DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **256 721 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 08 J 7/18**

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 08 J / 286 581 8 (22) 29.01.86 (44) 18.05.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD

(72) Schößler, Werner, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Boeden, Hans-Friedrich, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Holtzhauer, Martin, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Loth, Fritz, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Hiepe, Falk, Dr. med. Dipl.-Med.; Bertram, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Müller, Reinhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Konjuchowa, Dagmar, Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Aktivierung von zellulosehaltigen Festkörperoberflächen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von Hydroxyl-Gruppen enthaltenden zellulosehaltigen Festkörperoberflächen mit Organosilanen und gegebenenfalls homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien zur einfachen, schonenden und stabilen Bindung von Proteinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen, Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien. Die Erfindung findet Anwendung in den Biowissenschaften, der Biotechnologie und in der Medizin.

ISSN 0433-6461

7 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Aktivierung von Hydroxyl-Gruppen enthaltenden zellulosehaltigen Festkörperoberflächen, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Hydroxyl-Gruppen mit einem Organosilan der Formel

$$(XR'_{n'})_n \, Si \, R_{4-n} \qquad (1)$$

umgesetzt werden, wo X eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Nitroso-, Sulfhydryl- oder Halocarbonyl-Gruppe, R' eine Alkyl-, Alkyl-phenyl- oder Phenyl-Gruppe und R eine Alkoxy-, Phenoxy- oder Halogen-Gruppe sind, wobei n' den Wert zwischen 0–20 und und n den Wert zwischen 1–3 besitzen, oder daß die Umsetzung mit mindestens zwei Organosilanen der Formel I im Gemisch oder nacheinander in flüssiger oder gasförmiger Phase erfolgt und daß anschließend gegebenenfalls eine weitere Behandlung mit homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Umsetzung der Hydroxyl-Gruppen mit Verbindungen der Formel I in organischen Lösungsmitteln, Lösungsmittelgemischen, wäßrigen Lösungen oder Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln erfolgt.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Umsetzung der Hydroxyl-Gruppen in der Gasphase mit einem Aerosol oder bei einem Druck unterhalb des Atmosphärendrucks erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von Hydroxyl-Gruppen enthaltenden zellulosehaltigen Festkörperoberflächen, die für die Bindung von Proteinen, Lektinen, Enzymen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen, Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien in der Biotechnologie, den Biowissenschaften sowie der Medizin für analytische und präparative Zwecke eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zellulosehaltige Trägermaterialien finden seit Jahren Anwendung zur Bindung von Proteinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen und anderen biologisch aktiven Materialien.
Derartige trägerfixierte Proteine, Nukleinsäuren, niedermolekulare Liganden, Zellen und andere biologisch aktive Materialien haben u. a. zur Separation und Isolierung von spezifischen Wechselwirkungspartnern, als Enzymreaktoren, zum qualitativen und quantitativen Nachweis von biologisch bedeutsamen Verbindungen in den Biowissenschaften, der Biotechnologie, aber auch zunehmend in der Medizin große Bedeutung erlangt.
Voraussetzung hierfür ist in vielen Fällen die Einführung von chemisch reaktiven Gruppen, die eine chemische Bindung der entsprechenden Liganden gestatten. Die als Aktivierung bezeichnete chemische Modifizierung hängt prinzipiell von der Art der funktionellen Gruppen der Matrix und des Liganden ab, wird aber auch von der chemischen Stabilität der Matrix sowie der Stabilität der biologischen Eigenschaften des Liganden determiniert. Die Wahl des Aktivierungsverfahrens wird des weiteren durch den technologischen Aufwand bei der Aktivierung und die hiermit verbundenen Kosten des Aktivierungsverfahrens, die Reaktivität der eingeführten chemischen Gruppen, der Möglichkeit der Lagerung des aktivierten Trägers, der Toxizität und Biokompatibilität der Modifizierungsreagenzien sowie der Stabilität der chemischen Bindung zwischen Träger und Ligand bestimmt.
Bei der Vielzahl der zu beachtenden und limitierenden Parameter und Einflußfaktoren überrascht es nicht, daß in den letzten Jahren eine Reihe von Aktivierungsverfahren für zellulosehaltige Festkörperoberflächen beschrieben wurden (Übersicht: J. F. Kennedy: Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. **29** [1974] 306), die z. T. auch kommerziell genutzt werden.
Mit Abstand am verbreitetsten ist die durch Axen et al. eingeführte Aktivierung mittels Bromcyan (R. Axen, J. Porath, S. Ernback: Nature **214** [1967] 1302). Obwohl dieses Verfahren unstrittig zu einer breiten Anwendung trägerfixierter Verbindungen in den Biowissenschaften und der Biotechnologie führte, ist es jedoch mit den Nachteilen einer relativ instabilen chemischen Bindung zwischen Festkörperoberfläche und Ligand — insbesondere bei *p*H-Werten < 5 und > 10-, die zu einer nicht unbeträchtlichen Freisetzung des gebundenen Liganden (leakage) führen kann und somit die Anwendung vor allem für therapeutische in-vivo-Maßnahmen in der Medizin stark eingeschränkt, der hohen Toxizität von Bromcyan, die die Technologie der Aktivierung aufwendig gestaltet, und der Gefahr der Verknüpfung der Trägermoleküle untereinander (cross linking) behaftet.
Weitere häufig genutzte Aktivierungsverfahren sind die Aktivierung mittels Triazin-Derivaten (Cyanurchlorid) (G. Kay, E. M. Crook: Nature **216** [1967] 514; H.-D. Hunger, C. Coutelle, J. Lampe, H. Schlechte, W. Schößler, R.-M. Leiser, J. Schubert, G. Barchend: EP 134025) sowie Epichlorhydrin (L. Sandberg, J. Porath: J. Chrom. **90** [1974] 87). Auch diese Verbindungen sind toxisch. Hinzu kommt, daß bei der Anwendung von Epoxy- oder Cyanurchlorid-aktivierten Festkörperoberflächen nicht selten eine Inaktivierung empfindlicher biologischer Materialien zu beobachten ist, die einmal auf die geringe Reaktivität der Epoxy-Gruppen und somit langen Inkubationszeiten während der Bindung des Liganden und zum anderen auf den bei der Bindung an Cyanurchlorid freiwerdenden Chlorwasserstoff zurückzuführen ist. Als bedeutsamer Nachteil Cyanurchlorid-aktivierter Festkörperoberflächen erweist sich die leichte Hydrolysierbarkeit derartig modifizierter Träger, die die Praktikabilität erheblich einschränkt.

Es ist seit langer Zeit bekannt (R. A. Messing, H. H. Weetall: US-Patent 3519538; H. H. Weetall, N. Y. Elmira: US-Patent 3652761; H. H. Weetall: Methods in Enzymol. **44** [1976] 134), daß die OH-Gruppen auf SiO_2-Oberflächen, vorzugsweise Glas, als Angriffspunkte für chemische Agenzien, insbesondere Organosilanen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, zur Verfügung stehen, wobei die Organosilane als Brücke zwischen dem anorganischen Träger und der organischen Verbindung fungieren.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, ein einfaches, kostengünstiges, nicht toxisches Aktivierungsverfahren für Hydroxyl-Gruppen enthaltende zellulosehaltige Festkörperoberflächen zu entwickeln, das zu stabilen aktivierten Zellulosen führt, an die Proteine, Nukleinsäuren, niedermolekulare Liganden, Zellen, Mikroorganismen und andere biologische Materialien mit hoher Ausbeute stabil und biokompatibel gebunden werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, Hydroxyl-Gruppen enthaltende zellulosehaltige Festkörperoberflächen mit Verbindungen zu aktivieren, die gewöhnlicherweise zur Bindung von organischen Substanzen an anorganische Stoffe eingesetzt werden, wobei ein hoher Aktivierungsgrad sowie eine stabile und biokompatible chemische Modifizierung der Zelluloseoberflächen erzielt werden soll.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die auf den zellulosehaltigen Festkörperoberflächen befindlichen Hydroxyl-Gruppen mit einem Organosilan der Formel

$$(XR'_{n'})_n \, Si \, R_{4-n} \qquad (I)$$

umgesetzt werden, wo bei X eine Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Epoxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Nitroso-, Sulfhydryl- oder Halocarbonyl-Gruppe und R' eine Alkyl-, Alkylphenyl- oder Phenyl-Gruppe ist und n' den Wert zwischen 0 und 20 und n den Wert zwischen 1 und 3 haben kann.
Gebräuchliche Organosilane können durch folgende Formel dargestellt werden:

