



(19) österreichisches
patentamt

(10) **AT 504 367 B1** 2008-05-15

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1821/2006 (51) Int. Cl.⁸: **G10D 7/06** (2006.01)
G10D 9/02 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 2006-10-30
(43) Veröffentlicht am: 2008-05-15

(56) Entgegenhaltungen:
US 2003/0030184A1
US 4837024A

(73) Patentanmelder:
PROTAFIN BIOTECHNOLOGIE AG
A-8020 GRAZ (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR MESSUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON
CHEMOATTRAKTANTEN**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zum Messen der biologischen Aktivität von Chemoattraktanten, welches zumindest zwei Einheiten umfasst, die durch einen halbdurchlässigen Träger getrennt sind, wobei biologisch aktive Kohlehydratstrukturen, vorzugsweise Glycosaminoglykan(GAG)-Strukturen, an der Oberfläche dieses Trägers immobilisiert sind. Gemäß der Erfindung kann dieses System zur schnellen und wirtschaftlichen Messung des Grades der Zellmobilität und chemotaktischen Aktivität verwendet werden.

AT 504 367 B1 2008-05-15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zur Messung der biologischen Aktivität von Chemoattraktanten.

Das Studium von Zellverhalten nach externen Reizen, und hier insbesondere der Zellbewegung und -differenzierung, ist in der gesamten modernen biologischen Forschung vorherrschend. Im Allgemeinen werden bei dieser Forschung Zellen verschiedenen physikalischen/chemischen/biologischen Reizen ausgesetzt und die Zellantwort überwacht/quantifiziert. Durch exogenes Stimulieren von lebensfähigen Zellen erhält man Informationen über die Grundprinzipien vom Zellmetabolismus sowie über die Art der Effektorwirkung. Im Folgenden wird auf die exogen induzierte Chemotaxis ein besonderes Augenmerk gelegt.

Wird eine Zelle physikalischen/chemischen/biologischen Reizen ausgesetzt, verdient ihre Antwort besondere Aufmerksamkeit, insbesondere bei der Entwicklung und Evaluierung von therapeutischen Verbindungen und deren pharmakologische Wirksamkeit. Die Auswirkung von Anti-Krebs-/Anti-Entzündungs-Arzneien und Arzneianwärttern auf die Zellmigration muss speziell im Bereich der Onkologie- und Entzündungsforschung in Betracht gezogen werden. Für gewöhnlich werden diese Arten von Studien zunächst ex vivo unter Verwendung von entweder immortalisierten Zelllinien oder von von Patienten abgeleiteten Zellpräparaten durchgeführt. Zusätzlich zu chemotaktischen Parametern können diese Assays auch Einblick in die Prozesse der Geweberegeneration, Wundheilung, entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Prozesse vieler anderer degenerativer Erkrankungen und Leiden geben.

Bei der Durchführung dieser Art Forschung werden typischerweise Assays von Zellmigration in vitro verwendet. Die handelsüblichen Einrichtungen zur Durchführung solcher Assays basieren oft auf einer Boyden-Kammer oder sie arbeiten mit einer solchen. Die Boyden-Kammer ist ein Gefäß, das durch zwei halbdurchlässige Membranen in zwei eigene, übereinander gelagerte Einheiten geteilt wird: Einheit 1 (untere Einheit) und Einheit 2 (obere Einheit). Bei der Boyden-Kammer wird ein Migrationsmolekül/chemotaktisches Molekül in der Einheit 1 platziert und die zu untersuchenden Zellen in Einheit 2. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit können die Zellen fixiert, gefärbt und gezählt werden, um die Effekte des Reizes auf die Zellmigration quer über die Membran (Falk et al. (1980), J. Immunol. Methods 33:239-274) zu untersuchen.

