(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 197 T2** 2004.07.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 751 952 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 197.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/01966**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 910 281.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/022555**
(86) PCT-Anmeldetag: **16.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **02.07.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 1/14**
C07K 1/16, C07K 1/18, C07C 211/62

(30) Unionspriorität:
197146 **16.02.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Cramer, Steven M., Schenectady, N.Y., US; Moore, James A., Troy, N.Y., US

(72) Erfinder:
CRAMER, Steven M., Schenectady, US; MOORE, James A., Troy, US; KUNDU, Amitava, Troy, US; LI, Yufei, Beijin, CN; JAYARAMAN, Guhan, Madras, IN

(74) Vertreter:
Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339 München

(54) Bezeichnung: **VERDRÄNGUNGSCHROMATOGRAPHIE VON PROTEINEN MITTELS VERDRÄNGUNGSREAGENTIEN VON GERINGEM MOLEKULARGEWICHT**

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

[0001] Die Erfindung betrifft die Verdrängungschromatographie von Proteinen unter Verwendung von Verdrängungsmitteln mit niedrigem Molekulargewicht und betrifft eine neue Klasse dendritischer Polymer-basierter Polyelektrolyte, die für die Chromatographie von Proteinen von Nutzen sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Der Verdrängungsmodus der Chromatographie wurde als erstes von Tswett 1906 erkannt, der bemerkte, dass eine Proben-Verdrängung unter den Bedingungen einer überladenen Elutions-Chromatographie eintrat. Im Jahr 1943 entdeckte Tiselius die Klassifikationen der frontalen Chromatographie, der Elutions-Chromatographie und der Verdrängungschromatographie. Seit dieser Zeit haben die meisten Entwicklungen und Anwendungen, insbesondere solche in der analytischen Chromatographie, auf dem Gebiet der Elutions-Chromatographie stattgefunden und tatsächlich betrifft der Begriff Chromatographie ohne weitere Qualifizierung üblicherweise die Elutions-Chromatographie. Während die Theorie und Praxis der Elutions-Chromatographie die Literatur in den letzten fünfzig Jahren dominiert hat, hat nichts desto weniger die Theorie und Praxis der Verdrängungschromatographie eine kleine Nische in der chromatographischen Wissenschaft besetzt.

[0003] Die beiden Typen der Chromatographie, die Elution und Verdrängung, sind einfach sowohl in Theorie als auch in Praxis zu unterscheiden. Bei der Elutions-Chromatographie wird eine Lösung der zu reinigenden Probe (im Falle der vorliegenden Erfindung ein Protein) auf eine stationäre Phase, üblicherweise in eine Säule, aufgebracht. Die mobile Phase wird so ausgewählt, dass die Probe weder irreversibel adsorbiert noch total unadsorbiert ist, sondern viel eher reversibel bindet. Wenn die mobile Phase über die stationäre Phase fließt, wird ein Gleichgewicht zwischen der mobilen Phase und der stationären Phase hergestellt, wodurch, abhängig von der Affinität für die stationäre Phase, die Probe entlang der Säule in einer Ge schwindigkeit passiert, die ihre Affinität bzgl. anderer Bestandteile reflektiert, die in der ursprünglichen Probe auftreten können. Das differentielle Migrationsverfahren ist schematisch in **Fig.** 1 dargestellt und ein typisches Chromatogramm ist in **Fig.** 2 dargestellt. Von spezieller Erwähnung in der Standard-Elutions-Chromatographie ist die Tatsache, dass die eluierende Lösungsmittelfront oder das Null-Säulenvolumen in isokratischer Elution immer der Probe aus der Säule heraus vorangeht.

[0004] Eine Modifikation und Erweiterung der isokratischen Elutions-Chromatographie ist in der Schritt- bzw. Stufengradienten-Chromatographie zu finden, in der eine Reihe von Elutionsmitteln bzw. Eluenten variierender Zusammensetzungen über die stationäre Phase geleitet wird. In der Ionenaustausch-Chromatographie werden schrittweise Veränderungen der Salzkonzentration und/oder des pHs der mobilen Phase dazu verwendet, die Proteine zu eluieren oder zu desorbieren.

[0005] Die Verdrängungschromatographie ist von der Desorptions-Chromatographie fundamental verschieden (beispielsweise Affinitäts-Chromatographie, Schrittgradienten-Chromatographie). Das Verdrängungsmittel, das eine höhere Affinität als jeder der zugeführten Bestandteile aufweist, konkurriert effektiv um die Adsorptionsstellen an der stationären Phase. Ein bedeutender Unterschied zwischen der Verdrängung und Desorption besteht darin, dass die Verdrängungsmittelfront immer hinter den angrenzenden Zufuhrzonen im Verdrängungsmittel-Zug bleibt, während die Desorbentien (beispielsweise Salz, organische Modifikatoren) sich durch die Zufuhrzonen bewegen. Die Implikationen dieser Unterscheidung sind insofern sehr signifikant, als die Verdrängungschromatographie potentiell Bestandteile aus Gemischen mit schlecht trennenden Faktoren konzentrieren und aufreinigen kann, während im Falle der Desorptions-Chromatographie im allgemeinen relativ große Trennungsfaktoren erforderlich sind, um eine zufriedenstellende Auftrennung zu ergeben.

[0006] Bei der Verdrängungschromatographie weist das Elutionsmittel (d. h. das Verdrängungsmittel) eine höhere Affinität für die stationäre Phase auf als jeder der Bestandteile im zu trennenden Gemisch. Dies steht im Gegensatz zur Elutions-Chromatographie, bei der das Elutionsmittel üblicherweise eine niedrige Affinität aufweist. Das Schlüsselbetriebsmerkmal, das die Verdrängungschromatographie von der Elutions- oder Desorptions-Chromatographie unter scheidet, ist die Verwendung eines Verdrängungsmittel-Moleküls. In der Verdrängungschromatographie wird die Säule zunächst mit einem Trägerlösungsmittel unter Bedingungen äquilibriert, bei denen die Bestandteile, die getrennt werden sollen, alle eine relativ hohe Affinität für die stationäre Phase aufweisen. Ein großes Volumen an verdünntem Zufuhrgemisch kann auf die Säule aufgeladen werden und individuelle Bestandteile werden sich an die stationäre Phase adsorbieren. D. h., sie verteilen sich von der Zufuhrlösung auf die stationäre Phase und verbleiben dort. Wenn alle Bestandteile durch Verdrängung aufgetrennt werden sollen, verläßt das Trägerlösungsmittel die Säule und enthält keine Probe. Die Probe sitzt nunmehr an der stationären Phase und die Position jedes Bestandteils an der Säule wird mit seiner relativen Affinität für die stationäre Phase korreliert. Man kann sich begreiflicherweise vorstellen, dass jedes Molekül des Bestandteils mit der höchsten Affinität für die stationäre Phase ein Molekül eines Bestandteils mit einer geringeren Affinität an einem Ort auf der stationären Phase verdrängt, so dass die einzelnen Bestandteile letztendlich an der Säule in der Reihenfolge von der höchsten zur niedrigsten Affinität angeordnet werden.

[0007] Es wird manchmal vorteilhaft sein, einigen der Bestandteile zu ermöglichen, mit dem Trägerlösungsmittel durch die Säule zu laufen; in diesem Falle werden nur die zurückgehaltenen Zufuhr-Bestandteile durch Verdrängungschromatographie aufgetrennt.

[0008] Wenn einmal die Probe auf die Säule aufgeladen wird, wird eine Verdrängungsmittel-Lösung eingebracht. Die Verdrängungsmittel-Lösung umfasst ein Verdrängungsmittel in einem geeigneten Lösungsmittel. Das Verdrängungsmittel ist derart ausgewählt, dass es eine höhere Affinität für die stationäre Phase als jeder der Zufuhr-Bestandteile aufweist. Unter der Annahme, dass das Verdrängungsmittel und die mobile Phase in geeigneter Weise ausgewählt sind, verlassen die Produkt-Bestandteile die Säule als benachbarte Rechteckwellen-Zonen von hoch konzentriertem reinem Material in der Reihenfolge der zunehmenden Affinität der Absorption. Dies ist schematisch in **Fig.** 3 dargestellt. Ein typisches Chromatogramm aus einer Verdrängungschromatographie ist in **Fig.** 4 dargestellt. Es kann vom Chromatogramm für die Elutions-Chromatographie, dargestellt in **Fig.** 2, leicht mittels der Tatsache unterschieden werden, dass das Verdrängungsmittel der Probe folgt und dass die Zufuhr-Bestandteile aus der Säule als aufeinanderfolgende „Rechteckwellen"-Zonen des hoch konzentrierten reinen Materials austreten. Zuletzt wird die Säule nach dem Durchbruch des Verdrängungsmittels durch Desorbieren des Verdrängungsmittels aus der stationären Phase regeneriert, um den nächsten Betriebszyklus zu ermöglichen.

[0009] Die Verdrängungschromatographie weist einige spezielle vorteilhafte Eigenschaften zur Chromatographie biologischer Makromoleküle, wie beispielsweise Proteine, für die Chromatographie im Verfahrens-Massstab auf. Zuerst und vielleicht am meisten bedeutend kann die Verdrängungschromatographie eine Produktauftrennung und Konzentration in einem einzigen Schritt erreichen. Die isokratische Elutions-Chromatographie hat vergleichsweise eine Produktverdünnung während der Auftrennung zur Folge. Weil zweitens das Verdrängungsverfahren in der nicht linearen Region der Gleichgewichts-Isotherme arbeitet, sind hohe Säulenbeladungen möglich. Dies ermöglicht eine viel bessere Säulenverwertung als die Elutions-Chromatographie. Drittens erfordert die Säulen-Entwicklung per se weniger Lösungsmittel als ein vergleichbares Elutions-Verfahren. Viertens kann die Verdrängungschromatographie Bestandteile aus Gemischen mit niedrigen Trennungsfaktoren konzentrieren und aufreinigen, während relativ große Trennfaktoren für eine zufriedenstellende Auftrennung in der Desorptions-Chromatographie erforderlich sind.

[0010] Bei all diesen Vorteilen könnte man annehmen, dass die Verdrängungschromatographie weit verbreitet verwendet wird. Jedoch weist die Verdrängungschromatographie, wie traditionell bekannt ist, mehrere Nachteile gegenüber der Elutions-Chromatographie zur Aufreinigung von Proteinen auf. Der Begriff „Protein", wie er üblicherweise in der Technik verstanden wird und wie er hierin verwendet wird, betrifft Polypeptide eines Molekülgewichtes von 10 kDa oder mehr; gemäß dieser Konvention werden Polypeptide mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa üblicherweise als Oligopeptide bezeichnet. Zwei Hauptprobleme sind (1) die Regeneration der Säule und (2) das Vorliegen von Verdrängungsmittel in einigen der gereinigten Fraktionen.

[0011] Weil das Verdrängungsverfahren eine Hochaffinitäts-Verbindung als Verdrängungsmittel verwendet, kann die Zeit zur Regeneration und Reäquilibrierung im Vergleich zur Elutions-Chromatographie lang sein. Darüber hinaus sind relativ große Mengen an Lösungsmitteln oftmals während der Regeneration erforderlich, was jeden Vorteil gegenüber der Elutions-Chromatographie im Lösungsmittelverbrauch effektiv reduziert.

[0012] Das zweite Problem, das der Kontamination durch das Verdrängungsmittel, ist entstanden, weil eine übliche Eigenschaft der Verdrängungsmittel, die in der Proteinauftrennung verwendet werden, ihr relativ hohes Molekulargewicht war. Die Technik hat bis jetzt die Verwendung von Hochmolekulargewichts-Polyelektrolyten zur Verdrängung von Proteinen auf Grundlage der Annahme gelehrt, dass (wie unten erklärt) es notwendig ist, ein großes Polyelektrolyt zur Hand zu haben, um einen höheren Bindungskoeffizienten als das Protein sicherzustellen, das verdrängt werden soll. Hochmolekulargewichts-Verdrängungsmittel zeigen sowohl die oben aufgezählten Nachteile: sie binden eng an die stationäre Phase und erfordern deswegen drastische Zustände zur Regenerierung der Säule, und Spuren des Verdrängungsmittels, die die Produktfraktion kontaminieren können, sind schwer zu entfernen.

[0013] Es wäre deswegen von Vorteil, eine Klasse von Verdrängungsmitteln zur Hand zu haben, die keine umfassende Regeneration der Säule erfordern und die leicht aus dem Produkt-Protein entfernt werden könnten. Es ist den Anmeldern ein Beispiel in der Technik eines Versuchs bekannt geworden, ein schwaches 2 Kilodalton Poly(vinylsulfonsäure) an Polyethyleneiminbeschichtetes Anionenaustauscherharz zur Auftrennung von Conalbumin von Ovalbumin zu verwenden. Dieses Experiment scheint dahingehend erfolgreich gewesen zu sein, dass die beiden Proteine aufgetrennt wurden [siehe Jen und Pinto Journal of Chromatography 519, 87– 98 (1990)]. Die Trennung schien jedoch durch einen Mischmechanismus von Elution- und Verdrängungschromatographie bewirkt worden zu sein, wie es in einem anschließenden Paper diskutiert wurde [siehe Jen und Pinto Journal of Chromatographic Science 29, 478–484 (1991)], in dem die Autoren die Poly(vinylsulfat)-Verdrängungsmittel zu Gunsten eines höher molekulargewichtigen Dextran-Sulfats aufgaben. In diesem zweiten Paper demonstrieren Jen und Pinto die Überlegenheit des größeren Dextran-Sulfats gegenüber dem kleineren Polyvinylsulfat.

[0014] In einem anschließenden Artikel stellen Jen und Pinto [Reactive Polymers 19, 145–161 (1993), Seite

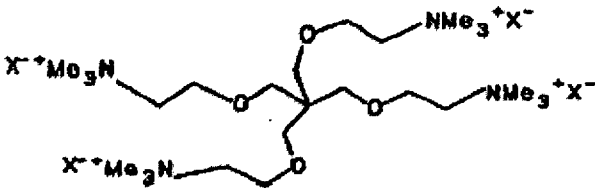
147] eine Tabelle aller für die Verdrängungschromatographie von Proteinen auf stationären Ionenaustauscher-Phasen verwendeten Verdrängungsmittel bereit. In ihrer Diskussion der Ergebnisse folgern sie wie vorher, dass das 2 kDa Polyvinylsulfat das zweite Protein teilweise verdrängt und als erstes eluiert.

[0015] Es hat sich nunmehr überraschenderweise herausgestellt, dass mehrere Klassen an geladenen Spezies mit sehr niedrigem Molekulargewicht sehr effizient als Verdrängungsmittel für Proteine in der Verdrängungschromatographie funktionieren können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] Ein Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung eines Proteins, wobei das Protein ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 10 kDa oder mehr ist, und wobei das Verfahren das Aufladen des Proteins in einem geeigneten Beladungslösungsmittel auf eine stationäre Ionenaustauscher-Phase und ein Verdrängen des Proteins von der stationären Phase durch Verdrängungschromatographie unter Verwendung eines Verdrängungsmittels mit einem Molekulargewicht von weniger als 1.620 umfasst.

[0017] In einer Ausführungsform ist die stationäre Phase ein Kationenaustauscherharz und das Verdrängungsmittel ist eine kationische Spezies; in einer anderen Ausführungsform ist die stationäre Phase ein Anionenaustauscherharz und das Verdrängungsmittel ist eine anionische Spezies. In verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen ist das Verdrängungsmittel ein Poly(quartäres) Ammoniumsalz, oder das Verdrängungsmittel ist ein Aminosäureester, Aminosäureamid, N-Acylaminosäure, Peptidester, Peptidamid oder N-Acylpeptid, vorzugsweise niedere Alkylester von Amiden des Lysins, Arginins, N^{α}-acylierten Lysins oder N^{α}-acylierten Arginins. Niederes Alkyl betrifft lineare, verzweigtkettige oder zyklische, gesättigte Kohlenwasserstoffreste von sechs oder weniger Kohlenstoffen. Das Verdrängungsmittel kann ebenfalls ein kationisches oder anionisches antibiotisches oder ein dendritisches Polymer sein. Wenn das Verdrängungsmittel ein dendritisches Polymer ist, ist ein bevorzugtes Verdrängungsmittel



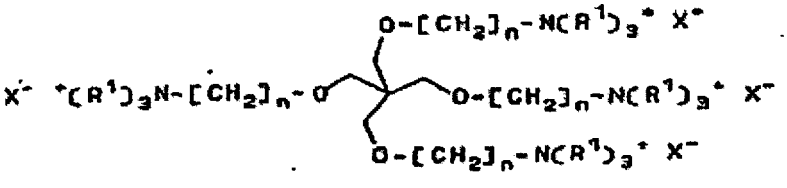
12

wobei X^- ein Gegenanion ist, beispielsweise Halogen, Sulfat, Sulfonat, Perchlorat, Acetat, Phosphat oder Nitrat.

[0018] Im allgemeinen kann das Verdrängungsmittel in vorteilhafter Weise aus Elektrolyten ausgewählt werden, deren charakteristische Ladung (v) und Gleichgewichtskonstante (K) derart sind, dass, wenn ein Koordinatensystem erzeugt wird, das auf der Ordinate den LogK präsentiert und v auf der Abszisse repräsentiert, eine Linie, die von einem Punkt A auf der Ordinaten-Achse durch einen Punkt definiert durch K und v des Verdrängungsmittels konstruiert wird, eine größere Steigung als eine entsprechende Linie aufweist, die von demselben Punkt A durch einen Punkt konstruiert wird, der durch K und v des zu reinigenden Proteins definiert wird. Der Punkt A entspricht in seinem Wert der Steigung der Arbeitskurve (Δ) in diesem Lösungsmittelsystem, in dem das Verdrängungsmittel gelöst wird. Verdrängungsmittel mit einem Molekulargewicht unter 900 sind besonders von Vorteil.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Aufreinigung eines Proteins, wobei das Verdrängungsmittel ein dendritisches, Polyelektrolyt-Verdrängungsmittel ist. Die stationäre Phase kann ein Kationenaustauscherharz sein, und in diesem Fall wird der Polyelektrolyt ein Polykation sein, beispielsweise ein Poly(quartäres Ammonium)salz, oder die stationäre Phase kann ein Anionenaustauscherharz sein, und in diesem Fall wird der Polyelektrolyt ein Polyanion sein.

[0020] Bei einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Verbindungen der Formel



wobei R^1 niederes Alkyl, n 2 bis 6 und X wie vorher definiert ist. Die Verbindungen sind als Verdrängungsmittel in der Verdrängungschromatographie von Nutzen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] **Fig.** 1 ist eine schematische Darstellung einer isokratischen linearen Standardelutions-Chromatographie.
[0022] **Fig.** 2 ist ein typisches Chromatogramm aus einer Elutions-Chromatographie.
[0023] **Fig.** 3 ist eine schematische Darstellung einer Verdrängungschromatographie.
[0024] **Fig.** 4 ist ein typisches Chromatogramm aus einer Verdrängungschromatographie.
[0025] **Fig.** 5 ist ein Plot einer Gleichgewichtskonstante (K) gegen die charakteristische Ladung (v) für zwei Proteine und zwei Verdrängungsmittel der Erfindung.
[0026] Die **Fig.** 6, 7 und 8 sind Chromatogramme von Proteinen unter Verwendung von Verdrängungsmitteln der Erfindung.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung einschließlich bevorzugter Ausführungsformen

[0027] Ein besseres Verständnis der überraschenden Entdeckung, dass kleine Moleküle effizient als Verdrängungsmittel in der Chromatographie von Proteinen verwendet werden können, wird durch eine kurze Betrachtung eines verbesserten mathematischen Modells für die Verdrängungschromatographie erreicht. Obwohl diese hypothetische Konstruktion zur Begründung des Phänomens von Nutzen ist, ist nicht beabsichtigt, dass diese die volle Breite der Erfindung einschränkt.
[0028] Das sterische Massenwirkungs(SMA)Ionenaustauschmodell, das von einem der Erfinder entwickelt wurde, trägt explizit, anders als bei anderen Modellen, den sterischen Wirkungen in Multikomponenten-Proteingleichgewichten Rechnung und ist dazu in der Lage, das komplexe Verhalten in Ionenaustausch-Verdrängungssystemen vorherzusagen. Ein makromolekularer gelöster Stoff, wie ein Protein oder ein Polyelektrolyt weist vermutlich eine Viel-Punktbindung an eine Ionen-Austauscheroberfläche auf und die Anzahl der Wechselwirkungen zwischen der absorbierenden Oberfläche und einem einzelnen Makromolekül ist als die charakteristische Ladung des gelösten Moleküls definiert. Die charakteristische Ladung eines gelösten Stoffes ist numerisch der Anzahl der Salz-Gegenionen gleich, die durch den gelösten Stoff aus der Ionenaustauscher-Oberfläche nach Adsorption verdrängt werden. Jedoch behindert zusätzlich zu den Stellen, an denen das Polyelektrolyt tatsächlich wechselwirkt, ein großes gelöstes Makromolekül, das an eine Ionenaustauscher-Oberfläche gebunden ist, ebenfalls sterisch die Adsorption von Makromolekülen ähnlicher Größe an Stellen unterhalb und angrenzend an das gebundene gelöste Molekül. Die Anzahl sterisch behinderter Salz-Gegenionen auf der Oberfläche (pro adsorbiertem gelöstem Molekül), die zum Austausch mit anderen gelösten Molekülen in der flüssigen Phase nicht verfügbar ist, ist als der sterische Faktor des adsorbierten Makromoleküls definiert. Frühere Behandlungen der Massenwirkungsionenaustauscher-Gleichgewichte nahmen an, dass die Bindung eines Makromoleküls an eine adsorbierende Oberfläche nur mehrere Adsorbenz-Stellen beeinträchtigt, die seiner charakteristischen Ladung gleich sind. Tatsächlich spielt die sterische Abschirmung der stationären Phase-Stellen eine bedeutende Rolle im nicht linearen Adsorptionsverhalten von Makromolekülen in Ionen-Austauschersystemen.
[0029] Der stöchiometrische Austausch eines gelösten Moleküls (Protein oder Polyelektrolyt) und der austauschbaren Salz-Gegenionen kann durch folgendes repräsentiert werden:

$$C_i + v_i\overline{Q}_s - Q_i + v_iC_s \qquad (1)$$

wobei C und Q die Konzentration der mobilen und stationären Phase sind; v_i die charakteristische Ladung des gelösten Stoffes ist und die Indizes i und s das gelöste Molekül bzw. das Salzgegenion betreffen. Der Oberbalken bezeichnet gebundene Salz-Gegenionen, die zum Austausch mit dem gelösten Makromolekül in Lösung verfügbar sind. Die Gleichgewichtskonstante K_i, für den an der Ionenaustauschoberfläche adsorbierten gelösten Stoff wird durch folgendes angegeben:

$$K_i = \left(\frac{Q_i}{C_i}\right)\left(\frac{C_s}{\overline{Q}_s}\right)^{v_i} \qquad (2)$$

[0030] Die Gleichgewichtskonstante ist das Maß der Affinität des Moleküls. Der Elektro-Neutralitätszustand an der stationären Phase wird durch die folgende Relation wiedergegeben:

$$\Lambda \equiv \overline{Q}_s + (v_i + \sigma_i)Q \qquad (3)$$

wobei σ_i der sterische Faktor des Verdrängungsmittels oder Proteins ist. Unter Einsetzen von Gleichung 3 in Gleichung 2 und Umordnen ergibt die nachfolgende Gleichgewichtsrelation für ein einzelnes Protein oder Verdrängungsmittel:

$$c_i = \left(\frac{Q_i}{K_i}\right)\left(\frac{C_s}{\Lambda - (v_i + \sigma)Q_i}\right)^{v_i} \qquad (4)$$

[0031] Somit kann man unter Kenntnis der Werte der Gegenionkonzentration C_s der mobilen Phase, der Säulenionen-Bettkapazität Λ und der Modellparameter für jeden Bestandteil eine Isotherme für einen einzelnen Bestandteil aus der impliziten Gleichung (4) leicht erzeugen. Die erforderlichen Modellparameter für jeden Bestandteil sind: charakteristische Ladung v_i, sterischer Faktor σ; und die Gleichgewichtskonstante K_i. Um dieses Modell zur Vorhersage des Verdrängungsverhaltens zu verwenden ist es notwendig, Modellparameter für die Proteine und die Verdrängungsmittel zu bestimmen.

[0032] Die Ionen-Bettkapazität, Λ, kann in situ unter Verwendung der frontalen Chromatographie-Techniken gemessen werden [siehe Gadam et al., J. Chromatog. 630, 37–52 (1993)].

[0033] Für Proteinmoleküle, die ein signifikantes Salz-empfindliches Zurückhalten unter niedrigen bis moderaten Salzkonzentrationen in der mobilen Phase zeigen, kann die lineare Elutions-Chromatographie verwendet werden, um zwei der drei SMA Modell-Parameter (d. h., charakteristische Ladung und Gleichgewichtskonstante) unter Verwendung wohl etablierter Verhältnisse für Ionenaustausch-Systeme zu bestimmen [siehe Kopaciewicz et al., J. Chromotog. 266, 3 (1983)]. Lineare Elutionsexperimente werden bei verschiedenen Salzkonzentrationen für die mobile Phase durchgeführt, um die charakteristische Ladung (v_i) und die Gleichgewichtskonstante (K_i) durch die nachfolgenden Gleichungen zu bestimmen:

$$\log k' = \log(\beta K_i \Lambda_i^v) - v_i \log C_s \qquad (5)$$

wobei für einen logk' v log C_s-Plot die
Steigung = $-v_i$: und Intercept = $\log(\beta K_i \Lambda_i^v)$.

[0034] Nachdem die charakteristischen Ladungen und Gleichgewichtskonstanten für die Proteine bestimmt wurden, werden die verbleibenden SMA-Parameter, d. h. sterischer Faktor σ_i, für die Proteine unabhängig von einem einzelnen nicht linearen frontalen chromatographischen Experiment gemäß des Ausdrucks:

$$\sigma_i = \frac{\beta}{C_{s_i}\Pi}\left(\Lambda - C_s\left(\frac{\Pi}{\beta K_i}\right)^{1/v_i}\right) - v_i \qquad (6)$$

bestimmt, wobei,

$$\Pi = \left(\frac{V_b}{V_o} - 1\right) \qquad (7)$$

[0035] Viele Proteine zeigen signifikant höhere sterische Faktoren bzgl. ihrer charakteristischen Ladung, was im Hinblick auf die Konformations-Zwänge in dem Proteinmolekül nicht überraschend ist. Wenn die SMA-Parameter für ein gegebenes Protein einmal gewonnen wurden, kann das Modell zur Erzeugung von Adsorptionsisothermen bei jeder Salzkonzentration verwendet werden.

[0036] Während die Bestimmung der charakteristischen Ladung und Gleichgewichtskonstante aus den linearen Elutionsdaten gut für moderat zurückgehaltene Proteine funktioniert, ist es sehr schwierig, auf diese Weise Verdrängungsmittel mit hoher Affinität zu charakterisieren. Die Frontal-Chromatographie ist andererseits für Parametereinschätzungen für diese Verbindungen mit hoher Affinität sehr gut geeignet. Die charakteristische Ladung des Verdrängungsmittels, v_D, kann aus dem induzierten Salzgradienten unter Verwendung des nachfolgenden Ausdrucks bestimmt werden:

$$v_D = \frac{n_1}{n_D} = \frac{\Delta C_s}{C_D} \qquad (8)$$

wobei n_1 die Gesamtmenge an verdrängten Ionen ist, wobei n_D die Anzahl von Mol an Verdrängungsmittel ist, die an einer stationären Phase adsorbiert ist, wobei C_D die Konzentration der mobilen Phase an Polyelektrolyt-Verdrängungsmittel und ΔC_s die schrittweise Zunahme der Gegenionen-Konzentration in der mobilen Phase nach Verdrängungsmittel-Adsorption ist.

[0037] Bei einer ausreichend niedrigen Salzkonzentration in der mobilen Phase sättigt das Verdrängungsmittel das stationäre Phasen-Material vollständig. Frontalexperimente können unter diesen Bedingungen dazu verwendet werden, um den sterischen Faktor σ_D aus dem nachfolgenden Ausdruck zu bestimmen:

$$\sigma_D = \frac{\Lambda}{Q_D^{max}} - n_D \qquad (9)$$

wobei Λ die Ionen-Bettkapazität und Q_D^{max} die maximale stationäre Phasenkapazität des Polyelektrolyt-Verdrängungsmittels ist. Alternativ kann der sterische Faktor durch Messen, beispielsweise der sterisch behinderten Natriumionen, die durch eine Ammoniumfront verdrängt werden (analog zur Betten-Kapazitätsmessung), bestimmt werden, n_2, wie gegeben durch

$$\sigma_D = \frac{n_2}{n_D} \qquad (10)$$

[0038] Die Gleichgewichtskonstante für das Ionenaustauscherverfahren ist durch Gleichung 2 definiert. Wenn einmal die charakteristische Ladung und der sterische Faktor unabhängig wie oben beschrieben gemessen wurden, wird ein frontales Experiment zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K_D durchgeführt. Dieses Experiment wird unter erhöhten mobilen Phasen-Salzbedingungen durchgeführt, wobei der gelöste Stoff das Bett nicht vollständig sättigt. Die Gleichgewichtskonstante wird direkt aus dem Durchbruchsvolumen unter Verwendung der unabhängig bestimmten Werte der charakteristischen Ladung (v_D) und des sterischen Faktors (σ_D) durch den folgenden Ausdruck berechnet:

$$K_D = \frac{1}{\beta}\left(\frac{V_b}{V_o} - 1\right)\left(\frac{C_s}{\Lambda - (v_D + \sigma_D)\frac{C_D}{\beta}\left(\frac{V_b}{V_o} - 1\right)}\right)^{v_D} \qquad (11)$$

wobei β das Säulenphasen-Verhältnis ist und C_s die anfängliche Salzkonzentration im Träger ist. Wenn einmal die charakteristische Ladung, der sterische Faktor und die Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden, können die Isotherme der Proteine und der Polyelektrolyte unter Verwendung des SMA-Formalismus, oben beschrieben, simuliert werden.

[0039] Gemäß des konventionellen Wissens, basierend auf den mit derivatisierten Polysaccharid-Verdrängungsmittel beobachteten Ergebnissen, ist eine Hochmolekulargewichts-Verbindung mit einer relativ hohen charakteristischen Ladung und einem hohen sterischen Faktor zu charakteristischem Ladungsverhältnis für die Proteinverdrängungschromatographie erforderlich. Es bestanden bis jetzt keine klar definierten Kriterien zur Auswahl oder Bestimmung der Leistungsfähigkeit eines Verdrängungsmittels gegenüber einem anderen. Unter Verwendung des oben beschriebenen mathematischen Modells ist es nunmehr möglich, die Elutionsreihenfolge der Zufuhr-Bestandteile als eine Funktion der charakteristischen Ladung und der Gleichgewichtskonstante jeder der Verbindungen vorherzusagen, wenn einmal die Steigung der Betriebslinie des Verdrängungsmittels bekannt ist.

[0040] Das mathematische Kriterium für die effektive Verdrängungschromatographie kann als ein Plot von $\log K_i$ gegen v_i (siehe **Fig.** 5) rekonstruiert werden. Die Elutionsreihenfolge im isotaktischen Verdrängungszug kann im allgemeinen graphisch durch Konstruieren von Linien aus dem Punkt auf der Ordinatenachse, der der Steigung der Verdrängungsmittelbetriebslinie entspricht, Δ,

$$\Delta = \frac{Q_d}{C_d} = K_{1d}\left[\frac{\Lambda - (v_d + \sigma_d)Q_d}{(C_1)_d}\right] \qquad (12)$$

durch jeden der Punkte bestimmt werden, die durch die Gleichgewichtsparameter (charakteristische Ladung und Gleichgewichtskonstante) der gelösten Stoffe definiert werden. Die Reihenfolge der Elution der Zufuhr-Bestandteile entspricht den Reihenfolgen dieser „Affinitäts"-Linien gegen den Uhrzeigersinn (d. h. zunehmende Steigungen). Die Gleichung (12) $(C_i)_d$ ist die Salzkonzentration, die dem Verdrängungsmittel entgegentritt (d. h. die Trägersalzkonzentration), Q_d ist die Konzentration des Verdrängungsmittels an der stationären Phase und C_d ist die Konzentration von Verdrängungsmittel in der mobilen Phase.

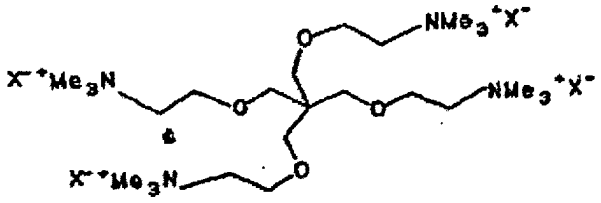
[0041] Obwohl die Anmelder nicht an diese hypothetische Konstruktion gebunden sein wollen, scheint es mit der Entdeckung übereinzustimmen, dass kleine Moleküle effektive Verdrängungsmittel sind, weil die Größe nicht der entscheidende Parameter ist. Gemäß dieser Theorie wird jedes Molekül, dessen K_i und v_i dieses in einer Richtung gegen den Uhrzeigersinn auf dem Affinitäts-Plot aus dem fraglichen Protein anordnet, als effektives Verdrängungsmittel für dieses Protein dienen.

[0042] In Übereinstimmung mit dieser Vorhersage wurden mehrere Verdrängungsmittel mit niedrigem Molekulargewicht getestet und für die Proteinverdrängung als wirksam befunden.

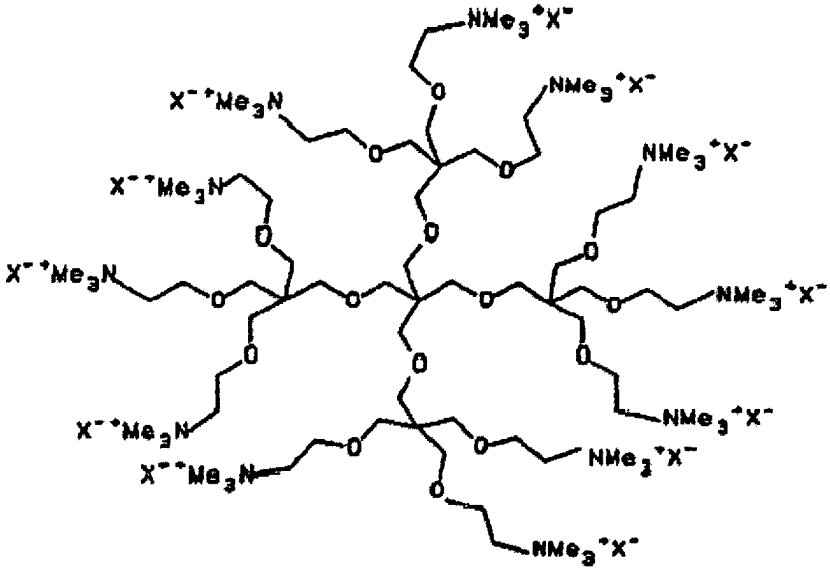
[0043] Dendritische Polymere (ebenfalls auch als Starburst-Polymere bekannt) sind dreidimensionale, hoch geordnete oligomere und polymere Verbindungen, die durch wiederholte Reaktionsfolgen, ausgehend von klei-

neren Molekülen – „Initiatorkerne" wie beispielsweise Ammoniak oder Pentaerythritol, gebildet werden. Mit ausgewählten Bildungsblöcken und Vermehrungsreaktionen können entscheidende Moleküldesign-Parameter wie beispielsweise Größe, Form, Topologie, Flexibilität und Oberflächenchemie präzise auf der molekularen Ebene kontrolliert werden. Diese Synthesen schreiten über getrennte Stufen voran, die als Generationen bezeichnet werden. Dendrimere besitzen drei unterschiedliche Gestaltungsmerkmale: (1) eine Initiator-Kernregion, (2) eine innere Zone, die kaskadierende Reihen von Zweigzellen mit radialer Verbindbarkeit zum Initiatorkern enthalten und (3) eine äußere oder Oberflächenregion mit terminalen Komponenten, die an die äußerste Generation gebunden sind.

[0044] Die Synthese von Pentaerythritol-basiertem Dendrimer der nullten (12), ersten (14) und zweiten [(16) dargestellt in Schema 2] Generation wurde wie ausführlich später beschrieben durchgeführt. Das Dendrimer der nullten Generation wird bequemerweise als PETMA4, PentaErythrityl (TriMethylAmmonium)$_4$, der ersten Generation als PETMA12 und der zweiten als PETMA36 bezeichnet. Pentaerythritol-basierte Dendrimere der ersten und zweiten Generation (PETMA12 und PETMA36) werden lediglich für beispielhafte Zwecke diskutiert und fallen nicht in den Umfang der beanspruchten Erfindung.



12



14

[0045] Die SMA-Modell-Gleichgewichtsparameter für die nullten, ersten und zweiten Generations-Dendrimere wurden in einer 50 × 5 mm I. D. SCX-Säule unter Verwendung einer frontalen chromatographischen Technik geschätzt.

[0046] Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, bindet ungefähr ein Drittel der Gesamtzahl an Ladungen auf jedem der Dendrimere an die Oberfläche. Die Dendrimere der ersten Generation (PETMA12) und der zweiten Generation (PETMA36) zeigten ähnliche Adsorptionsverhalten mit ähnlichen Werten von σ_D/v_D und $Q_D{}^*v_D$ und marginalen Zunahmen in Q_D unter Abnahme der Salzkonzentration.

Tabelle 1

Durchschnittliche Werte der SMA-Parameter für Pentaerythritol-basierte dendrimere Verdrängungsmittel							
Verdrängungsmittel (M.G.)	Salz (Na^+) Konz. (mM)	Konzentration an gelöstem Stoff C (mM)	Charakteristische Ladung (v_D)	Sterischer Faktor (σ_D)	(σ_D/v_D)	Q_D (mM)	$Q_D^* v_D$ (meq)
PETMA4 (480)	20	15	1,5	2,6	1,73	140	210
PETMA4 (480)	50	21	1,6	1,5	0,94	183	293
PETMA4 (480)	50	4,18	N.B.	N.B.	N.B.	177	N.B.
PETMA12 (1620)	20	6,17	4,2	6,3	1,50	55,3	232
PETMA12 (1620)	75	6,17	4,2	N.B.	N.B.	51,5	216
PETMA36 (5128)	20	1,96	11	16,7	1,52	20,9	230
PETMA36 (5128)	50	1,96	10,5	N.B.	N.B.	18,3	192

[0047] Wie in Tabelle 1 ersichtlich ist, weist das Dendrimer PETMA36 der zweiten Generation eine relativ höhere charakteristische Ladung als das Dendrimer der ersten Generation auf, jedoch ein ähnliches σ_i/v_i-Verhältnis. Gemäß der Theorie sollte PETMA36 als effizientes Verdrängungsmittel dienen und dies hat sich tatsächlich als solches herausgestellt. Eine Zwei-Protein Verdrängungs-Trennung (α-Chymotrypsinogen A und Cytochrom C) unter Verwendung von PETMA36 wurde in einer 100 × 5 mm Kationenaustauschersäule durchgeführt. Es bestand eine ausreichend gute Übereinstimmung von Theorie und Experiment. Das Experiment wurde unter Verwendung von gereinigtem (diafiltriertem) Pentaerythritol PETMA12 der ersten Generation als Verdrängungsmittel wiederholt. Diese Verdrängungen zeigen an, dass die Abnahme des Molekulargewichts und der Anzahl der geladenen Gruppen auf den Dendrimeren eine nur geringe Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit dieser Stoffe als Verdrängungsmittel aufwies. Unter Ausdehnung der Vorhersage auf eine weitere Ebene würde man voraussagen, dass ein Dendrimer der nullten Generation ebenfalls als Protein-Verdrängungsmittel dienen könnte. Diese Vorhersage läuft dem konventionellen Wissen der Verwendung von Hochmolekulargewichts-Polyelektrolyten mit hohen charakteristischen Ladungen als Verdrängungsmittel von Proteinen in Ionen-Austauschersystemen entgegen (das Dendrimer der nullten Generation weist eine Nettoladung von 4, eine charakteristische Ladung von 1,7 und ein Molekulargewicht von 480 Da auf.)

[0048] Die Ergebnisse der Verdrängungschromatographie des Zwei-Protein-Gemischs von α-Chymotrypsinogen A und Cytochrom-C mit dem dendritischen Verdrängungsmittel der nullten Generation sind in **Fig.** 6 dargestellt. Wie in dieser Figur ersichtlich ist, wird eine ausgezeichnete Verdrängungs-Auftrennung der beiden Proteine in hoch konzentrierten benachbarten Zonen mit scharfen Grenzen und relativ minimalem Vermischen beobachtet. Das Ergebnis ist wahrhaft revolutionär und ist für die Durchführung der Verdrängungschromatographie für Protein-Auftrennungen im großen Maßstab von tiefgreifender Signifikanz.

[0049] Es ist ersichtlich, dass die dendritischen Polyelektrolyte der nullten, ersten und zweiten Generation als leistungsfähige Verdrängungsmittel von Proteinen in Ionen-Austauschersystemen fungieren. Noch signifikanter ist die Fähigkeit von Niedermolekulargewichts-Verbindungen wie beispielsweise dem Dendrimer der „nullten" bzw. „null" Generation (M. G. 480), Proteine mit relativ hohem Molekulargewicht zu verdrängen im gegen-

wärtigen Kontext des Verständnisses des Verdrängungs-Phänomens besonders aufregend. Weil das Molekulargewicht und die Anzahl der geladenen Gruppen auf den Dendrimeren eine nur geringe Wirkung auf die Leistungsfähigkeit als Verdrängungsmittel aufzuweisen scheint, kann es vorteilhafter sein, ein Dendrimer der „zweiten" Generation als Verdrängungsmittel zu verwenden. Die Synthese dieser Moleküle ist viel einfacher und schließt wenige Schritte ein; (sie sind daher preiswerter). Sie weisen den zusätzlichen Vorteil einer einfachen Abtrennung von allen Zufuhrbe standteils-Zonen während des Nach-Verdrängungs, größenbasierten Downstream-Processings auf.

[0050] Weitere Elektrolyten mit niedrigem Molekulargewicht bzw. Molekülmasse scheinen ebenfalls effektiv als Verdrängungsmittel für Proteine zu fungieren. Beispielsweise können modifizierte Aminosäuren und ladungstragende Antibiotika als Verdrängungsmittel verwendet werden. Mit dem Begriff modifiziert soll gemeint sein, dass die Aminosäure so verändert wird, dass sie sich von amphoter entweder zu kationisch (für die Kationenaustauscherverdrängungs-Chromatographie) oder anionisch (für die Anionenaustauscher-Chromatographie) verändert. Dies wird am bequemsten durch Veresterung des Carboxylats erreicht, um eine kationische Spezies zu produzieren oder durch Acylieren des Amins, um eine anionische Spezies zu erzeugen.

[0051] Verdrängungsmittel, deren Ladung aus einem Carboxylat abgeleitet sind neigen dazu, wegen ihrer niedrigen charakteristischen Ladung bei einem pH, der üblicherweise in der Chromatographie verwendet wird, nicht besonders wirksame anionische Verdrängungsmittel zu sein; sie würden als Folge eine extrem hohe Gleichgewichtskonstante aufweisen, um auf dem Affinitäts-Plot in einen Bereich gegen den Uhrzeigersinn gegenüber den meisten interessierenden Proteinen zu fallen. Aus diesem Grund sind unter den Aminosäuren acylierte Taurin-Derivate wahrscheinlichere Kandidaten für anionische Verdrängungsmittel.

[0052] Carboxyl-derivatisierte Aminosäuren ergeben sehr wirksame kationische Verdrängungsmittel. Beispielsweise sind Carbobenzoxylysinmethylester, Benzoylargininethylester (BAEE), Argininmethylester und Argininamid wirksame Verdrängungsmittel in der Verdrängungschromatographie von α-Chymotrypsinogen und Cytochrom-C. Die ersten beiden weisen eine einzelne, positive Ladung auf; Argininmethylester und Amid weisen zwei positive Ladungen auf und als Folge weisen sie eine höhere Affinität für die stationäre Phase auf. Die Auftrennung von α-Chymotrypsinogen und Cytochrom-C in der isotaktischen Verdrängung ist mit der Auftrennung vergleichbar, die unter Verwendung von Verdrängungsmitteln mit hohem Molekulargewicht wie beispielsweise DEAE-Dextran erzielt wird. Ein Beispiel für ein Verdrängungs-Chromatogramm von α-Chymotrypsinogen A und Cytochrom-C auf einer 8 μm starken Kationenaustauschersäule und Verwendung von 45 mM Benzoylargininethylester in einer 50 mM Salzlösung bei pH 6,0 ist in **Fig.** 7 dargestellt. Die modifizierten Aminosäure-Verdrängungsmittel können in einer sehr reinen Form zu Kosten bezogen werden, die lediglich einen kleinen Teil der Kosten von Verdrängungsmitteln mit hohem Molekulargewicht darstellen. Zusätzlich ergibt ihre kleine Dimension bessere Transporteigenschaften und schnellere Kinetiken.

[0053] Viele Antibiotika weisen den Vorzug auf, dass sie klein genug sind, um leicht entfernt werden zu können, wenn sie in erwünschten Proteinfraktionen gefunden werden, sie können jedoch zusätzlich oftmals vorteilhafterweise in der Proteinfraktion zurückgelassen werden. Um die erwünschte Kombination von hoher charakteristischer Ladung und Gleichgewichtskonstante zu erreichen erscheint es, dass Antibiotika mit einer oder mehreren stark dissoziierenden Funktionalität besonders nützlich sind. Solche Antibiotika schließen Streptomycine ein, die zwei Guanidin-Funktionalitäten aufweisen. Ein Beispiel für ein Verdrängungs-Chromatogramm von α-Chymotrypsinogen A und Cytochrom-C auf einer 8 μm starken Kationenaustauschersäule unter Verwendung von 45 mM Streptomycinsulfat (M. G. 581) in einer 30 mM Salzlösung bei pH 6,0 ist in **Fig.** 8 dargestellt.

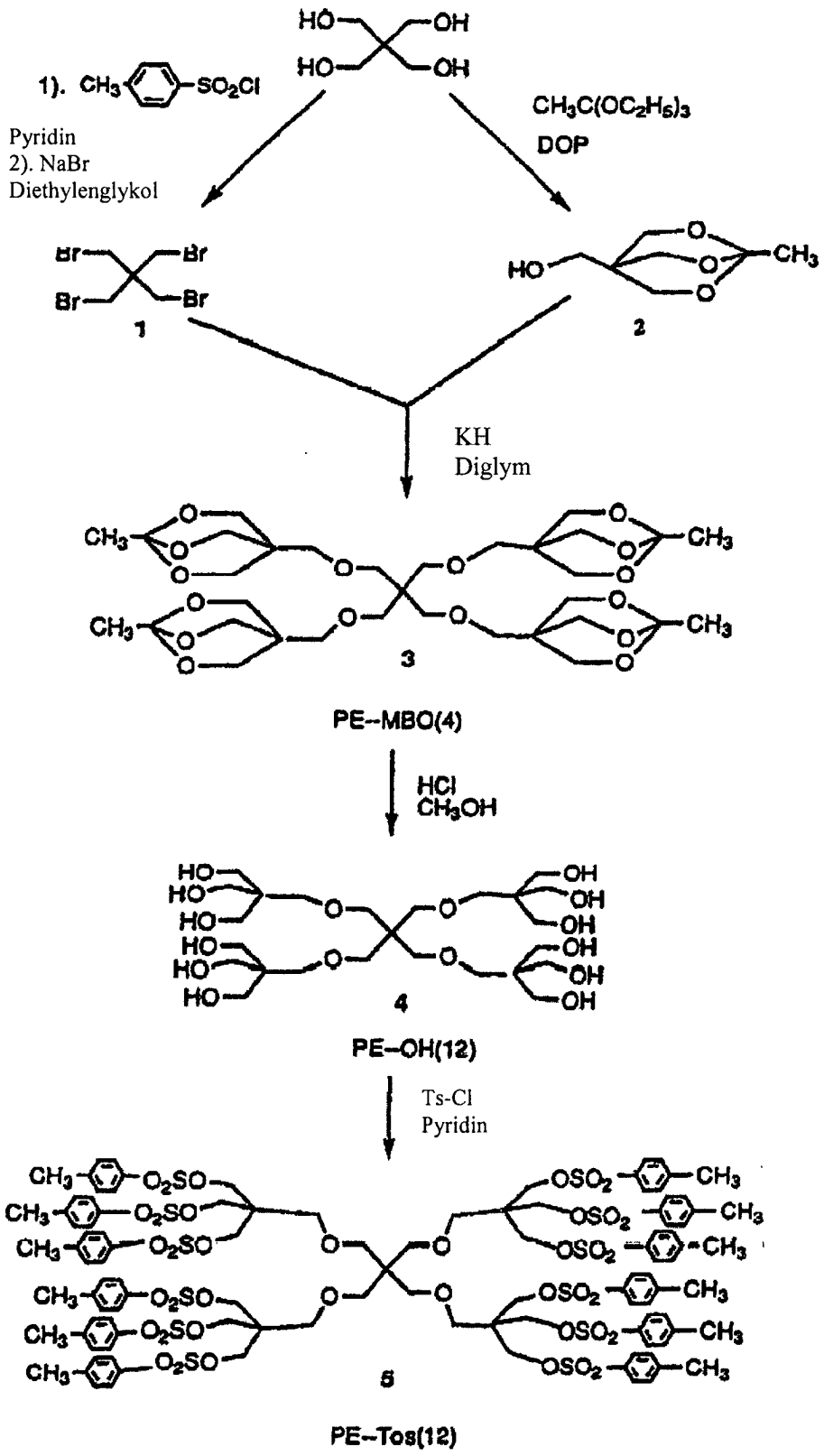
[0054] Der Beweis, dass Aminosäureester, dissoziierte Antibiotika und Dendrimere der nullten Generation alle Molekulargewichte unter 600 aufweisen und hoch wirksame Verdrängungsmittel sind bestätigt, dass Molekulargewichte über 2.000 nicht für Verdrängungsmittel für die Protein-Chromatographie notwendig sind. Wir haben tatsächlich keinen Fall einer geladenen Spezies von einem Molekulargewicht unter 2.000 gefunden, der nicht funktionierte, solange die charakteristische Ladung und Gleichgewichtskonstante derart waren, dass die SMA-Analyse (dargestellt in **Fig.** 5 und oben erklärt) eine Leistungsfähigkeit vorhersah.

[0055] Die Verdrängungs-Auftrennung eines Zwei-Komponenten Proteingemisches wurde ebenfalls unter Verwendung von rohem PETMA(12) als Verdrängungsmittel in einer 100 × 5 mm Kationenaustauschersäule durchgeführt. Obwohl die Proteinbestandteile verdrängt und in benachbarten Zonen gut aufgetrennt waren, zeigte das ausfließende Profil ähnliche Eigenschaften gegenüber früheren Verdrängungen mit unreinen DEAE-Dextran Verdrängungsmitteln. Es war am auffälligsten, dass die Cytochrom-C Zone beträchtlich weniger bzgl. der α-Chymotrypsinogen A-Zone konzentriert war. Offensichtlich trugen Verunreinigungen im Verdrängungsmittel zur Desorption der Proteine und zur Unterdrückung ihrer Isotherme bei. Es wird deswegen angenommen, dass es von Vorteil ist, die Dendrimere zu reinigen.

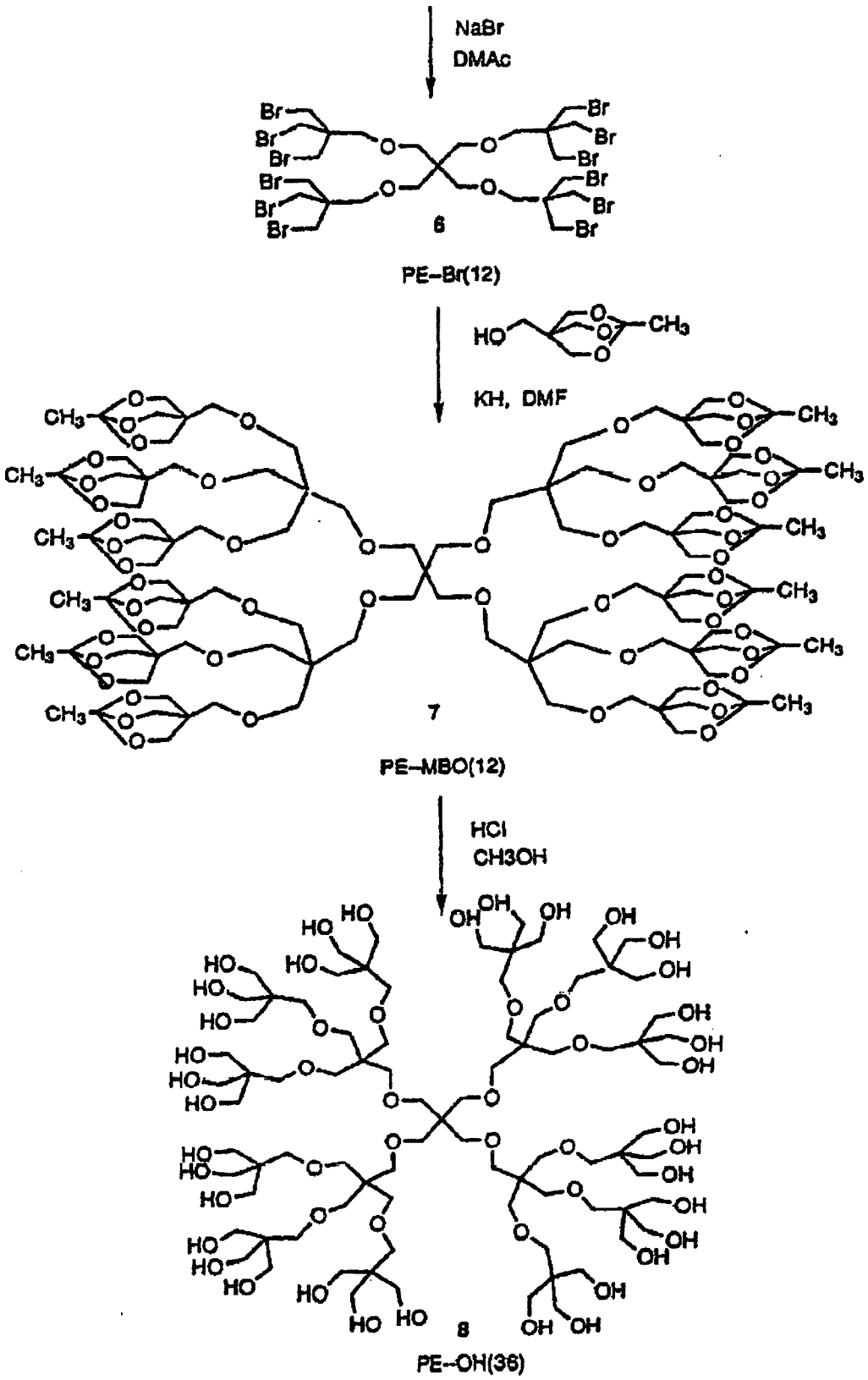
[0056] Ein Charakteristikum von Dendrimeren ist, dass eine Vielzahl terminaler Komponenten auf der Oberfläche der Dendrimere sitzen kann. Die terminalen bzw. Endgruppen können leicht zu Funktionalitäten umgewandelt werden, die das Potential für unterschiedliche Anwendungen ergeben und Dendrimere besitzen eine sehr hohe Dichte dieser terminalen Komponenten, die in der finalen Außenschicht sitzen. Wenn die organischen Gruppen auf der Oberfläche dieser kompakten Moleküle so funktionalisiert werden, dass sie geladene

Gruppen sind, wie beispielsweise quartäre Ammoniumsalze und Sulfonate, zeigen sie höhere Affinität gegenüber chromatographischen Medien als einige Proteine, was diese als neue Art von Verdrängungsmittel in der chromatographischen Auftrennung nützlich macht. Die Synthese des Rückgrats bzw. Grundgerüstes eines dendritischen Polyethers ist in Schema 1 dargestellt und dessen Funktionalisierungs-Weg zu einem Poly(etheramin) ist in Schema 2 dargestellt. Die Funktionalisierung dendrimerer Vorläufer zur Bereitstellung anionischer Dendrimere (Sulfonate) ist in Schema 3 dargestellt. Die in Schema 1 verwendete Strategie ist ein modifiziertes Verfahren, abgeleitet von der Arbeit von Hall und Padias [J. Org. Chem. 52, 5305 (1987)]. Pentaerythritol (PE) ist ebenfalls der Initiatorkern, jedoch wird 1-Methyl-4-(hydroxymethyl)-2,6,7-trioxabicyclo-[2.2.2]-octan (MHTBO) als Baustein anstelle des bicyclischen Hydroxymethyl-Orthoformiats (HTBO) verwendet. N,N-Dimethylethanolamin wird als das Synthon verwendet, um tertiäre Aminostellen einzubringen.

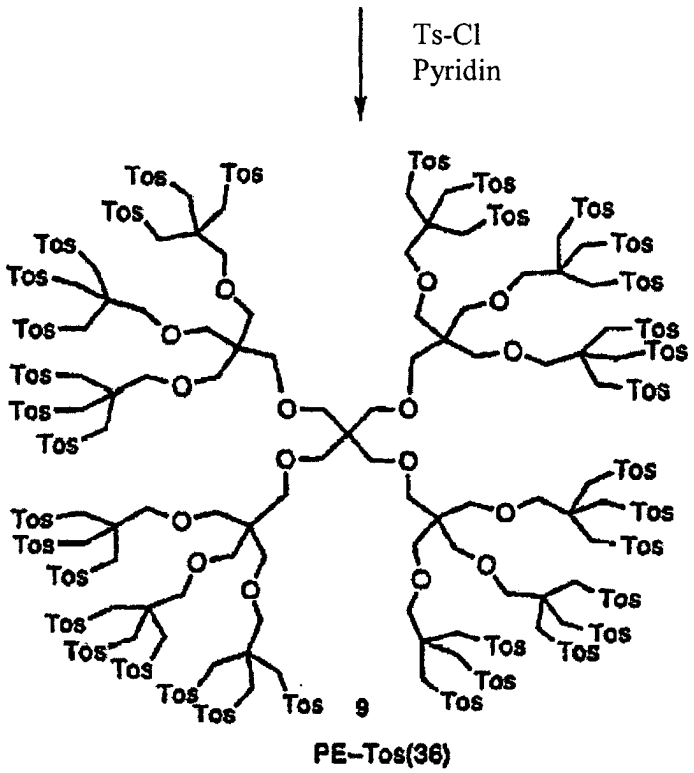
Schema 1


1). CH3 SO2Cl
Pyridin
2). NaBr
Diethylenglykol
CH3C(OC2H5)3
DOP
1
2
KH
Diglym
3
PE--MBO(4)
HCl
CH3OH
4
PE--OH(12)
Ts-Cl
Pyridin
5
PE--Tos(12)

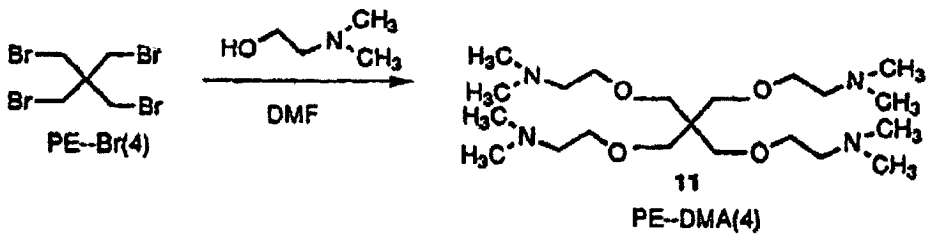
Schema 1 (Forts.)

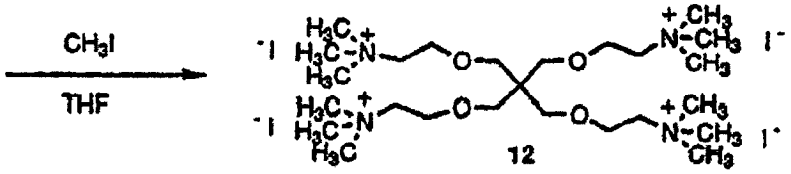


Schema 1 (Forts.)

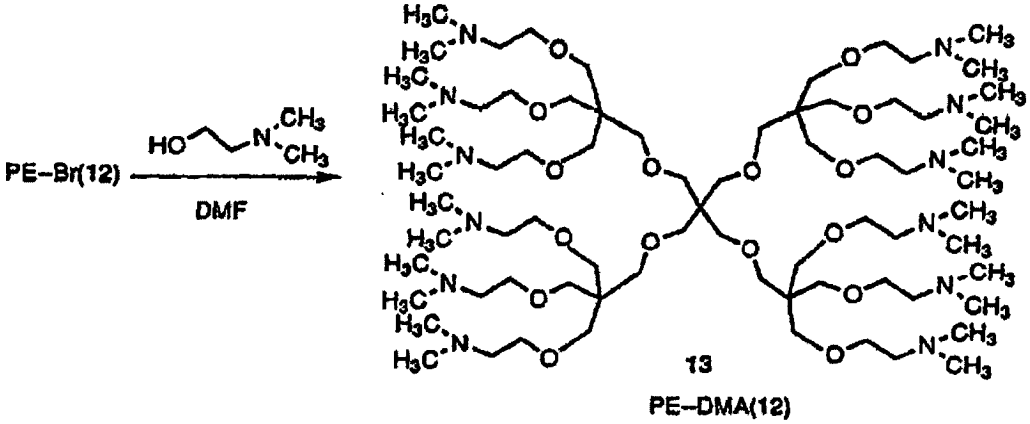


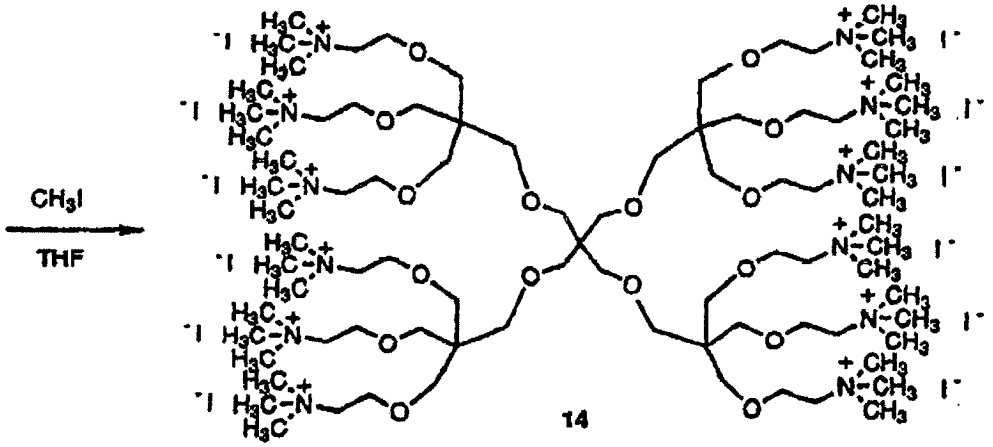
Schema 2





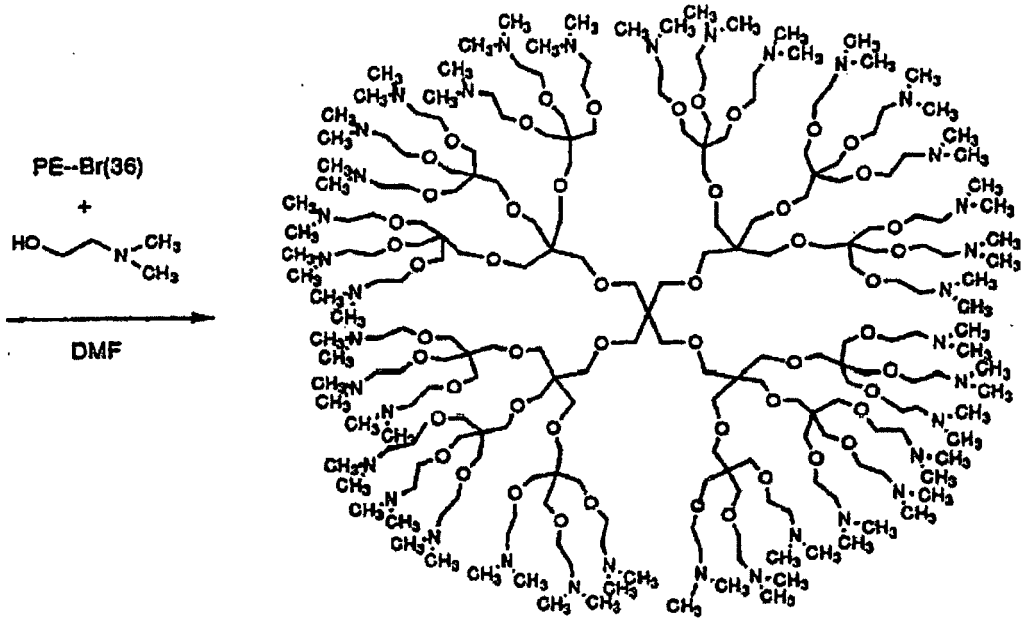
PE-TMA Iodid (4)





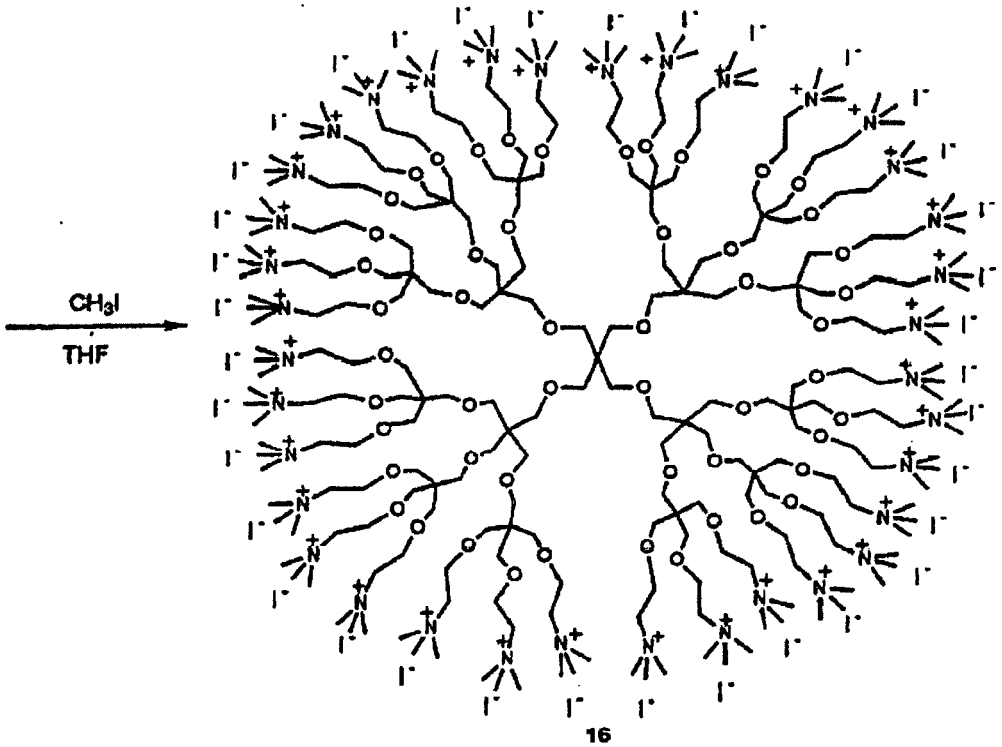
PE-TMA Iodid (12)

Schema 2 (Forts.)



15

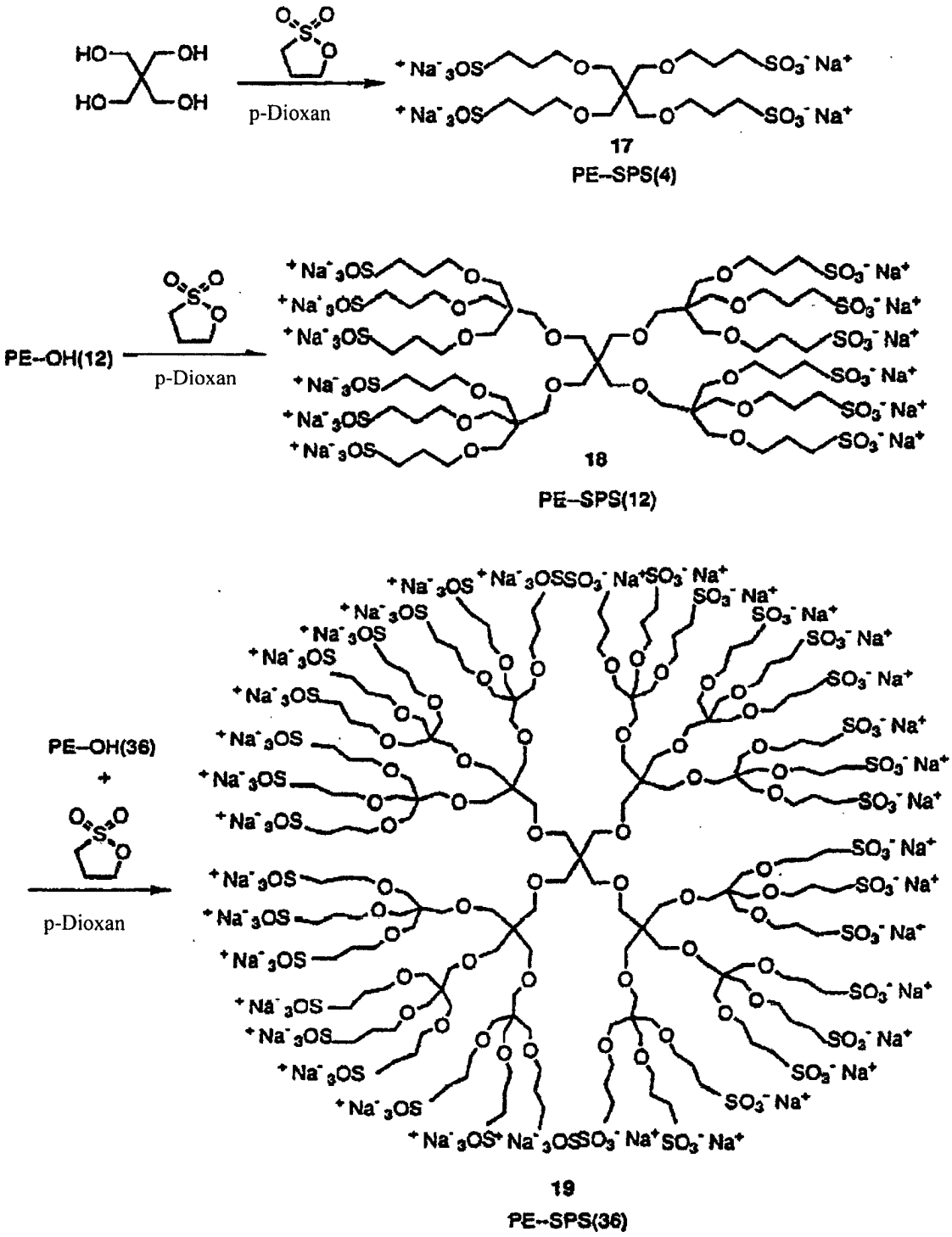
PE–DMA(36)



16

PE-TMA Iodid (36)

Schema 3



Herstellung dendrimerer Elektrolyte

[0057] Hexan, Tetrahydrofuran (THF) und 2-Methoxyethylether (Diglym) wurden über Natrium getrocknet und gerade vor Anwendung destilliert. N,N-Dimethylformamid (DMF) wurde von Aldrich Chemical Co. in HPLC Güte bezogen. Alle weiteren Lösungsmittel und Reagenzien wurden ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet, soweit in dem Verfahren nichts anderes angegeben ist.

Pentaerythrityltetrabromid, PE-Br(4) (Verbindung 1)

[0058] In einem 1 Liter Dreihalsrundbodenkolben, der mit einem mechanischen Rührgerät und einem Thermometer ausgestattet war, wurde Pentaerythritol (26,0 g, 0,19 Mol) und 200 ml Pyridin angeordnet. Das Rühren wurde begonnen und der Suspension wurde, abgekühlt in einem Eisbad, p-Toluolsulfonylchlorid (152,52

g, 0,8 Mol) als Feststoff in einer solchen Geschwindigkeit zugesetzt, dass die Temperatur nicht über 30°C anstiegt. Nachdem der Zusatz abgeschlossen war wurde die sich ergebende Aufschlemmung bei 35–40°C für weitere zwei Stunden gerührt. Die Aufschlemmung wurde dann langsam einer kräftig gerührten Lösung von 200 ml Wasser, 400 ml Methanol und 160 ml konzentrierter Salzsäure zugesetzt. Das rohe weiße Pentaerythrityltoluolsulfonat wurde weiter durch Zusetzen von mehr Eis abgekühlt, unter Absaugen filtriert und mit 1 Liter Wasser und 200 ml kaltem Methanol in zwei Anteilen gewaschen.

[0059] In einem 1 Liter Dreihalsrundbodenkolben, der mit einem mechanischen Rührgerät, einem Thermometer und einem Kondensator ausgestattet war, wurde das leicht feuchte Pentaerythrityltoluolsulfonat (ungefähr 140 g), Natriumbromid (120 g, 1,16 Mol) und 300 ml Diethylenglykol vermischt. Das Gemisch wurde dann auf 140–150°C unter langsamen Rühren erhitzt und in diesem Temperaturbereich über Nacht umgesetzt. Nach Abkühlen auf ungefähr Raumtemperatur wurde das Gemisch in 400 ml Wasser unter Rühren gegossen, das Präzipitat wurde unter Absaugen Filtriert und mit 500 ml Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde unter Vakuum (1 Torr) bei 50°C über Nacht getrocknet und aus Azeton umkristallisiert. Ausbeute: 52 g (70%). Schmelzpunkt: 157–160°C.

1-Methyl-4-(hydroxymethyl)-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2)octan (MHTBO, Verbindung 2)

[0060] Pentaerythritol (13,6 g, 0,1 mol), Triethylorthoacetat (16,22 g, 0,1 mol, 18,3 ml), Pyridin-p-toluolsulfonat (PPTS) (0,5 g, 2 mmol) und 100 ml Dioctylphthalat wurden in einem 250 ml Rundbodenkolben gemischt, der mit einem regulären Destillationsapparat ausgestattet war. Das Gemisch wurde auf 130–140°C erhitzt und Ethanol wurde langsam destilliert. Wenn die Menge an Ethanol dem theoretischen Wert nahe war, wurde der Druck auf < 0,1 Torr reduziert und das Produkt wurde im Vakuum destilliert. Das weiße Produkt, das destilliert wurde, kristallisierte im Kondensator und ergab 13,6–14,9 g MHTBO. Ausbeute: 85–93%. Die Verbindung kann aus Toluol umkristallisiert werden, kann jedoch auch direkt verwendet werden. Schmelzpunkt: 110–112°C.

PE-MBO(4) (Verbindung 3)

[0061] In einem 500 ml Dreihalskolben, der mit einem mechanischen Rührgerät, einem Thermometer und einem Zusatztrichter ausgestattet war, wurde unter einer Argonatmosphäre Kaliumhydrid (2,8 g, 0,07 mol, 8,0 g einer 35%igen Suspension) zweimal mit Hexan gewaschen, die Waschungen wurden dekantiert und 100 ml Diglym wurden zugesetzt. Nachdem das Gemisch auf 0°C unter Rühren abgekühlt war wurde eine Lösung aus 10,25 g (0,064 mol) von MHTBO in 100 ml Diglym tropfenweise zugesetzt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Darauf wurde eine Lösung von 5,82 g (0,015 mol) Pentaerythrityltetrabromid in 100 ml Diglym ebenfalls tropfenweise bei Raumtemperatur zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Rückfluß für 24 Stunden erhitzt. Das Gemisch wurde dann in 600 ml Eiswasser gegossen und das Präzipitat wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und unter Vakuum (1 Torr) bei 50°C über Nacht getrocknet. Ein weißer Feststoff (8,2 g, 78%) wurde gewonnen. Der Beilstein-Test für Bromid war negativ. Das Produkt wurde letztendlich aus 4 : 1 Ethylacetat/Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 5,86 g, 55%. Schmelzpunkt: 220°C leichtes Schrumpfen, 230–244°C Schmelzen.

PE-OH(12) (Verbindung 4)

[0062] In einem 250 ml Rundbodenkolben wurden PE-MBO(4) (6,0 g, 8,53 mmol) mit 100 ml Methanol und 1 ml konzentrierter HCl vermischt. Das Gemisch wurde langsam unter Rückflußkühlung erhitzt und für eine Stunde unter Rückflußkühlung gehalten. Methanol und Methylacetat wurden nur abdestilliert, bis ungefähr 1/3 des Lösungsmittels zurückblieb. Das weiße Produkt wurde filtriert und getrocknet. Ausbeute: 4,86 g (8,0 mmol), 94%. Schmelzpunkt: 180°C unter Schrumpfen, 220–235°C Schmelzen.

PE-Tos(12) (Verbindung 5)

[0063] In einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben wurde PE-OH(12) (2,24 g, 3,68 mmol) in 40 ml Pyridin gelöst und auf 0°C abgekühlt. Eine Lösung aus 21,2 g p-Toluolsulfonylchlorid (0,11 mol, 30 äqu.) in 100 ml Pyridin wurde tropfenweise durch einen Zusatztrichter zugesetzt. Die Lösung wurde für eine weitere Stunde bei 0°C gerührt und dann für vier Tage bei Raumtemperatur zurückgelassen. Das Gemisch wurde in 500 ml Eiswasser gegossen und das Lösungsmittel wurde dekantiert, nachdem das Präzipitat am Boden des Bechers agglomerierte. Das Rohprodukt, 9 g, wurde unter Vakuum (1 Torr) bei 50°C über Nacht getrocknet und wurde dann aus 4 : 1 Ethanol/Chloroform umkristallisiert. Ausbeute: 8,16 g (3,32 mmol), 90%. Schmelzpunkt: 130–133°C.

PE-Br(12) (Verbindung 6)

[0064] PE-Tos(12) (8,0 g, 3,25 mmol) wurde in 50 ml N,N-Dimethylacetamid (DMAc) gelöst und 10,06 g NaBr (98 mmol, 30 äqu.) wurden zugesetzt. Die sich ergebende Suspension wurde gerührt und auf 150°C erhitzt und bei dieser Temperatur für eine weitere Stunde gehalten. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur abgekühlt und auf Eiswasser gegossen. Das Präzipitat wurde filtriert, unter Vakuum (1 Torr) über Nacht getrocknet und aus Ethylacetat umkristallisiert. Ausbeute: 3,40 g (77%). Schmelzpunkt: 150°C unter Schrumpfen, 172–177°C Schmelzen.

PE-MBO(12) (Verbindung 7)

[0065] In einem 500 ml Dreihalsrundbodenkolben, der mit einem mechanischen Rührgerät, einem Thermometer und einem Zusatztrichter ausgestattet war, wurde Kaliumhydrid (1,6 g, 40 mmol, 4,57 g einer 35% Suspension) unter einer Argonatmosphäre mit Hexan zweimal gewaschen, die Waschungen wurden dekantiert und 100 ml DMF wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde auf 0°C abgekühlt und eine Lösung 5,76 g MHTBO (Verbindung 2) (36 mmol, 24 äqu.) in 50 ml DMF wurden tropfenweise zugesetzt. Die sich ergebende Suspension wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Dodecabromid (2,05 g, 1,5 mmol) wurde in 100 ml DMF bei 50°C gelöst und wurde darauf rasch tropfenweise dem Reaktionskolben sofort zugesetzt, während dieser warm war. Das Gemisch wurde für 24 Stunden unter Rückflußkühlung erhitzt und wurde dann in Eiswasser gegossen, das ungefähr 50 g Natriumchlorid enthielt. Das Präzipitat wurde filtriert und unter Vakuum (1 Torr) bei 40°C über Nacht getrocknet. Die Rohausbeute war quantitativ (3,45 g) und das Produkt wurde durch Säulenchromatographie mit Silikagel als stationärer Phase und einem Gemisch von 1 : 1 Ethylacetat/Hexan als Elutionsmittel gereinigt. RF-Wert: 0,42. Ausbeute: 2,9 g (1,25 mmol), 82%. Der Beilstein-Test für Halogen war negativ. Schmelzpunkt: 78°C unter Schrumpfen, 88–90° C Gelierung, 170°C Erweichung.

PE-OH(36) (Verbindung 8)

[0066] In einem 250 ml Rundbodenkolben wurde PE-MBO(12) (4,4 g, 1,9 mmol), 100 ml Methanol und 1 ml konzentrierte HCl angeordnet. Das Gemisch wurde unter Rückflußkühlung für eine Stunde erhitzt. Methanol und Methylacetat wurden destilliert, bis nur 15–20 ml der Lösung zurückblieben und die Lösung wurde in ein Becherglas übertragen. Nachdem der Rest des Lösungsmittels vollständig abgedampft war wurde der Sirup unter Vakuum (1 Torr) getrocknet, um einen Schaum zu gewinnen. Ausbeute: 3,35 g (1,66 mmol), 88%. Schmelzpunkt: 75° C unter Schrumpfen, 83–85°C Gelierung, 220–230°C Erweichung.

PE-Tos(36) (Verbindung 9)

[0067] In einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben wurden PE-OH(36) (4,17 g, 2,05 mmol) in 180 ml Pyridin gelöst und auf 0°C abgekühlt. Eine Lösung von p-Toluolsulfonylchlorid (29,4 g, 0,15 mol, 75 äqu.) in 200 ml Pyridin wurde tropfenweise zugesetzt. Das Gemisch wurde für eine weitere Stunde bei 0°C gerührt und dann bei Raumtemperatur für sieben Tage stehen gelassen. Die braune Lösung wurde in 2 Liter Eiswasser gegossen und das Präzipitat wurde abfiltriert und unter Vakuum (1 Torr) bei 40°C über Nacht getrocknet. Ausbeute: 14,36 g (1,88 mol), 92%. Schmelzpunkt: 120°C unter Schrumpfen, 220–245°C Schmelzen.

PE-Br(36) (Verbindung 10)

[0068] In einem 250 ml Dreihalsrundbodenkolben wurden 7,58 g (1,0 mmol) PE-Tos(36), 8,32 g (80 mmol, 80 äqu.) NaBr und 100 ml DMAc vermischt. Das Gemisch wurde gerührt und auf 150° C erhitzt und bei dieser Temperatur für eine Stunde gehalten. Darauf wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und unter Rühren in 2 Liter Eiswasser gegossen. Das Präzipitat wurde filtriert, mit weiteren 500 ml Wasser gewaschen und unter Vakuum (1 Torr) bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Ausbeute: 4,18 g, 98%. Schmelzpunkt: 48°C unter Schrumpfen. 52–68°C Schmelzen.

Tetralds[((N,N-Dimethylamino)ethoxy)methyl]methan, PE-DMA(4) (Verbindung 11)

[0069] In einem 500 ml Dreihalsrundbodenkolben, der mit einem mechanischen Rührgerät, einem Zusatztrichter und einem Thermometer ausgestattet war, wurde Kaliumhydrid (5,2 g, 0,13 mol, 14,8 g einer 35% Suspension) mit Hexan zweimal unter einer Argonatmosphäre gewaschen und 100 ml DMF wurden zugesetzt. Wenn das Gemisch auf 0°C abgekühlt war wurde eine Lösung aus 10,7 g (0,12 Mol, 6 äqu.) N,N-Dimethylethanolamin in 100 ml DMF tropfenweise zugesetzt und bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Eine Lösung von 7,8 g (0,02 mol) Pentaerythritoltetrabromid in 100 ml DMF wurde tropfenweise zugesetzt. Das Ge-

misch wurde auf 80°C erhitzt und bei 80–90°C für eine Stunde umgesetzt. Darauf wurde die Temperatur auf Rückfluß für weitere 12 Stunden angehoben. Das sich ergebende Gemisch wurde auf unter 50°C abgekühlt und in 300 ml Eiswasser gegossen. Alle Lösungsmittel wurden auf einem Rotavapor entfernt und der Rückstand wurde mit 800 ml Ethylether in einigen Portionen extrahiert und die kombinierten Extrakte wurden über $MgSO_4$ getrocknet. Nachdem der Ether abgedampft war wurde das Rohprodukt unter Vakuum (< 0,1 Torr) destilliert, um 5,7 g ölige Flüssigkeit PE-DMA(4) zu gewinnen. Die Verbindung wurde weiter zu einer klaren Flüssigkeit auf einer Al_2O_3 Säule unter Verwendung eines Gemisches von 4 : 1 Ethylacetat/Hexan als Elutionsmittel aufgereinigt. RF-Wert: 0,57. Ausbeute: 4,66 g, 59%. Siedepunkt: 140–143°C (0,03 mm Hg).

Tetrakis[((N,N,N-Trimethylammoniumiodid)ethoxy)methyl]methan, PE-TMA iodid(4) (Verbindung 12)

[0070] In einem 100 ml Dreihalskolben wurden PE-DMA(4) (2,3 g, 5,5 mmol) und 30 ml THF unter einer Argonatmosphäre angeordnet. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und eine Lösung von CH_3I (9,3 g, 66 mmol, 12 äqu., 4,1 ml) in 20 ml THF wurde tropfenweise zugesetzt. Nachdem der Zusatz abgeschlossen war, wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für fünf weitere Stunden gerührt. Das gelbliche Präzipitat wurde filtriert, unter Vakuum (1 Torr) bei 60°C über Nacht getrocknet und letztendlich aus Methanol umkristallisiert. Die Verbindung ist hoch hygroskopisch. Ausbeute: 3,84 g, 70%.

PE-DMA(12) (Verbindung 13)

[0071] Das Verfahren ist demjenigen ähnlich, das für PE-DMA(4) verwendet wurde. Kaliumhydrid (2,8 g, 0,07 Mol, 8,0 g einer 35% Suspension) wurden mit Hexan zweimal unter einer Argonatmosphäre gewaschen und es wurden 100 ml DMF zugesetzt. Eine Lösung aus 6 ml (0,06 mol, 5,34 g) N,N-Dimethylethanolamin in 50 ml DMF wurden tropfenweise bei 0°C zugesetzt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. PE-Br(12) (2,72 g, 32 mmol) wurden in 150 ml DMF bei 50°C gelöst und die Lösung wurde tropfenweise durch einen Zusatztrichter zugesetzt, während sie noch warm war. Das Gemisch wurde für 24 Stunden unter Rückflußkühlung erhitzt und in 300 ml Eiswasser gegossen. Nachdem das gesamte DMF und Wasser abgedampft waren, wurde der Rückstand mit 800 ml Ether in mehreren Anteilen extrahiert und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Etherlösung wurde filtriert und auf ungefähr 200 ml konzentriert. In einem 300 ml Dreihalskolben wurde HCl-Gas in die Lösung eingebracht und das Lösungsmittel wurde dekantiert, wenn kein Salz mehr gebildet wurde. Das Salz wurde mit wasserfreiem Ether zweimal gewaschen, unter Argon für eine halbe Stunde getrocknet, in Wasser gelöst und auf pH > 10 alkalisiert. Die sich ergebende wäßrige Lösung wurde auf einem Rotavapor getrocknet und der Rückstand wurde mit 500 ml Ether extrahiert und über $MgSO_4$ getrocknet. Nachdem der Ether abgedampft war, wurden 2,1 g ziemlich reines Produkt gewonnen. Die Verbindung ist ein viskoses Öl; Siedepunkt: 220°C bei 0,02 Torr. Ausbeute: 72%.

PE-TMA Iodid(12) (Verbindung 14)

[0072] Das Verfahren ist mit demjenigen für PE-TMA verwendeten identisch (Iodid (4)). PE-DMA (12) (2,04 g, 1,4 mmol) wurden in 60 ml THF gelöst. Bei 0°C wurde eine Lösung aus 3,2 ml (7,12 g, 50 mmol, 36 äqu.) CH_3I in 20 ml THF tropfenweise zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für weitere drei Stunden gerührt. Das gelbe Präzipitat wurde filtriert und unter Vakuum (1 Torr) bei 60°C über Nacht getrocknet. Dieses Salz kann nicht aus Methanol umkristallisiert werden und wurde weiter durch Ultrafiltration gereinigt, bevor es als Verdrängungsmittel getestet wurde. Ausbeute: 3,74 g, 84%.

PE-DMA(36) (Verbindung 15)

[0073] Dieses Verfahren ist mit demjenigen, das für PE-DMA(12) verwendet wurde, identisch. Kaliumhydrid (2,8 g, 0,07 mmol, 8,0 g einer 35% Suspension) wurde zweimal mit Hexan gewaschen und 100 ml DMF wurde zugesetzt. Bei 0°C wurde eine Lösung aus 6,4 ml (5,7 g, 64 mmol, 80 äqu.) N,N-Dimethylethanolamin in 50 ml DMF zugesetzt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. PE-Br(36) (3,43 g, 0,8 mmol) wurden in 100 ml DMF gelöst und tropfenweise bei Raumtemperatur zugesetzt. Das Gemisch wurde dann unter Rückflußkühlung für 24 Stunden erhitzt und in 200 ml Eiswasser gegossen. Nachdem die gesamten Lösungsmittel entfernt waren wurde der Rückstand mit 800 ml Ether extrahiert. Das Polyamin wurde durch Perlen von HCl-Gas in eine Etherlösung zu einem Salz umgewandelt und wurde dann durch Alkalisieren der wäßrigen Lösung auf einen pH > 10 freigesetzt. Diese Verbindung ist ein äußerst viskoser Sirup und ist hoch hygroskopisch. Ausbeute: 1,86 g, 51%.

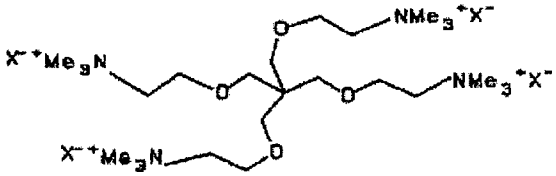
PE-TMA Iodid(36) (Verbindung 16)

[0074] Das Verfahren ist ebenfalls mit demjenigen identisch, das für PE-TMA Iodid(4) und PE-TMA (12) verwendet wurde. PE-DMA(36) (1,79 g, 0,39 mmol) wurde in 100 ml THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Eine Lösung aus 4,2 g (1,82 ml, 30 mmol, 75 äqu.) CH_3I in 20 ml THF wurde zugesetzt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für weitere drei Stunden gerührt. Das Präzipitat wurde dann filtriert und unter Vakuum (1 Torr) bei 60°C über Nacht getrocknet. Ausbeute: 2,8 g, 75%.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Aufreinigen eines Proteins, wobei das Protein ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 10 kDa oder mehr ist, wobei das Verfahren das Aufladen des Proteins in einem geeigneten Beladungslösungsmittel auf eine stationäre Ionenaustauscher-Phase, und ein Verdrängen des Proteins von der stationären Phase durch Verdrängungschromatographie unter Verwendung eines Verdrängungsmittels mit einem Molekulargewicht von weniger als 1.620, umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die stationäre Phase ein Kationenaustauscherharz ist und das Verdrängungsmittel eine kationische Spezies ist, beispielsweise
(a) ein Poly(quartäres Ammonium)-Salz oder
(b)



wobei x ein Gegenanion ist, ausgewählt aus Halogen, Sulfat, Sulfonat, Perchlorat, Acetat, Phosphat und Nitrat.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die stationäre Phase ein Anionenaustauscherharz ist und das Verdrängungsmittel eine anionische Spezies ist.

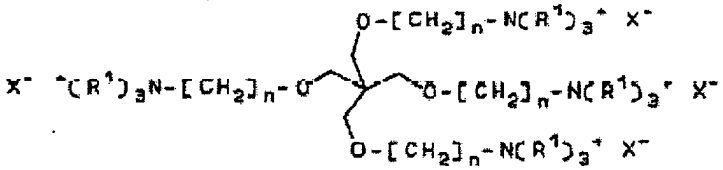
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verdrängungsmittel:
(a) aus Aminosäureestern, Aminosäureamiden, N-Acylaminosäuren, Peptidestern, Peptidamiden, N-Acylpeptiden, niederen Alkylestern und Amiden von Lysin, niederen Alkylestern und Amiden von Arginin, niederen Alkylestern und Amiden von N^{α}-acyliertem Lysin und niederen Alkylestern und Amiden von N^{α}-acyliertem Arginin, ausgewählt ist; oder
(b) ein dendritisches Polymer; oder
(c) ein kationisches Antibiotikum; oder
(d) ein anionisches Antibiotikum
ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verdrängungsmittel in einem Lösungsmittelsystem gelöst wird und das Verdrängungsmittel aus Elektrolyten ausgewählt ist, deren charakteristische Ladung (v) und Gleichgewichtskonstante (K) derart beschaffen sind, dass, wenn ein Koordinatensystem erzeugt wird, das auf der Ordinate den logK repräsentiert und auf der Abszisse repräsentiert, eine Linie, die von einem Punkt A auf der Ordinatenachse durch einen Punkt definiert durch K und v des Verdrängungsmittels konstruiert wird, eine größere Steigung als eine entsprechende Linie aufweist, die von dem selben Punkt A durch einen Punkt konstruiert wird, der durch K und v des zu reinigenden Proteins definiert wird, wobei Punkt A in seinem Wert der Steigung der Arbeitskurve des Verdrängungsmittels (Δ) in diesem Lösungsmittelsystem entspricht, in dem das Verdrängungsmittel gelöst wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verdrängungsmittel ein dendritisches Polyelektrolyt-Verdrängungsmittel ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die stationäre Phase ein Kationenaustauscherharz und das Polyelektrolyt-Verdrängungsmittel ein Polykation ist, beispielsweise ein Poly(quartäres Ammonium)-Salz.

8. Verbindung der Formel



wobei R^1 ein niederes Alkyl von sechs oder weniger Kohlenstoffatomen ist; n 2 bis 6 ist, und x Halogen, Sulfat, Sulfonat, Perchlorat, Acetat, Phosphat oder Nitrat ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

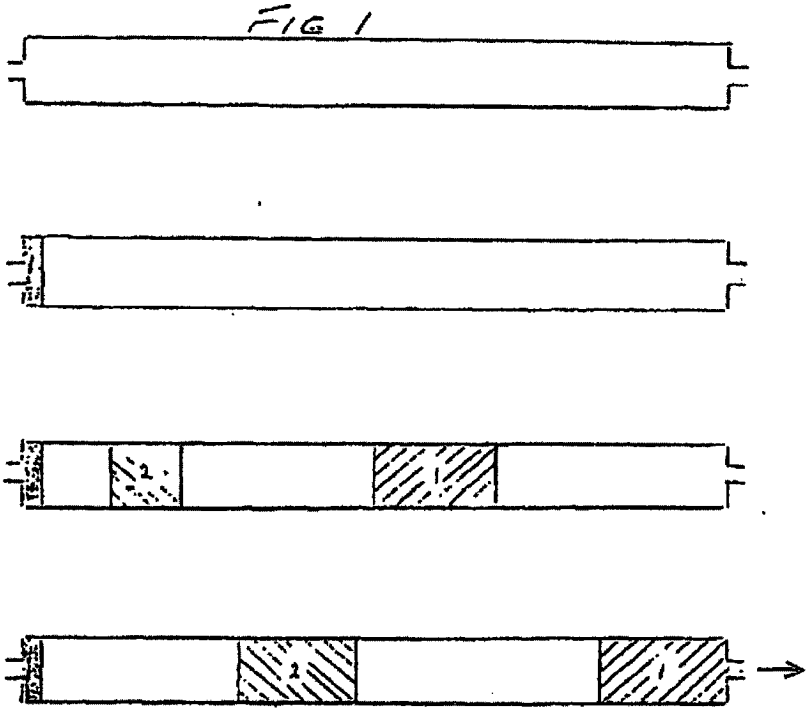


Fig 2

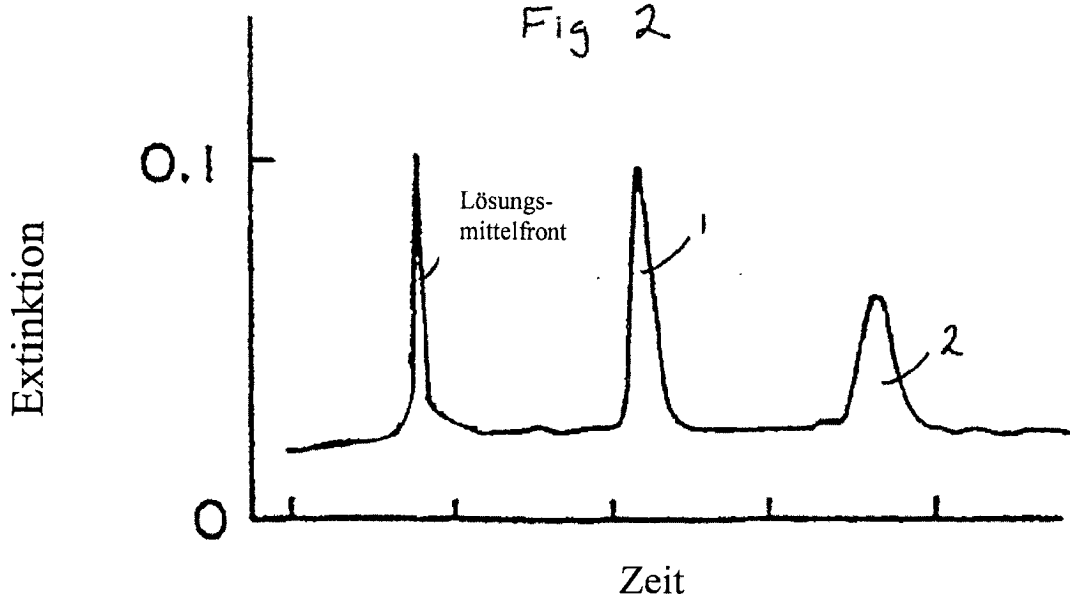


FIG 3

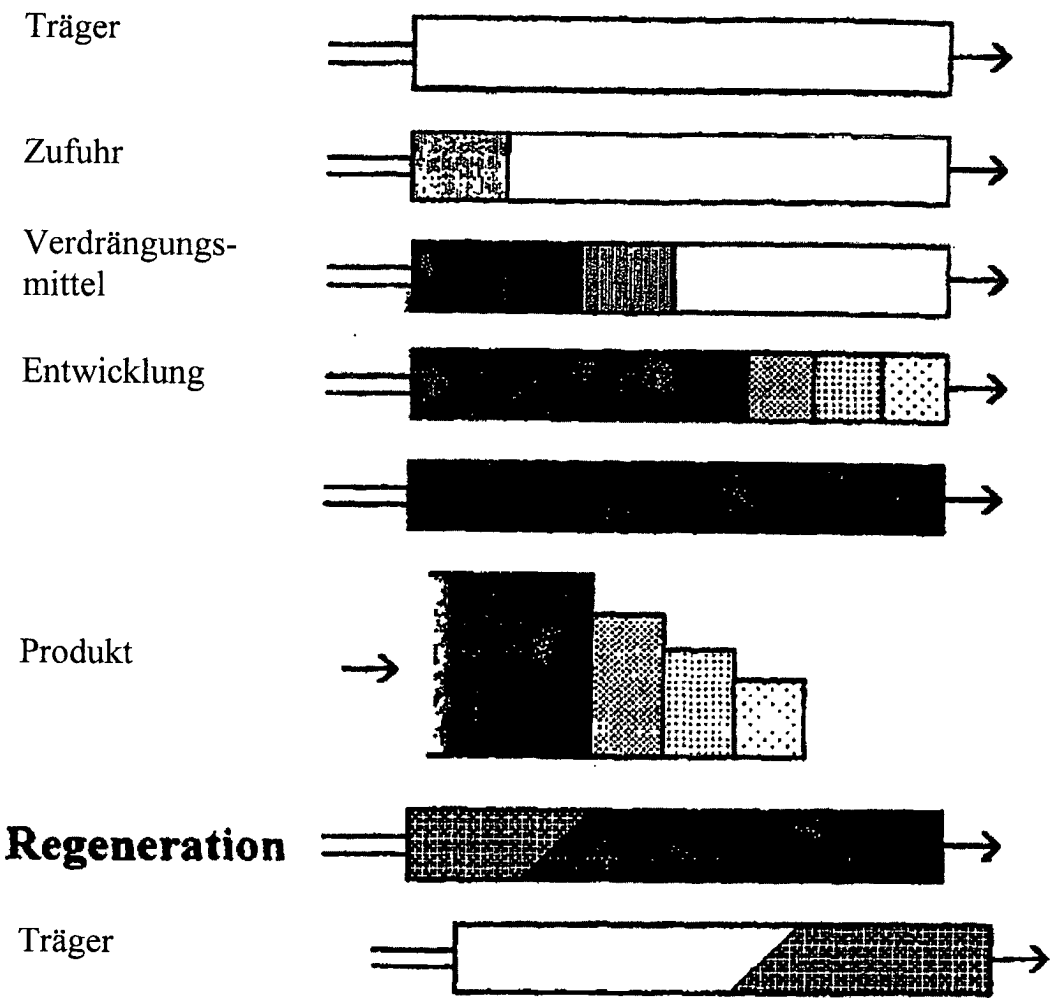

Träger
Zufuhr
Verdrängungs-
mittel
Entwicklung
Produkt
Regeneration
Träger

Fig 4

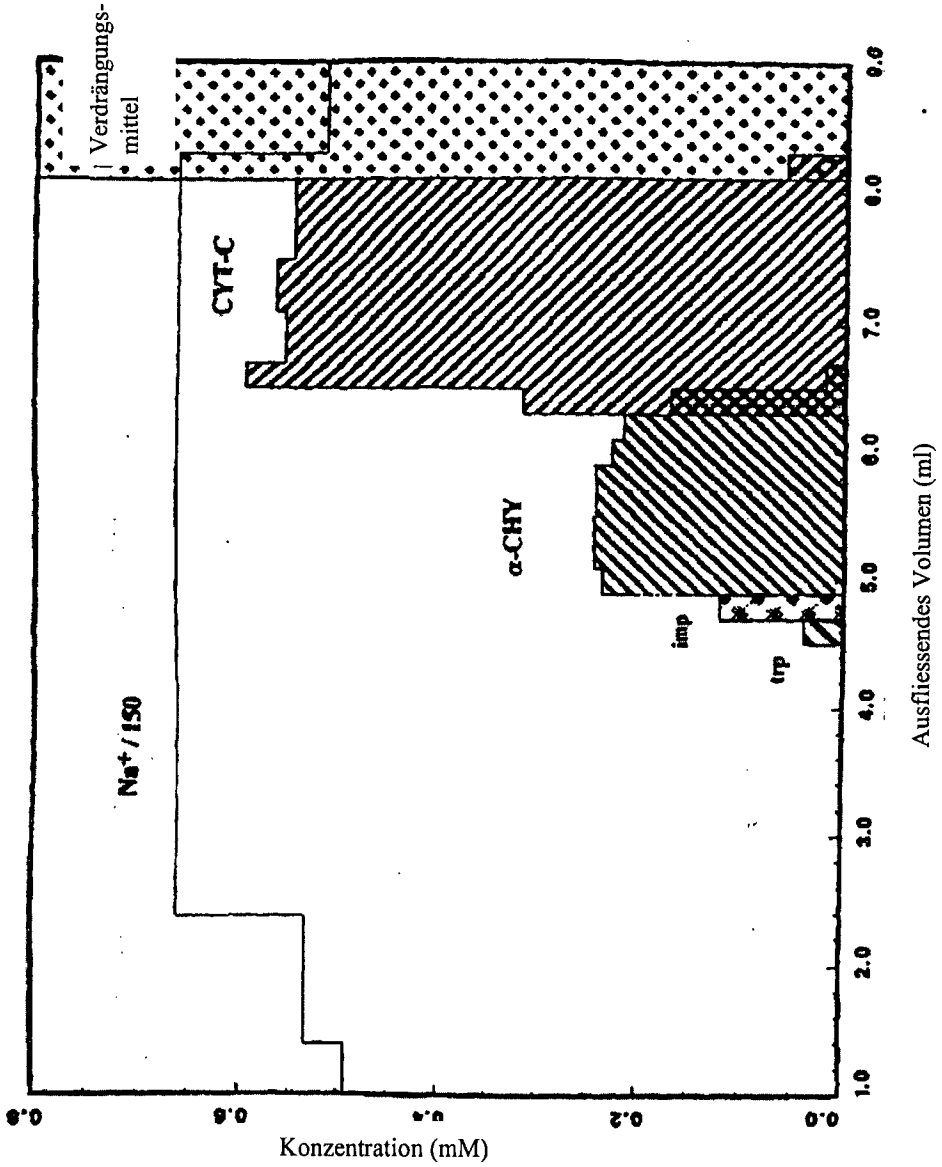
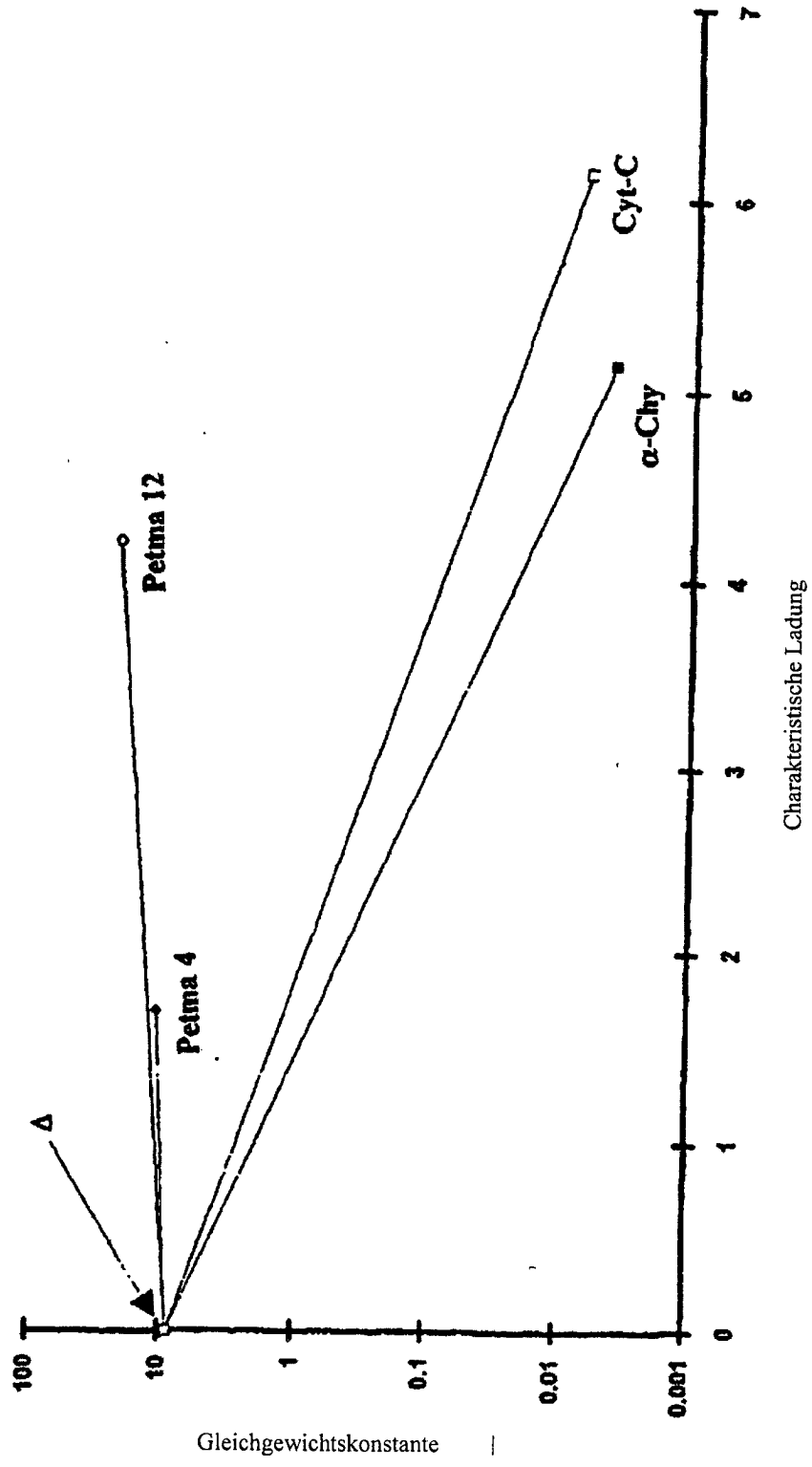

Verdrängungs-
mittel
CYT-C
α-CHY
imp
trp
Na+ / 150
Konzentration (mM)
Ausfliessendes Volumen (ml)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0

Fig 5


Petma 12
Petma 4
Δ
Cyt-C
α-Chy
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
1
2
3
4
5
6
7
Gleichgewichtskonstante
Charakteristische Ladung

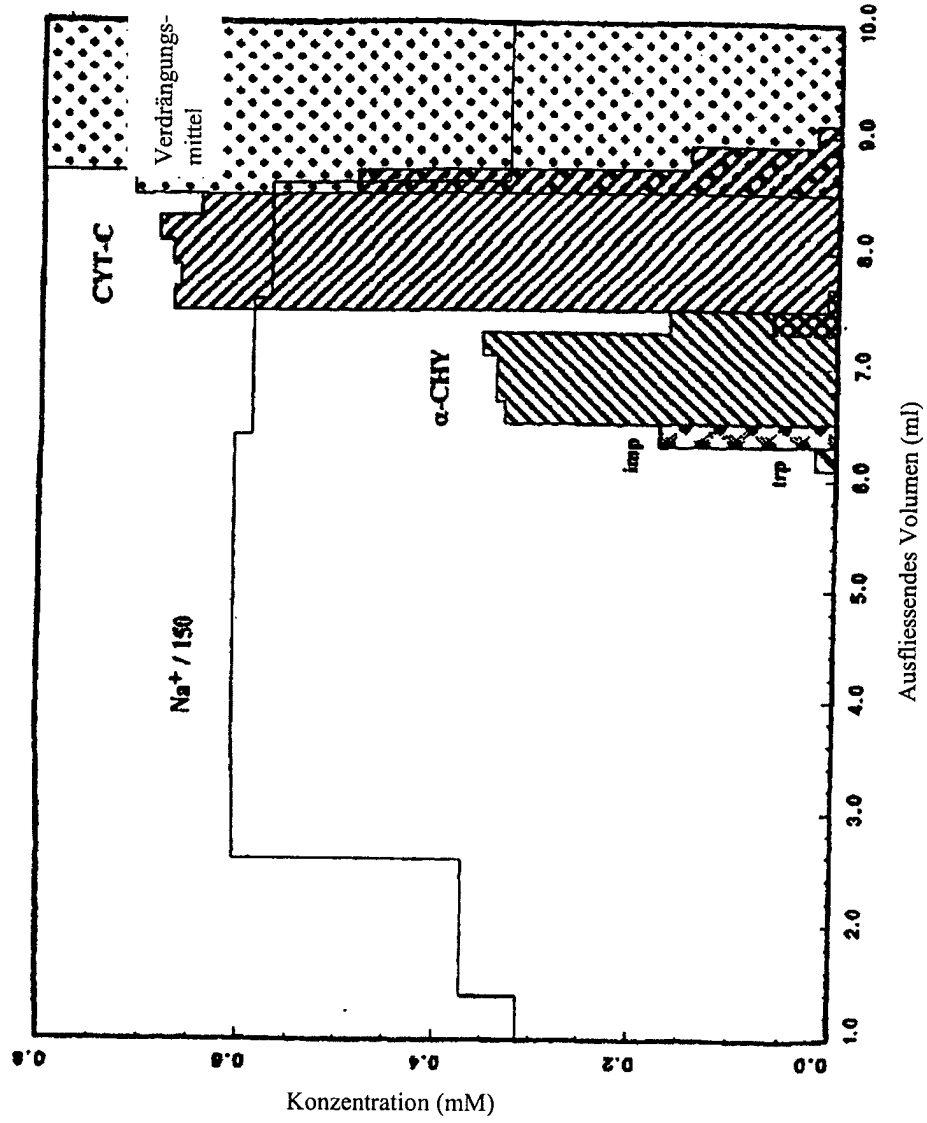

Verdrängungs-
mittel
CYT-C
α-CHY
imp
trp
Na+ / 150
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
Konzentration (mM)
Ausfliessendes Volumen (ml)

Fig 6

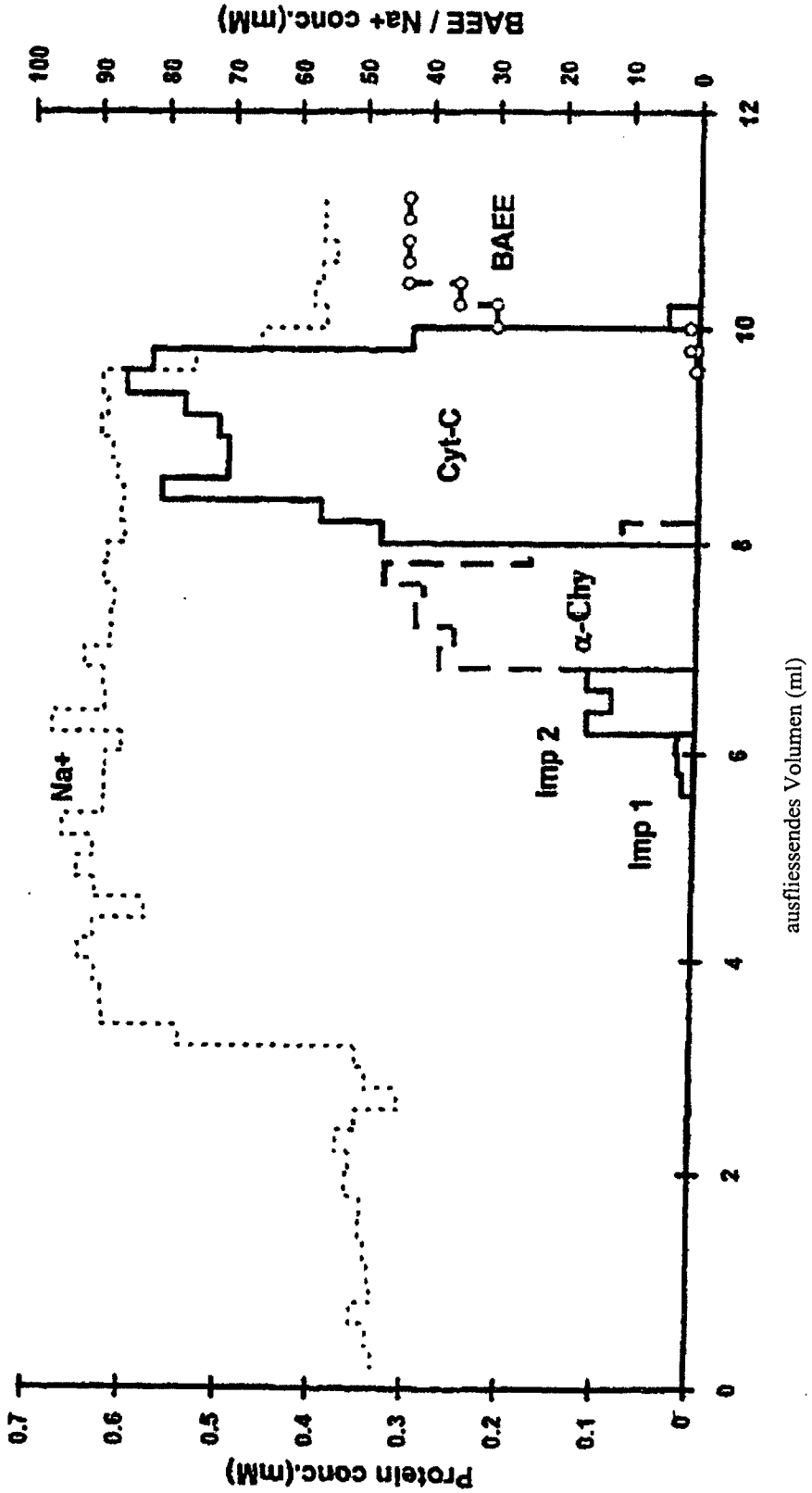

BAEE / Na+ conc.(mM)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12
10
8
6
4
2
0
BAEE
Cyt-C
α-Chy
Imp 2
Imp 1
Na+
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Protein conc.(mM)
ausfliessendes Volumen (ml)

Fig 7

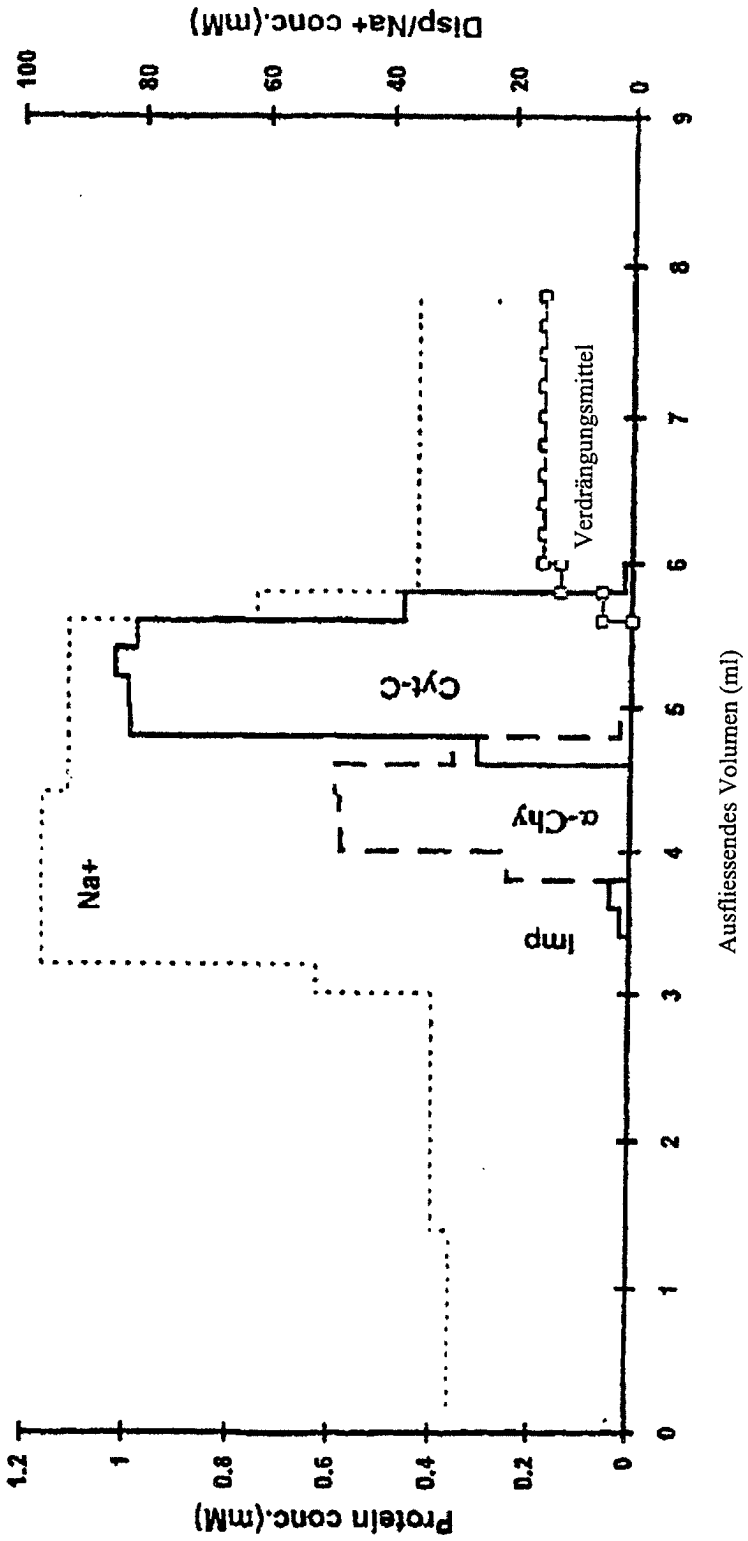

Disp/Na+ conc.(mM)
100
80
60
40
20
0
Verdrängungsmittel
Cyt-C
α-Chy
Imp
Na+
Protein conc.(mM)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Ausfliessendes Volumen (ml)

Fig 8