



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 285 099 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1

Patentgesetz der DDR

vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 08 J 7/12

C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 08 J / 329 768 3

(22) 26.06.89

(44) 05.12.90

(71) siehe (73)

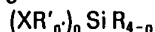
(72) Schößler, Werner, Dr. sc. nat.; Ackermann, Wilfried, Dr. rer. nat.; Ilchmann, Dieter, Dr. rer. nat.; Jainta, Ulrike, Dipl.-Biochem.; Schubert, Klaus, Dipl.-Chem.; Dostmann, Ute, Dipl.-Med.; Hiepe, Falk, Dr. sc. med.; Dittich, Christa, DD

(73) Klinikum Berlin Buch, Wiltbergstraße 50, Berlin, 1115, DD

(54) Verfahren zur Aktivierung von Polystyren-Festkörperflächen

(55) Aktivierung; Oberfläche; Polystyren; Bindung; Biomakromoleküle; biologische Materialien; niedermolekulare Verbindungen; Organosilan; Nachweis; Immobilisierung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von Polystyren-Festkörperoberflächen. Die Erfindung bezieht sich auf Polystyrenoberflächen, die nach der Aktivierung zur Bindung von Biomakromolekülen, biologischen Materialien und niedermolekularen Verbindungen eingesetzt werden. Anwendungsgebiete sind die pharmazeutische Industrie, die Biowissenschaften, die Biotechnologie sowie die Medizin. Die Aktivierung der Oberfläche erfolgt erfindungsgemäß mit unterschiedlichen Organosilanen der allgemeinen Formel



in der Gasphase nacheinander, wobei X eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Nitroso-, Sulfhydryl- oder Halocarbonyl-Gruppe und R' eine Alkyl-, Alkylphenyl- oder Phenyl-Gruppe ist, während R für eine Alkoxy-, Phenoxy- oder Halogen-Gruppe steht und n' den Wert zwischen 0 und 20 und n den Wert zwischen 1 bis 3 haben kann. Im Ergebnis dieser Oberflächenmodifizierung erhält man aktivierte Polystyrenoberflächen mit hoher Bindungsfähigkeit und Bindungskapazität.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Aktivierung von Polystyren-Festkörperoberflächen, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Polystyren-Festkörperoberflächen mit unterschiedlichen Organosilanen der Formel



nacheinander umgesetzt werden, wo X eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Nitroso-, Sulfhydryl- oder Halocarbonyl-Gruppe und R' eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Alkylphenyl- oder Phenyl-Gruppe sind, während R für eine Alkoxy-, Phenoxy- oder Halogen-Gruppe steht, wobei n' den Wert zwischen 0-20 und n den Wert zwischen 1-3 besitzen, und daß die Umsetzung mit mindestens zwei Organosilanen der Formel I nacheinander in gasförmiger Phase erfolgt und daß anschließend gegebenenfalls eine weitere Behandlung mit homo- oder heterofunktionellen Reagenzien durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Organosilane der Formel II eingesetzt werden



wo X die reaktive Gruppe entsprechend Formel I ist und vorzugsweise eine Amino-, Epoxy-, Carboxy- und Sulfhydryl-Gruppe darstellt und R für eine Methyl- oder Ethyl-Gruppe steht.

3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Organosilane gamma-Aminopropyltriethoxysilan und Glycidoxypopyltriethoxysilan sind, so daß X in Formel I eine Amino- bzw. Epoxy-Gruppe sind, während R' für eine Propyl-Gruppe steht und n' und n den Wert 1 besitzen.
4. Verfahren nach Punkt 1-3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Umsetzung der Polystyren-Festkörperoberflächen mit Verbindungen nach Formel I und II in wäßrigem Milieu oder Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln erfolgt.
5. Verfahren nach Punkt 1-3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Umsetzung der Polystyren-Festkörperoberflächen in der Gasphase mit einem Aerosol oder bei einem Druck unterhalb des Atmosphärendrucks erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von Festkörperoberflächen aus Polystyren zur nachfolgenden Bindung von Proteinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Mikroorganismen, Zellen und anderen biologischen Materialien. Das Verfahren findet Anwendung in der pharmazeutischen Industrie, den Biowissenschaften, in der Biotechnologie sowie in der Medizin.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Spezifische und empfindliche immunologische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Antigenen, Antikörpern, Haptenen, Viren, Mikroorganismen etc. erlangten in den letzten Jahren eine herausragende Bedeutung in der medizinischen und biowissenschaftlichen Forschung sowie in der klinischen Praxis. Insbesondere die als Immunoassays bezeichneten Methoden zur Bestimmung von Antigenen, Antikörpern, Haptenen etc. haben eine weite Verbreitung gefunden, da sie die Vorteile der hohen Spezifität immunologischer Reaktionen mit der extrem hohen Sensitivität des Detektionssystems (Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay, Fluoroimmunoassay etc.) in sich vereinigen.

