(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. März 2009 (19.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/033947 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
B03C 1/28 (2006.01) *B03C 1/01* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/061170

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. August 2008 (26.08.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 043 281.1
11. September 2007 (11.09.2007) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **BHAKDI, Sebastian Chakrit** [DE/DE]; Lahnbergstrasse 17a, 35043 Marburg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **MALASIT, Prida** [TH/TH]; Medical Molecular Biology Unit, Siriraj Hospital, Faculty of Medicine, Mahidol University, 12th fl. Adulyadej Vikrom Bldg., 10700 Prannok, Bangkok (TH).

(74) Anwalt: **HEHL, Ulrich**; Klostersteige 36, 87435 Kempten (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/033947 A2

(54) **Title:** HIGH GRADIENT MAGNET SEPARATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

(54) **Bezeichnung:** HOCHGRADIENTENMAGNETSEPARATION BIOLOGISCHEN MATERIALS

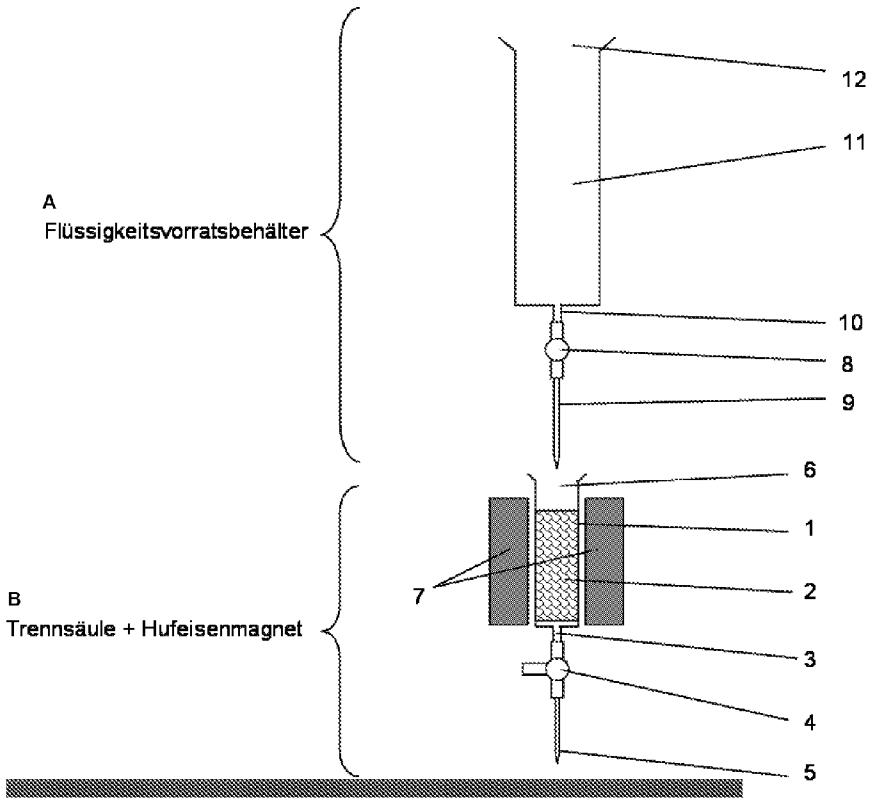


Fig. 1 A Liquid storage container
B Separating column + horseshoe magnet

(57) **Abstract:** The invention relates to a high gradient magnet separation device for the separation or purification of magnetic or magnetically labeled biological material, comprising a magnet (7), a separating column (1), and a ferromagnetic matrix (2) that can be arranged in an interior chamber of the separating column, and a storage container (11) containing a buffer solution for the equilibration of the separating column (1) and/or for the suspension of the biological material, wherein during operation a magnetic field created by the magnet (7) creates a high gradient magnetic field in the matrix (2) and buffer solution can flow from the storage container (11) through the separating column (1). For this purpose, the buffer solution comprises a base solution and macromolecules that can saturate nonspecific binding sites of the matrix (2).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(57) Zusammenfassung: Es wird eine Hochgradientenmagnetseparations-Vorrichtung für die Trennung oder Aufreinigung magnetischen oder magnetisch markierten biologischen Materials mit einem Magnet (7), einer Trennsäule (1) und einer in einem Innenraum der Trennsäule anordenbaren ferromagnetischen Matrix (2), sowie mit einem eine Pufferlösung zur Equilibrierung der Trennsäule (1) und/oder zur Suspension des biologischen Materials enthaltenden Vorratsbehälter (11) angegeben, wobei im Betrieb ein von dem Magnet (7) erzeugtes Magnetfeld in der Matrix (2) ein Hochgradientenmagnetfeld erzeugen und Pufferlösung aus dem Vorratsbehälter (11) die Trennsäule (1) durchströmen kann. Dabei weist die Pufferlösung eine Grundlösung und Makromoleküle auf, welche unspezifische Bindungsstellen der Matrix (2) absättigen können.

Hochgradientenmagnetseparation biologischen Materials

Die Erfindung betrifft eine Anwendung der Hochgradientenmagnetseparations (HGMS)-Technologie zur Trennung und Aufreinigung von biologischem Material.

Speziell auf dem Gebiet der medizinisch-biologischen Forschung ist die Abtrennung und Aufreinigung bestimmter Partikel aus heterogenen Partikelsuspensionen für verschiedenste Analyseverfahren von großer Bedeutung. Generell unterscheiden sich die Partikel, welche aufgereinigt werden sollen, im Folgenden „Zielpartikel" genannt, oftmals nur minimal von dem Rest der in der Suspension enthaltenen Partikel, im Folgenden „nicht-Zielpartikel" genannt. Bei Zielpartikeln und nicht-Zielpartikeln handelt es sich oft um Zellen oder Zellfragmente, es können jedoch auch beliebige andere biologische Substanzen sein.

Einige bewährte Abtrennungsverfahren nutzen magnetische Eigenschaften von Zielpartikeln, wobei die Zielpartikel natürliche, „intrinsische" magnetische Eigenschaften besitzen können oder aber vor dem eigentlichen Abtrennungsverfahren durch gezieltes Anheften synthetischer magnetischer Teilchen markiert werden.

Intrinsisch magnetische Partikel sind beispielsweise rote Blutzellen, vorausgesetzt der Fall, dass das in diesen enthaltende Hämoglobin in desoxygeniertem oder oxidiertem, jedoch nicht in oxygeniertem Zustand vorliegt. Hierbei bedeutet desoxygeniert nicht-sauerstofftragend und oxygeniert sauerstofftragend. In letzterem Falle trägt das Hämoglobinmolekül ein Sauerstoffmolekül in nicht kovalenter, also reversibler Bindung. Davon zu unterscheiden ist der oxidierte Zustand des Hämoglobins, in welchem Sauerstoff- oder andere oxidierende Atome kovalent, also nicht reversibel an das zentrale Eisenatom des Hämoglobinmoleküles gebunden sind. Nun tragen die Orbitale des im Hämoglobinmolekül enthaltenen zentralen Eisenatoms sowohl in der desoxygenierten wie in der oxidierten Form (jedoch nicht in der oxygenierten Form) ungepaarte Elektronen, deren ungepaarter Spin die Induktion magnetischer Pole im Eisenatom durch Anlegen eines magnetischen Feldes ermöglicht. Allerdings übt ein angelegtes magnetisches Feld konventioneller Art insgesamt keine gerichtete magnetische Kraft auf ein Partikel aus, welches solche Eisenatome enthält, da sich aufgrund des sehr kleinen Atomdurchmessers anziehende und abstoßende magnetische Kräfte an Nord- und Südpol der polarisierten Eisenatome die Waage halten. Auch wird das Partikel nach Wegnahme des Magnetfeldes seine magnetische Polarisation verlieren. Diese Art des

Magnetismus ist als „Paramagnetismus“ bekannt. Eine spezielle Form des Paramagnetismus wird gelegentlich auch als „Superparamagnetismus“ bezeichnet. Zwischen diesen beiden Formen besteht jedoch physikalisch keine scharfe Trennung, im Folgenden sollen daher die Begriffe „Paramagnetismus“ und „paramagnetisch“ die Begriffe „Superparamagnetismus“ und „superparamagnetisch“ mit umschließen.

Auch die gängigen, zur magnetischen Markierung von Zielpartikeln verwandten synthetischen Teilchen sind paramagnetisch und enthalten üblicherweise, ganz ähnlich dem oxidierten Hämoglobin, kleinste Mengen oxidierten Eisens oder einer anderen magnetisierbaren Substanz. Sie sind außerdem idealerweise so klein, dass sie in Suspension stabile Kolloide bilden, also auch über lange Zeiträume (Monate bis Jahre) nicht sedimentieren, daher beträgt ihr Durchmesser im Allgemeinen 30-200 nm. Kommerziell erhältliche Teilchen dieser Art werden allein oder an Antikörper gebunden vertrieben, beispielsweise von chemicell GmbH (Eresburgstrasse 22-23, D-12103 Berlin, Deutschland), micromod Partikeltechnologie GmbH (Friedrich-Barnewitz-Str.4, D-18119 Rostock, Deutschland) oder Miltenyi Biotech GmbH (Friedrich Ebert Straße 68, D-51429 Bergisch Gladbach, Deutschland).

Ein bewährtes Verfahren, paramagnetische Partikel aufzureinigen, d.h. von Partikelsuspensionen abzutrennen, ist die Erzeugung extrem hoher magnetischer Feldgradienten. Ein ausreichend hoher magnetischer Feldgradient führt dazu, dass Nord- und Südpole der paramagnetischen Teilchen eine Differenz von An- und Abstoßungskräften und somit insgesamt eine gerichtete magnetische Kraft erfahren. Diese Technologie ist unter der Bezeichnung Hochgradientenmagnetseparation (HGMS) bekannt.

Zu unterscheiden ist hier zwischen sogenannten „internen“ und „externen“ Hochgradientenmagnetseparatoren. Erstbeschreibungen der HGMS-Technologie bezogen sich auf interne Separatoren. Diese finden sich bei Oberteuffer (IEEE Transactions on Magnetics, Mag-9, No. 3, September 1973:303-306) und in der US 3.676.337. Ein ferromagnetisches Material in einem geeigneten, nicht magnetischen Behältnis, welches als Trennkammer dient, wird in ein starkes, homogenes Magnetfeld eingebracht, welches durch einen Elektromagneten oder durch einen hufeisenförmigen Permanentmagneten (Dipolmagneten) erzeugt werden kann. Das ferromagnetische Material trägt dabei im Allgemeinen die Bezeichnung „Matrix“; es kann filamentös (draht- oder fadenförmig), sphärisch (kugelförmig)

oder anderweitig geformt sein, zum Beispiel aus gestanztem Stahlblech bestehen. Das ferromagnetische Material der Matrix erfährt durch das extern angelegte Feld eine Magnetisierung entsprechend seiner magnetischen Suszeptibilität X. Ausgehend von der Oberfläche des Matrixmaterials entstehen dann magnetische Feldgradienten, die über 100 Tesla pro Zentimeter erreichen können, wobei die Größe des Gradienten in umgekehrtem Verhältnis zum Durchmesser der verwandten filamentösen oder sphärischen Elemente steht. „Externe" Hochgradientenmagnetseparatoren erreichen ähnlich hohe Gradienten durch eine technisch aufwendigere, spezielle Anordnung der Magnete außerhalb der eigentlichen Trennkammer, wie beispielsweise offenbart in der WO 98/055236, der WO 99/019071 oder der US 6.241.894 B1. Als wesentlicher Unterschied entfällt hier die Notwendigkeit einer Matrix innerhalb der Trennkammer.

