



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 373 T2** 2006.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 792 357 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 373.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/12959**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 938 187.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/016168**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **30.05.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.09.1997**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **10.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/11 (2006.01)**

**C07K 1/107 (2006.01)**

**C07K 14/435 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**343264 21.11.1994 US**

(73) Patentinhaber:

**Protein Polymer Technologies, Inc., San Diego,  
Calif., US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**STEDRONSKY, Erwin R., San Diego, US**

(54) Bezeichnung: **CHEMISCHE VERÄNDERUNG VON REPETITIVEN POLYMEREN ZUR ERHÖHUNG DER WASSER-  
LÖSLICHKEIT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Technisches Gebiet

**[0001]** Das Gebiet dieser Erfindung sind chemisch modifizierte, wasserlösliche Proteinpolymere.

### Hintergrund

**[0002]** Proteinpolymere wurden bisher mit wiederkehrenden Domänen mit unterschiedlicher Blockgröße und unterschiedlichem Massenverhältnis synthetisiert. Je nach Art der wiederkehrenden Domäne können Polymere dieser Art eine stark geordnete Struktur aus  $\beta$ -Faltblättern bilden. Im Allgemeinen nimmt die Löslichkeit des Polymers in Wasser mit steigender Gesamtanzahl solcher Blöcke in einem Polymer ab. Außerdem ist die Regelmäßigkeit dieser Proteine aus synthetisierten Grundeinheiten viel stärker als die von Proteinen aus natürlich vorkommenden Grundeinheiten, aus denen die synthetisierten Proteinpolymere hergestellt werden. In den extremsten Fällen sind Proteine aus fast 100 % seideähnlichen Blöcken vollkommen unlöslich in Wasser.

**[0003]** Die meisten Kunststoffe weisen hydrophobe Oberflächen auf. Bei vielen Anwendungen, z.B. bei Zellkulturen und Immundiagnosen, ist es entscheidend, eine hydrophile Oberfläche zu erhalten, die durch wässrige Flüssigkeiten benetzt wird. Derzeitige Behandlungen, die im Handel angewendet werden, umfassen Plasmabehandlungen, um die Bildung von ionisierbaren chemischen Gruppen auf der Oberfläche auszulösen, Oxidation unter Bestrahlungsbedingungen oder die Ablagerung von Tensiden auf der Oberfläche.

**[0004]** Bei vielen solchen Anwendungen ist es wünschenswert, die Tensid- und Adhäsionseigenschaften solcher stark geordneten Proteinpolymere zu nutzen, indem diese Proteine auf hydrophoben Oberflächen von wässrigen Lösungen abgeschieden werden. Aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Wasser müssen solche Proteinpolymere jedoch unter Verwendung von Lösungsmitteln mit starker Wasserstoffbindung, wie z.B. > 85 % Ameisensäure, oder unter Verwendung von konzentrierten wässrigen Lösungen von Salzen weit oben in der Hofmeisterschen Reihe, wie z.B. 4,5 M Lithiumperchlorat oder Lithiumbromid, löslich gemacht werden.

**[0005]** Solche Lösungsmittel bringen im täglichen Gebrauch jedoch Nachteile mit sich. > 85 % Ameisensäure ist zwar ein gutes Lösungsmittel und vollkommen flüchtig, ist aber korrosiv, und seine Dämpfe sind schädlich. Wenn die wässrigen Salzlösungen verwendet werden, sind die Salzlückstände korrosiv und schädlich. Es kann zwar ein Beschichtungsverfahren verwendet werden, das damit beginnt, eine relativ konzentrierte Stammlösung eines Proteinpolymers in einem Lösungsmittel, wie es oben beschrieben ist, herzustellen, wonach mithilfe von Wasser als Verdünner die geeigneten Arbeitskonzentrationen hergestellt werden, aber dieser Ansatz löst die oben genannten Probleme nicht. Außerdem sind diese verdünnten Arbeitslösungen häufig metastabil und ändern ihre Abscheidungseigenschaften im Laufe der Zeit.

**[0006]** Die schädlichen und korrosiven Komponenten der existierenden Lösungsmittelsysteme komplizieren die Entwicklung von Beschichtungsverfahren, die Proteinpolymere mit stark geordneten Strukturen umfassen. Deshalb wären Verfahren zur Modifikation solcher Proteinpolymere, um ihre Löslichkeit in Wasser zu verbessern, von großem Wert.

### Relevante Literatur

**[0007]** Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen aus wiederkehrenden Blöcken sind im US-Patent Nr. 5.243.038, das am 7.9.1993 erteilt wurde; und in der internationalen Anmeldung PCT/US89/05016, veröffentlicht als WO90/05177, beschrieben.

**[0008]** Die DE 19 04 108 offenbart Verfahren zur Hydroxyalkylierung von bestimmten Proteinen, insbesondere Albumin, Weizengluten, Sojahydrolysat und Casein.

**[0009]** Die FR 2.063.335 offenbart ein Verfahren zur Veresterung von Gelatine zur Verwendung in Kosmetika.

**[0010]** Die US 4.224.219 offenbart ein Verfahren zur Behandlung von Maisproteinen, insbesondere Zein oder Maisgluten, mit einem Alkylenoxid, um ein Derivat zu erhalten, das in einem mäßig alkalischen wässrigen Medium löslich ist.

**[0011]** Canella et al., Lebensmittel-Wiss. Technol. 12(2), 95–101 (1979), offenbaren Verfahren zur Succinylierung und Acetylierung von Sonnenblumenproteinen, um ihre physikochemischen Eigenschaften als Nah-

rungsmittelzusatz zu verbessern.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Bereitgestellt werden Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung und Verwendung von wasserlöslichen, Grundeinheiten umfassenden Proteinen durch chemische Modifikation von wasserunlöslichen, Grundeinheiten umfassenden Proteinen aus wiederkehrenden Blöcken mit der in den beiliegenden Ansprüchen definierten Aminosäuresequenz. Die Löslichkeit des Proteins in Wasser wird durch die Umsetzung eines polaren Reaktanten mit geringem Molekulargewicht mit verfügbaren Funktionalitäten auf dem Protein erhöht. Das resultierende Produkt ist wasserlöslich, kann auf Kunststoff aufgetragen werden und haftet fest daran und behält aktive funktionelle Sequenzen bei, insbesondere biologische funktionelle Sequenzen, die in der Ausgangsverbindung vorhanden waren.

#### BESCHREIBUNG SPEZIFISCHER AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0013]** Bereitgestellt werden Verfahren und Zusammensetzungen, wodurch Proteine, die einen Block aus Grundeinheiten aus 3–30 Aminosäuren umfassen und geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, durch das Hinzufügen von organischen Gruppen mit geringem Molekulargewicht zu verfügbaren Funktionalitäten chemisch modifiziert werden, um Produkte zu erhalten, die wasserlöslich sind, aber fest an einer Kunststoffoberfläche haften, auch in Gegenwart eines wässrigen Mediums über einen längeren Zeitraum. Von besonderem Interesse sind Proteine mit hohem Molekulargewicht, worin große Bereiche aus kleinen Grundeinheiten einen Hauptteil des Proteins ausmachen.