$$Y_n Si \, R_{4-n} \qquad (II)$$

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

$$XCH_2CH_2CH_2–Si \, (OR)_3 \qquad (III)$$

wo X die reaktive organische Gruppe entsprechend Formel I ist und R für eine Methyl- oder Ethyl-Gruppe steht. Der Umsatz wird auch mit mindestens zwei Organosilanen der Formel I im Gemisch oder nacheinander durchgeführt. Bevorzugtes Milieu für die Organosilane sind die flüssige oder die gasförmige Phase. Anschließend erfolgt gegebenenfalls eine weitere Behandlung mit homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien.
Zellulosehaltige Festkörper im Sinne dieser Erfindung besitzen auf ihrer Oberfläche Hydroxyl-Gruppen, die wesentlich für die hydrophilen Eigenschaften verantwortlich sind. Obwohl nur ein Bruchteil der im Zellulosemolekül vorhandenen OH-Gruppen an der Oberfläche sterisch zugänglich sein sollte, wurde überraschenderweise gefunden, daß Organosilane, die bisher ausschließlich an anorganischen Festkörperoberflächen umgesetzt wurden, mit mindestens gleicher Reaktivität mit zellulosehaltigen Festkörperoberflächen reagieren. Während die silikofunktionelle Gruppe mit den zugänglichen Hydroxyl-Gruppen des Festkörpers reagiert, steht die organofunktionelle Gruppe den üblichen chemischen Reaktionen unter Verwendung von Amino-, Carbonyl-, Carboxy-, Isocyano-, Diazo-, Isothiocyano-, Sufhydryl-, Nitroso- oder Halocarbonyl-Gruppen zur Verfügung, so daß diese Verbindungen als Brücke zwischen der Zellulose und der organischen/biologischen Verbindung fungieren.
Die so aktivierten zellulosehaltigen Festkörperoberflächen können nunmehr im folgenden direkt über die entsprechenden funktionellen Gruppe oder aber unter Vermittlung von homo- oder heterobifunktionellen Reagenzien auf an sich bekannte Art und Weise mit den zu bindenden Proteinen, Enzymen, Lektinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen, Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien umgesetzt werden. Das erfolgt beispielsweise erfindungsgemäß so, daß die Hydroxyl-Gruppen enthaltenden zellulosehaltigen Festkörperoberflächen mit γ-Amino propyltriethoxysilan umgesetzt werden ($X = NH_2–$; $R' = (–CH_2)_3$; $n' = 1$; $R = –OC_2H_5$; $n = 1$ in Formel I). Die nunmehr an der Festkörperoberfläche befindliche Amino-Gruppe kann im folgenden mit Glutaraldehyd oder N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat (SDPD) umgesetzt werden. Die Bindung der Proteine oder anderen Liganden erfolgt in diesen Fällen an eine Aldehydgruppe über Amino-Gruppen — vorzugsweise die in ε-Stellung befindliche Amino-Gruppe des Lysins- oder über Disulfid-Bindungen.
Ganz analog können die zellulosehaltigen Festkörperoberflächen mit Glycidoxypropyltriethoxysilan umgesetzt werden. Bei dieser Variante reagieren die zu bindenden biologischen Materialien direkt mit der Epoxy-Gruppe der Festkörperoberfläche.
Durch Einsatz von Mercaptopropyltrimethoxysilan eröffnet sich die Möglichkeit der reversiblen Bindung biologischer Materialien, da die resultierende Disulfid-Bindung durch Anwendung geeigneter Reduktionsmittel reversibel gespalten werden kann. Die reversible Liganden-Kopplung erweist sich insbesondere in solchen Fällen als vorteilhaft, in denen die Elution des spezifisch gebundenen Wechselwirkungspartners die Gefahr einer Denaturierung in sich birgt, so daß die Elution des Protein-Ligand-Komplexes vorzuziehen ist.
Wichtig hierbei ist, daß die Umsetzung mit den Organosilanen, die nicht toxisch sind und großtechnisch in beträchtlichem Umfang produziert werden, durch einfaches in Kontakt bringen oder Tauchen erfolgt, wobei die Aktivierung im gequollenen

oder nicht gequollenen Zustand des Festkörpers erfolgen kann oder aber in der Gasphase erfolgt. Von großer Bedeutung hierbei ist, daß die Umsetzung mit Organosilanen in flüssiger Phase mit organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, Toluol, Dioxan, Methanol, Ethanol u.a., Lösungsmittelgemischen, wie Methanol/Ethanol, sowie in wäßrigem Milieu oder Wasser-Lösungsmittel-Gemischen, wie Ethanol/Wasser und Methanol/Wasser, erfolgen kann, so daß im Gegensatz zu vielen anderen Aktivierungsverfahren der technologische Aufwand gering ist. Besonders vorteilhaft sollte sich die Aktivierung in gasförmiger Phase durch Anwendung von Aerosolen oder durch Unterdruck gestalten lassen.
Vorteilhaft ist weiterhin, daß durch Wahl unterschiedlicher Organosilane und gegebenenfalls bifunktioneller Kopplungsreagenzien praktisch alle in Frage kommenden Reaktionsmöglichkeiten realisiert werden können, da unter Nutzung des zugrundeliegenden und erfindungsgemäßen Prinzips Festkörperoberflächen mit den unterschiedlichsten funktionellen Gruppen (X in Formel I und III) erhalten werden können.
Hinzu kommt, daß — bedingt durch den Spacereffect der Organosilane (R' = 0–20) und/oder der bifunktionellen Kopplungsreagenzien (so z.B. Glutaraldehyd) — die gebundenen biologischen Materialien fast ausnahmslos ihre biologische Aktivität behalten.
Besonders vorteilhaft gestaltet sich der Einsatz von Gemischen an Organosilanen unterschiedlicher funktioneller Gruppen, da diese über unterschiedliche Mechanismen biologischen Materialien in hoher Ausbeute binden können. So erweisen sich Gemische aus Aminopropyltriethoxysilan und Glycidoxypropyltriethoxysilan sowie Aminopropyltriethoxysilan und Mercaptopropyltrimethoxysilan als besonders geeignet, da diese biologische Materialien durch Reaktion über unterschiedliche funktionelle Gruppen mit sehr hoher Ausbeute binden können. In diesen Fällen erfolgt die Bindung der Liganden über Aldehyd- und Epoxyö-Gruppen bzw. über Aldehyd- und Mercapto-Gruppierungen.
Die sich durch Reaktion von Organosilanen mit den Hydroxyl-Gruppen der zellulosehaltigen Festkörper ergebenden Bindungen sind sehr stabil, so daß so aktivierte Festkörper im trockenen oder feuchten Zustand über lange Zeit gelagert werden können und daß gebundene biologisch aktive Liganden über lange Zeiträume auch unter extremen Bedingungen stabil gebunden bleiben. Die unspezifischen Bindungen an so aktivierte Hydroxyl-Gruppen enthaltende zellulosehaltige Festkörperoberflächen sind äußerst gering. Organosilane zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität aus.
Als zellulosehaltige Festkörper kommen alle Zellulosen in Betracht, die über eine ausreichende Zahl sterisch zugänglicher Hydroxyl-Gruppen auf ihrer Oberfläche verfügen, wobei deren Zusammensetzung für das erfindungsgemäße Aktivierungsverfahren nicht entscheidend ist. Die auf diese Art und Weise aktivierten zellulosehaltigen Festkörper liegen als Formkörper vor, wobei die Formkörper eine sphärische, faserige oder eckige Form besitzen können, die durch Packung, Verweben oder durch Bindemittel zu Kolonnenpackungen, Flächenträgern oder anderen höheren Strukturen verbunden sein können. Eine dominierende Bedeutung hierbei besitzen sphärische zellulosehaltige Festkörper (z.B. Perlzellulose), die vor allem für chromatographische Methoden und Verfahren eingesetzt werden, und flächenförmige Träger („aktiviertes Papier"), die in der Analytik und Diagnostik eine weitere Verbreitung gefunden haben. Eingeschlossen hiervon sind auch dünne Schichten, die als Filme oder Lacke auf anderen Festkörpern, die in die erfindungsgemäße Reaktion nicht einbezogen sind, befindlich sind, wobei die für die erfindungsgemäße Aktivierungsreaktion inerten Trägermaterialien homogen oder nicht homogen sowie geformt oder nicht geformt sein können.
Die so aktivierten zellulosehaltigen Festkörperoberflächen werden zur chemischen Bindung von Proteinen, wie Antigenen, Antikörpern, Enzymen und Lektinen, Nukleinsäuren, niedermolekularen Liganden, Zellen, Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien eingesetzt. Derartige an Festkörperoberflächen gebundene Liganden können zur Separation und Isolierung von biospezifischen Wechselwirkungspartnern mittels affinitätschromatographischer Verfahren, als Enzymreaktoren, zum qualitativen und quantitativen Nachweis von biologisch bedeutsamen Verbindungen in den Biowissenschaften, der Biotechnologie, aber auch der Medizin Anwendung finden.
Im folgenden wird die Erfindung an einigen Beispielen erläutert.

Beispiel 1:
1g Perlzellulose mit einem Ausschlußvolumen von 5000000 D und einer Partikelgröße von 80–200 μm sowie einem Trockensubstanzgehalt von 64mg/ml wird mit 5% Aminopropyltriethoxysilan (NB 1114, VEB Chemiewerk Nünchritz, DDR) in Ethanol/Wasser (1:1), *p*H 2,5, 6h bei 60°C inkubiert und anschließend zweimal mit je 5ml Ethanol/Wasser sowie fünfmal mit je 5ml 0,1m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8 gewaschen. Nachfolgend wird der Aktivierungsgrad durch Bestimmung der Aminogruppen an der Festkörperoberfläche nach G. Antoni (Anal. Biochem. **129** [1983] 60) bestimmt. Der Aktivierungsgrad kann durch Wahl der Konzentration der Organosilane und/oder der Inkubationszeiten über einen weiten Bereich variiert werden. In der Regel erhält man charakteristische Aktivierungsgrade von 10–15 μMol Aminogruppen je ml Perlzellulose.

Beispiel 2:
5ml Perlzellulose entsprechend Beispiel 1 wird mit 10% Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol/Wasser (1:1), *p*H 2,5, 6 Stunden bei 60°C inkubiert und anschließendd zweimal mit je 30ml Ethanol/Wasser (1:1) bzw. fünfmal mit je 20ml 0,1m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, gewaschen. Das so aktivierte Gel wird nachfolgend mit 5%igem Glutaraldehyd 2h bei 37°C in 0,1m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, umgesetzt und nachfolgend wiederum fünfmal mit je 20ml Phosphat-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgt die Bindung des Proteins durch einfache Zugabe der Proteinlösung zu dem auf diese Art und Weise aktivierten Gel. Hierzu wird die Perlzellulose mit 10ml humanem Immunglobulin G in einer Konzentration von 35,5mg/ml in einem 0,1m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, 2h bei Raumtemperatur versetzt. Nach Absaugen des nicht gebundenen Überstandes erfolgt die Bestimmung der gebundenen Proteinmenge durch Differenzmessung der Eiweißkonzentration der eingesetzten Proteinlösung und des Überstandes. Auf diese Art und Weise konnten 12mg IgG/ml Perlzellulose gebunden werden.

Beispiel 3:
1ml Perlzellulose wird, wie in Beispiel 2 beschrieben, aktiviert und mit Glutaraldehyd in einer Konzentration von 3% umgesetzt. Anschließend wird der so aktivierte Träger mit ^{125}J-IgG (vom Kaninchen, gerichtet gegen das Enzym alkalische Phosphatase) in einer Konzentration von 41,3mg/ml versetzt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der überschüssigen Proteinmenge und nachfolgendem intensiven Waschen mit jeweils 5ml Phosphat-Puffer wird die gebundene Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität unter Mitführung der eingesetzten Proteinlösung als Standard bestimmt.
In diesem Versuch konnten 11,4g ^{125}J-IgG/ml Perlzellulose gebunden werden.

Beispiel 4:
5 ml Perlzellulose entsprechend Beispiel 1 wird mit 5% Glycidoxypropyltriethoxysilan (NB 1115, VEB Chemiewerk Nünchritz, DDR) in Ethanol/Wasser (1:1), *p*H 2,5, 6 h bei 60 °C inkubiert und anschließend weitere 6 h auf 120 °C erhitzt. Nach intensivem Waschen mit je 20 ml Ethanol/Wasser bzw. 0,1 m Phosphat-Puffer analog Beispiel 2 wird die so aktivierte Perlzellulose mit 10 ml humanem Immunglobulin G in einer Konzentration von 35,5 mg/ml in einem 0,1 m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, 2 h bei Raumtemperatur versetzt. Die gebundene Proteinmenge, die wie in Beispiel 2 beschrieben bestimmt wurde, betrug 7,2 mg IgG/ml Perlzellulose.

Beispiel 5:
5 ml Perlzellulose entsprechend Beispiel 1 wird mit 5% Mercaptopropyltrimethoxysilan (Serva, BRD) in Ethanol/Wasser (1:1), 4 h bei 60 °C inkubiert und anschließend zweimal mit je 5 ml Ethanol/Wasser sowie fünfmal mit je 5 ml 0,1 ml Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, gewaschen. Anschließend wird die Zellulose mit 10 mg humanem IgG, das zuvor mit N-succinimidyl-3-(3-pyridyldithio)propionat (SDPD, Pharmacia, Schweden) nach den Angaben des Herstellers aktiviert wurde, versetzt. Das bei der Reaktion freigesetzte Pyridin-2-thion kann photometrisch bei 343 nm verfolgt weerden. Dieses so gebundene IgG kann zur Gewinnung und Isolierung von Kaninchen-anti-human-IgG-antikörpern eingesetzt werden. Nach Ablauf der Affinitätschromatographie kann das über Disulfidbrücken gebundene IgG durch Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (50 mM) wieder abgespalten werden, so daß die aktivierte Matrix für eine erneute Bindung eines Liganden zur Verfügung steht.

Beispiel 6:
5 ml Perlzellulose entsprechend Beispiel 1 wird mit einem Gemisch aus Aminopropyltriethoxysilan sowie Glycidoxypropyltriethoxysilan (Haftvermittler 6130, VEB Chemiewerk Nünchritz, DDR) in Kontakt gebracht und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Absaugen des überschüssigen Reagenz sowie Trocknen im Vakuum und nachfolgendem intensiven Waschen mit 0,1 m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, wird der Träger mit 3% Glutaraldehyd umgesetzt und anschließend ^{125}J-IgG, wie in Beispiel 3 beschrieben, gebunden. Es konnten 26,4 mg ^{125}J-IgG/ml Perlzellulose gebunden werden.

Beispiel 7:
Die entsprechend den Beispielen 3 und 6 mit ^{125}J-IgG umgesetzte Perlzellulose wird je dreimal mit 20 ml PBS-Puffer, *p*H 7,4, der Dioxan enthält, gewaschen und nachfolgend wird die gebundene Radioaktivität bestimmt. Die an der Perlzellulose verbliebenen Proteinmengen sind mit 11,4 mg/ml (Beispiel 3) und 26,6 mg/ml (Beispiel 6) unverändert.

Beispiel 8:
Das in den Beispielen 3, 6 und 7 eingesetzte Immunglobulin G wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem Enzym alkalische Phosphatase erhalten. Somit ist es möglich, das ^{125}J-IgG unter Nutzung der entsprechenden Antikörperaktivitäten zur Reinigung und Isolierung des Enzyms alkalische Phosphatase einzusetzen. Hierzu wird durch n-Butanol-Extraktion vorgereinigte alkalische Phosphatase an die entsprechend Beispiel 3 mit ^{125}J-IgG umgesetzte Perlzellulose gebunden und nachfolgend mit Triethylamin, *p*H 11,4, eluiert. Das so gereinigte Enzym hat eine spezifische Aktivität von 1 000 IU/mg, wobei die Ausbeute ca. 80% beträgt. In der Polyacrylamidelektrophorese sind keine Begleitproteine nachweisbar.

Beispiel 9:
Humanes Immunglobulin G wird, wie in Beispiel 2 beschrieben, an Perlzellulose gebunden und zur Isolierung von Kaninchen-antihuman-IgG-Antikörpern eingesetzt. Hierzu wird der mit dem IgG beladene Träger in eine Chromatographiesäule gefüllt, die mit einem spezifischen Antiserum gegen humanes IgG beladen wird. Die Elution erfolgt zunächst mit PBS-Puffer und anschließend mit einer 3 m KSCN-Lösung. Nach sofortiger Dialyse der Antikörperfraktionen wurde der Nachweis von spezifischen Antikörpern mit einem Enzymimmunoassay sowie der doppelten radialen Immundiffusion (Ouchterlony-Technik) geführt. Die Prüfung auf unspezifische Bindungen erfolgt durch Auftragung eines entsprechenden Kaninchen-Normalserums sowie Testung aller antikörperhaltigen Fraktionen mit der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese.

Beispiel 10:
Flächenförmige Zelluloseträger (Whatman-Papier 540 und FN 4-Papier) werden mit 3% Aminopropyltriethoxysilan oder Glycidoxypropylsilan, wie in Beispiel 2 und 4 beschrieben, aktiviert und anschließend mit ^{131}J-Humanserumalbumin (^{131}J-HSA) in 0,1 m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, in den Konzentrationen 10 µg/ml und 100 µg/ml versetzt. Nach intensivem Waschen wurde die gebundene Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität unter Mitführung eines Standards bestimmt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

	gebundenes ^{131}J-HSA			
	Aminopropyltriethoxysilan		Glycidoxypropyltriethoxysilan	
eingesetzte Proteinekonz.	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
FN 4	192 ng/cm^2	1 036 ng/cm^2	75 ng/cm^2	343 ng/cm^2
Whatman 540	61 ng/cm^2	486 ng/cm^2	15 ng/cm^2	76 ng/cm^2

Beispiel 11:
Die in Beispiel 10 mit ^{131}J-HSA beladenen Papierträger werden im folgenden im Enzymimmunoassay eingesetzt. Hierzu werden definierte Flächen dieser Träger nach vorherigem Blocken eventuell noch freier reaktiver Gruppen mit Äthanolamin mit einem Kaninchen-antihuman-Albumin-Antiserum in geeigneter Verdünnung versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper werden die Papierträger mit einem Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Konjugat (Enzym: alkalische Phosphatase) 4 h bei 37 °C inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Die Enzymaktivität wird durch Hydrolyse von 4-Nitrophenylphosphat in 0,5 ml Diethanolamin-Puffer, *p*H 9,8, und photometrische Messung des Enzymproduktes bei 405 nm bestimmt.

Beispiel 12:
Flächenförmige Zelluloseträger (Whatman 540, Filtrak 1389, Filtrak 390, FN 3) werden, wie in Beispiel 6 beschrieben, mit einem Gemisch aus Aminopropyltriethoxysilan und Glycidoxypropyltriethoxysilan aktiviert und anschließend mit ^{125}J-IgG (gerichtet gegen das Enzym alkalische Phosphatase) in zwei Konzentrationen in 0,1 m Phosphat-Puffer, *p*H 6,8, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in einem PBS-Puffer wird die gebundene Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Danach werden die flächenförmigen Zelluloseträger erneut zehnfach mit PBS-Puffer gewaschen und die gebundene Proteinmenge wiederum durch Messung der Radioaktivität unter Mitführen eines Standards bestimmt. Schließlich werden die Zelluloseträger über einen Zeitraum von vier Wochen mehrfach mit HCl-Glycerin-Puffer, *p*H 2,2, 3 m KSCN, Carbonat-Bicarbonat-Puffer, *p*H 10, und PBS-Puffer, 20% Dioxan enthaltend, gewaschen und erneut zur Bestimmung der gebundenen Proteinmenge eingesetzt.
Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle 2
gebundenes ^{125}J-IgG

	Whatman 540	Filtrak 1389	Filtrak 380	FN 3
gebundene Proteinmenge nach dreimaligem Waschen:				
10 µg/ml	2092 ng/cm^2	2143 ng/cm^2	2015 ng/cm^2	2372 ng/cm^2
50 µg/ml	5536 ng/cm^2	6122 ng/cm^2	5867 ng/cm^2	5967 ng/cm^2
gebundene Proteinmenge nach weiteren 10 Waschvorgängen				
10 µg/ml	1888 ng/cm^2	1939 ng/cm^2	1786 ng/cm^2	2092 ng/cm^2
50 µg/ml	5000 ng/cm^2	5612 ng/cm^2	5281 ng/cm^2	5459 ng/cm^2
gebunden Proteinmenge nach vier Wochen				
10 µg/ml	1913 ng/cm^2	1913 ng/cm^2	1786 ng/cm^2	1964 ng/cm^2
50 µg/ml	5102 ng/cm^2	5612 ng/cm^2	5306 ng/cm^2	5281 ng/cm^2

Beispiel 13:
Ein Flächenträger mit papierähnlicher Matrix gemäß der Erfindung wird mit human Immunglobulin G, welches mit ^{125}J radioaktiv markiert ist, in verschiedenen Konzentration und Puffersystemen versetzt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffern, *p*H 7,4, der 0,05% Tween 20 enthält, werden die eventuell noch überschüssigen reaktiven Gruppen mit 1 m Ethanolaminlösung blockiert. Nach erneutem Waschen mit obigen PBS-Puffern wird die gebundene Proteinmenge durch Messung der Radioaktivität ermittelt. Zur Ermittlung möglicher Desorptionen werden die Proben anschließend erneut siebenmal mit PBS-Puffer gewaschen. Die so beladenen Flächenträger werden danach zur Ermittlung der Immunreaktivität mit einem Konjugat bestehend aus einem Kaninchen-anti-human IgG und dem Enzym alkalische Phosphatase versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase durch Hydrolyse von 4-Nitrophenylphosphat in 0,5 ml Diethanolaminpuffer *p*H 9,8 und photometrische Messung des Enzymproduktes bei 405 nm nach Stoppen mit 1 n NaOH oder 1 m EDTA bestimmt. Nach Ausführung des Enzymimmunoassays werden die Flächenträger zweimal mit je 0,5 ml PBS-Puffer gewaschen und nachfolgend in Mehrfachbestimmungen mit einer der folgenden Dissoziationsreagenzien für 1 h bei 4 °C versetzt.
1) PBS-Puffer, 2 m an NaCl, 5% Dioxan enthaltend, 2) 1 m KSCN, 3) 3 m KSCN 4) 4,5 m $MgCl_2$ 5) 1 m NaJ 6) HCl-Glyzin-Puffer *p*H 2,8. Durch alle diese Agenzien werden die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe gespalten, so daß die mit humanem IgG beladenen Flächenträger erneut im Enzymimmunoassay eingesetzt werden können.

Beispiel 14:
Flächenförmige erfindungsgemäße Formkörper (F = 56 mm^2) werden, wie in Beispiel 6 beschrieben, aktiviert und mit humanem Faktor VIII beladen. Diese Träger werden in Polystyrol-Mikrotitrations-Platten oder Polystyrol-Röhrchen überführt und im folgenden der Enzymimmunoassay zur Bestimmung von F VIII-Antigen (W. Schößler, M. Stepanauskas, Chr. Dittrich, H. Heine: Acta biol. med. germ. **41** [1982] 263; W. Schößler, M. Stepanauskas, Chr. Dittrich: Acta biol. med. germ. **41** [1982] 695) in der beschriebenen Art und Weise durchgeführt. Hierzu werden die Formkörper mit einem Inkubationsgemisch, bestehend aus dem zu bestimmenden Plasma und einem im Überschuß vorhandenen Kaninchen-anti-human-Faktor VIII-Antikörper, versetzt und 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer, *p*H 7,4, der 0,05% Tween 20 enthält, werden 200 µl eines Konjugates, bestehend aus einem Hammel-anti-Kaninchen-IgG und einem Enzym alkalische Phosphatase, zugegeben und nach mehrstündiger Inkubation und nachfolgendem Auswaschen die Enzymaktivität, wie in Beispiel 13 beschrieben, bestimmt. Die Abspaltung der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem der in Beispiel 13 angeführten Dissoziationsreagenzien, so daß die im Faktor VIII beladenen Träger erneut im Immunoassay eingesetzt werden können.

Beispiel 15:
Ein erfindungsgemäßer Flächenträger mit papierähnlicher Matrix wird, wie in Beispiel 14 beschrieben, mit humanem Faktor VIII beladen. Dieser Träger dient im folgenden als Modell für screening-Untersuchungen auf (monoklonale) Antikörper. Nach Ausführung der Waschvorgänge, die sich bei diesem Flächenträger besonders einfach gestalten, werden die zu untersuchenden und zu bestimmenden Substanzen mit einem geeigneten Auftragestempel punktförmig aufgetragen. In unserem Fall dienten hierzu geeignete Verdünnungen eines Kaninchen-anti-human-Faktor VIII-Antiserums bzw. eines Kaninchenserums als Negativkontrolle als Antikörperquelle. Nach einer Inkubation von 4–6 h bei 37 °C wird der Flächenträger erneut gewaschen und mit einem Schaf-anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit dem Enzym Peroxydase, 4 h bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur

inkubiert, erneut mehrmals gewaschen und die Enzymaktivität mit einem geeigneten Nachweissystem, so z. B. 4 mM O-Phenylendiamin und 1,5 nM H_2O_2 durch visuelle Auswertung der entstehenden Färbung bestimmt. Eine positive Färbung weist eindeutig auf einen Antikörper hin.

Beispiel 16:
^{32}P-markierte Phosphoproteine, die in Membranvesikeln aus Herzmuskel enthalten sind, werden in dem phosphat-gepufferten Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem nach Weber et a. (K. Weber, J. Pringle, M. Osborn, Meth, Enzymol. **26,** [1972] 3) aufgetrennt. Sofort nach Beendigung der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine auf das erfindungsgemäß aktivierte Papier in einem Triethanolamin und Buttersäure enthaltenden Transfersystem nach Kyhse-Andersen [J. Biochem. Biophys. Meth. **10** [1984] 203) dem Immunoblotting unterworfen. Nach dem Blotting wird in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, die 0,1% Gelatine und 0,05% Tween enthielt, gebadet, anschließend mit einem ersten Kaninchen-Antiserum inkubiert, dem eine Inkubation mit einem Anti-Kaninchen-Immunoglobulin-Meerrettichperoxidase-Konjugat und schließlich die Indikatorrektion folgt. An Stelle des Peroxidase-Konjugats kann mit gleichem Erfolg ein alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet werden.

Beispiel 17:
Die Proteine intrazellulärer Membranen verschiedener Muskelzelltypen werden in einem Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System nach Laemmli (U. K. Laemmli, Nature **227,** [1970] 680) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 20 bis 60 Min. in einer Pufferlösung, bestehend aus 25 mM Triethanolamin-Hydrochlorid, *p*H 8,4, 0,1% Natriumdodecylsulfat, gebadet. Daran schließt sich unmittelbar das Immunoblotting, wie in Beispiel 16 beschrieben, an.