Am weitesten verbreitet in der medizinisch-biologischen Forschung sind heutzutage die internen Hochgradientenmagnetseparatoren. Die US 4.664.796 und die US 5.200.084 beschreiben spezielle Ausführungsarten solcher Separatoren.

Die US 5.200.084 offenbart ein Gerät und ein Verfahren, welches speziell auf die Aufreinigung kleinster Mengen biologischen Materials in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte ausgerichtet ist. Unter anderem werden Aufreinigungen von bis 83% für mit paramagnetischen Partikeln markierte CD4 Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) berichtet.

Hohe Aufreinigungsraten erzielt derzeit nach dem Wissen der Erfinder allein eine technische Ausführung eines internen Hochgradientenmagnetseparators, wie in der WO 96/26782 und der EP 0.942.766 B1 offenbart. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von nicht-Zielpartikeln an die Matrix, welche das Aufreinigungsergebnis bei den in den genannten Druckschriften beschriebenen Separatoren beeinträchtigen, besitzt die Trennkammer dieses Separators eine polymerbeschichtete Matrix. Das Polymer wird dabei in mehreren Arbeitsschritten auf die Matrix aufgezogen, wie in der WO 96/26782 ausführlich beschrieben. Die so hergestellte Trennkammer zeichnet sich nach Angaben der Autoren dadurch aus, dass das Polymer auf dem ferromagnetischen Material der Matrix eine feste, geschlossene, flüssigkeits- und ionenundurchlässige und weniger als 1% Wasser enthaltende Beschichtung bildet, und die mit dem Polymer beschichtete Matrix 60-70% des Gesamtvolumens der beschriebenen Trennkammern ausfüllt.

Neben der Verminderung einer unspezifischen Bindung von nicht-Zielpartikeln an die Matrix soll diese gemäß der genannten Veröffentlichung auch eine Schädigung des zu trennenden biologischen Materials durch direkten Kontakt mit dem ferromagnetischen Matrixmaterial vermeiden (physikalische Schädigung), sowie eine chemische Reaktion des ferromagnetischen Matrixmaterials mit der zur Suspension des biologischen Materials verwandten Pufferlösung ausschließen, denn freigesetzte Ionen könnten ebenfalls zur Schädigung des zu trennenden biologischen Materials führen (chemische Schädigung). Diese beiden Arten der Schädigung sind nach dem Wissensstand der Erfinder jedoch als hypothetisch zu betrachten, denn es sind hierzu keine wissenschaftlich gesicherten Erkenntnisse verfügbar. Auch berichteten Paul et al. in Clinical and Laboratory Haematology, 7, 1985:43-53 gegenteilig über keine Beeinträchtigung der Morphologie und Viabilität von Blutzellen und Blutzellfragmenten, welche eine unbehandelte Edelstahlmatrix einer HGMS-Trennsäule passierten.

Sämtliche bisher genannten Patentschriften und Veröffentlichungen sind hierin durch Verweis aufgenommen.

Diese beschriebene Art Trennkammern sind aufgrund ihres zeitintensiven Herstellungsprozesses vor allem für die Matrixbeschichtung kostspielig. Sie sind kommerziell von Miltenyi Biotech GmbH (loc.cit.) erhältlich.

Hohe Aufreinigungen erzielen sie insbesondere bei Anwendung auf mit synthetischen paramagnetischen Teilchen markierten Partikeln aus Partikelsuspensionen.

Ebenfalls versucht wurde die Anwendung dieser Trennkammern mit beschichteter Matrix auf intrinsisch (natürlich) paramagnetische Partikel. Als intrinsisch paramagnetische Partikel dienten dabei Malaria-infizierte rote Blutzellen. Die Krankheitserreger der Malaria, Parasiten der Gattung Plasmodium aus dem Reich der Protozoen, befallen selektiv rote Blutzellen und haben die Eigenschaft, das zentrale Eisenatom des in der infizierten roten Blutzelle anfallenden freien Hämmoleküls zu dreiwertigem Eisen zu oxidieren. Dieses ist, wie oben beschrieben, paramagnetisch. Daher sollten Malaria-infizierte rote Blutzellen von nicht infizierten und oxygenierten roten Blutzellen in Trennkammern von Hochgradientenmagnetseparatoren abtrennbar sein. Dies wurde erstmals 1981 von Paul et al.

gezeigt (Lancet, July 11, 1981:70-71). Die beschriebenen, kommerziell erhältlichen Trennkammern mit beschichteter Matrix sollen heutzutage Aufreinigungen von über 80% erzielen (Uhlemann et al., MACS&more 2000;4 (2):7-8, Trang et al., Malaria Journal 2004;3:1-7).

Diese aufgeführten Untersuchungen beziehen sich jedoch nur auf einen der insgesamt vier bekannten beim Menschen vorkommenden Malariaerreger, nämlich *Plasmodium falciparum*, dem Erreger Malaria tropica, sowie auf einen weiteren Malariaerreger in Nagetieren, *Plasmodium berghei*. Weitere wissenschaftliche Studien zu den insgesamt nahezu 120 weiteren bekannten Plasmodienarten sind nicht verfügbar. Den Erfindern ist allerdings bekannt, dass die Anwendung der kommerziell erhältlichen Trennkammern zur Aufreinigung von roten Blutzellen, welche mit *Plasmodium vivax*, dem Erreger der ebenfalls beim Menschen vorkommenden Malaria tertiana, infiziert sind, nicht immer zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte.

Aus den vorangehenden Erläuterungen ist ersichtlich, dass weitere Verbesserungen der Aufreinigungseffektivität der HGMS-Technologie für den Bereich der medizinisch-biologischen Forschung von großem Nutzen wären. Dies gilt auch in Bezug auf die Kosteneffizienz, da die aufwändigen bekannten Trennkammern in verschiedenen Bereichen, besonders aber in der Erforschung von Malaria-Erregern, die besonders Länder mit kleineren medizinischen und Forschungsetats betrifft, schon allein aus Kostenerwägungen nicht immer verfügbar sind.

Daher ist Aufgabe der Erfindung, eine HGMS-Trennsäule bereitzustellen, welche in kostengünstigerer Weise bessere Aufreinigungsergebnisse erzielt.

Diese Aufgabe wird durch eine HGMS-Trennsäule gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren gemäß Anspruch 10 gelöst, wobei interne HGMS eingesetzt wird. Die erfindungsgemäße Lösung beruht auf dem Prinzip, das Problem der unspezifischen Bindung von nicht-Zielpartikeln an die Matrix der HGMS-Trennsäule durch eine Pufferlösung zur Equilibrierung der Trennsäule und zur Suspension des zu trennenden biologischen Materials mit den im Anspruch angegebenen Eigenschaften zu lösen. Auf die aufwändige und kostentreibende Beschichtung kann dann verzichtet werden, weil die unspezifischen Bindungsstellen der Trennsäule durch die Pufferlösung abgesättigt werden. Dabei sind unter unspezifischen

Bindungsstellen solche zu verstehen, an denen Partikel sich unabhängig von ihren magnetischen Eigenschaften absetzen, an denen Partikel also mechanisch, elektrisch, chemisch, physikalisch oder noch anders gebunden würden. Damit würden nicht-Zielpartikel unabhängig vom magnetischen Gradienten selektiert, was zu unvollständigen Aufreinigungs- oder Trennungsergebnissen führen würde. Bei dem biologischen Material handelt es sich bevorzugt um Zellen, Zellaggregate oder Zellbestandteile, welche intrinsische paramagnetische Eigenschaften besitzen, oder welche direkt oder indirekt mittels paramagnetischer oder superparamagnetischer Teilchenmagnetisch markierbar sind.

Die erfindungsgemäße Lösung hat den Vorteil, dass die Pufferlösung verhältnismäßig einfach und kostengünstig bereitgestellt werden kann. Eine zeit-, material- und kostenaufwändige Vorbehandlung der Trennsäule und der in ihr enthaltenen Matrix kann entfallen. Dabei hat diese Vereinfachung gegenüber herkömmlichen Trennsäulen mit ihren aufwändigen Beschichtungen der Matrix sogar noch den Vorteil verbesserter Aufreinigungsergebnisse.

Die Pufferlösung weist bevorzugt eine Dichte auf, die der Dichte zu trennender Partikel des biologischen Materials so weitgehend entspricht, dass eine auf die Partikel wirkende Schwerkraft im Wesentlichen kompensiert ist und die Partikel daher in der Pufferlösung nahezu schweben, und/oder die Pufferlösung weist eine hohe Viskosität auf, welche ein laminares Durchströmen der Trennsäule mit für den Trennvorgang geeigneter Fließgeschwindigkeit ermöglicht. Auf diese Weise können die Zielpartikel ohne störenden Schwerkrafteinfluss so lange im Wirkungsbereich des Hochgradientenmagnetfelds gehalten werden, dass sie sich in einem sehr hohen Grad dort absetzen. Somit wird ein besonders hoher Trennungs- oder Aufreinigungsgrad erhalten.

Der Magnet ist vorteilhafterweise ein Permanent- oder Elektromagnet, welcher so geformt ist, dass die Trennsäule in dem von ihm erzeugten insbesondere homogenen Magnetfeld angeordnet werden kann, wobei die Trennsäule durch räumliche Trennung und/oder Abschalten wahlweise unter Einwirkung des Magnetfelds stehen kann oder nicht. Durch die Formpassung kann das Magnetfeld nahe an die Matrix gebracht werden und stellt daher eine hinreichende äußere magnetische Feldstärke bereit. Der Magnet muss darüber hinaus hinreichend stark sein, so dass durch die Bündelung der Feldstärke mittels der Matrix ein starkes Hochgradientenmagnetfeld erzeugt wird. Mittels räumlicher Trennung oder Abschalten können die Zielpartikel dann gezielt festgehalten und freigegeben werden, je

nachdem, ob die aus der Trennsäule strömende Flüssigkeit im jeweiligen Arbeitsschritt Zielpartikel enthalten soll oder nicht.

Die Matrix ist vorzugsweise unbeschichtet und/oder weist geordnetes oder ungeordnetes, filamentöses, sphärisches oder anderweitig geformtes Material auf, insbesondere nichtrostenden, magnetischen Edelstahl oder Stahlwolle. Eine unbeschichtete Matrix ist besonders kostengünstig, und eine Beschichtung erfindungsgemäß nicht notwendig. Dennoch wäre alternativ vorstellbar, zusätzlich auch eine Beschichtung vorzusehen, um die Trenn- und Aufreinigungsergebnisse weiter zu verbessern, wobei diese Beschichtung dann auch unvollständig oder weniger hochwertig sein könnte als herkömmlich. Die relativ weitmaschige Anordnung der Matrix sowie die Verwendung hochwertigen nichtrostenden Edelstahls als Matrixmaterial beugen einer physikalischen oder chemischen Schädigung des zu trennenden biologischen Materials vor, beispielsweise ließen sich so in den unten beschriebenen Versuchen Schädigungen empfindlicher Zellen effektiv vermeiden.