**[0014]** Die Proteine weisen typischerweise ein relativ hohes Molekulargewicht über etwa 6 kD, üblicherweise über etwa 10 kD, vorzugsweise über 20 kD, und im Allgemeinen unter etwa 250 kD, üblicherweise unter etwa 150 kD, meist unter etwa 125 kD, auf. Das Protein ist normalerweise repetitiv, d.h. es besteht aus wiederkehrenden Grundeinheiten, worin eine einzelne Einheit aus 3–30 Aminosäuren (9–90 Nucleotiden), häufiger 3–25 Aminosäuren (9–75 Nucleotiden), vorzugsweise 4–15 Aminosäuren (12–45 Nucleotiden), noch bevorzugter 4–12 Aminosäuren (12–36 Nucleotiden), besteht, wobei üblicherweise die gleiche Aminosäure zumindest zweimal in der gleichen Einheit vorkommt, im Allgemeinen durch zumindest eine Aminosäure getrennt. Großteils bestehen die natürlich vorkommenden Grundeinheiten aus etwa 4 bis 8 Aminosäure-Grundeinheiten, insbesondere 4 bis 6 Aminosäureeinheiten. Unterschiedliche Kombinationen aus Aminosäure-Grundeinheiten können zusammengesetzt werden, um ein Blockcopolymer oder alternierendes Blockcopolymer zu bilden.

**[0015]** Ein wesentlicher Teil der gesamten Aminosäuren eines Proteins weist eine reaktive Funktionalität auf, einschließlich Hydroxy-, Sulfhydryl-, Carboxy- und Amino-, insbesondere Hydroxy- oder Sulfhydrylgruppen, z.B. Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein, Lysin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Üblicherweise bei zumindest 2 der Anzahl an Aminosäuren, häufiger zumindest etwa 5 % der Anzahl, vorzugsweise zumindest etwa 10 % der Anzahl, aber üblicherweise nicht mehr als etwa 30 %, häufiger nicht mehr als etwa 20 %, sind die reaktiven Funktionalitäten an der Funktionalisierung des Proteins beteiligt. Wünschenswerterweise ist die reaktive Gruppe Hydroxy, worin die an der Funktionalisierung beteiligte Hydroxygruppe je nach funktionalisierender Gruppe variieren kann, z.B. reagiert Tyrosin mit einem Oxiran und Serin mit einem Sulfonyl.

**[0016]** Für die Modifikation geeignete Proteine weisen eine stark geordnete, üblicherweise halbkristalline Struktur mit einem hohen Anteil an verlängerten  $\beta$ -Konformationen und  $\beta$ -Schleifenkonformationen auf.

**[0017]** Die Proteinlöslichkeit in entionisiertem Wasser bei Umgebungsbedingungen beträgt üblicherweise weniger als etwa 1,0 mg/ml, häufiger weniger als etwa 0,1 mg/ml. Nach der genannten chemischen Modifikation beträgt die Löslichkeit bei Umgebungsbedingungen zumindest etwa 10 mg/ml, häufiger zumindest etwa 100 mg/ml.

**[0018]** Das Protein wird durch Umsetzung mit einem funktionalisierenden Reagens, z.B. einem Alkylierungsmittel oder einem Acylierungsmittel, modifiziert, wobei ein einzelnes Reagens oder eine Kombination von Reagenzien, die üblicherweise aus nicht mehr als etwa 3 Reagenzien, häufiger nicht mehr als etwa 2 Reagenzien, besteht, verwendet werden kann. Geeignete Reagenzien weisen etwa 2 bis 8, häufig 2 bis 6, Kohlenstoffatome, üblicherweise 2 bis 4 Kohlenstoffatome, wenn es sich nicht um Ammonio handelt, und üblicherweise 5 bis 8 Kohlenstoffatome bei Ammonio auf, und umfassen 1 bis 4 Heteroatome, die Chalkogene (Sauerstoff und Schwefel) und Stickstoff sind, vor allem als Amino mit 1 bis 4 Substituenten. Funktionalitäten umfassen Epoxide mit 2 bis 4; üblicherweise 2 bis 3, Kohlenstoffatomen, Acylgruppen mit 2 bis 8, üblicherweise 2 bis 6, Kohlenstoffatomen, worin die Acylgruppe 0 bis 2 Oxygruppen mit 0 bis 2 Kohlenstoffatomen aufweisen kann, oder

Aminogruppen mit 0 bis 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere Ammonio, Lactone mit 3 bis 5 Kohlenstoffatomen, insbesondere Sulfonatlacton (Sulton) mit etwa 3 bis 8 Kohlenstoffatomen, und substituiertes aktives Olefin oder aktives Halogen mit etwa 2 bis 8 Kohlenstoffatomen, üblicherweise 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise 2 bis 3 Kohlenstoffatomen, wenn es sich nicht um wie oben beschrieben substituiertes Ammonio mit üblicherweise 1 bis 3 Heteroatomen handelt. Die resultierenden Substituenten umfassen Hydroxyethyl, Hydroxypropyl, Dihydroxypropyl, Dihydroxybutyl, Carboxymethyl, Carboxyethyl, Cyanoethyl, Trimethylammonioethyl, 2-Hydroxy-4-dimethylammonioethyl, Sulfonatopropyl, Trimethylammonioacetyl, Methoxyacetyl und dergleichen. Spezielle Reaktanten umfassen Ethylenoxid, Propylenoxid, Hydroxypropylenoxid, Epichlorhydrin, Chloressigsäure, Trimethylammonioethylchlorid, Trimethylammoniopropylenoxid, Acrylnitril, Methacrylamid, Dimethylaminoethylchloridhydrochlorid usw. Die Reaktion wird üblicherweise durch eine nucleophile Substitution am Kohlenstoff des Reagens stattfinden, mit Retention des Aminosäureheteroatoms, insbesondere durch eine basenkatalysierte nucleophile Substitution.

**[0019]** In einem ersten Schritt wird das Protein in einer geeigneten Lösung, in der die Reaktion stattfinden kann, löslich gemacht, üblicherweise unter Verwendung von konzentrierten wässrigen Lösungen von Salzen, die in der Hofmeisterschen Reihe weit oben sind und deren Anionen gegenüber dem/den funktionalisierenden Reagens/Reagenzien im Wesentlichen inert sind, wobei ihre Konzentration zumindest etwa 2 M, üblicherweise zumindest etwa 4,5 M, beträgt. Beispiele für geeignete Hofmeister-Salze sind Lithiumperchlorat und Kaliumsulfat. Bei basenkatalysierten Reaktionen kann der pH der Lösung dann auf zumindest etwa 9, häufiger zumindest etwa 11, oder zumindest etwa 10 erhöht werden, je nach Art des organischen Reagens. Das funktionalisierende Reagens wird üblicherweise in einem zumindest 2fachen molaren Überschuss, üblicherweise zumindest etwa 10fachen Überschuss, zugesetzt, je nach den für eine bestimmte Reaktion verfügbaren reaktiven Gruppen in der Proteinzusammensetzung. Die Reaktion findet solange statt, bis etwa 1 % der reaktiven Aminosäurereste modifiziert wurde, häufiger zumindest etwa 10 % der reaktiven Reste modifiziert wurden, und üblicherweise nicht mehr als etwa 80 %, häufiger nicht mehr als etwa 60 %, der reaktiven Reste modifiziert wurden. Bei Raumtemperatur ist die Reaktion üblicherweise nach etwa 6 Stunden, häufiger etwa 3 Stunden, abgeschlossen. Die Reaktion wird gestoppt, indem der pH auf etwa 7,0 bis 7,5 gesenkt wird. Das modifizierte Protein kann durch herkömmliche Verfahren gereinigt werden.

