



österreichisches
patentamt

(10) **AT 504 330 B1 2008-05-15**

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1872/2006 (51) Int. Cl.⁸: **G10D 7/06** (2006.01)
G10D 9/02 (2006.01)
(22) Anmeldetag: 2006-11-13
(43) Veröffentlicht am: 2008-05-15

(56) Entgegenhaltungen:
WO 2003/055906A1 FAHMY, K. ET AL,
BIOPHYSICAL JOURNAL 91 (3) (2006):
996-1007
VADILLO-RODRIGUEZ; V. ET AL,
COLLOIDS AND SURFACES, B:
BIOINTERFACES 41 (1) (2005): 33-41

(73) Patentanmelder:
NANO S BIOTECHNOLOGIE GMBH
A-1180 WIEN (AT)
(72) Erfinder:
MATIS ALEXANDER MAG.
WIEN (AT)
RANINGER ALEXANDER DIPL.ING. DR.
WIEN (AT)
SLEYTR UWE DIPL.ING. DR.
WIEN (AT)

(54) **BESCHICHTUNG HYDROPHILER OBERFLÄCHEN MIT S-SCHICHT-PROTEINEN**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft mit S-Schicht-Protein überzogene Oberflächen, wobei die unbedeckte Oberfläche eine Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als 150 µg/cm² hat, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, und wobei die Oberfläche zumindest teilweise mit einem S-Schicht-Protein-Gitter überzogen ist.

AT 504 330 B1 2008-05-15

Die vorliegende Erfindung betrifft mit S-Schicht-Protein überzogene Oberflächen.

Die unspezifische Adsorption von Proteinen an Oberflächen führt zur Verschmutzung („fouling“) von Biosensoren, einer verminderten Leistung und dem Versagen von im Inneren vorhandenen Vorrichtungen, wie Implantaten, Stents und Elektroden, und einer verringerten Empfindlichkeit medizinischer Tests, mit welchen die Bindung spezifischer Proteine nachgewiesen wird. Somit ist die Fähigkeit, einer Bioverschmutzung zu widerstehen, wichtig für das Entwerfen biokompatibler Überzüge für Implantate und für Biosensoren, welche Analyten nachweisen können. Weiters kann diese unspezifische Adsorption auch zu einer verringerten Effizienz im Lauf der Filterungen proteinhaltiger Lösungen und zu einer Verstopfung der Poren eines Filters führen. Oberflächenmerkmale können auch eine entscheidende Rolle bei der Modulation des Verhaltens von Zellsystemen spielen. Die chemische Modifikation von Oberflächen kann beispielsweise die Zelladhäsion an Substraten verhindern.

Es ist gut bekannt, dass es vorteilhaft ist, die Hydrophobie einer Membran zu verringern, da dies die Verschmutzungs-Tendenzen einer Oberfläche verringert. Um die den meisten polymeren Membran-Materialien innewohnende Hydrophobie zu verringern, ist es bekannt, entweder die Oberfläche mit hydrophilen Gruppen (z.B. Hydroxyl-Gruppen) chemisch zu modifizieren oder alternativ die Oberfläche mit einer hydrophilen Schicht zu überziehen, wobei die Schicht üblicherweise ihrem Wesen nach polymer ist. Die beschichtete hydrophile Schicht verbessert die Affinität des Verbundmaterials zu Wasser, wobei es dessen Benetzbarkeit erhöht und in einigen Fällen die Oberfläche durch Wasser vollständig benetzbar macht.

In der WO 2003/055906 A werden modifizierte S-Schicht-Proteine geoffenbart, die durch Insertion von heterologen Peptiden an einer Stelle im S-Schicht-Protein modifiziert wurden. Diese S-Schicht-Proteine sind in der Lage auf Oberflächen, wie z.B. Siliziumwafer und Gold, zu binden und darauf eine kristalline Struktur auszubilden.

In Fahmy K. et al. (Biophysical J. 91 (2006): 996-1007) wird die Fähigkeit von S-Schicht-Proteinen, Schwermetalle wie beispielsweise Palladium zu binden, beschrieben. Dabei wurde ein S-Schicht-Protein vom *Bacillus sphaericus* mit Palladiumchlorid in Kontakt gebracht und die Aufnahme von Palladium über das S-Schicht-Protein untersucht.

In Vadillo-Rodriguez V. et al. (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 41 (2005): 33-41) wurden die Bindungseigenschaften von zwei verschiedenen Laktobacillenstämmen an hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen untersucht, wobei einer dieser beiden Laktobacillenstämmen eine S-Schicht aufweist, wohingegen der zweite Laktobacillusstamm keine derartige Außenhülle aufweist. Dabei wurde festgestellt, dass beide Laktobacillusstämmen ähnliche Adhäsionseigenschaften zu hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen bei geringen und hohen Ionenstärken aufweisen.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Oberfläche mit schmutzabweisenden bzw. schmutzverhindernden („anti-fouling“) Eigenschaften vorzusehen, was die Bindung von Biomolekülen an diese Oberfläche im Wesentlichen inhibiert. Ein anderes Ziel betrifft eine modifizierte Oberfläche, die einerseits Moleküle spezifisch bindet, und andererseits schmutzabweisende Eigenschaften aufweist.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung eine mit S-Schicht-Protein überzogene Oberfläche, wobei die nicht bedeckte Oberfläche eine Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ hat, wie mittels dem BSA-Bindungstest gemessen, und die Oberfläche zumindest teilweise mit einem S-Schicht-Protein-Gitter bedeckt ist.

Es zeigte sich überraschenderweise, dass S-Schicht-Proteine an Oberflächen binden können, welche normalerweise als geringe Proteinbindungseigenschaften aufweisend angesehen werden. Weiters können die S-Schicht-Proteine auch das typische zweidimensionale kristalline

Gitter bilden. Da die S-Schicht-Proteine selbst schmutzabweisende Eigenschaften aufweisen, zeigen auch das Substrat oder die Teile, die mit dem S-Schicht-Gitter bedeckt sind, schmutzabweisende Eigenschaften.

- 5 S-Schicht-Gitter der vorliegenden Erfindung bestehen aus identischen Protein- oder Glykoprotein-Untereinheiten, die in der genauesten Orientierung ausgerichtet sind.

10 Die Poren im Gitter gewährleisten keinen signifikanten Druckabfall im Lauf der Ultrafiltration oder von Revers-Osmose-Filtrationen. Dies kann mit den nano-gemusterten schmutzabweisenden Eigenschaften von S-Schichten zusammenhängen. Die Oberfläche eines festen Trägers weist z.B. eine beliebige Anordnung geladener Gruppen oder hydrophilisierter und/oder hydrophober Domänen auf.

15 Mit S-Schichten sind die Oberflächen-(z.B. schmutzabweisenden Oberflächen-)Eigenschaften infolge der regelmäßigen Anordnung der (Glyko-)Protein-Untereinheiten sehr viel definierter.

Außerdem sieht die Topographie des S-Schicht-Gitters eine definiertere „nano-gesteuerte“ Oberfläche vor. An anderen schmutzabweisenden Trägern sind solche genauen Bedingungen und Oberflächeneigenschaften nicht gegeben.

20 „S-Schicht“-Proteine sind die äußerste Zellhüllen-Komponente eines breiten Spektrums von Bakterien und Archaeen. Die S-Schichten bestehen aus einer einzigen Protein- oder Glykoprotein-Spezies (MW 40-200 kDa) und weisen entweder eine schräge (p1, p2), quadratische (p4) oder hexagonale (p3, p6) Gitter-Symmetrie mit Einheits-Zelldimensionen im Bereich von 3 bis 30 nm auf. Die S-Schichten sind im Allgemeinen 5 bis 10 nm dick und zeigen Poren identischer Größe (Durchmesser 2-8 nm) und Morphologie. Die S-Schicht-Proteine werden routinemäßig bei mehreren technischen Anwendungen verwendet. Beispielsweise offenbart die EP 0 306 473 B1 die Verwendung von S-Schicht-Proteinen als Träger für Haptene, immunogene oder immunstimulierende Substanzen. Die Immobilisierung von Molekülen, insbesondere von Proteinen, an S-Schicht-Proteinen ist in der EP 0 362 339 B1 beschrieben. In der WO 02/097118 A1 ist die Erzeugung einer Schicht aus funktionellen Molekülen auf einem Substrat unter Verwendung von S-Schicht-Proteinen geoffenbart. Dort wird die Protein-Schicht an der Oberfläche eines Trägers durch Schaffung eines Unterschiedes im elektrochemischen Potential zwischen Lösung und Oberfläche gebildet. Die EP 0 189 019 B1 offenbart die Herstellung und die Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran unter Verwendung von S-Schicht-Proteinen. Die dort verwendeten Ultrafiltrationsmembranen zeigen keine geringen Bindungseigenschaften gemäß der vorliegenden Erfindung. Es zeigte sich, dass die Gesamtmenge des S-Schicht-Protein/S-Schicht-Fusionsproteins an der hydrophilen Oberfläche mindestens 6 mal höher ist als die Menge des BSA an derselben Oberfläche. Die Funktionalität des Proteins bleibt vollständig erhalten. Beispielsweise kann das S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-ZZ noch immer humanes IgG nach der Immobilisierung an der wenig Protein-bindenden Oberfläche binden. Weiters zeigt dies, dass die Biofunktionalität erhalten bleibt und die funktionelle Gruppe von der Oberfläche weg in richtiger Weise exponiert ist. S-Schicht-Proteine, wie hierin verwendet, schließen auch S-Schicht-Glykoproteine mit ein.

45 Die S-Schicht-Proteine weisen vorteilhaft auch eine intermolekulare Bindung auf (d.h. einzelne S-Schicht-Protein-Moleküle binden an andere S-Schicht-Protein-Moleküle daneben in einem S-Schicht-Gitter). Daher würden auch Regionen einer Oberfläche, die normalerweise nicht von irgendeinem Protein-Molekül bedeckt sind, durch das S-Schicht-Gitter bedeckt. Dies wird regelmäßig beobachtet, wenn ein Protein (z.B. BSA) verwendet wird, um Oberflächen zu bedecken, und einige Regionen dieser Oberfläche von keinem Protein-Molekül bedeckt sind. Ein solches Verhalten führt zu einer Oberfläche, die unregelmäßig mit einem Protein bedeckt ist.

50 Wie hierin verwendet beziehen sich „BSA-Bindungs-Test“ und „IgG-Bindungs-Test“ auf ein Verfahren zum (quantitativen) Bestimmen der Fähigkeit und des Ausmaßes einer Oberfläche,

ein Protein, insbesondere BSA („bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin) oder IgG, zu binden. Beide dieser Proteine werden regelmäßig als Modell-Proteine verwendet, um zu zeigen, in welchem Ausmaß eine Oberfläche Proteine binden kann (vgl. z.B. Weigert et al. (1995), Journal of Membrane Science, 106:147-159).

„Bindungskapazität von weniger als 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ “, wie hierin verwendet, bedeutet, dass ein Protein, insbesondere das Modell-Protein BSA, an das Substrat in einer Menge von weniger als 150 μg pro cm^2 des Oberflächenbereichs bindet. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung bindet BSA an die Oberfläche in einer Menge von weniger als 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, weniger als 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, weniger als 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, weniger als 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, weniger als 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Der Ausdruck „Oberfläche“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Oberfläche, die Teil eines dreidimensionalen Gegenstandes oder Körpers, wie einer Membran, eines kugelförmigen Körpers (z.B. Kügelchen), einer Platte (z.B. aus Glas, Silikon) usw., ist.

„Die Oberfläche ist zumindest teilweise mit einem S-Schicht-Protein-Gitter bedeckt“ bedeutet, dass die Oberfläche vollständig oder teilweise mit kristallisierten S-Schicht-Proteinen bedeckt sein kann. Die teilweise Bedeckung einer Oberfläche (zumindest 10%, vorzugsweise zumindest 25%, mehr bevorzugt zumindest 50%, noch mehr bevorzugt zumindest 75%) ermöglicht es, der Oberfläche eine Form zu verleihen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die unspezifische Bindungskapazität des Biomoleküls weniger als 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mehr bevorzugt weniger als 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels des BSA-Bindungs-Tests gemessen. S-Schicht-Proteine können sogar an hydrophile Oberflächen gebunden werden, die eine Bindungskapazität für Biomoleküle von weniger als 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufweisen.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Oberfläche hydrophil.

Hydrophile Oberflächen weisen insbesondere geringe Biomolekül-(z.B. Protein-) und Organismus-(z.B. Prokaryonten-, Eukaryonten-)Bindungs-Eigenschaften auf. Die Oberfläche, die gemäß der vorliegenden Erfindung zumindest teilweise durch ein S-Schicht-Protein-Gitter bedeckt ist, umfasst hydrophile funktionelle Gruppen, vorzugsweise Hydroxylgruppen.

Techniken, die zur Untersuchung des hydrophilen/hydrophoben Charakters der Membran-Oberflächen verwendet werden, sind dynamischer Kontaktwinkel („dynamic contact angle“, DCA), Protein-Adsorptionsstudien, Rasterkraft-Mikroskopie in Pulskraft-Modus („pulsed force mode - atomic force microscopy“) und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR-QCM-D, Quartz Crystal Microbalance) (vgl. z.B. Kwock et al. (1998), Colloids and Surfaces, 142:219-235; Meincken et al. (2005), Applied Surface Science, 252:1772-1779; Weigert et al. (1995), Journal of Membrane Science, 106:147-159).

Die Oberfläche kann mit einer hydrophilen Beschichtung bedeckt (z.B. US 2005/0133441) oder funktionalisiert sein. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Oberfläche Teil einer Membran, vorzugsweise einer porösen Membran, eines Kügelchens, eines kugelförmigen Körpers, einer Folie bzw. eines Objektträgers, einer filamentösen Struktur, einer Säule, eines Röhrchens, Partikels oder einer Platte.

Die Oberfläche, welche gemäß der vorliegenden Erfindung durch das S-Schicht-Protein-Gitter bedeckt ist, kann die Oberfläche jedes dreidimensionalen Gegenstandes, insbesondere einer Membran, eines Kügelchens, eines kugelförmigen Körpers, einer Folie bzw. eines Objektträgers, einer filamentösen Struktur, einer Säule, eines Röhrchens, Partikels oder einer Platte sein.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Oberfläche Teil einer porösen Membran, d.h. eines Filters. Poröse Membranen können als „mikroporöse“ Membranen oder „Ultrafiltrations-“ und „nanoporöse“ Membranen auf Grund der Größe der Poren der Membran eingestuft werden. Im Allgemeinen wird der Bereich der Porengrößen für mikroporöse Membranen als von etwa 0,05 µm bis etwa 10,0 µm reichend angesehen, wogegen der Bereich der Porengrößen für Ultrafiltrationsmembranen als von etwa 0,002 µm bis etwa 0,05 µm reichend angesehen wird. Diese Porengrößen beziehen sich auf Porendurchmesser für kreisförmige oder annähernd kreisförmige Poren, oder auf eine charakteristische Dimension für nicht-kreisförmige Poren. Die Porengröße einer Membran kann durch die Größe der kleinsten Spezies (Partikel oder Molekül) bezeichnet werden, die nicht durch die Membran hindurchtreten kann, über einer bestimmten fraktionierten Passage. Eine übliche Bewertung liegt unter 10% Passage, was 90% Ausschluss („cut-off“) oder Retention entspricht.

Andere Methoden sind den Fachleuten bekannt, einschließlich Bildanalyse der Rasterelektronenmikroskopie, um Porengrößenverteilungs-Charakteristika zu erhalten. Mikroporöse Membranen werden typischerweise verwendet, um teilchenförmiges Material aus Flüssigkeiten und Gasen zu entfernen. Eine wichtige Verwendung mikroporöser Membranen ist bei der Sterilfiltration pharmazeutischer Lösungen zum Entfernen jeglicher Bakterien, die in der Lösung vorhanden sein können. Mikroporöse Membranen werden auch als sterile Gasabzugsöffnungen verwendet, die eine Gasströmung ermöglichen, aber verhindern, dass durch die Luft übertragene Bakterien durch den Filter hindurch treten. Ultrafiltrationsmembranen werden allgemein in Anwendungsfällen verwendet, in welchen das Zurückhalten kleinerer Spezies erwünscht ist. Beispielsweise werden Ultrafiltrationsmembranen in der Biotechnologie-Industrie zum Konzentrieren von Proteinen verwendet, und bei Diafiltrationsanwendungen, um Salz und Spezies mit niedrigem Molekulargewicht aus Proteinlösungen zu entfernen. Sowohl Ultrafiltrations- als auch mikroporöse Membranen können in mehreren Formen, einschließlich Blättern, Röhrchen und Hohlfasern, erzeugt werden.

Poröse Membranen werden aus einer Vielfalt von Materialien hergestellt, wobei Polymere die häufigsten sind. Viele handelsübliche Membranen werden aus der Verarbeitung von Kunststoff, wie Polyethersulfon, Polysulfon, Polyvinyliden-Fluorid, Polyethylen, Polytetrafluorethylen, Polypropylen usw. erzeugt, um sich ihre robusten thermischen, mechanischen und chemischen Widerstandseigenschaften zunutze zu machen. Diese Materialien sind hydrophob und neigen sehr zum Adsorbieren von Biomolekülen und Zellen (z.B. prokaryontischen, eukaryontischen Zellen).

Im Allgemeinen ist eine hydrophile Membran, die mit einer wässrigen Lösung leicht benetzbar ist, zum Filtern wässriger Lösungen bevorzugt. Dagegen ist bei hydrophoben Membranen ein Kontakt mit einer Vorbenetzungsflüssigkeit mit geringer Oberflächenspannung, gefolgt von einem Wasseraustausch, notwendig, um eine Permeation zu beginnen. Dies bringt für das Verfahren nicht nur zusätzliche Materialkosten, sondern es muss auch jegliche Benetzungsflüssigkeit gründlich gespült werden, was die Möglichkeit einer Kontamination, die Verfahrenszeit und die Kosten stark erhöht. Eine hydrophobe Membran, die nicht mit einer wässrigen Lösung benetzt ist, kann zum Filtern organischer Lösungen oder Gase verwendet werden.

Außer der Permeabilität und den Retentionseigenschaften gibt es für poröse Membranen noch andere Erfordernisse, die durch die Art der Anwendung diktiert werden. Beispielsweise müssen sie eine ausreichende mechanische Festigkeit aufweisen, um die Betriebsdrücke und -temperaturen auszuhalten. Bei Anwendungen, bei welchen die Sauberkeit ein wesentliches Erfordernis ist, wie in der pharmazeutischen oder Mikroelektronik-Halbleitererzeugungs-Industrie, muss die Menge an Material, die bei der Verwendung von der Membran extrahiert wird, sehr klein sein. Bei Anwendungen, bei welchen die Membran mit Biomolekülen in Berührung kommt, muss die Membran-Oberfläche gegen eine Biomolekül-Adsorption resistent sein (z.B. geringe Protein-Bindung). Eine Biomolekül-resistente Oberfläche ist eine Oberfläche, die minimale Mengen an Biomolekülen, wie Proteine und Nukleinsäuren, adsorbiert oder bindet. Es ist

besonders bevorzugt, dass eine Membranoberfläche Biomolekül-resistent ist, um den Permeationsverlust aus der Verschmutzung durch eine Oberflächen-Adsorption oder Poren-Verstopfung zu verringern und einen Produkt-Verlust durch eine irreversible Adsorption oder eine damit verbundene Biomolekül-Denaturierung zu verhindern. Mit einer S-Schicht überzogene Membranen verringern die Biomolekül-Denaturierung und somit die Verschmutzung.

Poröse Medien und Membranen werden mit funktionellen Oberflächen verwendet. Funktionelle Oberflächen haben chemische Gruppen oder Anteile, die mit spezifischen Spezies im Fluid, welches die Medien oder Membran kontaktiert, reagieren oder diese adsorbieren oder absorbieren. Beispiele für solche Gruppen sind positiv oder negativ geladene Gruppen, Affinitäts-Liganden, wie Antikörper oder Antigene, Metall-Affinitäts-Liganden und hydrophobe Interaktionsgruppen.

Um den porösen Medien oder Membranen die zuvor erwähnten Eigenschaften zu verleihen, wird die Membran-Oberfläche typischerweise modifiziert, um die Oberfläche hydrophil und Biomolekül-resistent zu machen. Dies erfolgt durch eine Vielfalt von Vorgangsweisen, die die Oberfläche des Massen(„bulk“)-Matrix-Materials mit einem hydrophilen Polymer oder einer hydrophilen Gruppe oder mit einem hydrophoben Polymer oder einer hydrophoben Gruppe beschichten, diese an ihr befestigen oder sie in anderer Weise damit bedecken. Während eine derartige Modifikation einige Probleme im Zusammenhang mit der hydrophoben oder stark Biomolekül-bindenden Eigenschaft der Massen-Matrix-Materialoberfläche lösen kann, kann sie auch andere Probleme bringen. Beispielsweise erhöhen solche Modifikationen die Menge an Material, die während ihrer Verwendung aus der Membran extrahiert werden kann, und das Modifikationsmaterial kann eine geringe Toleranz für die Einwirkung alkalischer Lösungen haben. Außerdem werden bei vielen Anwendungen die Membranen erhitzt, entweder durch nasse Hitze, wie beim Autoklavieren oder beim Keimfreimachen mit Dampf, oder durch trockene Hitze, wie bei einem Trocknungsschritt. Es wurde beobachtet, dass ein solches Erhitzen die Hydrophilie verringert und die Biomolekül-Resistenz einiger modifizierter Oberflächen in einem Ausmaß verringert, dass sie für ihren beabsichtigten Zweck nicht verwendbar sind.

Einige Membranen des Standes der Technik werden durch Modifizieren der Oberfläche vorgeformter poröser Membranen mit vernetzten Hydroxyacrylaten erzeugt, wobei das vernetzende Monomer ein difunktionelles Acrylat ist („Case A-Membranen“. Solche Membranen haben eine ausgezeichnete Resistenz gegen Biomolekül-Adsorption, ausgezeichnete Wärmestabilität der Biomolekül-Resistenz, und einen akzeptablen Strömungsverlust (d.h. die Verringerung an Strömung oder Permeabilität im Vergleich zur nicht modifizierten Membran).

Ein großer Teil des Standes der Technik beschreibt die Verwendung von Hydroxyl-hältigen Monomeren, üblicherweise Carbonylester-enthaltende Acrylat-Polymeren, um Membran-Oberflächenmodifikationen mit hydrophilem Charakter und hoher Widerstandskraft gegen eine Proteinbindung zu erzeugen.

Es ist jedoch bekannt, dass Polymere von solchen Monomeren nicht widerstandsfähig gegen stark alkalische Lösungen sind. Beispielsweise hydrolysiert eine Lösung von 1,0 normalem Natriumhydroxid die Carbonyl-hältigen Acrylat-Polymere zu Acrylsäure-hältigen Polymeren. Solche Acrylsäure-hältigen Polymere sind unter bestimmten pH-Bedingungen ionisch geladen und ziehen entgegengesetzt geladene Proteine oder Biomoleküle an und binden diese und erhöhen so die Sorption und Membran-Verschmutzung. Außerdem quellen Acrylsäure-hältige Polymere in Wasser in einem Ausmaß, dass sie die Poren-Durchgänge verengen und somit die Membran-Permeabilität und die Produktivität verringern. Außerdem reagieren Polymere von Hydroxyl-hältigen Monomeren, wie Hydroxyacrylate, weiters in stark alkalischen Lösungen und zerfallen in lösliche Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht, welche sich auflösen und das darunterliegende poröse Medien- oder Membran-Substrat freilegen. Dagegen konnte gezeigt werden, dass das S-Schicht-Gitter seine Porosität und somit Permeabilität unter einer großen Vielfalt physikochemischer Bedingungen beibehält.

Der Filter der vorliegenden Erfindung ist erwünschterweise aus Material mit geringer Proteinbindung, wie derivatisiertem Nylon, Polysulfon u. dgl., hergestellt. Wie hierin verwendet, bindet ein wenig Protein-bindendes Material eines Filters oder einer porösen Membran weniger als etwa 0,1% des Proteins, das hindurchgeht. Diese Menge kann beispielsweise mit der folgenden Methode bestimmt werden. 0,4 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“, PBS) mit 3% Polyethylenglykol und 100 µl (48 µg) radioaktiv markierte BSA werden zwangsweise durch den Filter oder das poröse Material mit einem Durchmesser von etwa 13 mm, von welchem etwa 10 mm die Proteinlösung kontaktieren, und mit einer Dicke von etwa 0,15 mm hindurchgeleitet. Der Filter wird dann gewaschen, indem 5 ml einer Waschlösung (PBS mit 0,05% Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)) zwangsweise hindurchgeleitet werden. Der Filter wird entfernt und in 4 ml Szintillations-Cocktail gegeben. Die Menge des radioaktiv markierten BSA, die an den Filter gebunden ist, wird unter Heranziehen der Zerfälle pro Minute, die während fünf Minuten gemessen werden, berechnet. Gewünschtenfalls ist das Filtermaterial auch verformbar oder in der Richtung der Fluid-Strömung zusammendrückbar.

Die Porengröße des bei dieser Erfindung verwendeten Filters variiert gemäß dem untersuchten Analyten und der Art der Probe. Die Porengröße sollte gemäß dem bestimmten Analyten, für welchen der Test durchgeführt wird, bemessen sein, so dass, wenn der Analyt an den markierten Ligand-Rezeptor-Paar-Teil gebunden ist, der resultierende Komplex daran gehindert wird, durch den Filter hindurch zu treten. Obwohl die Porengröße des Filters größer als der durchschnittliche Durchmesser des Biomoleküls oder Organismus, der getestet wird, sein kann, um eine adäquate Empfindlichkeit des Tests zu erhalten, ist erwünscht, dass die Porengröße nicht mehr als 2,5 Mal so groß wie der untersuchte Analyt ist. Filter mit einer Porengröße im Bereich von 0,1 µm im Durchmesser bis 5 mm, vorzugsweise 0,1 µm bis 1 mm, mehr bevorzugt 0,1 µm bis 100 µm im Durchmesser wurden bei dieser Erfindung verwendet.

Vorzugsweise werden Filter mit einer Porengröße von nicht größer als etwa 15 µm verwendet. Bevorzugte Filter gemäß der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise in Elias Klein (Journal of Membrane Science 179 (2000): 1-27) beschrieben.

Die Membran und/oder die Oberfläche der Membran umfasst vorzugsweise ein Polymer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylchlorid, Celluloseacetat, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylensulfon und Polysulfon.

Eine zunehmende Hydrophilie von Membranen kann nicht nur durch physikalische Beschichtung, sondern auch durch Mischen (Polyethylenglykol, PVP), chemische Modifikationen (HEMA-Pfropfen („HEMA-grafting“)), photochemische Modifikationen, Bestrahlungen und Plasma-Polymerisation (z.B. Shudong et al., (2003), J. Membr. Sci. 222:3-18) erreicht werden.

Das gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendende S-Schicht-Protein ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SbpA (NCBI AAF22978). Die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendenden S-Schicht-Proteine stammen von gram-positiven und gram-negativen prokaryontischen Organismen und vorzugsweise von Bakterien, wie *Bacillus* oder *Lactobacillus Sp.* (wie *B. subtilis*).

Die wenig Protein-bindende Oberfläche kann jedoch durch jedes auf dem Gebiet bekannte S-Schicht-Protein bedeckt sein.

Das S-Schicht-Protein ist vorzugsweise ein natürliches oder rekombinantes Wildtyp-S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Fusionsprotein, ein trunkiertes S-Schicht-Protein, ein vollständiges oder trunkiertes S-Schicht-Protein mit einer hinzugefügten Funktionalität am N- oder am C-terminalen Ende des S-Schicht-Teils, ein S-Schicht-Glykoprotein oder eine S-Schicht-Protein-Mutante (z.B. Cystein-Mutante (vgl. z.B. Howorka et al. (2000), J. Biol. Chem. 275 (48):37876-37886)).

Das S-Schicht-Protein, welches zum Bedecken einer wenig Protein-bindenden Oberfläche zu verwenden ist, kann je nach dem Zweck, dem es dienen soll verschieden sein. Beispielsweise wird ein S-Schicht-Fusionsprotein verwendet, wenn die Oberfläche modifiziert werden muss, damit sie spezifische Funktionalitäten, wie bindende/einfangende („capturing“) Moleküle aus einer Lösung umfasst. S-Schicht-Glykoproteine können verwendet werden, wenn Moleküle an die Oberfläche gebunden werden müssen, die spezifisch die Glykan-Struktur des Glykoproteins erkennen. Trunkierte S-Schicht-Proteine können nur bis zu einem Ausmaß trunkiert werden, welches noch immer die Bildung von kristallinen S-Schicht-Protein-Gittern ermöglicht.

Natürliches Wildtyp-S-Schicht-Protein, wie hierin verwendet, bezieht sich auf S-Schicht-Proteine, die aus Organismen isoliert sind, welche natürlicherweise diese S-Schicht-Proteine auf ihrer Oberfläche tragen.

Einer der Vorteile der Verwendung von mit S-Schicht-Protein bedeckten Substraten ist die Möglichkeit, die Oberfläche mit einem breiten Spektrum von Molekülen und Nanopartikeln (z.B. Metallen, SiO_x, Halbleitern usw.) zu funktionalisieren. Diese Moleküle können an die S-Schicht-Proteine chemisch gebunden sein oder, wenn die Moleküle Proteine, Polypeptide oder Peptide sind, durch rekombinante Fusionstechniken (vgl. z.B. Ilk et al., Appl. Environ. Microbiol. 68, 3251-3260; Pleschberger et al., Bioconj. Chem. 14, 440-448; Völlenkle et al., Appl. Environ. Microbiol. 70, 1514-1521; Huber et al., Small 2, 142-150; Moll et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99(23), 14646-14651).

Daher ist das S-Schicht-Fusionsprotein ein S-Schicht-Protein, welches mit einem Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin, Antikörper, Antigene, Affinitätskörper, Enzyme, Rezeptoren, Liganden, Peptide, Kohlehydrate u. dgl., fusioniert ist.

Die mit dem S-Schicht-Gitter verbundenen oder fusionierten funktionellen Gruppen ermöglichen ein Isolieren von Bindungspartnern aus einer Flüssigkeit, welcher die mit dem S-Schicht-Protein bedeckte Oberfläche ausgesetzt wird, um eine Bindung zu ermöglichen. Die Funktionalität oder Funktionalitäten der S-Schicht-Proteine können vom Fachmann je nach dem Zweck, für welchen eine solche Oberfläche gebraucht wird, ausgewählt werden. Natürlich ist es auch möglich, S-Schicht-Proteine von mehr als einer Spezies oder S-Schicht-Proteine mit mehr als einer Funktionalität zu verwenden. Die verschiedenen S-Schicht-Proteine können an verschiedenen Stellen an der Oberfläche auskristallisiert sein, was zu einer strukturierten Oberflächenbeschichtung mit Flächen mit verschiedenen Beschichtungseigenschaften führt. Diese S-Schicht-Proteine können auch gemischt und danach auskristallisiert werden. Dies ermöglicht die Herstellung von mit einer S-Schicht beschichteten Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B. Bindungseigenschaften) oder Flächen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat das S-Schicht-Protein-Gitter an der Oberfläche eine unspezifische Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als 150 µg/cm², wie mittels BSA-Bindungstest gemessen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung hat das S-Schicht-Protein-Gitter an der Oberfläche eine unspezifische Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als 150 µg/cm², wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, und eine oder mehrere spezifische Bindungsaktivitäten gegenüber bestimmten Biomolekülen oder Organismen (erreicht über S-Schicht-Fusionsproteine oder chemische Kopplung aktiver Gruppen an die S-Schicht) (vgl. Völlenkle et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol. 70:1514-1521; Pleschberger et al., 2004, Bioconj. Chem. 15:664-671; Pleschberger et al., 2003, Bioconj. Chem. 14:440-448; Breitwieser et al., 2002, Protein Eng. 15:243-249).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Filtermembran mit einer Proteinbedeckten Oberfläche gemäß der vorliegenden Erfindung, wie oben angeführt. S-Schicht-Proteine können zumindest zur teilweisen Bedeckung verwendet werden, z.B. an vorbestimm-

ten Flächen (vg. WO 98/39688). Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer mit S-Schicht-Protein bedeckten Oberfläche, umfassend die Schritte:

- 5 • Vorsehen einer unbedeckten Oberfläche mit einer Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen,
- Kontaktieren und Inkubieren der Oberfläche mit einem S-Schicht-Protein und
- gegebenenfalls Waschen der mit S-Schicht-Protein bedeckten Oberfläche von ungebundenen S-Schicht-Proteinen.

10

Das mit S-Schicht bedeckte Substrat kann mittels einfacher Auskristallisation von S-Schicht-Proteinen der vorliegenden Erfindung an einer Oberfläche, die eine verringerte Biomolekül-Bindungskapazität aufweist, erzeugt werden.

15

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Biomolekül-Bindungskapazität weniger als $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mehr bevorzugt weniger als $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen.

20

Die Oberfläche ist vorzugsweise hydrophil.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Oberfläche hydrophile funktionelle Gruppen, vorzugsweise Hydroxylgruppen, auf.

25

Die Oberfläche ist vorzugsweise Teil einer Membran, vorzugsweise einer porösen Membran, eines Kügelchens, eines kugelförmigen Körpers, einer Folie bzw. eines Objektträgers, einer filamentösen Struktur, einer Säule, eines Röhrchen, eines Teilchens oder einer Platte.

30

Die Membran und/oder die Oberfläche der Membran weist vorzugsweise ein Polymer, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylchlorid, Celluloseacetat, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylensulfon und Polysulfon, auf.

35

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das S-Schicht-Protein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus S-Schicht-Proteinen von gram-positiven und gram-negativen prokaryontischen Organismen, und vorzugsweise von Bakterien, wie *Bacillus* oder *Lactobacillus* sp. (wie *B. subtilis* SbpA (NCBI AAF22978)).

40

Das beim Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete S-Schicht-Protein ist vorzugsweise ein natürliches oder rekombinantes Wildtyp-S-Schicht-Protein, ein chemisch modifiziertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Fusionsprotein, ein trunkiertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Glykoprotein, ein vollständiges oder trunkiertes S-Schicht-Protein mit einer hinzugefügten Funktionalität am N- oder am C-terminalen Ende des S-Schicht-Teils, ein S-Schicht-Glykoprotein, oder eine S-Schicht-Protein-Mutante (z.B. Cystein-Mutante, usw.).

45

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Molekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin, Antikörpern, Antigenen, Affinitätskörpern, Enzymen, Rezeptoren, Liganden, Peptiden, Kohlehydraten u. dgl., mit dem S-Schicht-Protein oder einem S-Schicht-Protein-Derivat (z.B. trunkierte Form) am C- oder N-Terminus des S-Schicht-Proteins oder intern fusioniert.

50

Das S-Schicht-Protein-Gitter an der Oberfläche weist vorzugsweise eine Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen.

55

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Set zur Herstellung einer mit S-Schicht-Protein bedeckten Oberfläche, insbesondere einen mit S-Schicht-Protein bedeckten

Filter, umfassend:

- eine Oberfläche mit einer Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, und
 - S-Schicht-Protein.
- Die Komponenten des Sets der vorliegenden Erfindung sind jene, die oben beschrieben sind.

Die vorliegende Erfindung ist weiters durch die folgenden Figuren und Beispiele beschrieben, ohne auf diese eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt SbpA, auf einem Silizium-Wafer wieder zusammengestellt. AFM-Bild.

Fig. 2 zeigt humanes IgG, gebunden durch rSbpA-ZZ und Protein A (Pierce).

Fig. 3 zeigt Selbst-Anordnungen von rSbpA-eGFP unter dem Fluoreszenz-Mikroskop: 100x vergrößert.

Fig. 4 zeigt SDS-PAGE, mit Silberfärbung; Bahn 1: Marker: alles blau (BioRad #:1610373), Bahn 2 bis Bahn 4: Durapore-Membran, mit Beschichtungspuffer (2), 0,8 nmol/ml BSA (3) und 0,8 nmol/ml wtSbpA (4) inkubiert; Bahn 5 und Bahn 6: wtSbpA in Lösung und BAS in Lösung, Bahn 7 bis Bahn 9: Mikron-PES-Membran inkubiert mit 0,8 nmol/ml wtSbpA (7), 0,8 nmol/ml BSA (8) und nur mit Beschichtungspuffer (9).

Fig. 5 zeigt die Proteinmenge pro mg Kisker-Glaskügelchen vs. Proteinmenge in der Beschichtungslösung.

Fig. 6 zeigt Fluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von mit rSbpA-ZZ beschichteten Kisker-Glaskügelchen mit gebundenem IgG (links) und ohne gebundenes IgG (rechts). Belichtungszeit: 1 s.

Fig. 7 zeigt Fluoreszenz-Mikroskopie-Bilder von mit rSbpA-eGFP beschichteten Kisker-Glaskügelchen (links) und Kisker-Glaskügelchen alleine (rechts). Belichtungszeit: 20 s.

BEISPIEL:

Beim vorliegenden Beispiel ist die Fähigkeit von S-Schicht-(Fusions-)Proteinen und Glykoproteinen zur Biofunktionalisierung von Oberflächen mit geringen Proteinbindungseigenschaften gezeigt.

1. Materialien

1.1 S-Schicht-Protein SbpA von *Bacillus sphaericus* CCM 2177

Das isolierte S-Schicht-Protein SbpA aus *B. sphaericus* (wtSbpA) hat die intrinsische Fähigkeit, sich an verschiedenen Schnittstellen (Luft-Flüssigkeit, Flüssigkeit-Feststoff, ...) und in Suspension zu 2-dimensionalen Protein-Gittern (Mono- oder Doppelschichten), „Selbstanordnungen“ („Self-Assemblies“) genannt, anzusammeln. „Selbstanordnungen“ können flache, röhrenförmige oder blasenförmige Strukturen aufweisen. Die nachstehend beschriebenen S-Schicht-Fusionsproteine wurden konstruiert, um die Fähigkeit zur Selbstanordnung aufrecht zu erhalten und um eine biologische Funktionalität hinzuzufügen.

1.2 Fluoreszierendes rSbpA-eGFP-S-Schicht-Fusionsprotein

Das S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-eGFP ist ein funktionales, chimäres S-Schicht-verstärktes grün fluoreszierendes Protein. Daher kann der Erfolg des Beschichtungsverfahrens bei Ver-

wendung von rSbpA-eGFP über die Fluoreszenz-Mikroskopie direkt sichtbar gemacht werden. Dieses S-Schicht-Fusionsprotein fluoresziert nur, wenn es korrekt gefaltet ist. Eine Oberflächenfluoreszenz wird daher anzeigen, dass das Protein an der Oberfläche immobilisiert ist und dass die Biofunktionalität beibehalten ist.

1.3 rSbpA-ZZ: Fc-Bindungsdomäne von Protein A-hältigem S-Schicht-Fusionsprotein

rSbpA-ZZ ist ein S-Schicht-Fusionsprotein, bestehend aus einer C-terminal trunkeierten Form des S-Schicht-Proteins aus *Bacillus sphaericus* CCM 2177 und zwei Kopien der Fc-bindenden Z-Domäne. Die Z-Domäne ist ein synthetisches Analogon der B-Domäne von Protein A, die den Fc-Teil von Immunglobulin G (IgG) binden kann. Die IgG-Bindungsaktivität dieses S-Schicht-Fusionsproteins kann nach dem Beschichtungsverfahren mittels ELISA-Technologie nachgewiesen werden, was beweist, dass die Biofunktionalität erhalten geblieben ist. Nur gut exponierte funktionelle Gruppen können IgG aus einer Lösung binden.

Daher zeigt die Bindung von IgG eine nicht-umgekehrte („non upside-down“) Beschichtung des korrekt gefalteten Proteins an.

1.3 Oberflächen

Von den folgenden Oberflächen ist bekannt, dass sie geringe Protein-Bindungseigenschaften aufweisen.

Membranen:

1) Osmonics PES-Membran (Osmonics Inc., Kat.#: SO4SP02500), 0,45 µm Porengröße; hydrophil, geringe Proteinbindung und stabil bei alkalischem pH.

2) Millipore Durapore® Membran-Filter (Millipore, Kat.#: HVLP 02500), 0,45 µm Porengröße; hergestellt aus Polyvinyliden-Fluorid, ergibt hohe Fließgeschwindigkeiten und Durchsatz, geringe extrahierbare Stoffe und eine breite chemische Kompatibilität; hydrophile Durapore-Membranen binden viel weniger Protein als Nylon-, Nitrocellulose- oder PTFE-Membranen.

3) Chemisch resistente RC-Membran-Filter (Sartorius, Kat.#: 18406-25), 0,45 µm Porengröße, sind hydrophile Membran-Filter, hergestellt aus regenerierter Zellulose, verstärkt mit Cellulose-Vlies.

4) Sartobind Membrane Adsorber (Sartorius, Kat.Nr.: 18706); diese Membran besteht aus stabilisierter, verstärkter Cellulose und hat eine Gesamt-Porengröße von 0,45 µm.

Kügelchen:

1) Glaskügelchen (Kisker, Kat.#: PGB-05, Größe: 10-50 µm, Packungsgröße: 50 g mit $2,4 \times 10^7$ Kügelchen/g); erzeugt aus hochreinen Rohmaterialien mit einer reinen und glänzenden Oberfläche. Die Dichte ist $2,5 \text{ g/cm}^3$, die chemische Charakterisierung ist 72% SiO_2 , 13% Na_2O , 9% CaO . Die Glaskügelchen sind frei von PbO .

2. Expression, Isolierung und Reinigung von Proteinen

2.1 rSbpA-ZZ und wtSbpA

Diese beiden Proteine wurden erzeugt, isoliert und gereinigt, wie früher beschrieben (Sleytr et al. (1986) Arch. Microbiol. 146:19-24; Pum et al. (1997) Coll. Surf. B: Biointerfaces. 8:157-162; Völlenknecht et al. (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70, 1514-1521).

2.2 Proteinerzeugung: rSbpA-eGFP/eGFP

Die Herstellung von rekombinanten S-Schicht-Proteinen in *E. coli* erfolgte unter Verwendung des T7-Expressionssystems. pET-28 (+) (Novagen) diente als Expressionsvektor. Der Expressionswirt *E. coli* BL21 wurde in Schüttelkolben in 250 ml M9ZB-Medium (pH=7,0) gezüchtet. Bei einer optischen Dichte von 1 (bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen) wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM zugegeben, und die Proteine wurden bei 28°C 5 h lang exprimiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet.

2.3 Zelldisruption: rSbpA-eGFP

1 mg Biomasse-Pellet wurde in 10 ml B-Per Bacterial Protein Extraction Reagent, enthaltend 1 mM DTT (Dithiothreitol) re-suspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension bei 20000 U/min (4°C) 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand enthielt die lösliche Protein-Fraktion. Danach wurde das unlösliche Protein-Pellet in 10 ml B-Per, enthaltend 1 mM DTT, re-suspendiert. 200 µl einer 10 mg/ml Lysozym-Stammlösung wurden zugegeben, und die Mischung wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl einer 1 mg/ml DNAse-Lösung und 500 µl einer 0,1 M MgSO₄-Lösung zugegeben, und die Suspension wurde weitere 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension auf Eis gehalten. 50 ml von 1:10 verdünntem B-Per, enthaltend 1 mM DTT, wurden zugegeben, und die Suspension wurde bei 20000 U/min (4°C) 20 min lang zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 30 ml verdünntem B-Per, enthaltend 1 mM DTT, wurde die Suspension unter den vorigen Bedingungen zentrifugiert, und das Pellet (Einschlusskörper, enthaltend das S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-eGFP) wurde auf 4°C gehalten.

2.4 Zelldisruption: eGFP

1 mg Biomasse-Pellet wurde in 10 ml B-Per Bacterial Protein Extraction Reagent, enthaltend 1 mM DTT (Dithiothreitol) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension bei 20000 U/min (4°C) 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand enthielt die lösliche Protein-Fraktion mit dem eGFP darin. Das Protein eGFP wurde über Ammoniumsulfat-Fällung abgetrennt. Die Proteinlösung wurde kontinuierlich gerührt auf Eis gehalten. Ammoniumsulfat wurde in einem Mörser gemahlen und in kleinen Portionen zugesetzt. Sättigung von 0-30%, 30-60% und 60-90% wurde eingestellt. Der Niederschlag wurde über 20-minütiges Zentrifugieren bei 25000 U/min (4°C) isoliert. Das Protein, an dem Interesse bestand, wurde in der Fraktion mit einer Kochsalz-Sättigung von 30-60% gefunden. Der Niederschlag wurde in 2 ml MilliQ Wasser (entionisiertes Wasser) gelöst. Die Lösung wurde danach gegen RO-Wasser, enthaltend 1 mM DTT, bei 4°C 24 h lang dialysiert.

2.5 Reinigung des S-Schicht-Fusionsproteins rSbpA-eGFP

Die S-Schicht-Protein-Reinigung wurde auf einem FPLC-Gerät (ÄKTAprime) durchgeführt. Ein Maximum von 0,2 g nassem Pellet (Einschlusskörper) wurde in 2,5 x der Menge des Extraktionspuffers (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5M GHI), enthaltend 1 mM DTT, bei Raumtemperatur 30 min lang suspendiert. Danach wurde die Suspension 30 min lang mit 25.000 U/min bei 4°C zentrifugiert (Beckman, Avanti JA25™). Der Überstand wurde behalten, und ein SDS-PAGE des Pellets und des Überstandes wurde hergestellt. Der Überstand wurde 1:1,5 mit Verdünnungspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl), enthaltend 1 mM DTT, verdünnt. Schließlich wurde die gesamte Menge auf eine Superdex 200™ (GE Healthcare)-Säule aufgetragen, wobei die Pumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 ml/min verwendet wurde. Die S-Schicht-Protein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, gefriergetrocknet und lyophilisiert.

2.6 Reinigung von eGFP

Die Proteinreinigung wurde auf einem FPLC-Gerät (ÄKTAprime) durchgeführt. 2 ml des gelös-

ten Ammoniumsulfat-Niederschlags wurden 16 h lang gegen 150 mM NaCl und 50 mM Tris/HCl, enthaltend 1 mM DTT (Laufpuffer) dialysiert. Schließlich wurden die ~5 ml auf eine Superdex 75™ (GE Healthcare 19-0146-01)-Säule aufgetragen, wobei die Pumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 ml/min verwendet wurde. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, gefriergetrocknet und lyophilisiert. Das Protein war vor dem Gebrauch leicht in Wasser zu lösen, und das Protein-Konzentrat wurde bei 4°C gelagert.

2.7 Herstellung einer monomeren Protein-Lösung des S-Schicht-Fusionsproteins rSbpAeGFP/rSbpA-ZZ

1 mg Protein-Lyophilisat wurde in 1 ml einer Lösung eines chaotropen Mittels (5M GHCl + 50 mM Tris/HCl, pH 7,2) vollständig gelöst. Die S-Schicht-Proteinlösung wurde gegen 3 l destilliertes Wasser, enthaltend 1 mM DTT (nur im Fall von rSbpA-eGFP) dialysiert, um das chaotrope Mittel bei Raumtemperatur zu entfernen. Das S-Schicht-Fusionsprotein musste in Lösung bleiben. Das destillierte Wasser wurde nach 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten gewechselt. Nach dreistündigem Dialysieren wurde die S-Schicht-Fusionsproteinlösung zurückgewonnen. Zusätzliches fünfminütiges Zentrifugieren der Lösung bei 14000 U/min entfernte alle Niederschläge (z.B. Selbst-Anordnungen). Die endgültige Proteinkonzentration wurde über einen Lowry-Test / spektrometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Proteinlösung wurde bei 4°C gelagert.

3. S-Schicht als Klebeschicht

Die Eigenschaft der S-Schicht-Proteine, sich an Oberflächen von wenig Protein-bindendem Charakter (hydrophile Oberflächen) wieder anzuordnen wurde untersucht. Die Menge des S-Schicht-Proteins pro definierter Quadrat-Einheit wurde mit einem Proteintest (quantitativ) und über SDS-PAGE-Analyse (qualitativ) bestimmt. Zur Quantifizierung der S-Schicht-Proteinmenge an bestimmten Oberflächen wurde ein modifizierter Lowry-Test durchgeführt.

3.1 Beschichten von Membranen

Um die Beschichtungslösung in die Membran zu ziehen, wurden die Membranen in eine Amicon-Öffnung integriert. Zuerst wurden 2,5 ml MilliQ-Wasser und danach 2,5 ml Beschichtungspuffer (0,5 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, pH = 9) auf die Membran zur Wiederansammlung der S-Schicht-Proteine aufgetragen. Die Lösungen wurden durch die Membran einmal durchlaufen lassen und danach verworfen. 2 ml des Beschichtungspuffers, enthaltend 0,8 nmol/ml Protein wurden auf die Membran aufgetragen, kurz eingezogen und 4 h lang inkubiert. Die Proteinlösung wurde alle 30 Minuten eingezogen, wobei mäßiger Druck auf die Membran ausgeübt wurde. Der Austrag wurde gesammelt und wieder in die Amicon-Öffnung gefüllt. Nach dem Beschichten wurde die Membran fünfmal mit 5 ml MilliQ-Wasser gewaschen. Die Membran wurde bis zur Verwendung bei 4°C in MilliQ-Wasser gehalten.

3.2 Beschichtung von Glas-Mikrokügelchen

0,8 nmol Protein wurden 10 mg Mikrokügelchen zugesetzt, und die Suspension wurde intensiv geschüttelt, um die Mikrokügelchen ordentlich zu suspendieren. Die Suspension wurde 4 h lang bei Raumtemperatur am Heidolph REAX 2 gehalten. Danach wurden die Mikrokügelchen dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und bis zur Verwendung auf 4°C gehalten.

4. Beweis der Erhaltung der Funktionalität

Diese Testreihen bewiesen, dass die S-Schicht-Fusionsproteine nach dem Beschichtungsvorgang ihre biologische Funktionalität beibehalten. Das Wildtyp-S-Schicht-Protein wtSbpA und die S-Schicht-Fusionsproteine rSbpA-ZZ und rSbpA-eGFP wurden gemäß den Standard-Betriebsbedingungen untersucht. Die Bildung des typischen S-Schicht-Gitters wurde untersucht, entweder in erneuter Anordnung an festen Oberflächen (Silizium-Wafer) mittels Rasterkraftmikrosko-

pie (AFM) oder in Lösung (Bildung von Selbst-Anordnungen) über TEM-Techniken. Außerdem wurde dem immobilisierten und dem freien S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-ZZ humanes IgG angeboten. Danach wurden die hlgG-Moleküle über eine pH-Verschiebung (nach unten auf pH = 3,5) wieder freigegeben und unter Verwendung von ELISA-Techniken und Protein-Tests nachgewiesen. Die Fluoreszenz des rSbpA-eGFP wurde über Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

5. Ergebnisse

5.1. Beweis des Konzepts

5.1.1 wtSbpA

Das S-Schicht-Protein von *Bacillus sphaericus* CCM 2177 SbpA kann sich an festen Trägern wieder anordnen. Dies wurde durch Beschichtungstests unter standardisierten Bedingungen bewiesen (Györvary et al., J. Microsc. Oxford, 212:300-306). Das typische S-Schicht-Muster (quadratisches Gitter) auf Silizium-Wafer wurde über AFM-Techniken beobachtet (Fig. 1).

5.1.2 rSbpA-ZZ

Die Aktivität des S-Schicht-Fusionsproteins rSbpA-ZZ in Lösung wurde im Vergleich zu Protein A (Pierce; Reacti-Bind Protein A) untersucht, um die Qualität des Proteins zu garantieren. Bei den Proteinen wurde humanes IgG angeboten, welches dann mit einem anti-Human-IgG-POX-Konjugat (Sigma, A 0293) unter Verwendung von ELISA-Techniken nachgewiesen wurde (Fig. 2).

Fig. 2 zeigt eine typische ELISA-Kurve für beide Proteine. Sie sagte aus, dass das für diese Testserien benutzte rSbpA-ZZ eine gute hlgG-Bindungsaktivität aufwies.

5.1.3 rSbpA-eGFP

Um die Fähigkeit von rSbpA-eGFP, sich an bestimmten Schnittflächen (z.B. Luft-Flüssigkeit) wieder anzuordnen, zu garantieren, wurde die Bildung von Selbst-Anordnungen in Lösung über TEM-Techniken untersucht. Weiters wurde die Fluoreszenz der konjugierten eGFP-Gruppe an Selbst-Anordnungen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet (Fig. 3).

Fig. 3 zeigt, dass das selbst angeordnete S-Schicht-Fusionsprotein Licht unter UV-Strahlung aussenden konnte.

5.2 Beschichtung von Membranen

Die hydrophilen Membranen Durapor (Millipore) und Micron-PES (Osmonics) wurden für eine Zeitdauer von 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden einer Proteinkonzentration von 0,08 nmol/ml ausgesetzt und danach mit dreimal 5 ml MilliQ-Wasser/pro 5 cm² gewaschen.

Um die Menge an Protein, das wieder angeordnet/haftend an die Membran gebunden war, wurden die vorbehandelten (beschichteten) Membranen in SDS-Lösung gekocht, und die Überstände wurden zur Elektrophorese auf ein SDS-Gel aufgetragen. Fig. 4 stellt eine qualitative Analyse des Proteingehalts jeder Membran dar.

Fig. 4 zeigt eine SDS-PAGE, die anzeigt, dass mehr Protein auf der Micron-PES-Membran als auf der Durapore-Membran war, und dass die Menge des S-Schicht-Proteins wtSbpA viel höher war als die Menge des BSA, das an der Membranoberfläche befestigt war.

Danach wurde ein Protein-Test auf Basis von Lowry verwendet, um die exakte Proteinmenge auf jeder Membran zu quantifizieren. In dieser Testreihe wurde für weitere Funktionalitätsstudien auch ein S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-ZZ (welches eine Human-IgG-Bindungsstelle präsentiert) untersucht.

Tabelle 1: Quantitative Bestimmung des Proteingehalts verschiedener Membran-Systeme.

	Durapore	Micron.PES
Proteine	pmol Protein / cm ²	
BSA	7	13
SbpA	40	97
rSbpA-ZZ	16	91

Die Menge des S-Schicht-Proteins lag deutlich über der Menge des BSA auf der Membran. Weiters wurde die Funktionalität der aktiven Gruppe untersucht. So wurden mit rSbpA-ZZ beschichtete Membranen, die mit DMP vernetzt waren, mit humanem IgG (bei pH = 9,5) inkubiert. Die Membranen mussten mit 40 mM DMP stabilisiert werden, um den weiteren Reaktionsbedingungen standzuhalten. Danach wurde das gebundene hlgG durch eine pH-Verschiebung (pH = 3,5) eluiert, und das hlgG in Lösung wurde mittels ELISA-Techniken bestimmt.

Tabelle 2: Quantitative Bestimmung des Human-IgG, das an mit rSbpA-ZZ vorbeschichtete Membranen gebunden ist

	Sartobind Dicke: 270 µm	RC Membran Dicke: 180 µm
Protein	pmol / cm ²	
rSbpA-ZZ	240	41
Human-IgG	142	25

Etwa 60% der stabilisierten rSbpA-ZZ-Moleküle können hlgG binden. Die Funktionalität der Human-IgG-Bindungsstelle bleibt nach der Immobilisierung, Stabilisierung und Reaktionsprozedur beibehalten.

5.3 Beschichtung von Kisker-Mikrokügelchen

Die Menge des S-Schicht-Proteins, das in der Beschichtungslösung benötigt wird, um eine vollständige Proteinbedeckung der Mikrokügelchen zu garantieren (Fig. 5), wurde bestimmt.

Die Fähigkeit von S-Schicht-Fusionsproteinen, sich an dieser Glasoberfläche wieder anzusammeln, im Vergleich zum Wildtyp-Protein wtSbpA und zum alleinigen Protein BSA wurde untersucht. Die Mikrokügelchen wurden mit 0,008 nmol Protein inkubiert. Nach den Waschschritten wurde der Protein-Gehalt pro mg Kisker-Glaskügelchen durch einen Test auf Lowry-Basis bestimmt.

Tabelle 3: Quantifizierung der Menge der Proteine, die wieder angeordnet / absorbiert an Kisker-Glaskügelchen waren

Protein	Protein-Gehalt [pmol/mg]
BSA	16
rSbpA-LamA	44

Protein	Protein-Gehalt [pmol/mg]
rSbpA-eGFP	48
rSbpA-ZZ	30
SbpA-Wildtyp	48

Das S-Schicht-Protein wtSbpA zeigte dieselbe Menge pro mg Glaskügelchen. Im Vergleich zu BSA waren dreimal mehr S-Schicht(fusions)proteine auf den Glaskügelchen. Um zu beweisen, dass die S-Schicht-Fusionsproteine ihre funktionelle Aktivität nach dem Beschichtungsprozess beibehielten, wurden die IgG-Bindung von rSbpA-ZZ und die Fluoreszenz von rSbpA-eGFP untersucht.

Humanes IgG wurde an mit rSbpA-ZZ beschichtete Glaskügelchen gebunden, was mit einem Anti-IgG(Ziegen)FITC-Konjugat visualisiert wurde. Die nachfolgenden Fluoreszenzmikroskopie-Bilder zeigten Kisker-Glasmikrokügelchen mit und ohne rSbpA-ZZ-Beschichtung, 20x vergrößert. Die Fähigkeit von rSbpA-ZZ, humanes IgG zu binden, bleibt nach dem Beschichtungsvorgang beibehalten.

Das S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-eGFP hat die Fähigkeit, Fluoreszenz zu emittieren. Die Beibehaltung dieser Fähigkeit nach dem Beschichtungsvorgang wurde auch über Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Nikon Eclipse E400 mit 100W Hg-Lampe zur Erregung und integrierter Digital-Kamera: DS Camera Control Unit DS-L1 und DS Camera head DS-5M).

Fig. 7 Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von mit rSbpA-eGFP beschichteten Kisker-Glaskügelchen (links) und Kisker-Glaskügelchen alleine (rechts). Belichtungszeit: 20 s.

Im Vergleich zu unbeschichteten Glas-Mikrokügelchen zeigten die mit rSbpA-eGFP beschichteten ein Fluoreszenz-Signal. Wie erwartet ist das Signal schwach (lange Belichtungszeit ist notwendig) infolge der Monolayer-Beschichtung.

Eine Kamera (DS Camera Control Unit DS-L1 und DS Camera head DS-5M) wurden verwendet, um Kopien der Mikroskop-Bilder aufzubewahren.

Die Bezeichnung der Belichtungszeit der Kamera erfolgte, weil dieser Faktor von der Schicht-Dicke des an den Glaskügelchen wieder angeordneten Proteins, und somit von der Menge der Moleküle, die Fluoreszenz emittieren, pro definierter Quadrateinheit abhängt. Eine hohe Belichtungszeit weist auf eine Monolayer-Bildung des S-Schicht-Fusionsproteins rSbpA-eGFP hin im Vergleich zu Glaskügelchen alleine, die keinerlei Fluoreszenz aufweisen, selbst bei sehr langen Belichtungszeiten, und mit FITC markiertem IgG, die nicht in einer Monolayer gebunden sind (IgG-Cluster) und daher mehr Fluoreszenz-Licht emittieren.

Die Fähigkeit von rSbpA-ZZ, IgG zu binden, bleibt nach dem Beschichtungsvorgang beibehalten. Das S-Schicht-Fusionsprotein rSbpA-eGFP hat die Fähigkeit, Fluoreszenz zu emittieren. Die Beibehaltung dieser Fähigkeit nach dem Beschichtungsvorgang wurde ebenfalls über Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

6. Schlussfolgerung

Die S-Schicht-Proteine können hydrophile Membranen mit niedrigen Proteinbindungseigenschaften beschichten. Die Gesamtmenge an S-Schicht-Protein/S-Schicht-Fusionsprotein an der hydrophilen Membran-Oberfläche ist 6 mal höher als die Menge des BSA an derselben Oberfläche. Die Funktionalität des Proteins bleibt erhalten. rSbpA-ZZ kann nach dem Immobilisierungsvorgang noch immer humanes IgG binden. Weiters weist dies darauf hin, dass die funktionelle Gruppe in richtiger Weise von der Oberfläche weg exponiert ist (keine umgedrehte

Orientierung). Die S-Schicht-Proteine können sich auf reinen Glaskügelchen in größerem Ausmaß als BSA wieder ansammeln. Das wtSbpA und die S-Schicht-Fusionsproteine zeigten im Vergleich zu BSA 2,5 mal mehr Protein auf der Oberfläche der Glaskügelchen. In allen Fällen konnte bewiesen werden, dass die Biofunktionalität der S-Schicht-Fusionsproteine erhalten bleibt und dass die funktionellen Gruppen korrekt exponiert sind.

Patentansprüche:

1. Mit S-Schicht-Protein oder S-Schicht-Glykoprotein überzogene Oberfläche, *dadurch gekennzeichnet*, dass die unbedeckte Oberfläche eine Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, hat und dass die Oberfläche zumindest teilweise mit einem S-Schicht-Protein-Gitter bedeckt ist.
2. Mit Protein überzogene Oberfläche nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die unspezifische Bindungskapazität des Proteins weniger als $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mehr bevorzugt weniger als $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen.
3. Mit Protein überzogene Oberfläche nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche hydrophil ist.
4. Mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche hydrophile funktionelle Gruppen, vorzugsweise Hydroxylgruppen, aufweist.
5. Mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche Teil einer Membran, vorzugsweise einer porösen Membran, eines Kügelchens, eines kugelförmigen Körpers, einer Folie bzw. eines Objektträgers, einer filamentösen Struktur, einer Säule, eines Röhrchen, Teilchens oder einer Platte ist.
6. Mit Protein überzogene Oberfläche nach Anspruch 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Membran und/oder die Oberfläche der Membran ein Polymer umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylchlorid, Celluloseacetat, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylensulfon und Polysulfon.
7. Mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus S-Schicht-Proteinen oder S-Schicht-Glykoproteinen von gram-positiven und gram-negativen prokaryontischen Organismen und vorzugsweise von Bakterien, mehr bevorzugt z.B. von *Bacillus* oder *Lactobacillus Sp.*, insbesondere *B. subtilis* SbpA (NCBI AAF22978).
8. Mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein ein natürliches oder rekombinantes Wildtyp-S-Schicht-Protein, ein chemisch modifiziertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Fusionsprotein, ein trunkiertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Glykoprotein, ein vollständiges oder trunkiertes S-Schicht-Protein mit einer hinzugefügten Funktionalität am N- oder am C-terminalen Ende des S-Schicht-Teils, ein S-Schicht-Glykoprotein oder eine S-Schicht-Protein-Mutante ist.
9. Mit Protein überzogene Oberfläche nach Anspruch 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin, Antikörpern, Antigenen, Affinitätskörpern, Enzymen, Rezeptoren, Liganden, Peptiden, Kohlehydraten u. dgl. mit dem S-Schicht-Protein oder einem S-Schicht-Protein-Derivat am C- oder N-Terminus des S-Schicht-Proteins oder intern fusioniert ist.

10. Mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 9, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein-Gitter an der Oberfläche eine unspezifische Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, hat.
11. Filtermembran, umfassend eine mit Protein überzogene Oberfläche nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
12. Verfahren zur Herstellung einer mit S-Schicht-Protein überzogenen Oberfläche, umfassend die Schritte:
- Vorsehen einer unbedeckten Oberfläche mit einer Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen,
 - Kontaktieren und Inkubieren der Oberfläche mit einem S-Schicht-Protein und
 - gegebenenfalls Waschen und Lagern der mit S-Schicht-Protein bedeckten Oberfläche.
13. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass die unspezifische Bindungskapazität des Biomoleküls weniger als $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, vorzugsweise weniger als $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mehr bevorzugt weniger als $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ist, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche hydrophil ist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche hydrophile funktionelle Gruppen, vorzugsweise Hydroxylgruppen, aufweist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oberfläche Teil einer Membran, vorzugsweise einer porösen Membran, eines Kügelchens, eines kugelförmigen Körpers, einer Folie bzw. eines Objektträgers, einer filamentösen Struktur, einer Säule, eines Röhrchens, eines Teilchens oder einer Platte ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Membran und/oder die Oberfläche der Membran ein Polymer umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Polyvinylchlorid, Celluloseacetat, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylensulfon und Polysulfon.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein oder Glykoprotein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus S-Schicht-Proteinen oder Glykoproteinen von gram-positiven und gram-negativen prokaryontischen Organismen, vorzugsweise von Bakterien, mehr bevorzugt von *Bacillus* oder *Lactobacillus Sp.*, insbesondere SbpA (NCBI AAF22978).
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein ein natürliches oder rekombinantes Wildtyp-S-Schicht-Protein, ein chemisch modifiziertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Fusionsprotein, ein trunkiertes S-Schicht-Protein, ein S-Schicht-Glykoprotein, ein vollständiges oder trunkiertes S-Schicht-Protein mit einer hinzugefügten Funktionalität am N- oder am C-terminalen Ende des S-Schicht-Teils, ein S-Schicht-Glykoprotein oder eine S-Schicht-Protein-Mutante ist.
20. Verfahren nach Anspruch 19, *dadurch gekennzeichnet*, dass ein Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Streptavidin, Antikörpern, Antigenen, Affinitätskörpern, Enzymen, Rezeptoren, Liganden und Peptiden u. dgl. mit dem S-Schicht-Protein oder einem S-Schicht-Protein-Derivat am C- oder N-Terminus des S-Schicht-Proteins oder intern fusioniert ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20, *dadurch gekennzeichnet*, dass das S-Schicht-Protein-Gitter an der Oberfläche eine unspezifische Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels BSA-Bindungstest gemessen, hat.

- 5 22. Set zur Herstellung einer mit S-Schicht-Protein überzogenen Oberfläche, insbesondere eines mit S-Schicht-Protein überzogenen Filters, umfassend:
- eine Oberfläche mit einer Biomolekül-Bindungskapazität von weniger als $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie mittels dem BSA-Bindungstest gemessen, und
 - S-Schicht-Protein.

10

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

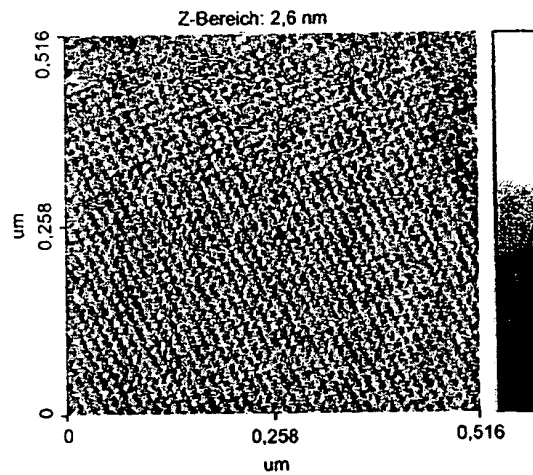


FIG. 1

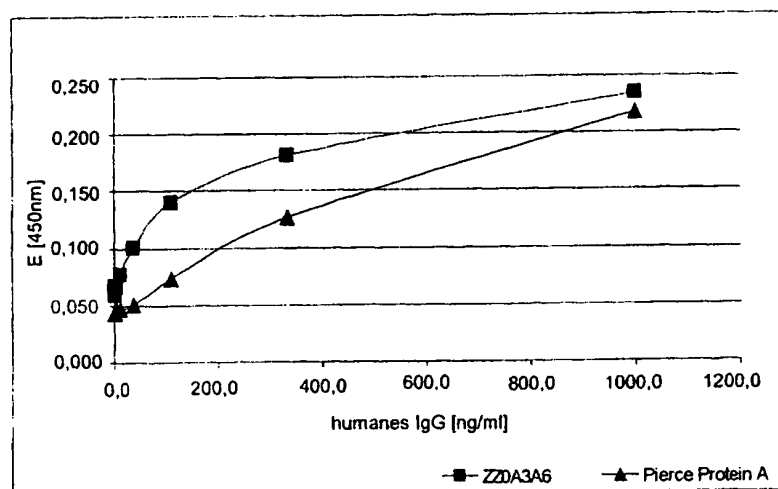


FIG. 2

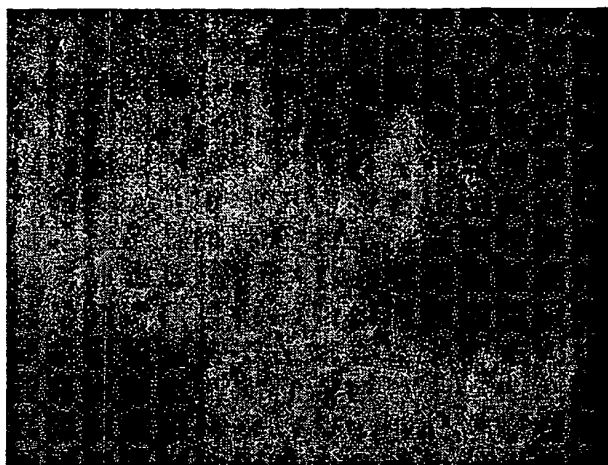


FIG. 3

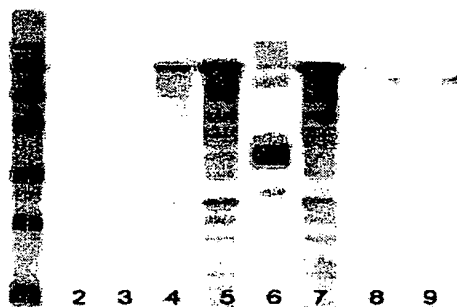


FIG. 4

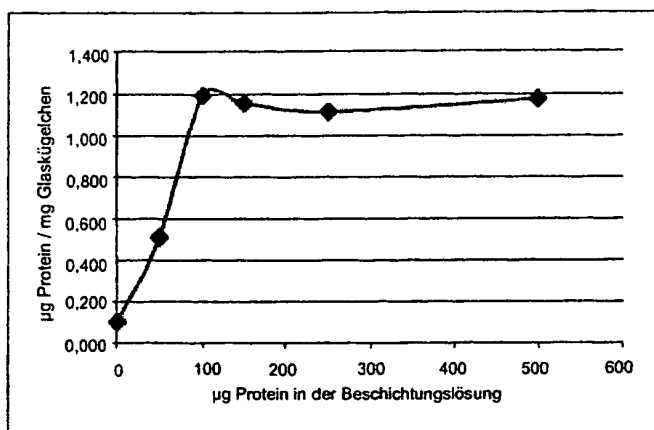


FIG. 5

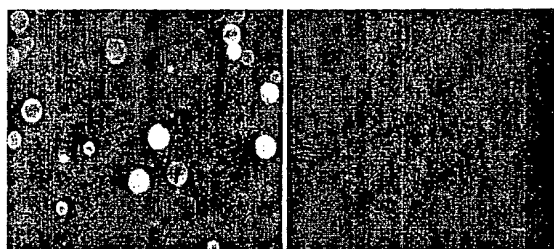


FIG. 6

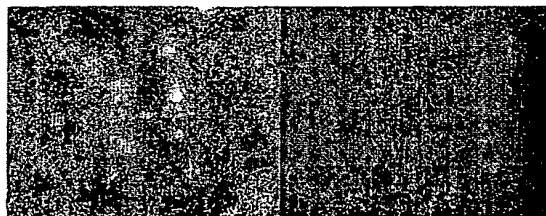


FIG. 7