Der Vorratsbehälter ist bevorzugt mit der Trennsäule verbunden, so dass Pufferlösung über eine Zuflussbegrenzungseinrichtung mit einer einstellbaren Fließgeschwindigkeit in die Trennsäule eingebracht werden kann oder nicht, und/oder wobei die Trennsäule eine Durchflussbegrenzungseinrichtung aufweist, welche den Ausfluss aus der und die Strömungsgeschwindigkeit in der Trennsäule beeinflussen kann. Dabei kann die Verbindung zwischen Vorratsbehälter und Trennsäule apparativ, etwa durch eine Rohrleitung, aber ach durch freies Tropfen vorgesehen sein. Die Fließgeschwindigkeit kann damit an das biologische Material, die Pufferlösung und den jeweiligen Arbeitsschritt angepasst werden, wobei auch ein vollständiges Sperren des Zuflusses von Pufferlösung ermöglicht ist, etwa um zum Equilibrieren eine Phase des Ruhens in der Trennsäule vorzusehen, oder in Arbeitsschritten, in denen keine Pufferlösung benötigt wird.

Die Pufferlösung umfasst eine Grundlösung und mindestens ein Makromolekül. Beispielsweise enthält die Pufferlösung von 80 bis 99,8 Gew.-% Grundlösung und von 0,2 bis 20 Gew.-% Makromolekül.

Die Pufferlösung weist dabei vorzugsweise eine Grundlösung auf, deren Ionenstärke in Abhängigkeit von den Makromolekülen so angepasst ist, dass aggregierende Effekte der Makromoleküle auf das biologische Material kompensiert werden, wobei die Grundlösung

eine isoosmolare Konzentration aus Kationen Natrium, Kalium, Magnesium oder Kalzium und aus Anionen Chlorid, Phosphat, Sulfat oder Carbonat aufweist, insbesondere eine phosphatgepufferte Kochsalz- oder Sucroselösung oder eine Mischung daraus ist. Die Grundlösung sollte also nach dem unten beschriebenen Mechanismus in ihren Eigenschaften wie pH-Wert und anderen an sowohl das biologische Material wie an die Makromoleküle zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen angepasst werden, um noch bessere Ergebnisse zu erzielen. Dabei werden unerwünschte Aggregationen des biologischen Materials besonders gut verhindert, wenn die isoosmolare (physiologische) phosphatgepufferte Kochsalzlösung durch isoosmolare phosphatgepufferte Sucroselösung ganz- oder teilweise ersetzt ist. Andere Zuckerlösungen als Sucroselösung sind vorstellbar.

Beispielsweise enthält die Pufferlösung 0,2 bis 10 Gew.-% Gelatine, 9,5-10 Gew.-% Sucrose, 80-95 Gew.-% destilliertes Wasser und Natriumphosphat zur Pufferung, und/oder 3-10% bovines Serumalbumin, 0,85-0,95 Gew.-% Natriumchlorid und 89-98 Gew.-% destilliertes Wasser und Natriumphosphat zur Pufferung und/oder 0,5-20 Gew-% hydrolysiertes Kollagen, 5-10% Gew.-% Sucrose, 0,1-0,9 Gew.-% Natriumchlorid und Natriumphosphat zur Pufferung.

Die Makromoleküle können vorteilhafterweise natürliche oder synthetische Polyelektrolyte oder Polyampholyte umfassen, die stark oder schwach sein können, insbesondere synthetisches Polyelektrolyt Orotan 1850 oder organisches Polyelektrolyt D-Glucuronsäure, und/oder die Makromoleküle weisen einen isoelektrischen Punkt auf, der bei pH-Wert der Grundlösung zu einer Ladung führt, welche der Ladung zu trennender Partikel des biologischen Materials entspricht und/oder die Makromoleküle weisen ein Molekulargewicht von 10.000 bis 100.000 kDa, insbesondere von 30.000 bis 70.000 kDa auf. Es hat sich herausgestellt, dass solche Pufferlösungen zu besonders guten Ergebnissen führen.

Die Makromoleküle können ferner bevorzugt globuläre Proteine, insbesondere Albumine, bovines oder humanes Serumalbumin, Ovalbumin, Lactalbumin oder pflanzliche Albumine, β-Lactoglobulin, κ-Casein, Histone, Protamine, Globuline, Prolamine oder Gluteline mit einer Konzentration von 3 bis 7 Gew.-%, insbesondere 4 bis 5 Gew.-% umfassen. Alternativ oder zusätzlich umfassen die Makromoleküle noch bevorzugter filamentöse Proteine, insbesondere Gelatinen, Rindergelatinen, Schweinegelatinen oder Teleosteangelatinen in einer Konzentration von 0,3 bis 1,5 Gew.-%, insbesondere von 0,4 bis 0,8 Gew.-%, die eine

niedrige Gelierkraft von 150 Bloom oder weniger, insbesondere 75 Bloom oder weniger aufweisen. Auch enzymatisch hydrolysiertes Kollagen (Kollagen-Hydrolysat) kann alternativ oder zusätzlich eingesetzt werden, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,3 bis 20 Gew.-%, insbesondere von 1 bis 10 Gew.-%.

Makromoleküle dieser Arten, besonders in den angegebenen Konzentrationen und mit den daraus resultierenden Viskositäten, sind ganz besonders gut geeignet, die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen, und dabei mit einer passenden Fließgeschwindigkeit und Dichte Bedingungen zu erzeugen, in denen die Zielpartikel besonders gut an der Matrix anhaften können.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann als Pufferlösung jede in der Beschreibung als geeignet genannte und insbesondere jede in Unteransprüchen zu der Vorrichtung beschriebene Pufferlösung verwendet werden.

Die Matrix und eine sie umgebende Trennsäule wird dabei bevorzugt vor dem Durchströmen der Suspension durch eine Vorinkubation mit reiner, also kein biologisches Material enthaltender Pufferlösung equilibriert, und zwar über einen ausreichend langen Zeitraum, um unspezifische Bindungsstellen in der Matrix abzusättigen, insbesondere über eine Dauer von 3 bis 20 oder 5 bis 10 Minuten, wobei die Matrix während des Equilibrierens ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird. Die Suspension hat hier noch bevorzugter eine für den Trennvorgang kritische Konzentration des biologischen Materials, was auch von der verwandten Pufferlösung abhängig ist. Die angegebenen Zeitspannen genügen nach Erkenntnissen der Erfinder, um die spezifischen Bindungsstellen vorab hinreichend abzusättigen. Die vorbereitende Equilibrierung verhindert, dass sich anfänglich bei Einleiten der Suspension in die Matrix noch unerwünschte Partikel an den dann noch nicht vollständig von der Pufferlösung der Suspension abgesättigten unspezifischen Bindungsstellen anheften. Während des gesamten Verfahrens ist die Matrix bedeckt zu halten, damit die unspezifischen Bindungsstellen nicht freigegeben und die Flussbedingungen konstant gehalten werden, denn damit würde das Trennergebnis beeinträchtigt.

Zum Trennen von unerwünschtem biologischen Material wird das Eluat, also ein die Matrix verlassendes Fluid, bevorzugt nach dem Durchströmen aufgefangen, wobei nach Einführen der Suspension in die Matrix bei weiterhin aktiviertem Magnetfeld so lange die Matrix mit

zusätzlicher reiner Pufferlösung durchströmt wird, bis sichergestellt ist, dass die Suspension die Matrix vollständig verlassen hat, und wobei die Matrix während des Durchströmens ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird. Zielpartikel sind in diesem Fall Störkörper, die entfernt werden sollen, und sie haften in der Matrix, bis die eigentlich erwünschten Bestandteile des biologischen Materials vollständig aus der Matrix ausgespült sind. Das aufgefangene Eluat enthält die an der Matrix durch Magnetkraft haften gebliebenen Zielpartikel nicht mehr, sie werden abgetrennt, und ihre Konzentration ist im Eluat erheblich verringert, beziehungsweise das Eluat enthält im Idealfall gar keine solchen Zielpartikel mehr. Die in der Matrix verbliebenen Zielpartikel können anschließend getrennt entsorgt oder für alternative weitere Zwecke verwendet werden, indem sie in einem eigenen Arbeitsschritt ausgespült werden.

Alternativ wird zum Aufreinigen erwünschten biologischen Materials nach Einführen der Suspension in die Matrix bei noch aktiviertem äußeren Magnetfeld die Matrix so lange mit zusätzlicher reiner Pufferlösung durchströmt, bis sichergestellt ist, dass die Suspension die Matrix vollständig verlassen hat, und anschließend wird bei durch räumliche Trennung oder Abschalten deaktiviertem äußeren Magnetfeld die Matrix mit zusätzlicher reiner Pufferlösung ausgespült und dabei das Eluat aufgefangen, wobei die Matrix während des gesamten Vorgangs ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird. In diesem Fall enthält das in der Phase des aktivierten Magnetfeld die Matrix verlassende Fluid kein primär interessierendes biologische Material, diese Fluid kann verworfen oder anderweitig verwendet werden. Erst beim anschließenden Ausspülen ohne Magnetfeld gibt die Matrix die Zielpartikel wieder frei, die also in dem dann aufgefangenen Eluat beim abschließenden Ausspülen der Matrix in einem ganz wesentlich erhöhten Reinheitsgrad enthalten sind. Die Pufferlösung bei diesem Ausspülen kann dieselbe, aber auch eine andere Pufferlösung sein wie während der eigentlichen HGMS-Phase mit aktiviertem Magnetfeld. Die Zielpartikel sind in diesem Fall in der anderen Pufferlösung des Eluats enthalten, oder in einer Mischung aus beiden Pufferlösungen.

Das aufgefangene Eluat wird bevorzugt zentrifugiert, und mit dem abzentrifugierten biologischen Material ohne Flüssigkeitsphase des Eluates wird das Verfahren bevorzugt ein- oder mehrfach wiederholt. Bei dem Trennverfahren verbleibt dann das biologische Material ohne die störenden, abzutrennenden Zielpartikel, dem Aufreinigungsverfahren verbleiben gerade umgekehrt die Zielpartikel in reiner Form ohne die Pufferlösung der Suspension.

Sofern der gewöhnlich schon nach einem Durchlauf hohe Trennungs- oder Aufreinigungsgrad noch nicht ausreicht, kann das Verfahren erneut ausgeführt werden. Dies gilt besonders dann, wenn die Matrix bei einem Trennverfahren überladen war, ansonsten sind nur noch deutlich verminderte Verbesserungen gegenüber dem ersten Durchlauf zu erwarten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin mit ähnliche Merkmalen weitergebildet werden, wie sie beispielhaft, aber nicht abschließend in den sich an die unabhängigen Ansprüche anschließenden Unteransprüchen angegeben, und zeigt dabei ähnliche Vorteile.

