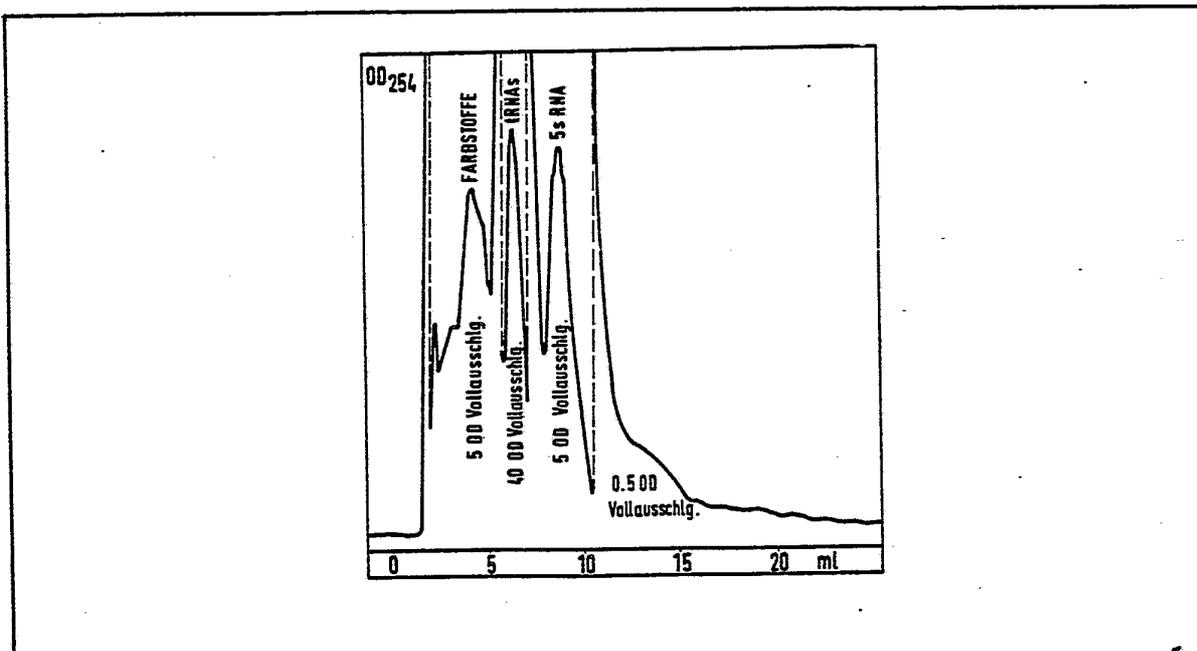



 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : B01J 20/32, B01D 15/08 G01N 30/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 85/ 03885 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1985 (12.09.85)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP85/00054 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Februar 1985 (20.02.85) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 34 07 814.2 (32) Prioritätsdatum: 2. März 1984 (02.03.84) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG[DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt (DE). (72) Erfinder;und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MÜLLER, Werner [DE/DE]; Geibelstrasse 8, D-8000 München 80 (DE). SÄNGER, Heinz, Ludwig [DE/DE]; Am Klopferspitz 10, D-8033 Martinsried (DE).		(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG; Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, JP, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PHASE SUPPORTS FOR THE PARTITION CHROMATOGRAPHY OF MACROMOLECULES, PRODUCTION METHOD THEREOF AND UTILIZATION THEREOF		
(54) Bezeichnung: PHASENTRÄGER FÜR DIE VERTEILUNGSCHRMATOGRAPHIE VON MAKROMOLEKÜLEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG		
(57) Abstract Phase supports for the partition chromatography of macromolecules from non absorbing base support particles, insoluble in the phase system, with an average particulate size from 7 to 2000 μm , of which the surface is coated with an adhering material which is insoluble in the phase system and presenting an affinity for one of the phases of the phase system for the partition chromatography; their production method and their utilization for the separation by partition chromatography of macromolecules, biopolymers, subcellular units and complete cells, particularly in the polyethylene glycol-dextrane-dual phase system.		
(57) Zusammenfassung Phasenträger für die Verteilungschromatographie von Makromolekülen aus nichtabsorbierenden, im Phasensystem unlöslichen Grundträgerteilchen mit einer durchschnittlichen Teilchengröße im Bereich von 7 bis 2000 μm , deren Oberfläche mit einem in dem Phasensystem unlöslichen, festanhaftenden Material mit Affinität für eine der Phasen des Phasensystems für die Verteilungschromatographie beschichtet ist, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur verteilungschromatographischen Trennung von Makromolekülen, Biopolymeren, subzellulären Einheiten und ganzen Zellen insbesondere im wässrigen Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystem.		