Alternativ können Transwell-Assays in einem System ähnlich der Boyden-Kammer verwendet werden, wobei die Trennung der zwei Einheiten (die Migrationszellen und Chemoattraktanten enthalten) nicht nur durch eine Membran erreicht wird, sondern durch (endotheliale) Zellbeschichtete Membranen (Weber et al. (1997) J. Immunol. 159:3968-75). Dieses System hat mehrere Nachteile. Zum Beispiel benötigt man für Assays, bei denen Transwells verwendet werden, ein arbeitsaufwendiges Protokoll, welches nicht leicht auf das High-Throughput-Screening und das Verarbeiten adaptierbar ist. Das Zählen der Zellen, was oft manuell mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt wird, ist ein zeitaufwendiger, mühsamer und kostspieliger Prozess. Weiters ist das Zählen von Zellen subjektiv und schließt statistische Annäherungen mit ein. Im Speziellen können aufgrund der/des mit der Untersuchung eines gesamten Filters verbundenen Zeit und Aufwands nur repräsentative Bereiche gezählt werden, welche zufällig ausgewählt werden, und selbst wenn diese Bereiche gezählt sind, muss der Wissenschaftler/Techniker nichtsdestotrotz sein Urteil bei der Zuteilung einer solchen Zelle abgeben, wenn eine Zelle nur teilweise durch den Filter migriert ist. Angesichts der für jeden Test benötigten Mehrfachproben, können, zusätzlich zu den für den Erhalt von verlässlichen Daten notwendigen Positiv- und Negativkontrollen, für einen einzigen chemotaktischen Assay Dutzende Filter nötig sein, wobei jeder individuell untersucht und gezählt werden muss.

Die Überwachung von Zellmigration und -differenzierung ist für das Verstehen von zahlreichen biologischen Funktionen, sowohl physiologisch als auch pathologisch, wichtig. Zum Beispiel umfasst das Studium der Geweberegeneration und Wundheilung, das Studium der Entzündung, der Autoimmunerkrankungen und anderer degenerativer Erkrankungen die Analyse der Zellbewegung, welche entweder spontan oder in Reaktion auf chemotaktische Faktoren oder andere

Zellsignale geschieht. Weiters müssen die Wissenschaftler zum Untersuchen der Behandlung von verschiedenen abnormalen Gewebefunktionen oder -erkrankungen, die Effekte von potentiellen Therapien auf Zellbewegung in Zellkulturen analysieren, bevor mit klinischen Studien weitergearbeitet werden kann.

Da das Migrationsverhalten von Zellen mögliche Schlussfolgerungen auf die Entwicklung gewisser Therapeutika birgt, bedarf es eines besseren und verfeinerten In-Vitro-Systems zum Screening und Quantifizieren der Auswirkungen von Arzneien und Arzneianwärttern auf die Zellmotilität und -migration. Die Targetzellen/-gewebe, die Migrationszellen anziehen, verdienen mehr Beachtung. Die Interaktion von chemotaktischen Cytokinen, den so genannten Chemokinen, mit Glycosaminoglykan(GAG)-Strukturen auf der Oberfläche von endothelialen Zellen ist ein bedeutender Schritt bei der Entzündungskaskade (Proudfoot et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 1885-90). Während dieses Prozesses werden Chemokine auf diesen Glykanstrukturen sequestriert, um einen chemotaktischen Festphasengradienten zu bilden, von welchem Migrationszellen wie Leukozyten angezogen werden. Deshalb sind Assay-Systeme, bei welchen die biologische Aktivität der Chemokine in Gegenwart von biologisch aktiven GAG-Molekülen gemessen werden können, sehr nützlich. Für diesen Zweck können die Membranen der konventionellen Boyden-Kammern mit Targetzellen, wie endotheliale Zellen, bedeckt sein und die Leukozyten-Transmigration kann bestimmt werden. Diese so genannten Transwell-Assays sind allerdings höchst zeitaufwendig und kostspielig und liefern dem Benützer aufgrund von Zellvariation keine standardisierten Resultate. Somit besteht hier eine große Nachfrage daran, ein System zu erhalten, bei dem die kostspielige Prozedur vermieden werden kann, welches höchst reproduzierbare Resultate bringt und welches auf eine High-Through-Put-Evaluierung von Verbindungen adaptierbar ist.

Es ist ein Ziel dieser Erfindung ein System für eine einfache, wirtschaftliche, effektive und spezifische Messung der biologischen Aktivität von Chemoattraktant-Substanzen, wie Chemokinen, zur Verfügung zu stellen.

Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung ein System bereit, um die biologische Aktivität von Chemoattraktanten zu bewerten, welches zumindest eine erste Einheit und eine zweite Einheit umfasst, die durch einen halbdurchlässigen Träger getrennt sind, dadurch gekennzeichnet, dass biologisch aktive Kohlehydratstrukturen an der Oberfläche dieses Trägers immobilisiert werden. Dadurch kann bei Verwendung dieses neuen Assays die Zelloberfläche der endothelialen Target-Gefäßzellen in vivo passender nachgeahmt werden als bei der konventionellen (modifizierten) Boyden-Kammer, welche keine relevanten Bindungsinteraktionen zwischen Proteinen und Kohlehydraten beinhaltet. Darüber hinaus hat der neue Assay gemäß der vorliegenden Erfindung zusätzlich den Vorteil eines viel einfacheren und rascheren experimentellen Aufbaus und Throughputs als der Transwell-Assay durchgeführt werden kann.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können Glycosaminoglykan-Strukturen, z.B. GAGs, an der Trägeroberfläche zur Messung der biologischen Aktivität von Chemokinen immobilisiert werden.

Ein einzigartiges Merkmal der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines halbdurchlässigen Trägers, an welchem verschiedene biologisch aktive Kohlehydratstrukturen immobilisiert werden können. Diese beinhalten N- und O-gebundene, von Glykan abgeleitete Moleküle, so wie die hohe Mannose-, die komplexen und hybriden Typ- (sialyliert und fucosyliert), genauer gesagt Lewis^{ax}, Lewis Y, SialylTn (entweder sialyliert oder nicht sialyliert), vorzugsweise Glycosaminoglykan(GAG)-Strukturen. Dieser Träger ist gegenüber dem Transwell-Approach sehr vorteilhaft, da die Immobilisierung chemisch gut definierter Strukturen rasch und leicht reproduzierbar ist und somit die Möglichkeit standardisierter Messungen der biologischen Aktivität für verschiedene Chemoattraktanten vorsieht. Die GAG-Strukturen können alle GAGs sein, die aus dem Stand der Technik bekannt sind (wie in „Conformation of Carbohydrates“ von V.S.R. Rao, P.K. Quasba, P.V. Balaji, R. Chandrasekaran, 1998, harwood academic publishers, Seiten:

162-166, besprochen). Die GAGs sind vorzugsweise Heparansulphat, Heparin, Chondroitinsulphat, Keratansulphat, Dermatansulphat oder Hyaluronsäure. Diese GAGs können natürlich abgeleitet werden, entweder von gesunden Geweben oder Geweben mit einem gewissen pathologischen Phänotypen, welcher mit einer vorzugsweise ursprüngliche (unmodifizierte) Kettenlänge oder welcher durch chemische oder biochemische Mittel hinsichtlich der Größe fraktioniert wurde. Alternativ können sie vollständig synthetisch sein. Sowohl natürlich abgeleitete als auch chemisch synthetisierte GAGs können weiter chemisch modifiziert oder substituiert werden, z.B. durch Substituieren von Sulfat durch Phosphatgruppen, durch Einbringen von hydrophoben Substituenten, durch Entfernen der N-Acetyl-Gruppen und durch andere, im Stand der Technik bekannte Mittel (wie detailliert in „Carbohydrates in Chemistry and Biology“ von B. Ernst, G.W. Hart, P. Sinay (Eds.), 2000, Wiley-VCH Verlag, angegeben).

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das GAG ein aktiviertes GAG. Die Aktivierung kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren erfolgen (für einen Überblick siehe Casu et al., 2002, Seminars Thromb. Hemostasis 28: 335-342 sowie Fernandez et al., 2006, Carbohydrates Res. 341: 1253-1265), z.B. Kuppeln von GAG über freie Primäramine (NH_2), über Acetylgruppen, Sulphatgruppen oder Hydroxylgruppen an den Träger.

Die biologisch aktiven Kohlehydrate, z.B. GAG-Strukturen, können entweder kovalent oder nicht kovalent am Träger immobilisiert werden, z.B. mittels Affinitätsbindung (Biotinstreptavidin), ionische/elektrostatische oder hydrophobe Interaktion. Die Immobilisierung kann vorzugsweise mittels Linkermolekülen, wie Strukturen/Verbindungen von aliphatischen Linkern, Kohlehydrat-Linkern oder aromatischen Linkern erfolgen.

Es wird in Erwägung gezogen, dass der halbdurchlässige Träger aus jedem passenden porösen Material konstruiert werden kann. Halbdurchlässige, d.h. selektiv durchlässige Träger, sind in einer Vielzahl von Formen erhältlich, z.B. Blättern, Schläuchen und Hohlfasern, welche einen selektiven Austausch von Materialien quer über die Wände erlauben.

Es kann jedes Material verwendet werden, solange die Porengröße des Trägers ausreichend ist, um es den Chemoattraktanten und deren Inhibitoren zu ermöglichen, den Träger in beide Richtungen zu passieren und um übermäßige nicht induzierte Zellmigration in die untere Kammer zu unterbinden. Vorzugsweise ist der Träger eine Membran, insbesondere eine Membran ausgewählt aus der Gruppe umfassend eine Polycarbonat-, Polysulfon-, Polyvinyl- oder Polystyrolstruktur.

Die Porengröße der Membranen sollte vorzugsweise zwischen 0,5 und 10 μm Durchmesser sein, vorzugsweise zwischen 2,5 und 7,5 μm , mehr bevorzugt ungefähr 5 μm .

Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Chemoattraktanten kann jede, im Stand der Technik bekannte Chemoattraktant-Substanz sein. Ein Chemoattraktant ist ein Molekül - vorzugsweise ein Protein, noch mehr bevorzugt ein Chemokin -, welches die Migration von gewissen Targetzellen - vorzugsweise Leukozyten - veranlasst, indem es einen chemotaktischen Gradienten aufbaut, entlang welchem sich die Targetzellen bewegen können (siehe Kehrl, 2006, Immunol. Res. 34:211-27). Der chemotaktische Gradient ist ein chemotaktischer Festphasengradient, der durch Binden von Chemoattraktanten an spezifische Gewebe oder Gefäße oder Zelloberflächenwände gebildet wird. Die biologische Aktivität von Chemoattraktanten wird über Rezeptormoleküle auf den Targetzellen vermittelt, welche die Zellen nach der Bindung an den Chemoattraktanten aktivieren. Vorzugsweise sind diese Proteine und mehr bevorzugt Chemokine, Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Derivate oder Fragmente davon. Bei einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Chemokine IL-8, RANTES, SDF-1, I-TAC oder MCP-1 oder Derivate oder Fragmente davon.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind alle Derivate und Fragmente von Chemokinen miteinander geschlossen, die noch immer zumindest teilweise oder verringerte Chemoattraktant-Aktivität

hinsichtlich des unmodifizierten Chemokins oder des Chemokins der vollen Länge aufweisen. Genauer gesagt, kann es auch ein modifiziertes Chemokin sein, welches erhöhte oder ausgeschaltete („knocked-out“) Bindungsaffinität an die GAGs und/oder weiters inhibierte oder niederregulierte biologische Aktivität verglichen mit dem jeweiligen Wild-Typ IL-8 aufweist. Diese modifizierten Chemokine können auch dominant negative Chemokine genannt werden. Beispiele für solche modifizierte Proteine sind im Detail in der WO 05/054285 A beschrieben.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist der Chemoattraktant in einer der Einheiten des Systems vorhanden, vorzugsweise in Einheit 1. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Chemoattraktant in einer Pufferlösung vorhanden, gegebenenfalls gemeinsam mit stabilisierenden Ionen und/oder Detergenzien. Ein bevorzugter Puffer zum Testen der Chemoattraktant-Aktivität von Chemokinen sollte in einem pH-Bereich zwischen 5,0 und 9,0, vorzugsweise im Bereich zwischen 6 und 8, mehr bevorzugt im Bereich zwischen 6,5 und 7,5 liegen, und sollte eine Salzkonzentration > 20 mM NaCl, vorzugsweise > 100 mM NaCl, enthalten. Zusätzlich kann jede Detergenssubstanz verwendet werden, die unspezifische Aggregation von Chemokinen verhindert.