Die Erfindung wird nachstehend auch hinsichtlich weiterer Merkmale und Vorteile anhand von Ausführungsbeispielen und unter Bezugnahme auf die Zeichnung beschrieben. Die Figuren der Zeichnung zeigen in:

Fig. 1 eine schematische Frontalansicht des Aufbaus einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen HGMS-Vorrichtung und der Trennsäule;

Fig. 2A/B eine flowzytometrische Analyse eines ersten Beispiels der erfindungsgemäßen Aufreinigung bei Verwendung einer isoosmolaren phosphatgepufferten Sucroselösung mit 0,75% Gelatine als Pufferlösung (Fig. 2A: *P. falciparum* Kultur vor Passage durch die HGMS-Säule ; Fig. 2B: Eluat nach Passage, Spülen und Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld),

Fig. 3A/B eine Darstellung gemäß Fig. 2 eines zweiten Beispiels mit bovinem Serumalbumin (BSA) enthaltender phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Pufferlösung;

Fig. 4A/B eine flowzytometrische Analyse eines dritten Beispiels als Dotplot (Fig. 4A: Anteil weißer CD8 positiver Blutzellen in einer Suspension von peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs) vor Aufreinigung; Fig. 4B: Eluat aus der Trennsäule nach Passage der PBMCs, Spülen und Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld); Verwendung einer isoosmolaren phosphatgepufferten Sucroselösung mit 0,75% Gelatine als Pufferlösung wie im ersten Beispiel; und

Fig. 5A/B eine Darstellung gemäß Fig. 4 eines vierten Beispiels, jedoch Verwendung bovines Serumalbumin (BSA) enthaltender

phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Pufferlösung wie im zweiten Beispiel.

Figur 1 zeigt eine schematische Frontalansicht einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Aufreinigungsvorrichtung. Die Aufreinigungsvorrichtung umfasst eine Trennsäule 1, einen Flüssigkeitsvorratsbehälter 11, aus welchem Pufferlösung der Trennsäule 1 zugeführt werden kann, einen Permanent- oder Elektromagneten 7 zur Erzeugung eines starken magnetischen Feldes, sowie eine spezielle Pufferlösung, die weiter unten näher erläutert wird.

Die Trennsäule 1 weist ein Gehäuse und eine darin angeordnete Matrix 2 auf. Das Gehäuse besteht aus nichtmagnetischem Material und besitzt mindestens einen Flüssigkeitseinlass 6 und mindestens einen Flüssigkeitsauslass 3. Der Flüssigkeitsauslass 3 ist mit einer Vorrichtung 4 zur Beeinflussung der Fließgeschwindigkeit der Pufferlösung in der Trennsäule 1 versehen, welche einen Mehrwegehahn 4 und einem Durchflussbegrenzer 5 aufweist. Alternativ können auch andere bekannte Einrichtungen zur Regulierung der Fließgeschwindigkeit in der Trennsäule eingesetzt werden.

Die Matrix 2 ist so ausgebildet, das im Inneren der Trennsäule 1 ein hoher magnetischer Gradient von dem außen angeordneten Magnet erzeugt wird, wie dies zur HGM-Separation erforderlich ist. Dazu weist die Matrix 2 ferromagnetisches Material auf, etwa nichtrostenden, magnetischen Edelstahl oder anderes, welches geordnet oder ungeordnet, filamentös, sphärisch oder anderweitig geformt ist. Beispiele für die Ausführung der Matrix 2 werden weiter unten im Zusammenhang mit experimentellen Aufreinigungen genannt.

Die Trennsäule 1 mit der in ihr enthaltenen Matrix 2 befindet sich in einem starken, vorzugsweise homogenen magnetischen Feld, welches durch den Permanentmagneten oder Elektromagneten 7 erzeugt werden kann. Das Magnetfeld ist an- oder abschaltbar, beispielsweise durch Entfernung der Trennsäule aus dem Feld des Permanentmagneten, oder durch Abschalten des Elektromagneten 7.

Der Flüssigkeitsvorratsbehälter 11 weist einen Flüssigkeitseinlassbereich 12, einem Reservoirbereich und einem Flüssigkeitsauslass 10 auf, aus welchem die Pufferlösung in den Flüssigkeitseinlass 6 der Trennsäule 1 eingebracht werden kann. Der Flüssigkeitsauslass 10

des Flüssigkeitsvorratsbehälters 11 ist mit einer Einrichtung zur Beeinflussung der Ausflussgeschwindigkeit der in ihm enthaltenen Flüssigkeit versehen, welche einen Einwegehahn 8 und einen Durchflussbegrenzer 9 aufweist. Wie bei dem Flüssigkeitsauslass 3 der Trennsäule 1 sind auch hier andere bekannte Einrichtungen zur Regulierung der Ausflussgeschwindigkeit aus dem Flüssigkeitsvorratsbehälter 11 denkbar. Auch können jeweils nach Bedarf Ein- oder Mehrwegehähne verwendet bzw. gegeneinander ausgetauscht werden.

Die oben genannte erfindungsgemäß eingesetzte Pufferlösung dient zur Equilibrierung der Trennsäule 1 und Suspension des zu trennenden biologischen Materials. Diese Pufferlösung kann reines Wasser sowie eine oder mehrere verschiedene Sorten von Makromolekülen enthalten, welche in ausreichender Konzentration die Eigenschaft besitzen, unspezifische Bindungsstellen in der Trennsäule 1 und der darin befindlichen Matrix 2 absättigen zu können. Die Pufferlösung besitzt bevorzugt weiterhin eine Dichte, die der Dichte der zu trennenden Partikel hinreichend ähnlich ist, um die Auswirkungen der Schwerkraft auf die Partikel stark oder sogar möglichst vollständig zu reduzieren und daher selbige in Schwebe zu halten. Auf diese Weise wird eine Sedimentation der zu trennenden Partikel bei langsamen Fließgeschwindigkeiten in der Trennsäule 1 vermieden. Des weiteren besitzt die Pufferlösung bevorzugt eine Viskosität, welche zu einer für den Trennvorgang geeigneten Flussgeschwindigkeit mit laminaren Strömungsverhältnissen in der Trennsäule 1 führt. Schließlich können in der Pufferlösung verschiedene Ionen enthalten sein, wie beispielsweise, jedoch nicht ausschließlich, Kationen wie Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium, oder Anionen wie Chlorid, Phosphat, Sulfat und Carbonat. Dabei soll vorgenannte Aufzählung keineswegs weitere andere Kationen oder Anionen ausschließen.

Die in der Pufferlösung zur Anwendung kommenden Makromoleküle sollten ausreichend groß sein, um unspezifische Bindungsstellen effektiv absättigen zu können, jedoch nicht so groß, dass sie in den zu verwendenden Konzentrationen die Viskosität der Pufferlösung zu kritisch erhöhen. Bevorzugt werden daher Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von 10.000 bis 100.000 kDa, noch mehr bevorzugt mit einem Molekulargewicht von 30.000 bis 70.000 kDa. Vorteilhafterweise tragen die zugesetzten Makromoleküle eine Ladung, welche der Ladung der zu trennenden Partikel entspricht, da es sich vorzugsweise um eine kompetitive Hemmung der unspezifischen Bindung von zu trennenden Partikeln und Makromolekülen an das Material der Matrix 2 handelt. Beispielsweise werden, wenn es sich

bei den zu trennenden Partikeln um Zellen handelt, deren Zellwand zumeist negative Ladungen trägt, vorzugsweise Makromoleküle mit negativer Ladung gewählt.

Solche positiv oder negativ geladenen Makromoleküle sind unter dem Oberbegriff Polyelektrolyte bekannt. Eine Untergruppe der Polyelektrolyte ist weiterhin unter dem Namen Polyampholyte bekannt. Dies bezeichnet Polyelektrolyte, die sowohl positive wie auch negative funktionelle Gruppen tragen. Die Nettoladung der Polyampholyte lässt sich bei Kenntnis ihres isoelektrischen Punktes und des pH-Werts der das Molekül umgebenden Pufferlösung leicht herleiten: Liegt der pH der Pufferlösung unterhalb des isoelektrischen Punktes des Polyampholyts, so liegt dessen Nettoladung im positiven Bereich, bei einem pH-Wert der Pufferlösung oberhalb des isoelektrischen Punktes verhält es sich umgekehrt, die Nettoladung liegt also im negativen Bereich. Liegt der pH-Wert der Pufferlösung am oder sehr in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Polyampholyts, so ist dieser neutral, er trägt also keine Nettoladung.

Polyelektrolyte, welche sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere zur Auftrennung zellulären Materials vorteilhaft bewährt haben, sind beispielsweise Makromoleküle aus der Gruppe der Proteine (Eiweiße). Die Gruppe der Proteine wird in die beiden Untergruppen der globulären Proteine (kugelförmigen) und filamentösen Proteine (faserförmigen) unterteilt. Allerdings ist die begriffliche Trennung zwischen den genannten Untergruppen strenggenommen als unscharf zu anzusehen, da Übergangsformen zwischen kugelförmigen und faserförmigen Proteinen bestehen. Im Folgenden sollen daher die Begriffe „globulär“ und „filamentös“ Proteine der beiden Untergruppen sowie Übergangsformen mit umschließen.

In Flüssigkeiten gelöste globuläre und filamentöse Proteine besitzen nun die Eigenschaft, reversibel und irreversibel an feste Oberflächen zu binden, dieses Phänomen wird zumeist als Adsorption oder Adhäsion bezeichnet. Wissenschaftliche Veröffentlichungen weisen im Zusammenhang mit der Bindung an Edelstahloberflächen darauf hin, daß es bei Kontakt von in Flüssigkeiten gelösten Proteinen mit Edelstahloberflächen zur Abscheidung eines Monolayers (einer einschichtigen Molekülschicht) von Proteinmolekülen auf der Edelstahloberfläche kommt (Nakanishi et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 2001:233-244, Fukuzaki et al., Journal of Fermentation and Bioengineering, 80, 1995:6-11). Während die Dicke dieses Monolayers im Bereich des hydrodynamischen Durchmessers

(Stokes-Radius) des jeweiligen Proteinmoleküles liegt, sich also im Bereich weniger Nanometer bewegt, ist die genaue flächige Symmetrie des Monolayers bisher nicht genau bekannt. Es darf allerdings angenommen werden, dass der Monolayer nicht ganz regelmäßig ausgebildet wird. Pradier et al. weisen darauf hin, dass sogar möglicherweise Lücken zwischen den abgeschiedenen Molekülen bestehen, also die Edelstahloberfläche nicht zur Gänze mit Proteinmolekülen bedeckt sein könnte (Surface and Interface Analysis, 34, 2002:50-54). Weitere Untersuchungen lassen unklar, ob die Ausbildung eines solchen Monolayers die Korrosion der Edelstahloberfläche positiv oder negativ beeinflusst (Omanovic und Roscoe, Langmuir, 15, 1999:8315-8321, Hansen et al., Corrosion Science, 37, 1995:1423-1441). Insgesamt muss so davon ausgegangen werden, dass Wassermoleküle und gelöste Ionen keineswegs komplett von dem Monolayer ausgeschlossen werden. Trotzdem wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass die Ausbildung eines solchen Monolayers unspezifische Bindungen von nicht-Zielpartikeln an die Matrix eines HGMS-Separators äußerst effektiv zu verhindern vermag, darüber hinaus wurde weder eine physikalische noch eine chemische Schädigung des zu trennenden biologischen Materials beobachtet.

Im Folgenden soll auf einige Proteine, die sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bewährt haben, näher eingegangen werden, ohne die Erfindung damit auf diese besonders geeigneten Proteine zu beschränken.

Als Vertreter aus der Untergruppe der globulären Proteine sind an dieser Stelle besonders bevorzugt zu nennen die Albumine, wie beispielsweise bovines und humanes Serumalbumin. Aus der Gruppe der Albumine weiterhin verwendbar, jedoch weniger bevorzugt sind Serumalbumine jeglicher anderer Spezies, sowie weiterhin andere Albumine, wie beispielsweise, jedoch nicht ausschließlich, Ovalbumin, Lactalbumin oder pflanzliche Albumine.

Für bovines oder humanes Serumalbumin in phosphatgepufferter isoosmolarer (physiologischer) Kochsalzlösung wurden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Konzentrationen von 3% bis 7% und noch mehr bevorzugt von 4% bis 5% für den Trennvorgang von zellulärem Material als optimal gefunden. Deutlich niedrigere Konzentrationen (0,1%-1%), wie sie üblicherweise in der Zellforschung physiologischen Puffern zugesetzt werden, führten im Rahmen der vorliegenden Erfindung nicht zu dem

gewünschten Ergebnis. Dies erklärt sich einerseits daraus, dass solch relativ niedrige Albuminkonzentrationen unspezifische Bindungsstellen der in dieser Erfindung eingesetzten Trennsäule 1 mit unbeschichteter Matrix 2 nicht effizient abzusättigen vermögen. Zum anderen verleihen diese niedrigen Albuminkonzentrationen der Pufferlösung nicht die notwendige Dichte, welche die zu trennenden Partikel in Schwebe zu halten und ein schwerkraftbedingtes Absinken auch bei langsamen Fließgeschwindigkeiten zu verhindern vermag.

Aus der Untergruppe der filamentösen Proteine sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt zu nennen die Gelatinen. Aufgrund ihres günstigen isoelektrischen Punktes von etwa pH 4,5 bis pH 5,6 und ihrer daher im neutralen pH-Bereich negativen Ladung finden sich unter den Gelatinen für Auftrennungen zellulären Materials im physiologischen pH-Bereich besonders bevorzugt Gelatinen der Klasse B (Rindergelatinen). Ein Konzentrationsbereich, welcher besonders günstig für den Trennvorgang zellulären Materials ist, wurde für Rindergelatinen von 0,3% bis 1,5%, noch mehr bevorzugt von 0,4% bis 0,8% gefunden. Andere Gelatinen wie Gelatinen der Klasse A (Schweinegelatinen) oder Teleosteangelatinen (Fischgelatinen), oder jegliche andere Gelatinen sowie die enzymatisch hydrolysierten Kollagene (Kollagen-Hydrolysate) als eine weitere Untergruppe der Gelatinen sind gleichfalls einsetzbar, werden jedoch aufgrund ihrer weniger günstigen isoelektrischen Punkte zumindest für Auftrennungen im physiologischen pH-Bereich weniger bevorzugt. Generell sind unter den verschiedenen Gelatinen B sowie den Gelatinen der anderen genannten Gruppen jene zu bevorzugen, welche eine niedrige Gelierkraft (Bloomstärke) aufweisen, vorzugsweise weniger als 150 Bloom und noch weiter bevorzugt weniger als 75 Bloom.

Weitere Makromoleküle aus der Gruppe der Proteine, welche im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, sind in nicht abschließender Aufzählung unter anderem weitere globuläre Proteine, wie beispielsweise β-Lactoglobulin oder κ-Casein, oder andere globuläre Proteine aus den Untergruppen der Histone und Protamine, der Globuline, der Prolamine und der Gluteline, sowie weitere filamentöse Proteine.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist der Einsatz anderer Makromoleküle aus der Gruppe der organischen oder synthetischen Polyelektrolyte denkbar, beispielsweise des

synthetischen Polyelektrolyts Orotan 1850™ (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) oder des organischen Polyelektrolyts D-Glucuronsäure.

Einige der erwähnten Makromoleküle, die zur Verminderung der unspezifischen Bindung des zu trennenden Materials an das Matrixmaterial der Pufferlösung zugesetzt werden können, führen in Kombination mit bestimmten Pufferlösungen zu einer Aggregation des zu trennenden, sich in Suspension befindlichen biologischen Materials. Die Aggregationsneigung von roten Blutzellen in Suspension korreliert positiv mit dem Molekulargewicht und der Konzentration der zugesetzten Makromoleküle sowie mit der Ionenstärke der Pufferlösung, wobei sich die Ionenstärke dabei als die Gesamtladungskonzentration der gelösten Ionen in der Pufferlösung versteht. Niedrige Ionenstärken können einer Aggregation, welche durch zugesetzte Makromoleküle verursacht wird, entgegenwirken und vermögen diese sogar gänzlich zu verhindern. Die Betrachtung des hydrodynamischen Durchmessers (Stokes-Radius), welcher sich von dem Molekulargewicht und der Messung der intrinsischen Viskosität herleiten lässt, ermöglicht noch genauer als die alleinige Betrachtung des Molekulargewichts eines bestimmten Makromoleküls dessen aggregationsfördernde Wirkung auf eine Suspension von roten Blutzellen vorherzusagen (vgl. hierzu auch die Arbeiten von Jan und Chien (Journal of General Physiology, 61, 1973:638-654, 655-668 und Armstrong et al. (Biophysical Journal, 87, 2004:4259–4270)). Der Begriff „Molekulargewicht“ eines Makromoleküls soll im Folgenden immer auch stellvertretend für den daraus ableitbaren hydrodynamischen Durchmesser (Stokes-Radius) dieses Makromoleküls stehen.

Es hat sich im Rahmen der Erfindung als vorteilhaft herausgestellt, diese Erkenntnisse auszunutzen und die Ionenstärke der Pufferlösung anzupassen, um einer Aggregation des zu trennenden biologischen Materials wirksam vorzubeugen. Beispielsweise haben die Erfinder eine Aggregation von Blutzellen insbesondere bei Suspension in gelatinehaltiger physiologischer phosphatgepufferter Kochsalzlösung beobachtet. Um diese Aggregation zu verhindern, erwies es sich zur Auftrennung von Blutzellen unter der Verwendung von Gelatinen als besonders vorteilhaft, physiologische phosphatgepufferte Kochsalzlösung durch physiologische phosphatgepufferte Sucroselösung ganz- oder teilweise zu ersetzen.

Aus dem beschriebenen Zusammenhang zwischen Partikelaggregation und den speziellen Eigenschaften der Pufferlösung (insbesondere der Konzentration und dem Molekulargewicht

der Makromoleküle, sowie der Ionenstärke der Pufferlösung) können Vorhersagen getroffen werden, welche Kombination von Makromolekülen und Pufferlösungen für die Auftrennung eines bestimmten zu trennenden biologischen Materials besonders geeignet sind, und es kann eine makromolekülhaltige Pufferlösung gewählt werden, deren physikalisch-chemische Eigenschaften an die für ein bestimmtes Partikel benötigten Trennbedingungen angepasst sind. Der Begriff physikalisch-chemische Eigenschaften einer Pufferlösung soll dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung Viskosität, Dichte, Ionenstärke, Osmolarität und pH-Wert der Flüssigkeit, weiterhin Art, Molekulargewicht, Ladung, und Konzentration der in dieser gelösten Makromoleküle und andere beeinflussbare physikalisch-chemische Parameter sowohl der Makromoleküle als auch der diese umgebenden Flüssigkeit mit umschließen.

Im Folgenden wird das erfindungsgemäße Aufreinigungsverfahren schrittweise näher erläutert.

In einem ersten Schritt wird die Trennsäule 1 mit Pufferlösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen equilibriert. Die Equilibrierung erfolgt dabei durch eine Vorinkubation der Trennsäule 1 mit einer wie oben beschriebenen, für den Trennvorgang der spezifischen zu untersuchenden Partikelsuspension geeigneten Pufferlösung, im Folgenden genannt Pufferlösung A, über einen ausreichend langen Zeitraum, welcher sich nach den verwandten Makromolekülen in der Pufferlösung richtet. Im Regelfall beträgt dieser Zeitraum 3 bis 20 Minuten, davon noch regelmäßiger 5 bis 10 Minuten, in seltenen Fällen können jedoch auch kürzere oder längere Zeiträume notwendig sein.

Nach der Equilibrierung wird das zu trennende biologische Material in Pufferlösung A suspendiert und in den Einlassbereich 6 der Trennsäule 1 gegeben, wobei sich die Trennsäule 1 im homogenen Magnetfeld des Hufeisen- oder Elektromagneten 7 befindet. Gleichzeitig wird der Flüssigkeitsauslass 3 der Trennsäule 1 mit Hilfe des Mehrwegehahns 4 geöffnet. Dabei ist darauf zu achten, die Matrix 2 ständig von Pufferlösung bedeckt zu halten. Das biologische Material fließt durch die Trennsäule 1, wobei sich die intrinsisch paramagnetischen oder vorab mit synthetischen paramagnetischen Teilchen markierten Zielpartikel an die Matrix 2 anheften. Alle unmagnetischen Partikel durchlaufen die Trennsäule 1 jedoch ungehindert und treten am Flüssigkeitsauslass 3 aus.

Nach vollständiger Zugabe des zu trennenden biologischen Materials erfolgt das Spülen der Trennsäule 1. Dieses dient dem Ausspülen der noch in der Trennsäule 1 verbliebenen unmagnetischen nicht-Zielpartikel. Der Flüssigkeitsauslass 10 des Flüssigkeitsvorratsbehälters 11, enthaltend Pufferlösung A, wird mit Hilfe des Einwegehahns 8 geöffnet, so dass nun reine Pufferlösung A als Spüllösung durch die Trennsäule 1 fließt. Dabei ist wieder darauf zu achten, die Matrix 2 ständig von Pufferlösung bedeckt zu halten. Die Menge der zur Spülung zu verwendenden Pufferlösung A richtet sich nach der Größe der Trennsäule 1. Beispielsweise beträgt die zu einer ausreichenden Spülung notwendige Menge an Pufferlösung A für eine Trennsäule 1 mit einem Volumen von 3 ml etwa 30-60 ml, für Trennsäulen anderer Größe muss sie entsprechend angepasst werden.

Nach Abschluss des Spülens der Trennsäule 1 wird der Flüssigkeitsauslass 3 der Trennsäule 1 und des Flüssigkeitsvorratsbehälters 11 geschlossen. Die Trennsäule 1 wird aus dem Magnetfeld des Hufeisenmagneten 7 entnommen, oder im Falle der Verwendung eines Elektromagneten 7 das Magnetfeld abgeschaltet. Ohne den Einfluss des Magnetfeldes lösen sich nun die Zielpartikel von der Matrix 2 und können durch antero- oder retrogrades Spülen der Trennsäule 1 mit Pufferlösung A oder, da die Trennung nun vollzogen ist, einer beliebigen anderen Pufferlösung ausgewaschen werden.

Dieses Verfahren eignet sich sowohl zur Aufreinigung von Zielpartikeln, da diese im Eluat enthalten sind, welches durch das Auswaschen der Säule erhalten wurde, als auch zur Entfernung von Zielpartikeln aus dem zu trennenden biologischen Material. Im zweiten Falle ist die aus der Trennsäule 1 austretende Spüllösung von Interesse, die das um die Zielpartikel reduzierte biologische Material enthält. Die Spüllösung wird dann während des Einbringens des in Pufferlösung A suspendierten biologischen Materials in die Trennsäule 1 und während des anschließenden Spülens der Trennsäule 1 mit reiner Pufferlösung A aufgefangen. Dabei ist wichtig zu beachten, dass die Matrix 2 nicht mit einer zu hohen Zahl von Zielpartikeln überladen wird, da bei Erschöpfung der Kapazität der Matrix 2 nicht gebundene Zielpartikel mit dem übrigen zu trennenden biologischen Material aus dem Flüssigkeitsauslass 3 der Trennsäule 1 austreten können.

Das Verfahren kann mit den gewonnenen, aufgereinigten Zielpartikeln wiederholt werden, falls eine noch höhere Aufreinigung erzielt werden soll. Gleiches gilt für die aufgefangene Spüllösung nach Durchlaufen durch die Trennsäule 1, falls eine noch reinere Entfernung von

Zielpartikeln aus dem zu trennenden biologischen Material angestrebt wird. Das ist aber wegen des hohen erfindungsgemäßen Aufreinigungsgrads oft nicht mehr erforderlich.

Die nachfolgenden Versuchsbeispiele sollen die Erfindung weiter illustrieren, ohne aber damit die Anwendbarkeit auf die Versuchsbeispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Aufreinigung von mit Malariaerregern (Plasmodien) infizierten roten Blutzellen aus einer *P. falciparum* Kultur mit isoosmolarer gelatinehaltiger phosphatgepufferter Sucroselösung.

Material:
Pufferlösung A_1: isoosmolare phosphatgepufferte Sucroselösung mit 0,75% Gelatine
Edelstahlwolle 1 g
Einwegehahn
Dreiwegehahn
20G Injektionsnadel
3 ml Einwegspritze
10 ml Einwegspritze
50 ml Einwegspritze
1 Neodymium-Hufeisenmagnet

a) Bereitstellung des Aufreinigungskits

Herstellung der Trennsäule
Eine 3 ml Einwegspritze als Trennsäule 1 wurde zu zwei Dritteln ihres Gesamtvolumens mit einem Gramm Edelstahlwolle als Matrix 2 gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Mehrzahl der Edelstahlwollefasern in Längsrichtung des Spritzenkörpers zu liegen kommt. An den Flüssigkeitsauslass 3 des Spritzenkörpers wurde ein Dreiwegehahn 4 und die 20G Injektionsnadel als Durchflussbegrenzer 5 angeschlossen. Das obere, nicht von Edelstahlwolle gefüllte Drittel der Einwegspritze diente als Einlassbereich 6 der Trennsäule 1.

Equilibrierung der Trennsäule

Über den Dreiwegehahn 4 wurde die so hergestellte Trennsäule 1 mit Pufferlösung in senkrechter Position retrograd gefüllt. Luftblasen wurden durch Klopfen mit dem Finger möglichst vollständig evakuiert, wobei allerdings gefunden wurde, dass verbleibende kleinere Luftblasen den Trennvorgang nicht negativ beeinflussen. Die Trennsäule 1 wurde nun zwischen den Polen des Hufeisenmagneten 7 positioniert, so dass die gesamte Matrix 2 dem homogenen Magnetfeld ausgesetzt war, und 10 Minuten equilibriert.

Aufbau und Positionierung des Flüssigkeitsvorratsbehälters

Ein Einwegehahn 8 versehen mit einer 18G Nadel als Durchflussbegrenzer 9 wurde am Flüssigkeitsauslass 10 der 50 ml Einwegspritze, welche als Flüssigkeitsvorratsbehälter 11 diente, angebracht. Diese wurde dann so über der Trennsäule 1 positioniert, dass die aus der Nadel austretende Flüssigkeit in den Einlassbereich 6 der Trennsäule 1 tropfen konnte.

b) Vorbereitung und Durchführung des Trennvorganges

Vorbereitung der P. falciparum Kultur zur Aufreinigung von mit Malariaerregern infizierten roten Blutzellen

50 µl rote Blutzellen einer *P. falciparum* Kultur mit einer Parasitämie von 13,51% wurden in 450 µl RPMI Medium resuspendiert und 10 min unter Einfluss von Raumluft oxygeniert. Die Kultur wurde sodann abzentrifugiert und in 5 ml Pufferlösung A_1 resuspendiert.

Durchführung des Trennvorganges

Nach Abschluss der 10minütigen Equilibrierung der Trennsäule 1 wurden deren Flüssigkeitsauslass 3 geöffnet und gleichzeitig die resuspendierten Zellen langsam so in den Einlassbereich der Trennsäule 1 eingebracht, dass die Matrix 2 ständig von Flüssigkeit bedeckt blieb. Nach erfolgter vollständiger Zugabe der resuspendierten Kultur wurde der Flüssigkeitsauslass 10 des Flüssigkeitsvorratsbehälters 11, welcher 45 ml Pufferlösung A_1 enthielt, geöffnet. Dabei war zu vermeiden, die Fließgeschwindigkeit in der Trennsäule 1 durch Manipulation am Flüssigkeitsauslass 3 der Trennsäule 1 zu ändern, und darauf zu achten, die Matrix 2 der Trennsäule 1 ständig von Pufferlösung A_1 bedeckt zu halten. Nach vollständiger Zugabe der Pufferlösung A_1 aus dem Flüssigkeitsvorratsbehälter 11 wurde der Fluss in der Trennsäule 1 durch Schließen ihres Flüssigkeitsauslasses 3 gestoppt und die Trennsäule 1 aus dem Magnetfeld entnommen. Eine 10 ml Einwegspritze, welche mit Pufferlösung A_1 gefüllt ist, wurde am Dreiwegehahn 4 angesetzt und die Trennsäule retrograd 1 ausgespült. Das Eluat wurde dabei in einem geeigneten Gefäß aufgefangen und die

Suspension 5 min bei 1500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert.

c) Auswertung und Ergebnis

Es erfolgte ein Anfärben der Zellen mit Acridine Orange und eine flowzytometrische Analyse wie anderweitig beschrieben (Bhakdi et al., Cytometry A 2007: (71A) 662-667). Fig. 2 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung anhand von Histogrammen der flowzytometischen Analyse. A) *P. falciparum* Kultur vor Passage durch die Hochgradientenmagnetseparationssäule. M1: normale rote Blutzellen, M2: mit *P. falciparum* infizierte rote Blutzellen (13,51%). B) Eluat aus der Trennsäule 1 nach Passage der Kultur, Spülen mit 45 ml Pufferlösung A_1 und Entnahme der Trennsäule 1 aus dem Magnetfeld. M1: normale rote Blutzellen, M2: Mit *P. falciparum* infizierte rote Blutzellen, aufgereinigt auf 99,54%. Entsprechend zeigte ein mit Giemsa gefärbter Blutausstrich ausschließlich mit Malariaerregern infizierte rote Blutzellen. Die Malariaerreger in den aufgereinigten roten Blutzellen ließen sich über mehrere Tage problemlos weiter kultivieren.

Beispiel 2

Aufreinigung von mit Malariaerregern infizierten roten Blutzellen aus einer *P. falciparum* Kultur mit bovines Serumalbumin (BSA) enthaltender phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).

Material:

Wie aufgelistet in Beispiel 1, jedoch wurde Pufferlösung A_1 mit Pufferlösung A_2 (PBS mit 5% BSA) ersetzt.

a) Bereitstellung des Aufreinigungskits

Wie beschrieben in Beispiel 1

b) Vorbereitung und Durchführung des Trennvorganges

Vorbereitung der P. falciparum Kultur zur Aufreinigung von mit Malariaerregern infizierten roten Blutzellen

Wie beschrieben in Beispiel 1. Die Parasitämie der *P. falciparum* Kultur betrug in diesem Versuch 14.47%. Pufferlösung A_1 wurde durch Pufferlösung A_2 ersetzt.

Durchführung des Trennvorganges

Wie beschrieben in Beispiel 1, mit folgenden Unterschieden:

Pufferlösung A_1 wurde durch Pufferlösung A_2 ersetzt. Das Abzentrifugieren des Eluates erfolgte dann bei 800 g für 5 min.

c) Auswertung und Ergebnis

Die Auswertung erfolgte analog zu Beispiel 1. Fig. 3 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung anhand von Histogrammen der flowzytometischen Analyse. A) *P. falciparum* Kultur vor Passage durch die Hochgradientenmagnetseparationssäule. M1: normale rote Blutzellen, M2: mit *P. falciparum* infizierte rote Blutzellen (14,47%). B) Eluat aus der Trennsäule 1 nach Passage der Kultur, Spülen mit 45 ml Pufferlösung A_2 und Entnahme der Trennsäule 1 aus dem Magnetfeld. M1: normale rote Blutzellen, M2: Mit *P. falciparum* infizierte rote Blutzellen, aufgereinigt auf 97,03%. Entsprechend zeigte ein mit Giemsa gefärbter Blutausstrich nahezu ausschließlich mit Malariaerregern infizierte rote Blutzellen. Die Malariaerreger in den aufgereinigten roten Blutzellen ließen sich über mehrere Tage problemlos weiter kultivieren.

Beispiel 3

Aufreinigung von weißen Blutzellen, welche das Oberflächenantigen CD8 tragen (CD8 positive Zellen) aus einer Suspension von weißen Blutzellen (peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs)).

Material:

Wie aufgelistet in Beispiel 1

a) Bereitstellung des Aufreinigungskits

Wie beschrieben in Beispiel 1.

b) Vorbereitung und Durchführung des Trennvorgangs

Markieren von CD8 positiven Zellen mit Antikörper-konjugierten synthetischen paramagnetischen Teilchen (Microbeads)

$1{,}5x10^7$ humane periphere mononukleare Zellen (PBMCs) wurden mit monoklonalen Ratte-anti-Mensch CD8 IgG Antikörpern 30 Minuten in PBS/BSA 1% auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit der gleichen Pufferlösung gewaschen und anschließend mit anti-Ratte IgG konjugierten Microbeads (Miltenyi Biotech GmbH, loc. cit.) für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal in gleicher Pufferlösung gewaschen und schließlich weitere 30 Minuten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (PE-anti CD8 und FITC-anti CD3, Simultest™, BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA USA 95131) auf Eis inkubiert. Es folgte erneut ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS/BSA 1%. Die Zellen wurden dann nochmals abzentrifugiert und in 1,5 ml Pufferlösung A_1 resuspendiert.

Durchführung des Trennvorganges

Wie beschrieben in Beispiel 1

c) Auswertung und Ergebnis

Fig. 4 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung der CD8 positiven Zellen aus der Suspension von PBMCs. A) Zellpopulation der Probe. Die beiden oberen Quadranten zeigen die CD8 positiven Zellen (23,21%). B) Eluat aus der Trennsäule 1 nach Passage der PBMCs, Spülen mit 45 ml Pufferlösung A_1 und Entnahme der Trennsäule 1 aus dem Magnetfeld. Die beiden oberen Quadranten zeigen die CD8 positiven Zellen, aufgereinigt auf 99,17%.

Beispiel 4

Entfernung (Depletion) von CD8 positiven Zellen aus einer Suspension von PBMCs

Material

Wie aufgelistet in Beispiel 2, jedoch Einsatz einer 25G Injektionsnadel als Durchflussbegrenzer anstelle einer 20G Injektionsnadel.

A) Bereitstellung des Aufreinigungskits

Wie beschrieben in Beispiel 1.

B) Vorbereitung und Durchführung des Trennvorganges

Markieren von CD8 positiven Zellen mit Antikörper-konjugierten synthetischen paramagnetischen Teilchen (Microbeads)

Wie beschrieben in Beispiel 3.

Durchführung des Trennvorganges

Wie beschrieben in Beispiel 2, jedoch Einsatz von 15 ml Pufferlösung A_2. Für diesen Versuch war die die Trennsäule 1 durchlaufende Flüssigkeit von Interesse. Sie wurde in einem geeigneten Gefäß aufgefangen, die Zellen bei 800 g für 5 min abzentrifugiert und in 300 µl PBS resuspendiert.

c) Auswertung und Ergebnis

Fig. 5 zeigt das Ergebnis der Entfernung der CD8 positiven Zellen aus der Suspension von PBMCs. A) Zellpopulation der Probe. Die beiden oberen Quadranten zeigen die CD8 positiven Zellen (35,41%). B) Eluat aus der Trennsäule 1 nach Passage der PBMCs, Spülen mit 15 ml Pufferlösung A_2 und Entnahme der Trennsäule 1 aus dem Magnetfeld. Die beiden oberen Quadranten zeigen die CD8 positiven Zellen, depletiert auf 0,57%.

Alle vorangehend erwähnten Veröffentlichungen sind durch Verweis in Gänze in die vorliegende Patentschrift aufgenommen.

Zusammengefasst beruht die Erfindung auf dem Gedanken, eine technische Vorrichtung mit Verbrauchsmaterialien zur Durchführung einer Hochgradientenmagnetseparation an biologischem Material einzusetzen, auch bezeichnet als „Kit“, umfassend oder bestehend aus:

1.1. einer Trennsäule enthaltend eine Matrix bestehend aus ferromagnetischem Material, welches zur Generierung eines Hochgradientenmagnetfeldes innerhalb eines externen starken, homogenen magnetischen Feldes geeignet ist,

1.2. einem Flüssigkeitsvorratsbehälter, aus welchem Pufferlösung A in den Einlassbereich der Trennsäule eingebracht werden kann,

1.3. einem Permanent- oder Elektromagneten zur Erzeugung eines starken, homogenen magnetischen Feldes,

1.4. einer Pufferlösung A zur Equilibrierung der Trennsäule und Suspension des zu trennenden biologischen Materials,

bei dem die Pufferlösung A mindestens eine der drei folgenden vorteilhaften Eigenschaften aufweist:

1.5. Pufferlösung A enthält zur Equilibrierung der Trennsäule und zur Suspension des zu trennenden biologischen Materials Makromoleküle, welche die Eigenschaft besitzen, unspezifische Bindungsstellen in der Trennsäule absättigen zu können, und/oder

1.6. Pufferlösung A besitzt eine Dichte, die der Dichte der zu trennenden Partikel hinreichend ähnlich ist, um die Auswirkungen der Schwerkraft auf die Partikel so weit wie möglich zu reduzieren und daher selbige in der Pufferlösung A in Schwebe zu halten, und/oder

1.7. besagte Pufferlösung A besitzt eine Viskosität, welche zu einer für den Trennvorgang geeigneten Flussgeschwindigkeit mit laminaren Strömungsverhältnissen in der Trennsäule beiträgt.

Patentansprüche

1. Hochgradientenmagnetseparations-Vorrichtung für die Trennung oder Aufreinigung magnetischen oder magnetisch markierten biologischen Materials mit einem Magnet (7), einer Trennsäule (1) und einer in einem Innenraum der Trennsäule anordenbaren ferromagnetischen Matrix (2), sowie mit einem eine Pufferlösung zur Equilibrierung der Trennsäule (1) und/oder zur Suspension des biologischen Materials enthaltenden Vorratsbehälter (11), wobei im Betrieb ein von dem Magnet (7) erzeugtes Magnetfeld in der Matrix (2) ein Hochgradientenmagnetfeld erzeugen und Pufferlösung aus dem Vorratsbehälter (11) die Trennsäule (1) durchströmen kann,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass die Pufferlösung eine Grundlösung und Makromoleküle umfasst, welche unspezifische Bindungsstellen der Matrix (2) absättigen können.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
   wobei die Pufferlösung eine Dichte aufweist, die der Dichte zu trennender Partikel des biologischen Materials so weitgehend entspricht, dass eine auf die Partikel wirkende Schwerkraft im Wesentlichen kompensiert ist und die Partikel daher in der Pufferlösung nahezu schweben, und/oder die Pufferlösung eine hohe Viskosität aufweist, welche ein laminares Durchströmen der Trennsäule (1) mit für den Trennvorgang geeigneter Fließgeschwindigkeit ermöglicht.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
   wobei der Magnet (7) ein Permanent- oder Elektromagnet ist, welcher so geformt ist, dass die Trennsäule (1) in dem von ihm erzeugten insbesondere homogenen Magnetfeld angeordnet werden kann, wobei die Trennsäule (1) durch räumliche Trennung und/oder Abschalten wahlweise unter Einwirkung des Magnetfelds stehen kann oder nicht.

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
   wobei die Matrix (2) unbeschichtet ist und/oder geordnetes oder ungeordnetes, filamentöses, sphärisches oder anderweitig geformtes Material aufweist, insbesondere nichtrostenden, magnetischen Edelstahl oder Stahlwolle.

5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
wobei der Vorratsbehälter (11) mit der Trennsäule (1) verbunden ist, so dass Pufferlösung über eine Zuflussbegrenzungseinrichtung (8, 9) mit einer einstellbaren Fließgeschwindigkeit in die Trennsäule (1) eingebracht werden kann oder nicht, und/oder wobei die Trennsäule (1) eine Durchflussbegrenzungseinrichtung (4, 5) aufweist, welche den Ausfluss aus der und die Strömungsgeschwindigkeit in der Trennsäule (1) beeinflussen kann.

6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
wobei die Ionenstärke der Grundlösung in Abhängigkeit von den Makromolekülen so angepasst ist, dass aggregierende Effekte der Makromoleküle auf das biologische Material kompensiert werden, wobei die Grundlösung eine isoosmolare Konzentration aus Kationen Natrium, Kalium, Magnesium oder Kalzium und aus Anionen Chlorid, Phosphat, Sulfat oder Carbonat aufweist, insbesondere eine phosphatgepufferte Kochsalz- oder Sucroselösung oder eine Mischung daraus ist.

7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
wobei die Makromoleküle natürliche oder synthetische Polyelektrolyte oder Polyampholyte umfassen, insbesondere synthetisches Polyelektrolyt oder organisches Polyelektrolyt D-Glucuronsäure, und/oder wobei die Makromoleküle einen isoelektrischen Punkt aufweisen, der bei pH-Wert der Grundlösung zu einer Ladung führt, welche der Ladung zu trennender Partikel des biologischen Materials entspricht und/oder wobei die Makromoleküle ein Molekulargewicht von etwa 10.000 bis etwa 100.000 kDa, insbesondere von etwa 30.000 bis etwa 70.000 kDa aufweisen.

8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
wobei die Makromoleküle globuläre Proteine umfassen, insbesondere Albumine, bovines oder humanes Serumalbumin, Ovalbumin, Lactalbumin oder pflanzliche Albumine, β-Lactoglobulin, κ-Casein, Histone, Protamine, Globuline, Prolamine oder Gluteline mit einer Konzentration von etwa 3% bis etwa 7%, insbesondere etwa 4% bis etwa 5% bezogen auf die Pufferlösung.

9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

wobei die Makromoleküle filamentöse Proteine umfassen, insbesondere hydrolisierte Kollagene in einer Konzentration von etwa 0,3 bis etwa 20 Gew.-%, insbesondere von etwa 1 bis etwa 10 Gew.-%., und/oder Gelatinen, Rindergelatinen, Schweinegelatinen oder Teleosteangelatinen in einer Konzentration von etwa 0,3% bis etwa 1,5%, insbesondere von etwa 0,4% bis etwa 0,8%, die eine niedrige Gelierkraft von etwa 150 Bloom oder weniger, insbesondere etwa 75 Bloom oder weniger aufweisen.

10. Verfahren zur Trennung oder Aufreinigung intrinsisch magnetischen oder vorbereitend magnetisch markierten biologischen Materials mittels Hochgradienten-magnetseparation, wobei eine Suspension mit dem biologischen Material eine in einem äußeren Magnetfeld angeordnete ferromagnetische Matrix (2) durchströmt, so dass das Material an der Matrix (2) anhaftet,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Matrix (2) unbeschichtet ist und dass das biologische Material in einer Pufferlösung mit einer Grundlösung und Makromolekülen suspendiert wird, die beim Durchströmen der Matrix unspezifische Bindungsstellen der Matrix (2) absättigen.

11. Verfahren nach Anspruch 10,
wobei die Matrix (2) und eine sie umgebende Trennsäule (1) vor dem Durchströmen der Suspension durch eine Vorinkubation mit reiner, also kein biologisches Material enthaltender Pufferlösung equilibriert wird, und zwar über einen ausreichend langen Zeitraum, um unspezifische Bindungsstellen in der Matrix (2) abzusättigen, insbesondere über eine Dauer von etwa 3 bis etwa 20 oder etwa 5 bis etwa 10 Minuten, und wobei die Matrix (2) während des Equilibrierens ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
wobei zum Trennen von unerwünschtem biologischen Material das Eluat, also ein die Matrix (2) verlassendes Fluid, nach dem Durchströmen aufgefangen wird, wobei nach Einführen der Suspension in die Matrix (2) bei weiterhin aktiviertem Magnetfeld so lange die Matrix (2) mit zusätzlicher reiner Pufferlösung durchströmt wird, bis sichergestellt ist, dass die Suspension die Matrix (2) vollständig verlassen hat, und wobei die Matrix (2) während des Durchströmens ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird.

