CH 682373 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 682373 A5

(51) Int. Cl.[5]: B 01 J 20/26
// C 07 K 17/08

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 2436/91

(22) Anmeldungsdatum: 19.08.1991

(30) Priorität(en): 25.08.1990 DE 4026992

(24) Patent erteilt: 15.09.1993

(45) Patentschrift veröffentlicht: 15.09.1993

(73) Inhaber:
Röhm GmbH, Darmstadt (DE)

(72) Erfinder:
Klesse, Wolfgang, Dr., Mainz 31 (DE)
Krämer, Dieter, Dr., Mainz (DE)
Petereit, Hans-Ulrich, Darmstadt (DE)
Lehmann, Klaus, Dr., Rossdorf 1 (DE)
Siol, Werner, Dr., Darmstadt-Eberstadt (DE)

(74) Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

(54) Verfahren zur Herstellung von Trägersystemen für biologisch aktive Materialien.

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Trägersystemen zur kovalenten Bindung von biologisch aktivem Material, bestehend aus einem festen Supportmaterial mit polymerbeschichteter Oberfläche, wobei das Polymer die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen enthält, und das Supportmaterial mit einer Mischung einer filmbildenden Polymerdispersion FD und einer nichtfilmbildenden Dispersion NFD beschichtet wird, wobei mindestens eine der beiden Polymerdispersionen die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen besitzt.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Trägersystemen für biologisch aktive Materialien mit kovalenter Bindung an die ploymer-beschichtete Oberfläche der Trägematerialien.

Die Europäische Patentschrift Nr. 0 071 704 stellt «Oberflächenreiche Systeme zur Fixierung von nucleophile Gruppen enthaltenden Substanzen» vor. Die reaktive Einheiten zur Bindung der die nucleophilen Systeme enthalten Substrate sind dabei Bestandteil eines durch Emulsionspolymerisation hergestellten Polymerlatex, der aus 0,03 bis 6 µm grossen Latexteilchen aufgebaut ist und wobei der Polymerlatex selbst zu einem oberflächenreichen System aggregiert und/oder an einem oberflächenreichen Trägermaterial fixiert ist.

Sofern die Verbindung der einzelnen Latexteilchen untereinander nicht durch Filmbildung erfolgt, kann bei der EP-C die Verknüpfung untereinander bzw. zum Träger durch kovalente Bindung geschehen. Gegebenenfalls kann die kovalente Verknüpfung der Latexteilchen auch durch den Einsatz von multifunktionellen Nucleophilen verstärkt werden. Auch der Zusatz untergeordneter Mengen einer weichen, filmbildenden Substanz, z.B. Latexteilchen mit niedrigerer Glastemperatur wird erwähnt. Als besonders bevorzugt hat die Ausfällung mittels der zu fixierenden, biologisch wirksamen Einheiten selbst zu gelten. In der genannten EP werden die funktionellen Gruppen X als Bestandteile von Monomeren $Z'-(R_n)-X$ genau definiert, wobei die Gruppen X im physiologisch sinnvollen pH-Bereich (etwa pH 5,0–9,0), bei Temperaturen unterhalb 40 Grad C und in wässrigem Milieu mit den nucleophilen Gruppen, insbesondere den Amino-, Hydroxy- und Thiolgruppen der zu fixierenden biologisch aktiven Materialien kovalent zu reagieren vermögen.

Die DE-A 2 016 729 sieht ein Verfahren zur Herstellung unlöslicher Enzyme in aktiver Form vor, bei dem ein Mischpolymerisat mit einer Enzymlösung behandelt und eine Quervernetzung des Enzym-Polymerkomplexes und/oder eine Neutralisation der restlichen reaktionsfähigen chemischen Gruppen durchgeführt wird. Die Lehre dieser Offenlegungsschrift umfasst die Auflösung jeglicher Partikelstruktur – soweit von der Herstellung her vorhanden durch Auflösung der Mischpolymerisate in Lösungsmitteln. Damit entfällt die Voraussetzung für das Vorhandensein einer Partikelstruktur bei der Verfilmung. Soweit unlösliche Niederschläge oder Präcipitate den Gegenstand der Lehre bilden, sind sie nicht das unmittelbare Ergebnis des Polymerisationsverfahrens, sondern Folgeprodukte einer (externen) Vernetzung des gebildeten polymeren Materials, welche die Zugänglichkeit eher herabsetzt.

Der Stand der Technik die Immobilisierung von biologisch aktiven Materialien an polymeren Trägern betreffend, ist in nicht wenigen Übersichtsartikeln behandelt worden (vgl. Encyclopädia of Polymer Science and Engineering Vol. 2, pg. 55–59, John Wiley 1985; Characterization of Immobilized Biocatalysts, Ed. K. Buchholz, Dechema-Monographien No. 1724–1731, Vol. 84, Verlag Chemie 1984; Methods in Enzymology, Ed. W.B. Jokoby, Vol. 104, pp 3–369, Academic Press 1984; Biotechnology, Ed. H.J. Rehm & G. Reed, Vol. 7a, pg. 347–464, Verlag Chemie 1987).

In der letztgenannten Literaturstelle wird darauf hingewiesen, dass ungeachtet des grossen Angebots an Immobilisationstechniken keine spezifische Technik für sich in Anspruch nehmen kann, mit idealem Ergebnis universell anwendbar zu sein. Führt die Immobilisation zum Eingebundensein (Entrapment) der biologisch aktiven Einheiten innerhalb der Trägermatrix, dann muss mit erschwerter Zugänglichkeit infolge des Diffussionswiderstands für die Substrate gerechnet werden; ein Effekt, der neben anderen die (scheinbare) Michaeliskonstante deutlich beeinflusst. Das klassische «Entrapping» ist daher wirkungsgemäss begrenzt auf niedermolekulare Substrate und Produkte, bei denen sich der Widerstand gegen den Massentransport in Grenzen hält. Interne Diffusionseffekte spielen verständlicherweise eine massgebliche Rolle, wenn es sich um im Innern eines porenhaltigen Trägersystems fixierte Enzyme handelt. In «Biotechnology» (loc.cit. pg. 353) werden die Vorteile und Nachteile poröser und nicht-poröser Träger einander gegenübergestellt. Bei nicht porösen Trägern wird der Vorteil der geringen diffusionsbedingten Beschränkungen durch den Nachteil der geringen aktiven Oberfläche und in der Folge geringen Enzymbeladung, dem Zwang zur Benutzung kleiner Trägerpartikel und den Schwierigkeiten bei der Handhabung insbesondere im kontinuierlichen Betrieb aufgewogen. Bei porösen Trägern schlägt zwar die grosse innere Oberfläche und hohe Enzymbeladung und der relative Schutz vor externer Wirkungsbeeinträchtigung zu Buche, dagegenzuhalten sind aber die mit der grossen inneren Oberfläche verbundenen Diffusionsproblemen, die hohen Kosten, die u.a. mit der unabdingbaren Kontrolle der Hohlraumdimensionen zu tun haben und gegebenenfalls Flüssigkeits-Druckprobleme, die mit der Tendenz zur Gelbildung zusammenhängen.

Idealerweise sollten die biologisch aktiven Strukturen an einem Träger mit möglichst grosser Oberfläche so fixiert sein, dass möglichst wenige der biologisch aktiven Strukturen von der Wechselwirkung mit den Substraten ausgeschlossen bleiben bzw. dass optimale Zutrittsmöglichkeiten für die Substratmoleküle bestehen. Die Lösung des oben genannten europäischen Patents stellt eine Annäherung an dieses Ideal dar, insofern Träger mit grosser Oberfläche zur Verfügung gestellt werden, welche die Bindungsfunktionen für die Fixierung des biologisch aktiven Materials, insbesondere von Enzymen, Antikörpern usw. in Oberflächennähe aufweisen. Eine ebenfalls interessante Lösung stellt die US-A 4 710 525 dar, die redispergierbare Polymerlatices mit Kern-Schale-Aufbau beschreibt, die in der Schale die funktionellen Gruppen zur kovalenten Fixierung der biologisch aktiven Materialien besitzen. Es bestand dessen ungeachtet die Aufgabe, noch leistungsfähigere polymere Trägersysteme zur kovalenten Fixierung von

biologisch aktiven Materialien zur Verfügung zu stellen, die eine möglichst optimale Nutzung der in der Regel teuren biologisch aktiven Materialien gewährleisten. Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von Trägersystemen zur kovalenten Bindung von biologisch aktivem Material mit polymer-beschichteter Oberfläche, wobei das Polymer die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen enthält, und wobei ein an sich bekanntes Supportmaterial mit einer Mischung einer filmbildenden Polymerdispersion FD und einer nichtfilmbildenden Polymerdispersion NFD beschichtet wird.

Das Supportmaterial

Als Supportmaterialien eignen sich die gemäss dem Stand der Technik entwickelten Träger. (Vgl. Biotechnology, Vol. 7A, loc.cit. pg. 351–367; 411–412; Dechema-Monographien Vol. 84, loc.cit. pg. 49–72). Dabei kommen sowohl anorganische als organische Supportmaterialien in Frage. Als Träger anorganischer Provenienz seien beispielsweise genannt: Aluminiumoxid, Zirkondioxid, Magnesia, Siliciumdioxid, Glas, Mineralien in verschiedenen Modifikationen, z.B. Tone wie Attapulgit, Bentonit, sowie Kieselgur, Bimsstein u.ä., keramische Materialien, Sand, Titandioxid, Metalle, wie z.B. ferromagnetisches Material und zwar in gepfropftem wie im ungepfropftem Zustand. Weiter sind organische Träger-Materialien natürlichen Ursprungs von Bedeutung, wie z.B. Polysaccharide (Cellulose, Dextrane, Stärke, Agar, Agarose, Alginate, Carragenate, Chitin, Chitosan) sowie Proteine wie Collagen, Gelatine, Albumin, Seide u.ä. ferner verschiedene Modifikationen der Kohle.

Als synthetische polymere Träger seien Polystyrol, Polyacrylate und -amide, Maleinsäureanhydrid-Polymere, Vinyl- und Allyl-Polymere und Polyamide genannt. Für die Geometrie der Träger haben sich in der Technik gewisse Präferenzen herausgebildet. Erwähnt sei z.B. die gut zu handhabende Kugelform, etwa mit Durchmesser 1–10 mm, insbesondere um 6 mm. In diesem Zusammenhang sind Polystyrolkugeln besonders bevorzugt. Als beschichtbare Oberflächen im Sinne der vorliegenden Erfindung müssen aber auch diejenigen von Körpern nicht kugelförmiger oder strikt regelmässiger Gestalt betrachtet werden, z.B. von Granulen, Sticks, sowie im Hinblick auf einen hohen Oberflächenanteil z.B. als Katalysatorträger entwickelte Massen, z.B. mit Wabenstruktur, ebenfalls Gefässoberflächen, wie z.B. Glasoberflächen. Ferner Flächengebilde, auf Cellulose oder auch textiler (z.B. Seide)-Basis, z.B. beschichtete Papiere. Im allgemeinen genügen die etablierten Supportmaterialien der Voraussetzung unter den Bedingungen der Fixierung chemisch inert (bzw. in eindeutigem Sinne aktivierbar) zu sein. Bei Anwendung für diagnostische Zwecke empfiehlt sich auch für die vorliegende Erfindung Perlen bzw. Kugeln mit ca. 0,01 bis 10 mm Durchmesser vorzugsweise der Perlbereich 0,1 bis 0,6 mm, sowie die diagnostisch bereits verwendeten Grössen 0,01–10 mm, insbesondere im Bereich 6–7 mm einzusetzen. Auf die Fläche berechnet sollten Flächen des Trägers von 1 mm^2 bis 100 cm^2, vorzugsweise 10 mm^2 bis 10 cm^2 zur Verfügung stehen. Bei Anwendung planer Träger kann von quadratischen oder rechteckigen Formen ausgegangen werden, es können aber auch Rundformen zur Anwendung kommen, z. B. die an sich bekannten Filterplättchen. Auch irreguläre Formen sind möglich.

Als Anforderung, welche die erfindungsgemäss zu verwendenden Trägermaterialien mit denen des Standes der Technik gemeinsam hat, sei erwähnt: Mechanische Stabilität, insbesondere unter Scherbeanspruchung. Die Materialien sollen bei den üblichen Manipulationen wie Filtrieren, Rühren, Schütteln, sowie beim Transport und bei der Lagerung ausreichende Stabilität besitzen und keinen störenden Abrieb entwickeln. Zur Erleichterung der Handhabung ist eine Fixierung in Haltern möglich.

Die Polymerdispersionen

Die Polymerdispersionen und zwar die nichtfilmbildende Dispersion NFD wie die filmbildende Dispersion FD können in an sich bekannter Weise nach den Regeln der Emulsionspolymerisation gewonnen werden. (Vgl. H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, «Acryl- und Methacrylverbindungen» pg. 217–230, Springer-Verlag, 1967, Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 4. Auflage, Bd. 14/1, pg. 133–390, Georg Thieme-Verlag 1961). Die praktische Durchführung kann z.B. in Anlehnung an DE-OS 1 804 159, DE-OS 1 910 488 und DE-OS 1 910 532 erfolgen. Die gewünschte Grösse der Latex-Teilchen wird praktisch durch die Emulgatorkonzentration zu Beginn der Polymerisation eingestellt. Im allgemeinen liegt die Emulgatorkonzentration zu Beginn der Emulsionspolymerisation zwischen 0,005 und 0,5 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Polymerisationsansatz. Es ist auch möglich, die gewünschte Teilchengrösse durch Zusatz einer definierten Menge eines feinteiligen Saatlatex einzustellen. Die Grösse der Latex-Teilchen soll zwischen 0,03 und 6 µm liegen, vorzugsweise zwischen 0,03 und 1 µm. Als Emulgatoren können die bekannten anionischen und nichtionischen Emulgatoren verwendet werden, beispielsweise Fettalkoholsulfate und -sulfonate, -phosphate und -phosphonate, Alkalisalze langkettiger Fettsäuren, langkettige Sarkoside sowie oxäthylierte Fettalkohole, substituierte Phenole, die zum Teil sulfiert sein können, sowie andere in der Emulsionspolymerisation verwendete Emulgatoren (Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. XIV/I, loc.cit). Die Verwendung kationischer Tenside empfiehlt sich nur insoweit als sich diese von tertiären oder quartären Ammoniumsalzen ableiten. Des weiteren können auch einpolymerisierbare Emulgatoren verwendet werden. Als Initiatoren können ebenfalls die allgemein bei Emulsionspolymerisation üblichen verwendet werden (vgl. J. Brandrup, E.H. Im-

mergut, «Polymer Handbook» second Edition, J. Wiley & Sons; H. Rauch-Puntigam, Th. Völker, «Acryl- und Methacrylverbindungen», Springer-Verlag 1967). Genannt seien Peroxide, Hydroperoxide, Persäuren und Azoverbindungen, z.B. Kaliumperoxidisulfat, Wasserstoffperoxid u.a.m. Die Konzentration der Initiatoren liegt in der Regel im üblichen Bereich, beispielsweise bei 0,01 bis 1,0 Gew.-%, bezogen auf die Monomeren. Der Feststoffgehalt der Dispersion kann je nach Teilchengrösse zwischen 10 und 60 Gew.-% liegen.

Die erfindungsgemäss einzusetzenden Polymer-Dispersionen können im Prinzip aus den bekannten, der Emulsionspolymerisation zugänglichen Monomeren aufgebaut sein. Genannt seien z.B. Polymerisate auf Basis von

- Acrylaten bzw. Methacrylaten
- Styrol und Styrolderivaten
- Vinylfettsäureestern wie Vinylacetat, Vinylpropionat,
- Vinylhalogenverbindungen wie z.B. Vinylchlorid, Tetrafluorethylen
- Vinylidenverbindungen sowie Misch-Copolymerisate wie z.B. Copolymerisate des Styrols mit Butadien, Polyvinyliden-Copolymerisate mit Vinylacetat u.a. Im allgemeinen ist die Polymerisation radikalisch initiiert.

Das Molekulargewicht der Polymerisate (Bestimmung durch Gelpermeations-Chromatographie; vgl. Encyclopedia of Polymer Science & Engineering, Bikales, Overberger and Menges, 2nd Ed. Vol. 10, pg. 1–19; J. Wiley 1987) hat sich als nicht eigentlich kritisch erwiesen. Unter praktischen Gesichtspunkten liegen die Molekulargewichte der Polymerisate im Bereich 10 000 bis 2 x 10^6, vorzugsweise oberhalb 50 000. Ein unabdingbarer Bestandteil mindestens eines der verwendeten Polymertypen ist ein Minimum an funktionalen Gruppen X, die zur kovalenten Bindung mit den biologisch aktiven Materialien geeignet sind. Vorzugsweise sind die funktionalen Einheiten X Bestandteil der nichtfilmbildenden Dispersionen NFD. Dabei kann es sich um eine aktivierbare Gruppe (Gruppe X') handeln, die eines zusätzlichen aktivierenden Reagenzes Q bedarf, vorzugsweise ist die funktionale Gruppe X aber unmittelbar zur Reaktion mit nucleophilen Gruppen des biologisch aktiven Materials geeignet, zweckmässigerweise unter Bedingungen, welche biologisch akzeptabel sind, d.h. welche die biologische Aktivität im Endeffekt nicht beeinträchtigen. Als derartige Bedingungen sind z. B. ein physiologisch sinnvoller pH-Bereich des wässrigen Mediums, z. B. der pH-Bereich 5,0–9,0, insbesondere Pufferlösungen, ferner die Abwesenheit von Agentien, welche die biologische Aktivität beeinträchtigen und ein geeigneter Temperaturbereich, der die Inaktivierung der Proteine vermeidet, z.B. unterhalb 60 Grad C, insbesondere unterhalb 40 Grad C zu betrachten.

Am Träger T befindliche Carboxylgruppen können beispielsweise analog den Methoden der Peptidsynthese mit den Aminogruppen der biologisch aktiven Materialen kovalent verknüpft werden, beispielsweise mit der Carbodiimidmethode. Amidfunktionen lassen sich mittels Glutardialdehyd aktivieren oder durch Hydrazinolyse und Diazotierung, letzteres gilt auch für Ester. Auch aromatische Aminogruppen am Träger lassen sich durch Diazotierung aktivieren. Aliphatische Aminogruppen können z.B. mittels Glutaraldehyd, mit D-Cyclopenta-dialdo-1,4-furanose oder mittels Thiophosgen kovalent mit den Aminogruppen des biologisch aktiven Materials verknüpft werden. Für Hydroxygruppen eignet sich die Umsetzung mit halogenierten Triazinen oder mit 1,1'-Carbonyldiimidazol zur Aktivierung und bei Glykol-Konfiguration die Reaktion mit Bromcyan zum Imidocarbonat (Vgl. Biotechnology, Ed. H. J. Rehm & Reed, Vol. 7a, loc.cit). Bevorzugt stellt, wie bereits erwähnt, die Gruppe X eine aktivierte, unmittelbar zur Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der biologisch aktiven Materialen geeignete Funktion dar.

X hat somit vorzugsweise die Bedeutung einer Sulfonsäurehalogenid-, einer Thioisocyanatgruppe, eines aktivierten Esters, einer Thiocarbonyldioxy-, Carbonylimidoyldioxy-, Haloethoxy-, Haloacetoxy-, Oxiran-, Aziridin-, Formyl-, Keto-, Acryloyl- oder Anhydridgruppe. Als Sulfonsäurehalogenide kommen die Chloride und Bromide, als Haloacetoxy die Fluoro-, Chloro- und Bromoverbindungen, als Esterkomponente der aktivierten Ester solche von Hydroxylaminverbindungen, wie des N-Hydroxysuccinimids oder des N-Hydroxyphthalimids, von (mittels elektronenanziehenden Gruppen) aktivierten Phenolen, wie von Halogenphenolen, wie Trichlorphenol oder von Nitrophenolen, von heterocyclischen Lactamen, wie Pyridon in Frage. Besonders bevorzugt sind Oxiran-, Keto-, Formyl-, Sulfonsäurechlorid-, Thioisocyanatgruppen sowie aktivierte Carbonsäureester sowie Carbonsäureanhydride.

Die funktionalen Gruppen tragenden Monomeren entsprechen vorzugsweise der Formel

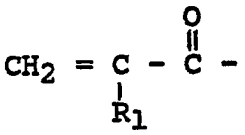
$$Z\text{-}(R)_n\text{-}X$$

worin
X die oben angegebene Bedeutung besitzt
R für einen chemisch inerten Abstandshalter (Spacer) zwischen der funktionalen Einheit und der polymerisierbaren Einheit
n für 0 oder 1 und
Z für eine polymerisationsfähige Einheit steht.

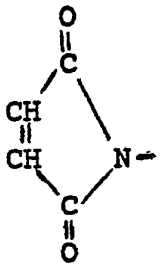
Grösse und Typ des Abstandhalters R sind vergleichsweise unkritisch. Typische Vertreter von derartigen Abstandshaltern sind beispielsweise Alkylengruppen von C_1 bis C_{20}, vorzugsweise C_2 bis C_{12}, wobei gegebenenfalls Kohlenstoffatome durch Ätherbrücken ersetzt sein oder auch Alkylverzweigungen

und/oder Substitution z.B. mit einer Hydroxyfunktion vorliegen können. Vorzugsweise ist jedoch R linear. Darüber hinaus andere ursprünglich (d.h. vor dem Einbau) bifunktionelle Gruppen enthaltende Einheiten, wobei sowohl am polymerständigen als am funktionalen Ende eine Verknüpfung über Amid-, Ester-, Äther-, Thioäther-, Harnstoff-, Urethan-, Sulfonamid- und ähnliche Gruppen erfolgen kann. Im allgemeinen bringt der Abstandhalter eine Distanz der funktionellen Gruppen X von der Polymerhauptkette im Bereich von 0,5–4 nm. In einer Reihe von Beispielen kann die Gruppe R ganz fehlen, d.h. n kann auch den Wert 0 besitzen.

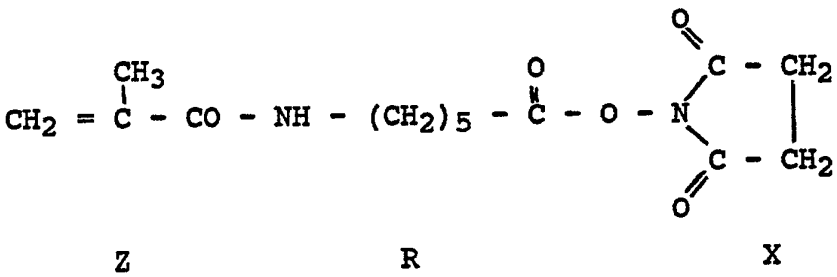
Radikalisch polymerisationsfähige Einheiten I sind z.B. Vinylgruppen wobei Z beispielsweise die Bedeutung



besitzt, worin R_1 für Wasserstoff oder Methyl bzw. für CH_2–$COOR_2$, CH_2–$CONHR_2$ oder CH_2–$CON(R_2)_2$ steht, wobei R_2 einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeutet. Des weiteren kann Z sich von der Maleinsäure ableiten:

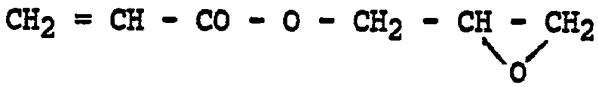


Als reaktionsfähige und zugleich polymerisierbare Einheiten sind ferner Maleinsäureanhydrid und Itaconsäureanhydrid geeignet. Zur Verdeutlichung des Formelschemas Z–R–X seien die folgenden Beispiele aufgeführt:



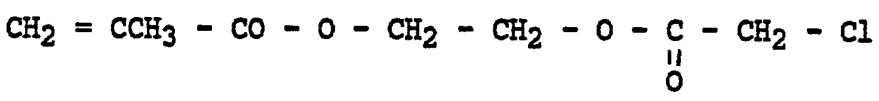
Z R X

(Polymerisierbarer aktivierter Ester mit Spacer)



Z R X

(Glycidylacrylat)



Z R X

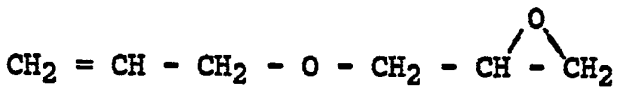
(2-(Chloroacetoxy)-äthylmethacrylat)



(2,4,5-Trichlorphenylmethacrylat) R = O

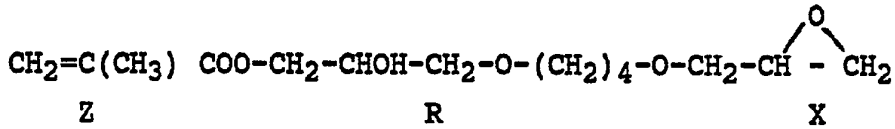


(2-Bromäthylmethacrylat)



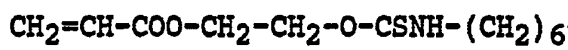
Z R X

(Allylglycidyläther)



Z R X

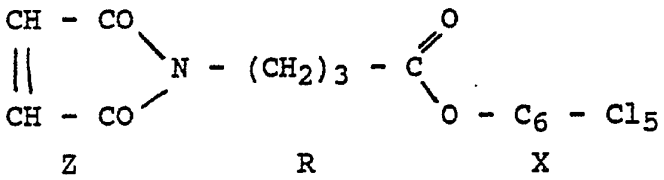
(Anlagerungsprodukt von Methacrylsäure an 1,4-Butandioldiglycidylether)



(Anlagerungsprodukt von Acrylsäure-2-Hydroxyethylester an 1,6-Hexandiisothiocyanat)

$CH_2 = CH - O - CO - CH_2 - Cl$

(Chloressigsäurevinylester)



Z R X

(4-Maleimido-buttersäure-pentachlorphenylester)

$CH_2 = C(CH_3) - COO - C_6H_4 - SO_2 - CH_3$

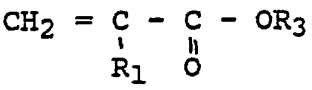
(4-Methylsulfinylphenyl)-methacrylat)

$CH_2 = CH - COO - CH_2 - C \equiv C - H$

(Propargylacrylat)

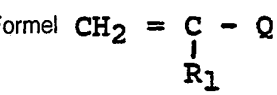
Dispersionen vom Polyacrylattyp

Die Polymer-Dispersionen vom Acrylattyp sind in der Regel aufgebaut aus (Meth)acrylat-Monomeren der Formel



worin R_1 die oben bezeichneten Bedeutungen besitzt und worin R_3 für einen gegebenenfalls verzweigten Alkylrest mit 1–18 Kohlenstoffatomen, insbesondere mit 1–8 C-Atomen oder einem Cycloalkylrest mit 3 bis 12 Ringgliedern steht, speziell einen Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, vor allem einen n-Butyl- oder einen 2-Ethylhexylrest steht. (Vgl. H. Rauch-Puntigam, Acryl- und Methacrylverbindungen, Springer Verlag 1967, pg. 217–230).

Als im wesentlichen hydrophobe Comonomere kommen u.a. Diene wie Butadien, Chlorpropen, Isopren in Frage. Ferner können aktivierte Vinylverbindungen wie Vinylester von Fettsäuren wie Vinylacetat und Vinylpropionat, Vinylether, Allylether und Allylester, Acrolein, Vinylmethylketon, vinylgruppenhaltige Heterocyclen wie Vinylimidazol, Vinylpyrroliden, Vinylpyridin, Vinylcarbazol und Styrol und seine Derivate, insbesondere alkylierte Derivate wie α-Methylstyrol, Vinyltoluol u.ä. copolymerisiert werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, dass die Copolymerisate in (unerwünschte) gruppenbedingte Wechselwirkungen mit den zu fixierenden, biologisch aktiven Materialien treten können. Unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Haptenwirkung kann es z.B. in bestimmten Fällen zweckmässig sein, von der Verwendung aromatenhaltiger Monomeren ganz abzusehen. Im allgemeinen überwiegt der Anteil der oben genannten (Meth)acrylatmonomeren an den die Dispersion FD bzw. NFD vom Acrylattyp bildenden Polymeren. In der Regel beträgt deren Anteil über 50 Gew.-% und – sofern sie nicht-funktionalisierte Polymerkomponenten darstellen – bis zu 99,9 Gew.-%, vorzugsweise bis zu 99 Gew.-%.

Wenigstens eine der beiden Dispersionen FD und NFD enthält die bereits vorstehend beschriebenen Monomeren mit funktionalen Gruppen X oder mit aktivierbaren Gruppen X′. Der Anteil an Monomeren mit funktionalen Gruppen X an den Polymeren der Dispersionen FD bzw. NFD kann 0,1 bis 80 Gew.-% betragen. Im allgemeinen beträgt der Anteil der (Meth)acrylat-Monomeren der obigen Formel 1 bis 40 Gew.-%. Ausser den funktionalisierten Monomeren können die Polymerisate noch andere Comonomere enthalten, z.B. deutlich hydrophile Monomere, insbesondere der Formel  worin R_1 die oben bezeichneten Bedeutungen besitzt und Q für die Reste –CN, $COOR_4$, worin R_4 Wasserstoff-,

Natrium-, Kalium- oder Ammoniumionen bedeutet oder Q für $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NR_5R_6$, worin R_5 und R_6 für Wasserstoff oder für einen R_3 entsprechenden Alkylrest stehen oder unter Einbeziehung des Stickstoffatoms einen, gegebenenfalls noch weiteren Stickstoff oder Sauerstoff enthaltenden, 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus bilden oder für einen gegebenenfalls verzweigten Alkylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen steht, der mindestens eine, vorzugsweise endständige –OH oder $-NR_5R_6$-Gruppe mit den oben bezeichneten Bedeutungen aufweist.

Der Anteil der hydrophilen Monomeren an den Polymerisaten, die gegebenenfalls verbesserte Haftfestigkeit und verbesserte Eignung bei spezialisierten Anwendungen mit sich bringen können, liegt, sofern überhaupt vorhanden, bei 0,5 bis 30 Gew.-%, vorzugsweise bei 1 bis 20 Gew.-% (bezogen auf die eingesetzten Monomeren). Neben den oben beschriebenen Monomerkomponenten können die Polymerisate noch vernetzende Monomere enthalten. Unter «vernetzende Monomeren» werden wie üblich z. B. solche Monomere verstanden, die zwei oder mehrere reaktive Doppelbindungen im Molekül enthalten, wie z. B. mit der Acrylsäure oder vorzugsweise der Methacrylsäure veresterte Di- oder Polyole sowie Allylverbindungen, wie z. B. Allylmethacrylat, Triallylcyanurat u.a. Genannt seien z.B. Ethylenglykoldimethacrylat, 1,4-Butandioldimethacrylat, Triglykoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat. Der Anteil an Vernetzer liegt in der Regel zwischen 0 und 50 Gew.-%, vorzugsweise 2 bis 20 insbesondere 5–20 Gew.-% bezogen auf die Gesamtheit der Monomeren. Der Gehalt der Dispersionen FD bzw. NFD an Polymerisat liegt in der Regel bei 10 bis 60 Gew.-%.

Dispersionen von Polystyroltyp

Die Herstellung von Styroldispersionen ist in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, Bd. XIV/l Georg Thieme Verlag 1961, S. 834–839 ausführlich beschrieben. Als Emulgatoren eignen sich insbesondere die Fettseifen, wie z.B. Natriumoleat, ferner Harzseifen sowie Alkylsulfonate und kationenaktive Emulgatoren, normalerweise in Mengen von 2 bis 6 Gew.-% bezogen auf die Wassermenge.

Als Initiatoren kommen auch hier vor allem wasserlösliche z.B. von Typ der Peroxydisulfatsalze in Frage, ferner Redoxsysteme, gewöhnlich in Mengen von 0,01 bis 0,2 Gew.-%, bezogen auf die Monomeren. Als Regler können die üblicherweise verwendeten, z.B. Schwefelregler angewendet werden, normalerweise in Mengen von 0,05 bis 2 Gew.-% bezogen auf die Monomeren. Vorteilhaft wählt man für die Startreaktion mit Peroxydisulfaten ein schwach saures Milieu (pH 3–6). Vorteilhafterweise bemüht man sich bei der Polymerisation um den Ausschluss von Luftsauerstoff z.B. durch Arbeiten unter einem Schutzgas wie Stickstoff. Als Comonomeren für Styrol bzw. die an sich bekannten radikalisch polymerisationsfähigen Styrolderivaten können die unter «Dispersionen vom Acrylattyp» genannten Monomeren zur Anwendung kommen, wobei sinngemäss die Rolle der (Meth)acrylatmonomeren durch Styrol und/oder seine Derivate übernommen wird und umgekehrt.

So wird im allgemeinen der Anteil an Styrol bzw. Styrolderivaten an den Polymeren mehr als 50 Gew.-% und bis zu 100 Gew.-% betragen. Von Interesse sind insbesondere auch Copolymerisate vom Styrol-Butadientyp. Beim Styrol-Butadientyp kann in bekannter Weise ausgehend von einem 1 : 1 Gew.-Verhältnis durch Variation der Anteile das Eigenschaftsspektrum in Richtung «härter» (höherer Styrolanteil) oder «weicher» verschoben werden. (Vgl. z.B. Houben-Weyl, 4. Auflage, loc.cit. Bd. XIV/l pg. 147, 327).

Dispersionen vom Polyvinylfettsäureester-Typ

Als Monomere dieses Typs kommen solche der Formel

$$CH_2 = \overset{H}{\overset{|}{C}} - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - R_7$$

in Frage, worin R_7 für einen Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, inbesondere 1 bis 2 Kohlenstoffatomen steht, d.h. Vinylacetat und -propionat. Als Comonomere kommen beispielsweise gegebenenfalls halogenierte Olefine wie Ethylen, Vinylchlorid, andere Vinylester wie Vinylphosphonsäurediester, (Meth)acrylate der bereits genannten Art (s. Dispersionen vom Polyacrylattyp) (Meth)acrylnitril u.ä. (Vgl. Houben-Weyl loc.cit, 4. Auflage, Bd. 14/2 pg. 704, Bd. 14/1 pg. 911–918). Die Polymerisation lehnt sich im allgemeinen an die bereits genannten Verfahren an, beispielsweise in bezug auf die Emulgatoren, Initiatoren und Regler. Vorteilhaft ist die Polymerisation im pH-Bereich 4–5. Von besonderem Interesse sind Polyvinyliden-Copolymerisate.

Dispersionen vom Polyvinylhalogentyp

Als Monomere dieses Typs kommen vor allem Vinylchlorid und insbesondere Vinylidenchlorid in Frage (Houben-Weyl, loc cit. pg. 887, 891–905). Als Acrylat-Komponenten seien der Acrylsäuremethylester, -ethylester, -butylester, -octylester, -nonylester, -2-ethylhexylester,-3,5,5-trimethylhexylester sowie der Methacrylsäuremethylester und das Methacrylsäureamid genannt. Im allgemeinen beträgt der Anteil an Comonomeren vom Acrylattyp und/oder an (Meth)acrylnitril, Vinylester (oder Vinylchlorid) bei den Vinyliden-Copolymeren 10–20 Gew.-%, wobei die Erweichungstemperatur i.a auf einen erwünschten Wert sinkt. Auch die Polymerisation der halogenierten Vinylverbindungen schliesst an die bereits erwähnten Verfahrensweisen an. Als Emulgatoren eignen sich insbesondere Alkalisalze von Fettsäuren bzw. Alkyl- oder Acrylsulfonaten sowie nichtionogene Polyethylenoxid-Emulgatoren. Als Initiatoren eignen sich übliche Perverbindungen, insbesondere Redoxinitiatoren.

Die filmbildende Dispersion FD

Die filmbildende Dispersion FD zeichnet sich dadurch aus, dass im Zuge der Trocknung, d.h. während des Verdampfens des flüssigen Mediums, in der Regel eines wässrigen Mediums, die Glastemperatur Tg überschritten wird. Die Glastemperatur Tg ist in erster Näherung mit der Glastemperatur des getrockneten Polymerisats gleichzusetzen, solange das Polymerisat kein hydroplastisches Verhalten zeigt, d.h. aufgrund seiner Zusammensetzung durch Wasser weichgemacht wird.

(Die Glastemperatur Tg eines Copolymerisats lässt sich aus den Beiträgen der Monomeren ableiten. Vgl. R. Vieweg, F. Esser Kunststoff-Handbuch, Bd. IX, Polymethacrylate pg. 333–342, Carl Hanser Verlag 1975; H.F. Mark et al. Ed. Encyclopedia of Polymer Science & Technology Vol. Z, pp 531, 544, John Wiley 1987; T.G. Fox, Bull. Am. Phys. Soc. 1, 123 1956)). Im allgemeinen genügt jedoch die Kenntnis der minimalen Filmbildungstemperatur MFT zur Auswahl geeigneter Polymerdispersionen bzw. der darin enthaltenen Monomeren. Im Einklang mit dem Wissen des Fachmanns (demzufolge die MFT die massgebliche Kenngrösse für die Filmbildungseignung einer Polymerdispersion darstellt, deren Wert (in Grad C) bei der Trocknung überschritten werden muss), ist die MFT der filmbildenden Dispersion FD zweckmässig unter 60 Grad C, vorzugsweise < 40 Grad C, insbesondere < 30 Grad C anzusetzen. Die Bestimmung der MFT wird nach DIN 35 787 vorgenommen. Besonders bevorzugt sind filmbildende Dispersionen FD auf Basis von (Meth)acrylat-Dispersionen, die den oben erläuterten Bedingungen genügen (vgl. Houben-Weyl, 4. Auflage, Bd. XIV/I, loc.cit. pg. 1048). Die filmbildene Dispersion FD kann aus den vorstehend erläuterten Polymerklassen ausgewählt werden, vorausgesetzt, das Polymer genügt den vorstehend dargelegten Regeln. In der Praxis wird die Glastemperatur Tg der Polymeren den Wert 30 Grad C nicht überschreiten, d. h. es handelt sich um relativ «weiche» Polymerisate (Werte für die Glastemperaturen Tg von Homopolymerisaten finden sich z.B. in Brandrup-Immergut, Polymer Handbook, 2nd Ed. J. Wiley). Durch Copolymerisation entsprechender Monomerer lässt sich ein weites Spektrum von Latices mit kontinuierlich abgestuften Filmhärten herstellen.

Besonders genannt seien Dispersionen FD mit folgender Polymerzusammensetzung: Methacrylsäureester von C_1–C_4-Alkoholen, insbesondere Methylmethacrylat in Anteilen von 20 bis 80 Gew.-%, speziell 20–60 Gew.-%, sowie Acrylsäureester von C_1–C_4-Alkohlen in Anteilen von 80 bis 20 Gew.-% bezogen auf die Gesamtheit des Polymeren.

Die nicht-filmbildende Dispersion NFD

Die wässrige nicht-filmbildende Dispersion hat die grundlegende Eigenschaft, dass die Einfriertemperatur der Polymerisate über der Filmbildungstemperatur liegt. Nach üblichem Sprachgebrauch kann man das Polymerisat der nichtfilmbildenden Dispersion als «hart» bezeichnen. Voraussetzung dafür ist das Überwiegen sogenannter «harter» Monomerer, ablesbar an den Erweichungspunkten der Homopolymerisate (vgl. Houben-Weyl, 4. Auflage loc.cit, Bd. XIV/I, pg. 1034). Polymethacrylsäureester sind bekanntlich «härter» als Polyacrylsäureester. Die «Härte» nimmt mit steigender Grösse der Alkoholreste zunächst ab und steigt dann nach dem n-Dodecyl in der Methacrylesterreihe und dem n-Octylester in der Acrylesterreihe wieder an. Als «harte» Monomere haben z.B. das Methylmethacrylat und das Styrol und seine Derivate zu gelten.

Alternativ zu der Anwendung «harter» Monomerer, etwa vom Typ des Methylmethacrylats oder des Styrols und seiner Derivate kann die nicht-filmbildende Dispersion auch so aufgebaut sein, dass an sich «weiche» Monomere mit höheren Gehalten an vernetzenden Monomeren, beispielsweise mit mindestens 5 Gew.-% und bis zu 50 Gew.-% kombiniert werden. Solche Polymerisate bilden keine geschlossenen Filme aus.

Vorzugsweise stellen die nicht-filmbildenden Dispersionen NFD Polymere mit > 60 Gew.-% «harter» Monomerer wie Methylmethacrylat bzw. Styrol und seiner Derivate dar. Der Gehalt der Dispersionen an Polymerisat liegt in der Regel im Bereich 10 bis 60 Gew.-%.

Die nichtfilmbildende Dispersion NFD weist im allgemeinen Teilchengrössen im Bereich von 0,03 bis 5 µ vorzugsweise 0,1 bis 2 µ auf. Die filmbildende Dispersion FD hat im allgemeinen Teilchengrössen im Bereich von 0,02 bis 5 µ, vorzugsweise 0,04 bis 0,5 µ. Die Bestimmung der Teilchengrösse wird mit Hil-

fe der Photonenkorrelationsspektroskopie mit dem Nano-Sizer TDM der Firma Coulter Electronics Ltd, Luton Beds. vorgenommen. Als eine praktische Bemessungsregel kann gelten, dass die Teilchen der nicht-filmbildenden Dispersion jeweils im Durchschnitt um einen Faktor 1,2 bis 20 grösser sein sollen als die der filmbildenden Dispersion, vorzugsweise 1,5- bis 10mal, speziell 2- bis 5mal so gross. Das quantitative Verhältnis der beiden Dispersionstypen bei der erfindungsgemässen Anwendung liegt vorteilhafterweise bei 50:50 Gew.-Teile bis 99 Gew.-Teile nicht-filmbildende Dispersion NFD zu 1 Gew.-Teil filmbildende Dispersion FD, insbesondere 60 Gew.-Teile NFD zu 40 Gew.-Teile FD bis 95 Gew.-Teile NFD zu 5 Gew.-Teile FD, speziell 65 Gew.-Teile NFD zu 35 Gew.-Teile FD bis 90 Gew.-Teile NFD zu 10 Gew.-Teilen FD bezogen auf das trockene Polymerisat. Daraus lässt sich der folgende überraschende Befund ableiten: Der aus theoretischen Betrachtungen abgeleitete Wert für eine sinnvolle Obergrenze der filmbildenden Polymerkomponente (FE-Polymer) im Gemisch liegt bei ca. 26 Vol.-%. (In erster Näherung können für die hier vorliegende Betrachtung Vol.-% und Gew.-% gleichgesetzt werden).

Mit wachsendem Unterschied in der Teilchengrösse ist zu erwarten, dass sich das real existierende System der Idealform der dichtesten Kugelpackung der NFD-Teilchen annähert, wobei die FD-Teilchen in den Zwickeln sitzen. Daher wäre zu folgern, dass mit steigendem Faktor im Verhältnis der Teilchengrösse der Anteil der filmbildenden Komponente unter die theoretisch anzunehmende Grenze von 26 Vol.-% zu senken ist im Interesse der Bildung eines porösen Materials bzw. um das völlige Ausgefülltwerden der geometrisch möglichen Hohlräume zu vermeiden. Faktisch hat es sich aber gezeigt, dass der oben genannte Wert von ca. 26 Vol.-% an FD-Polymer drastisch überschritten werden kann, ohne dass der Ausschluss-Effekt eintritt, vermutlich weil das real existierende System von der Idealform der dichtesten Kugelpackung signifikant abweicht.

Herstellung der Trägersysteme

Die Herstellung der erfindungsgemässen Trägersysteme zur kovalenten Bindung von biologisch aktivem Material geschieht durch Beschichtung des Supportmaterials mit einer Mischung der filmbildenden Polymerdispersion FD und der nicht-filmbildenden Polymerdispersion NFD vorzugsweise in den oben angegebenen Verhältnissen. Die Beschichtung kann in an sich bekannter Weise z.B. durch Sprühen oder Tauchen vorgenommen werden, vorzugsweise im Gemisch, aber auch der Einzelauftrag ist möglich (sequentielles Sprühen).

Besonders bewährt hat sich beispielsweise das Aufbringen des Dispersionsgemisches mittels einer Sprüheinrichtung. Eine besonders günstige Ausführungsform sieht das Versprühen der Dispersionsgemische auf perl- oder kugelförmiges Supportmaterial (s. dort), vorteilhafterweise in einer Dagiertrommel unter gleichzeitiger Zuführung von Luft, vor.

Die Beschichtung kleinerer Teilchen erfordert eine besonders intensive Trocknung, so dass ein Verkleben der Teilchen vermieden wird. Dafür eignen sich spezielle Geräte mit hohem Luftdurchsatz, z.B. Wirbelschichtgeräte oder Coatingapparaturen mit durchlöcherten Trommeln. Für den Überzugsprozess sind die Verfahrensparameter, z.B. Sprühgeschwindigkeit, Zuluftmenge, Zuluftparameter, den jeweiligen Eigenschaften von Kernmaterial und Dispersionsmischung anzupassen.

Ausgehend von einer Definition «Schicht» gleich «Dicke eines Monolayer» haben sich folgende Bemessungsgrenzen bewährt: Ca. eine Schicht bis 1000 Schichten, bevorzugt eine Schicht bis 100 Schichten. Als Daumenregel kann man auch das Verhältnis der Massen von Supportkörper und Beschichtung anwenden, demzufolge ein Massenverhältnis Supportmaterial zu Beschichtung (in getrocknetem Zustand) von 1:50 bis 10 000:1 zu brauchbaren Resultaten führt.

Die biologisch aktiven Materialien

Die biologisch aktiven Materialien, deren Fixierung an festen Trägern unter vielerlei Gesichtspunkten in Wissenschaft und Technik betrieben wird, fallen in viele verschiedene Klassen. So ist beispielsweise eine Einteilung nach chemischen Gesichtspunkten möglich, z.B. nach funktionalen Gruppen, wie in Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, in Nucleoside, Nucleotide und Polynucleotide (Saccharide), wobei – wie ersichtlich wiederum – nieder- und hochmolekulare Verbindungstypen zu unterscheiden wären.

Besonderes Interesse können polymere Verbindungen beanspruchen, an erster Stelle Proteine, Lipoproteine, Polysaccharide, (Mucopolysaccharide) Nucleinsäuren wie DNA und RNA, Lipoide. In vielen Fällen wird durch die Art der funktionalen Gruppen auch die Auswahl der zur Verfügung stehenden Fixierungsmechanismen wie z.B. kovalent, polar (ionisch), komplexchemisch, hydrophob oder durch Occlusion bestimmt. Des weiteren ist eine Einteilung nach der biologischen Wirksamkeit sinnvoll: Danach lassen sich z.B. Biokatalysatoren wie Enzymkomplexe, Blutfaktoren, Hormone (Messenger Substanzen), immunologisch aktive Materialien wie Antigene und Antikörper (z.B. Monoclonale Antikörper) unterscheiden. Weiter sind der Fixierung auch morphologisch (und meist auch funktionell) definierbare Einheiten zugänglich wie Organellen, z.B. Mitochondrien, Viren, ganze Zellen und Zellbestandteile, Zellhybride, z.B. Bakterienzellen, eukariotische Zellen u.ä. Schliesslich bietet sich auch eine Klassifizierung der immobilisierten Materialien nach der vorgesehenen technischen Verwendung an. So ist z.B. ausser der Anwendung von Biokatalysatoren der Einsatz in der Diagnostik und in der (Affinitäts)chromatogra-

phie von Interesse. Die erfindungsgemässen Systeme eignen sich auch hervorragend zur Anwendung im «all sorting» und in der Depletionstherapie. Zweckmässig geht man dabei von einer Modifikation aus, bei der z.B. ein monoclonaler Antikörper oder ein anderer Ligand zum Einsatz kommt, der für die fragliche «Receptorsite» spezifisch ist. Die immobilisierten Biokatalysatoren können z.B. zur Produktion bzw. der Umwandlung sehr verschiedenartiger Substrate wie Aminosäuren, Peptide und Enzyme von Zuckern, organischen Säuren, Antibiotika, Steroiden, Nucleosiden und Nucleotiden, Lipiden, Terpenoiden und organischen Grundchemikalien dienen (vgl. Ullmann 5. Auflage, Bd. 9A, loc.cit. S. 389–390).

Als immunologisch aktive Materialien seien z.B: Mikroorganismen, wie gram-positive und gram-negative Bakterien, Spirochäten, Mycoplasma, Mycobacterien, Vibrionen, Actinomyceten, Protozoen, wie intestinale Protozoen, Amöben, Flagellaten, Sporozoen, intestinale Nematoden und Gewebenematoden (Würmer), Trematoden (Schistosomen, Egel), Cestoden, Toxoplasma, sowie Pilze, wie Sporotrichum, Cryptocoecus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides, Candida, Viren und Rickettsien, wie Hunde-Hepatitis, Shope-Pappillome, Influenza A + B, Hühnerpest, Herpes-Simplex, HIV, Adenoviren, Polyane, Rous-Sarkom, Impfpocken, Poliovirus, Masern, Hundestaupe, Leukämie, Mumps, Newcastle-Krankheit, Sendai, ECHO, Maul- und Klauenseuche, Psittacosis, Rabies, Ectromelia, Baumviren, weiter Gewebe-Antigene, Enzyme, wie Pancreas-Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase, Glucose-Oxidase, Lactatdehydrogenase, Uricase, Aminosäure-Oxidase, Urease, Asparaginase, Proteasen, Blutzellen-Antigene, Blutgruppensubstanzen und andere Isoantigene, wie Blutplättchen, Leucozyten, Plasma-Proteine, Milch-Proteine, Speichel-Proteine, Urin-Proteine, Antikörper einschliesslich Auto-Antikörper genannt. Erwähnt seien insbesondere monoklonale Antikörper, die gegen Antigene beispielsweise der folgenden Art gerichtet sind.

Antigen-Klassen	antigen
Bakteriell	Tetanus-Toxoid
	H. influoenza Typ b Polysaccharid
	Diphterie-Toxin
	Chlamydia trachomatis
	M.leprae
	Lipopolysaccharid/Endotoxin
	Pneumokokken
	LPS von P.aeruginosa
	Exotoxin von P.aeruginosa
	Streptokokken Gruppe A Kohlehydrat
Viral	X31 Influenza-Virus-Nukleoprotein
	Masern-Virus
	HSV Glykoprotein D
	Masern-Virus, Nukleocapsid
	Zytomegalie-Virus
	Influenza A-Viren
	Röteln-Virus-Antigene
	HTLV I
	Varizella-Zoster
	HBsAg

(Fortsetzung)

Antigen-Klassen	antigen
Autoimmun	doppelsträngige DNA
	Inselzellen (Diabetes mellitus)
	Myasthenia gravis, Antiidiotypen
	Thyreotropin-Rezeptor
	Rheuma-Faktor
	Acetylcholin-Rezeptor
	Schilddrüse
	Sperma
Tumor	Mamma-Ca
	Prostata-Ca
	Lungen-Ca
	Magen-Ca
	Melanom
	BD2 (humanes Melanom)
	Gliom
	Rectum-Ca
	Leukämie
	Cervix-Ca
Gewebe/Blut	Rhesus D
	Blutgruppenantigen A
	HLA-A, B, C, DR
	Intermediäre Filamente
Andere	Malaria
	Forssman-Antigen
	Schaferythrozyten
	Nitrophenol
	Dinitrophenol
	Trinitrophenol
	Keyhole limpet hemocyanin (KLH)
	Rheumafaktor
	Insulin

Besonders genannt seien die Immunoglobuline aller Klassen, speziell die oligomeren Typen, insbesondere IgM, IgE und IgA

Die Fixierung der biologisch aktiven Materialien
-kovalente Fixierung

Die kovalente Fixierung der biologisch aktiven Materialien setzt das Intaktsein der reaktiven Gruppen X in den Polymerisaten der Dispersionen FD und NFD und somit eine entsprechend schonende Herstellung und Handhabung voraus. Eine solche schonende Herstellung wird z.B. in der EP-A 0 071 704 beschrieben.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

BEISPIELE

Beispiel 1

a) Herstellung eines Saatlatex für Polymerdispersionen

Saatlatex A

In einem 2-1-Polymerisationsgefäss, ausgestattet mit Rückflusskühler, Rührer und Thermometer gibt man

2,90 g	Methylmethacrylat
2,90 g	Isobutylmethacrylat
0,30 g	Glykoldimethacrylat
3,60 g	Ammoniumperoxydisulfat
0,72 g	Natriumlaurylsulfat

in 1482 g doppeldestilliertes Wasser und erwärmt auf 80 Grad C. Zu diesem Gemisch gibt man eine Mischung aus

171,00 g	Methylmethacrylat
171,00 g	Isobutylmethacrylat
18,00 g	Glykoldimethacrylat

bei 80 Grad C während 2 Stunden tropfenweise unter Rühren zu. Das Rühren bei 80 Grad C wird noch zusätzlich 2 Stunden lang fortgesetzt. Dann wird das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Man erhält eine Dispersion, die im wesentlichen frei von Koagulat ist mit einem Feststoffgehalt von ca. 20 Gew.-%, einer Viskosität (bestimmt nach DIN 53 018) von 4 mPa s und einem durchschnittlichen Partikelradius von 120 nm (bestimmt mit «Coulter Nanosizer»).

b) Herstellung eines Saatlatex für Polymerdispersionen

In einem Witt'schen Topf wurde die Vorlage unter Rühren auf 80 Grad C erhitzt, der Initiator (Ammoniumperoxodisulfat oder das Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure) zugegeben und anschliessend der Zulauf als Emulsion oder Monomerengemisch innerhalb einer bestimmten Zeit zudosiert. 15 min nach Zulaufende wurde die Dispersion auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

Saatlatex B

Vorlage:	1478,0 g	Wasser
	2,9 g	Isobutylmethacrylat
	2,9 g	Methylmethacrylat
	0,3 g	Glykoldimethacrylat
	3,6 g	Ammoniumperoxidsulfat
Zulauf:	168,1 g	Isobutylmethacrylat
(Über 20 min)	168,1 g	Methylmethacrylat
	17,7 g	Glykoldimethacrylat

Feststoffgehalt: 21,1 Gew.-%; pH = 2,4; Viskosität: 5 mPa s; Teilchendurchmesser: 480 nm

Saatlatex C

Es wurde verfahren wie in Beispiel 1b) nur:

Vorlage:	1485,0 g	Wasser
	0,72 g	Natriumlaurylsulfat
	3,6 g	Ammoniumperoxodisulfat

Feststoffgehalt: 21,4 Gew.-%; pH 2,3; Viskosität: 5 mPa s; Teilchendurchmesser: 270 nm

Saatlatex D

Vorlage:	427,0 g	Wasser
	540,0 g	Saatlatex B
	9,0 g	Titrisol-Lösung pH 7 (Merck)
	0,35 g	4,4'-Azobis-(4-canovaleriansäure), Na-Salz
Zulauf:	585,0 g	Wasser
	0,88 g	Natriumlaurylsulfat
	2,12 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	119,7 g	sobutylmethacrylat
	119,7 g	Methylmethacrylat
	12,6 g	Glykoldimethacrylat

Feststoffgehalt: 21,2 Gew.-%, pH = 6,2, Viskosität: 5 mPa s, Teilchendurchmesser: 730 nm.

Beispiel 2

Herstellung der filmbildenden Polymerispersion FD mit Epoxygruppen als funktionalen Gruppen X.
Zu einem 2-1-Polymerisationsgefäss mit Rückflusskühler, Rührer und Thermometer wird eine Lösung, bestehend aus

7,50 g	Phosphatpuffer, pH = 7,0
0,29 g	Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano)-Valeriansäure
0,48 g	Natriumlaurylsulfat
150,00 g	eines Saatlatex gemäss Beispiel 1 (= Saatlatex A)
275,00 g	destilliertes Wasser

hergestellt und auf 80 Grad C erwärmt.
Zu dieser Lösung gibt man tropfenweise und unter Rühren eine Emulsion bestehend aus

210,00 g	Ethylacrylat
75,00 g	Methylmethacrylat
15,00 g	Glycidylmethacrylat
1,76 g	Natriumsalze der 4,4'-Azobis-(4-Cyano)valeriansäure
0,73 g	Natriumlaurylsulfat und
933,00 g	destilliertes Wasser bei 80 Grad C innerhalb 4 Std.

Die Dispersion rührt man weitere 15 Minuten, lässt auf Raumtemperatur abkühlen und filtriert. Man erhält eine völlig koagulatfreie Dispersion mit einem Feststoffgehalt von ca. 20 Gew.-%, einem pH-Wert von 7,0, einer Viskosität von 6 mPa s und einem durchschnittlichen Partikelradius von ca. 240 nm.

Beispiel 3

Herstellung einer nicht-filmbildenden wässrigen Polymerdispersion NFD mit Epoxygruppen als funktionalen Gruppen X.

In ein Polymerisationsgefäss wie in Beispiel 1 beschrieben gibt man ein Gemisch aus

7,50 g	Phosphat-Puffer pH = 7,0
0,29 g	Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano)-Valeriansäure
30,00 g	Saatlatex A gemäss Beispiel 1 und
340 g	doppelt destilliertes Wasser und erwärmt auf 80 Grad C. Zu dieser Mischung gibt man während 4 Stunden bei 80 Grad C eine Emulsion, hergestellt aus
180,00 g	Methylmethacrylat
105,00 g	Ethylacrylat
15,00 g	Glycidylmethacrylat
1,76 g	Natriumsalz der 4,4'-Azobis-(4-cyano)-Valeriansäure
0,73 g	Natriumlaurylsulfat
865,00 g	doppelt destilliertes Wasser

Die Dispersion wird weitere 15 Minuten bei 80 Grad C gerührt, wird dann auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Man erhält eine koagulatfreie Dispersion mit einem Feststoffgehalt von ca. 20 Gew.-% und einen pH-Wert von 7,0, einer Viskosität von 6 mPa s und einen Partikel-Radius von ungefähr 400 nm.

Beispiel 4

Herstellung einer filmbildenden Polymerdispersion FD mit Epoxygruppen als funktionalen Gruppen X

Vorlage:	272,0 g	Wasser
	0,48 g	Natriumlaurylsulfat
	7,5 g	Titrisol-Lösung pH 7 Merk
	150,0 g	Saatlatex C
	0,29 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure) Na-Salz
Zulauf:	932,0 g	Wasser
über 240 min)	0,73 g	Natriumlaurylsulfat
	1,76 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	210,0 g	Ethylacrylat
	75,0 g	Methylmethacrylat
	15,0 g	Glycidylmethacrylat

Feststoffgehalt: 20,2 Gew.-%, pH = 7,3; Viskosität 5 mPa S; Teilchendurchmesser 560 nm, MFT: 5 Grad C.

Beispiel 5

Herstellung einer nichtfilmbildenden Polymerdispersion NFD mit Epoxygruppen-haltigen funktionalen Gruppen X

Der Zulauf besteht aus Emulsion 1 und Emulsion 2 im Verhältnis 70:30, die nacheinander zugetropft werden.

Vorlage:	407,0 g	Wasser
	9,0 g	Titrisol-Lösung, pH 7 (Merck)
	36,0 g	Saatlatex C
	0,35 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
Emulsion 1:	726,0 g	Wasser
(über 168 min)	0,61 g	Natriumlaurylsulfat
	1,48 g	4,4-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	163,8 g	Methylmethacrylat
	75,6 g	Ethylacrylat
	12,6 g	Allylmethacrylat
Emulsion 2:	311,0 g	Wasser
(über 72 min)	0,27 g	Laurylsulfat
	0,64 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	64,8 g	Ethylacrylat
	43,2 g	Glycidylmethacrylat

Feststoffgehalt: 20,8 Gew.-%, pH:7,3; Viskosität: 5 mPa s; Teilchendurchmesser: 760 nm, MFT > 50 Grad C.

Beispiel 6

Herstellung einer filmbildenden Polymerdispersion FD

Vorlage:	560,0 g	Wasser
	1,12 g	Natriumlaurylsulfat
	0,98 g	4,4'-Azobis-(4'-cyanovaleriansäure), Na-Salz
Zulauf:	860,0 g	Wasser
(über 240 min)	4,2 g	Natriumlaurylsulfat
	0,98 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	420,0 g	Ethylacrylat
	180,0 g	Methylmethacrylat

Feststoffgehalt: 28,7, Gew.-%, pH = 6,7; Viskosität : 6 mPa s, Teilchendurchmesser: 82 nm, MFT: 8 Grad C.

Beispiel 7

Herstellung einer nicht-filmbildenden Polymerdispersion NFD

Vorlage:	1411,0 g	Wasser
	37,5 g	Titrisol-Lösung, pH 7 (Merck)
	1200,0 g	Saatlatex D
	1,18 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz

Nach Zugabe des Initiators wird zuerst innerhalb von 120 min eine Emulsion bestehend aus

	1830,0 g	Wasser
	2,92 g	Natriumlaurylsulfat
Zulauf 1	5,29 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	313,5 g	Isobutylmethacrylat
	313,5 g	Methylmethacrylat
	33,0 g	Glykoldimethacrylat

zugetropft und dann innerhalb von 60 min gleichzeitig a) ein Monomergemisch aus

	126,0 g	Glycidylmethacrylat
	102,0 g	Methylmethacrylat
	12,0 g	Glykoldimethacrylat und
b) eine Lösung aus)	601,0 g	Wasser
(Zulauf 2	60,0 g	Methacrylamid
	1,77 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz

Feststoffgehalt: 20,8 Gew.-%, pH = 7,7, Viskosität: 5 mPa s, Teilchendurchmesser: 1120 nm; MFT > 60 Grad C.

Beispiel 8

Herstellung einer nicht-filmbildenden Polymerdispersion NFD
Der Zulauf besteht aus Emulsion 1 und Emulsion 2 im Verhältnis 4:1, die nacheinander zugetropft werden.

Vorlage:	559,0 g	Wasser
	0,42 g	Natriumlaurylsulfat
	0,98 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
Emulsion 1: (über 192 min)	679,0 g	Wasser
	3,36 g	Natriumlaurylsulfat
	0,78 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	456,0 g	Methylmethacrylat
	24,0 g	Allylmethacrylat
Emulsion 2: (über 48 min)	177,0 g	Wasser
	0,84 g	Natriumlaurylsulfat
	0,2 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	84,0 g	Ethylacrylat
	36,0 g	Methylmethacrylat

Feststoffgehalt: 29,6 Gew.-%, pH: 6,7; Viskosität 5 mPa s, Teilchendurchmesser: 204 nm, MFT > 50 Grad C.

Beispiel 9

Herstellung einer filmbildenden Polymer-Dispersion FD

Vorlage:	560,0 g	Wasser
	1,12 g	Natriumlaurylsulfat
	0,98 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
Zulauf: (über 240 min)	860,0 g	Wasser
	4,2 g	Natriumlaurylsulfat
	0,98 g	4,4'-Azobis-(4-cyanovaleriansäure), Na-Salz
	420,0 g	Ethylacrylat
	180,0 g	Methylmethacrylat

Feststoffgehalt: 28,7 Gew.-%, pH:6,7, Viskosität: 6 mPa s, Teilchendurchmesser: 82 nm, MFT: 8 Grad C.

Beispiel 10

Herstellung einer filmbildenden Polymerdispersion FD
In einem Witt'schen Topf werden

920 g	Wasser
29 g	eines ethoxylierten Isononylphenol (Ethoxylierungsgrad 100)
346 g	Ethylacrylat
146 g	Methylmethacrylat und
6 g	Methacrylsäure

vorgelegt und die Apparatur mit N_2 gespült. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,5 g Ammoniumperoxidisulfat, 0,7 g Natriumpyrosulfit und 0,01 g Eisen-(II)-Sulfat ausgelöst. Nach Überschreiten der Temperaturspitze wurde auf 40 Grad C abgekühlt und

100 g	des oben genannten Emulgators
346 g	Ethylacrylat
146 g	Methylmethacrylat und
6 g	Methacrylsäure

zugefügt und die Polymerisation durch Zusatz von 0,7 g Natriumpyrosulfit und 0,5 g Ammoniumperoxodisulfat erneut ausgelöst. Nach Überschreiten des Temperaturmaximums wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und mit Wasser auf 30% F.G. verdünnt.
Feststoffgehalt: 30%, Teilchendurchmesser: 160 nm, Viskosität: 20 mPa s, MFT: 7 Grad C

Beispiel 11

Herstellung der anwendungsfähigen Mischungen aus filmbildender Dispersion FD und nichtfilmbildender Dispersion NFD.
Anwendungsfähige Mischungen erhält man durch Mischen der Polymerdispersionen aus den Beispielen 2 und 3 in Verhältnissen (angegeben in Gew.-%) die aus den folgenden Tabellen 1–7 zu entnehmen sind. 34 ml der Dispersions-Mischungen werden mit entionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 200 ml verdünnt.

Beispiel 12

Beschichten von Polystyrol-Perlen mit einer Polymersuspension

a) Das Sprühaggregat wird mit 6–8 ml der anwendungsfähigen Mischungen aus Beispiel 11 gefüllt.
b) Ein Dragierkessel (Durchmesser 145 mm, zwei Verteilerplatten) wird mit 150 Polystyrolkugeln

(Spherotech-Kugeln bezogen von Spherotech-Vertriebs GmbH, Fulda, Bundesrepublik Deutschland) mit einem Durchmesser von 6,35 mm beschickt. Die Rotation des Kessels lief mit 50–70 rpm an, wobei 5–7 ml der anwendungsfähigen Mischung auf die Kugeln aufgesprüht werden, während sie innerhalb des Dragierkessels in Bewegung waren. Der Sprühprozess wurde bei Raumtemperaturen während ca. 30 Minuten durchgeführt, währenddessen wird ein nichtgeheizter Luftstrahl (elektr. Fön) in den Dragierkessel geblasen um die Feuchtigkeit zu verdampfen.

c) nach Abschluss des Beschichtungsschritts werden die beschichteten Perlen in einer geschlossenen Polystyrol-Flasche bei –15 Grad C aufbewahrt bis zu ihrer Anwendung z.B. zur Immobilisierung von Antikörpern.

Analog werden auch anorganische Granulate, beispielsweise aus Calciumcarbonat, Aluminiumoxid, Titandioxid, Aerosil® mit ähnlich gutem Erfolg beschichtet.

Beispiel 13

Immobilisierung von monoclonalen Antikörpern an mit den Dispersionen NFD/FD beschichteten Polystyrolperlen.

a) 1 000 ug eines monoclonalen Antikörpers aus der Maus (gerichtet gegen ein menschliches Polypeptid-Hormon vom Molekulargewicht ca. 30 000) wurden in 20 ml einer 0,3 molaren Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH = 8,0) gelöst.

b) Diese Antikörper-Präparation wird auf 100 in einem Becherglas befindliche beschichte Perlen gemäss Beispiel 1 aufgebracht.

c) Man lässt dieses Gemisch bei 23 Grad C über Nacht stehen ohne Bewegung.

d) Der wässrige Anteil dieses Gemischs wird durch Vakuum-Absaugen entfernt und die zurückbleibenden Perlen werden dreimal mit je 80 ml PBS (Standardpuffer, mit Kochsalzzusatz pH = 7,2) gewaschen. Der Waschvorgang besteht in fünfminütigem schwachem Schütteln, gefolgt vom Absaugen der wässrigen Phase, wobei die Perlen in dem verwendeten Gefäss zurückbleiben.

e) Nach dem dritten Waschgang gibt man 20 ml einer Pufferlösung die 1 Gew.-% an Serum-Albumin in PBS (pH = 7,2) enthält, auf die Perlen auf. Diese Mischung lässt man über Nacht bei 23 Grad C ohne zu schütteln stehen.

f) Das Waschen erfolgt wie unter b) beschrieben.

g) Die beladenen Perlen bewahrt man im Kühlschrank bei +5 Grad C auf bis zum Gebrauch.

Beispiel 14

Radio-immunometrische Bestimmung des Antigens (menschliches Polypeptid-Hormon, Molgewicht ca. 30 000).

a) Die Polystyrolkugeln, die gemäss Beispiel 13 gewonnen worden waren, werden in Teströhrchen mit Kalotten-Boden (9,6 mm Durchmesser) abgefüllt und zwar eine Perle pro Reagenzglas.

b) Dazu gibt man 100 µl eines radioaktiven Tracers (verschiedener monoclonaler Antikörper, der gegen das oben genannte Antigen gerichtet ist, und mit ^{125}J markiert wurde in der Grössenordnung von ca. 50 000 Counts per minute).

c) Unmittelbar nach der Zugabe des Tracers gibt man 100 µl des Antigens zu in den untenstehend (s. Tabelle) angegebenen Konzentrationen.

d) Die Mischung wird bei Raumtemperatur (21 Grad C) mittels einer Orbital-Schüttelmaschine bei 300 Umdrehungen pro Minute 3 Stunden lang geschüttelt.

e) Der wässrige Anteil des Inkubations-Ansatzes wird durch Vakuum-Absaugen beseitigt.

f) Jedes Reagenzglas mit seiner Perle wird dreimal mit je 1 ml Pufferlösung gewaschen (2 Gew.-% Rinderserum-Albumin in 0,2 molarem Tris-Puffer vom pH 8,5 und 1,2 Gew.-% an RTween-20-Emulgator)

g) Die Teströhrchen werden in einem Gamma-Szintillationszähler ausgezählt (Typ Multi Crystal Gamma Counter LB 2103).

Die so erhaltenen Resultate sind in den Tabellen 1–7 (s. unten) wiedergegeben.

Diskussion der Resultate:

Wie die Werte in den Tabellen 1–7 zeigen, ergibt das erfindungsgemässe Überziehen der Polystyrolkugeln bzw. -perlen mit dem Gemisch der Dispersionen FD und NFD eine erhebliche Verbesserung nämlich einen Abfall des Variationskoeffizienten parallel zu einem gewissen Anstieg (9585 cpm:16636 cpm) im Bereich der Testergebnisse bei den höchsten angewendeten Konzentrationen.

Bei den niedrigen Konzentrationen des Analyten schlägt sich hingegen der Unterschied zwischen der Beschichtung mit ausschliesslich der filmbildenden Dispersion FD gegenüber dem Gemisch aus filmbildender und nichtfilmbildender Dispersion NFD nicht in einem deutlichen Anstieg der Testempfindlichkeit nieder.

Die besten Ergebnisse ergeben Perlen, die erfindungsgemäss mit dem Latex aus einem Dispersionsgemisch, das 10–20 Gew.-% der filmbildenden Dispersion FD enthält, beschichtet sind.

Verglichen mit nichtbeschichteten Polystyrol-Perlen (die als Stand der Technik zu gelten haben) weisen mit dem Gemisch der filmbildenden Dispersion FD und nicht-filmbildenden Dispersion NFD beschichtete Polystyrol-Perlen einen mindestens vierfachen Anstieg der gemessenen Counts-per-minute (cpm)-Werte im unteren und mittleren Konzentrationsbereich des Analyten auf, der sogar noch bis in die zweithöchste Konzentration hineinreicht. Selbst bei der höchsten Konzentration ergibt sich ein Anstieg der gemessenen cpm-Werte um den Faktor ca. 2,5. Der erfindungsgemäss erzielte Fortschritt in der Technik des Festkörper-Immunoassays kann somit als eindeutig nachgewiesen gelten.

Tabelle 1: Ergebnisse mit unbeschichteten Polystyrol-Perlen

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
0,6			
0,0	3,3	157,8%	0
9,3			
11,8			
17,0	11,9	43,0%	0,016
6,8			
23,2			
30,7	22,4	39,3%	0,062
52,4			
52,3	56,9	13,8%	0,218
56,9			
213,7			
205,6	204,2	5,1%	0,700
193,1			
1299,8			
750,0	929,6	43,5%	2,980
738,8			
2891,3			
2724,6	3089,9	16,1%	11,80
10872,2			
11561,9	9585,7	29,6%	50,80
6322,9			

Tabelle 2: Ergebnisse mit unbeschichteten Polystyrol-Perlen, die nur mit der nicht-filmbildenden Dispersion NFD (gemäss Beispiel 3) beschichtet wurde.

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
23,6			
22,4	28,8	21,3%	0
29,3			
52,3			
47,1	44,8	20,0%	0,016
34,8			
93,5			
87,9	90,1	3,4%	0,062
88,9			
269,4			
278,2	274,6	1,7%	0,218
276,2			
889,6			
853,6	882,4	3,0%	0,700
904,0			
3227,2			
3226,7	3242,5	0,7%	2,980
3233,4			
10768,1			
11230,9	11016,4	2,2%	11,80
11051,1			
23203,6			
23339,7	23266,7	0,3%	50,80
23258,4			

Tabelle 3: Ergebnisse mit Polystryrol-Perlen, die mit einem Gemisch aus den Dispersionen NFD (gmäss Beispiel 3) und DS (gemäss Beispiel 2) im Verhältnis 90:10 Gew.-% beschichtet werden.

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
19,7			
23,6	24,0	18,7%	0
28,6			
66,8			
68,9	64,4	9,6%	0,016
57,4			
133,6			
124,2	125,0	6,7%	0,062
117,0			
371,3			
345,5	360,5	3,8%	0,218
364,6			
1108,7			
1151,4	1127,4	2,0%	0,700
1121,0			
4165,3			
4076,9	4148,6	1,6%	2,980
4203,4			
13811,1			
14083,3	13998,1	1,2%	11,80
14100,2			
27782,0			
28631,9	28598,4	2,8%	50,80
29383,4			

Tabelle 4: Ergebnisse mit Polystyrol-Perlen, die mit einem Gemisch der Dispersionen NFD und FD im Gew.-Verhältnis 80:20 beschichtet worden waren. (Vgl. Beispiele 2 und 3.)

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
24,7			
24,6	28,4	22,7%	0
35,8			
51,4			
58,7	55,7	6,8%	0,016
56,8			
117,0			
115,4	114,7	2,5%	0,062
111,6			
350,3			
348,8	345,2	2,3%	0,218
336,3			
1054,3			
1044,9	1074,7	4,1%	0,700
1124,7			
3981,6			
3904,3	3941,7	1,0%	2,980
3940,4			
13249,4			
12887,8	13070,7	1,4%	11,80
13074,8			
27895,8			
29123,3	28372,2	2,4%	50,80
28097,4			

Tabelle 5: Ergebnisse mit Polystyrol-Perlen, die mit einem Gewicht aus je 50 Gew.-% der Dispersionen FD und NFD beschichtet wurden. (Vgl. Beispiele 2 und 3.)

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
78,6			
28,9	46,7	46,7%	0
32,6			
57,3			
52,9	55,7	5,2%	0,016
57,3			
99,8			
104,6	104,8	4,8%	0,062
109,8			
338,1			
322,2	327,4	2,9%	0,218
321,9			
982,4			
1006,4	1012,4	3,3%	0,700
1048,2			
3531,1			
3741,1	3673,7	3,4%	2,980
3749,6			
12408,6			
12242,5	12371,6	0,9%	11,80
12463,8			
26464,6			
26530,6	26944,0	2,9%	50,80
27838,8			

Tabelle 6: Ergebnisse mit Polystyrol-Perlen, die mit einem Gemisch aus den Dispersionen FD und NFD im Gewichtsverhältnis 80:20 beschichtet wurden. (Vgl. Beispiele 2 und 3.)

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
18,7			
27,6	26,4	27,3%	0
33,0			
47,6			
54,8	52,9	8,9%	0,016
56,3			
103,9			
95,9	98,2	5,1%	0,062
94,8			
304,7			
294,0	300,8	2,0%	0,218
303,7			
865,8			
870,4	885,2	3,4%	0,700
919,3			
3396,1			
3231,9	3317,7	2,5%	2,980
3326,0			
11132,8			
10865,5	10965,4	1,4%	11,80
10899,1			
22130,6			
22364,9	22269,8	0,6%	50,80
22313,9			

Tabelle 7: Ergebnisse mit Polystyrol-Perlen, die ausschliesslich mit der Dispersion FD gemäss Beispiel 2 beschichtet wurde.

cpm Messungen nach 5 min.	Durchschnitt	Variationskoeffizient	Konzentration Antigen (ng/ml)
41,4			
27,6	36,3	20,9%	0
39,9			
42,9			
49,8	46,8	7,6%	0,016
47,6			
90,9			
75,1	78,3	14,6%	0,062
68,8			
241,8			
243,6	238,3	3,3%	0,218
229,5			
698,9			
663,8	706,9	6,8%	0,700
757,8			
2747,1			
2700,0	2663,4	4,1%	2,980
2543,3			
8310,1			
8138,1	8124,4	2,4%	11,80
7925,8			
17829,9			
15204,7	16556,0	8,0%	50,80
16635,9			

Beispiel 15

Überziehen des inerten Trägermaterials in Form von Polymerperlen

700 g PMMA-Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengrösse von 310 µm wird im Wirbelschichtgerät (Uniglatt, Fa. Glatt) mit folgender Dispersionmischung überzogen:

Nichtfilmbildende Dispersion gemäss Beispiel 7 und	1225 g
filmbildende Dispersion gemäss Beispiel 10 (auf 20% Trockensubstanz verdünnt)	525 g
	1750 g

Verhältnis Kern/Schale = 2:1

Verfahrensbedingungen:	
Sprühdruck:	1,8 bar
Zulufttemperatur:	40 Grad C
Ablufttemperatur:	23–25 Grad C
Sprühgeschwindigkeit:	8,75 g/min

Das erhaltene Produkt wird 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Es ist freifliessend, nach einer Teilchengrössenanalyse mittels Rüttelsieb liegen 81,4 % (Gew.) der Ausbeute im Bereich von 0,3–0,6 mm.

Aktivität nach Bindung von Trypsin:	
BAEE:	0,7 U/g
Casein:	0,3 U/g

Beispiel 16

Überziehen des inerten Trägermaterial in Form von Polymerperlen

900 g PMMA-Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengrösse von 310 µm wird im Wirbelschichtgerät (Uniglatt, Fa. Glatt) mit folgender Dispersionmischung überzogen.

Nichtfilmbildende Dispersion gemäss Beispiel 7 und	3150 g
filmbildende Dispersion gemäss Beispiel	1350 g
	4500 g

Verhältnis Kern/Schale = 1:1

Verfahrensbedingungen:	
Sprühdruck:	1,8 bar
Zulufttemperatur:	40–50 Grad C
Ablufttemperatur:	19–23 Grad C
Sprühgeschwindigkeit:	11,84 g/min.

Das erhaltene Produkt wird 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Es ist freifliessend, 85,8 % (Gew.) der Ausbeute liegen im Korngrössenbereich von 0,3 bis 0,6 mm

Aktivität nach Bindung von Trypsin:	
BAEE:	3,9 U/g
Casein:	1,04 U/g

Beispiel 17

Bindung von Trypsin an Produkt aus Beispiel 16

500 mg Trypsin (vom Rind, Art. No. 24 579, 40 v/mg; E. Merck, D-6100 Darmstadt) werden in 10 ml 1 M Kalium-Phosphatpuffer (ph 7,5) gelöst und zu 5 g Produkte nach Beispiel 16 gegeben.

Die Mischung wird 10 sec. lang leicht geschüttelt und bei +23 Grad C 72 Stunden lang stehen gelassen. Danach wäscht man siebenmal mit jeweils 10 Volumen deionisiertem Wasser und dreimal mit jeweils 10 Volumen 0,1 M Phosphatpuffer (enthält 500 ppm p-Hydroxbenzoesäure zur Konservierung und 2% 2-Propanol)

Gewaschen (auf Fritte über Vakuum) erhält man eine Feuchtausbeute: 5,6 g

Aktivität gegenüber	
BAEE:	3,2 U/g
Casein:	0,36 U/g

Im Vergleich zum Stand der Technik wurde kein Aktivitätsverlust beobachtet.

Aktivitätsbestimmung

Aktivität gegenüber Casein (hochmolekulares Substrat)
Substrat
Auf 20 g Casein nach Hammarstein (Art. No. 2242, E. Merck, D-6100 Darmstadt) gibt man 350 ml deionisiertes Wasser und 32 ml 0,5 M NaOH und rührt solange bei 60 Grad C bis das Casein gelöst ist. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der pH-Wert durch Zugabe von 0,1 M HCl auf pH 8,0 eingestellt. Dann wird das Volumen mit deionisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. (Es sollte beachtet werden, dass auf Grund der Aggregation von Casein, die Lösung immer etwas trübe ist.)

Bestimmung

20 ml Substrat-Lösung und 2 g Produkt nach Beispiel 17 werden bei 37 Grad C, pH 8,0 in einem thermostatisierten Reaktionsgefäss mit pH-Stat.-Einheit gerührt. Gleichzeitig wird die Menge an hydrolysiertem Substrat über den Verbrauch an 0,01 N NaoH gegen die Zeit aufgezeichnet.
Nach 10 min der Inkubation wird das Produkt in einer Glasfritte (Porosität No 2) aufgefangen und dasselbe Produkt wird für weitere 10 min inkubiert. Für die Deklaration der Aktivität wird der 4. Cyclus herangezogen.
Aktivität gegenüber N-Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid
(BAEE, niedermolekulares Substrat)

Substrat

1% BAEE-Lösung (Art. No. 1672; E. Merck, D-6100 Darmstadt) wird in 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 7,5) gelöst

Inkubation

20 ml Substrat-Lösung und 2 g Produkt nach Beispiel 17 (Feuchteinwaage) werden bei 37 Grad C und pH 7,5 mit 0,1 M NaoH titriert. Inkubationszeit: 10 min. Für die Deklaration der Aktivität wird der 4. Cyclus herangezogen.

Beispiel 18

Überziehen des inerten Trägermaterials in Form von Polymerperlen
900 g PMMA-Perlpolymerisat mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 310 um wird im Wirbelschichtgerät (Uniglatt, Fa. Glatt) mit 1575 g der Dispersion aus Beispiel 5 überzogen.

Verhältnis Kern/Schale:	3:1
Verfahrensbedingungen:	
Sprühdruck:	1,8 bar
Zulufttemperatur:	40–45 Grad C
Ablufttemperatur:	20–23 Grad C
Sprühgeschwindigkeit:	8,75 g/min.

Das erhaltene Produkt wird 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Es ist freifliessend, 62,2 % (Gew.) der Ausbeute liegt im Korngrössenbereich von 0,3–0,6 mm.

Aktivität nach Bindung von Trypsin:	
BAEE	0,3 U/g
Casein	0,9 U/g

Beispiel 19

Überziehen des inerten Trägermaterials in Form von Polymerperlen.
775 g PMMA-Perlpolymerisat (PLEXIDON® M 449) mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 100 µm wird im Wirbelschichtgerät (Uniglatt, Fa. Glatt) mit folgender Dispersionsmischung überzogen:

Dispersion aus Beispiel 6	1803,33 g
Dispersion aus Beispiel 8	775,00 g
	2583,33 g

Verhältnis Kern/Schale: 1:1

Verfahrensbedingungen:

Sprühdruck:	2 bar
Zulufttemperatur:	40–45 Grad C
Ablufttemperatur:	22–25 Grad C
Sprühgeschwindigkeit:	10,5 g/min
Trocknung:	24 Stunden im Vakuum

Das erhaltene Produkt ist freifliessend und weiss. Der mittlere Teilchendurchmesser liegt bei 189 µm.

Beispiel 20

Analog den Beispielen 2 und 3 werden filmbildende und nicht-filmbildende Dispersionen hergestellt, mit der Änderung, dass Glycidylmethacrylat jeweils durch gleiche Gewichtsanteile der folgenden Monomeren ersetzt wird:

a) Methacrylsäureanhydrid
b) Acrolein
c) 2-(Acetoacetoxy)-ethylmethacrylat
d) Acrylamidoglycolsäuremethylester
e) 2-(Chloroacetoxy)-ethylmethacrylat
f) 2-Chloroethylmethacrylat

Die erhaltenen Dispersionen sind, im Sinne der Erfindung, mit denen aus Beispiel 2 bzw. 3 vergleichbar. Sie sind ebenfalls zur Herstellung von Trägermaterialien für biologisch aktive Systeme analog den Beispielen 11 und 12 geeignet und liefern ähnliche Resultate.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trägersystemen zur kovalenten Bindung von biologisch aktivem Material, bestehend aus einem festen Supportmaterial mit polymerbeschichteter Oberfläche, wobei das Polymer die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Supportmaterial mit einer Mischung einer filmbildenden Polymerdispersion FD und einer nichtfilmbildenden Dispersion NFD beschichtet wird, wobei mindestens eine der beiden Polymerdispersionen die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen besitzt.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein anorganisches Supportmaterial verwendet wird.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein organisches Supportmaterial verwendet wird.

4. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1–3, dadurch gekennzeichnet, dass kugelförmige Partikel verwendet werden.

5. Verfahren gemäss Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Kugeln mit einem Durchmesser im Bereich 0,01 bis 10 mm verwendet werden.

6. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass Flächengebilde auf Cellulose- oder textiler Basis bzw. Glasfaser verwendet werden.

7. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Polymerdispersionen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Polyacrylaten, Polystyrol und Polymerisaten aus Alkylstyrol, Polyvinylester, Polyvinylhalogenverbindungen sowie Mischpolymerisaten.

8. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerdispersionen einen Gehalt an funktionale Gruppen tragenden Monomeren der Formel

$Z\text{-}(R)_n\text{-}X$

worin X für eine Sulfonsäurehalogenid-, Thioisocyanat-, Thiocarbonyldioxy-, Carbonyl-imidoyldioxy-, Haloethoxy-, Aziridin-, Epoxy-, Formyl-, Keto-, Acryloyl-, Anhydrid- oder aktivierte Estergruppe als funktionale Gruppen
R für einen chemisch inerten Abstandhalter (Spacer)
n für 0 oder 1 und
Z für eine polymerisationsfähige Einheit steht, besitzen.

9. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die zur kovalenten Bindung geeigneten funktionalen Gruppen Bestandteil der nicht-filmbildenden Dispersion NFD sind.

10. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 und 7–9, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an funktionalen Monomeren im Polymerisat 0,1 bis 80 Gew.-% bezogen auf die Gesamtheit der Monomeren beträgt.