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KR	Republik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BE	Belgien	LK	Sri Lanka
BG	Bulgarien	LU	Luxemburg
BR	Brasilien	MC	Monaco
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MG	Madagaskar
CG	Kongo	MR	Mauritanien
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumänien
FI	Finnland	SD	Sudan
FR	Frankreich	SE	Schweden
GA	Gabun	SN	Senegal
GB	Vereinigtes Königreich	SU	Soviet Union
HU	Ungarn	TD	Tschad
JP	Japan	TG	Togo
KP	Demokratische Volksrepublik Korea	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Phasenträger für die Verteilungschromatographie
von Makromolekülen, Verfahren zu ihrer
Herstellung und ihre Verwendung

5 Gegenstand der Erfindung sind Phasenträger für die Verteilungschromatographie von Makromolekülen insbesondere im wäßrigen Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystem, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

10 Es ist bekannt, daß man biologische Makromoleküle, subzelluläre Einheiten, Bakterien und eukaryotische Zellen durch Gegenstromverteilung im wäßrigen Polyethylenglykol-Dextran-System trennen kann (P.A. Albertson "Partition of Cell Particles and Macromolecules" (1971), 2nd Ed., Almqvist & Wiksell, Stockholm). Diese Gegenstromverteilungsverfahren sind nun aber apparativ äußerst aufwendig und
15 zeitraubend, insbesondere wenn bei kleinen Verteilungskoeffizienten eine große Vielzahl von Gegenstromverteilungsstufen notwendig ist, um die gewünschte Trennung zu erreichen. Es wurden daher bereits Versuche unternommen, diesen Gegenstromverteilungsprozeß durch ein verteilungschromatographisches
20 Verfahren zu ersetzen, da es in dieser Weise wesentlich einfacher möglich ist, eine Vielzahl von Trennungsstufen zu erreichen. Allerdings scheiterten diese Versuche bislang an geeigneten Trägern für die stationäre Phase.

25 Bislang konnten lediglich doppelsträngige Nucleinsäuren im wäßrigen Polyethylenglykol-Dextran-System unter Verwendung von Cellulose als Träger für die dextranreiche stationäre Phase chromatographisch getrennt werden (W. Müller, H.J. Schuetz, C. Guerrier-Takada, P.E. Cole und R. Potts, Nucleic Acids Research, Vol. 7, Nr. 8 (1979) 2483
30 bis 2499 und W. Müller und G. Kütemeier, Eur. J. Biochem. 128 (1982), 231 bis 238). Bei diesen Untersuchungen der Flüssig/Flüssig-Chromatographie von DNA-Fragmenten wurde als Trägermaterialien für die dextranreiche Phase des wäßrigen Polyethylenglykol-Dextran-Systems eine Reihe

von Materialien eingesetzt, von denen sich insbesondere Cellulose als geeignet erwiesen hat, da es eine ausreichende Affinität für die dextranreiche Phase zeigt. Für Proteine und proteinhaltige Zellbestandteile sind diese Phasenträger aber wegen ihrer ausgeprägten Adsorptionseigenschaften nicht anwendbar; auch bei Ribonucleinsäuren machen sich adsorptionsbedingte Störeffekte schon bemerkbar. Kationische oder anionische Gele auf Polysaccharidbasis binden die dextranreiche Phase zwar ähnlich gut wie Cellulose, sind jedoch nur für isokratische Trennprozesse zu benutzen, da die Phase abgestoßen wird, sobald sich das elektrische Phasenpotential im Zuge der Gradientenelution mit verschiedenen Salzen in der mobilen, polyethylenreichen Phase ändert.

Unter den neutralen Gelen, die als potentielle Phasenträger für eine solche Verteilungschromatographie in Frage kämen, sind poröse Mischpolymere auf Vinylbasis (Fraktogele der Firma Merck, Darmstadt) sowie die Polyacrylamidgele (Biogele der Firma Biorad). Erstere binden für eine generelle Anwendung eine zu geringe Menge der Dextranphasen, während im letzteren Falle die gebundene Phase für Makromoleküle kaum zugänglich ist. Dieser Sachverhalt wird auch in der oben angesprochenen Literaturstelle Eur. J. Biochem. 128 (1982), Seite 233 deutlich hervorgehoben. Diese Unzugänglichkeit der gebundenen Phase gilt auch für Polyacrylamid-Agarose-Kombinationsgele (beispielsweise die ACA-Ultrogele der Firma IDF).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, Phasenträger mit universellem Anwendungsbereich für die Verteilungschromatographie von Makromolekülen zu schaffen, die eine hervorragende Trennung in einfacher Weise ermöglichen, leicht herzustellen sind und für die Trennung von nieder- und hochmolekularen Ribonucleinsäuren ebenso geeignet sind wie für subzelluläre Einheiten und ganze Zellen, was namentlich für die Virusforschung

und Viroidforschung von großer Bedeutung ist.

Es hat sich nunmehr gezeigt, daß diese Aufgaben mit Hilfe von Phasenträgern gelöst werden kann, die Grundträgerteilchen umfassen, deren Oberfläche mit einem fest anhaftenden Material mit Affinität für eine der Phasen des Phasensystems für die Verteilungschromatographie beschichtet ist.

10 Gegenstand der Erfindung sind daher die Phasenträger gemäß Hauptanspruch. Die Unteransprüche betreffen besonders bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Phasenträger und deren Verwendung.

15 Die Erfindung betrifft somit Phasenträger für die Verteilungschromatographie von Makromolekülen, namentlich einsträngigen Nucleinsäuren und insbesondere Proteinen sowie subzellulären Einheiten und ganzen Zellen, die aus nicht-adsorptiven, in dem Phasensystem unlöslichen Grundträgerteilchen mit einer durchschnittlichen Teilchengröße im Bereich von 7 bis 2000 µm bestehen, deren Oberfläche mit einem in dem Phasensystem unlöslichen, fest anhaftenden Material mit Affinität für eine der Phasen des Phasensystems für die Verteilungschromatographie beschichtet ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Phasenträger sind die Grundträgerteilchen mit einem festanhaftenden Material mit Affinität für eine der Phasen, namentlich die Dextranphase des Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystems, beschichtet, was zur Folge hat, daß bei diesen Kombinations-
30 teilchen die Dextranphase zwangsläufig an der Oberfläche gebunden wird und in dieser Weise auch für extrem große Moleküle bis zu ganzen Zellen zugänglich wird. Auf der anderen Seite sorgen die Grundträgerteilchen für die erforderliche mechanische Stabilität des Phasenträgers.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bestehen die Grundträgerteilchen aus einem anorganischen und/oder organischen Material, beispielsweise aus Aluminiumoxid, einem Silicat, Kieselgur, Kieselgel, Cellulose, Cellulosederivaten, vernetztem Dextran, vernetzter Agarose oder einem Polymer oder Copolymer auf der Grundlage von Monomeren, wie Acrylsäure, Acrylamid, Acrylsäureestern, Acrylnitril, Methacrylsäure, Methacrylamid, Methacrylsäureestern, Methacrylnitril und/oder Vinylverbindungen oder Gemischen aus diesen Monomeren. Besonders bevorzugt ist es, daß die Grundträgerteilchen aus einem dieser angegebenen Materialien in hydroxylierter Form bestehen, da es in dieser Weise ohne weiteres möglich ist, die Oberflächenschicht fest mit den Grundträgerteilchen zu verbinden, namentlich eine chemische Bindung zwischen dem Material der Oberflächenschicht und dem der Grundträgerteilchen zu erreichen.

Besonders vorteilhaft ist es, Grundträgerteilchen aus einem diolsubstituierten Kieselgel, einem hydrophilisierten Polymethacrylat, einem Silicat mit stärkeartiger Beschichtung oder einem porösen Polymer auf Vinylbasis einzusetzen.

Mit besonderem Vorteil besitzen die Grundträgerteilchen des erfindungsgemäßen Phasenträgers eine durchschnittliche Teilchengröße von 7 bis 100 μm und insbesondere von 10 bis 50 μm .

Einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung zufolge sind die Grundträgerteilchen mit einem polymeren Material beschichtet, das mit besonderem Vorteil chemisch an das Material der Grundträgerteilchen gebunden ist. Dabei hat es sich als besonders vorteilhaft erwiesen, die Grundträgerteilchen mit einem synthetischen Polymer oder Copolymer zu beschichten, welches durch Aufpfropfen der monomeren Bestandteile auf die Grundträgerteilchen gebil-

det wird. Für diesen Zweck hat sich aufgepfropftes Polyacrylamid und insbesondere lineares oder schwach vernetztes Polyacrylamid am für den angestrebten Trenneffekt geeignetsten erwiesen.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung dieses Phasenträgers, welches darin besteht, die Grundträgerteilchen der oben beschriebenen Art chemisch mit dem in Form einer Oberflächenschicht aufgebracht
10 brachten polymeren Material zu verbinden. Vorzugsweise wird dies in der Weise durchgeführt, daß man die Grundträgerteilchen durch Pfropfpolymerisation mit der Oberflächenschicht aus dem polymeren Material versieht.

15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens werden die Grundträgerteilchen aus einem hydroxylierten Material der oben angegebenen Art in einer das bzw. die Monomeren enthaltenden Lösung suspendiert, worauf das Aufpfropfen des polymeren Materials im Zuge einer Redoxpolymerisation unter Sauerstoffausschluß bewirkt wird. Dabei
20 kann man bei diesem Verfahren mit Vorteil als Polymerisationskatalysator Cer(IV)-ionen verwenden, da dieses Material die Bildung der die Polymerisation begünstigenden freien Radikale ausschließlich an der Oberfläche der
25 Grundträgerteilchen bewirkt, so daß die Polymerisation in Form einer Pfropfpolymerisation abläuft. Bezüglich Einzelheiten dieses an sich bekannten Verfahrens darf auf G. Mino und S. Kaizerman in Journal of Polymer Science, Vol. XXXI, Nr. 122 (1958), 242 bis 243 verwiesen
30 werden.

Bei dieser Verfahrensführung setzt man das zur Bildung des als Oberflächenschicht bevorzugten Polyacrylamids verwendete Acrylamid vorzugsweise in Form einer wäßrigen
35 Lösung ein.

Es hat sich gezeigt, daß bei der oben angesprochenen Redoxpolymerisation in Gegenwart von Cer(IV)-ionen die Pfropfpolymerisation von Acrylamid unter sorgfältigem Sauerstoffausschluß innerhalb von 30 bis 240 Minuten eine genügend
5 dichte Polyacrylamidschicht auf den Grundträgerteilchen ergibt, die zur Bindung einer ausreichenden Menge der Dextranphase für die Verteilungschromatographie im wässrigen Polyethylenglykol-Dextran-System ausreicht.

10 Im einzelnen wurden die folgenden Träger mit Erfolg mit einer Polyacrylamidschicht versehen:

- "Superose[®]": Vernetzte Agarose der Firma Pharmacia, Teilchengröße 25 bis 40 µm,
15 "Lichrosorb[®] "-Diol: Diolsubstituiertes Kieselgel der Firma Merck, Teilchengröße 10 µm,
"Separon Hema 1000[®]": Hydrophilisiertes Polymethacrylat der Laboratory Instruments Works, Prag, Teilchengröße 16 bis 21 µm,
20 "TSK-SIL 3000[®]": Silicatträger mit stärkeartiger Beschichtung der Firma Toyo Soda, Teilchengröße 10 µm (unter anderem Inhalt der "Blauen Säule" der Firma LKB),
"TSK-HW-40(S)[®], -55(S) -65(S) und -75(S)": Poröse Mischpolymere auf Vinylbasis, 1m Äq OH/g ,
25 der Firma Toyo Soda, erhältlich als "Fractogele" der Firma Merck, Teilchengröße 25 bis 40 µm.

30 Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Phasenträger für die Trennung von nieder- und hochmolekularen Ribonucleinsäuren, von doppelsträngigen Nucleinsäuren, von subzellulären Einheiten und ganzen Zellen geeignet sind, so daß sie für die Isolierung von Viroid-RNA aus
35 pflanzlichen Rohextrakten und für die chromatographische Trennung subzellulärer Einheiten und ganzen Zellen unter

anderem für medizinisch-diagnostische Zwecke angewandt werden können.

5 Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung der oben definierten Phasenträger zur verteilungschromatographischen Trennung von Makromolekülen, Biopolymeren, subzellulären Einheiten und ganzen Zellen in wässrigen Zwei- und Mehrphasensystemen auf Polymerbasis, wie sie beispielsweise von P.A. Albertson ("Partition of Cell
10 Particles and Macromolecules" (1971), 2nd Ed. Almquist & Wiksell, Stockholm, S. 18-30) beschrieben worden sind, insbesondere in wässrigen Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystemen.

15 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

B e i s p i e l 1

20 Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung eines erfindungsgemäßen Phasenträgers.

Man beschickt einen mit einem Gaseinleitungsrohr, einem Tropftrichter und einem Vakuumschluß versehenen Dreihalskolben mit einer Lösung von 50g Acrylamid in 500 ml
25 destilliertem Wasser und suspendiert 20g Grundträgerpartikelchen aus einem diolsubstituierten Kieselgel (Lichrosorb[®] Diol der Firma Merck) mit einer Teilchengröße von 10 µm in dieser Lösung. Dann spült man zunächst während 5 Minuten mit nachgereinigtem Stickstoff, evakuiert und füllt
30 erneut mit Stickstoff. Diese Maßnahmen des Evakuierens und Befüllens mit Stickstoff wiederholt man zweimal, wonach man 15ml einer 0,2 M Lösung von Cer(IV)-ammoniumnitrat in 1 N Salpetersäure unter Rühren zusetzt. Man leitet unter
35 mäßigem Rühren während 60 Minuten Stickstoff durch die Suspension, wobei die Intensität der gelben Farbe der Cer(IV)-ionen deutlich abnimmt. Dann versetzt man die Suspension unter Luftzutritt mit weiteren 20g der Grundträgerpartikelchen und filtriert nach dem Mischen unter Druck über ein Blaubandfilter (Schleicher & Schüll Nr. 589³) ab. Nach
40 dem Waschen mit 400ml destilliertem Wasser wäscht man mit

rund 400 ml einer 0,2 M Natriumacetatlösung in einem Cacodylat-Puffer (10 mM Natriumcacodylat/1 mM Ethylendiamintetraessigsäure, pH-Wert = 6).

