



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

(11) **DD 300 949 A7**

5(51) G 01 N 30/48  
B 01 J 20/10

DEUTSCHES PATENTAMT

---

(21)	DD G 01 N / 304 579 4	(22)	03. 07. 87	(45)	10. 09. 92
(72)	Kirstein, Dieter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Müller, Hans-Georg, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol.; Heymann, Stephan, Dr. rer. nat. Dipl.-Phys.; Schülke, Ulrich, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Kayser, Renate, Dipl.-Päd.; Megges, Rudolf, Dr. sc. Dipl.-Chem., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin, DE				
(74)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patente, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				

---

(54) **Träger für affinitätschromatographische Trennungen**

(57) Die Erfindung betrifft Träger für affinitätschromatographische Trennungen, die aus einem porösen Feststoff, der mehrwertige Metallionen – ausgenommen Aluminium-Ionen – in der Matrix oder in einer Überzugsschicht enthält, und einer mono- oder bifunktionellen Verbindung besteht, die mindestens eine Phosphonsäuregruppe und gegebenenfalls eine zweite Phosphonsäuregruppe und/oder eine weitere funktionelle Gruppe, insbesondere einen Molekülrest hoher chemischer Reaktivität, einen Alkylrest mit mindestens 3 C-Atomen, einen ein- oder mehrkernigen Arylrest oder ein heterocyclisches Ringsystem enthält, wobei die funktionelle Gruppe reversible und selektive Wechselwirkungen mit einer oder mehreren Komponenten eines zu trennenden Gemisches eingeht.

## Patentansprüche:

1. Träger für Affinitätschromatographische Trennungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus einem porösen Feststoff, der mehrwertige Metallionen – ausgenommen Aluminium-Ionen – in der Matrix oder in einer Überzugsschicht enthält, und einer mono- oder bifunktionellen Verbindung besteht, die mindestens eine Phosphonsäuregruppe und gegebenenfalls eine zweite Phosphonsäuregruppe oder eine andere funktionelle Gruppe hoher chemischer Reaktivität oder einen Alkylrest mit mindestens 3 C-Atomen oder einen ein- oder mehrkernigen Arylrest oder heterozyklisches Ringsystem enthält.
2. Träger nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gruppe hoher chemischer Reaktivität reversible und selektive Wechselwirkungen mit einer oder mehreren Komponenten eines zu trennenden Gemisches eingeht.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen Träger für Affinitätschromatographische Trennungen.

Anwendungsgebiet ist die Biotechnologie, so z. B. bei der Isolierung von Bestandteilen aus Produkten chemischer oder biotechnologischer Prozesse, Reinigung und Feinreinigung von Substanzen und die Anreicherung von Spurenbestandteilen.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es sind Verfahren bekannt, nach denen Feststoffe aus organischen Materialien, insbesondere Polymere, durch chemische Synthese oder durch polymeranaloge Reaktionen mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden, die reversible und selektive Reaktionen mit Komponenten eines zu trennenden Gemisches eingehen. Die Bindung der funktionellen Gruppe an die Matrix beruht in der Regel auf kovalenter Bindung (P. Mohr and K. Pommerening „Affinity Chromatography—Practical and Theoretical Aspects“ Marcel Dekker Inc. NY, Basel 1985).

Nachteile organischer Trägermaterialien sind geringe mechanische Stabilität und hohe Kompressibilität.

Weiterhin sind Verfahren zur Herstellung von analogen Verbindungen auf der Basis anorganischer Materialien bekannt, bei denen anorganische Feststoffe mit organischen Überzügen versehen werden, die funktionelle Gruppen enthalten, welche den Einsatz des Produkts für Affinitätschromatographische Trennverfahren gestatten. Das Verfahren zur Funktionalisierung anorganischer Träger beinhaltet in der Regel als ersten Schritt die Bildung eines Überzuges aus einer bifunktionellen Verbindung. Als anorganische Träger werden Gläser, Metalle, Metalloxide oder Salze, z. B. Silikate oder Phosphate, genutzt, wobei abhängig vom Molekulargewicht der abzutrennenden Verbindung makroporöse Trägermaterialien eingesetzt werden, die über große spezifische Oberflächen verfügen. Als bifunktionelle Verbindung werden gegebenenfalls substituierte Alkoxyde oder Halogenide des Siliziums, Titans, Zirkons oder von anderen Nebengruppenelementen des Periodensystems genutzt. Sie werden gasförmig, in organischen oder wäßrig-organischen Lösung angewandt und erfordern zumeist eine zusätzliche thermische Nachbehandlung (USP 3'783'101, Cabral, J. M. S., Novais, J. M. und Cardoso, J. P. Biotechnol. Bioeng. 23 2083 (1981)). In einigen Fällen enthalten diese bifunktionellen Verbindungen bereits Molekülreste, die zu einer spezifischen Wechselwirkung mit Komponenten eines zu trennenden Gemisches führen. Normalerweise werden aber über eine zweite funktionelle Gruppe derartige Molekülreste chemisch gebunden. Bekannte Beispiele sind die Silanisierung poröser Gläser mit  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilan und die anschließende Bindung von Liganden über Dialdehyde, Chinone, Säurechloride, Diisocyanate o. ä. Als Liganden werden genutzt: Chelatbildner, Enzymsubstrate, Enzyminhibitoren, Cofaktoren, Glykoproteine, Enzyme, Antigene, Antikörper, Thiole, aliphatische, aromatische und heterocyclische Verbindungen unterschiedlicher Polarität, Farbstoffe und Nukleotide.

Die modifizierten Träger werden schließlich in gerührten Gefäßen, vorwiegend aber in Säulen, zur Affinitätschromatographischen Trennung eingesetzt. Das Hauptanwendungsgebiet ist die Reindarstellung von Biomolekülen aus biologischem Rohmaterial oder aus angereicherten Fraktionen. Zunehmend wird die Affinitätschromatographie auch zur Aufarbeitung biotechnologisch hergestellter Produkte genutzt, z. B. zur Abreicherung von Proteasen u. a.

Nachteil der hier beschriebenen Verfahren ist der relativ teure und verfahrensintensive Schritt der Primärfunktionalisierung. Weiterhin ist bekannt, daß sich Phosphonsäuregruppen in organische Verbindungen einführen lassen, indem Carboxyl-, Carbonyl-, Amid- oder Nitrilgruppen mit  $P_4O_6$  in organischen Lösungsmitteln phosphoryliert werden oder indem Aminogruppen mit Formaldehyd und phosphoriger Säure umgesetzt werden. Aus EP 218506 sind Aluminiumverbindungen bekannt, die mit funktionellen Phosphatgruppen versehen sind und Träger für Biomakromoleküle darstellen. Ihre Herstellung ist jedoch aufwendig.

## Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, einen Träger für Affinitätschromatographische Anwendung herzustellen, der bei guten mechanischen Eigenschaften einen leicht herstellbaren Überzug aus einer funktionellen Verbindung enthält, die direkt oder nach chemischer Umsetzung ein Produkt ergibt, das für Affinitätschromatographische Verfahren einsetzbar ist.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß besteht der Träger für Affinitätschromatographische Trennungen aus einem makroporösen Feststoff, der mehrwertige Kationen – ausgenommen Aluminium-Ionen – in der Matrix oder in einem Überzug trägt und einer mono- oder bifunktionellen Verbindung, die mindestens eine Phosphonsäuregruppe und gegebenenfalls eine zweite Phosphonsäuregruppe oder eine andere funktionelle Gruppe hoher chemischer Reaktivität, einen Alkylrest mit mindestens 3 C-Atomen, einen ein- oder mehrkernigen Arylrest oder ein heterocyclisches Ringsystem enthält.

Die funktionelle Gruppe bzw. die genannten Reste sind dadurch gekennzeichnet, daß sie reversible und selektive Reaktionen mit einer oder mehreren Komponenten eines zu trennenden Gemisches eingehen.

Als mehrwertige Kationen versteht man erfindungsgemäß Ionen, die mit Phosphonaten schwerlösliche Salze oder stabile Komplexe bilden, im Prinzip sind das alle Metalle der 2.-4. Hauptgruppe des Periodensystems und die Metalle der Nebengruppen.

Die Überzüge werden aus der Gasphase (z. B. im Fall von  $TiCl_4$ ) oder aus Lösungen aufgebracht, z. B. in Form von wäßrigen Metallsalzlösungen.

Die hiermit beschriebene Matrix wird anschließend durch einfaches Eintragen in eine vorwiegend wäßrige Lösung einer substituierten Phosphonsäure primär funktionalisiert.

Durch geeignete Wahl der Ausgangsstoffe werden substituierte Phosphonsäuren erhalten, die mit der Matrix unter Bildung des Endproduktes reagieren (s. Beispiele 1 und 2), anderenfalls werden insbesondere  $\omega$ -Aminoalkanphosphonsäuren eingesetzt, und die hochreaktive Aminogruppe wird anschließend zur Bindung von Liganden genutzt (Beispiel 3).

Als Liganden werden die gleichen Molekülgruppen genutzt, die bei den bekannten technischen Lösungen im Zusammenhang mit bifunktionellen Silanen angegeben sind. Der Träger besitzt gute mechanische Eigenschaften, enthält einen leicht herstellbaren Überzug und ist für Affinitätschromatographische Trennungen gut geeignet.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

2 g Stearinsäure werden mit 1,1 g Phosphor-III-oxid in 20 ml n-Hexan phosphonyliert, in 10 ml Wasser gelöst und mit einer Suspension von 15 g sphärischem Hydroxylapatit in 50 ml Natronlauge (10  $\mu$ mol/l) 2 h geschüttelt. Das Produkt wird mit Wasser gewaschen, bis die Leitfähigkeit im Überstand kleiner als 100  $\mu$ S ist. Der modifizierte Träger wird zur Affinitätschromatographischen Abtrennung hydrophober Proteine eingesetzt.

#### Beispiel 2

0,4 mol Dodecylamin und 66 g  $H_3PO_3$  werden in 90 ml HCl (0,05 mol/l) gelöst, mit 160 ml Formaldehyd (33%ig) versetzt und 30 min auf 100° erhitzt. 100 g poröses Glas werden mit einer Lösung von 25 g Titan-tetrachlorid in 300 ml Toluol 3 h unter Feuchtigkeitsausschluß erhitzt (Siedepunkt), dann abfiltriert und getrocknet. Das titanylierte Glas wird bei pH 8 mit der eingangs hergestellten Phosphonsäure umgesetzt und das Produkt wie in Beispiel 1 verwendet.

#### Beispiel 3

21,9 g 2-Aminoethan-1,1-bisphosphonsäure werden in 300 ml Pyridin gelöst, mit 18,55 g p-Nitrobenzoylchlorid versetzt und auf 80° erhitzt. Nach 2 h wird das überschüssige Pyridin im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in 100 ml Wasser gelöst und mit 30 g Natriumdithionit bei pH 8 um 2° reduziert. Nach Zugabe von 15 ml konzentrierter Salzsäure wird unter starkem Rühren bei 0° mit 6,9 g Natriumnitrit in 10 ml  $H_2O$  diazotiert. Anschließend werden bei pH 4,5 14,5 g 8-Hydroxychinolin an diese Verbindung gekuppelt und das Reaktionsprodukt zu einer Suspension von 500 g Ca-Silikat in 4 l verdünnter Natronlauge (pH = 12) gegeben und 2 h in einem rotierenden Gefäß immobilisiert. Das erhaltene Produkt wird zur AC-Trennung von Schwermetallionen eingesetzt.