



CH 679399 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 679399 A5

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C 07 K 17/00  
C 12 N 11/00

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteiner Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 4035/89

㉑ Anmeldungsdatum: 09.11.1989

③① Priorität(en): 18.11.1988 DE 3839020

㉒ Patent erteilt: 14.02.1992

④⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 14.02.1992

⑦③ Inhaber:  
Röhm GmbH, Darmstadt (DE)

⑦② Erfinder:  
Hadas, Eran, Dr., Rishon Lezion (IL)  
Koppel, Rela, Dr., Tel-Aviv (IL)  
Fleminger, Gideon, Dr., Rehovit (IL)

⑦④ Vertreter:  
Bovard AG, Bern 25

⑤④ **Fixierung von Proteinen an festen Trägern.**

⑤⑦ Im Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Proteinen an festem, funktionelle Gruppen aufweisenden Trägermaterial, werden in einem ersten Reaktionsschritt die besonders reaktiven Aminogruppen des Proteins mit einem Reagenz R modifiziert, das sich unter kontrollierten Bedingungen reversibel entfernen lässt, in einem zweiten Reaktionsschritt wird das Protein mit den funktionellen Gruppen FG des Trägermaterials T zur Reaktion gebracht, in einem dritten Reaktionsschritt werden die verbliebenen, funktionellen Gruppen FG des Trägermaterials T chemisch blockiert und im abschliessenden Reaktionsschritt werden die aus dem Reagenz R gebildeten, modifizierten Gruppen R' in kontrollierter Reaktion abgespalten. Die biologische Aktivität der nach diesem Verfahren gebunden Proteine bleibt weitgehend erhalten. Die gebundenen Proteine sind z.B. Biokatalysatoren, wie Enzyme; Zellen und immunologische Wirkstoffe, wie Antikörper.

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Fixierung von Proteinen an festen Trägern unter weitgehender Erhaltung von deren biologischer Aktivität.

5 Für die Fixierung biologischer signifikanter Materie an festen Trägern sind vielerlei Methoden vorgeschlagen worden (vgl. z.B. K. Buchholz, «Characterization of Immobilized Biocatalysts in Dechema-Monographie» Bd. 84, Nr. 1724–1731, Verlag Chemie 1979).

Als feste Träger eignen sich sowohl anorganische als organische Materialien. Teils wird von in der Natur vorkommenden Materialien ausgegangen teils von synthetisch erzeugten.

10 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung gilt das Interesse den funktionalisierten Trägern, insbesondere solchen mit reaktiven Gruppen, die mit den nucleophilen Gruppen von biologisch signifikanter Materie wie Enzymen, Zellen u.ä. reagieren und somit eine kovalente Bindung eingehen. Viele aus der präparativen organischen Chemie bekannte reaktive funktionelle (elektrophile) Gruppen, die mit den (nucleophilen) Amino-, Thio- oder Hydroxyfunktionen der biologisch signifikanten Materie unter bio-  
15 logisch akzeptablen Bedingungen reagieren, sind mit mehr oder weniger gutem Erfolg zur kovalenten Fixierung angewendet worden (wobei die zu deren Anbindung am Träger zur Verfügung stehenden Gruppen limitierend wirken können. Detaillierte Angaben finden sich bei K. Buchholz loc.cit; vgl. ferner Ullmann's Encyclopädie der techn. Chemie, 4. Auflage Bd. 10, S. 539–545, Verlag Chemie 1975; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, fifth Ed. Vol. A9, pg. 382–383, Verlag Chemie 1988).  
20 Oft angewendete Aktivierungsmethoden sind beispielsweise bei Trägern mit –OH-Gruppen die Reaktion mit Bromcyan zu den Imiden oder die Umsetzung mit halogenierten s-Triazinen, bei Trägern mit –NH<sub>2</sub>-Gruppen die Diazotierung oder die Reaktion mit Glutarialdehyd, bei Trägern mit –COOH-Gruppen die Umsetzung zu Säureazidgruppen oder die aus der Peptidsynthese bekannten Aktivierungen mit z.B. Carbodiimid.

25 Träger mit z.B. Anhydrid- oder Epoxyfunktionen sind zur unmittelbaren Reaktion mit den vorkommenden Nucleophilen, insbesondere den Aminofunktionen von Proteinen geeignet.

Die kovalente Fixierung von biologisch signifikantem Material hat eine Reihe von Vorzügen gegenüber anderen Bindungsmethoden. Zu nennen wäre u.a. das Nicht-Ausbluten des Materials, die leichte Zugänglichkeit der allgemein an der Trägeroberfläche fixierten aktiven Strukturen und nicht selten eine erhöhte thermische Stabilität. Andererseits hat man aber auch gelegentlich gewisse Nachteile in Kauf zu nehmen z.B.:

30 a) Beeinträchtigung der biologischen Aktivität durch partielle Modifikation der aktiven Zentren  
b) zu starke Interaktion zwischen Träger und fixiertem Material, die dessen Beweglichkeit und Zugänglichkeit einschränkt  
35 c) diffizile Suche nach den optimalen Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit von der Natur des biologischen Materials. (Vgl. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th Ed. Vol., A.9. loc.cit, pg. 384).

40 Ullmann führt als weiteren Nachteil der kovalenten Fixierung neben der Nicht-Regenerierbarkeit der Träger die Nicht-Anwendbarkeit der Methode auf ganze Zellen an. In der Tat können in bestimmten Fällen insbesondere die unter a) und b) aufgeführten Folgen der kovalenten Immobilisierung ein ernstzunehmendes Handicap für diese Methode bedeuten.

Dies sei am konkreten Beispiel erläutert:

45 Bei der Immobilisierung der verschiedensten Proteinarten hat sich ein Trägersystem bestehend aus einem vernetzten Copolymeren des (Meth)acrylamids mit Glycidyl(meth)acrylat, vorzugsweise in Perlforn hervorragend bewährt. (Handelsprodukt ®EUPERGIT C, vgl. DE-C 2 722 751, US-A 4 190 713, US-A 4 511 694).

50 Die hauptsächlichste Interaktion zwischen diesem Trägersystem und Proteinen findet zwischen den Epoxid-Gruppen und den freien Aminogruppen der Proteine statt. Diese Interaktion braucht sich jedoch nicht auf eine oder einige wenige Anbindungsstellen zu beschränken, sondern sie kann an zahlreichen weiteren Stellen stattfinden. Im Endeffekt läuft dann die kovalente Fixierung auf eine Inaktivierung des gebundenen Proteins hinaus. Auch die Blockierung der für die Wirkung essentiellen Aminogruppen kann bei Reaktionen mit dem Träger zur Inaktivierung des gebundenen Proteins führen.

55 Es bestand daher die Aufgabe, Wege zu finden, die eine kovalente Fixierung biologischer signifikanter Materie möglichst mit Hilfe bewährter Trägersysteme gestatten, ohne die geschilderten Nachteile, insbesondere die völlige oder partielle biologische Inaktivierung.

Die vorliegende Erfindung betrifft das im Anspruchsteil definierte Verfahren. Es umfasst die Verfahren zur kovalenten Fixierung von biologisch signifikanten Materialien mit Proteinstruktur des Standes  
60 der Technik, wobei aber deren biologische Aktivität erhalten bleibt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur kovalenten Fixierung von biologisch aktiven Proteinen P an festen funktionellen Gruppen FG aufweisenden Trägern T besteht darin, dass in einem ersten Reaktionsschritt die aktivsten Aminogruppen des Proteins P mit einem Reagenz R modifiziert werden, das sich unter kontrollierten Bedingungen reversibel entfernen lässt, in einem zweiten Reaktionsschritt die  
65

Reaktion mit den funktionellen Gruppen FG des Trägers T durchgeführt wird, in einem weiteren Reaktionsschritt die verbliebenen funktionellen Gruppen FG des Trägers T chemisch blockiert werden und schliesslich der die Aminogruppen des Proteins P modifizierende Rest R' des Reagenzes R in kontrollierter Weise entfernt wird.

- 5 Als modifizierendes Reagenz R, das sich unter kontrollierten Bedingungen reversibel entfernen lässt, eignet sich speziell Dimethylmaleinsäureanhydrid.

Die Trägermaterialien

- 10 Das erfindungsgemässe Verfahren ist im Prinzip bei allen Trägermaterialien T anwendbar, bei denen die geschilderte Aufgabe manifest werden kann, d.h. wenn eine zu starke Interaktion zwischen Träger und zu fixierendem Objekt eintritt bzw. wenn die Fixierung an Stellen der biologisch signifikanten Materie erfolgt, die für eben diese biologische Wirkung bedeutsam sind und deren Blockierung eine Minderung oder Aufhebung der biologischen Wirkung bedeutet. Diese Gefahr mag für einzelne eine kovalente Haf-
- 15 tung bewirkende reaktive Gruppe und für verschiedenartige Träger unterschiedlich gross sein, aber sie besteht im Prinzip immer, insbesondere bei genügend hoher Dichte und bei – an sich nicht unerwünschter – Reaktionsfreudigkeit der elektrophilen funktionellen Gruppen unter biologisch akzeptablen Bedingungen (vgl. K. Buchholz loc.cit. pg. 49–63; Ullmann, 4. Auflage Bd. 10, loc.cit. S. 540). Als solche Gruppen können z.B. Säurederivate wie z.B. Säurehalogenide, Azide, aktivierte Ester, Imidoester, Säureanhydride, im weiteren Sinne auch Imidocarbonate, Isothiocyanate, ferner halogenierte Triazine, so-
- 20 wie Aziridin- und insbesondere Epoxid-(Oxiran)-Funktionen erwähnt werden.

- Als Beispiel sei wiederum das im übrigen hervorragend geeignete Trägersystem aus einem vernetzten Copolymeren des Methacrylamids mit Glycidylmethacrylat (siehe vorstehend ®EUPERGIT C) aufgeführt. Untersuchungen über Struktur und Aktivität dieses Trägersystems führen zu der Annahme einer
- 25 Epoxy-Gruppen-Dichte an der Oberfläche, die durch einen 5 Å-Abstand charakterisiert wird bei gleichzeitig hoher Permeabilität der Systeme. Es leuchtet unmittelbar ein, dass unter solchen Bedingungen mit bestimmten zu fixierenden Materialien, was im Regelfall bedeutet: mit gewissen Proteinen P ein «Multi Point Attachment» eintritt, das die geschilderten, negativen Effekte im Gefolge hat.

- Es sei indessen nochmals betont, dass auch bei anderen Trägersystemen, sofern eine genügend hohe
- 30 Dichte der funktionellen Gruppen FG und hinreichende Strukturverhältnisse, d.h. auch ausreichende Zugänglichkeit vorliegen, der Effekt des «Multi Point Attachments» eintritt, der negative Folgen haben kann. Unter diesem Gesichtspunkt können weder anorganische Träger, wie z.B. oberflächenmodifiziertes, insbesondere silanisiertes Glas, Silicagel, Tone wie Bentonit und Hydroxyapatit, Metalle bzw. Metallverbindungen wie Nickel, Nickeloxid, Titandioxid, Zirkondioxid u.ä., (vgl. E. Katchalski-Katzir, L.
- 35 Goldstein Ed. Applied Biochemistry and Bioengineering Vol. 1, pg. 23 ff; H.H. Weetall Ed. Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides, Marcel Dekker, New York 1975, pg 1 ff) noch (modifizierte) natürlich vorkommende oder synthetisch erzeugte organische Polymere ausgenommen werden.

- Als Beispiele für die ersteren seien insbesondere Polysaccharide genannt, die durch Umsetzung mit
- 40 Bromcyan zum cyclischen Imid, mit Chloressigsäure zum Carboxylmethylderivat bzw. zum Azid, durch Einführung einer diazotierbaren Aminogruppe, oder durch Einführung einer Glycidyl(ether)gruppe funktionisiert werden können. (Vgl. K. Buchholz, Characterization of Immobilized Biocatalysts, loc. cit. pg. 52–54).

- Wie leicht einzusehen, besteht die grösste Variabilität bei Trägern auf Basis synthetischer organischer Polymeren. Einerseits werden Polymere angewendet, in die nachträgliche durch polymeranaloge
- 45 Reaktionen reaktive Gruppen eingeführt werden, andererseits lassen sich auch polymere Träger durch Copolymerisation reaktive Einheiten enthaltende Monomeren herstellen. Ausser der Anwesenheit funktioneller Gruppen FG wird von dem Trägermaterial T ausreichende mechanische Belastbarkeit, physikalische, chemische und biologische Stabilität und toxikologische Unbedenklichkeit erwartet.

- Die Aktualität der vorliegenden Erfindung sei am Beispiel eines epoxigruppenhaltigen Trägers T erläutert:
- 50

- Als Prototyp kann dabei das bereits erwähnte vernetzte Copolymerisat aus Acrylamid bzw. Methacrylamid und Glycidylacrylat bzw. -methacrylat gelten, das vorzugsweise aus perlförmigen Partikeln besteht. Derartige Trägerpolymerisate werden in der DE-C 2 722 751 bzw. US-A 4 190 713 sowie der US-
- 55 A 4 511 694 beschrieben. Die Perlen besitzen in der Regel einen Durchmesser von 5–1000 µm, insbesondere 30–1000 µm und weisen einen inneren Hohlraum (Hohlperlen) auf. Als Anhalt für den Gehalt an Glycidylgruppen im Trägerpolymerisat T, die zur Reaktion gebracht werden können, sei ein Wert von 0,8–2,5 µMol pro mg trockenes Trägermaterial genannt. Weitere Kenndaten für ein handelsübliches Matrixpolymerisat (EUPERGIT C der Röhm GmbH) das für Trägerpolymerisate T des angegebenen Typs repräsentativ ist, lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen.
- 60