**[0020]** Je nach den gewählten Bedingungen kann ein gewisser Abbau des Proteins stattfinden. Werden stark basische Bedingungen über einen längeren Zeitraum gewählt, z.B. > 2 M für > 1 h, kann, vor allem bei hoher Ionenstärke, z.B. > 2 M LiClO<sub>4</sub>, das Molekulargewicht des Proteins um etwa die Hälfte verringert werden. Deshalb kann durch die Wahl der Reaktionsbedingungen ein Produkt erhalten werden, das ein geringeres oder etwa das gleiche Molekulargewicht aufweist wie das Protein, plus dem zusätzlichen Gewicht des Reagens.

**[0021]** Proteine von Interesse umfassen Strukturproteine, wie z.B. elastin-, collagen-, keratin- und seideähnliche Proteine, vorzugsweise synthetische Proteinpolymere, insbesondere Proteine, die aus seideähnlichen Proteingrundeinheiten bestehen, worin Blöcke aus Grundeinheiten, im Allgemeinen Blöcke aus 2 bis 50 Grundeinheiten, durch Sequenzen aus etwa 3 bis 50, häufiger 3 bis 35, Aminosäuren getrennt sind, die eine Sequenz mit chemischer oder physiologischer Aktivität, z.B. Zellrezeptorbindung, umfassen, wie etwa in Basalmembranproteinen, Liganden für Rezeptoren, homing-Proteinen usw. Diese Proteine enthalten die RGDS-Sequenz (Fibronectin), die IKVAV-Sequenz (Laminin), Cystein, Lysin, Asparaginsäure, Histidin usw. und andere Gruppen, wie in den US-Patentanmeldungen Nr. 609.716 und 114.618 (zusammen den US-Patenten Nr. 6.184.348; 6.140.072; 6.018.030; 5.830.713; 5.773.249; 5.770.697; 5.723.588; 5.641.648; 5.606.019; 5.514.581; 5.496.712 und 5.243.038 entsprechend) und in der PCT/US87/02822 (veröffentlicht als WO88/03533) und in der PCT/US89/05016 (veröffentlicht als WO90/05177) beschrieben ist, worin zahlreiche wiederkehrende Grundeinheiten sowie unterschiedliche dazwischenliegende Sequenzen beschrieben sind. Die Polypeptide können natürliche, chemisch synthetisierte oder rekombinante Proteine sein, einschließlich modifizierter Formen, wie z.B. Mutanten und Fusionsprodukte.

**[0022]** Seideähnliche Proteine weisen als Grundeinheit GAGAGS auf (G = Glycin; A = Alanin; S = Serin). Diese Grundeinheit ist in einem natürlich vorkommenden Seidefibrinprotein enthalten. Der N-Terminus und der C-Terminus können unterschiedliche Sequenzen sein, im Allgemeinen aus etwa 1 bis 125 Aminosäuren, üblicherweise etwa 1 bis 60 Aminosäuren, die üblicherweise weniger als 20 %, häufiger weniger als etwa 10 % der gesamten Aminosäuren des Proteins ausmachen. Größtenteils weisen die Aminosäuren kein bestimmtes Muster in den terminalen Sequenzen auf. Von besonderem Interesse sind Proteine, welche die Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften von Seide des Bombyx mori nachahmen. Im Allgemeinen sind unterschiedliche Termini das Ergebnis der Insertion des Gens in einen Vektor auf eine Weise, die zur Expression eines Fusionsproteins führt. Jedes beliebige Protein, das die gewünschten Eigenschaften des Produkts nicht beeinträchtigt, kann den einen oder anderen Terminus bereitstellen. Insbesondere endogene Wirtsproteine,

z.B. bakterielle Proteine, können eingesetzt werden. Die Termini sind in der vorliegenden Erfindung nicht entscheidend, sondern dienen hauptsächlich der einfacheren Handhabung, sollten aber die gewünschten Eigenschaften des Proteins nicht beeinträchtigen, und außerdem können sie auf eine proteolytische Spaltung ausgerichtet sein.

**[0023]** Von besonderem Interesse ist ein Motiv mit einer Basensequenz aus etwa 2 bis 10, vorzugsweise 8 bis 9, einzelnen Grundeinheiten, üblicherweise durch eine Sequenz aus etwa 5 bis 160 Aminosäuren, üblicherweise 8 bis 50 Aminosäuren, getrennt, die eine innere Wiederholung aufweisen können, die sich von der einzelnen Grundeinheit aus 3 bis 30 Aminosäuren unterscheidet, was normalerweise zur Modifikation der physikalischen Eigenschaften und der Struktur des Proteins führt. Durch die Einführung von Elastinwiederholungen in einem fibroinähnlichen Polymer kann beispielsweise größere Elastizität und Flexibilität im Vergleich zum fibroinähnlichen Polymer erreicht werden. Somit können Blockcopolymerere bereitgestellt werden, worin die Eigenschaften je nach Art der Homopolymere der einzelnen Grundeinheiten variieren. Die Gesamtanzahl an Basigrundeinheiten liegt im Allgemeinen im Bereich von etwa 50 bis 300, üblicherweise 75 bis 250.

**[0024]** Physikalische Messungen an gereinigten seideähnlichen Proteinen, die durch Rekombinationsverfahren hergestellt und danach beschrieben wurden, bestätigen das Modell der Faltblattkonformationen mit antiparallelen Ketten für die kristallinen Regionen von Bombyx-mori-Seidefibroin. Zirkulardichroismus-(CD-) und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie-(FTIR-) Analysen bestätigen einen hohen Grad an großen  $\beta$ - und  $\beta$ -Schleifenkonformationen. Vergleiche zwischen dem Spektrum eines seideähnlichen Proteins (SlpIII, in den oben genannten Patenten beschrieben) und dem eines natürlich vorkommenden Seidefibroins in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen, dass SlpIII in Lösung aus einem Gemisch aus den ungeordneten und stark geordneten Strukturen besteht, die in Seidefibroinen vorkommen.

**[0025]** Ein seideähnliches Protein mit dazwischenliegenden RGDS-Sequenzen (in den oben genannten Patenten als SLPF- oder FCB-SLP-Protein bezeichnet und als ProNectin<sup>®</sup>-F von Protein Polymer Technologies, Inc., San Diego, CA, erhältlich) ist dadurch charakterisiert, dass es starkes Adhäsionsvermögen aufweist. Beim Beschichten einer Kunststoff- oder Glasoberfläche, z.B. Polystyrol, Bioglas, Polyacrylate usw., vor allem beim Wärmeformen und Extrudieren von Kunststoffen, wird eine Beschichtung mit starker Adhäsion erhalten, die in einer Zellkultur über einen längeren Zeitraum, z.B. 30 Tage oder länger, stabil ist. Nach der Modifikation wurde keine wesentliche Veränderung der oben definierten Adhäsionseigenschaften nachgewiesen.

**[0026]** Die Proteinverbindungen können als wässrige Lösungen bereitgestellt werden, worin der Salzgehalt nicht mehr als 1 M, normalerweise weniger als etwa 0,5 M, beträgt und können entionisiertes Wasser sein. Üblicherweise ist die Proteinverbindung in der wässrigen Lösung in einer Menge von zumindest etwa 0,001 Gew.-% vorhanden, kann aber auch 0,01 Gew.-% oder mehr betragen, liegt aber üblicherweise nicht über 90 Gew.-%, und das Ganze kann als Lösung zur direkten Verwendung zum Beschichten oder für andere Zwecke, als Konzentrat aus zumindest etwa 10 Gew.-% oder als Zusammensetzung mit anderen Komponenten, die für den gewünschten Zweck geeignet sind, bereitgestellt werden. Die jeweilige Konzentration des Proteins in der Lösung hängt von der Art des Proteins, von seiner Löslichkeit, von der beabsichtigten Anwendung, von anderen Komponenten in der Lösung und dergleichen ab. Das Auftragen von biologisch funktionellen Proteinen auf Kunststoffsubstrate kann bei extrem geringen Konzentrationen stattfinden, während Lösungen zum Spinnen von Fasern eine hohe Konzentration aufweisen.

**[0027]** Die modifizierten Proteine sind vor allem zum Beschichten von Kunststoffoberflächen geeignet. Die erhöhte Wasserlöslichkeit ermöglicht Beschichtungsverfahren in nichttoxischen Lösungsmittelsystemen, wobei verschiedene Auftrageverfahren eingesetzt werden können, ohne sich um die Gefahren der früher verwendeten Lösungsmittel Gedanken machen zu müssen. Da viele Anwendungen den Kontakt mit lebensfähigen biologischen Zellen oder solchen Geweben umfassen, sind biokompatible Kunststoffe insbesondere bevorzugt. Biokompatible Kunststoffe sind typischerweise nicht toxisch und biochemisch inert. Beispiele für biokompatible Kunststoffe umfassen Polycaprolacton, Polycarbonat, Polydimethylsiloxan (Silikonkautschuk), Polydioxanon, Polyetherurethan, Polyethylen und Polyethylenterephthalat, Polyglykolsäure und Polymilchsäure und PLGA-Copolymere, Polystyrol, Polyhydroxyethylmethacrylat (HEMA), Polymethylmethacrylat (Acryl), Polyvinylchlorid (PVC) usw.

**[0028]** Das Kunststoffsubstrat kann unterschiedliche Formen aufweisen, wobei das Kunststoffsubstrat Laborware, z.B. eine Petrischale, ein Kulturkolben, ein Erlenmeyerkolben, ein Objektträger, eine Rollflasche, eine Mikrotiterplatte oder dergleichen, auf die eine festhaftende Beschichtung aufgetragen werden soll, um beispielsweise Zellen darin zu züchten; eine Vorrichtung, auf der eine festhaftende Proteinbeschichtung aufgetragen werden soll, wie z.B. eine Vorrichtung, die in vivo eingeführt wird, worin die unbeschichtete Kunststoffo-

berfläche der Vorrichtung zu einer nachteiligen physiologischen Reaktion führen kann; und Fasern oder Filme, wobei die Oberflächeneigenschaften des Materials modifiziert werden sollen; und dergleichen sein kann. Die Lösung kann durch Anstreichen, Aufsprühen, Eintauchen oder Einweichen auf die Oberfläche aufgetragen werden.

**[0029]** Die Lösungen können auch Additive, wie z.B. Stabilisatoren, Puffer, Detergenzien, Verteilungsmittel oder dergleichen, enthalten, die im Allgemeinen insgesamt weniger als etwa 5 Gew.-% der Lösung, häufig weniger als etwa 1 Gew.-% der Lösung, ausmachen.

**[0030]** Die nachstehenden Beispiele dienen der Veranschaulichung und nicht der Einschränkung.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

**[0031]** Die Namen der Polymere und ihre Herstellung sind im US-Patent Nr. 5.243.038 und in der Anmeldung mit der Seriennummer 07/609.716, eingereicht am 6. November 1990, sowie in den entsprechenden US-Patenten Nr. 6.184.348; 6.140.072; 5.830.713; 5.773.249; 5.723.588; 5.641.648; 5.606.019; 5.514.581 und 5.496.712 zu finden.

**[0032]** SLPF (ProNectin<sup>®</sup>-F, Protein Polymer Technologies, Inc., San Diego, CA, USA) (100 mg) wurde in 5,0 ml 4,5 M Lithiumperchlorat in Wasser gelöst. Festes NaOH (19 mg) wurde unter Rühren bei Raumtemperatur in dem Gemisch gelöst. Propylenoxid (600 µl) wurde in zwei Portionen von jeweils 300 µl zugesetzt, wobei nach jedem Zusatz 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in 45 ml Wasser gegossen und unter Verwendung von verdünnter wässriger Salzsäure auf einen pH von 7,0–7,5 neutralisiert. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Cellulosemembran mit einem Cutoff-Wert von 13 kDA (Spectrum Medical Devices) 24 h lang gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Ein leichter Niederschlag (4,8 mg) wurde durch ein gewogenes Filterpapier abfiltriert. Die verbleibende sehr geringe Trübung wurde durch ein Kissen aus Celite 545 abfiltriert, um eine klare Lösung mit einem pH von 6,5 zu erhalten. Diese Lösung wurde auf dem Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingeengt, bevor sie 24 h lang unter Verwendung einer Cellulosemembran mit einem Cutoff-Wert von 13 kDA gegen entionisiertes Wasser dialysiert wurde. Der Gehalt des Dialyseschlauchs wurde in einem 100 ml fassenden, birnenförmigen Kolben außen eingefroren (Shell-Freezing) und auf einen Enddruck von 75 mTorr bei 25 °C gefriergetrocknet. Ein weißer, flockiger Faserfeststoff (42,8 mg) wurde gewonnen. Dieses Material wurde als HP-PnF bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

**[0033]** Eine Gelelektrophorese dieses Materials zeigt eine Reihe von Banden, die bei etwa der Hälfte des Molekulargewichts des Ausgangsmaterials wandern, was auf etwa eine hydrolytische Kettenspaltung pro Molekül während der Reaktionschemie hinweist. Die Reaktivität des Seidefibrinantikörpers gegenüber HP-PnF erwies sich als weniger intensiv als die gegenüber nativem SLPF, wie durch die Intensität der auf dem Gel entstehenden Banden und die bekannte Masse der auf das Gel aufgetragenen Proteinprobe bestimmt wurde.

#### Hydroxypropyliertes SLP3.0

**[0034]** Rohes SLP3.0 (100 mg) wurde in 4,5 ml 4,5 M Lithiumperchlorat aufgeschlämmt und 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt, um eine braune partikuläre Suspension in einer viskosen Lösung zu erhalten. Celite 454 (50 mg) wurde zugesetzt und das Ganze gerührt und zentrifugiert, um ein braunes Pellet (ca. 0,3 ml Volumen) zu erhalten und eine klare Überstandslösung bereitzustellen. Der Überstand wurde abdekantiert. Zum Überstand wurde NaOH (20 mg), gelöst in 0,50 ml einer 4,5-molaren Lithiumperchloratlösung, zugesetzt. Propylenoxid (300 µl) wurde auf ein Mal zugesetzt, und das Gemisch wurde 6 h lang bei 35 °C gerührt. Eine zweite Portion Propylenoxid (300 µl) wurde zugesetzt und das Gemisch 2 h lang gerührt. Wasser (5,0 ml) wurde zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter wässriger Salzsäure auf einen pH von 7,0 neutralisiert. Die Lösung wurde 48 h lang gegen entionisiertes Wasser durch eine Cellulosemembran mit einem Cutoff-Wert von 13 kDA dialysiert. Die leichte Trübung der Produktlösung wurde durch Zentrifugation entfernt, um einen klaren Überstand und ein Pellet (ca. 0,2 ml) zu erhalten. Der Überstand wurde Hüllegefroren ("Shell-Freezing") und auf einen Enddruck von 75 mTorr bei 25 °C gefriergetrocknet, um ein weißes, flockiges Material (39 mg) zu erhalten. Dieses Material wurde als HP-SLP3.0 bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

**[0035]** Eine Gelelektrophorese dieses Materials zeigt eine Reihe von Banden, die bei etwa der Hälfte des Molekulargewichts des Ausgangsmaterials wandern, was auf etwa eine hydrolytische Kettenspaltung pro Molekül hinweist. Die Reaktivität des Seidefibrinantikörpers gegenüber HP-SLP3.0 erwies sich als weniger intensiv

als die gegenüber nativem SLP3.0, wie durch die Intensität der auf dem Gel entstehenden Banden und die bekannte Masse der auf das Gel aufgetragenen Proteinprobe bestimmt wurde.

#### Dimethylaminoethyliertes SLP3

**[0036]** Rohes SLP3.0 (1,0 g) wurde 16 h lang mit 25 ml 4,5 M LiClO<sub>4</sub> gerührt. Ungelöste suspendierte Feststoffe wurden durch Zentrifugation unter Verwendung eines S534-Rotors bei 15.000 U/min über einen Zeitraum von 20 min entfernt. Ein hellgelber klarer Überstand (23,5 ml) wurde gewonnen und in den nächsten Schritten verwendet. Vier Portionen Dimethylaminoethylchlorid-HCl (0,72 g, 5 mmol) und Natriumhydroxid (0,40 g, 10 mmol) wurden zugesetzt, wobei nach jedem Zusatz 30 min gerührt wurde. Essigsäure (1140 µl) wurde zugesetzt, um den pH auf 6,5 einzustellen. Die neutralisierte Lösung wurde in einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegeben und 24 h lang gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde durch ein Kissen aus Celite 545 auf einem Büchner-Trichter filtriert, auf dem Rotationsverdampfer eingeeengt und 24 h lang durch einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde Hülle-gefroren ("Shell-Freezing") und gefriergetrocknet, um 39,5 mg eines weißen Produkts zu erhalten. Dieses Material wurde als DMA-SLP3.0 bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

#### Sulfopropyliertes SLP3

**[0037]** Rohes SLP3.0 (1,0 g) wurde 16 h lang mit 25 ml 4,5 M LiClO<sub>4</sub> gerührt. Ungelöste suspendierte Feststoffe wurden durch Zentrifugation unter Verwendung eines S534-Rotors bei 15.000 U/min über einen Zeitraum von 20 min entfernt. Ein hellgelber klarer Überstand (23,5 ml) wurde gewonnen und in den nächsten Schritten verwendet. Vier Portionen Propansulton (1,22 g, 876 µl, 10 mmol) und Natriumhydroxid (0,40 g, 10 mmol) wurden zugesetzt, wobei nach jedem Zusatz 30 min lang gerührt wurde. Essigsäure (600 µl) wurde zugesetzt, um den pH auf 6,5 einzustellen. Die neutralisierte Lösung wurde in einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegeben und 24 h lang gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde durch ein Kissen aus Celite 545 auf einem Büchner-Trichter filtriert, auf dem Rotationsverdampfer eingeeengt und 24 h lang durch einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegen entionisiertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde Hülle-gefroren ("Shell-Freezing") und gefriergetrocknet, um 160 mg eines weißen Produkts zu erhalten. Dieses Material wurde als SP-SLP3.0 bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

#### Sulfopropyliertes SLPF

**[0038]** SLPF (103 mg) und 3,0 ml 4,5-molares wässriges Lithiumperchlorat wurden zu einem 10 ml fassenden Erlenmeyerkolben zugesetzt, der mit einem Gummiseptumverschluss ausgestattet war und mithilfe eines Magnetrührers gerührt wurde. Der Kopfraum wurde mit Stickstoff gespült, wonach bei Raumtemperatur zu rühren begonnen wurde. Propansulton, gelöst in 2,0 ml Tetrahydrofuran, wurde auf ein Mal zugesetzt, um ein homogenes Gemisch zu erhalten. Eine Lösung (1,0 ml) von Natriumhydroxid (40 mg) in 4,5-molarem wässrigem Lithiumperchlorat wurde dann mithilfe einer Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,019 ml/min zugesetzt. Nach weiteren 30 min Rühren wurde eine Lösung von Essigsäure (60 mg) in Wasser (1,0 ml) auf ein Mal zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde in einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegeben und 24 h lang gegen 15 l entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde gewechselt und die Dialyse weitere 24 h fortgesetzt. Der Rückstand wurde Hülle-gefroren ("Shell-Freezing") und gefriergetrocknet, um 90 mg eines weißen Produkts zu erhalten. Dieses Material wurde als SP-SLPF bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

#### Dimethylaminoethyliertes SLPF

**[0039]** SLPF (103 mg), Dimethylaminoethylchloridhydrochlorid (360 mg) und 3,0 ml 4,5-molares wässriges Lithiumperchlorat wurden zu einem 10 ml fassenden Erlenmeyerkolben zugesetzt, der mit einem Gummiseptumverschluss ausgestattet war und mithilfe eines Magnetrührers gerührt wurde. Der Kopfraum wurde mit Stickstoff gespült, und Rühren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Lösung von Natriumhydroxid (200 mg) in 4,5-molarem wässrigem Lithiumperchlorat (2,65 ml) wurde dann mithilfe einer Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,174 ml/min zugesetzt. Nach weiteren 60 min Rühren wurde Essigsäure verwendet, um den pH auf 6,0–6,5 einzustellen, und das Reaktionsgemisch wurde in einen Dialyseschlauch mit einem Cutoff-Wert von 13 kDa gegeben und 24 h lang gegen 15 l entionisiertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde Hülle-gefroren ("Shell-Freezing") und gefriergetrocknet, um 63 mg eines weißen Produkts zu erhalten. Dieses Material wurde als DMA-SLPF bezeichnet und erwies sich als leicht löslich in entionisiertem Wasser.

## Aminosäurezusammensetzungen

**[0040]** Die Aminosäurezusammensetzung der derivatisierten Proteinpolymere wurde durch das PTC-Derivatisierungsverfahren gemäß Henrickson und Meredith (1984) bestimmt. Proteinproben wurden bei 108 °C 24 h lang im Vakuum mit 5,7 N konstant siedender Salzsäure hydrolysiert. Nach der Umsetzung mit PITC wurden Aminosäurederivate bei 254 nm durch HPLC-Umkehrphasenchromatographie unter Verwendung des Systems Hewlett Packard 1090 und einer C18-Säule von Supelco (4,6 mm × 25 cm) mit einem linearen Gradienten von 0–50 % Acetonitril in 0,1 M Ammoniumacetat pH 6,78 als mobile Phase detektiert. Henrickson, R.L., und Meredith, S.C., Amino Analysis by Reverse High Performance Liquid Chromatography, Anal. Biochem. 137, 64–74 (1984). Die normalisierten Ergebnisse dieser Analysen von HP-PnF, HP-SLP3.0, DMA-SLP3.0, SP-SLP3.0 bzw. SP-PnF sind in den Tabellen 1 bis 5 zusammengefasst.

Tabelle 1

Normalisierte Aminosäurezusammensetzungen von HP-PnF

Komponente	picomol (gef.)	Verhältnisse (theoret.)	Verhältnisse (gef.)	Defizit
L-Glycin	6623	30	30	0
L-Alanin	4707	23	21,3	-7 %
L-Serin	2091	11	9,5	-14 %
L-Tyrosin	57	1	0,3	-70 %
L-Threonin	201	1	0,9	-10 %

Tabelle 2

Normalisierte Aminosäurezusammensetzungen von HP-SLP3.0

Komponente	picomol (gef.)	Verhältnisse (theoret.)	Verhältnisse (gef.)	Defizit
L-Glycin	6774	29	29	0
L-Alanin	4520	20	19,4	-3 %
L-Serin	1831	9	7,8	-14 %
L-Tyrosin	60	1	0,3	-70 %

Tabelle 3

Normalisierte Aminosäurezusammensetzungen von DMA-SLP3.0

Komponente	picomol (gef.)	Verhältnisse (theoret.)	Verhältnisse (gef.)	Defizit
L-Glycin	2487	29	29	0
L-Alanin	1621	20	18,9	-5 %
L-Serin	602	9	7,0	-22 %
L-Tyrosin	74	1	0,9	-10 %

Tabelle 4

Normalisierte Aminosäurezusammensetzungen von SP-SLP3.0

Komponente	picomol (gef.)	Verhältnisse (theoret.)	Verhältnisse (gef.)	Defizit
L-Glycin	4856	29	29	0
L-Alanin	3135	20	18,7	-6 %
L-Serin	632	9	3,8	-58 %
L-Tyrosin	67	1	0,4	-60 %

Tabelle 5

Normalisierte Aminosäurezusammensetzungen von SP-PnF

Komponente	picomol (gef.)	Verhältnisse (theoret.)	Verhältnisse (gef.)	Defizit
L-Glycin	4269	30	30	0
L-Alanin	2972	23	20,9	-9 %
L-Serin	1426	11	10,0	-9 %
L-Tyrosin	133	1	0,9	-10 %
L-Threonin	143	1	1,0	0

**[0041]** In den Fällen von SP-SLP3.0 und SP-PnF können die Defizite mittels mikrochemischer Analysen der Elementarzusammensetzung der Proteine und Berechnung des Molverhältnisses zwischen Schwefel und Stickstoff verifiziert werden. Sowohl die SLP3.0- als auch die SLPF-Moleküle sind anfangs frei von Schwefel, und jeder Funktionalisierungsvorgang führt eine einzelne 3-Sulfopropylgruppierung ein. Somit ist das Molverhältnis zwischen Schwefel und Stickstoff ein Maß für das Ausmaß der Funktionalisierungsreaktion.

**[0042]** Aufgrund der beobachteten Defizite von Aminosäuren in SP-SLP3.0 ist das vorhergesagte Verhältnis S:N = 0,120. Eine Mikroanalyse der Elementarzusammensetzung dieses funktionalisierten Proteins ergab ein gemessenes Verhältnis S:N von 0,119. Aufgrund der beobachteten Defizite von Aminosäuren in SP-PnF ist das vorhergesagte Verhältnis S:N = 0,042. Eine Mikroanalyse der Elementarzusammensetzung dieses funkti-

onalisierten Proteins ergab ein gemessenes Verhältnis S:N von 0,034. Somit stimmen die Daten der Elementarzusammensetzungen und Aminosäurezusammensetzungen überein.

**[0043]** Die Daten in den Tabellen 1 bis 5 konzentrieren sich auf die Aminosäuren, welche die Seidefibrinregion (GAGAGS) dieser Proteinpolymere ausmachen, die seideähnliche Regionen umfassen. In allen Fällen weisen die normalisierten Verhältnisse auf eine Abreicherung von L-Serin hin. Solche Ergebnisse lassen vermuten, dass die L-Serinreste durch die Reaktion auf den Seitenkettenhydroxylen die primären Stellen für die verschiedenen Veresterungsreaktionen sind.

**[0044]** Von einem O-alkylierten Rest von L-Serin im modifizierten Proteinpolymer wird erwartet, dass er zurück zu einer Aminosäure hydrolysiert, nicht aber, dass er unter den Bedingungen des sauren Hydrolyseschritts der Aminosäurezusammensetzungsanalyse zu nativem L-Serin zurück spaltet. Somit scheint der Absolutgehalt an L-Serin in den modifizierten Proteinpolymeren verringert, wie beobachtet wurde. Basierend auf diesen Zusammensetzungsdaten findet die Funktionalisierung auf 9 % bis 58 % der L-Serinreste statt.

**[0045]** Die Reaktivität des Antikörpers gegenüber Seidefibrin hängt von der Erkennung des GAGAGS-Epitops ab. Wenn eine chemische Modifikation in der markantesten chemischen Gruppe in diesem Epitop, in der Hydroxyseitenkette auf dem L-Serinrest, stattfindet, dann würde man eine verringerte Reaktivität gegenüber dem Antikörper erwarten. Qualitativ wurde eine solche verringerte Reaktivität gegenüber dem Antikörper in den Fällen des HP-PnF und des HP-SLP3.0 beobachtet.

#### Bindung von VERO-Zellen an mit HP-PnF beschichtetem Polystyrol

**[0046]** Um die Fähigkeit von HP-PnF in Bezug auf Oberflächenaktivität und Zellbindungsaktivität zu beurteilen, wurde ein Zellbindungstest auf einer Polystyrolkulturplatte mit 96 Wells durchgeführt. In diesem Test wurde 1,0 mg/ml ProNectin F (PnF) zu 4,5 M Lithiumperchlorat zugesetzt und mit phosphatgepufferter Salzlösung zu den endgültigen Beschichtungskonzentrationen reihenverdünnt. Das HP-PnF wurde zu entionisiertem Wasser zugesetzt und mit entionisiertem Wasser reihenverdünnt. Auf jede Bahn aus 8 Wells auf der Platte wurde eine Verdünnung aufgetragen. Das Blockieren, Inokulieren mit Zellen, Inkubieren, Fixieren und Färben mit blau-schwarzem Amidofarbstoff wurden alle laut Standardprotokollen durchgeführt. Die relativen Zellenanzahlen wurden bei 495 nm spektralphotometrisch geschätzt. Die Ergebnisse dieses Zellbindungstests sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

#### VERO-Zellbindung an reihenverdünntem ProNectin<sup>®</sup>F und reihenverdünntem HP-PnF

Beschichtungs- lösung (µg/ml)	Dosis pro Well (g/Well)	Absorptions- vermögen PnF	Absorptions- vermögen HP-PnF
20	$2,0 \times 10^{-6}$	$0,775 \pm 0,024$	$0,758 \pm 0,031$
4,0	$4,0 \times 10^{-7}$	$0,761 \pm 0,016$	$0,799 \pm 0,038$
0,80	$8,0 \times 10^{-8}$	$0,781 \pm 0,021$	$0,795 \pm 0,019$
0,16	$1,6 \times 10^{-8}$	$0,764 \pm 0,026$	$0,776 \pm 0,015$
0,032	$3,2 \times 10^{-9}$	$0,771 \pm 0,033$	$0,768 \pm 0,024$
0,0063	$6,3 \times 10^{-10}$	$0,737 \pm 0,040$	$0,558 \pm 0,075$
0	0	0	0

#### Bindung von VERO-Zellen an mit SP-PnF beschichtetem Polystyrol

**[0047]** Um die Fähigkeit von SP-PnF in Bezug auf Oberflächenaktivität und Zellbindungsaktivität zu beurteilen, wurde ein Zellbindungstest auf einer Polystyrolkulturplatte mit 96 Wells durchgeführt. In diesem Test wurde 1,0 mg/ml ProNectin F zu 4,5 M Lithiumperchlorat zugesetzt und mit phosphatgepufferter Salzlösung zur End-

konzentration von 1,0 µg/ml reihenverdünnt und dann auf die erste Bahn aus 8 Wells aufgetragen. Das SP-PnF wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in entionisiertem Wasser gelöst und zu den endgültigen Beschichtungskonzentrationen von 10 µg/ml, 1,0 µg/ml, 0,10 µg/ml verdünnt. Auf jeweils zwei Bahnen aus 8 Wells auf der Platte wurde eine Verdünnung aufgetragen. Das Blockieren, Inokulieren mit Zellen, Inkubieren, Fixieren und Färben mit blauschwarzem Amidofarbstoff wurden alle laut Standardprotokollen durchgeführt. Die relativen Zellenanzahlen wurden bei 495 nm spektralphotometrisch geschätzt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7

VERO-Zellbindung an reihenverdünntem ProNectin<sup>®</sup>F und reihenverdünntem SP-PnF

Beschichtungslösung (µg/ml)	Dosis pro Well (g/Well)	Absorptionsvermögen PnF
Negative Kontrolle	0,0	0,047 ± 0,004
ProNectin <sup>®</sup> F 10 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	0,683 ± 0,017
SP-PnF 10 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	0,724 ± 0,015
SP-PnF 1,0 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	0,741 ± 0,023
SP-PnF 0,1 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-7</sup>	0,731 ± 0,032

Haftung von VERO-Zellen an mit DMA-PnF beschichtetem Polystyrol

**[0048]** Um die Fähigkeit von DMA-PnF in Bezug auf Oberflächenaktivität und Zellbindungsaktivität zu beurteilen, wurde ein Zellbindungstest auf einer Polystyrolkulturplatte mit 96 Wells durchgeführt. In diesem Test wurde 1,0 mg/ml ProNectin F zu 4,5 M Lithiumperchlorat zugesetzt und mit phosphatgepufferter Salzlösung zur Endkonzentration von 10 µg/ml reihenverdünnt und dann auf die erste Bahn aus 8 Wells aufgetragen. Das DMA-PnF wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in entionisiertem Wasser gelöst und zu den endgültigen Beschichtungskonzentrationen von 10 µg/ml, 1,0 µg/ml, 0,10 µg/ml verdünnt. Auf jede Bahn aus 8 Wells auf der Platte wurde eine Verdünnung aufgetragen. Das Blockieren, Inokulieren mit Zellen, Inkubieren, Fixieren und Färben mit blauschwarzem Amidofarbstoff wurden alle laut Standardprotokollen durchgeführt. Die relativen Zellenanzahlen wurden bei 495 nm spektralphotometrisch geschätzt. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8

VERO-Zellbindung an reihenverdünntem ProNectin<sup>®</sup>F und reihenverdünntem DMA-PnF

Beschichtungslösung (µg/ml)	Dosis pro Well (g/Well)	Absorptionsvermögen PnF
Negative Kontrolle	0,0	0,044 ± 0,002
ProNectin <sup>®</sup> F 10 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	0,728 ± 0,042
SP-PnF 10 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-5</sup>	0,771 ± 0,022
SP-PnF 1,0 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-6</sup>	0,715 ± 0,029
SP-PnF 0,1 µg/ml	1,0 x 10 <sup>-7</sup>	0,625 ± 0,031

**[0049]** Die Daten zeigen, dass PH-PnF sowohl seine Aktivität als Tensid als auch als Zellbindungsflächenmodifikator beibehält. Außerdem führt die Hydroxypropylierung zu keiner akuten Zytotoxizität. Das hydroxypropylierte Polymer ist zur Beschichtung von Polystyrol nützlich, das für Säugetierzellkulturen bestimmt ist.

Durch die Modifikation ist es auch für andere Zwecke geeignet, wie beispielsweise die Ablagerung auf Polypropylenfasern.

**[0050]** Aus den dargelegten Daten ist ersichtlich, dass die vorliegenden Verfahren die Wasserlöslichkeit von hochrepetitiven, geordneten Proteinen erhöht, ohne die Adhäsionseigenschaften des Proteins zu verringern. Nach der Modifikation können die Proteine in Wasser löslich gemacht und zur Beschichtung von Kunststoffoberflächen für biologische Zwecke verwendet werden, wobei keine Löslichmachung in toxischen Lösungen mehr erforderlich ist.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Proteins aus einem wasserunlöslichen, zumindest teilweise kristallinen Vorläuferprotein mit einer Wasserlöslichkeit von weniger als 1,0 mg/ml bei Umgebungstemperatur, das eine natürlich vorkommende Aminosäure mit einem reaktiven Heteroatom, eine Funktionalität aufweisend, und ferner einen Block von Grundeinheiten aus 3–30 Aminosäuren umfasst, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

Auflösen des Vorläuferproteins in einem wässrigen Lösungsmittel, das eine Salzkonzentration von zumindest 2 M aufweist, um eine Reaktionslösung bereitzustellen;

Hinzufügen eines organischen Reaktanten zur Reaktionslösung unter Bedingungen zur Reaktion des organischen Reaktanten mit der Funktionalität, um das Heteroatom beizubehalten und zumindest ein zusätzliches polares Heteroatom bereitzustellen, wodurch zumindest 1 % der Aminosäuren funktionalisiert wird; wodurch das wasserlösliche Protein hergestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Konzentration der Lösung zumindest 4,5 M beträgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Lösung zumindest 2 M an einem Lithiumsalz ist und die Bedingung ein pH von zumindest 9 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin der organische Reaktant ein Epoxid mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin die Grundeinheit 4 bis 8 Aminosäuren lang ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin in der Grundeinheit die gleiche Aminosäure zumindest zweimal wiederholt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin die wiederholten Aminosäuren durch zumindest eine Aminosäure getrennt sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin das Vorläuferprotein ein Blockcopolymer oder alternierendes Blockcopolymer umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin das Copolymer Blöcke aus 2–10 einzelnen Grundeinheiten aus 3 bis 30 Aminosäuren aufweist, die durch eine Sequenz aus 5 bis 160 Aminosäuren getrennt sind, wobei die Sequenz eine innere Wiederholung aufweist, die sich von der einzelnen Grundeinheit aus 3 bis 30 Aminosäuren unterscheidet.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin die Gesamtzahl an Grundeinheiten im Bereich von 50 bis 300 liegt

11. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Protein ein seideähnliches Protein, ein elastinähnliches Protein, ein collagenähnliches Protein oder ein keratinähnliches Protein ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Grundeinheit eine Fibroin-Grundeinheit ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin die Grundeinheit GAGAGS ist.

14. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Grundeinheiten aufweisende Vorläuferprotein SLPF (ProNectin®-F) umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Grundeinheiten aufweisende Vorläuferprotein ein seideähnliches Protein III (SLP3.0) umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 12, worin die Grundeinheit Serin oder Threonin umfasst, das Vorläuferprotein in einem basischen wässrigen Lösungsmittel gelöst und der organische Reaktant ein Epoxid mit 2 bis 5 Kohlenstoffatomen ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin die Salzkonzentration 4,5 M beträgt.

18. Verfahren nach Anspruch 16, worin das wässrige Lösungsmittel zumindest 2 M an einem Lithiumsalz ist und eine Hydroxidkonzentration von zumindest etwa 10 mM aufweist.

19. Verfahren nach Anspruch 16, worin das Vorläuferprotein dazwischenliegende Gruppen umfasst, die eine zellbindende Sequenz umfassen.

20. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Grundeinheit Serin oder Threonin umfasst, das Vorläuferprotein in einem basischen wässrigen Lösungsmittel gelöst ist und die zumindest eine zusätzliche polare Heteroatomfunktionalität aus der aus Hydroxyl, Sulfonat und Ammonio bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, worin die zusätzliche Heteroatomfunktionalität Hydroxyl ist und der Reaktant ein Epoxid mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20, worin die zusätzliche Heteroatomfunktionalität Sulfonat ist und der Reaktant ein Sulton mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen ist.

23. Verfahren nach Anspruch 20, worin die zusätzliche Heteroatomfunktionalität Ammonio mit 4 bis 8 Kohlenstoffatomen ist.

24. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die funktionalisierten Aminosäuren eines oder mehrere der folgenden umfassen: Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein, Lysin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

25. Wasserlösliche, Grundeinheiten umfassende Proteinverbindung, die aus einem wasserunlöslichen Vorläuferprotein mit einer Wasserlöslichkeit von weniger als 1,0 mg/ml bei Umgebungstemperatur abgeleitet ist, wobei die Verbindung zumindest 6 kD aufweist und einen Block aus Grundeinheiten aus 3–30 Aminosäuren sowie zumindest eine Aminosäure umfasst, die ein chemisch reaktives Heteroatom mit Funktionalität aufweist, wovon zumindest etwa 1 % an eine mit einer polaren Gruppe substituierte Alkylgruppe mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen gebunden ist, wobei das zumindest etwa 1 % eines oder mehrere der Folgenden umfasst: Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein, Lysin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

26. Proteinverbindung nach Anspruch 25, worin die Grundeinheiten etwa 4 bis 10 Aminosäuren aufweisen und Serin oder Threonin umfassen und die polare Gruppe Hydroxyl ist.

27. Proteinverbindung nach Anspruch 25, worin die polare Gruppe Ammonio ist.

28. Proteinverbindung nach Anspruch 25, worin die polare Gruppe sauer ist.

29. Proteinverbindung nach Anspruch 25, worin die Grundeinheit eine Fibroin-Grundeinheit ist, die Serin umfasst, worin zumindest 1 % der Serinreste im Protein an eine mit einer polaren Gruppe substituierte Alkylgruppe mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen gebunden ist.

30. Proteinverbindung nach Anspruch 29, worin die polare Gruppe Hydroxyl, Sulfonato oder Ammonio ist.

31. Proteinverbindung nach Anspruch 29, worin die Blöcke aus Grundeinheiten eine dazwischenliegende Sequenz aufweisen, die eine physiologisch aktive Sequenz umfasst.

32. Proteinverbindung nach Anspruch 31, worin die physiologisch aktive Sequenz RGDS umfasst.

33. Proteinverbindung nach Anspruch 25, worin die Verbindung zumindest etwa 10 kD aufweist, Grundeinheiten der Sequenz GAGAGS umfasst und eine dazwischenliegende Sequenz besitzt, die RGDS umfasst, wobei zumindest etwa 1 % der Seringruppen mit der polaren Gruppe alkyliert sind, worin die polare Gruppe aus der aus Hydroxyl, Sulfonate und Ammonio bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

34. Festes Substrat, eine Beschichtung aus einer Proteinverbindung nach Anspruch 25 umfassend.
35. Festes Substrat nach Anspruch 34, worin die Proteinverbindung eine Verbindung nach Anspruch 33 ist.
36. Festes Substrat nach Anspruch 35, worin die polare Gruppe Hydroxyl ist.
37. Wässrige Lösung mit einer Salzkonzentration von weniger als etwa 1 M und zumindest 0,01 Gew.-% einer Proteinverbindung nach Anspruch 25.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen