

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) DD 287 950 A5

5(51) C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 719 2	(22)	15.09.89	(44)	14.03.91
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate				

(55) Verfahren; kovalente Bindung; Polyoxyalkylenglykole; biologisch aktive Verbindungen; bifunktionelle Aktivierungsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate mit primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltenden, funktionellen Gruppen werden in einem ersten Reaktionsschritt mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln in aktivierte Polymere überführt. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen, zum Beispiel von biokatalytisch aktiven oder inaktiven Proteinen und höher integrierten Systemen wie Mikroorganismen an die aktivierten Polymeren. Die Umsetzungen erfolgen in wäßrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen oder, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels. Die modifizierten, biologisch aktiven Verbindungen werden in der Biotechnologie und Medizin eingesetzt.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate, **dadurch gekennzeichnet**, daß biologisch aktive Verbindungen an Thiolgruppen, primäre Aminogruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Polymertyp der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, die in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 bis 12 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Lösungsmittelgemischen aus organischen Lösungsmitteln oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels oder einer Puffersubstanz, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln aktiviert werden, in wäßrigen Lösungen, gegebenenfalls gepuffert oder in organischen Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel oder Gemischen aus wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln, die gegebenenfalls gepuffert oder mit säurebindenden Mitteln versetzt sind oder Gemischen organischer Lösungsmittel, gegebenenfalls ebenfalls in Gegenwart von säurebindenden Mitteln, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C kovalent gebunden werden und die Isolierung und Reinigung nach an sich bekannten Verfahren erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biologisch aktive Verbindungen Biokatalysatoren wie Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme und Koenzyme oder biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine, zuckerbindende Proteine oder in vitro hergestellte Konjugate aus Biokatalysatoren und biokatalytisch inaktiven Proteinen oder nieder- und hochmolekulare Effektoren wie Nukleinsäuren, Bruchstücke von Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka, Sauerstoff bindende, aktivierende und transportierende, synthetische Verbindungen sowie Affinitätsliganden eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel Dialdehyde, diazotierte, aromatische Diamine, Diisocyanate, Diisobiocyanate, gleichzeitig Diisocyanat- und Diisothiocyannatgruppen enthaltende Verbindungen, bisaktivierte Derivate von Dikarbonsäuren wie Säurechloride, Säureazide und aktivierte Ester, Diepoxide, Chinone, Epihalogenhydrine, Karbodiimide, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine oder 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Aktivierungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C ausgeführt werden, bei Säuren freisetzenden Aktivierungsreaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die kovalente Bindung von Biokatalysatoren, vorzugsweise von Enzymen, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, bei 0°C bis 100°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, 4, 6 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß als säurebindende Mittel tertiäre Amine, Heterocyklen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Biokatalysatoren Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Das Verfahren und die danach hergestellten Verbindungen können in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Makromolekulare Verbindungen mit Aminogruppen werden sehr oft und solche mit Thiol-, Amidoxim-, Hydroxamsäure- oder Karbonsäurehydrazidgruppen weniger zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen verwendet (Methods Enzymol. 1988, 137, [Immobilized Enzymes and Cells], Pt. A-D, Ed. by K. Mosbach). In dieser Form können die mit den genannten, funktionellen Gruppen versehenen Makromoleküle bei Immobilisierungsreaktionen allerdings nur eingesetzt werden, wenn reaktive, hochaktivierte Gruppen besitzende, biologisch aktive Verbindungen an die Makromoleküle kovalent gebunden werden sollen. In der Regel werden bei Immobilisierungsreaktionen aber die makromolekularen Verbindungen mit den genannten, funktionellen Gruppen vor der kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen aktiviert, was praktisch bedeutet, daß die funktionellen Gruppen der Makromoleküle in einen solchen reaktiven Zustand überführt werden müssen, daß eine Verdünnungsreaktion beider Komponenten erfolgen kann.

In Amino-, Thiol-, Amidoxim-, Karbonsäurehydrazid- und Hydroxamsäuregruppen- in letzteren Verbindungen kann als tautomere Form ebenfalls die Oximgruppe $=NOH$ vorliegen – enthaltenden Verbindungen besitzen die funktionellen Gruppen nukleophile Eigenschaften, so daß die nukleophilen Substitutionsreaktionen und auch verschiedenartigsten Additionsreaktionen zugänglich sind. Diese Reaktionstypen gehören zu den grundlegenden Reaktionen der Syntheschemie, und auf diese Weise können durch eine Vielzahl von Verknüpfungsreaktionen von zwei oder mehreren bekannten Verbindungen neue Verbindungen synthetisiert werden. Diese Reaktionsprinzipien werden auch zur Aktivierung der zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen geeigneten, unlöslichen Makromoleküle wie Zellulose, Sepharosen, Sephadex oder Polyhydroxyethylmethakrylate angewendet. Mit Vorteil werden in diesen Fällen sehr oft bi- beziehungsweise multifunktionelle, niedermolekulare Aktivierungsmittel verwendet, weil auf diese Weise schon nach einem Reaktionsschritt das Makromolekül in aktivierter Form vorliegt. Unter den bi- oder multifunktionellen und zur Aktivierung von Makromolekülen geeigneten Aktivierungsmitteln sind eine Vielzahl leicht zugänglicher, chemischer Reagentien, die für eine Aktivierung in Frage kommen. Einige wichtige sind zum Beispiel Dialdehyde, aktivierte Dikarbonsäurederivate, aliphatische, durch Aktivierung reaktiv gemachte aromatische und heteroaromatische Dihalogenide beziehungsweise höher halogenierte Verbindungen und funktionalisierte und gleichzeitig reaktiv gemachte Diaminoverbindungen.

In wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln lösliche Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate sind für verschiedene Anwendungsfälle von Interesse, vor allem in der Biotechnologie und angewandten, medizinischen Forschung. Das setzt in jedem Falle auch die Funktionalisierung dieser Polymeren, am besten durch kovalente Verknüpfung, mit biologisch aktiven Verbindungen voraus. Diese kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen erfordert aber, daß zunächst einmal reaktive Derivate der genannten Polymeren vorliegen, die zu diesen Verknüpfungsreaktionen befähigt sind. Die bisher beschriebenen Methoden zur Aktivierung und Funktionalisierung mit biologisch aktiven Verbindungen der hydroxylgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykole und der Monoalkoxyderivate dieser Polymeren (Life Sci., 1983, 33, 1467–1473) reichen für eine breite Anwendung aber mit Sicherheit nicht aus. Mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Derivate der Polyoxyalkylenglykole und ihre gleichartig substituierten Monoalkoxyderivate stellen ebenso geeignete Derivate dieser Polymeren dar, um biologisch aktive Verbindungen an sie kovalent zu binden, zumal mit diesen reaktiven Gruppen substituierte Polymere der genannten Art aus den hydroxylgruppenhaltigen Ausgangspolymeren durch in der Regel einfache chemische Reaktionen synthetisiert werden können.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, biologisch aktive Verbindungen an mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate nach Aktivierung der genannten, funktionellen Gruppen kovalent zu binden. Dadurch sollen modifizierte, biologisch aktive Verbindungen mit breiten Anwendungsmöglichkeiten erhalten werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre ebenso substituierten Monoalkoxyderivate in eine aktivierte Form zu überführen und an diese aktivierten Polymeren biologisch aktive Verbindungen kovalent zu binden. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Typ der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2,0 bis 12,0 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln umgesetzt und aktiviert werden und an die aktivierten Polymeren in wäßrigen Lösungen, die gegebenenfalls

gepuffert sind oder Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln oder in organischen Lösungsmitteln oder in Gemischen organischer Lösungsmittel, in letzteren beiden Fällen gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C biologisch aktive Verbindungen kovalent gebunden werden. Als biologisch aktive Verbindungen für die erfindungsgemäße, kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden nieder- und hochmolekulare Verbindungen eingesetzt. Neben ihrer biologischen Wirksamkeit ist für eine erfolgreiche und stabile Bindung an die genannten Polymeren das Vorliegen reaktiver, funktioneller Gruppen zusätzliche Voraussetzung. Erfindungsgemäß werden biokatalytisch aktive Verbindungen wie Enzyme – bevorzugt solche aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen-Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme oder Koenzyme, aber auch biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine und zuckerbindende Proteine wie die Lektine kovalent gebunden. Andere biologisch aktive Verbindungen, die den zuvor genannten Kategorien nicht zugeordnet werden können und die für eine kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate in Frage kommen, sind zum Beispiel Nukleinsäuren, Bruchstücke der Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka sowie Sauerstoff bindende, transportierende und aktivierende, synthetische Verbindungen.

Als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel für mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden Dialdehyde, aromatische, diazotierte Diamine, Disocyanate, Diisothiocyanate, Säurechloride, Säureazide, und aktivierte Ester von Dikarbonsäuren, Diepoxide, Chinone, Karbodiimide, Epihalogenhydrine, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine, oder 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine verwendet, wobei die Auswahl der bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmittel auch durch die Reaktivität der substituierten Polymeren bestimmt wird. Die Aktivierungsreaktionen werden vorzugsweise in organischen Lösungsmitteln ausgeführt und dann bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden. Da bei einer Reihe von Reaktionen Säuren freigesetzt werden, wird in diesen Fällen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels gearbeitet, zum Beispiel einem tertiärem Amin, Heterocyclen mit endocyclischem, teritiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxiden, Alkalikarbonaten, Alkalialkoholaten oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten. Die ebenfalls möglichen Aktivierungsreaktionen mit einer Reihe bi- oder multifunktioneller Aktivierungsmittel in wäßrigen Lösungen werden bei säurefreisetzenden Reaktionen vorzugsweise in Gegenwart von Puffersubstanzen durchgeführt.

Die Reaktionen zur kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen an die aktivierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate können in Abhängigkeit von der zu bindenden Komponente unter unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen ausgeführt werden. Eine bevorzugte Variante, vor allem für Proteine, besteht darin, daß die biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden an die Polymeren kovalent gebunden werden. Eine andere bevorzugte Variante besteht darin, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt. Eine weitere erfindungsgemäße Variante ist dadurch gekennzeichnet, daß Biokatalysatoren und hierbei vorzugsweise Enzyme, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden kovalent an die substituierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate gebunden werden. Bei den Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln gegebenenfalls freigesetzte Säuren werden durch säurebindende Mittel wie tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate, oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten gebunden und neutralisiert.

Für die Isolierung und gegebenenfalls erforderliche Reinigung der an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate kovalent gebundenen, biologisch aktiven Verbindungen stehen eine Vielzahl bekannter Methoden zur Verfügung. Die mit Biokatalysatoren oder mit biokatalytisch inaktiven Proteinen modifizierten Polymeren werden in der Regel aus den wäßrigen Reaktionslösungen nach Methoden der Proteingewinnung und Proteinreinigung zum Beispiel durch Dialyse, Ultrafiltration und Gefriertrocknung oder durch Fällungsreaktionen mit anorganischen Salzen und organischen Lösungsmitteln isoliert. Die dabei gewonnenen Produkte können durch chromatographische Methoden wie die Gel-, Ionenaustauscher oder Affinitätschromatographie weiter gereinigt werden. In organischen Lösungsmitteln lösliche Reaktionsprodukte der Umsetzungsreaktionen, besonders die Kopplungsprodukte von niedermolekularen, biologisch aktiven Verbindungen mit den substituierten Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten, werden aus den Reaktionslösungen durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel, gegebenenfalls im Vakuum oder durch Fällungsreaktionen mit anderen organischen Lösungsmitteln oder nach Versetzen der Reaktionslösungen mit Wasser durch Extraktion mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln und Ausfällen aus diesen Lösungsmitteln isoliert. Auch diese Reaktionsprodukte können weiter gereinigt werden, zum Beispiel durch Umfällen, Umkristallisieren oder mit Methoden der Chromatographie. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen in einfacher Weise an Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate kovalent gebunden werden. Durch die kovalente Bindung entstehen neue und stabile Derivate biologisch aktiver Verbindungen. Sie besitzen für die praktische Anwendung vorteilhafte Eigenschaften, da sie in der Regel sowohl in wäßrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Dadurch ergeben sich breite und verbesserte Anwendungsfelder dieser modifizierten Polymeren in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin. Die Erfindung wird anhand von Beispielen weiter erläutert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

1 g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) in der Form seines Natriumsalzes werden in 7 ml destilliertem Wasser gelöst, und zu der Lösung werden 10 ml Aceton zugegeben. Die Lösung wird auf 5°C bis 10°C abgekühlt und tropfenweise mit einer acetonischen Lösung von 0,8 g Cyanurchlorid in 5 ml Aceton versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach mit 25 ml destilliertem Wasser versetzt und anschließend dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform extrahiert. Das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 50 mg in 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöste Penicillinacylase addiert. Nach dem Filtrieren wird die Lösung 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeeengt und lyophilisiert.

Beispiel 2

1 g w,w'-Diamino-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 10 ml 0,05 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 gelöst. Zu der Lösung werden 0,3 ml 25%iger Glutaraldehyd addiert. Die Lösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, und danach werden 10 mg Cholesterinesterase in lyophilisierter Form zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 5 Stunden bei 4°C gerührt und anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die resultierende Lösung wird durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeeengt und lyophilisiert.

Beispiel 3

Entsprechend Beispiel 2 wird das Enzym β -Lactamase kovalent gebunden, mit der Ausnahme, daß ein 0,1 molarer Phosphatpuffer vom pH-Wert 8,4 verwendet wird und das dialysierte und eingeeengte Reaktionsgemisch zur Isolierung und Reinigung des modifizierten Enzyms auf eine mit einem Affinitätssträger gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen und chromatographiert wird.

Beispiel 4

Entsprechend Beispiel 2 werden die Enzyme Cholesterinoxidase und Lipase (aus *Rhizopus arrhizus*) modifiziert, mit der Ausnahme, daß w-Methoxy-w'-amino-polyethylenglykol verwendet werden.

Beispiel 5

1 g des Bishydroxamsäurederivates des Polyethylenglykols (MG 6000) wird in 10 ml 0,05 normaler Natronlauge gelöst, mit 1 ml Epichlorhydrin versetzt, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das aktivierte Derivat des Polyethylenglykols dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform aus der wäßrigen Lösung extrahiert, das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 10 mg Concanavalin A addiert, das in 10 ml 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöst war. Die Lösung wird 9 Stunden bei 30°C gerührt und danach gegen ein Calciumsalz und Zinksalz enthaltendes, destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird danach auf 2 ml eingeeengt, und das modifizierte Concanavalin A wird durch Fällung mit Ammoniumsulfat isoliert.

Beispiel 6

Es wird ein Reaktionsgemisch aus 1 g des Bisamidoximderivates des Polyethylenglykols (MG 6000) mit 1 ml 25%igem Glutaraldehyd und 0,1 ml einer Suspension vom Mikroorganismus *Bacillus subtilis* in 20 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 hergestellt, und die resultierende Suspension wird 5 Stunden bei 4°C gerührt. Die Suspension wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, und der Feststoff wird durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt. Zur Isolierung des Feststoffes ohne Dialyse wird dieser mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und zentrifugiert.