Unter den zahlreichen beschriebenen Varianten hat die sogenannte Festphasentechnik („solid phase“-Technik), bei der einer der immunologischen Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden wird und somit eine leichte Trennung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe von den freien, ungebundenen Reaktionspartnern ermöglicht, eine weite Verbreitung gefunden. Gegenwärtig wird fast ausschließlich das auf K.J. Catt und G.W. Tregear (Science 15 [1967] 1570) zurückgehende Verfahren der adsorptiven Bindung von Proteinen an feste Kunststoffphasen, vorzugsweise Polystyren, angewandt (Übersicht: J.E. Herrmann: Methode in Enzymol. 73 [1981] 239).

Allerdings ist dieses Verfahren mit einigen Nachteilen verbunden:

- Die Beladungsdichte an Platematerialien und damit die Empfindlichkeit des Immunoassays werden durch das jeweilige Kunststoffmaterial, die zur Verfügung stehende Oberfläche sowie die Größe des Proteins limitiert.
- Während der einzelnen Inkubations- und Waschvorgänge im Immunoassay werden erhebliche Proteinmengen (60% bei Virusantigenen: J.E. Herrmann, R.M. Hendry, M.F. Collins: J. Clin. Microbiol. 10 [1979] 210; 50% bei Antikörpern: W. Schöblier, G. Wegner: Z. med. Labordiagn. 243 [1983] 177) desorbiert. Derartige Desorptionen beeinflussen wiederum die Empfindlichkeit ungünstig und bestimmen entscheidend den Fehler der Methode.

- Die mit Proteinen beladenen Platematerialien können nach Ablauf der Immunreaktion nur einmal verwendet werden, so daß sehr wertvolle und nur aufwendig zu präparierende Proteine verlorengehen.
- Die Verwendung dieser Platematerialien als Einweggefäße stellt bei größeren Probenzahlen in der klinischen Routine einen nicht unerheblichen ökonomischen Faktor dar.
- Die Möglichkeiten einer Standardisierung sind bei diesem Verfahren begrenzt.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, beschrieben verschiedene Autoren den Einsatz von chemisch modifizierten Trägern zur kovalenten Kopplung von Proteinen im Immunoassay (Übersicht: J. E. Herrmann: *Methode in Enzymol.* 73 [1981] 239). Von derartigen Materialien haben insbesondere Zellulose (DD-WP 225795 EP 0134025), Dextrane, Agar und dessen Derivate (Übersicht: S. Fuchs, M. Sela in: *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir, ed.) Blackwell Scientific Publication, Oxford (1978) neben Polyacrylsäure-Derivaten oder Polyamiden (R. M. Hendry, J. E. Herrmann: *J. Immunol. methods.* 35 [1980] 285) als Matrix Anwendung gefunden.

Alle diese Materialien haben sich jedoch nicht in dem gewünschten Umfang durchsetzen können, einmal, da die chemischen Modifizierungen häufig mit einem erheblichen Aufwand verbunden sind, und zum anderen, da diese Materialien Proteine unspezifisch binden, thermisch und chemisch relativ instabil sind oder mikrobiell leicht angegriffen werden.

In den Patentschriften DD-WP 214659 und DD-WP 218189 wird die kovalente Bindung an Glas als feste Phase im Immunoassay beschrieben. Dieses Verfahren, das sich durch eine Reihe von Vorteilen auszeichnet und auch Anwendung in der Praxis gefunden hat (W. Schöbber, F. Hiepe, T. Montag, H. E. Schmidt: *Biomed. Biochem. Acta* 44 [1985] 1247), läßt sich nur relativ schwer an die kommerzielle Gerätetechnik, die unter Nutzung von Mikrotitrationsplatten mit 96 Vertiefungen eine halb- oder vollautomatische Durchführung von Enzymimmunoassays ermöglicht, adaptieren.

