

(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
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/064122 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 9/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01584

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Februar 2002 (14.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 08 857.4 14. Februar 2001 (14.02.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: HUNGER, Hans, Dieter [DE/DE]; Uhland-
strasse 21, 16321 Bernau (DE).

(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt
Ziebig & Schneider, Schützenstrasse 15 - 17, 10117 Berlin
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BIOACTIVE AND BIOCOMPATIBLE CONJUGATES WITH MAGNETIC PROPERTIES AND A METHOD FOR
PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: BIOAKTIVE UND BIOKOMPATIBLE KONJUGATE MIT MAGNETISCHEN EIGENSCHAFTEN UND
VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to bioactive and biocompatible conjugates with magnetic properties and to a method for produc-
ing the same. The aim of the invention is to obtain a preparation of magnetically separable conjugates that have a high bioactivity and
biocompatibility. To achieve this, the magnetically separable, bioactive and biocompatible conjugates consist of a network of struc-
tures with superparamagnetic or ferromagnetic properties, which consist in part of biomolecules and/or cells, optionally provided
with active groups and one or more cross-linked layers that are penetrated by channels, said layers consisting in part of magnetic
iron oxides or mixed oxides of the formula $MeO \cdot Fe_2O_3$, wherein Me represents divalent metal ions such as Fe, Ba, Sr, Mn, Zn or
Co and Fe_2O_3 represents γ - Fe_2O_3 or magnetic pure metals such as cobalt and iron. The biomolecules and/or cells can be subjected
to biochemical action through said layers.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf bioaktive und biokompatible Konjugate mit magnetischen Eigenschaften
und Verfahren zu deren Herstellung. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Präparation von magnetisch separierbaren
Konjugaten mit hoher Bio-Aktivität und Bio-Kompatibilität zu ermöglichen. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß mag-
netisch separierbare, bioaktive und biokompatible Konjugate hergestellt werden, die aus Netzstrukturen mit superparamagnetischen
oder ferromagnetischen Eigenschaften bestehen, die teilweise aus Biomolekülen und/oder Zellen, die gegebenenfalls mit Ankergrup-
pen versehen sind, und einer oder mehreren von Kanälen durchbrochenen, vernetzten Schichten, die teilweise aus magnetischen
Eisenoxiden oder Mischoxiden der Formel $MeO \cdot Fe_2O_3$ bestehen, wobei Me zweiwertige Metallionen wie Fe, Ba, Sr, Mn, Zn
oder Co und Fe_2O_3 γ - Fe_2O_3 oder magnetische Reinelemente, wie Kobalt und Eisen sind, durch die die Biomoleküle und/oder Zellen
biochemisch erreichbar sind, aufgebaut sind.

WO 02/064122 A1

**Bioaktive und biokompatible Konjugate mit magnetischen
Eigenschaften und Verfahren zu deren Herstellung**

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf bioaktive und biokompatible Konjugate mit magnetischen Eigenschaften und Verfahren zu deren Herstellung gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1 und 13.
- 10 Im Stand der Technik findet man eine Reihe von magnetisch manipulierbaren Materialien, die sich in ihrer Größe, Zusammensetzung und Wirkung auf Zielstrukturen stark unterscheiden.
- 15 Verfahren zur Herstellung magnetisch beweglicher, biologisch aktiver Partikel sind bekannt. So sind sogenannte „magnetische Beads“ (Technical Handbook 3rd Edition 1998 „Biomagnetic Techniques in Molecular Biology“) bekannt, die aus uniformen, superparamagnetischen, monodispersen Mikrometer-Polymerpartikeln (z.B. Polystyrol) bestehen, die etwa 10 Gew. % magnetische Nano-Magnetitpartikel enthalten und deren Oberfläche mit unterschiedlichen Biomolekülen wie z.B. Nukleinsäurefragmenten, Dextran oder Antikörpern beschichtet wurden und die in der molekularbiologischen
- 20 Forschung und der klinischen Diagnostik Einsatz finden. Diese Partikel besitzen einen Durchmesser von 0,5-100 Mikrometern und sind für einen direkten Einsatz im klinischen Bereich zu groß. Die Biomoleküle sind ausschließlich auf der Oberfläche der Polymerkugeln
- 25 fixiert.
- 30

Verfahren zur Herstellung von Dispersionen kolloidaler, superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel sind vielfach beschrieben. So werden z.B. in

der DE 196 54 965 dispergierbare Partikel, die superparamagnetische/ferromagnetische Kristalle und/oder maßgeschneiderte di-, tri- oder Blockcopolymere enthalten, in der DE 196 24 426 magnetische Flüssigkeiten für den Transport von diagnostischen oder therapeutisch wirksamen Substanzen, in der DE 4309333 superparamagnetische Teilchen, Verfahren zur Herstellung und Verwendung, in der DE 19736736 Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit definierten Molekülschichten, in der DE 19758335 eine Magnetflüssigkeit auf der Basis unpolarer Trägerflüssigkeit und Verfahren zur Herstellung, in der DE 19758350 eine magnetische Flüssigkeit und Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung, in der DE 4325386 eine magnetische Flüssigkeit auf der Basis einer wässrigen Trägerflüssigkeit, in der DE 19702710 stabile und/oder instabile Dispersionen superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Kristalle und in der DE 3709851 NMR-Diagnostische Flüssigkeitszusammensetzungen beschrieben.

All diesen Verfahren ist gemeinsam, dass sie zunächst magnetische Partikel präparieren und diese danach mit biologischen Material in Kontakt bringen. Die Bio-Aktivität und Bio-Kompatibilität der Materialien ist nachteiligerweise gering und wurde nie vergleichend untersucht.

Weiterhin ist bekannt, vorgebildete magnetische Nanopartikel mit Biomolekülen zu beschichten. So wird im U.S. Pat. No. 5,512,332 ein Verfahren zur Herstellung von beschichteten magnetischen Partikeln durch Inkubation von magnetischen Partikeln mit beschichtenden Materialien beschrieben. Als Beschichtungsmaterialien werden natürliche oder synthetische Materialien wie z.B. Polypeptide, Proteine

oder Antikörper verwendet. Dabei werden ausgehend von einer Teilchenpräparation z.B. durch Beschallung zunächst sehr kleine magnetische Teilchen hergestellt und diese mit den Beschichtungsmaterialien inkubiert.

5

In U.S. Pat. No. 3,970,518 und 4,018,886 wird die physikalische Beschichtung von magnetischen Partikeln über Adsorptionskräfte beschrieben. Es wird dabei die Herstellung von Nickel-Teilchen mit einem Durchmesser von 1µm durchgeführt, die mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet sind. Bei Präparationen dieser Art wird von enormen Auswaschungen von nichtadsorbiertem Material (U.S. Pat. No. 5,512,332) berichtet. In U.S. Pat. No. 4,554,088 wurde gezeigt, dass bei Präparationen dieser Art an die Oberfläche von Eisenoxiden adsorbierte Antikörper durch Inkubation mit 1M Kochsalz leicht abgelöst werden können, so dass nur sehr wenig adsorbiertes Material an der Oberfläche zurückbleibt. Diese Ergebnisse können von eigenen Untersuchungen bei der Adsorption von BSA an Magnetitpräparationen gestützt werden.

10

15

20

Aus U.S. Pat. No. 4,230,685 ist die Präparation von Magnetit-Teilchen, die Albumin und Protein A durch eine Emulsionspolymerisation bekannt.

25

In U.S. Pat. No. 4,554,088 wird eine Silanisierung von magnetischen Metalloxiden versucht, um diese kovalent an bioaktive Moleküle zu binden. Damit ist aber die freie Beweglichkeit, die für entsprechende Nachweisreaktionen oder sogar pharmakologische Wirkungen erforderlich ist, stark eingeschränkt.

30

In U.S. Pat. No. 4,452,773 wird die Herstellung von „kolloidalen“ Eisenoxid-Partikeln, die mit nicht-ionischen Polysacchariden beschichtet sind, durch Bildung des Magnetits in 25%-iger Polysaccharidlösung beschrieben. Danach werden die Biomoleküle mittels chemischer Vernetzungstechnologie an den Partikeln fixiert.

Aus U.S. Pat. No. 4,795,698 ist eine Kopräzipitation von Metalloxiden und von Polymeren oder Proteinen von 0,1-1mg/ml durch Titration mit einer Base in den schwach alkalischen Bereich, Waschschritten und anschließender Beschallung bekannt. Dabei wird fast das gesamte Polymer oder Protein gefällt.

Es hat sich gezeigt, dass ähnliche Präparationen unter Verwendung von Proteinen nachteiligerweise eine stark reduzierte biologische Aktivität (z.B. Erkennbarkeit durch Antikörper) der adsorbierten Biomoleküle zeigen. Auf Grund der Präparationstechniken besitzen die beschriebenen Teilchenpräparationen eine eingeschränkte Bio-Kompatibilität.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Präparation von magnetisch separierbaren Konjugaten mit hoher Bioaktivität und Biokompatibilität zu ermöglichen.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1 und 13. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, dass magnetisch separierbare, bioaktive und biokompatible

Konjugate hergestellt werden, die Netzstrukturen mit superparamagnetischen oder ferromagnetischen Eigenschaften aufweisen, die teilweise aus Biomolekülen und/oder Zellen, die gegebenenfalls mit Ankergruppen versehen sind, und einer oder mehreren von hohlen Kanälen durchbrochenen, vernetzten Schichten, durch die die Biomoleküle und/oder Zellen biochemisch erreichbar sind und die teilweise aus magnetischen Eisenoxiden oder Mischoxiden der Formel $\text{MeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ bestehen, wobei Me zweiwertige Metallionen wie Fe, Ba, Sr, Mn, Zn oder Co und Fe_2O_3 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oder magnetische Reinmetalle, wie Kobalt und Eisen sind, aufgebaut sind.

Diese Konjugate können nach unterschiedlichen Verfahren hergestellt werden. Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung magnetisch separierbarer, bioaktiver und biokompatibler Konjugate ist dadurch gekennzeichnet, dass gegebenenfalls mit Ankergruppen versehene Biomoleküle und/oder Zellen mit einer Lösung, die Schwermetallsalze enthält, vermischt werden und das Gemisch auf einen alkalischen pH-Wert eingestellt wird, bzw. die gegebenenfalls mit Ankergruppen versehenen Biomoleküle und/oder Zellen auf einen alkalischen pH-Wert eingestellt werden und mit einer Lösung, die Schwermetallsalze enthält, vermischt werden, die entstandenen magnetisch beweglichen separierbaren Konjugate ggf. anschließend gewaschen und danach mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt werden, die die Schwermetalloxidabscheidung partiell auflösen.

Dabei sind die ggf. mit Ankergruppen versehene Biomoleküle und/oder Zellen bei der Bildung der Konjugate direkt anwesend und können zwischen den

Schichten der sich bildenden magnetischen Komponente eingelagert werden.

5 In einer Weiterbildung der Erfindung sind die Biomoleküle synthetische und/oder natürliche Oligomere oder Polymere, wie z.B. Peptide und/oder Proteine und/oder Nukleinsäurefragmente und/oder Nukleinsäuren und/oder Oligo- oder Polysaccharide.

10 Zellen sind Bakterienzellen oder humane Zellen, die bioaktiv sein können.

15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Ankergruppen sind ionisch bindende Gruppen und/oder chelatbildende Gruppen und/oder kovalent bindende Gruppen und/oder über biologische Affinität bindende Gruppen, wie z.B. Biotin, und/oder antikörperbindende Gruppen und/oder Fluoreszenzfarbstoffe, die zur Weiterreaktion der Biomoleküle und/oder Zellen geeignet sind.

20 Die Volumenkonzentrationen der eingesetzten magnetischen Eisenoxide oder Mischoxide betragen 0,0001% bis 10 Vol%, insbesondere 0,01 % bis 1 Vol%.

25 Kernteilchengrößen der magnetischen Komponente betragen 1 bis 1000 nm.

30 Die durchbrochenen, vernetzten Schichten, die teilweise aus der magnetischen Komponente bestehen, sind von Hohlräumen, die einen Durchmesser von 0,1 nm bis 1000 nm besitzen, durchbrochen.

In einer weiteren Ausbildung der Erfindung liegen die Konjugate in dispergierter Form in wässrigen oder mit

Wasser mischbaren Lösungen vor, wobei die Teilchengröße der Konjugate in Kugelform von 1 nm bis 500 µm oder als ausgedehnte Objekte bis zu 10 cm Länge und Breite beträgt.

5

In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden gegebenenfalls mit Ankergruppen versehene Biomoleküle und/oder Zellen mit einer Lösung, die zweiwertige Metallionen und dreiwertige Eisenionen enthält, vermischt und das Gemisch auf einen alkalischen pH-Wert eingestellt wird, bzw. die gegebenenfalls mit Ankergruppen versehenen Biomoleküle und/oder Zellen auf einen alkalischen pH-Wert eingestellt werden und mit einer Lösung, die zweiwertige Metallionen und dreiwertige Eisenionen enthält, vermischt werden, die entstandenen magnetisch beweglichen separierbaren Konjugate anschließend ggf. gewaschen und mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt werden, die die oxidischen Bestandteile partiell auflösen.

10

15

20

25

Vorgebildete magnetisch separierbare Konjugate mit Biomolekülen und/oder Zellen, die ggf. mit Ankergruppen versehen sind, werden inkubiert und danach mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt, die die oxidischen Bestandteile partiell auflösen.

30

Vorgebildete magnetisch separierbare Konjugate werden mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt, die die Oxidabscheidung partiell auflösen

und danach werden sie mit Biomolekülen und/oder Zellen, die ggf. mit Ankergruppen versehen sind, inkubiert und anschließend ggf. gewaschen und magnetisch separiert.

5 Positiv geladene, in Wasser dispergierte magnetische Nanoteilchen werden mit Biomolekülen und/oder Zellen vermischt, anschließend ggf. gewaschen und die magnetisch separierbaren Konjugate mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen
10 oder biochemischen Methoden behandelt, die die Oxidabscheidung partiell auflösen.

Als ggf. mit Ankergruppen versehene Biomoleküle werden Proteine eingesetzt, wie z.B. Serumproteine, Albumine,
15 wie Humanserumalbumin, und Enzyme.

Als ggf. mit Ankergruppen versehene Biomoleküle werden Nukleinsäuren oder deren Fragmente eingesetzt.

20 Als Ankergruppen werden ionisch bindende und /oder chelatbildende Gruppen und/oder zur kovalenten Bindung befähigte Gruppen und/oder über biologische Affinität bindende Gruppen, wie zB. Biotin, und/oder zur Bindung von Antikörpern befähigte Gruppen und/oder
25 Fluoreszenzfarbstoffe, sowie Fluoreszein eingesetzt.

Die Schwermetallsalzlösung kann erfindungsgemäß Eisen(II)- und Eisen(III)-Salze enthalten.

Die Metallsalzlösung kann weiterhin Kobalt- oder
30 Nickel-Salze enthalten.

Der alkalische pH-Wert wird durch Zugabe von konzentriertem Ammoniumhydroxid NaOH oder KOH eingestellt.

Als Substanzen, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, werden organische oder anorganische Säuren eingesetzt. Insbesondere eignen sich dazu organische Säuren, wie Citronensäure, Weinsäure und Oxalsäure. Oxalsäure wird hierbei in einer

5

Konzentration von 10 - 0,1% und bei einer Temperatur von 0°C - 50°C eingesetzt.

Darüberhinaus werden zum Auflösen der Metalloxidabscheidungen anorganische Säuren, wie Salzsäure, verwendet.

10

Als physikalische bzw. physiko- oder biochemische Methode, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, werden Ionenstrahl- und/oder Laserstrahl-techniken sowie elektrochemische Methoden und Bio-Korrosions-Methoden verwendet.

15

Die Bildung der magnetischen Konjugate wird entweder dadurch erreicht, dass man eine Lösung die Schwermetallsalze enthält mit den Biomolekülen und/oder Zellen vermischt und das Gemisch anschließend auf einen alkalischen pH-Wert einstellt, bzw. dadurch, dass man die gelösten Biomoleküle und/oder Zellen zunächst auf einen stark alkalischen pH-Wert einstellt und zu dieser Lösung die Lösung, die Schwermetallsalze enthält, zugibt. Die Reihenfolge der Verfahrensschritte ist dabei von der Art der verwendeten Biomoleküle und/oder Zellen abhängig und von dem beabsichtigten Verwendungszweck der hergestellten Konjugate. Die entstandenen magnetisch separierbaren Konjugate werden danach ggf. dadurch gewaschen, dass sie mittels eines Magneten von der Lösung abgetrennt werden, in dem Waschmedium, meist Wasser, resuspendiert werden und erneut magnetisch abgetrennt werden. Die Zahl der

20

25

30

Waschschritte hängt von der Art der herzustellenden Konjugate ab und beträgt üblicherweise 3-4. Bei einigen Herstellungsvarianten kann durchaus auf den Waschwischenschritt verzichtet werden.

5 Überraschend wurde gefunden, dass eine Behandlung von magnetisch separierbaren Konjugaten dieser Art mit bestimmten chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden, die die Schwermetalloxidabscheidung partiell
10 auflösen, zu einer wesentlichen Erhöhung der Bio-Aktivität und Bio-Kompatibilität der Konjugate führt.

Dabei zeigte sich, dass unbehandelte Konjugate teilweise völlig biologisch inaktiv sind und erst durch
15 den die magnetische Komponente partiell auflösenden Verfahrensschritt aktiviert werden.

In einer bevorzugten Verfahrensvariante werden als Schwermetallsalze Salze von zweiwertigen Metallionen
20 gemeinsam mit dreiwertigen Eisenionen eingesetzt.

In einer weiteren Verfahrensvariante werden vorbildete magnetisch separierbare Konjugate mit Biomolekülen und/oder Zellen inkubiert und danach mit chemischen
25 Substanzen, aber auch mittels physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt, die die Schwermetalloxidabscheidung partiell auflösen. Diese Verfahrensvariante arbeitet nicht mit allen vorgebildeten Konjugaten und ist offensichtlich stark
30 von der Struktur der gebildeten Konjugate abhängig. Dabei kann es teilweise zur völligen Auflösung der gesamten magnetisch separierbaren Konjugate kommen, bzw. die behandelten Konjugate besitzen eine reduzierte biologische Aktivität.

In einer weiteren Verfahrensvariante werden vorgebildete magnetische Konjugate zunächst mit chemischen Substanzen, aber auch mittels physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden, die die Schwermetalloxidabscheidung partiell aufgelösen, behandelt und anschließend mit Biomolekülen und/oder Zellen inkubiert. Dabei wird zunächst durch eine partielle Auflösung von Schwermetalloxidschichten die Struktur der vorgebildeten Konjugate verändert, so dass eine verbesserte An- oder Einlagerung der Biomoleküle und/oder Zellen erfolgen kann. Dies kann besonders für niedermolekulare Biomoleküle sehr wichtig sein.