Beispiel 7

1 g w-Methoxy-w'-hydroxamsäure-polyethylenglykol (MG 5000) werden in 20 ml Chloroform gelöst und 0,4 ml Toluendiisocyanat, aufgelöst in 5 ml trockenem Aceton, werden zur Chloroformlösung addiert. Die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, danach auf etwa 5 ml eingeeengt und schließlich mit 50 ml trockenem Ether versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird gesammelt, getrocknet und in dieser Form zu einer Enzymlösung bei 4°C addiert, die hergestellt wurde durch Auflösen von Cholinoxidase oder Cholinesterase in destilliertem Wasser. Die resultierende Lösung wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, die Lösung auf etwa 2 ml eingeeengt und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch Gelchromatographie mit Sephadex G50 weiter aufgetrennt, um die modifizierten Enzyme in reiner Form zu erhalten.

Beispiel 8

1 g Polyethylenglykol-w,w'-dikarbonsäure-dihydrazid (MG 6000) wird gemeinsam mit 0,5 g Benzochinon in einem Lösungsmittelgemisch aus 15 ml Chloroform und 10 ml Aceton gelöst. Es werden 0,2 g Kaliumkarbonat zur Lösung addiert, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird ein fester Rückstand abfiltriert, und die Lösung wird auf 5 ml eingeeengt und mit 50 ml Petrolether versetzt. Der Niederschlag wird abgetrennt, getrocknet und zu 20 ml eines 0,1 molaren Boratpuffers vom pH-Wert 8,0, in dem 20 mg Rinderserum-Albumin aufgelöst waren, addiert. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, auf etwa 2 ml eingeeengt und schließlich lyophilisiert.

Beispiel 9

1 g w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylenglykol (MG 5000) werden in 25 ml Benzen gelöst, und 0,8 g 2-Methoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazin und 0,5 ml Triethylamin werden zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden bei 80°C gerührt und nach dem Abkühlen dreimal mit jeweils 20 ml destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Die Benzenschicht wird zur Trockne eingedampft, und zum Rückstand werden 10 ml 0,5 molarer Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 addiert, in dem 20 mg Hemoglobin vom Rind aufgelöst waren. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, eingengt, und der Rückstand wird chromatographisch mit Hilfe einer mit Sephadex G50 gefüllten Säule aufgetrennt. Das erste Säuleneluat enthält das modifizierte Hemoglobin.

Beispiel 10

1 g Imidazol, 1 g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) und 0,6 g Cyanurchlorid werden in 50 ml trockenem Benzen gelöst, und die Lösung wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert, mit 20 mg Lipase aus *Rhizopus arrhizus* versetzt, und die Suspension wird 3 Stunden bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird filtriert und das Benzen im Vakuum bei Normaltemperatur entfernt. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und über eine Sephadex G50-Säule chromatographiert. Ein biokatalytisch aktives, modifiziertes Lipasepräparat wird als erste Fraktion von der Säule eluiert.

Beispiel 11

1 g w'-Amidoximderivat des w-Methoxy-polyethylenglykols (MG 5000) werden zu 15 ml frisch destilliertem Dimethylformamid addiert, in dem 0,3 g Hemin und 1,5 g Imidazol aufgelöst waren. Nachdem alle Komponenten aufgelöst waren, wird die Lösung auf eine Temperatur von 0°C bis 4°C gebracht, und zur Lösung wird eine Lösung diazotierten Benzidins addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 2 Stunden gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch in 75 ml destilliertes Wasser eingetragen, und dreimal wird mit jeweils 20 ml Benzen extrahiert. Die Benzenlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, auf 5 bis 10 ml eingengt und mit 75 ml Petrolether versetzt. Der Niederschlag des mit w-Methoxy-polyethylenglykol modifizierten Komplexes aus Hämin und Imidazol wird gesammelt und bei Umgebungstemperatur getrocknet.