Andererseits hat es nicht an Versuchen gefehlt, Polystyren chemisch zu modifizieren, um an derartig aktivierte Polystyrenoberflächen Proteine und andere biologisch aktive Verbindungen kovalent zu binden. Das Verfahren der Aktivierung von Polystyren-Festkörperoberflächen mit Salpetersäure und anschließender Reduzierung der eingeführten Nitro-Gruppen zu Amino-Gruppen, die nunmehr zur Umsetzung mit Glutaraldehyd (Übersicht: G. H. Parsons: *Methods in Enzymol.* 73 [1981] 224) oder zur Diazotierung (H. Filippsson, W. E. Hornby: *Biochem. J.* 120 [1970] 215) zur Verfügung stehen, führt zu einer Einfärbung des Polystyrens während der Nitrierung, die die Auswertung der im Enzymimmunoassay eingesetzten Mikrotitrationsplatten durch vertikale Photometrie erheblich beeinträchtigt.

Boehnisch (in: *Prot. Biol. Fluids. Proc. 24th Coll. Bruges 1976* [H. Peters, ed.], Pergamon Press, Oxford 1976, S. 743) beschrieb ein Verfahren der Aktivierung von Polystyrenoberflächen mittels Glutaraldehyd. Leider führte dieses Verfahren nicht zu den gewünschten Ergebnissen, da sich auf diese Art und Weise keine Empfindlichkeitssteigerung im Enzymimmunoassay nachweisen ließ (M. Steiner, J. L. Stratt: *Clin. Chem.* 24 [1978] 339; E. Nügel, B. Porstmann, T. Porstmann, R. Seifert, H. Schmechta: *Z. med. Labor.-Diagn.* 22 [1981] 202; eigene Ergebnisse).

In der US-Patentschrift 4001583 wird ein Verfahren der kovalenten Bindung von Proteinen mittels Glutaraldehyd an zuvor mit adiphatischen Aminen benetzten Polystyrenoberflächen beschrieben. Allerdings kann die relativ schwache auf vorzugsweise hydrophoben Wechselwirkungen basierende Bindung zwischen dem Polystyren und den adiphatischen Aminen durch Detergenzien, die in den Inkubations- und Waschmedien von z. B. Immunoassays Anwendung finden, gestört werden, so daß es zu nicht unbeträchtlichen Desorptionen während der Ausführung des Immunoassays kommen kann. Deshalb wird bisher fast ausschließlich das eingangs erwähnte Verfahren der adsorptiven Bindung an Polystyren genutzt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, Polystyrenoberflächen kostengünstig mit geringem technologischen Aufwand zu aktivieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch chemische Oberflächenmodifizierung eine hohe Bindungsfähigkeit und Bindungskapazität von Polystyrenoberflächen zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren gelöst, bei dem Polystyrenfestkörperoberflächen mit unterschiedlichen Organosilanen der allgemeinen Formel



nacheinander behandelt werden, wobei X eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Nitroso-, Sulfhydryl-, oder Halocarbonyl-Gruppe und R' eine Alkyl-, Alkylphenyl- oder Phenyl-Gruppe ist, während R für eine Alkoxy-, Phenoxy- oder Halogen-Gruppe steht und n' den Wert zwischen 0 und 20 und n den Wert zwischen 1 und 3 haben kann. Gebräuchliche Organosilane können durch folgende Formel dargestellt werden:



wo Y eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy- oder Sulfhydryl-Gruppe darstellt und R für eine Alkoxy-, Phenoxy-Halogen-Gruppe steht und n den Wert zwischen 1–3 annehmen kann. In der Praxis weit verbreitet und oft genutzte Organosilane besitzen die allgemeine Zusammensetzung



wo X die reaktive organische Gruppe entsprechend Formel I ist und R für eine Methyl- oder Ethyl-Gruppe steht.

Der Umsatz wird damit mit mindestens zwei Organosilanen der Formel I nacheinander durchgeführt, wobei die Reaktion in gasförmiger Phase erfolgt und bevorzugt wäßrige Systeme oder Wasser-Lösungsmittelgemische eingesetzt werden.

Anschließend erfolgt gegebenenfalls eine weitere Behandlung der modifizierten Polystyrenfestkörperoberflächen mit homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien.

Die Bindung der eingesetzten Organosilane an die Polystyrenfestkörperoberflächen ist überraschend, da keine Hydroxyl-Gruppen (wie z. B. bei SiO_2 -Oberflächen, vorzugsweise Glas) als Angriffspunkte zur Verfügung stehen. Der Mechanismus der Bindung ist noch weitgehend unklar. Denkbar ist, daß die Organosilane über einige wenige Hydroxyl-Gruppen des Polystyrens oder darin enthaltener Weichmacher gebunden werden, wobei möglicherweise eine Stabilisierung und Verstärkung der Bindung durch nachfolgende Polykondensation der Organosilane auftritt. Denkbar ist jedoch auch, daß die Bindung durch einige wenige konvalente Bindungen und/oder starke Nebervalenzkräfte erfolgt.

Wichtig hierbei ist, daß die Umsetzung mit den Organosilanen, die nicht toxisch sind und großtechnisch in beträchtlichem Umfang produziert werden, in der Gasphase erfolgt. Von großer Bedeutung hierbei ist, daß die Reaktion in wäßrigem Milieu oder Wasser-Lösungsmittelgemischen, wie Ethanol/Wasser oder Methanol/Wasser erfolgen kann, so daß der technologische Aufwand gering ist. Besonders vorteilhaft gestaltet sich die Aktivierung durch Anwendung von Aerosolen oder durch Unterdruck.

Nunmehr steht die organofunktionelle Gruppe den üblichen chemischen Reaktionen unter Verwendung von Amino-, Carbonyl-, Epoxy-, Carboxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Sulfhydryl-, Nitroso- oder Halocarbonyl-Gruppen zur Verfügung, so daß diese Verbindungen als Brücke zwischen der Festkörperoberfläche und der organischen/biologischen Verbindung fungieren.

Die sich durch Bindung von Organosilanen an Polystyrenfestkörperoberflächen ergebenden chemischen Modifizierungen sind sehr stabil, so daß so aktivierte Polystyren-Oberflächen im trockenen oder feuchten Zustand über lange Zeiträume ohne Aktivitätsverlust gelagert werden können und daß gebundene biologisch aktive Liganden über lange Zeit auch unter extremen Bedingungen stabil gebunden bleiben. Die unspezifischen Bindungen an so aktivierte Polystyrenoberflächen sind gering.

Organosilane zeichnen sich durch gute Biokompatibilität aus.

Das erfolgt beispielsweise so, daß die Polystyrenfestkörperoberflächen mit Aminopropyltriethoxysilan und nachfolgend mit Glycidoxypropyltriethoxysilan aktiviert werden und die nunmehr an der Festkörperoberfläche befindlichen Epoxy-Gruppen mit Proteinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen, Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien reagieren. An die so aktivierten Polystyrenfestkörperoberflächen werden im folgenden Proteine, wie Antigene und Antikörper, Nukleinsäuren, niedermolekulare Liganden, Mikroorganismen, Zellen und andere biologisch aktive Materialien, gebunden und zur Trennung und Isolierung entsprechender Wechselwirkungspartner oder vor allem zum qualitativen und quantitativen Nachweis von spezifischen Wechselwirkungspartnern im Festphasen-Immunoassay eingesetzt.

Vorteilhaft ist weiterhin, daß durch Wahl unterschiedlicher Organosilane und gegebenenfalls bifunktioneller Kopplungsreagenzien realisiert werden können, da unter Nutzung des zugrunde liegenden und erfindungsgemäßen Prinzips Polystyrenfestkörperoberflächen mit den unterschiedlichsten funktionellen Gruppen (X in Formel I) erhalten werden können. Hinzu kommt, daß – bedingt durch den Spacereffekt der Organosilane ($\text{R}' - \text{O} - 20$) und/oder der bifunktionellen Kopplungsreagenzien (so z. B. Glutaraldehyd) – die gebundenen biologisch aktiven Verbindungen fast ausnahmslos ihre Aktivität behalten.

Die Erfindung weist folgende Vorteile auf:

- Durch Verwendung vorgefertigter Formkörper aus Polystyren ist die gezielte Aktivierung nur der Flächen möglich, an die die nachfolgender Bindung erfolgen soll.
- Der technologische Ablauf der Aktivierung ist einfach und kostengünstig.
- Die aktiven Oberflächen besitzen eine hohe Bindungskapazität.
- Die optischen Eigenschaften der Formkörper sind nach der Aktivierung nicht verändert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Polystyrenröhrchen (4 ml, Durchmesser 9 mm, Höhe 40 mm, VEB Polyplast Halberstadt, DDR) werden mit Aminopropyltriethoxysilan und nachfolgend Glycidoxypropyltriethoxysilan in Wasser/Ethanol (1:1) besprüht und anschließend getrocknet. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8, werden die Röhrchen mit je 200 μl ^{125}I -IgG (gerichtet gegen das Enzym alkalische Phosphatase) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0,1 M Phosphat-Puffer, pH 6,8) versetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der überschüssigen Proteinmenge und nachfolgender intensiven dreimaligen Waschen mit jeweils 2 ml PBS-Puffer, der 0,05% Tween 20 und 0,02% NaN_3 enthält, wird die gebundene Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität unter Mitführung der eingesetzten Proteinlösung als Standard bestimmt. Danach werden die Polystyrolröhrchen wiederum zehnmal mit o. g. PBS-Puffer gewaschen und erneut die gebundene Proteinmenge durch Bestimmung der Radioaktivität bestimmt. Die so mit ^{125}I -IgG beladenen Röhrchen werden anschließend mehrfach im Enzymimmunoassay eingesetzt. Nach einem Zeitraum von vier Wochen wird die gebundene Proteinmenge wiederum durch Bestimmung der Radioaktivität ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Beispiel 2

Eine kommerzielle Mikrottestplatte (VEB Polyplast Halberstadt, DDR) wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, aktiviert und anschließend mit 3% Glutaraldehyd versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des überschüssigen Reagenz und nachfolgendem dreimaligen Waschen werden die Röhrchen mit je 200 μl ^{125}I -IgG (gerichtet gegen das Enzym alkalische Phosphatase) in den Konzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der überschüssigen Proteinmenge und nachfolgendem Waschen wird die gebundene Proteinmenge, wie in Beispiel 1 beschrieben, durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Auch hier erfolgt eine mehrmalige Bestimmung der gebundenen Proteinmenge nach weiteren Waschzyklen sowie Einsatz der Röhrchen im Enzymimmunoassay. Die Ergebnisse sind auch in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Bestimmung der Bindung von $^{125}\text{J-IgG}$ an Polystyren (alle Werte repräsentieren Zehnfachbestimmungen; zur Vergleichbarkeit wurde die gebundene Proteinmenge auf gleiche Flächeneinheiten bezogen: als Referenz erfolgte die Bindung von $^{125}\text{J-IgG}$ durch Adsorption mit einem Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6)

Proteinbindung	1. Messung (drei Wasch- zyklen)	2. Messung (weitere zehn Waschzyklen)	3. Messung (nach mehrmali- gem Eins. i. EIA)
adsorptiv:			
Polystyrenröhrchen			
10 µg/ml	760 ng/cm ²	700 ng/cm ²	488 ng/cm ²
50 µg/ml	1 598 ng/cm ²	1 464 ng/cm ²	1 110 ng/cm ²
Polystyrenkugeln			
10 µg/ml	1 150 ng/cm ²	1 026 ng/cm ²	522 ng/cm ²
chemisch aktiviert			
Polystyrenröhrchen			
10 µg/ml	1 149 ng/cm ²	1 023 ng/cm ²	1 047 ng/cm ²
50 µg/ml	2 283 ng/cm ²	2 047 ng/cm ²	2 047 ng/cm ²
chemisch aktiviert			
Polystyren			
10 µg/ml	1 504 ng/cm ²	1 327 ng/cm ²	1 327 ng/cm ²