13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,

wobei zum Aufreinigen erwünschten biologischen Materials nach Einführen der Suspension in die Matrix (2) bei noch aktiviertem äußeren Magnetfeld die Matrix (2) so lange mit zusätzlicher reiner Pufferlösung durchströmt wird, bis sichergestellt ist, dass die Suspension die Matrix (2) vollständig verlassen hat, und anschließend bei durch räumliche Trennung oder Abschalten deaktiviertem äußeren Magnetfeld die Matrix (2) mit zusätzlicher reiner Pufferlösung ausgespült und dabei das Eluat aufgefangen wird, wobei die Matrix (2) während des gesamten Vorgangs ständig von Pufferlösung bedeckt gehalten wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13,

wobei das aufgefangene Eluat zentrifugiert und mit dem abzentrifugierten biologischen Material ohne Flüssigkeitsphase des Eluates das Verfahren ein- oder mehrfach wiederholt wird.

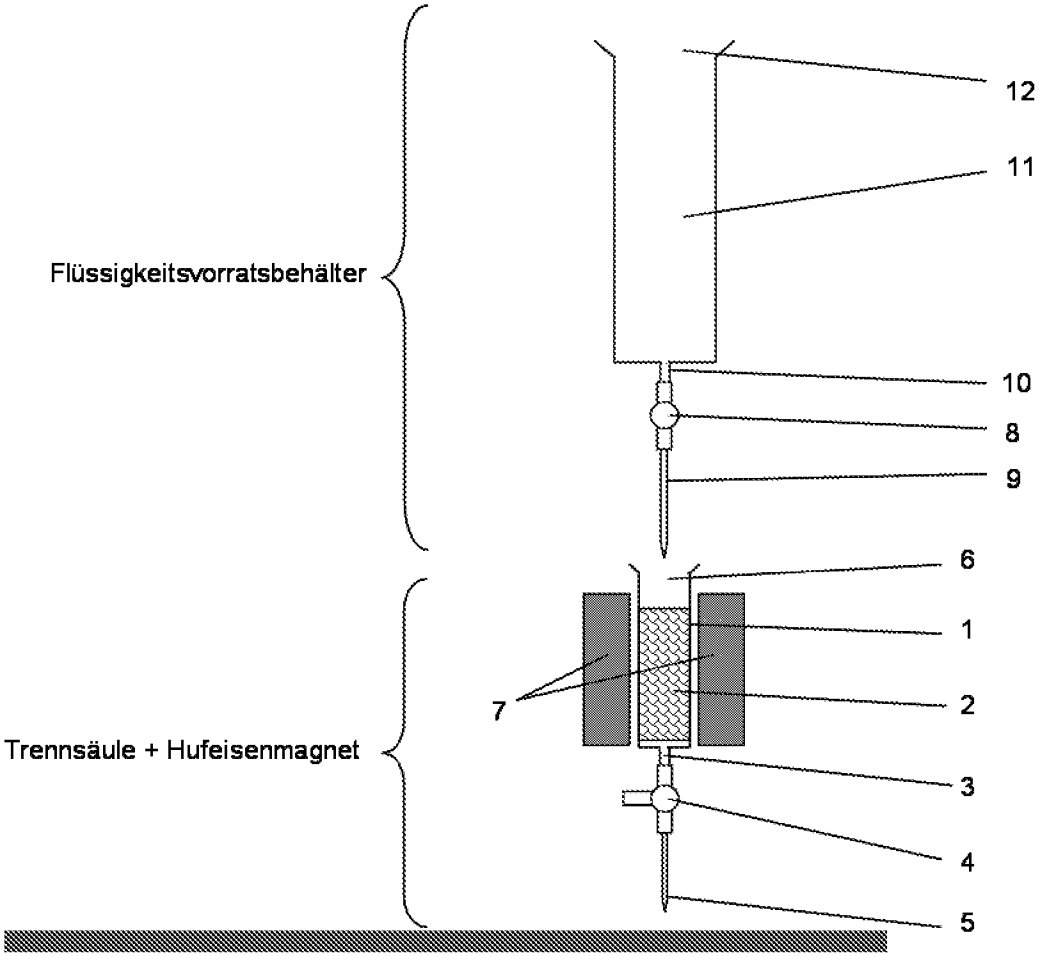

Flüssigkeitsvorratsbehälter
Trennsäule + Hufeisenmagnet
12
11
10
8
9
6
1
2
7
3
4
5

Fig. 1

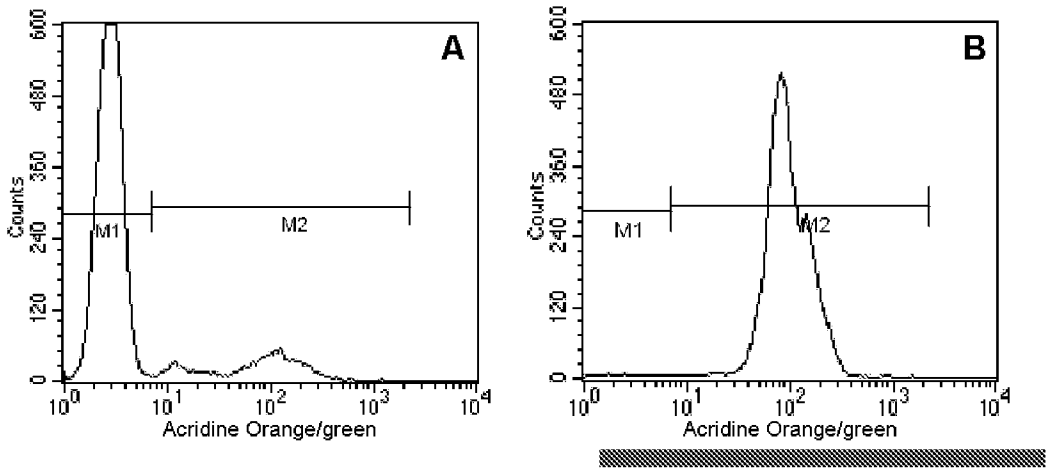

A
B
Counts
M1
M2
Acridine Orange/green

Fig. 2

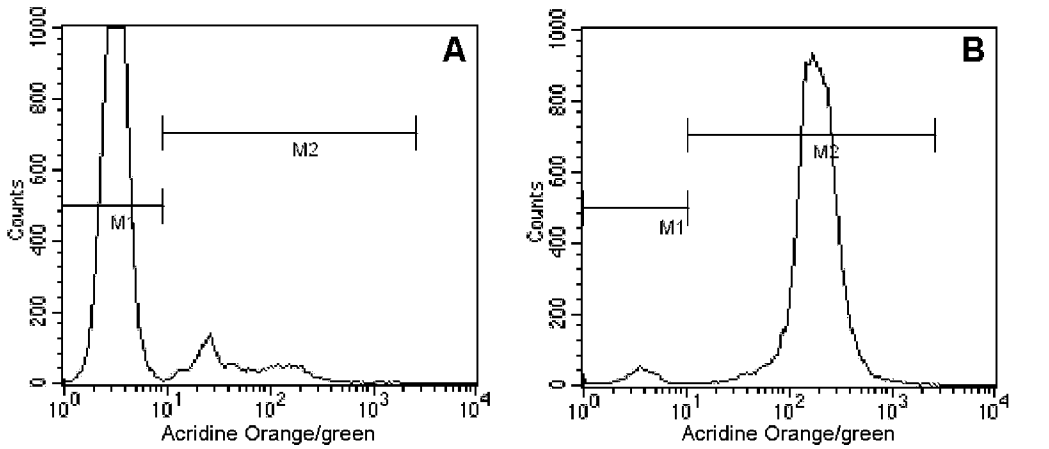

A
B
Counts
M1
M2
Acridine Orange/green

Fig. 3

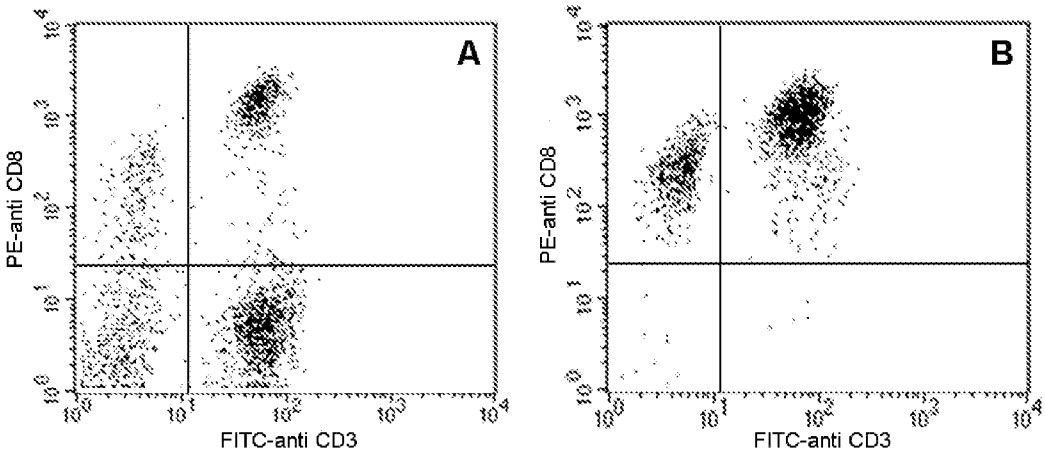


Fig. 4

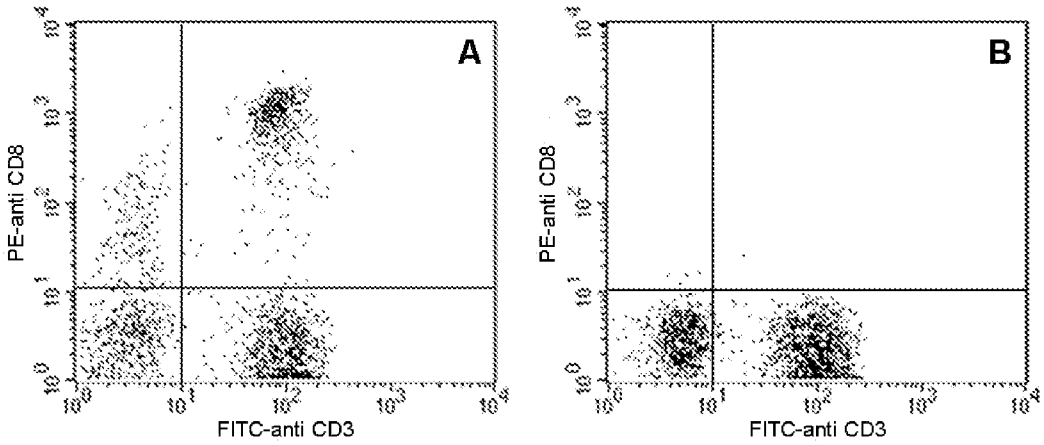


Fig. 5