In einer bevorzugten Verfahrensvariante werden positiv geladene, in Wasser dispergierte magnetische Nanoteilchen eingesetzt. Dies kann von Vorteil sein, wenn die Bindung der Biomoleküle und/oder Zellen über ionische Wechselwirkungen erfolgen soll.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren biokompatible, das heißt bioverträgliche, Biomoleküle und/oder Zellen eingesetzt, da die entsprechenden Konjugate teilweise innerhalb von Therapiestrategien verwendet werden können. Dies schließt eine Kombination von biokompatiblen Biomolekülen und/oder Zellen mit pharmakologisch wirksamen Biomolekülen und/oder Zellen in Konjugaten ein. Als Zellen werden innerhalb von Therapiestrategien z.B. humane Eigenzellen nach Zellzucht verwendet.

In dem Verfahren werden bioaktive Biomoleküle und/oder Zellen eingesetzt. Der Begriff „bioaktiv“ muß im breitesten Sinne verstanden werden und umfaßt z.B. enzymatische Aktivitäten und/oder Bindungsaktivitäten für und von Antikörpern und/oder Hybridisationsaktivitäten von Nukleinsäurefragmenten oder Nuklein-

säuren und/oder Bindungsaktivitäten über biologische Affinitäten, wie z.B. des Systems Biotin/Streptavidin oder z.B. die biologischen Aktivitäten von Proteaseinhibitoren. Als Zellen werden z.B. 5 Bakterienzellen mit enzymatischer Aktivität oder humane Zellen mit Affinitäten zu anderen Zelltypen verwendet. Zur Herstellung von Konjugaten, die zur Verwendung innerhalb von Therapiestrategien vorgesehen sind, werden pharmakologisch wirksame Biomoleküle und/oder 10 Zellen eingesetzt.

Der Einsatz erfolgt dabei durchaus in Kombination mit anderen Biomolekülen und/oder Zellen. Die pharmakologisch wirksamen Biomoleküle können durchaus auch niedermolekulare chemische Verbindungen, die z.B. 15 eine cancerostatische Wirkung aufweisen, sein. Diese können sich zum z.B. im Innern der von uns hergestellten Konjugate, gemeinsam mit bio-kompatiblen Biomolekülen und/oder Zellen befinden und nach magnetophoretischer Konzentration am beabsichtigten 20 Wirkungsort gezielt freigegeben werden. Als Zellen werden z.B. Bakterienzellen mit enzymatischer Aktivität oder humane Zelllinien mit Affinität zu bestimmten Tumoren eingesetzt.

Als Biomoleküle werden in dem Verfahren bevorzugt 25 Proteine eingesetzt. Sie sind sehr gut in die magnetisch separierbaren Konjugate integrierbar, werden durch die die Schwermetalloxidabscheidung partiell auflösenden Verfahrensschritte nicht aus den Konjugaten herausgelöst und erhalten dadurch eine erhöhte Bio- 30 aktivität. Durch Verwendung von Serumproteinen, bevorzugt Albumine, z. B. Humanserumalbumin (HSA) wird dem beabsichtigten Anwendungsgebiet innerhalb humaner Therapiestrategien Rechnung getragen. So besitzen z.B. magnetisch separierbare Konjugate, die HSA enthalten

und deren magnetische Komponente mit dem erfindungs-
gemäßen Verfahren auf das mindest erforderliche Ausmaß
beschränkt wurde, eine sehr hohe Biokompatibilität im
humanen Blutsystem.

5 Bevorzugt werden in unserem Verfahren als Proteine
Enzyme verwendet. Dabei werden magnetisch separierbare
Konjugate hergestellt, die innerhalb diagnostischer
Tests Einsatz finden, wobei z.B. Enzyme wie alkalische
10 Phosphatase (EC 3.1.3.1.) und Peroxidase (EC 1.11.1.7)
verwendet werden, als auch andere Enzyme für organische
Synthesen wie z.B. Cholesterol Esterase (EC 3.1.1.13),
Trypsin (EC 3.4.21.4), Alkoholdehydrogenase
(EC 1.1.1.1) und Enzyme, die therapeutisch interessant
sind.

15 Als Biomoleküle können Nukleinsäuren oder deren
Fragmente verwendet werden. Dabei kann sowohl RNA als
auch DNA bzw. Fragmente davon (z.B. Oligonukleotide)
zum Einsatz kommen. Die hergestellten magnetisch
separierbaren Konjugate reagieren mit Zielmolekülen
20 über Hybridisationsreaktionen und können in
diagnostischen Verfahren und innerhalb therapeutischer
Strategien zur Anwendung kommen.

An den Biomolekülen können sich ggf. Ankergruppen
befinden. Dies können ionisch bindende und /oder
25 chelatbildende Gruppen und/oder zur kovalenten Bindung
befähigte Gruppen und/oder über biologische Affinität
bindende Gruppen, wie zB. Biotin, und/oder zur Bindung
von Antikörpern befähigte Gruppen und/oder
Fluoreszenzfarbstoffe sein. Diese Ankergruppen können
30 sowohl zur nachträglichen Vernetzung von Molekülen
innerhalb der magnetisch separierbaren Konjugate, als
auch zur Kopplung an Zielstrukturen und die Bindung von
diagnostisch oder therapeutisch interessanten Molekülen
genutzt werden. So können z.B. über zur kovalenten

Bindung befähigte Gruppen unter Beteiligung chemischer Crosslinker weitere für die entsprechende Anwendung interessante Moleküle gekoppelt werden oder ein biotinyliertes Protein innerhalb des Konjugates kann durch Reaktion mit Streptavidin mit weiteren Partnern verknüpft werden. Dabei kann z.B. ein weiterer, diagnostisch bzw. therapeutisch interessanter Antikörper an das magnetisch separierbare Konjugat gebunden werden. Bei Benutzung von Fluorescein-Ankergruppen kann z.B. mittels eines Anti-Fluorescein-Antikörpers eine entsprechende Nachweiskette aufgebaut werden.

Bevorzugt werden in dem Verfahren in der Schwermetallsalzlösung Eisen(II)- und Eisen(III)-Salze eingesetzt. Das entstehende Magnetit besitzt gute magnetische Eigenschaften und ist sehr gut für die weiteren Verfahrensschritte geeignet. Durch Einsatz von Kobalt- und Nickel-Salzen können die magnetischen Eigenschaften und Strukturen der Konjugate verändert werden und die Verfahrensschritte zur partiellen Auflösung der magnetischen Metalloxidabscheidungen beeinflusst werden.

Eine bevorzugte Variante der Einstellung des alkalischen pH-Wertes ist die Zugabe von konzentriertem Ammoniak. Dadurch werden möglichst kleine (10-50 nm) Primärpartikelgrößen erreicht. Geeignete Biomoleküle und/oder Zellen können auch als stark alkalische Lösung zugesetzt werden.

Die erfindungsgemäße partielle Auflösung der magnetischen Schwermetalloxidabscheidung spielt die entscheidende Rolle bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate. Dazu werden bevorzugt

organische oder anorganische Säuren verwendet. Diese „ätzen“ erreichbare Teile der magnetischen Schwermetalloxidabscheidungen an und aktivieren damit die biologische Aktivität der Konjugate. Bevorzugt werden organische Säuren, wie Citronensäure, Weinsäure und Oxalsäure verwendet. Schwermetallkomplexierende Verbindungen eignen sich ebenfalls.

Ein bevorzugtes Verfahren arbeitet mit 10 - 0,1%iger Oxalsäure. Durch Veränderung der Verfahrensbedingungen (z.B. Konzentration, Temperatur) können unterschiedliche Konjugate (unterschiedliche Eigenschaften, unterschiedliche Konjugatgrößen) hergestellt werden. Bevorzugt wird eine Reaktionstemperatur zwischen 0°C und 50°C, bei der die partielle Auflösung der Schwermetalloxidabscheidungen gut gesteuert werden kann. Salzsäure, als anorganische Säure, ist für das Verfahren ebenfalls geeignet, erfordert aber eine sehr genaue Abstimmung auf die entsprechenden Biomoleküle und/oder Zellen. Als Mittel, die magnetischen Schwermetalloxidschichten partiell aufzulösen, können auch physikalische Methoden, wie der Einsatz von Ionenstrahl- oder Laserstrahltechniken, verwendet werden. Dabei werden unterschiedlich große Hohlräume (Kanäle) in die entsprechenden magnetischen Schichten geschossen bzw. Schichten partiell abgetragen. Zu partieller Auflösung der magnetischen Schwermetalloxidschichten können auch elektrochemische Verfahren, bei denen die Schwermetalloxidschichten durch Bildung elektrochemischer Lokalelemente aufgelöst werden und Bio-Korrosions-Methoden, bei denen unter Einwirkung von Mikroorganismen (z.B. Bakterien) die magnetischen Schwermetalloxidschichten partiell durch die Mikroorganismen zersetzt werden, eingesetzt werden.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

5 Beispiele

Beispiel 1

2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 2ml einer
10 Lösung von FITC-markiertem BSA (Fluoreszein-
isothiocyanat-markiertes Rinderserumalbumin, 0,5 mg/ml)
gemischt und mit 1 ml konzentriertem Ammoniak versetzt.
Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden
sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 2 ml
15 Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch
abgetrennt. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt.
Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische
Konjugate, die FITC-markiertes BSA enthalten. Aus
Fluoreszenzmessung der Überstände kann kalkuliert
20 werden, dass ca. 90% des FITC-BSA in den Konjugaten
enthalten sein müssen. In einem Tüpfeltest auf
Nitrocellulose und Fluorometer kann aber keine
Fluoreszenz auf der Oberfläche der Konjugate
nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Position der
25 fluoreszenzmarkierten Moleküle im Innern der Konjugate
bzw. für eine Löschung der Fluoreszenz durch die
Magnetitabscheidung.