	Kenndaten	Dimension
	– Mittlere Korngrösse:	140–180 $\mu\text{m}$
5	– Porendurchmesser:	40 nm
	– Ausschlussgrenze = $M_{LM}$ :	$2,10^5$ Daltons
	– Bindungsaktive Oberfläche:	180 $\text{m}^2/\text{g}$ (trocken)
	– Epoxidgehalt:	800–1000 mmol/g (trocken)
10	– Wasseraufnahme:	2,3 ml/g (trocken)
	– Dichte = $d_4^{20}$ :	1,20
	– Schüttdichte:	0,34 g/ml
15	– Bindungskapazität: (bei üblichen Bedingungen)	
	Humanalbumin:	48 mg/g (feucht)
	Human IgG:	34 mg/g (feucht)
	– Quellverhalten gegenüber Wasser:	1:1,4 1 ml (trocken) ergibt 1,4 ml (feucht)
20	– Löslichkeit (in Wasser, Puffern und organischen Lösungsmitteln):	unlöslich
	– Druckstabilität:	300 bar

25 Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man die makroporöse Struktur der Perlen mit Kanälen und Hohlräumen, die einen Durchmesser von 0,1–2,5  $\mu\text{m}$  (1000–25 000 Å) besitzen, so dass Enzym- bzw. Substratmoleküle mit einer Grösse von 10–100 Å das gesamte Innere der makroporösen Matrix erreichen können.

### 30 Die biologisch signifikanten Materialien

Die biologisch signifikanten Materialien, auf deren möglichst optimale Fixierung an Trägern T die vorliegende Erfindung gerichtet ist, sind bereits vorstehend (Stand der Technik) charakterisiert worden.

35 Sie weisen in der Regel nucleophile Gruppen, speziell Aminogruppen auf, die mit den funktionellen Gruppen FG der Träger T unter biologisch akzeptablen Bedingungen reagieren. Insbesondere handelt es sich dabei um Proteine. Genannt seien Biokatalysatoren wie Enzyme, sowie Zellen, Organellen und immunologisch aktive Materialien und Strukturen, insbesondere Antikörper. Die immobilisierten Biokatalysatoren können z.B. zur Produktion bzw. der Umwandlung sehr verschiedenartiger Substrate wie

40 Aminosäuren, Peptide und Enzyme, von Zuckern, organischen Säuren, Antibiotika, Steroiden, Nucleosiden und Nucleotiden, Lipiden, Terpenoiden und organischen Grundchemikalien dienen (vgl. Ullmann 5. Auflage, Bd. 9A, loc.cit. S. 389–390).

45 Als immunologisch aktive Strukturen seien z.B. Mikroorganismen, wie gram-positive und gram-negative Bakterien, Spirochäten, Mycoplasma, Mycobacterien, Vibrionen, Actinomyceten, Protozoen, wie intestinale Protozoen, Amöben, Flagellaten, Sporozoen, intestinale Nematoden und Gewebenematoden (Würmer), Trematoden (Schistosomen, Egel), Cestoden, Toxoplasma, sowie Pilze, wie Sporotrichum, Cytococcus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides, Candida, Viren und Rickettsien, wie Hunde-Hepatitis, Shope-Papillome, Influenza A + B, Hühnerpest, Herpes-Simplex, Adenoviren, Polyane, Rous-Sarkom, Impfpocken, Poliovirus, Masern, Hundestaube, Leukämie, Mumps, Newcastle-Krankheit, Sendai, ECHO, Maul- und Klauenseuche, Psittacosis, Rabies, Extremelia, Baumviren, weiter Gewebe-Antigene, Enzyme, wie Pancreas-Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase, Glucose-Oxidase, Lactatdehydrogenase, Uricase, Aminosäure-Oxidase, Urease, Asparaginase, Proteasen, Blutzellen-Antigene, Blutgruppensubstanzen und andere Isoantigene, wie Blutplättchen, Leucozyten, Plasma-Proteine, Milch-Proteine, Speichel-Proteine, Urin-Proteine, Antikörper, einschliesslich Auto-Antikörper genannt. Erwähnt seien insbesondere monoklonale Antikörper, die gegen Antigene beispielsweise der folgenden Art gerichtet sind.

55

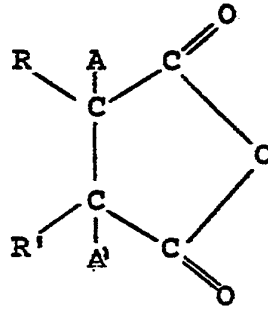
60

65

Antigen-Klasse	Antigen	
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50	<b>Bakteriell</b>	Tetanus-Toxoid H. influenza Typ b Polysaccharid Diphtherie-Toxin Chlamydia trachomatis M. leprae Lipopolysaccharid/Endotoxin Pneumokokken LPS von P. aeruginosa Exotoxin von P. aeruginosa Streptokokken Gruppe A Kohlehydrat
	<b>Viral</b>	X31 Influenza-Virus-Nukleoprotein Masern-Virus HSV Glykoprotein D Masern-Virus, Nukleocapsid Zytomegalie-Virus Influenza A-Viren Röteln-Virus-Antigene HTLV I Varizella-Zoster HBsAg
	<b>Autoimmun</b>	doppelsträngige DNA Inselzellen (Diabetes mellitus) Myasthenia gravis, Antiidiotypen Thyreotropin-Rezeptor Rheuma-Faktor Acetylcholin-Rezeptor Schilddrüse Sperma
	<b>Tumor</b>	Mamma-Ca Prostata-Ca Lungen-Ca Magen-Ca Melanom BD2 (humanes Melanom) Gliom Rectum-Ca Leukämie Cervix-Ca
	<b>Gewebe/Blut</b>	Rhesus D Blutgruppenantigen A HLA-A,B,C,DR Intermediäre Filamente
	<b>Andere</b>	Malaria Forssman-Antigen Schaferythrozyten Nitrophenol Dinitrophenol Trinitrophenol Keyhole limpet hemocyanin (KLH) Rheumafaktor Insulin

## Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens

Bei dem Verfahren werden in einem ersten Reaktionsschritt die jeweils aktivsten nukleophilen Gruppen, in der Praxis regelmässig die Aminogruppen des Proteins P mit einem Reagenz R modifiziert, das sich unter kontrollierten Bedingungen, d.h. möglichst ohne negative Konsequenzen für die Aktivität des Proteins reversibel entfernen lässt. Als Reagentien R kommen vorzugsweise solche der folgenden Struktur



worin R für Methyl und

R' für Wasserstoff oder Methyl stehen, und worin A und A' entweder für Methylgruppen stehen oder eine Doppelbindung symbolisieren, in Frage.

Genannt seien insbesondere das Dimethylmaleinsäure-Anhydrid und das Citraconsäureanhydrid. Die Anwendung des Reagenzes 2,3-Dimethylmaleinsäureanhydrid ist zur kovalenten Modifikation von Antikörpern an ihren Aminogruppen bereits beschrieben worden (vgl. N. Endo, N. Umemoto, Y. Kato, Y. Takeda, u. T. Hara; J. Immunol. Methods 104 (1-2) 253-258, 1987). Es wird dabei so vorgegangen, dass die für das Antigen-Bindungsvermögen verantwortlichen Aminogruppen mit dem Reagenz blockiert werden, danach die verbleibenden Aminogruppen modifiziert werden und schliesslich die Dimethylmaleyl-Schutzgruppe durch Hydrolyse entfernt wird. Die Methode wurde für die kovalente Konjugation von Methotrexat (MTX) mit zwei monoclonalen Antikörpern mittels des MTX-N-Succinimidylesters angewendet. In ähnlicher Weise wurden monoclonale Anti-Melanoma-Antikörper mit Dimethyl-Maleinsäureanhydrid und anschliessend mit N-Acetylhomocystein-thiolacton zur Einführung von reaktionsfähigen Thiolgruppen umgesetzt, die wiederum unter S-S-Verknüpfungen weiterreagieren können (vgl. PCT-Anmeldung WO 87/4171). In dieser Weise wurde eine Reaktion mit Thiopropyl-Sepharose 4B erreicht.

Die vorliegende Erfindung ist darin zu sehen, dass die Fixierung von biologisch signifikanter Materie unmittelbar über die verbleibenden nucleophilen Gruppen, insbesondere deren Aminogruppen erfolgen kann, wofür überraschenderweise trotz eines hohen Überschusses an Reagenz noch eine ausreichende Zahl dieser Gruppen mit einer für die Fixierung hinreichenden sterischen Zugänglichkeit zur Verfügung steht.

Die Modifizierung bzw. Aktivierung der nach der Blockierung mit den Reagentien R übriggebliebenen Aminogruppen zum Zwecke der Anbindung an den Träger T ist somit nicht erforderlich, was einen wesentlichen Fortschritt gegenüber dem Stand der Technik bedeutet.

Im allgemeinen kann bei dem erfindungsgemässen Verfahren wie folgt vorgegangen werden:

Man stellt eine Lösung, vorzugsweise unter Verwendung eines Puffers zweckmässig im alkalischen Bereich (beispielsweise pH 8,7) und mit einem Gehalt an NaCl her, der die biologisch signifikante Materie, in der Regel ein Protein beispielsweise einen Antikörper enthält, her, mischt vorzugsweise mit einem Überschuss am Reagenz R (ca. 200-500 mol) das in einem geeigneten, vorzugsweise mit Wasser mischbaren Lösungsmittel insbesondere Dimethylformamid (DMF) gelöst worden war, wobei der Gehalt an dem Lösungsmittel zweckmässig unterhalb 5 Gew.-% bezogen auf die Lösung gehalten wird.

Man inkubiert dann zweckmässig unter Kühlung, beispielsweise in einem Eisbad  $45 \pm 15$  Minuten lang, wobei die gewünschte Modifikation der biologisch signifikanten Materie eintritt.

Dann überführt man diese erhaltene Flüssigkeit in ein geeignetes Gefäss (beispielsweise ein Zentrifugenglas) das das Trägermaterial T enthält und inkubiert, beispielsweise zunächst für einige Stunden (Anhaltspunkt ca. 4 Stunden) und anschliessend eine wesentlich längere, beispielsweise die vierfache Zeit, bei reduzierter Temperatur jedoch oberhalb  $0^{\circ}\text{C}$ , beispielsweise bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Danach wird die Blockierung der nicht zur Reaktion gekommenen funktionellen Gruppen FG des Trägers T mittels chemischer Reagentien vorgenommen; im Falle von epoxigruppenhaltigen Trägern, beispielsweise durch Reaktion mit 2-Mercaptoethanol, etwa in Form einer 0,2 M-Lösung und bei Raumtemperatur. In der Regel genügt auch hier eine mehrstündige, etwa 4stündige Einwirkung. Anschliessend wird das beladene Trägermaterial gewaschen, beispielsweise mit Phosphat-Standardpuffer (PBS). Die Abspaltung der Schutzgruppen (die als Reagenz R aufgebracht worden waren) wird vorzugsweise hydrolytisch in einem zweckmässigen pH-Bereich, beispielsweise im schwach sauren Bereich, etwa bei pH 5,5 vorgenommen, wobei eine Hydrolysedauer von ca. 1 Stunde als Anhaltspunkt dienen kann.

Abschliessend wird das Trägermaterial noch einmal mit PBS gewaschen.

Bestimmung der Immuno-Kapazität von erfindungsgemäss fixierten Antikörpern

Die Bindungskapazität der erfindungsgemäss immobilisierten Antikörper wird bestimmt durch Messung der Antigene insbesondere von Enzymen wie z.B. der Anti-Carboxypeptidase (CPA) die sich an die Antikörper binden. Zu diesem Zweck wird beispielsweise CPA in gleichbleibenden Quantitäten im PBS zu Reagenzgläsern gegeben, die jeweils 100 mg des beladenen Trägermaterials T aber mit verschiedener Beladung an immobilisierten monoklonalen Antikörpern tragen. Der an die Antikörper des Matrixpolymerisats gebundene CPA-Anteil wurde wie folgt bestimmt:

α) durch Bestimmung der Differenz des jeweiligen Proteingehalts mittels des BRADFORD-Tests und die enzymatische Aktivität, die in der Ausgangslösung und schliesslich in der Restlösung vorhanden war,

β) durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des an die Träger-Perlen T immobilisierten Enzyms, bei EPA z.B. mit Hilfe der Ninhydrin-Methode.

Die Bestimmung über die Enzymaktivität ist in all den Fällen angebracht, wo Antikörper vorhanden sind, welche die Enzymaktivität nicht beeinträchtigen.

Es erweist sich, dass die erfindungsgemäss am Trägermaterial fixierten Antikörper ihre volle immunologische Aktivität zur Bindung des Enzyms, beispielsweise CPA, beibehalten.

Das molare Verhältnis von monoclonalem Antikörper zu CPA bewegt sich im Rahmen 2:1 bis 1:1.

Vorteilhafte Wirkungen

Die vorteilhaften Wirkungen des erfindungsgemässen Verfahrens seien wiederum anhand einer Ausführungsform beschrieben, bei der Antikörper an epoxygruppenhaltigem Trägermaterial T fixiert worden waren.

Beim Vergleich von Antikörpern, die nach dem erfindungsgemässen Verfahren und die nach dem Verfahren des Standes der Technik am gleichen Trägersystem T («®EUPERGIT C») fixiert worden waren, wurden (bei einer Antikörperbeladung von 10 mg/g EUPERGIT C) die in der Tabelle wiedergegebenen Resultate erzielt.

Die Aktivität aller Antikörper, die erfindungsgemäss immobilisiert worden waren, hatte sich gesteigert. Der Aktivitätszuwachs bei den verschiedenen Antikörpern bewegte sich zwischen dem 3- und dem 10,7fachen, anscheinend in Abhängigkeit von den spezifischen Charakteristiken individueller Antikörper. Soweit die bisherigen Ergebnisse eine Aussage erlauben, erbrachte lediglich der Anti-Meerrettich-Peroxidase mAB, HRP2-Antikörper keine gesteigerte Aktivität nach Immobilisierung mittels des erfindungsgemässen Verfahrens im Vergleich mit der Standardmethode.

Der Einfluss des Reagenzes R wurde mit verschieden grosser Beladung an Antikörper pro Gramm perlförmigem Trägermaterial T bestimmt. Um die Voraussetzungen für einen unmittelbaren Vergleich zwischen den beiden Methoden zu erfüllen, wurde derselbe Antikörper (CPAB) nach beiden Verfahren im gleichen Experiment immobilisiert. Es wurde gefunden, dass der höchste Aktivitätszuwachs bei den immobilisierten Antikörpern dann beobachtet wurde, wenn die Beladung mit Antikörpern gering war.

Tabelle

Vergleich der Aktivitäten von Anti-CPA-Antikörpern, die nach der Standardmethode und nach dem erfindungsgemässen Verfahren mit Dimethylmaleinsäureanhydrid an EUPERGIT C immobilisiert worden waren.

Antikörper-Aktivität*			
Monoclonale Antikörper	Standardmethode	Erfindungsgemässes Verfahren	Steigerungsfaktor
CPA1	0,040	0,362	9,0
CPA8	0,060	0,216	3,6
CPA9	0,082	0,242	3,0
CPA14	0,102	0,300	3,0
CPA18	0,030	0,322	10,7

\* Die Antikörperaktivität wird ausgedrückt durch die Aktivität der CAP, die vom Antikörper immobilisiert wurde. Die CPA-Aktivität wurde mittels der Ninhydrin-Methode bestimmt. Die Werte in der Tabelle stellen die Netto-Absorption bei 550 nm nach Abzug des Blindwerts dar.

Die günstigen Resultate bei der Anwendung des erfindungsgemässen Verfahrens erlauben es, eine Vorstellung von der Wirkweise der an ®EUPERGIT C immobilisierten Antikörper zu entwickeln, die jedoch ohne Einfluss auf die Tragweite der vorliegenden Erfindung sein soll. Der Erfolg des Verfahrens

beruht primär auf der Blockierung der freien Oxiran-Funktionen bevor die Konzentration am Reagenz R abgenommen hat. Verläuft das Verfahren in dieser Weise, dann kann mit dem Wirksamwerden zweier Mechanismen gerechnet werden. Erstens unterliegen diejenigen Aminogruppen, die für die Antikörper-Bindung essentiell sind und die durch die Reaktion mit dem Reagenz R vor der Anbindung an den Träger geschützt worden waren, nicht der Modifizierung und können daher ihre Aktivität entfalten.

Zweitens dürfte die Zahl der Fixierungspunkte zwischen Antikörpern und dem Trägermaterial T relativ klein sein, verglichen mit der Zahl, die man bei der Interaktion mit nicht-vorbehandelten Antikörpern erwarten sollte. Darüber hinaus sollte nicht vergessen werden, dass ungeachtet der Tatsache, dass die hauptsächlichsten Bindungsstellen aus der Interaktion der Oxirangruppen mit der Amino-Funktion des Lysins stammen dürften, dennoch auch andere Gruppen, wie z.B. die Sulfhydrylgruppen von Cystein-Resten, sowie die Hydroxylgruppen des Tyrosins, Serins u. Tyrosins involviert sein könnten. Möglicherweise trägt auch die reversible Blockierung dieser Hydroxygruppen zu dem zusätzlichen Aktivitätsanstieg der immobilisierten Antikörper bei.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung:

## BEISPIELE

### Beispiel 1

#### Allgemeine Vorschrift.

0,5 mg Trägerperlen (®EUPERGIT C der Fa. Röhm GmbH) werden in Beckman-Zentrifugenröhren mit einem Volumen von 5–10 µl eingebracht.

Eine Lösung der Antikörper (5–10 µg pro Probe, 0,3–1,3 µg/µl 5–30 µl) in 25 mM Natriumborat-Puffer von pH 8,7 der 1 M NaCl enthält wird mit einem Überschuss (x 400 mol/mol) Dimethylmaleinsäureanhydrid in Dimethylformamid (DMF) gemischt, wobei die entstehende DMF-Konzentration 5 Gew.-% nicht überschreiten soll. Nachdem die Lösung in einem Eisbad 30–60 Minuten inkubiert worden war, werden die modifizierten Antikörper zu den Trägerperlen T hinzugegeben und anschliessend 4 Stunden bei Raumtemperatur und dann noch 16 Stunden bei 4°C gehalten.

Noch vorhandene Oxiran(Epoxid)-Gruppen werden dann chemisch blockiert, indem man das Träger-Antikörper-Konjugat mit 2-Mercaptoethanol-Lösung behandelt. (0,2 M, 4 Stunden bei Raumtemperatur) Die Perlen werden dann mit Standard-Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Die Abspaltung der aus Dimethylmaleinsäureanhydrid gebildeten Schutzgruppen von den Antikörpern wird durch Inkubieren mit 50 mM Citratpuffer, pH 5,5 (1 Stunde bei Raumtemperatur) vorgenommen. Zum Abschluss wäscht man die Perlen gründlich mit Standard-Phosphatpuffer.

Als Antikörper sind beispielhaft eingesetzt worden:

- 1) Murine monoclonale Antikörper spezifisch für Carboxypeptidase A.
- 2) Murine monoclonale Antikörper spezifisch für menschliches Choriogonadotropin.
- 3) Murine monoclonale Antikörper spezifisch für Humaninsulin.
- 4) Eine Präparation von polyclonalen Ziegen-Antikörpern spezifisch für das FG-Fragment von murinem IgG.

### Beispiel 2

Die Aktivitäten von Anti-Carboxypeptidase-A (Anti-CPA)-Antikörpern, die einmal nach dem Stand der Technik und einmal nach dem erfindungsgemässen Verfahren immobilisiert worden waren, wurden bei einer Belegung von 10 mg Antikörper pro Gramm ®EUPERGIT C verglichen. Die Aktivitäten sämtlicher, nach dem erfindungsgemässen Verfahren immobilisierten Antikörper waren gestiegen (s. Tabelle). Der Aktivitätsanstieg reichte bei den verschiedenen Antikörpern vom 3- bis 10,7fachen, anscheinend in Abhängigkeit von den spezifischen Charakteristiken der individuellen Antikörper.

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen zeigte nur die Anti-Meerrettichperoxidase mAB, HRP2 keinen Aktivitätsanstieg nach erfindungsgemässer Immobilisierung im Vergleich zu den Immobilisierungsprodukten aus dem Verfahren des Standes der Technik.

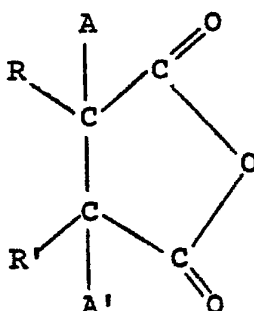
### Beispiel 3

In den vorstehenden Beispielen wurde ein 400facher molarer Überschuss an Dimethylmaleinsäureanhydrid, bezogen auf die Antikörper, eingesetzt. Untersuchungen zur Variation des Antikörper-Dimethylmaleinsäureanhydrid-Verhältnisses ergaben, dass relativ geringe Dosen an Dimethylmaleinsäureanhydrid ausreichen, um die volle Wirkung zu erzielen. Ein nicht sehr stark ausgeprägtes Optimum wurde im Bereich eines 200–500 molaren Überschusses registriert.

Steigert man den Überschuss auf das 10 000fache der Antikörper-Konzentration, so setzt ein allmählicher Aktivitätsabfall der immobilisierten Antikörper ein.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Proteinen an festem, funktionelle Gruppen aufweisenden Trägermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass in einem ersten Reaktionsschritt die besonders reaktiven Aminogruppen des Proteins mit einem Reagenz R modifiziert werden, das sich unter kontrollierten Bedingungen reversibel entfernen lässt, in einem zweiten Reaktionsschritt das Protein mit den funktionellen Gruppen FG des Trägermaterials T zur Reaktion gebracht wird, in einem dritten Reaktionsschritt die verbliebenen, funktionellen Gruppen FG des Trägermaterials T chemisch blockiert werden und im abschliessenden Reaktionsschritt die aus dem Reagenz R gebildeten, modifizierenden Gruppen R' in kontrollierter Reaktion abgespalten werden.
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz R ein solches der Formel



15  
20  
25

worin R für Methyl, R' für Wasserstoff oder Methyl und A und A' für Methylgruppen stehen, oder eine Doppelbindung symbolisieren, ist.

3. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz R ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Dimethylmaleinsäureanhydrid und Citraconsäureanhydrid.
4. Verfahren gemäss den Ansprüchen 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz R in einem 200- bis 500fachen molaren Überschuss über die Proteine angewendet wird.
5. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, zur Bindung von Antikörpern.
6. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das feste, funktionelle Gruppen aufweisende Trägermaterial T Oxirangruppen als funktionelle Gruppen besitzt.
7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das feste funktionelle Gruppen aufweisende Trägermaterial aus oxirangruppenhaltigen Hohlperlen besteht.
8. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Reaktionsschritt in einem schwach alkalischen Puffer vorzugsweise bei pH 8,7 durchgeführt wird.
9. Verfahren gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Puffer noch 1 molar an NaCl ist.
10. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man im zweiten Reaktionsschritt das mittels des Reagenz R modifizierte Protein mit dem Trägermaterial zunächst einige Stunden bei Raumtemperatur und dann über die ca. vierfache Zeit wenig oberhalb 0°C inkubiert.
11. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 und 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das im zweiten Reaktionsschritt gebildete Konjugat aus Protein und dem Trägermaterial T im dritten Reaktionsschritt zur Blockierung noch vorhandener Oxirangruppen mit 2-Mercaptoethanolösung behandelt.
12. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 und 10–11, dadurch gekennzeichnet, dass man das Produkt des dritten Reaktionsschritts hydrolytisch von der aus dem Reagenz R gebildeten Schutzgruppe R' befreit.

50  
55  
60  
65