In gleicher Weise versieht man Grundträgerteilchen aus
5 den oben spezifisch angesprochenen Materialien mit einer
Polyacrylamidschicht, wobei es nicht notwendig ist, die
oben angegebene Verdünnung des polyacrylamidbeschich-
teten Trägers mit nichtbeschichtetem Material durchzu-
führen. Im Fall von Grundträgerteilchen aus "Lichrosorb[®]"
10 ist diese Verdünnung erforderlich, um das beschichtete Ma-
terial filtrierbar zu machen und somit die Beschichtung mit
der Dextranphase zu begünstigen.

B e i s p i e l 2

15

Zur Verdeutlichung der Trenneigenschaften des erfindungs-
gemäßen Phasenträgers wurden Vergleichsversuche durchge-
führt, bei denen die erfindungsgemäßen Phasenträger Pha-
senträgern gegenübergestellt wurden, die lediglich aus
20 den Grundträgerteilchen des entsprechenden erfindungsge-
mäßen Phasenträgers bestehen.

Zunächst wurden die Phasenträger mit der Dextranphase
des Polyethylenglykol-Dextran-Systems wie folgt beschich-
25 tet.

Das gewaschene Material wurde im Druckfilter bei 37°C mit
2,5 Volumen der Dextranphase des Polyethylenglykol-Dex-
tran-Systems (hergestellt durch Lösen von 66,3 g Dextran
30 T500 und 5,4 g Polyethylenglykol 8000 in 428,3 ml 0,2 M
Natriumacetat in dem in Beispiel 1 beschriebenen Cacody-
lat-Puffer) gespült, wonach der Phasenüberschuß mit der
polyethylenglykolreichen Oberphase des gleichen Systems
(hergestellt durch Lösen von 3 g Dextran T500, 71,7 g Po-
35 lyethylenglykol 8000 in 925,3 ml 0,2 M Natriumacetat in
dem Cacodylat-Puffer) ausgewaschen wurde. Nach dem Suspendieren

des Materials in 3 Volumen Oberphase wurde der in dieser Weise erhaltene Phasenträger in ein geeignetes Chromatographierohr mit einem auf 37°C thermostatisierten Heizmantel eingeschlämmt.

5

Dann wurden die Trenneigenschaften der in dieser Weise mit der Dextranphase versehenen unbeschichteten Grundträgerpartikelchen einerseits bzw. der erfindungsgemäßen Phasenträger andererseits untersucht, und zwar unter Verwendung eines Probenmaterials auf der Grundlage eines Gemisches aus Transfer-RNA (tRNA) und 5sRNA. Beide RNA-Komponenten gehören zu den löslichen Ribonucleinsäuren und besitzen die folgenden Eigenschaften:

15 tRNA: Molgewicht \approx 30 000, besteht aus 40 bis 60 gleich großen Spezies, die sich in ihrer Aminosäureakzeptoraktivität unterscheiden.

20 5sRNA: Molgewicht \approx 43 000, bei den meisten Organismen einheitliche RNA, die eine Rolle bei der Übertragung einer RNA-Basensequenz in eine Aminosäuresequenz spielt.

Die Trennung erfolgt in dem Polyethylenglykol-Dextran-System "D" aus 6,20 Gew.-% Dextran, 4,40 Gew.-% Polyethylenglykol und 89,40 Gew.-% Wasser, welches in der Unterphase aus 13,25 Gew.-% Dextran, 1,07 Gew.-% Polyethylenglykol und 85,68 Gew.-% Wasser und in der Oberphase aus 0,30 Gew.-% Dextran, 7,17 Gew.-% Polyethylenglykol und 92,53 Gew.-% Wasser besteht (dieses und ähnliche Polyethylenglykol-Dextran-Systeme sind aus der oben angesprochenen Literaturstelle P.A. