

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2018 (15.02.2018)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2018/028848 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 33/543 (2006.01) C12N 11/08 (2006.01)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/062661

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. Mai 2017 (24.05.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

16184020.2 12. August 2016 (12.08.2016) EP

(71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V. [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: REINICKE, Stefan; Altes Bahnwerk 5, 14473
Potsdam (DE). BÖKER, Alexander; Pfeilstraße 8, 13156
Berlin (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER MBB;
Theresienhöhe 11a, 80339 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A PROTEIN-FUNCTIONALIZED FILM AS WELL AS PROTEIN-FUNCTIONALIZED FILM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES PROTEIN-FUNKTIONALISIERTEN FILMS SOWIE PROTEIN-FUNKTIONALISierter FILM

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a protein-functionalized film, in which a protein is bound to a copolymer or a polymer having an unhydrolyzed or hydrolyzed thiolactone functionalization is bound to the film by means of the existing functionalization. The present invention also relates to a correspondingly produced film.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films, bei dem ein Protein an ein Copolymer oder ein Polymer mit einer unhydrolisierten oder hydrolisierten Thiolacton-Funktionalisierung über die vorhandene Funktionalisierung an den Film angebunden wird. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem einen entsprechend hergestellten Film.



WO 2018/028848 A1

Verfahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films sowie Protein-funktionalisierter Film

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films, bei dem ein Protein an ein Copolymer oder ein Polymer mit einer unhydrolisierten oder hydrolisierten Thiolacton-Funktionalisierung über die vorhandene Funktionalisierung an den Film angebunden wird. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem einen entsprechend hergestellten Film.

10

Die Herstellung dünner enzymhaltiger Polymerschichten ist zahlreich beschrieben und dient u.a. der Stabilisierung des verwendeten Enzyms sowie der Kopplung von enzymatischen Reaktionen mit geeigneten Signalübertragungswegen. Die geringe Dicke solcher Schichten ist vor allem für Anwendungsbereiche interessant, bei denen nur geringe Mengen an aktivem Material benötigt werden, gleichzeitig aber schnelle, nicht durch Diffusionseffekte behinderte Ansprech- bzw. Kontaktzeiten gefordert sind. Zu nennen ist hier vor allem

15

die Sensorik aber auch Bereiche wie die Biokatalyse. Jedoch findet sich bisher kein System, bei dem eine einzige funktionelle Gruppe eine solche Vielzahl an Funktionen im Rahmen der Generierung der enzymhaltigen Schicht übernimmt.

5

Die reversible Anbindung von Enzymen an eine Polymerschicht über Disulfidbrücken ist in einem Patent von 1979 beschrieben (Patent US 4,176,006), jedoch müssen hier die Thiolgruppen in einem extra Schritt über ein niedermolekulares Mercaptan in die Polymerschicht eingeführt werden.

10

Verbindungen die sich zur Erzeugung dünner, enzymhaltiger Polymerschichten eignen, müssen eine ganze Reihe von Eigenschaften erfüllen. Sie müssen mit wässrigen Enzymlösungen mischbar bzw. in diesen quellbar sein, um eine hinreichende Beladung mit Enzym zu erreichen. Sie müssen funktionelle Gruppen tragen, die eine feste Anbindung des Enzyms an die Polymerschicht bzw. der Polymerschicht an das Substrat ermöglichen (z.B. kovalent). Eine Quellbarkeit der fertigen Polymerschicht im Arbeitsmedium des Enzyms (i.d.R. wässrige Lösungen) ist gefordert und oft werden Möglichkeiten zur Vernetzung der Polymermatrix angestrebt. Ober allem steht darüber hinaus die Notwendigkeit den Immobilisierungsprozess vom ersten bis zum letzten Schritt proteinkompatibel zu gestalten, d.h. eine Deaktivierung des Enzyms während Prozesses weitgehend zu verhindern.

15

20

25

30

35

Eine besondere Bedeutung kommt der Erzeugung ultradünner Schichten durch Selbstassemblierungsvorgänge von geeigneten Verbindungen (amphiphile Moleküle, polare Polymere, u.a.) an der Luft-Wasser-Grenzfläche mittels Langmuir-Technik bei, da sie die Möglichkeit bietet, dünne, auf der Wasseroberfläche gespreitete Schichten kontrolliert und in gewünschtem Maße zu komprimieren und damit Schichtdicken und —dichten einzustellen. Polymere als verwendetes Material haben dabei gegenüber niedermolekularen, amphiphilen Verbindungen den Vorteil, dass sie mechanisch stabilere Schichten bilden. Verwendbare Polymere müssen allerdings eine limitierte Wasserlöslichkeit aufweisen und strukturell einen gewissen Polaritätsgradienten aufweisen. Üblicherweise wird dies durch den Einsatz von amphiphilen Blockcopolymerstrukturen gelöst, die jedoch in ihrer Herstellung komplizierter sind als etwa Homopolymere oder statistische Copolymere. Grundsätzlich

können auch Homopolymere bzw. statistische Copolymere Langmuirfilme ausbilden (einen Polaritätsgradienten gäbe es hier entlang der Struktur einer Wiederholungseinheit), jedoch muss auch hier die limitierte Löslichkeit gewährleistet sein. Da dies aber im Widerspruch steht zu der für die spätere Anwendung geforderten Wasserquellbarkeit der Polymermatrix, muss zusätzlich noch ein Weg gefunden werden, diese nachträglich zu hydrophilisieren.

Das technische Problem liegt also darin, eine möglichst einfach aufgebaute und damit leicht zugängliche Polymerstruktur zu finden, die im Zuge der Bildung von ultradünnen, enzymhaltigen Schichten auf einem festen Substrat oder an der Luft-Wasser-Grenzfläche mittels Langmuir-Technik eine Vielzahl von Funktionen übernehmen kann: Hydrophobisierung des Polymers mit nachträglicher Möglichkeit zur Hydrophilisierung, kovalente Anbindung des Enzyms an die Polymermatrix, kovalente Anbindung der Polymermatrix an das gewünschte Substrat, nachträgliche Vernetzung der gebildeten Schicht.

Ein Verfahren, welches eine einfache, leicht zugängliche polymere Struktur einsetzt, die sämtliche oben angesprochenen Funktionen vereint und auch noch zum Teil aus biogenen Rohstoffen gewonnen werden kann, existiert bisher nicht. Funktionelle Gruppen in den Polymeren oder Polymerprecursoren übernehmen in der Regel jeweils nur eine Funktion. Zur kovalenten Anbindung von Enzymen werden in der Regel funktionelle Einheiten wie Oxiran-, Carboxyl- oder Aminogruppen eingesetzt wobei z.B. bei letzterem noch zusätzliche, mitunter giftige Linker oder Cokomponenten zur Anbindung des Enzyms notwendig sind. Oft wird das Enzym auch lediglich in einer Polymermatrix ohne kovalente Anbindung physikalisch eingeschlossen. Auch die Vernetzung der Polymermatrix erfolgt meist über zusätzlich einzusetzende Vernetzer.

Um polymerbasierte Schichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu erzeugen verlässt man sich üblicherweise auf amphiphile Blockstrukturen, wobei das Enzym dann in der Regel auch nur physisorbiert, jedoch nicht kovalent angebunden ist. Etwaig vorhandene funktionelle Gruppen übernehmen auch in diesen Fällen in der Regel nur eine Funktion.

Ausgehend hiervon ist es somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Ver-

fahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films anzugeben, das die oben angesprochenen Nachteile vermeidet. Zudem ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Protein-funktionalisierten Film bereitzustellen.

5 Diese Aufgabe wird hinsichtlich eines Verfahrens mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1 bezüglich eines Protein-funktionalisierten Films mit den Merkmalen des Patentanspruchs 15 gelöst. Die jeweilig abhängigen Patentansprüche stellen dabei vorteilhafte Weiterbildungen dar.

10 Die Erfindung betrifft demnach ein Verfahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films, bei dem ein Film, enthaltend mindestens ein Copolymer oder Polymer mit einer unhydrolysierten und/oder hydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung sowie mindestens ein Protein erzeugt oder bereitgestellt, und das mindestens eine Protein über die unhydrolysierte oder
15 hydrolysierte Thiolacton-Funktionalisierung kovalent an das mindestens eine Copolymeren oder Polymere angebunden wird.

Kennzeichnendes Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass ein spezifisches Copolymer bzw. Polymer eingesetzt wird, das eine
20 (unhydrolysierte oder hydrolysierte) Thiolacton-Funktionalisierung aufweist. Bevorzugt ist die Thiolacton-Funktionalisierung dabei über ein entsprechendes Monomer in das Copolymer bzw. Polymer eingearbeitet. Die Thiolacton-Funktionalisierung kann allerdings auch in einer Seitenkette des Copolymeren bzw. Polymeren vorliegen, beispielsweise für den Fall, dass es sich bei den
25 Copolymeren bzw. Polymeren um Pfropfpolymere handelt. Lediglich das Vorhandensein der Thiolacton-Funktionalisierung ist zur kovalenten Anbindung des Proteins erfindungswesentlich.

Das Copolymer und/oder Polymer kann dabei entweder ausschließlich
30 unhydrolysierte oder ausschließlich hydrolysierte Thiolacton-Funktionalisierungen umfassen. Ebenso ist es möglich, dass das Copolymer bzw. Polymer beide Arten der Funktionalisierung aufweist.

Die Erfindung zeichnet sich insbesondere durch die folgenden Vorteile aus:
35

- Eine funktionelle Gruppe — die bis zu 5 Funktionen erfüllt:
 - Kovalente Anbindung der Polymerschicht an das Substrat
 - Kovalente Anbindung des Proteins, insbesondere eines Enzyms an die Polymerschicht
 - Vernetzung der Polymerschicht
 - Steuerung der Hydrophilie/Hydrophobizität des Polymers
 - Bereitstellung von Thiolgruppen zur reversiblen Anbindung von Enzymen über Bildung von Disulfidbrücken bzw. zur Fixierung der Polymermatrix auf Metalloberflächen
- Leichte Zugänglichkeit dieser funktionellen Gruppe aus biobasierten Rohstoffquellen
- Verwendung eines leicht zugänglichen statistischen Copolymers hergestellt durch radikalische Polymerisation, Vermeidung komplizierter amphiphiler Block- bzw. multifunktionaler Strukturen

Der Hauptvorteil liegt darin, dass eine funktionelle Gruppe, die leicht zugänglich ist und ebenso leicht in eine Polymerkette eingebaut werden kann, eine Vielzahl von Funktionen übernimmt die im Zuge der Bildung dünner enzymhaltiger Schichten auf verschiedenen Substraten von Bedeutung sind. Dadurch wird die Verwendung von komplexen, multifunktionalen Polymerstrukturen oder Multikomponentensystemen vermieden. Gleichzeitig handelt es sich bei dieser funktionellen Gruppe um eine Verbindung, die z. B. aus biobasierten Rohstoffquellen gewonnen wird. Die Möglichkeit die Thiolactongruppen in verschiedenste Polymere einzubauen führt darüber hinaus zu einer vergleichsweise flexiblen Immobilisierungsplattform. Auch wenn das Verfahren letztlich für jedes Enzym individuell getestet werden muss, so ist es grundsätzlich auf jedes Protein anwendbar, welches z. B. mindestens eine von außen zugängliche Lysineinheit trägt.

Der Film aus den Copolymeren oder Polymeren kann dabei in situ erzeugt werden, indem der Film beispielsweise aus einer Lösung des Copolymeren oder Polymeren abgeschieden wird. Alternativ kann der Film des thiolacton-funktionalisierten Copolymeren oder Polymeren auch bereits vorab gefertigt und für die Zwecke des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird der Film allerdings in situ erzeugt und hierbei insbesondere direkt auf einem Substrat oder mittels Langmuir-Schaefer-Technik erzeugt.

5 Eine bevorzugte Ausführungsform des Erzeugens des Films auf einem Substrat umfasst hierbei das Rakeln, Spin-Coating und/oder Sprühauftrag aus einer Lösung des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren, bevorzugt aus (schwach) saurer oder neutraler Lösung, insbesondere aus einer Lösung mit einem pH-Wert von 5 bis 7. Zur Herstellung der Lösungen der
10 Copolymeren und/oder Polymeren werden dabei Lösungsmittel verwendet, die in der Lage sind, die jeweiligen Copolymeren bzw. Polymeren zu lösen.

Eine bevorzugte Ausführungsform zur Erzeugung des Films mittels Langmuir-Schaefer-Technik sieht ein Spreiten einer Lösung des mindestens einen
15 Copolymeren und/oder Polymeren in einem flüchtigen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, insbesondere Chloroform, auf der Oberfläche von Wasser oder einer wässrigen Lösung vor.

Für den Fall, dass der Film des Copolymeren oder Polymeren auf einem Substrat abgeschieden wird, ist das Substrat bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polymerfilmen oder -membranen, bevorzugt mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten Polymerfilmen oder Membranen, insbesondere mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten Filmen oder Membranen aus Polyacrylnitril, Polydimethylsiloxan, cellulosebasierten Polymeren,
20 Polyvinylalkoholen, Poly(hydroxyalkylacrylate), insbesondere Poly(2-hydroxyethylacrylat), Poly(hydroxymethylacrylat) sowie Copolymere hiervon sowie anorganischen Substraten, bevorzugt mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten anorganischen Substraten, insbesondere mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten anorganischen Siliziumwafer, Glassubstrate
25 oder Metallsubstrate, insbesondere Münzmetallsubstraten oder mit Münzmetallen beschichteten Substraten. Besonders bevorzugt als Münzmetall ist dabei Gold. Metalle, die eine kovalente Bindung mit Thiolgruppen eingehen können, beispielsweise die zuvor genannten Münzmetalle, insbesondere Gold brauchen dabei nicht notwendigerweise mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisiert sein.
30
35

Über die vorhandenen Thiolacton-Einheiten im mindestens eine Copolymeren kann somit ein kovalentes Anbinden des Films an ein ggf. vorhandenes Substrat erfolgen. Für den Fall, dass das Substrat eine oberflächlich vorhandene Aminofunktionalisierung aufweist, können diese Aminogruppen in Analogie zu den Aminogruppen des anzubindenden Proteins mit den Thiolactongruppen reagieren. Andererseits kann alternativ oder zusätzlich hierzu auch ein kovalentes Anbinden des Copolymeren oder Polymeren an das Substrat direkt über freie SH-Gruppen der hydrolysierten Thiolactoneinheit erfolgen, beispielsweise im Falle von Substraten aus Münzmetallen oder mit Münzmetallen beschichteten Substraten.

Das Protein kann auf verschiedene Art und Weise mit den Copolymeren oder Polymeren vor Erzeugung der kovalenten Bindung in Kontakt gebracht werden und dadurch in den Film des mindestens einen Copolymeren oder Polymeren eingearbeitet werden.

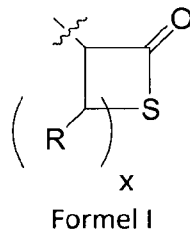
Beispielsweise kann das Protein nach Erzeugung oder Bereitstellung des Films des mindestens einen Copolymeren oder Polymeren auf die Oberfläche des Films, insbesondere durch, Spin-Coating und/oder Sprühauftrag einer Lösung des mindestens einen Proteins aufgetragen werden. Bevorzugt wird hierbei der Film des mindestens einen Copolymeren oder Polymeren mit dem mindestens einen Protein durchdrungen, d.h. das Protein penetriert in den Film des Copolymeren oder Polymeren.

Alternativ oder additiv hierzu ist es ebenso möglich, dass das mindestens eine Protein mit dem mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren vermischt wird und aus dieser Mischung der Film des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren erzeugt wird. Beispielsweise kann das Copolymere und/oder Polymere zusammen mit dem mindestens einen Protein in eine Lösung gebracht werden und aus dieser Lösung der Film erzeugt werden. Insbesondere bei dieser Ausführungsform ist das mindestens eine Protein homogen innerhalb des Films aus mindestens einem Copolymeren oder Polymeren verteilt.

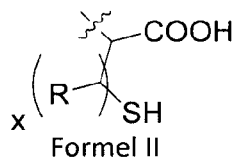
Im Falle des Erzeugens des Films des mindestens einen Copolymeren

und/oder Polymer an der Luft-Wasser-Grenzfläche kann das mindestens eine Protein mittels Langmuir-Schaefer-Technik durch Aufgabe des Proteins in die wässrige Subphase, vor, während und/oder nach Erzeugen des Films des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren und Ad- und/oder Absorption des mindestens einen Proteins an und/oder in den Film des Copolymeren und/oder Polymeren eingearbeitet werden.

Bevorzugte unhydrolysierte Thiolacton-Funktionalisierungen sind hierbei insbesondere ausgewählt aus der Gruppe aus Resten mit der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel I



Eine hydrolysierte Thiolacton-Funktionalisierung ist dabei insbesondere ausgewählt aus der Gruppe aus Resten mit der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel II

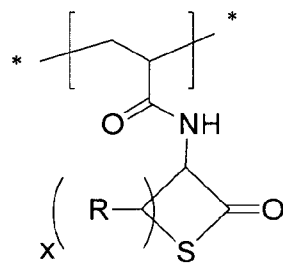


In den voranstehend beschriebenen Formeln I und II bedeuten jeweils unabhängig voneinander

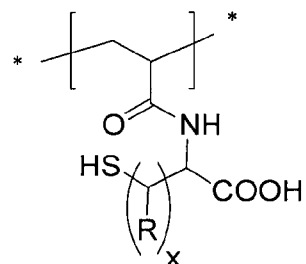
R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und
x 1 bis 6.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Rest R Wasserstoff bedeutet und x 2 oder 3 ist, insbesondere 2 ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass das Copolymere Wiederholungseinheiten beinhaltet oder das Polymere aus Wiederholungseinheiten gebildet ist mit der nachfolgenden allgemeinen Formel III (unhydrolisiert) oder IV (hydrolisiert)



Formel III



Formel IV

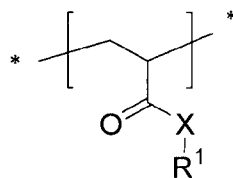
wobei jeweils unabhängig voneinander

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

x 1 bis 6

bedeuten und bevorzugt R Wasserstoff und x 2 oder 3 ist.

Das Copolymere kann hierbei zudem Wiederholungseinheiten beinhalten, die nicht Thiolacton-funktionalisiert sind und insbesondere der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel genügen:



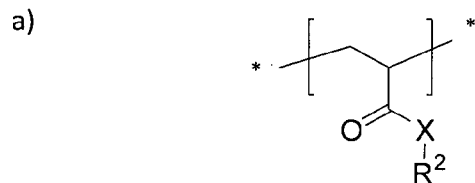
wobei jeweils unabhängig voneinander

X NH, O oder NR¹ und

R¹ einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen oder Wasserstoff bedeuten.

R^1 ist hierbei insbesondere ein Isopropyl-Rest, X insbesondere die Funktionalisierung NH.

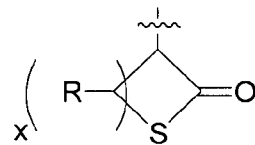
Gemäß einer insbesondere bevorzugten Ausführungsform ist das Copolymere aus den beiden folgenden Wiederholungseinheiten a) und b) gebildet ist:



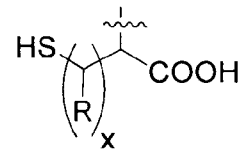
wobei jeweils unabhängig voneinander

X NH,

R^2 einen der nachfolgenden Reste



oder



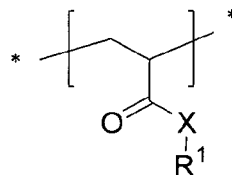
wobei jeweils unabhängig voneinander

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

x 1 bis 6

bedeuten, und

b)



wobei jeweils unabhängig voneinander

X NH, O oder NR^1 und

R^1 einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen oder Wasserstoff bedeuten,

wobei die Wiederholungseinheiten a) und b) statistisch verteilt im Copolymeren vorliegen.

Beim zuvor genannten bevorzugten Copolymeren ist es insbesondere vorteilhaft, wenn der molare Anteil der Wiederholungseinheiten a), bezogen auf die Gesamtheit der Wiederholungseinheiten a) + b) 5 bis 50 mol-%, bevorzugt 10 bis 40 mol-%, besonders bevorzugt 15 bis 30 mol% beträgt.

5

Bevorzugt ist das Protein, das kovalent an das Copolymer bzw. Polymer angebunden wird, ein Enzym, insbesondere ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aldolasen, Hydrolasen, wie z.B. Lipasen, Proteasen, Amidasen, Acylasen, Nitrilasen, Dehalogenasen, Isomerasen, Transferasen, oder ein funktionelles Protein insbesondere Kanalproteine und Antikörper sowie Kombinationen hiervon.

10

Der Film kann beispielsweise mit 0,01 bis 50 Gew.-%, bevorzugt 1 bis 20 Gew.% des mindestens einen Proteins beladen werden.

15

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass zur kovalenten Anbindung des Proteins an das mindestens eine Copolymer oder Polymer mit einer unhydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung der im ersten Schritt erzeugte Protein enthaltende Film über 0,1 bis 24 h, bevorzugt 0,1 bis 8h h, insbesondere 0,1 bis 2 h gelagert wird.

20

Die zuvor beschriebene Lagerung wird dabei bei zumindest einem der nachfolgenden Parameter ausgeführt: Bei Temperaturen von 0 bis 30 °C, bevorzugt 0 bis 10 °C und/oder bei einem pH von 7,5 bis 12, bevorzugt 8 bis 10 und/oder unter Einwirkung eines Oxidationsmittels, beispielsweise Wasserstoffperoxid.

25

Insbesondere bei den zuvor genannten Nachbehandlungsschritten findet eine Vernetzung des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren statt, indem noch vorhandene Thiolacton-Funktionalitäten hydrolysiert und vorhandene freie oder durch die Hydrolyse entstandene Thiofunktionalitäten untereinander Disulfidbrücken ausbilden.

30

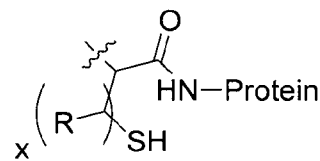
Zudem ist insbesondere über die beschriebene Nachbehandlung ebenso eine kovalente Anknüpfung des mindestens einen Copolymeren und/bzw. Polymeren an ein ggf. vorhandenes Substrat möglich, indem beispielsweise eine Aminogruppe eines oberflächlich Aminogruppen-funktionalisierten Substrats mit

35

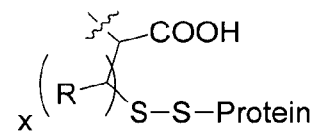
einem noch vorhandenen Thiolacton reagiert oder eine freie Thiolgruppe mit einem Thiolgruppen-affinen Substrat, bevorzugt einem Metall oder mit Metall beschichtetem Substrat, insbesondere einem Münzmetall oder mit Münzmetall beschichtetem Substrat, beispielsweise ein Goldsubstrat oder ein mit Gold beschichtetes Substrat unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert.

Alternativ hierzu ist es ebenso bevorzugt, dass zur kovalenten Anbindung des Proteins an das mindestens ein Copolymer oder Polymer mit einer hydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung der im ersten Schritt erzeugte Protein enthaltende Film unter oxidierenden Bedingungen behandelt wird, wobei Disulfidbrücken zwischen proteineigenen Thiolgruppen und den Thiolgruppen des hydrolysierten Thiolactons erzeugt werden.

Die Erfindung betrifft zudem einen Protein-funktionalisierten Film, enthaltend mindestens ein Copolymer und/oder Polymer, an das über einen Spacer, ausgewählt aus den nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formeln V und VI



Formel V



Formel VI

wobei jeweils unabhängig voneinander

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

x 1 bis 6

bedeuten,

mindestens ein Protein kovalent angebunden ist.

Die freien SH-Gruppen in Formel V können zum Teil oder insgesamt durch den Nachbehandlungsschritt Disulfidbrücken zu weiteren freien SH-Gruppen der

Formel V und/oder zu Thiolgruppen von Proteinen ausbilden und so den Polymerfilm vernetzend stabilisieren.

5 Zudem kann auch ein kovalentes Anbinden des Substrates über die Thiolactonfunktionalisierung gemäß den weiter oben stehenden Mechanismen erfolgen.

10 Sämtliche zuvor genannten bevorzugten Ausführungsformen, die im Zusammenhang mit dem Verfahren genannt sind, insbesondere hinsichtlich der einsetzbaren bzw. angebundenen Proteine, der bevorzugten Ausführungsformen hinsichtlich der zur Anbindung verwendeten funktionellen Gruppierungen gelten sowie möglicher Substrate uneingeschränkt ebenso für den erfindungsgemäßen Protein-funktionalisierten Film.

15 Der erfindungsgemäße Protein-funktionalisierte Film zeichnet sich insbesondere durch eine Dicke von 5 nm bis 500 nm aus.

20 Der Film kann dabei wie vorstehend beschrieben ebenso auf einem Substrat, das zuvor bereits eingehender definiert wurde, angeordnet sein.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass der Gehalt des mindestens einen Proteins, bezogen auf die Gesamtmasse des Films von 0,01 bis 50 Gew%, bevorzugt 1 bis 20 Gew.% beträgt.

25 Technische Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung sind insbesondere die Immobilisierung von Enzymen auf Membransubstraten für biokatalytische Anwendungen. Hier geht es vor allem um die Möglichkeit, die Enzymstabilität zu erhöhen, aufwendige Reinigungsschritte zu vermeiden sowie kontinuierliche Prozessführungen zu erlauben. Als Beispiel sei hier die
30 oben näher beschriebene beispielhaft erwähnte Immobilisierung einer Aldolase erwähnt, ein Enzym, welches bei der Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen Verwendung findet. Zur Herstellung solcher Membranen können im Prinzip etablierte, skalierbare Membranziehverfahren angewendet werden. Die Möglichkeit zur Regenerierung der enzymaktiven Membran, d.h.
35 des Neubeladens dieser mit Enzym ohne die Notwendigkeit, die Membran komplett austauschen zu müssen, dürfte für viele technische Anwendungen

einen wichtigen Pluspunkt darstellen. Ein weiteres relevantes Anwendungsgebiet wäre in der Sensorik zu suchen. Glucosesensoren beispielsweise basieren oft auf Glucose-Oxidase die in dünnen Schichten immobilisiert ist.

5 Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Ausführungen näher beleuchtet, ohne die Erfindung auf die speziell dargestellten Parameter zu beschränken.

10 Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird nachfolgend insbesondere am Beispiel der Nutzung von thiolactonhaltigen Copolymeren für verschiedene Verfahren zur Erzeugung dünner, enzymhaltiger Polymerschichten bzw. -filme auf variierenden Substraten näher erläutert.

15 Diese Schichten bzw. Filme können dabei entweder direkt auf dem gewünschten Substrat durch Techniken wie Spin-Coating und Sprühauftrag generiert oder zunächst an der Luft-Wasser-Grenzfläche mit anschließendem Übertrag auf das Substrat mittels Langmuir-Schaefer-Technik gebildet werden. Zentrales Element sind dabei die γ -Butyrothiolactoneinheiten des verwendeten Copolymers, die bevorzugt als statistisch verteilte Substituenten entlang der
20 Polymerkette angeordnet sind.

Diese nehmen mehrere, für das jeweilige Immobilisierungsverfahren essentielle Funktionen ein, deren Kombination üblicherweise nur durch Verwendung strukturell komplexer Verbindungen erreicht werden kann.

25 Gleichzeitig sind γ -Butyrothiolactonderivate als Produkte der intramolekularen Kondensationsreaktion von Methionin oder Homocystein leicht aus biologischen Rohstoffquellen zu erschließen.

30 Die Herstellung der dünnen, enzymhaltigen Polymerschicht geschieht bevorzugt in zwei Stufen. Zunächst wird die Schicht selbst auf einem passenden Substrat generiert wobei das Enzym hier zunächst nur physikalisch in die Polymerschicht eingebunden ist. In einem Nachbehandlungsschritt wird dann die feste Verbindung aller Komponenten sowie die Vernetzung und u.U.
35 Hydrophilisierung der Polymermatrix gewährleistet. Für die Grundstruktur des verwendeten Polymers kommen verschiedene Polymerklassen in Frage, wie

etwa (meth)acrylamid-, oder (meth-)acrylatbasierte Systeme. Diese sind leicht durch radikalische Copolymerisation des Hauptmonomeren mit einem analogen, thiolactonfunktionalisierten Comonomer synthetisierbar. Geht man von N-Isopropylacrylamid als Hauptmonomereinheit aus (siehe Figur 1, in der die Grundstruktur eines thiolactonhaltigen, statistischen Copolymers auf N-Isopropylacrylamid-Basis dargestellt ist), so kommt man durch einen genügend hohen Anteil an Thiolactonacrylamid-Comonomer zu einem Polymer welches in der Lage ist, definierte Langmuirfilme auszubilden und dabei hinreichend hydrophob ist, so dass dieser Film an der Luft-Wasser-Grenzfläche Ober einen längeren Zeitraum hinweg stabil bleibt. Greift man andererseits auf N,N-Dimethylacrylamid als Hauptmonomereinheit zurück, können wiederum Polymere erzeugt werden, die auch bei höheren Thiolactongehalten noch wasserlöslich sind, was vor allem für das Verfahren Ober den direkten Auftrag der Schicht auf ein Substrat wichtig ist.

Sämtliche Funktionen, die die Thiolactoneinheiten im Zuge des Immobilisierungsverfahrens einnehmen, sind in Figur 2 dargestellt. Ersichtlich sind die von den Thiolactongruppen des eingesetzten Polymers übernommenen Funktionen im Zuge der Generierung enzymhaltiger, dünner Polymerschichten auf variierenden Substraten.

A) Generierung der dünnen, enzymhaltigen Schicht

Der Direktauftrag der Polymerschicht auf ein Substrat, beispielsweise einer Polyacrylnitrilmembran die mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisiert ist, kann durch Rakeln, Spin-Coating oder Sprühauftrag aus leicht saurer Lösung erfolgen. Die Beladung mit Enzym erfolgt dann ebenfalls durch Sprühauftrag. (Figur 3). In Figur 3 links dargestellt ist die Applikation der Polymerschicht durch Rakeln; rechts die Beladung der aufgetragenen Polymerschicht mit Enzymlösung durch Sprühauftrag.

Alternativ werden Polymer und Enzym in einer Lösung gemischt und dann gemeinsam aufgetragen.

Im Falle der Filmerzeugung an der Luft-Wasser-Grenzfläche mittels Langmuir-Schaefer wird der Polymerfilm erzeugt, indem eine Lösung des Polymeren in

Chloroform auf der Wasseroberfläche gespreitet wird. Nach Verdampfen des Lösungsmittels kann der Film durch Bewegung der Barrieren der Langmuir-Filmwaage beliebig komprimiert werden bevor im Anschluss das zu immobilisierende Protein, hier beispielhaft eine Aldolase, in die Subphase injiziert wird. Nach einer festgelegten Wartezeit (etwa 1-2 Stunden), während der das Enzym an den Polymerfilm adsorbiert, wird dieser nach einer eventuellen, weiteren Komprimierung und damit Verdichtung durch einfaches Auftippen eines passenden, aminfunktionalisierten Substrats auf die Wasseroberfläche auf jenes Substrat übertragen (siehe Figur 4, die schematisch die Erzeugung einer ultradünnen, enzymhaltigen Polymerschicht mittels Langmuir-Schaefer-Technik zeigt). Durch mehrfache Wiederholung des Übertragungsschritts kann kontrolliert ein ultradünner Film mit gewünschter Schichtdicke aufgebaut werden (siehe Figur 4). Dargestellt ist hierbei der kontrollierte Aufbau einer ultradünnen Schicht eines *N*-isopropylacrylamid (NIPAAm)-basierten Polythiolactones aus Figur 1 auf einem geeigneten Substrat (hier: aminofunktionalisierte Silizium-Wafer) mittels Langmuir-Schaefer; A) Schichtdicke in Abhängigkeit von der Anzahl an Übertragungsschritten; B) AFM Topographiebild einer Polymerschicht entstanden aus aufeinanderfolgenden 8 Übertragungsschritten.

B) Nachbehandlungsschritt

Beispielhaft wird nachfolgend die Nachbehandlung einer durch Langmuir-Schaefer erzeugten aldolasehaltigen Polymerschicht beschrieben. Die Nachbehandlung von Filmen, die durch Direktauftrag gewonnen wurden erfolgt jedoch völlig analog. Im Anschluss an die Filmerzeugung und -übertragung wird das beschichtete Substrat in einem leicht basischen Puffer (pH = 9) bei 5 °C für einige Stunden gelagert, um die Anbindung des Enzyms an das Polymer sowie die Fixierung des Polymers an das Substrat über die Thiolactoneinheiten zu forcieren (siehe hierzu auch Figur 2). Gleichzeitig wird ein weiterer Teil der Thiolactone hydrolysiert, wodurch die Polymermatrix hydrophilisiert wird. Die Umsetzung der Thiolactone bedingt wiederum die Freisetzung von Thiolgruppen, die unter oxidativen Bedingungen Disulfidbrücken ausbilden können und damit eine zusätzliche Vernetzung des Polymerfilms bewirken. Um letzteres in ausreichendem Maße zu gewährleisten, setzen wir geringe Mengen Wasserstoffperoxid zu. Die erfolgreiche Hydrophilisierung kann durch

Kontaktwinkelmessungen und AFM-Studien nachgewiesen werden. Steht für die Anbindung der Polymermatrix an das Substrat kein entsprechend aminfunktionalisiertes Material zur Verfügung, kann diese auch prinzipiell über die freigesetzten Thiolgruppen erfolgen. Diese Anbindungsstrategie kommt beispielsweise für Metalloberflächen in Frage.

Durch Verwendung von im Vorfeld mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertem Enzym konnte gezeigt werden, dass die an Luft-Wasser-Grenzfläche erzeugten Filme tatsächlich enzymhaltig sind, wobei das Ausmaß der anfänglichen Komprimierung des Films die immobilisierte Menge an Enzym direkt beeinflusst. Da das verwendete Enzym wie die meisten Proteine ein multifunktionelles Amin darstellt, bedingt bereits dessen Anbindung an die Thiolactoneinheiten der Polymermatrix eine Vernetzung derselbigen. Deutlich wird dies anhand von Mikroskopiebildern, die zeigen, dass die Nachbehandlung der übertragenen Schichten diese deutlich intakter zurücklässt wenn Enzym anwesend ist, während ein Großteil des Materials in Abwesenheit von Enzym während der Nachbehandlung abgewaschen wird (siehe hierzu Figur 6, in der optische Mikroskopiebilder von dünnen, NIPAAm-basierten Polythiolactonschichten auf Silizium-Wafern, erzeugt mittels Langmuir-Schaefer, nach der Behandlung mit schwach basischem Kaliumphosphatpuffer (pH = 9) dargestellt sind). Der Kontrast zwischen den Bereichen mit und denen ohne Film korreliert direkt mit der Schichtdicke und damit der Menge an Material welches nach dem Nachbehandlungsschritt übriggeblieben ist. Grundsätzlich bleibt jedoch noch mehr Material erhalten, wenn H_2O_2 zur Ausbildung der Disulfidbrücken eingesetzt wird.

Die übertragenen Schichten zeigen enzymatische Aktivität (Figur 7), wobei im Zuge der Messungen ein Herausdiffundieren des Enzyms nicht oder nur zu einem geringen Teil zu beobachten ist. In Figur 7 ist ein Aktivitätsassay für 2-Deoxy-5-phosphatealdolase (DERA) basierend auf der Freisetzung eines fluoreszierenden Farbstoffs im Zuge der enzymatischen Umsetzung eines entsprechenden Substrats gezeigt. Die jeweilige Konzentration an Enzym (immobilisiert und in Lösung) betrug ca. 3 $\mu\text{g/mL}$ (bezogen auf das Volumen der Substratlösung). Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen mit denen sich die jeweilige Menge an immobilisiertem Enzym abschätzen lässt, kann aus den Ergebnisse der Aktivitätsstudien geschlossen werden, dass die spezifische Aktivität des

immobilisierten Enzyms und die des entsprechenden Enzyms in Lösung von der Größenordnung her ähnlich sind. Ein massiver Verlust an Enzymaktivität wird durch die erfindungsgemäße Immobilisierungsstrategie effektiv vermieden.

5

C) Modifiziertes Protokoll zur Herstellung regenerierbarer Membranen

Eine leichte Modifikation des Verfahrens zum Direktauftrag der enzymhaltigen Polymerschicht auf ein Substrat gibt uns die Möglichkeit regenerierbare enzymhaltige Schichten aufzubauen. Hier wird zunächst das Polymer allein auf die unter A) beschriebene Weise auf ein Substrat aufgebracht. Bevor die Beladung mit Enzym erfolgt wird nun jedoch zunächst eine Hydrolyse der Thiolactoneinheiten durchgeführt. Wichtig dabei ist, dass die Hydrolyse vollständig ist damit später kein Enzym irreversibel gemäß Figur 3 an die Polymerschicht anbinden kann. Die Anbindung erfolgt stattdessen durch Generierung von Disulfidbrücken zwischen enzymeigenen und den im Hydrolyseschritt freigesetzten polymereigenen Thiolgruppen unter oxidativen Bedingungen. Diese Bindungen können zu einem späteren Zeitpunkt durch ein geeignetes Reduktionsmittel wieder gespalten werden um so den Weg für eine neuerliche Beladung mit Enzym freizumachen. Die Thiolactoneinheiten dienen hierbei auch weiterhin zur Anbindung der Polymerschicht an das Substrat.

10

Eine entsprechende Vorgehensweise ist in Figur 8 skizziert, die schematisch ein Verfahren zur Erzeugung regenerierbarer, enzymhaltiger Polymerschichten durch reversible Anbindung des Enzyms an die Polymermatrix über Bildung von Disulfidbrücken darstellt.

15

20

25

30

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Herstellung eines Protein-funktionalisierten Films, bei dem ein Film, enthaltend

10

mindestens ein Copolymer oder Polymer mit einer unhydrolysierten und/oder hydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung sowie mindestens ein Protein erzeugt oder bereitgestellt, und

das mindestens eine Protein über die unhydrolysierte oder hydrolysierte Thiolacton-Funktionalisierung kovalent an das mindestens eine Copolymeren oder Polymere angebunden wird.

15

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Film direkt auf einem Substrat oder mittels Langmuir-Schaefer-Technik erzeugt wird.

20

3. Verfahren nach vorhergehendem Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Erzeugung des Films

auf einem Substrat durch Rakeln, Spin-Coating und/oder Sprühauftrag aus einer Lösung des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren, bevorzugt aus saurer oder neutraler Lösung, insbesondere aus einer Lösung mit einem pH-Wert von 5 bis 7 und/oder

25

mittels Langmuir-Schaefer-Technik durch Spreiten einer Lösung des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren in einem flüchtigen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, insbesondere Chloroform, auf der Oberfläche von Wasser oder einer wässrigen Lösung (wässrige Subphase)

erfolgt.

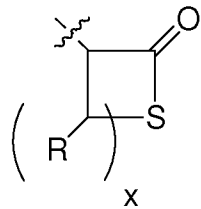
30

4. Verfahren nach vorhergehendem Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polymerfilmen oder -membranen, bevorzugt mit Aminogruppen ober-

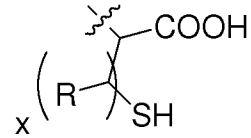
- 5 flächenfunktionalisierten Polymerfilmen oder Membranen, insbesondere mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten Filmen oder Membranen aus Polyacrylnitril, Polydimethylsiloxan, cellulosebasierten Polymeren, Polyvinylalkoholen, Poly(hydroxyalkylacrylate), insbesondere Poly(2-hydroxyethylacrylat), Poly(hydroxymethylacrylat) sowie Copolymeren hiervon sowie anorganischen Substraten, insbesondere Metallsubstraten, insbesondere Münzmetallsubstraten oder mit Münzmetall beschichteten Substraten, oder mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten anorganischen Substraten, insbesondere mit Aminogruppen oberflächenfunktionalisierten anorganischen Siliziumwafer, Glassubstrate.
- 10
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Protein
- 15 nach Erzeugung oder Bereitstellen des Films des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren auf die Oberfläche des Films aufgetragen, insbesondere durch Spin-Coating und/oder Sprühauftrag einer Lösung des mindestens einen Proteins und/oder
- 20 während der Erzeugung des Films durch Vermischen des mindestens einen Proteins mit dem mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren und/oder
- 25 im Falle des Erzeugens des Films des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymer mittels Langmuir-Schaefer-Technik durch Aufgabe des Proteins in die wässrige Subphase, vor, während und/oder nach Erzeugen des Films des mindestens einen Copolymeren und/oder Polymeren und Ad- und/oder Absorption des mindestens einen Proteins an und/oder in den Film
- in den Film des Copolymeren und/oder Polymeren eingearbeitet wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die unhydrolisierte Thiolacton-Funktionalisierung bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe aus Resten mit der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel I und die hydrolisierte
- 30

Thiolacton-Funktionalisierung bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe aus Resten mit der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel II

5



Formel I



Formel II

wobei jeweils unabhängig voneinander

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

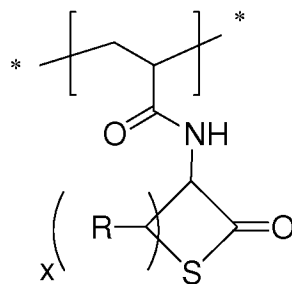
10

x 1 bis 6

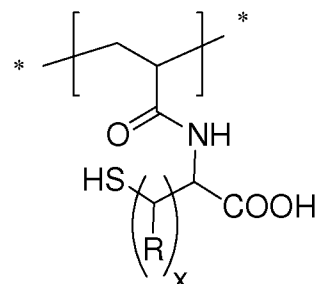
bedeuten und bevorzugt R Wasserstoff und x 2 oder 3 ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Copolymere Wiederholungseinheiten beinhaltet oder das Polymere aus Wiederholungseinheiten gebildet ist mit der nachfolgenden allgemeinen Formel III (unhydrolisiert) oder IV (hydrolisiert)

15



Formel III



Formel IV

wobei jeweils unabhängig voneinander

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

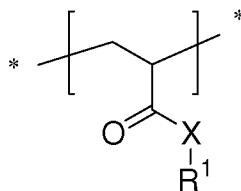
25

x 1 bis 6

bedeuten und bevorzugt R Wasserstoff und x 2 oder 3 ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Copolymere Wiederholungseinheiten der nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formel beinhaltet

5



wobei jeweils unabhängig voneinander

X NH, O oder NR¹ und

10

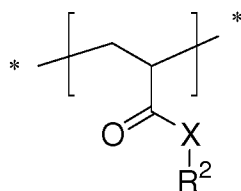
R¹ einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen oder Wasserstoff

bedeuten.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Copolymere aus den beiden folgenden Wiederholungseinheiten a) und b) gebildet ist:

15

a)



wobei jeweils unabhängig voneinander

20

X NH,

R² einen der nachfolgenden Reste



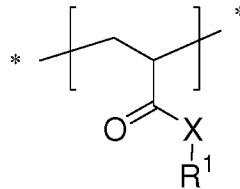
25

R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

x 1 bis 6

bedeuten, und

b)



5

wobei jeweils unabhängig voneinander

X NH, O oder NR¹ und

R¹ einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen oder Wasserstoff

10

bedeuten,

wobei die Wiederholungseinheiten a) und b) statistisch verteilt im Copolymeren vorliegen, wobei insbesondere der molare Anteil der Wiederholungseinheiten a), bezogen auf die Gesamtheit der Wiederholungseinheiten a) + b) 5 bis 50 mol-%, bevorzugt 10 bis 40 mol-%, besonders bevorzugt 15 bis 30 mol% beträgt..

15

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein ein Enzym ist, insbesondere ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aldolasen, Hydrolasen, wie z.B. Lipasen, Proteasen, Amidasen, Acylasen, Nitrilasen, Dehalogenasen, Isomerasen, Transferasen, oder ein Protein mit nicht-enzymatischer Funktion, insbesondere Kanalproteine und Antikörper sowie Kombinationen hiervon.

20

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Film mit 0,01 bis 50 Gew.-%, bevorzugt 1 bis 20 Gew.% des mindestens einen Proteins beladen wird.

25

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur kovalenten Anbindung des Proteins an das mindestens eine Copolymer oder Polymer mit einer unhydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung der im ersten Schritt erzeugte Protein

enthaltende Film über 0,1 bis 24 h, bevorzugt 0,1 bis 8 h, insbesondere 0,1 bis 2 h gelagert wird.

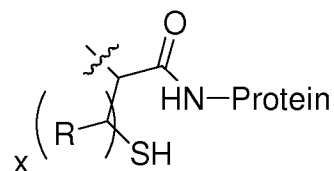
13. Verfahren nach vorhergehendem Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Lagerung

5 bei Temperaturen von 0 bis 30 °C, bevorzugt 0 bis 10 °C und/oder bei einem pH von 7,5 bis 12, bevorzugt 8 bis 10 und/oder unter Einwirkung eines Oxidationsmittels, beispielsweise Wasserstoffperoxid, erfolgt.

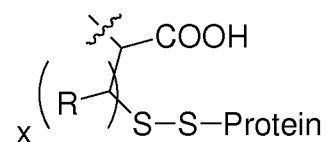
- 10 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zur kovalenten Anbindung des Proteins an das mindestens ein Copolymer oder Polymer mit einer hydrolysierten Thiolacton-Funktionalisierung der im ersten Schritt erzeugte Protein enthaltende Film unter oxidierenden Bedingungen behandelt wird, wobei
- 15 Disulfidbrücken zwischen proteineigenen Thiolgruppen und den Thiolgruppen des hydrolysierten Thiolactons erzeugt werden.

15. Protein-funktionalisierter Film, enthaltend mindestens ein Copolymer und/oder Polymer, an das über einen Spacer, ausgewählt aus den nachfolgend abgebildeten allgemeinen Formeln V und VI

20



Formel V



Formel VI

wobei jeweils unabhängig voneinander

- 25 R Wasserstoff oder einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und

x 1 bis 6

bedeuten,

5

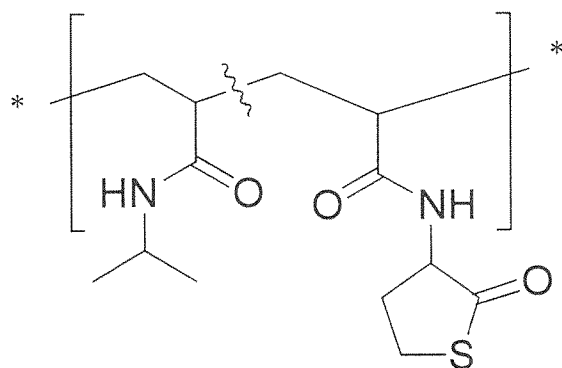
mindestens ein Protein kovalent angebunden ist,

wobei der Protein-funktionalisierter Film bevorzugt eine Dicke von 5 nm bis 500 nm, und/oder

das Copolymere oder das Polymere über Disulfidbrücken vernetzt ist und/oder mit dem Substrat kovalent verbunden ist, und/oder

der Gehalt des mindestens einen Proteins, bezogen auf die Gesamtmasse des Films von 0,01 bis 50 Gew%, bevorzugt 1 bis 20 Gew.% beträgt.

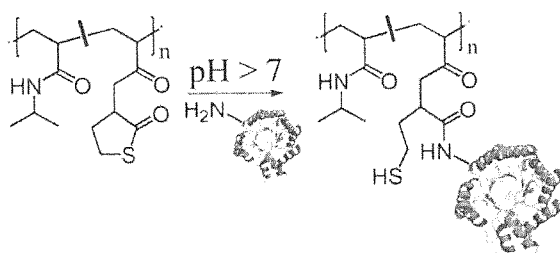
Figur 1



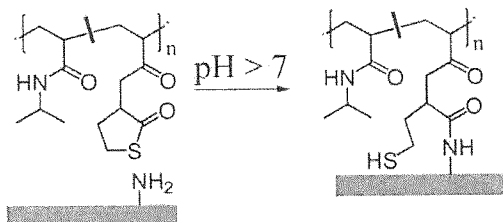
Figur 2

Hydrophobisierung
des Polymers

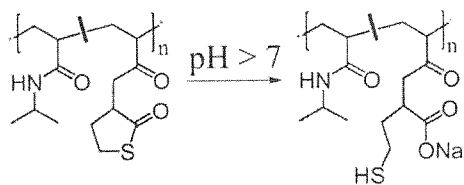
Anbindung des Enzyms



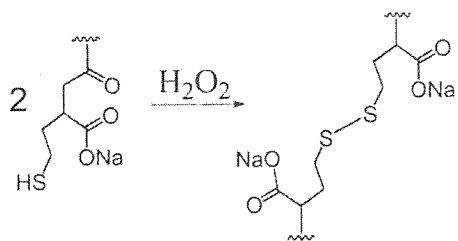
Anbindung der
Polymermatrix an das
Substrat



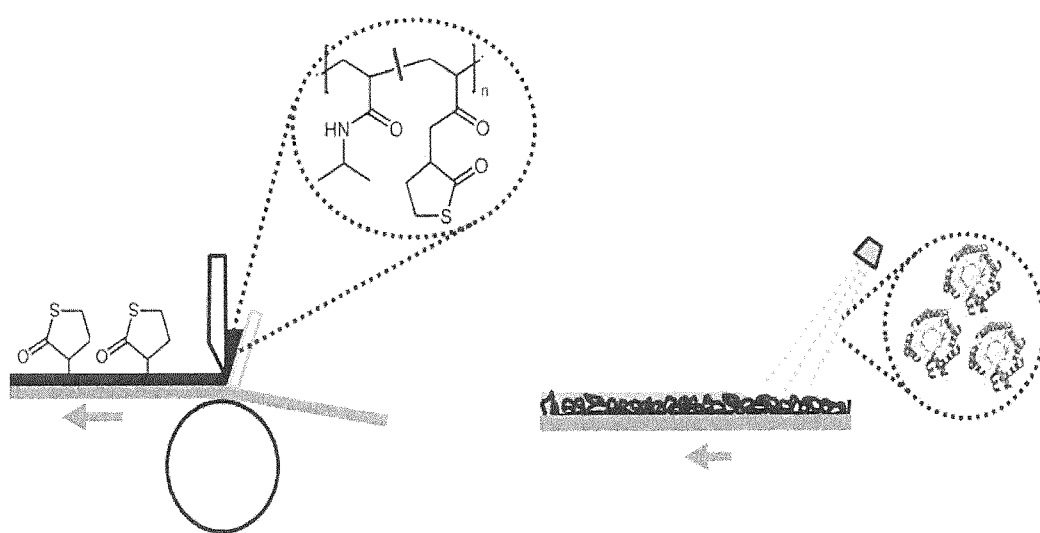
Hydrophilisierung
der Polymermatrix



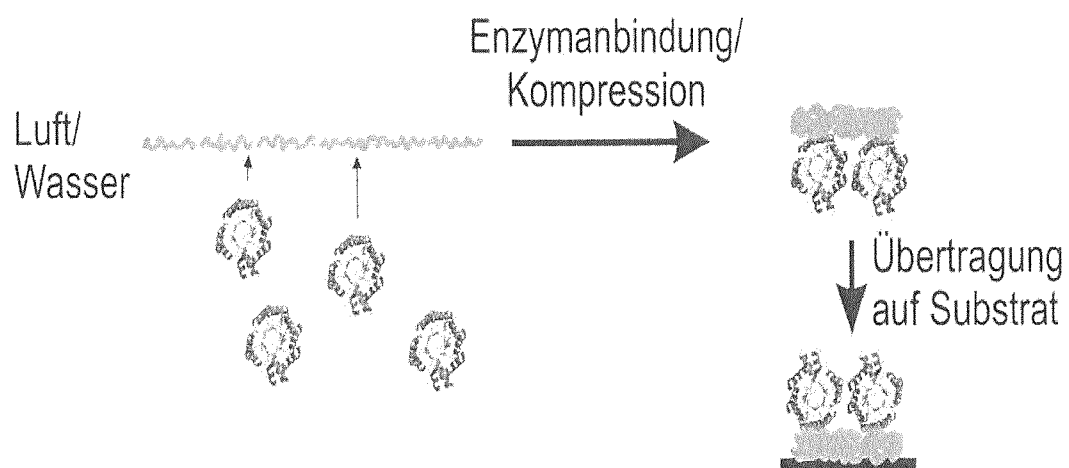
Vernetzung
der Polymermatrix



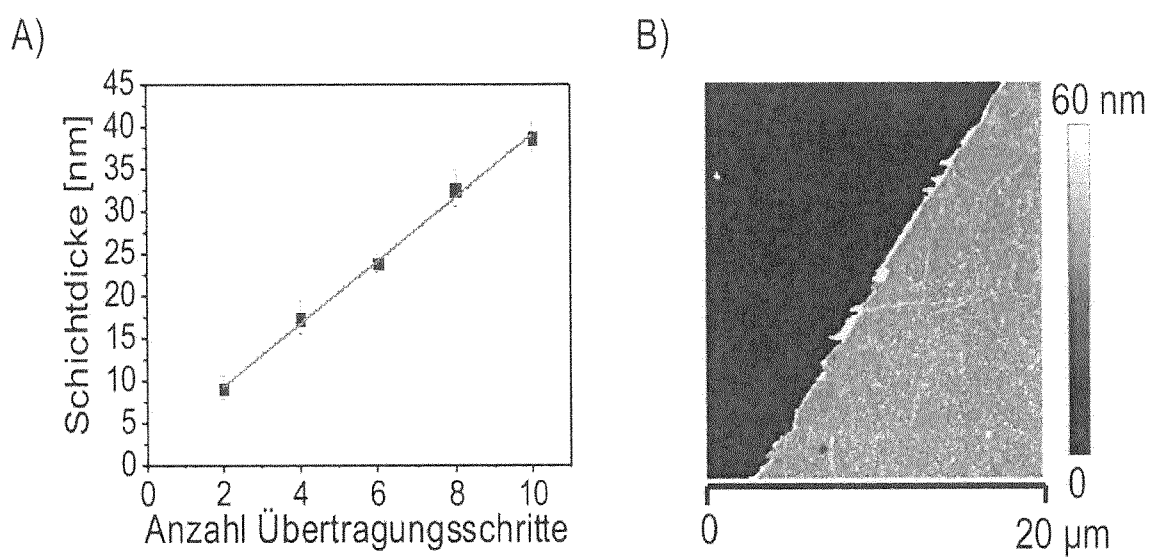
Figur 3



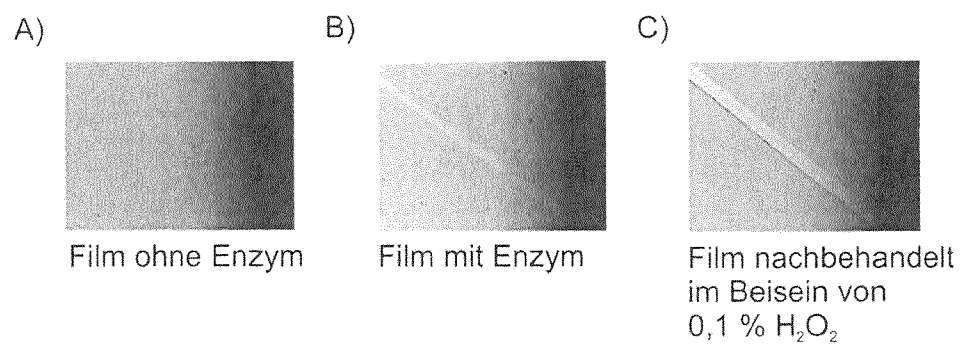
Figur 4



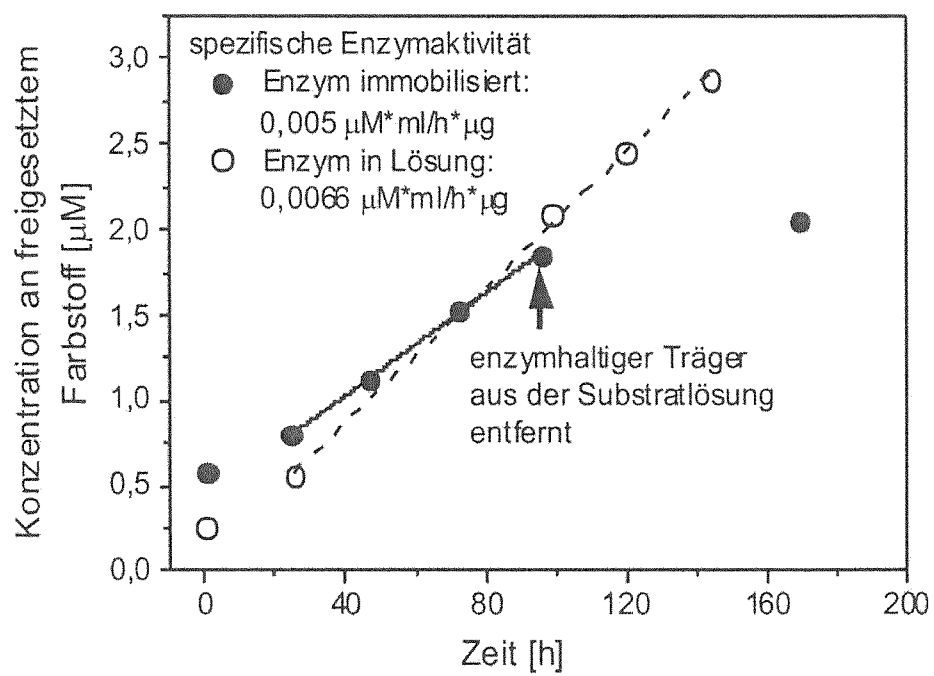
Figur 5



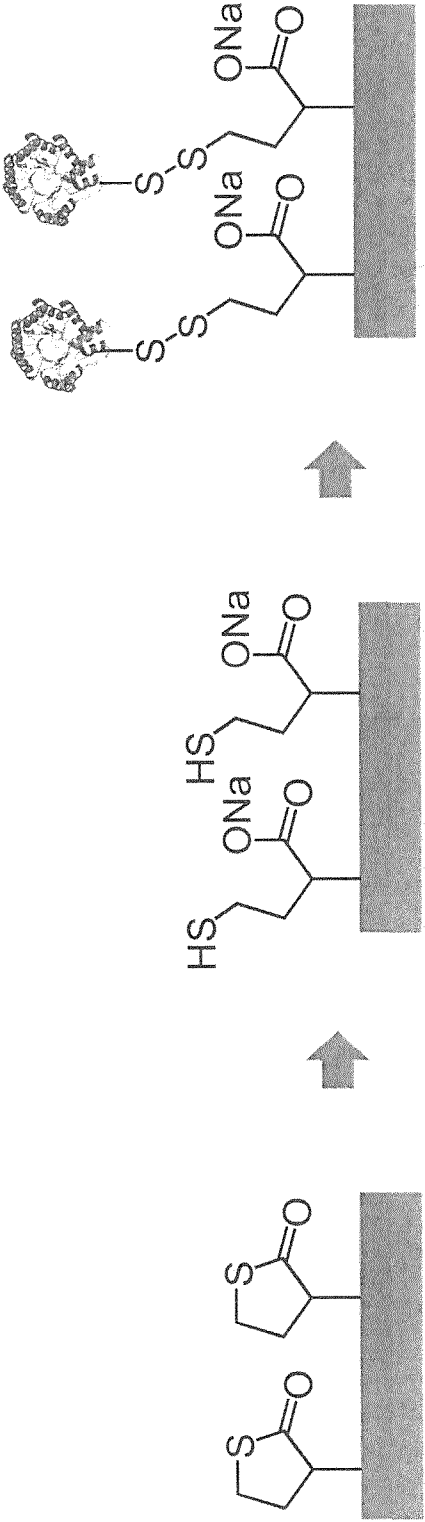
Figur 6



Figur 7



Figur 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/062661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/543 C12N11/08
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAOYU WANG ET AL: "Elastic Properties of Protein Functionalized Nanoporous Polymer Films", LANGMUIR, vol. 32, no. 1, 12 January 2016 (2016-01-12), pages 151-158, XP055320359, US ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b04334	1-5, 10-15
A	page 152, column 1 - column 2 -----	6-9
Y	US 3 171 831 A (WILLIAM TOWN BERNARD) 2 March 1965 (1965-03-02)	1-5, 10-15
A	the whole document ----- -/-	6-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 2017

Date of mailing of the international search report

11/07/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seranski, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/062661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PIETER ESPEEL ET AL: "One-Pot Multistep Reactions Based on Thiolactones: Extending the Realm of Thiol-Ene Chemistry in Polymer Synthesis", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 133, no. 6, 16 February 2011 (2011-02-16), pages 1678-1681, XP055320067, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja1098098	1-5, 10-15
A	the whole document -----	6-9
A	PIETER ESPEEL ET AL: "One-pot multi-step reactions based on thiolactone chemistry: A powerful synthetic tool in polymer science", EUROPEAN POLYMER JOURNAL., vol. 62, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 247-272, XP055284256, GB ISSN: 0014-3057, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.07.008 the whole document -----	1-15
A	HEREDIA KARINA L ET AL: "In situ preparation of protein-smart polymer conjugates with retention of bioactivity", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 127, no. 48, 7 December 2005 (2005-12-07), pages 16955-16960, XP002514531, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA054482W the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/062661

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 3171831	A	02-03-1965	GB 946378 A	15-01-1964
			GB 954411 A	08-04-1964
			US 3171831 A	02-03-1965

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G01N33/543 C12N11/08
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G01N C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAOYU WANG ET AL: "Elastic Properties of Protein Functionalized Nanoporous Polymer Films", LANGMUIR, Bd. 32, Nr. 1, 12. Januar 2016 (2016-01-12), Seiten 151-158, XP055320359, US ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b04334	1-5, 10-15
A	Seite 152, Spalte 1 - Spalte 2 -----	6-9
Y	US 3 171 831 A (WILLIAM TOWN BERNARD) 2. März 1965 (1965-03-02)	1-5, 10-15
A	das ganze Dokument ----- -/-	6-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juni 2017

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/07/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seranski, Peter

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PIETER ESPEEL ET AL: "One-Pot Multistep Reactions Based on Thiolactones: Extending the Realm of Thiol-Ene Chemistry in Polymer Synthesis", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 133, Nr. 6, 16. Februar 2011 (2011-02-16), Seiten 1678-1681, XP055320067, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja1098098	1-5, 10-15
A	das ganze Dokument -----	6-9
A	PIETER ESPEEL ET AL: "One-pot multi-step reactions based on thiolactone chemistry: A powerful synthetic tool in polymer science", EUROPEAN POLYMER JOURNAL., Bd. 62, 1. Januar 2015 (2015-01-01), Seiten 247-272, XP055284256, GB ISSN: 0014-3057, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.07.008 das ganze Dokument -----	1-15
A	HEREDIA KARINA L ET AL: "In situ preparation of protein-smart polymer conjugates with retention of bioactivity", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, Bd. 127, Nr. 48, 7. Dezember 2005 (2005-12-07), Seiten 16955-16960, XP002514531, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA054482W das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/062661

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 3171831 A	02-03-1965	GB 946378 A	15-01-1964
		GB 954411 A	08-04-1964
		US 3171831 A	02-03-1965