Beispiel 2

30 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 2ml einer
Lösung von BSA (Rinderserumalbumin, 0,5 mg/ml)
gemischt und mit 1ml konzentriertem Ammoniak versetzt.
Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden
35 sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 2 ml

Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die BSA enthalten. Die Konjugate werden in ca. 5 ml Wasser suspendiert und aliquotiert.

Parallel wird eine Konjugat-Präparation ohne BSA durchgeführt. Von den Konjugat-Suspensionen werden Verdünnungsreihen in Wasser (1:10, 1:100) hergestellt.

Die Testung der Konjugat-Präparationen erfolgt in einem Nitrocellulose -Streifentest:

Auf einem Streifen Nitrocellulose (NC, 7 x 8,4 cm) werden die Verdünnungsreihen der Konjugate mit und ohne BSA in der Präparation, und eine BSA-Verdünnungsreihe als Positivkontrolle getüpfelt (1 µl, Doppelwerte). Es

werden mehrere NC-Streifen parallel getüpfelt.

Nach Lufttrocknung bleibt ein Streifen unbehandelt, andere Streifen werden 5 Minuten bei Zimmertemperatur mit organischen oder anorganischen Säuren [5% Oxalsäure, 5% Weinsäure, 5% Citronensäure und Salzsäure

(1:10 Verdünnung)] behandelt, kurz mit Wasser gewaschen und 30 Minuten in eine Blocklösung (PBS, 0,5% Gelatin) gelegt. Danach erfolgt eine gemeinsame Inkubation der unbehandelten und behandelten Streifen mit einem FITC-

markierten Antikörper gegen BSA (Chicken, affinitätsgereinigt, 1:100 Verdünnung). Nach der Antikörperreaktion (4 Stunden, Zimmertemperatur) werden die Streifen mit PBS gewaschen und unter UV-Licht auf Bindung von Anti-BSA Antikörpern geprüft:

Die Positivkontrolle aller Streifen (unbehandelt und säurebehandelt) hat reagiert, die BSA-Verdünnungsreihe zeigt deutliche grüne Fluoreszenz.

Die Negativkontrolle (Konjugat-Präparation ohne BSA) zeigt keine Fluoreszenz auf allen Streifen (unbehandelt und säurebehandelt).

Von der Konjugat-Präparation mit BSA fluoresziert die Verdünnungsreihe auf dem mit Oxalsäure behandeltem Streifen stark grün (bis 1:100 Verdünnung) während die anderen Streifen, einschließlich des unbehandelten Streifens, nicht fluoreszieren.

Offensichtlich wird durch die Oxalsäurebehandlung das BSA im Innern der Konjugate der Antikörperreaktion zugänglich gemacht.

Dies spricht wiederum für eine Abschirmung des BSA durch eine äußere magnetische Schicht in der ersten Phase der Präparation der Konjugate und für die Möglichkeit der partiellen Zerstörung und damit biologischen Erreichung des BSA im Innern der Konjugate durch Behandlung mit Säuren.

Beispiel 3

2ml einer Lösung von FITC-markiertem BSA (Fluoreszeinisothiocyanat-markiertes Rinderserumalbumin, 0,5 mg/ml) werden mit 1 ml konzentriertem Ammoniak vermischt.

Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:20 verdünnt, versetzt und umgeschüttelt.

Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 2 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die FITC-markiertes BSA enthalten. Der Überstand nach Ausfällung der Konjugate wird fluorometrisch vermessen. Im Überstand sind nur noch ca. 10% des FITC-markierten BSA nachweisbar. Damit müßten ca. 90% des FITC-

markierten BSA in der Konjugat-Präparation enthalten sein.

5 Im Tüpfeltest auf NC und im Fluorometer zeigen die Konjugate keine Fluoreszenz, was wiederum für eine Positionierung des FITC-BSA im Innern der Konjugate auch bei dieser Variante des ersten Teiles der Präparation spricht.

10 Die BSA-Konjugat-Präparation zeigt optisch weiterhin ihre braunschwarze Färbung, was für ihre magnetische Beweglichkeit spricht, während die Färbung der Konjugat-Präparation ohne BSA ihre schwarze Färbung nach Behandlung mit Oxalsäure völlig verloren hat (völlige Zerstörung der Teilchen).

15 **Beispiel 4**

2ml einer Lösung von BSA (Rinderserumalbumin, 0,5 mg/ml) werden mit 1 ml konzentriertem Ammoniak vermischt.

20 Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:20 verdünnt, versetzt und umgeschüttelt.

Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 2 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt.

25 Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die BSA enthalten. Die Konjugat-Präparation wird analog der Präparation aus Bsp. 2 aliquotiert, auf NC getüpfelt, säurebehandelt und mit einem FITC-markierten Antikörper gegen BSA inkubiert. Nach PBS Waschung wird
30 mittels UV-Lampe auf Fluoreszenz geprüft:

Wie in Bsp. 2 arbeiten alle Positiv- und Negativkontrollen korrekt.

Wie in Bsp 2 fluoresziert auch bei dieser Konjugat-Präparation nur die mit Oxalsäure gewaschene Präparation (grüne Fluoreszenz bis 1:100 Verdünnung) was wiederum für eine Positionierung des BSA im Innern der Konjugate und die Möglichkeit der partiellen Öffnung von Magnetitschichten durch Säurebehandlung spricht.

Die BSA- Konjugat-Präparation zeigt optisch weiterhin ihre braunschwarze Färbung, was für ihre magnetische Beweglichkeit spricht, während die Färbung der Konjugat-Präparation ohne BSA ihre Färbung nach Behandlung mit Oxalsäure völlig verloren hat (völlige Zerstörung der Teilchen).

Beispiel 5

Analog Bsp. 2 werden magnetische Konjugate mit und ohne BSA präpariert.

Die Konjugate werden nach Waschung mit Wasser in 5ml Wasser suspendiert. 50 µl der Teilchensuspension werden mit 50 µl 5%iger Oxalsäure versetzt. Die Reaktion erfolgt 5 Min. bei Raumtemperatur. Nach ca. 2 Min. lösen sich die ohne BSA präparierten magnetischen Konjugate völlig auf. Nach 5 Min. werden die mit BSA präparierten Konjugate mittels eines Magneten von der Lösung abgetrennt, mehrmals mit Wasser gewaschen und in 50 µl Wasser resuspendiert.

Jeweils 1 µl der Überstände und der Konjugate werden analog Bsp.2 (einschließlich Positivkontrollen (BSA-Verdünnungsreihe), Negativkontrolle: Konjugate ohne Oxalsäurebehandlung) auf Nitrocellulose getüpfelt, mit mit Anti-BSA Antikörper (FITC-markiert) behandelt.

Nach Waschung wird der NC-Streifen unter UV-Licht ausgewertet.

Nur die BSA-Verdünnungsreihe (Positivkontrolle) und die mit Oxalsäure behandelten Konjugate (BSA-Konjugate) zeigen eine deutliche grüne Fluoreszenz.

Die Konjugate waren gut magnetisch abscheidbar und sind damit magnetisch und biologisch aktiv. Die Überstände nach der Oxalsäurebehandlung fluoreszieren ebenfalls nicht, was für eine hohe Stabilität des BSA in den Konjugaten spricht.

10 **Beispiel 6**

Analog zu Bsp 5 werden Konjugat-Präparationen durchgeführt. Die Säurebehandlung der Konjugate wird 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1% Oxalsäure durchgeführt, die Auswertung erfolgt mittels des NC-Streifentestes unter Verwendung des FITC-markierten Antikörpers gegen BSA. Die Ergebnissen werden mit denen von Bsp. 5 verglichen. Die präparierten, säurebehandelten magnetischen Konjugate zeigen eine starke Reaktion mit dem Antikörper.

20 Nicht mit Säure behandelte Konjugate zeigen keine oder nur sehr schwache Reaktion mit dem Antikörper. Dies spricht für eine Freilegung und/ oder Aktivierung biologischer Funktionen durch die Behandlung mit Säuren.

25

Beispiel 7

Die Konjugat-Präparation erfolgt zunächst analog zu Bsp 2 ohne BSA. Danach werden die Teilchen 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einer BSA-Lösung (5mg/ml) inkubiert, mehrmals mit Wasser gewaschen, magnetisch abgetrennt und aliquotiert. Überstandsmessungen zeigen eine adsorptive Bindung von BSA. Aliquots der Teilchensuspension werden mit Säuren behandelt.

30

Im NC-Streifentest werden säurebehandelte mit unbehandelten Konjugate und analog Bsp. 2 mit BSA präparierten Konjugate verglichen.

5 Die hier präparierten Konjugate zeigen keine Antikörperreaktion bzw. lösen sich in 5-1%-iger Oxalsäure völlig auf.

10 Dies spricht für einen völlig anderen Konjugat-Aufbau bei den durch nachträgliche Beschichtung mit BSA hergestellten Konjugaten im Vergleich zur Präparation der Konjugate unter Beteiligung von BSA.

Beispiel 8

15 Die Konjugat-Präparation erfolgt ausgehend von positiv geladenen, in Wasser dispergierten magnetischen Nanoteilchen. 2 ml einer 0,5 molaren (100g/l) wässrigen Nanoteilchen-Dispersion werden 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit einer BSA-Lösung (5mg/ml) inkubiert, mehrmals mit Wasser gewaschen, magnetisch abgetrennt und aliquotiert. Überstandsmessungen ergeben
20 eine deutliche Bindung von BSA. Aliquots der Konjugat-Suspension werden mit Säuren behandelt.

Im NC-Streifentest werden säurebehandelte mit unbehandelten Konjugate und analog Bsp. 2 mit BSA präparierten Konjugate verglichen.

25 Die hier präparierten Konjugate zeigen keine bzw. sehr schwache Antikörperreaktion, lösen sich aber in 5-1%-iger Oxalsäure nicht völlig auf.

30 Die Säureresistenz spricht für einen anderen Konjugat-Aufbau als bei den durch nachträgliche Beschichtung (Bsp.7) hergestellten Konjugaten. Im Vergleich mit den unter Beteiligung von BSA während der Präparation hergestellten Konjugaten zeigen die hier hergestellten Konjugate aber eine wesentlich schwächere Antikörperreaktion. Dies weist auf eine andere Bindung

der Biomoleküle bzw. eine andere Konjugat-Struktur in den Konjugaten hin.

Beispiel 9

5 Verkapselung von Peroxidase ohne Trägerprotein

1,3 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 150 Einheiten Alkalische Phosphatase (Roche) gemischt und mit 0,5ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 20 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal mit größeren Volumina Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die Peroxidase enthalten. Aus Messungen der Enzymaktivität der Überstände kann kalkuliert werden, dass ca. 95% des Enzyms in den Konjugaten enthalten sein müssen. Die magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des Konjugates wird 5 Minuten mit 3ml 1%iger Oxalsäure behandelt. Und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität der Konjugate wird mittels eines Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von BM blue POD Substrat (Roche) in Lösung (Mikrotiterplatte, 100 μl) vermessen. Die mit Oxalsäure behandelten Konjugate zeigen eine Enzymaktivität, die einer 1:5 Verdünnung des unbehandelten Enzymes entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während des aktivierenden Oxalsäureschrittes ein Teil des verkapselten Enzymes in der nicht magnetisch beweglichen Fraktion erscheint. Der Nachweis der Enzymaktivität der magnetisch

beweglichen Konjugate kann über mehrere Tage bei Zimmertemperatur geführt werden.

Beispiel 10

5 Verkapselung von Peroxidase mit Trägerprotein

1,3 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 10 mg Humanserumalbumin (HSA) und 300 Einheiten Alkalische Phosphatase (Roche) gemischt und mit 0,5 ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 20 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. 15 Der Vorgang wird noch dreimal mit größeren Volumina Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die Peroxidase enthalten. Aus Messungen der Enzymaktivität der Überstände kann kalkuliert werden, dass ca. 80% des Enzyms in den Konjugaten enthalten sein müssen. Die 20 magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des Konjugates wird 5 Minuten mit 3 ml 1%iger Oxalsäure behandelt. Und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität 25 der Konjugate wird mittels eines Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von BM blue POD Substrat (Roche) in Lösung (Mikrotiterplatte, $100\mu\text{l}$) vermessen. Die mit Oxalsäure behandelten Konjugate zeigen eine Enzymaktivität, die einer 1:4 Verdünnung des 30 unbehandelten Enzymes entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während des aktivierenden Oxalsäureschrittes ein Teil des verkapselten Enzymes in der nicht magnetisch beweglichen Fraktion erscheint. Der Nachweis der Enzymaktivität der magnetisch

beweglichen Konjugate kann über mehrere Tage bei Zimmertemperatur geführt werden.

5 **Beispiel 11**

Verkapselung von Alkalischer Phosphatase ohne Trägerprotein

1,3 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 10 μl (150 Einheiten) Alkalische Phosphatase (Roche) gemischt und mit 0,5 ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch viermal mit 40 ml Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die Alkalische Phosphatase enthalten. Aus Messungen der Enzymaktivität der Überstände kann kalkuliert werden, dass ca. 90% des Enzyms in den Konjugaten enthalten sein müssen. Die magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des Konjugates wird 10 Minuten mit 5ml 0,1%iger Oxalsäure behandelt. Und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität der Konjugate wird mittels eines Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von BM purple Alkalische Phosphatase Substrats (Roche) in Lösung (Mikrotiterplatte, 200 μl) vermessen. Die mit Oxalsäure behandelten Konjugate zeigen eine Enzymaktivität, die einer 1:10 Verdünnung des unbehandelten Enzymes entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während des aktivierenden Oxalsäureschrittes ein Teil des verkapselten Enzymes in der nicht magnetisch

beweglichen Fraktion erscheint. Der Nachweis der Enzymaktivität der magnetisch beweglichen Konjugate kann über mehrere Tage bei Zimmertemperatur geführt werden.

5

Beispiel 12

Verkapselung von Alkalischer Phosphatase mit Trägerprotein

10 1,3 ml Fe-Stammlösung (21g FeCl₂ x 4H₂O, 54,7g FeCl₃ x 6H₂O + 200 ml H₂O), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 5mg Humanserumalbumin (HSA) und 10µl (150 Einheiten) Alkalische Phosphatase (Roche) gemischt und mit 0,5 ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die

15 schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch viermal mit 40 ml Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält

20 stabile magnetische Konjugate, die Alkalische Phosphatase enthalten. Aus Messungen der Enzymaktivität der Überstände kann kalkuliert werden, dass ca. 90% des Enzyms in den Konjugaten enthalten sein müssen. Die magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des

25 Konjugates wird 10 Minuten mit 5 ml 0,1%iger Oxalsäure behandelt. Und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität der Konjugate wird mittels eines Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von BM purple Alkalische Phosphatase

30 Substrats (Roche) in Lösung (Mikrotiterplatte, 200µl) vermessen. Die mit Oxalsäure behandelten Konjugate zeigen eine Enzymaktivität, die einer 1:8 Verdünnung des unbehandelten Enzymes entspricht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während des aktivierenden

Oxalsäureschrittes ein Teil des verkapselten Enzymes in der nicht magnetisch beweglichen Fraktion erscheint. Der Nachweis der Enzymaktivität der magnetisch beweglichen Konjugate kann über mehrere Tage bei
5 Zimmertemperatur geführt werden.

Beispiel 13

Verkapselung von Glukoseoxidase ohne Trägerprotein

10 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 8 mg (260 Einheiten/ml) Glukoseoxidase (GOD) (Serva) gemischt und mit 1ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die schwarz ausfallenden magnetischen
15 Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch viermal mit 40 ml Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die
20 Glukoseoxidase enthalten. Die magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des Konjugates wird 10 Minuten mit 5 ml 0,1%iger Oxalsäure behandelt. und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität der Konjugate wird
25 mittels eines Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von o-Dianisidin als Farbsubstrat und Peroxidase als Zweitenzym in Lösung bestimmt. Die Auswertung erfolgt mittels Spektralphotometer bei 436 nm. Die magnetisch beweglichen Konjugate zeigen nach Renaturierung bei 4°C
30 über Nacht deutliche Enzymaktivität.

Beispiel 14

Verkapselung von Glukoseoxidase mit Trägerprotein

5 2,6 ml Fe-Stammlösung ($21g \text{ FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $54,7g \text{ FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, werden mit 1ml PBS, die 5 mg Humanserumalbumin (HSA) und 4 mg (260 Einheiten/ml) Glukoseoxidase (GOD) (Serva) gemischt und mit 1ml konzentriertem Ammoniak versetzt. Die schwarz ausfallenden magnetischen Konjugate werden sofort
10 mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch viermal mit 40 ml Wasser wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile magnetische Konjugate, die Glukoseoxidase enthalten.
15 Die magnetischen Konjugate werden aliquotiert. Ein Teil des Konjugates wird 10 Minuten mit 5 ml 0,1%iger Oxalsäure behandelt. und anschließend unter magnetischer Abscheidung mit Wasser 4x gewaschen. Die Enzymaktivität der Konjugate wird mittels eines
20 Enzymaktivitätstestes unter Verwendung von o-Dianisidin als Farbsubstrat und Peroxidase als Zweitenzym in Lösung bestimmt. Die Auswertung erfolgt mittels Spektralphotometer bei 436 nm. Die magnetisch beweglichen Konjugate zeigen deutliche Enzymaktivität.

25

Beispiel 15

Verkapselung von Nukleinsäurefragmenten mit Trägerprotein

30 2 ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 0,5 mg/ml) und beschallter FITC-markierter Heringssperma-DNA (0,5 mg/ml) werden mit 1 ml konzentriertem Ammoniak vermischt.

Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g FeCl₂ x 4H₂O, 54,7g FeCl₃x6H₂O + 200 ml H₂O), 1:20 verdünnt, versetzt und umgeschüttelt.

5 Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die HSA und Heringssperma-DNA enthalten. Die Konjugat-
10 Präparation wird analog der Präparation aus Bsp. 2 aliquotiert, auf NC getüpfelt, säurebehandelt und mit einem Peroxidase-markierten Antikörper gegen FITC inkubiert. Nach PBS Waschung wird mittels ECL-Nachweissystem auf Peroxidaseaktivität geprüft. Die
15 FITC-markierte DNA ist in den säurebehandelten Präparationen deutlich nachweisbar. Die DNA kann in einem Hybridisationsassay mit ³²P-markierter homologer DNA in einer Verdünnung bis 1:10⁴ nachgewiesen werden.

20 **Beispiel 16**

Verkapselung von Nukleinsäurefragmenten ohne Trägerprotein

25 2 ml einer Lösung beschallter FITC-markierter Heringssperma-DNA (0,5 mg/ml) werden mit 1ml konzentriertem Ammoniak vermischt.

Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g FeCl₂ x 4H₂O, 54,7g FeCl₃x6H₂O + 200 ml H₂O), 1:20 verdünnt, versetzt und umgeschüttelt.

30 Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die

Herings sperma-DNA enthalten. Die Konjugat-Präparation wird analog der Präparation aus Bsp. 2 aliquotiert, auf NC getüpfelt, säurebehandelt und mit einem Peroxidase-markierten Antikörper gegen FITC inkubiert. Nach PBS
5 Waschung wird mittels ECL-Nachweissystem auf Peroxidaseaktivität geprüft. Die FITC-markierte DNA ist in den säurebehandelten Präparationen deutlich nachweisbar. Die DNA kann in einem Hybridisationsassay mit ^{32}P -markierter homologer DNA in einer Verdünnung
10 bis $1:10^4$ nachgewiesen werden.

Beispiel 17

Verkapselung von Antibiotika (Kanamycin) mit Trägerprotein.

15

2 ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 0,5 mg/ml) und Kanamycinsulfat (20 mg/ml) werden mit 1ml konzentriertem Ammoniak vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g
20 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:20 verdünnt, versetzt und umgeschüttelt. Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal wiederholt.
25 Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die HSA und Kanamycin enthalten. Die Konjugat-Präparation wird aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen Konzentrationen Oxalsäure (0,01% - 10 %) 3 Min. behandelt und anschließend mit jeweils
30 30 ml Wasser dreimal gewaschen. Aliquots der Präparationen werden auf Nähragarplatten aufgetüpfelt. Die Agarplatten werden mit einer Bakterienkultur (Kanamycin-empfindlich) beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die säurebehandelten Präparationen zeigen

eine deutliche Hemmung des Bakterienwachstums um den Auftragungsort der magnetischen Präparate. Die höchste Hemmung wird durch Präparate nach Behandlung mit 0,1-1% Oxalsäure erzielt.

5

Beispiel 18

Verkapselung von Antibiotika (Ampicillin) mit Trägerprotein

10 2ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 0,5 mg/ml) und Kanamycinsulfat (10 mg/ml) werden mit 1ml konzentriertem Ammoniak vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:10 verdünnt, versetzt und

15 umgeschüttelt. Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate,

20 die HSA und Ampicillin enthalten. Die Konjugat-Präparation wird aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen Konzentrationen Oxalsäure (0,01%-10%) 3 Minuten behandelt und anschließend mit jeweils 30 ml Wasser dreimal gewaschen. Aliquots der Präparationen

25 werden auf Nähragarplatten aufgetüpfelt. Die Agarplatten werden mit einer Bakterienkultur (Ampicillin-empfindlich) beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die säurebehandelten Präparationen zeigen eine deutliche Hemmung des Bakterienwachstums um

30 den Auftragungsort der magnetischen Präparate. Die höchste Hemmung wird durch Präparate nach Behandlung mit 0,05%-1% Oxalsäure erzielt.

Beispiel 19

Verkapselung von Bakterienzellen

2 ml einer Nährlösung, die 10^6 E.coli Zellen
5 (Ampicillin-resistenter Stamm) enthalten werden mit
2,6 ml Fe-Stammlösung ($21g \text{ FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $54,7g$
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:20 verdünnt, versetzt,
umgeschüttelt und danach mit 1ml Ammoniak versetzt. Die
10 schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels
eines Magneten abgetrennt und mit 30ml Wasser versetzt,
geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der
Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Der gewaschene
Niederschlag enthält stabile Konjugate, die E.coli-
Zellen enthalten. Die Konjugat-Präparation wird
15 aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen
Konzentrationen Oxalsäure (0,01% -10%) 3 Min. behandelt
und anschließend mit jeweils 30 ml Wasser dreimal
gewaschen. Aliquots der Präparationen werden auf
Nähragarplatten, die Ampicillin enthalten, überimpft.
20 Die Agarplatten werden 2 Tage bei 37°C bebrütet.
Parallel werden Agarplatten ohne Zellen, Magnetit-
Präparationen ohne Zellen und Präparationen ohne
Säurebehandlung als Kontrolle mitgeführt. Die
säurebehandelten Präparationen zeigen eine
25 kolonieförmiges Bakterienwachstum. Das höchste
Bakterienwachstum wird durch Präparate nach Behandlung
mit 0,1-1% Oxalsäure erzielt.

Beispiel 20

30 Verkapselung von Farbstoffen (Dextranblau) mit
Trägerprotein, Oxalsäurebehandlung

2 ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 5 mg/ml)
und Dextranblau (10 mg/ml) werden mit 1 ml

konzentriertem Ammoniak vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:10 verdünnt, versetzt und durchmischt. Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Magnetit-Konjugate, die HSA und Dextranblau enthalten. Die Waschlösungen werden spektralphotometrisch vermessen und die Menge des verkapselten Farbstoffes kalkuliert. Die Kalkulation ergibt, dass ca. 70% des Dextranblaus mittels Magnetit verkapselt wurden. Die Konjugat-Präparation wird aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen Konzentrationen Oxalsäure (0,01% - 10%) 3 Min. behandelt und anschließend mit jeweils 30 ml Wasser dreimal gewaschen. Eine Probe bleibt unbehandelt. Die Magnetit-Konjugate werden in 1ml destilliertes Wasser aufgenommen und in Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben werden zunächst 3 Stunden bei Zimmertemperatur und danach bei 4°C über Nacht gelagert. Danach werden die Magnetit-Konjugate mittels Magnet von den Überständen abgetrennt und diese spektralphotometrisch vermessen. Nach dieser Lagerung befindet sich kein Dextranblau in den Überständen der säurebehandelten und der unbehandelten Präparationen. Anschließend werden die Proben zwei Stunden bei 80°C gemeinsam im Wasserbad erhitzt, die Magnetit-Konjugate erneut mittels Magnet von den Überständen getrennt und vermessen. Nur bei den säurebehandelten Magnetit-HSA-Dextranblau-Konjugaten kann eine deutliche Blaufärbung der Überstände nachgewiesen werden, während die nicht mit Säure behandelten Präparationen kein Dextranblau in den Überstand abgeben. Die stärkste Freisetzung von

Farbstoff wird bei einer Oxalsäurekonzentration von 0,05-4% gemessen. Auch diese Experimente sprechen für eine völlig veränderte Struktur der säurebehandelten Magnetitkonjugate mit geöffneten Porenstrukturen.

5

Beispiel 21

Verkapselung von Farbstoffen (Dextranblau) mit Trägerprotein, Salzsäurebehandlung

10 2 ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 5 mg/ml) und Dextranblau (10 mg/ml) werden mit 1ml konzentriertem Ammoniak vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:10 verdünnt, versetzt
15 und durchmischt. Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile
20 Magnetit-Konjugate, die HSA und Dextranblau enthalten. Die Waschlösungen werden spektralphotometrisch vermessen und die Menge des verkapselten Farbstoffes kalkuliert. Die Kalkulation ergibt, dass ca. 70% des Dextranblaus mittels Magnetit verkapselt wurden. Die
25 Konjugat-Präparation wird aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen Konzentrationen Salzsäure (0,01n -1n) 3 Minuten behandelt und anschließend mit jeweils 30 ml Wasser dreimal gewaschen. Eine Probe bleibt unbehandelt. Die Magnetit-Konjugate werden in 1 ml
30 destilliertes Wasser aufgenommen und in Eppendorf-röhrchen überführt. Die Proben werden zunächst 3 Stunden bei Zimmertemperatur und danach bei 4°C über Nacht gelagert. Danach werden die Magnetit-Konjugate mittels Magnet von den Überständen abgetrennt und diese

spektralphotometrisch vermessen. Nach dieser Lagerung befindet sich kein Dextranblau in den Überständen der säurebehandelten und der unbehandelten Präparationen. Anschließend werden die Proben zwei Stunden bei 80°C
5 gemeinsam im Wasserbad erhitzt, die Magnetit-Konjugate erneut mittels Magnet von den Überständen getrennt und vermessen. Nur bei den säurebehandelten Magnetit-HSA-Dextranblau-Konjugaten kann eine deutliche Blaufärbung der Überstände nachgewiesen werden, während die nicht
10 mit Säure behandelten Präparationen kein Dextranblau in den Überstand abgeben. Die stärkste Freisetzung von Farbstoff wird bei einer Salzsäurekonzentration von 0,1 bis 0,3n gemessen. Auch diese Experimente sprechen für eine völlig veränderte Struktur der säurebehandelten
15 Magnetitkonjugate mit geöffneten Porenstrukturen.

Beispiel 22

Verkapselung von Farbstoffen (Bromphenolblau) mit Trägerprotein, Oxalsäurebehandlung

20

2 ml einer Lösung von HSA (Humanserumalbumin, 5 mg/ml) und Bromphenolblau (10 mg/ml) werden mit 1ml konzentriertem Ammoniak vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$,
25 54,7g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O} + 200 \text{ ml H}_2\text{O}$), 1:10 verdünnt, versetzt und durchmischt. Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30 ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt. Der Vorgang wird noch dreimal
30 wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Magnetit-Konjugate, die HSA und Bromphenolblau enthalten. Die Waschlösungen werden spektralphotometrisch vermessen und die Menge des verkapselten Farbstoffes kalkuliert. Die Kalkulation ergibt, dass

ca. 60% des Bromphenolblaus mittels Magnetit verkapselt wurden. Die Konjugat-Präparation wird aliquotiert und die Aliquots mit unterschiedlichen Konzentrationen Oxalsäure (0,01%-10%) 3 Min. behandelt und anschließend mit jeweils 30 ml Wasser dreimal gewaschen. Eine Probe bleibt unbehandelt. Die Magnetit-Konjugate werden in 1ml destilliertes Wasser aufgenommen und in Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben werden zunächst 3 Stunden bei Zimmertemperatur und danach bei 4°C über Nacht gelagert. Danach werden die Magnetit-Konjugate mittels Magnet von den Überständen abgetrennt und diese spektralphotometrisch vermessen. Nach dieser Lagerung befindet sich kein Bromphenolblau in den Überständen der säurebehandelten und der unbehandelten Präparationen. Anschließend werden die Proben zwei Stunden bei 80°C gemeinsam im Wasserbad erhitzt, die Magnetit-Konjugate erneut mittels Magnet von den Überständen getrennt und vermessen. Nur bei den säurebehandelten Magnetit-HSA-Bromphenolblau-Konjugaten kann eine Blaufärbung der Überstände nachgewiesen werden. Die stärkste Freisetzung von Farbstoff wird bei einer Oxalsäurekonzentration von 0,05-4% gemessen. Auch diese Experimente sprechen für eine völlig veränderte Struktur der säurebehandelten Magnetitkonjugate mit geöffneten Porenstrukturen.

Beispiel 23

Verkapselung von Proteinen mit zusätzlichen funktionellen Gruppen, immunologischer Nachweis

2 ml einer Lösung von FITC-markiertem BSA (Rinderserumalbumin, 5 mg/ml) werden mit 1 ml ammoniakalischer Lösung vermischt. Die alkalische Lösung wird mit 2,6 ml Fe-Stammlösung (21g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$,

54,7g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 200 ml H_2O), 1:20 verdünnt, versetzt und durchmischt.

Die schwarz ausfallenden Konjugate werden sofort mittels eines Magneten abgetrennt und mit 30ml Wasser versetzt, geschüttelt und wieder magnetisch abgetrennt.

Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Der gewaschene Niederschlag enthält stabile Konjugate, die FITC-BSA enthalten. Die Konjugat-Präparation wird aliquotiert. Eine Probe bleibt unbehandelt, andere

werden mittels unterschiedlicher Konzentrationen (0,1-5%) Oxalsäure behandelt und anschließend dreimal mit je 30 ml Wasser gewaschen, in 1ml Wasser aufgenommen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Jeweils 3 μl der

Präparate werden analog zu Bsp. 2 auf Nitrocellulose getüpfelt und mit einem Peroxidase-markierten

Antikörper gegen FITC inkubiert. Nach PBS Waschung wird mittels ECL-System auf Peroxidaseaktivität (Auswertung über Chemolumineszenz) geprüft: Wie in Bsp. 2 arbeiten

alle Positiv- und Negativkontrollen korrekt. Nur die mit Oxalsäure behandelten Präparationen zeigen deutliche Signale. Das heißt der gegen FITC gerichtete

Antikörper konnte das FITC am BSA erreichen und immunologisch erkennen. Die optimale Oxalsäurekonzentration liegt bei 0,1-1%.

25

Patentanprüche

- 5 1. Bioaktive und biokompatible Konjugate mit
magnetischen Eigenschaften,
gekennzeichnet dadurch, dass
sie Netzstrukturen mit superparamagnetischen oder
ferromagnetischen Eigenschaften aufweisen, die
10 teilweise aus Biomolekülen und/oder Zellen, die
gegebenenfalls Ankergruppen enthalten, und einer
oder mehreren von Hohlräumen durchbrochenen,
vernetzten Schichten, durch die die Biomoleküle
und/oder Zellen biochemisch erreichbar sind und die
15 teilweise aus magnetischen Eisenoxiden oder
Mischoxiden der Formel $MeO \cdot Fe_2O_3$ bestehen, wobei Me
zweiwertige Metallionen von Fe, Ba, Sr, Mn, Zn oder
Co und Fe_2O_3 , γ - Fe_2O_3 oder magnetische Reinmetalle,
wie Cobalt und Eisen sind, aufgebaut sind.
- 20 2. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach
Anspruch 1,
gekennzeichnet dadurch, dass
die Biomoleküle und/oder Zellen biokompatibel sind.
- 25 3. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach Anspruch
1 oder 2,
gekennzeichnet dadurch, dass
die Biomoleküle und/oder Zellen bioaktiv sind.
- 30 4. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach einem
der Ansprüche 1 bis 3,
gekennzeichnet dadurch, dass
die Biomoleküle und/oder Zellen pharmakologisch
35 wirksam sind.

5. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, dass
5 die Biomoleküle pharmakologisch wirksame Moleküle, wie Cancerostatika sind.
6. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, dass
10 die Biomoleküle synthetische und/oder natürliche Oligomere oder Polymere, wie z.B. Peptide und/oder Proteine und/oder Nukleinsäurefragmente und/oder Nukleinsäuren und/oder Oligo- oder Polysaccharide
15 sind.
7. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, dass
20 die Zellen Bakterienzellen oder humane Zellen, die bioaktiv sein können, sind.
8. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, dass
25 die Ankergruppen ionisch bindende Gruppen und/oder chelatbildende Gruppen und/oder kovalent bindende Gruppen und/oder über biologische Affinität bindende Gruppen, wie z.B. Biotin, und oder
30 Antikörperbindende Gruppen und/oder Fluoreszenzfarbstoffe sind, die zur Weiterreaktion der Biomoleküle und/oder Zellen geeignet sind.
- 35

9. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach 1,
gekennzeichnet dadurch, dass
die Volumenkonzentration der magnetischen
Eisenoxide oder Mischoxide 0,0001% bis 10 Vol%,
5 insbesondere 0,01 % bis 1 Vol %, beträgt.
10. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach 1,
gekennzeichnet dadurch, dass
die Kernteilchengröße der magnetischen Komponente
10 1-1000 nm beträgt.
11. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach 1,
gekennzeichnet dadurch, dass
die durchbrochenen, vernetzten Schichten, die
15 teilweise aus der magnetischen Komponente bestehen,
von Hohlräumen, die einen Durchmesser von 0,1 nm
bis 1000 nm besitzen, durchbrochen sind.
12. Bioaktive und biokompatible Konjugate nach 1,
20 gekennzeichnet dadurch, dass
die Konjugate in dispergierter Form in wässrigen
oder mit Wasser mischbaren Lösungen vorliegen,
wobei die Teilchengröße der Konjugate in Kugelform
von 1nm bis 500 µm oder als ausgedehnte Objekte bis
25 zu 10 cm Länge und Breite beträgt.
13. Verfahren zur Herstellung von bioaktiven und
biokompatiblen Konjugaten mit magnetischen
Eigenschaften,
30 gekennzeichnet dadurch, dass
gegebenenfalls Ankergruppen enthaltene Biomoleküle
und/oder Zellen mit einer Lösung, die Metallsalze
enthält, vermischt werden und das Gemisch auf einen
alkalischen pH-Wert eingestellt wird, bzw. die
35 gegebenenfalls mit Ankergruppen versehenen

5 Biomoleküle und/oder Zellen auf einen alkalischen
pH-Wert eingestellt werden und mit einer Lösung,
die Metallsalze enthält, vermischt werden, die
entstandenen magnetisch beweglichen separierbaren
10 Konjugate anschließend ggf. gewaschen und danach
mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen,
physiko-chemischen oder biochemischen Methoden
behandelt werden, die die unmagnetischen und/oder
magnetischen oxidischen Bestandteile partiell
10 auflösen.

14. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und
biokompatibler Konjugate nach Anspruch 13,
gekennzeichnet dadurch, dass
15 gegebenenfalls mit Ankergruppen versehene
Biomoleküle und/oder Zellen mit einer Lösung, die
zweiwertige Metallionen und dreiwertige Eisenionen
enthält, vermischt werden und das Gemisch auf einen
alkalischen pH-Wert eingestellt wird, bzw. die
20 gegebenenfalls mit Ankergruppen versehenen
Biomoleküle und/oder Zellen auf einen alkalischen
pH-Wert eingestellt werden und mit einer Lösung,
die zweiwertige Metallionen und dreiwertige
Eisenionen enthält, vermischt werden, die
25 entstandenen magnetisch beweglichen separierbaren
Konjugate anschließend ggf. gewaschen und mit
chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen,
physiko-chemischen oder biochemischen Methoden
behandelt werden, die die oxidischen Bestandteile
30 partiell auflösen.

15. Verfahren zur Herstellung von bioaktiven und
biokompatiblen Konjugaten mit magnetischen
Eigenschaften,
35 gekennzeichnet dadurch, dass

vorgebildete magnetisch separierbare Konjugate mit Biomolekülen und/oder Zellen, die ggf. mit Ankergruppen versehen sind, inkubiert werden und danach mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt werden, die die oxidischen Bestandteile partiell auflösen.

16. Verfahren zur Herstellung von bioaktiven und biokompatiblen Konjugaten mit magnetischen Eigenschaften, gekennzeichnet dadurch, dass vorgebildete magnetisch separierbare Konjugate mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt werden, die die Oxidabscheidung partiell auflösen und danach mit Biomolekülen und/oder Zellen, die ggf. mit Ankergruppen versehen sind, inkubiert werden und anschließend ggf. gewaschen und magnetisch separiert werden.

17. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 14, gekennzeichnet dadurch, dass positiv geladene, in Wasser dispergierte magnetische Nanoteilchen mit Biomolekülen und/oder Zellen vermischt werden, anschließend ggf. gewaschen werden und die magnetisch separierbaren Konjugate mit chemischen Substanzen, bzw. mit physikalischen, physiko-chemischen oder biochemischen Methoden behandelt werden, die die Oxidabscheidung partiell auflösen.

18. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17,
gekennzeichnet dadurch, dass
5 als ggf. mit Ankergruppen versehenen Biomoleküle Proteine eingesetzt werden.
19. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 18,
10 gekennzeichnet dadurch, dass als Proteine Serumproteine eingesetzt werden.
20. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 18,
15 gekennzeichnet dadurch, dass als Proteine Albumine eingesetzt werden.
21. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 20,
20 gekennzeichnet dadurch, dass als Albumin Humanserumalbumin eingesetzt werden.
22. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 18,
25 gekennzeichnet dadurch, dass als Proteine Enzyme eingesetzt werden.
23. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17,
30 gekennzeichnet dadurch, dass als ggf. mit Ankergruppen versehenen Biomoleküle Nukleinsäuren oder deren Fragmente eingesetzt werden.
- 35

- 5 24. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass als Ankergruppen ionisch bindende und /oder chelatbildende Gruppen und/oder zur kovalenten Bindung befähigte Gruppen und/oder über 10 biologische Affinität bindende Gruppen, wie Biotin, und/oder zur Bindung von Antikörpern befähigte Gruppen und/oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.
- 15 25. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 24, gekennzeichnet dadurch, dass als Ankergruppe fluoreszeinhaltige Gruppen eingesetzt werden.
- 20 26. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 13, gekennzeichnet dadurch, dass als Schwermetallsalzlösung Eisen(II)- und 25 Eisen(III)-Salze enthaltende Lösungen eingesetzt werden.
- 30 27. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 13, gekennzeichnet dadurch, dass als Metallsalzlösung Kobalt- oder Nickel-Salze enthaltende Lösungen eingesetzt werden.

28. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 13, gekennzeichnet dadurch, dass
5 der alkalische pH-Wert durch Zugabe von konzentriertem Ammoniumhydroxyd NaOH oder KOH eingestellt wird.
29. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche
10 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass als Substanzen, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, organische oder anorganische Säuren verwendet werden.
- 15 30. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass
20 als Substanzen, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, organische Säuren, wie Citronensäure, Weinsäure und Oxalsäure verwendet werden.
- 25 31. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, dass Oxalsäure in einer Konzentration von 10- 0,1 % eingesetzt wird.
- 30 32. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, dass Oxalsäure bei einer Temperatur von 0°C-50°C eingesetzt wird.

33. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass
5 als Substanzen, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, anorganische Säuren, wie Salzsäure, verwendet werden.
34. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass
10 als physikalische Methode, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, Ionenstrahl- und/oder Laserstrahltechniken, verwendet werden.
15
35. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biocompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass
20 als physiko-chemische Methoden, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, elektrochemische Methoden, verwendet werden.
25
36. Verfahren zur Herstellung bioaktiver und biokompatibler Konjugate nach einem der Ansprüche 13 bis 17, gekennzeichnet dadurch, dass
30 als biochemische Methoden, die die Metalloxidabscheidungen partiell auflösen, Bio-Korrosions-Methoden, verwendet werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 02/01584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/50

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)
IPC 7 A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 03653 A (SILICA GEL GMBH ;PILGRIMM HERBERT (DE)) 8 February 1996 (1996-02-08) Seite 2, letzter Absatz - Seite 5, 1. Absatz; Seite 6, letzter Absatz; Beispiel 1, 2, 6-10 ---	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36
X	SHINKAI M ET AL: "PREPARATION OF FINE MAGNETIC PARTICLES AND APPLICATION FOR ENZYME IMMOBILIZATION" BIOCATALYSIS, XX, XX, vol. 5, no. 61, 1991, pages 61-69, XP001039623 Seite 62, Absatz mit Titel "Preparation of Ferrofluid" und "Activation of Magnetic Particles and Immobilisation of Enzyme" --- -/--	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in 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 document 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

20 June 2002

Date of mailing of the international search report

02/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Borst, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inte Application No
 PCT/EP 02/01584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 09840 A (COCKBAIN JULIAN R M ;JACOBSEN ANNE (NO); STRANDE PER (NO); GUNDERS) 4 April 1996 (1996-04-04) Beispiel 1-4 ----	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36
X	EP 0 928 809 A (MARUNO SHIGEO ;MEITO SANGYO KK (JP)) 14 July 1999 (1999-07-14) Beispiel 1 und 2 ----	1-14, 17-33, 36
P, X	WO 01 19405 A (KLICHE KAY OLIVER ;TRIDELTA BIO MEDICAL GMBH (DE); BUSKE NORBERT () 22 March 2001 (2001-03-22) Beispiel 10-13 ----	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36
A	US 3 843 540 A (REIMERS G ET AL) 22 October 1974 (1974-10-22) example 1 ----	1-36
A	LUBBE A S ET AL: "Physiological aspects in magnetic drug-targeting" JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 194, no. 1-3, April 1999 (1999-04), pages 149-155, XP004166660 ISSN: 0304-8853 Seite 150, Absatz mit Titel "2. The general aspects" -----	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inte I Application No
 PCT/EP 02/01584

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9603653	A	08-02-1996	DE 4427821 A1	01-02-1996
			AT 191086 T	15-04-2000
			WO 9603653 A1	08-02-1996
			DE 59508069 D1	27-04-2000
			EP 0772776 A1	14-05-1997
			JP 10503281 T	24-03-1998
			US 6274121 B1	14-08-2001
			US 5928958 A	27-07-1999
WO 9609840	A	04-04-1996	US 6207134 B1	27-03-2001
			WO 9609840 A1	04-04-1996
			AU 687093 B2	19-02-1998
			AU 7702994 A	19-04-1996
			DE 69421943 D1	05-01-2000
			DE 69421943 T2	18-05-2000
			DK 783325 T3	01-05-2000
			EP 0783325 A1	16-07-1997
			JP 10506121 T	16-06-1998
			NO 971436 A	23-05-1997
			RU 2147243 C1	10-04-2000
			EP 0928809	A
EP 0928809 A1	14-07-1999			
US 6165378 A	26-12-2000			
WO 9808899 A1	05-03-1998			
WO 0119405	A	22-03-2001	AU 1694301 A	17-04-2001
			DE 10046508 A1	05-04-2001
			WO 0119405 A2	22-03-2001
US 3843540	A	22-10-1974	AU 473730 B	01-07-1976
			AU 5848673 A	30-01-1975
			CA 995093 A1	17-08-1976
			DE 2336398 A1	14-02-1974
			FR 2209989 A1	05-07-1974
			GB 1439031 A	09-06-1976
			IT 995065 B	10-11-1975
			JP 49084998 A	15-08-1974
			ZA 7304763 A	26-06-1974

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte les Aktenzeichen
PCT/EP 02/01584

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 A61K9/50		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K		
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, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 03653 A (SILICA GEL GMBH ;PILGRIMM HERBERT (DE)) 8. Februar 1996 (1996-02-08) Seite 2, letzter Absatz - Seite 5, 1. Absatz; Seite 6, letzter Absatz; Beispiel 1, 2, 6-10 ---	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36
X	SHINKAI M ET AL: "PREPARATION OF FINE MAGNETIC PARTICLES AND APPLICATION FOR ENZYME IMMOBILIZATION" BIOCATALYSIS, XX, XX, Bd. 5, Nr. 61, 1991, Seiten 61-69, XP001039623 Seite 62, Absatz mit Titel "Preparation of Ferrofluid" und "Activation of Magnetic Particles and Immobilisation of Enzyme" --- -/--	1-12, 16, 18-25, 29-33, 36
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> 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* älteres Dokument, 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 anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 20. Juni 2002	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 02/07/2002	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Borst, M	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 02/01584

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 09840 A (COCKBAIN JULIAN R M ;JACOBSEN ANNE (NO); STRANDE PER (NO); GUNDERS) 4. April 1996 (1996-04-04) Beispiel 1-4 ---	1-12,16, 18-25, 29-33,36
X	EP 0 928 809 A (MARUNO SHIGEO ;MEITO SANGYO KK (JP)) 14. Juli 1999 (1999-07-14) Beispiel 1 und 2 ---	1-14, 17-33,36
P,X	WO 01 19405 A (KLICHE KAY OLIVER ;TRIDELTA BIO MEDICAL GMBH (DE); BUSKE NORBERT ()) 22. März 2001 (2001-03-22) Beispiel 10-13 ---	1-12,16, 18-25, 29-33,36
A	US 3 843 540 A (REIMERS G ET AL) 22. Oktober 1974 (1974-10-22) Beispiel 1 ---	1-36
A	LUBBE A S ET AL: "Physiological aspects in magnetic drug-targeting" JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 194, Nr. 1-3, April 1999 (1999-04), Seiten 149-155, XP004166660 ISSN: 0304-8853 Seite 150, Absatz mit Titel "2. The general aspects" -----	1-36

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/01584

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9603653 A	08-02-1996	DE 4427821 A1	01-02-1996
		AT 191086 T	15-04-2000
		WO 9603653 A1	08-02-1996
		DE 59508069 D1	27-04-2000
		EP 0772776 A1	14-05-1997
		JP 10503281 T	24-03-1998
		US 6274121 B1	14-08-2001
		US 5928958 A	27-07-1999
WO 9609840 A	04-04-1996	US 6207134 B1	27-03-2001
		WO 9609840 A1	04-04-1996
		AU 687093 B2	19-02-1998
		AU 7702994 A	19-04-1996
		DE 69421943 D1	05-01-2000
		DE 69421943 T2	18-05-2000
		DK 783325 T3	01-05-2000
		EP 0783325 A1	16-07-1997
		JP 10506121 T	16-06-1998
		NO 971436 A	23-05-1997
		RU 2147243 C1	10-04-2000
		EP 0928809 A	14-07-1999
EP 0928809 A1	14-07-1999		
US 6165378 A	26-12-2000		
WO 9808899 A1	05-03-1998		
WO 0119405 A	22-03-2001	AU 1694301 A	17-04-2001
		DE 10046508 A1	05-04-2001
		WO 0119405 A2	22-03-2001
US 3843540 A	22-10-1974	AU 473730 B	01-07-1976
		AU 5848673 A	30-01-1975
		CA 995093 A1	17-08-1976
		DE 2336398 A1	14-02-1974
		FR 2209989 A1	05-07-1974
		GB 1439031 A	09-06-1976
		IT 995065 B	10-11-1975
		JP 49084998 A	15-08-1974
		ZA 7304763 A	26-06-1974