de |
| Technische Fach-hochschule Wildau (TFHW) Biosystemtechnik | Prof. Fred Lisdat | Bahnhofstraße | 15745 Wildau | flisdat@igw.tfh-wildau.de<br>www.tfh-wildau.de |

## II. Eingehende Darstellung

### 1. Verwendung der Zuwendung

Die Zuwendung wurde für die Gewinnung der nachfolgend dargestellten Ergebnisse verwendet:

In Absprache mit der Arbeitsgruppe Aptamere wurden ausschließlich Aptamere gegen Viren-Targets isoliert und untersucht. Nachfolgend findet sich die Liste der im Rahmen des Projektes untersuchten Aptamere:

| Aptamer Int. Nummer | Target (Viren) | Aptamer gesammte Zahl |
|---|---|---|
| 176 -195 | Kuh Pocken | 19 |
| 236 – 248 | Camel Pocken | 13 |
| 249-263 | Vaccinia | 15 |
| 325 -333 | Kuh-, Camel-Vaccinia Pocken UV | 9 |
| 334-339 | Camel | 6 |
| 340 -345 | Kuh | 6 |
| 346-349 | Vaccinia | 4 |
| 350-354 | A 27L – Protein | 5 |
| 355-360 | A 33 R -Protein | 6 |
| 361-366 | F13L-Protein | 6 |
| 368-371 | Ebola | 4 |
| 372-375, 367 | Marburg | 5 |
| 376-383 | Ebola | 8 |
| 389,431-439 | Rec. L1R f. baculovirus | 10 |
| 390-404 | Rec. A 27L f. baculovirus | 15 |
| 483-498 | Rec. A 33 R f. baculovirus | 16 |
| | | 147 |

**Initiale Untersuchungen der Spezifität**

Erste Untersuchungen der Spezifität wurden mit Elektrophorese und nachfolgendem Blot durchgeführt.

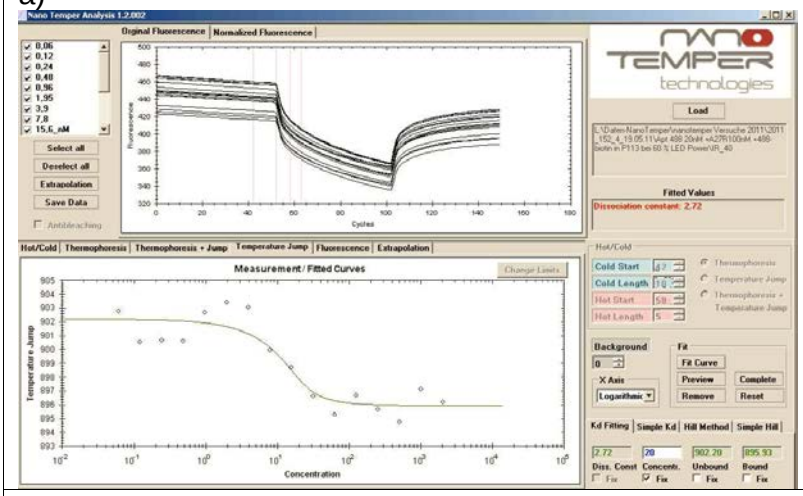
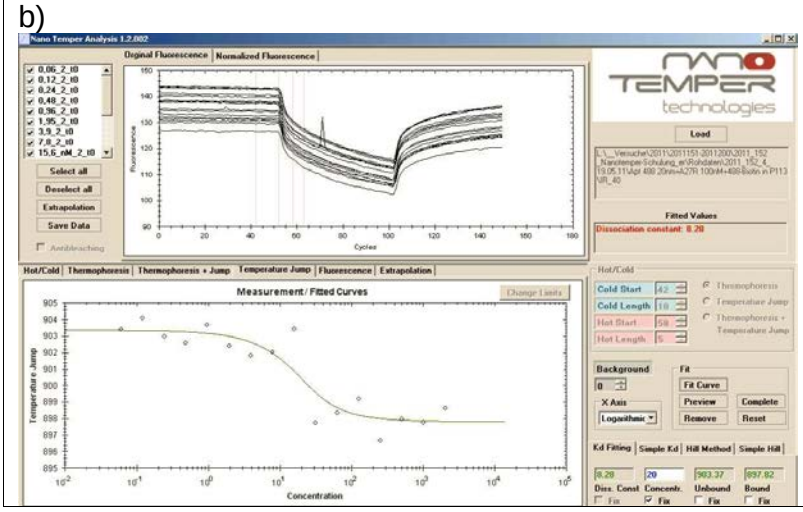
**Weiterführende Untersuchungen zur Spezitätsbestimmung von Aptameren**

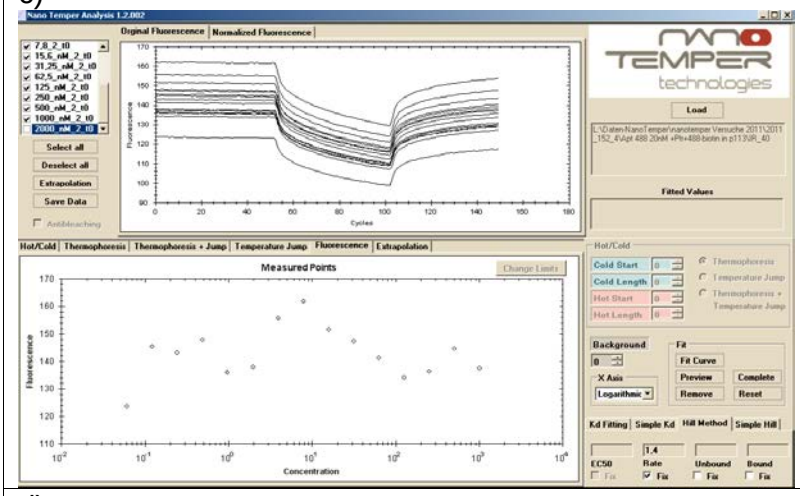
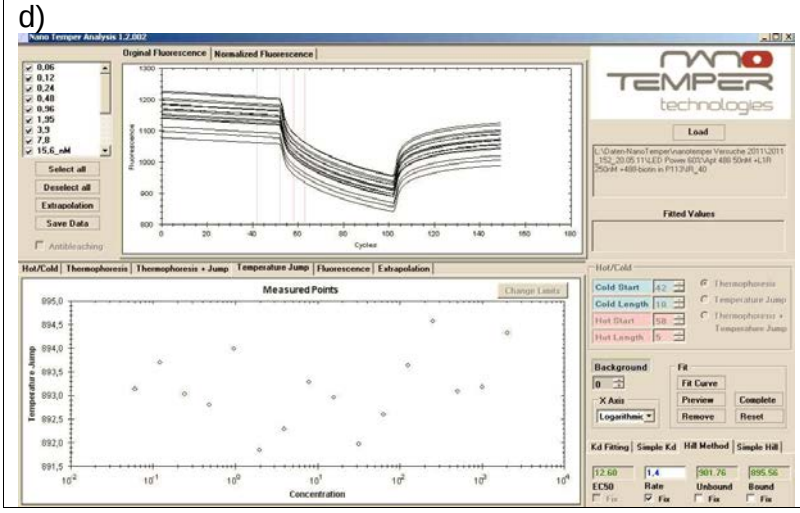
Mit der Thermophorese wurde eine innovative Methode zur Validierung der Aptamerspezifität etabliert und mit dem AlphaLISA ein neues FRET-basiertes Verfahren zur einfachen single reagent and „no-wash“ Quantifizierung von Targets.

**Thermophorese**

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Untersuchung und Validierung von intermolekularen Wechselwirkungen beschrieben. Viele dieser Methoden darunter auch das verbreitete BiaCORE System erfordern eine Immobilisierung einer der beiden Komponenten an einer feste Phase mit der Gefahr einer Beeinflussung der 3D-Struktur dieses Partners. Auch unterliegen Festphasen-Reaktionen Phänomenen, die bis heute noch nicht gänzlich verstanden sind. Der Gel-Shift Assay ist ein verbreitetes Beispiel für Interaktionsanalytik zwei gelöster Partner. Hier wird die Abtrennung des Komplexes von den Einzelkomponenten einer Bindungsreaktion durch ein elektrisches Feld ermöglicht. Beide Gruppen von Verfahren unterliegen erheblichen Einschränkungen bezüglich der verwendbaren Puffer.

Ein anderes Verfahren zur Untersuchung von Wechselwirkungen zweier gelöster Komponenten wurde in den letzten Jahren entwickelt. Es basiert auf dem physikalischen Phänomen eines gerichteten Transportes von Molekülen in einem Temperaturgradienten. Während eine globale Temperaturveränderung in einem System die ungerichtete Braun'sche Molekularbewegung beeinflusst, bewegen sich Moleküle gerichtet in Gegenwart eines Temperaturgradienten. Ursprünglich wurde dieses physikalische Phänomen in Zusammenhang mit der Entstehung von Leben als Kumulation von Biomolekülen in einem durch vulkanische Hitze und kühler Umgebung geprägten wässrigen Umfeld entdeckt und untersucht. Durch Miniaturisierung hat die Fa. NanoTemper, München, ein Gerätesystem entwickelt, das als Prototyp für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt wurde.

| **Screenshots NanoTemper mit allen Einstellungen** | |
|---|---|
| **Screenshots NanoTemper mit allen Einstellungen** | |
| a)<br>  <br><br>b)<br>  <br> | Ein Cy5-markiertes Aptamer gegen rekombinantes A27L Protein (Oberflächenprotein von Pockenviren) wird mit dem Target inkubiert. Unmarkiertes Aptamer wird als kompetitiver Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die Lösung wird in einer Kapillare inkubiert, durch einen IP-Laser wird ein Termopuls gesetzt und die Veränderung der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Ansätze in diesem Spot über die Zeit aufgenommen. Die zeitlichen Verläufe der Rohdaten sind im oberen Kurvenbereich zu sehen. Im unteren Teil sind die Messwerte der verschiedenen Kurven z einer Zeit aufgetragen in eine Interpolationskurve gezeichnet. Die Ergebnisse der beiden Wiederholungsexperimente zeigen eine Affinität zwischen 2 und 9 nmol. |

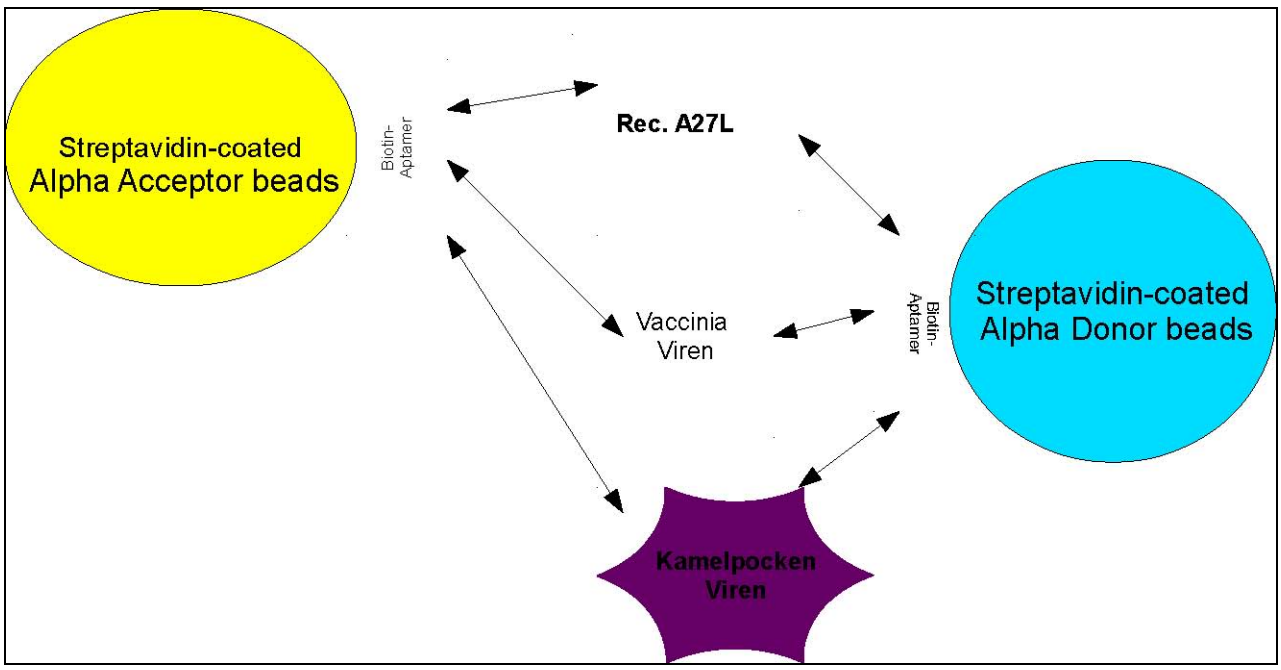
| **Screenshots NanoTemper mit allen Einstellungen** | |
|---|---|
| c)<br>  | Hier die Auswertung der Interaktionen in Abwesenheit des Targets. Keine Interpolation möglich, d.h. keine Wechselwirkung. |
| d)<br>  | Keine auswertbare Kurve gibt es bei Verwendung eines anderen Proteins (L1R), d.h. es gibt keine Wechselwirkung. |

Insgesamt hat sich die Thermophorese als interessante, wenn auch sehr zeitaufwändige Möglichkeit der Interaktion von Aptameren mit ihren Targets gezeigt.

**Entwicklung eines FRET-basierten Sandwich-Assays**

Viele analytische Bindungsverfahren – auch die im BiGRUDI – Projekt verfolgten analytischen Strategien – erfordern eine räumliche Abtrennung der gebundenen von den freien Interaktionspartnern vor dem Auslesen eines Signals. Diese Abtrennung wird landläufig mit

Waschen beschrieben. Eine Alternative zu diesen Verfahren sind die Proximity-Assays. Sie basieren auf dem Prinzip, dass durch die enge räumliche Nähe von Bindungspartnern ein Signal entsteht. Der exponentielle Verlauf des Zusammenhangs Nähe zu Signalstärke führt dazu, dass erst bei sehr großer Nähe (hier ca. 10 nm) ein äußerst großes Signal generiert wird. Ein bekanntes Beispiel sind die sogenannten FRET – Assays, bei dem nach Anregung eines Fluorophors emittierte Photonen von einem in der Nähe befindlichen zweier Fluorophor aufgefangen werden und letzteres ein starkes, spezifisches Fluoreszenz-Signal emittiert. Durch die Verwendung von zeitaufgelöster Fluoreszenz wird ein äußerst geringes Hintergrundsignal z.B. durch die Eigenfluoreszenz von Proteinen erreicht. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein etabliertes System der Fa. PerkinElmer (AlphaLISA) verwendet. Das System besteht aus einem Donor und einem Akzeptor Teilchen, die bei Annäherung nach Fluoreszenzanregung des Akzeptor – Beads einen single-Oxygen-Transfer auf das Donor – bead induzieren, was wiederum zu eines starken Photonen Aussendung des Donor-beads führt. Für das Assay-Design werden die Bindungspartner kovalent an die beiden Beads gekoppelt.




In unseren Untersuchungen haben wir Streptavidin-gekoppelte Donor-und Akzeptor-Beads eingesetzt um biotinylierte Aptamere als Pärchen eines Sandwichdesigns flexibel zu verwenden. Die typischen Signalstärken dieses Assays lagen 4-5 log Stufen über dem Leerwert, die Empfindlichkeit ohne Optimierung des Assays lag bei 50 ng/ml. Durch ein Aptamer-Pärchen spezifische Optimierung der Assaybedingungen konnten Empfindlichkeiten erreicht werden, die deutlich besser als 5 ng/ml lagen. Nach Abschluss der Arbeiten zu diesem Teilprojekt sind in

der Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen zu Optimierungsmöglichkeiten geplant.

| Jahr | 1. Jahr | | | | 2. Jahr | | | | 3. Jahr | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
| **AptaRes (Unterauftragsnehmer)** | | | | | | | | | | | | |
| AP22 Selektion DNA-Aptamere | | | | | | | | | | | | |
| AP23 Amplifikation Aptamere | | | | | | | | | | | | |
| **Charité / Kage** | | | | | | | | | | | | |
| AP24 Design Aptamer Library,Charakteris. DNA-Aptamere | | | | | | | | | | | | |
| AP25 Design effizienter Selektionsstrategien | | | | | | | | | | | | |

## 2. Wichtgste Positionen und Notwendigkeit sowie Angemessenheit der Kosten

In Absprache mit dem Arbeitskreis “Aptamere” wurde die Targetreihenfolge derart verändert, dass nur noch ausschließlich virale Targets eingesetzt werden. So wurden eine Reihe von Aptameren gegen verschiedene virale Targets identifiziert, nachdem die Viren unterschiedlichen Inaktivierungsverfahren unterzogen wurden. Zur Gesamtzahl der Viren siehe Tabelle oben. Die Entwicklung der Aptamere wurde aus einem Budget des RKI übernommen, die Synthese der erforderlichen Aptamere mit entsprechenden Modifikationen waren im Rahmen des vorliegenden Teilprojektes abgedeckt.

Es zeigte sich insbesondere gegenüber dem direkten Vergleich mit der Entwicklung von Antikörpern, dass die Herstellung und Identifizierung von Aptameren erheblich kostenintensiver ist. So ergaben sich Kosten von mehr als 300 Euro für die Synthese und Reinigung eines Aptamers während die Synthese der Antikörper in der Zellkultur mit ca. 1 Euro anzusetzen ist. Dementsprechend konten erheblich weniger Aptamer-Kandidaten im Vergleich zu Antikörpern getestet werden. Der strategische Vorteil der wesentlich geringeren Kosten größerer Synthesemengen durch die einfach skalierbare Synthese von Aptameren auf der Basis eines Bauplanes (Sequenz) wurde in diesem Projekt nicht evaluiert. Sie wird auch nur bei entsprechendem Bedarf standardisierter spezifischer Binder in einem weltweiten Szenario relevant werden. Dies gilt auch für die in diesem Projekt überprüfte Zeit bis zur Verfügbarkeit erster Aptamere, die mit weniger als 2 Monaten kurz war.

Wesentliche Kostenpositionen sind die Kosten für die Materialien des AlphaLISA (PerkinElmer), Gelelektrophorese und Blot (verschiedene Firmen) sowie Säulen für die eigene Aufreinigung der Aptamere (VWR).

**3. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Verwertbare Ergebnisse dieses Projektes sind die erarbeiteten Verfahren zur Validierung von Aptameren für den Einsatz in analytischen Assays (Thermophorese und Proximity-Assay). Voraussetzung hierzu sind allerdings weitergehende Untersuchungen und Optimierungen über das Laufzeitende des Projekts hinaus. Da es sich bei viralen Antigenen offensichtlich um sehr flexible Proteinstrukturen handelt, ist die Abschätzung eines Erfolgs innerhalb eines konkreten Zeithorizonts sehr schwierig. Die erzielten Ergebnisse werden im Erfolgsfall dann von der Patentverwertungsgesellschaft IPAL auf Patentierbarkeit überprüft und ggf. als Patent der TU Berlin angemeldet werden. In jedem Falle können die Daten in den entsprechenden Fachzeitschriften publiziert werden.

**4. Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für das Vorhabens relevant sind**

Im Vergleich zu den Publikationsaktivitäten bis zum Zeitpunkt der Projektbeantragung sind in den letzten Jahren verstärkt Publikationsaktivitäten zur Thematik zu verzeichnen. Das betrifft allgemein die Technologieentwicklicklung (1) genauso wie die einzelnen konkreten Arbeitsschwerpunkte.

Die Viren betreffend sind das projekt-irrelevante Viren (2,3) aber auch relevante Viren, wie das Vaccinia Virus (4,5).

Das gleiche gilt auch für die Toxine. Es wurden Aptamere gegen projektirrelevante Toxine (6) als auch gegen projektrelevante Toxine (7,8) beschrieben.

Für bakterielle Targets wurde eine Arbeit, die ein nicht-projektrelevantes Bakterium zum Inhalt hat, beschrieben (9).

Keine dieser Arbeiten zielt auf das Etablieren eines dem BiGRUDI-Vorhaben vergleichbaren Detektionssystems (APPROVE-B Chiptechnologie) ab. Dennoch sind die Erfahrungen dieser Arbeitsgruppen augewertet und in die Überlegungen und Planungen für das Teilprojekt mit einbezogen worden..

(1) T.M. Gronewold (2009). Aptamers and biosensors. Methods Mol. Biol. 535, 209-222
(2) J.G. Bruno, M.P. Carrillo, T. Phillips (2009) Development of DNA aptamers to a footand-mouth disease peptide for competitive FRET-based detection. J. Biomol. Tech. 19, 109-115
(3) K.T. Shum, J.A. Tanner (2008) Differential inhibitory activities and stabilization of DNA aptamers against the SARS coronavirus helicase. Chembiochem. 15, 3037-3045
(4) Z. Tang, P. Parekh, P. Turner, R.W. Moyer, W. Tan (2009) Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. Clin. Chem. 55, 813-822

(5) L. Saccucci, J.M. Crance, P. Colas, M. Bickle, D. Garin, F. Iseni (2009) Inhibition of vaccinia virus repication by peptide aptamers. Antiviral Res. 82, 134-140
(6) J.A. Cruz-Aguado, G. Penner (2008). Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. J. Agric. Food Chem. 56, 10456-10461.
(7) S. Fan, F. Wu, F. Martiniuk, M.L. Hale, A.D. Ellington, K.M. Tchou-Wong (2008). Protective effects of anti-ricin A-chain RNA aptamer against ricin toxicity. World. J. Gastroenterol. 14, 6360-6365
(8) F. Wei, C.M. Ho (2009) Aptamer-based electrochemical biosensor for Botullinum neurotoxin. 393, 1943-1948
(9) C.L. Hamula, H. Zhang, L. le Guan, X.F. Li, X.C. Le (2008). Selection of aptamers against live bacterial cells. Anal. Chem. 80, 7812-7819.

**Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit**

Eine wissenschaftliche Anschlussfähigkeit ist darin zu erwarten, dass die isolierten Aptamere und ihre Spezifität bzw. Kreuzreaktivität für weitere grundlegende Untersuchungen von Struktur-Bindungs-Wechselwirkungen verwendet werden können. Da es sich hier um Untersuchungen mit hochpathogenen Erregern handelt, können diese an der TU Berlin aufgrund der fehlenden Sicherheitslabore nicht durchgeführt werden. Die Arbeiten sollen daher in Kooperation mit geeigneten Projektpartnern (RKI) durchgeführt werden. Die Ergebnisse werden zeigen, in welchem Maße der Einsatz von Aptameren mittel-und langfristig als Ersatz der Antikörper auf den Detektionsplattformen möglich sein wird. Im Kern steht die die Frage der Vermeidung falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse. Zwar wurden für einige grundlegende Fragen zur Entwicklung der Aptamertechnologie, wie die Selektion von Aptameren gegen komplexe Strukturen (wie es große Proteine, Viren und Bakterien sind), sowie deren schnelle und aussagekräftige Charakterisierung Lösungen entwickelt, aber ein unmittelbarer, kurzfristiger technischer Nutzen ist hier nach derzeitigem Erkenntnisstand noch nicht zu erwarten.

Die wirtschaftliche Verwertung dieses BiGRUDI-Teilprojektes wird von der Identifizierung geeigneter Aptamere und der Integration in die in Entwicklung befindlichen Anwendungssysteme abhängen und liegen damit in der Hand der Kooperationspartner am RKI und bei den Partnern, die für die Detektionsplattformen verantwortlich sind. Die in diesem Teilprojekt entwickelten Verfahren (Thermofusion und Proximity Assay) werden erst in nachfolgenden Generationen von Detektionssystemen Anwendung finden können, da vor einer Patentierung zunächst die hohen Anforderungen an die Spezifität in weiteren Untersuchungen eindeutig nachgewiesen sein müssen. Entsprechend der Absprachen im Kooperationsvertrag für den BigRudi Verbund wird die TU Berlin entsprechend berücksichtigt werden. Eine Übertragung von Verwertungsrechten an Dritte hat nicht stattgefunden.

Eine der Aufgaben, die im BiGRUDI Projekt bearbeitet werden sollten, war die Generierung von spezifischen und sensitiven Detektionsreagenzien für ausgewählte BT-relevante Agenzien. Aufgrund der Komplexität dieser Aufgabe wurden bewusst parallele Arbeitsansätze gewählt, um dann nach entsprechender Charakterisierung die optimalen Reagenzien in die Detektionsplattformen zu integrieren. Das Teilprojekt an der TU Berlin war auf grundlegende Fragestellungen zur Spezifität von Aptameren auf virale Antigene ausgerichtet. Wie in der abschließenden Diskussion des BigRudi Projekts am 2/3 November 2011 dargestellt, sind aus dem Pool der generierten Reagenzien, derzeit die Antikörper besser in der Lage, sich auf flexible Target-Strukturen (virale Proteine) anzupassen. Folgerichtig wurde sowohl das ABICAP-System

von FZMB als auch die in der Zenteris GmbH entwickelte und nun von der 4HJena übernommene Plattform auf die Detektion von Bakterien, Viren und Toxinen über Antikörper fokussiert. Dies war zu Projektbeginn so nicht absehbar. Damit ist eine zeitnahe wirtschaftliche Verwertung der Erkenntnisse aus dem TU Teilprojekt mit Auswirkungen auf den Industriestandort Deutschland nicht zu erwarten

**Publikationen**

Es ist aktuell eine Publikation zur Anwendung der Thermophorese mit Aptameren in Vorbereitung.

Anlage

**Berichtsblatt**

1) ISBN: geplant

2) Art des Berichts: Schlussbericht

3a) Vollständiger Berichtstitel:

Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien Akronym: BiGRUDI Teilprojekt: Validierung von Aptameren

3b) noch nicht festgelegt

4a) PD Dr. Andreas Kage

5) Datum des Vorhabensendes: Dezember 2011

6) geplant

7) Präsentation

8) FAK. III – Prozesswissenschaften, Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Medizinische Biotechnologie

9) N/A

10) Förderkennzeichen: 13N9599

11a) n.b.

11b) n.b.

12) Literaturangaben im Bericht: 9

13) Fördernde Institution: Bundesministserium für Bildung und Forschung (BMBF)

14) Anzahl der Tabellen: 2

15) Anzahl der Abbildungen: 3

16) Abschlussbericht

17) vorgelegt bei:

18) Kurzfassung

Als Folge der Anschläge mit Anthraxsporen in den USA im Oktober 2001 häuften sich weltweit, auch in Deutschland, vorgetäuschte Anschläge, bei denen eine Vielzahl von Sendungen mit der Drohung verschickt wurde, Anthraxsporen zu enthalten. Allein im Herbst 2001 mussten in den USA deshalb 120.000 Proben, in Deutschland bereits 5000 Proben untersucht werden. Solche Untersuchungen sind aufwändig, da die Palette der zu BT-Zwecken missbrauchbaren Agenzien Bakterien, Viren und Toxine umfasst, deren Nachweis schwierig ist. Derzeit können die meisten BT-Agenzien verlässlich nur einzeln und in Speziallaboratorien detektiert werden; eine Vor-Ort-Diagnostik ist kaum möglich. Im Teilprojekt sollen Aptamere für die Detektion von BT-Agenzien entwickelt werden. Aptamere sind kurze DNA-oder RNA-Oligonukleotide, die an 3-dimensionale Strukturen im Zielmolekül binden, und werden zunehmend als Alternative zu Antikörpern verwendet. Die Selektion von Aptameren erfolgt über verschiedene Selektionsprinzipien *in vitro* (SELEX, MonoLex). In dem vorleigenden Projekt wurden neue Aptamere für die Erkennung von Viren aus der Liste der BT-Agenzien entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass dies grundsätzlich in etwa 2 Monaten möglich ist. Allerdings ist der Aufwand für die Isolierung und Erstuntersuchung deutlich höher als der für Antiköper. Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene innovative Validierungsverfahren für Aptamere untersucht. Hierzu gehören die Mikrothermophorese und der homogene AlphaLISA, einem sehr sensitiven quantitativen Nachweisverfahren vom Proximity Assay Design. Insgesamt wurden 147 Aptamere untersucht.

19) Schlagwörter: Aptamere, Bioterrorismus, Virentargets, MonoLex, SELEX

## Document Control Sheet

| | |
|---|---|
| 1. ISBN or ISSN / | 2. type of document (e.g. report, publication) closing report |
| 3. title Abschlussbericht zum Verbundprojekt Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung Ultraschnelle Detektion und Identifikation von bioterroristisch relevanten Agenzien | |
| 4. author(s) (family name, first name(s)) / | 5.end of project 31.12.2011 |
| | 6. publication date / |
| | 7. form of publication / |
| 8. performing organization(s) (name, address) PD Dr. Andreas Kage Fak III – Prozesswissenschaften Institut für Biotechnologie FG Medizinische Biotechnologie c/o Tempelhofer Weg 11/12, 10829 Berlin | 9. originator's report no. / |
| | 10. reference no. / |
| | 11. no. of pages / |
| 13. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn | 12. no. of references / |
| | 14. no. of tables / |
| | 15. no. of figures / |
| 16. supplementary notes / | |
| 17. presented at (title, place, date) / | |
| 18. abstract / | |
| 19. keywords / | |
| 20. publisher / | 21. price / |