Ein Chemoattraktant-Inhibitor kann der anderen Kammer beigelegt werden. Dies kann ein Antagonist des Chemoattraktant-Rezeptors an der Targetzelle sein, oder ein Antikörper, der gegen den Chemoattraktant-Rezeptor oder den Chemoattraktanten selbst gezogen wurde, oder ein modifizierter Chemoattraktant oder ein Antagonist der Zelloberflächen-GAGs, oder ein Antikörper, der gegen die Zelloberflächen-GAGs gezogen wurde. Die Inhibition der Chemoattraktant-Aktivität ist durch die verringerte Migration der Targetzellen im chemotaktischen Assay - wie durch die Anzahl der migrierten Zellen ausgedrückt - hinsichtlich der nicht-inhibierten Situation definiert.

Zum Messen der biologischen Aktivität kann die obere Kammer zumindest einen Inhibitor des Chemoattraktanten, Zellen, Medien und/oder einen Puffer enthalten. Die Inhibitoren der Chemoattraktanten gemäß der vorliegenden Erfindung können alle geeigneten bekannten Inhibitoren sein, z.B. können sie GAGs, Analoga, Fragmente und Derivate davon sein, und GAG-Mimetika (siehe Freeman et al., 2005, J. Biol. Chem. 280: 8842-8849; Barbosa et al., 2004, J. Cell. Sci. 118: 253-264; Ziebell et al., 2001, Chem. Biol. 8: 1081-1094) sein. Diese sind Verbindungen, die natürlichen GAGs, entweder strukturell oder funktional oder beides, ähneln. Sie können durch chemische Synthese oder durch Extraktion aus einer natürlichen Quelle stammen oder aus einer Kombination von beiden stammen. Typische GAG-Mimetika, sowohl strukturell als auch funktional, sind z.B. Heparine mit geringem Molekulargewicht (LMHWs), welche als Inhibitoren der Blutgerinnung angewendet werden und somit die Aufgabe der physiologischen, von den Mastzellen freigesetzten Heparine nachahmen. GAG-Mimetika können alle Strukturen sein, die die gleiche oder ähnliche Funktion wie natürlich vorkommende GAGs haben. Alternativ dazu können Chemoattraktant-Inhibitoren jedes natürliche, modifizierte oder mutierte Protein, vorzugsweise ein natürliches, modifiziertes oder mutiertes Chemokin, vorzugsweise ein dominant negatives, wie oben erwähntes Chemokin sein. Alternativ dazu können sie GCPR-Antagonisten sein (z.B. die Verbindung mit geringem Molekulargewicht Traficet-EN von ChemoCentrys, ein CCR9-Antagonist, der sich derzeit in einer internationalen klinischen Testphase II mit über 400 Patienten mit Morbus Chron befindet).

Gemäß einer spezifischen Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße System zwei Einheiten, wobei Einheit 1 Chemokine enthält, Einheit 2 Leukozyten, und wobei die Einheiten durch einen halbdurchlässigen Träger getrennt werden, welcher daran immobilisiertes biotinyliertes Heparin aufweist.

Die für das System gemäß der Erfindung geeigneten Einheiten können aus jeglichem Material sein, das für chemotaktische Assays (gemäß der Erfindung können die Ausdrücke „Kammer“ und „Einheit“ gleichbedeutend verwendet werden) nützlich ist. Vorzugsweise bestehen die Einheiten aus Glas oder synthetischem Material, z.B. Polyethylen oder Polypropylen. Auch die

Dimensionen der Einheiten können so geändert werden, dass sie der vorteilhaften Spezifikation entsprechen. Grundsätzlich kann auch die allgemeine Architektur einer Boyden-Kammer für die vorliegende Erfindung verwendet werden; diese kann in einfacher Weise durch den Fachmann gemäß der Lehre der vorliegenden Erfindung angepasst werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das System zum Messen des Grades der Zellmobilität und/oder des Grades der chemotaktischen Aktivität verwendet werden. Dies kann dadurch erfolgen, dass eine GAG-beschichtete Membran zwischen den beiden Einheiten einer Boyden-Kammer platziert wird, welche die die Targetzellen enthaltende Einheit (Einheit 2, siehe Fig. 1) und die den Chemoattraktanten enthaltende Einheit (Einheit 1) trennt. Im Gegensatz zur konventionellen Boyden-Kammer führt dies zu einer strukturellen Änderung des Chemoattraktanten nach der Bindung an die GAG-Moleküle an der Membran, was ein konformativer Auslöser für die Aktivierung des Chemoattraktant-Rezeptors an den Targetzellen ist, auf eine Weise, die der In-vivo-Situation ähnlicher ist.

Die folgenden Beispiele und Figuren beschreiben die Erfindung detaillierter, beschränken jedoch nicht den Umfang der Erfindung.

Figuren

Figur 1: Schematisches Bild der modifizierten Boyden-Kammer mit immobilisierten GAGs auf der halbdurchlässigen PC-Membran

Figur 2: Resultate eines chemotaktischen Assays unter Verwendung von nicht beschichteten und mit Heparin beschichteten PC-Membranen bei verschiedenen Chemokin-Konzentrationen

Beispiele

Chemotaktischer Assay in einer Heparin-modifizierten Boyden-Kammer

Die Transfilter-Chemotaxis der Neutrophile in Antwort auf IL-8-Mutanten wurde in einer mikrochemotaktischen Kammer (Neuroprobes, Boyden-Kammer mit 48-Well) untersucht, welche Kammer mit einer PVP-freien, mit Streptavidin beschichteten Polycarbonatmembran von 5 µm (Neuroprobes) ausgestattet ist, an welcher biotinyliertes Heparin immobilisiert wurde. Es wurde festgestellt, dass PVP-freie Membranen dichter mit Streptavidin beschichtet sind als PVP-enthaltende Membranen. Diese Membranen wurde danach mit 100 µM-biotinylierter Heparin(Sigma)-Lösung in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen mit PBS wurden die Membranen im chemotaktischen Assay verwendet.

Zellpräparierung:

Kurz gesagt wurde eine neutrophile Fraktion aus frisch entnommenem menschlichem Blut hergestellt. Dies erfolgte durch Zugabe einer 6%-Dextran-Lösung in das Blut (1:2), welches Blut zuvor mit EDTA gegen eine Gerinnung behandelt wurde, welches dann für die Sedimentation für 45 min stehen gelassen wurde. Die obere klare Zelllösung wurde gesammelt und zweimal mit HBSS (0,4 g/l KCL, 0,06 g/l KH₂PO₄, 0,35 g/l NaHCO₃, 8 g/l NaCl, 0,05 g/l Na₂HPO₄) gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und schließlich mit HBSS bei 2 Mio/ml Zellsuspension verdünnt, wobei berücksichtigt wurde, dass lediglich 60 % der gezählten Zellen Neutrophile waren.

Chemotaktischer Assay:

IL-8 wurde in HBSS enthaltend 0,14 g/l CaCl₂ und 0,1 g/l MgSO₄ bei Konzentrationen von 10 µg/ml, 1 µg/ml und 0,1 µg /ml verdünnt und in das untere Abteil der Kammer (26 µl pro Well) gegeben. Die frisch hergestellten Neutrophile wurden in die oberen Kammer (50 µl per Well)

geimpft und für 30 Minuten bei 37°C in einem 5%-CO₂-befeuchteten Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kammer auseinandergenommen, die obere Seite des mit Heparin beschichteten Filters wurde gewaschen und abgetrocknet und die an der unteren Seite haftenden Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit Hemacolor-Lösungen (Merck) gefärbt. Die Zellen wurden dann bei 400-facher Vergrößerung in 4 zufällig gewählten mikroskopischen Feldern pro Well gezählt. Schließlich wurde das Mittel der drei unabhängigen Experimente gegen die Chemokin-Konzentration aufgetragen.

Patentansprüche:

1. Ein System zur Bewertung der biologischen Aktivität von Chemoattraktanten, welches zumindest eine erste Einheit und eine zweite Einheit umfasst, die durch einen halbdurchlässigen Träger getrennt sind, *dadurch gekennzeichnet*, dass biologisch aktive Kohlehydratstrukturen an der Oberfläche dieses Trägers immobilisiert sind.
2. Das System gemäß Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die aktiven Kohlehydratstrukturen aus der Gruppe der Glycosaminoglykane (GAGs) ausgewählt sind.
3. Das System gemäß Anspruch 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die GAGs natürlich abgeleitete GAG-Strukturen, chemisch synthetisierte GAG-Strukturen oder chemisch modifizierte oder substituierte GAG-Strukturen sind.
4. Das System gemäß Anspruch 2 oder 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die GAGs von Heparin, Heparansulphat, Keratansulphat, Dermatansulphat, Chondroitinsulphat und Hyaluronsäure oder Derivaten oder Fragmenten davon abgeleitet, diesen ähnlich oder mit diesen identisch sind.
5. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Chemoattraktant aus der Gruppe bestehend aus Chemokinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren ausgewählt ist.
6. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Chemokine aus der Gruppe bestehend aus IL-8, RANTES, SDF-1, I-TAC oder MCP1 oder Derivaten oder Fragmenten davon ausgewählt sind.
7. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass der halbdurchlässige Träger eine Membran ist, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polycarbonat, Polyvinyl oder Polystyrol.
8. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Kohlehydratstruktur an der Membran nicht kovalent immobilisiert ist.
9. Das System gemäß Anspruch 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass die nicht kovalente Immobilisierung durch Affinitätsbindung, ionische/elektrostatische Interaktion oder hydrophobe Interaktion erfolgt.
10. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Kohlehydratstruktur an der Membran kovalent immobilisiert ist, vorzugsweise mittels Linker-Strukturen, vorzugsweise mittels aliphatischen Linkern, Kohlehydrat-Linkern oder aromatischen Verbindungen.
11. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, *dadurch gekennzeichnet*, dass die immobilisierte Kohlehydratstruktur ein GAG ist, vorzugsweise aktiviertes GAG, mehr bevorzugt GAG, welches durch direkte Kuppelung mittels freier Primäramine, Acetylgruppen,

Sulphatgruppen oder Hydroxylgruppen aktiviert ist.

- 5 12. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, *dadurch gekennzeichnet*, dass die erste Einheit zumindest einen Chemoattraktanten enthält, gegebenenfalls gemeinsam mit einem Puffer oder mit Detergenzien.
13. Das System gemäß Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Ionenstärke > 100 mM ist und der pH-Wert im Bereich von 6,5 bis 7,5 liegt.
- 10 14. Das System gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, *dadurch gekennzeichnet*, dass die zweite Einheit zumindest einen Inhibitor eines Chemoattraktanten und/oder Zellen enthält.
- 15 15. Das System gemäß Anspruch 14, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Inhibitoren der Chemoattraktanten aus der Gruppe von GAGs, Analoga, Fragmenten oder Derivaten oder GAG-Mimetika ausgewählt sind.
16. Das System gemäß Anspruch 15, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Inhibitoren der Chemoattraktanten aus der Gruppe von modifizierten Chemokinen oder mutierten Chemokinen ausgewählt sind.
- 20 17. Ein System zur Bewertung der biologischen Aktivität von Chemoattraktanten, welches zwei Einheiten umfasst, wobei die erste Einheit Chemokine enthält, die zweite Einheit Leukozyten, und wobei die Einheiten durch einen halbdurchlässigen Träger getrennt sind, welcher daran immobilisiertes, biotinyliertes Heparin aufweist.
- 25 18. Verwendung eines Systems gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 zum Messen des Grades der Zellmobilität.
- 30 19. Verwendung eines Systems gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 zum Messen des Grades der chemotaktischen Aktivität.

Hiezu 2 Blatt Zeichnungen

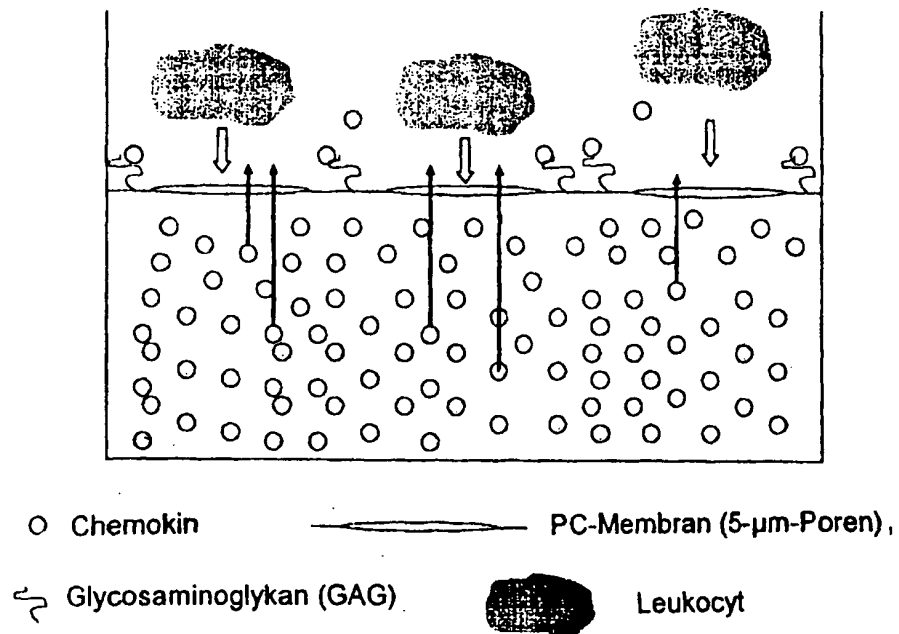
35

40

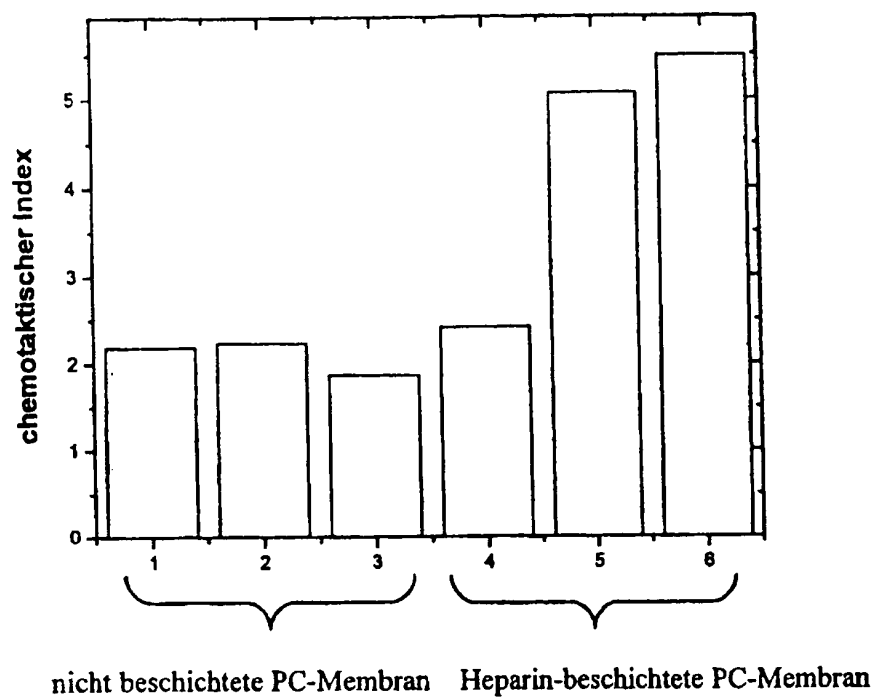
45

50

55



Figur 1



Säule 1 & 4: wtIL-8, 0,1 µg/ml
Säule 2 & 5: wtIL-8, 1 µg/ml
Säule 3 & 6: wtIL-8, 10 µg/ml

Figur 2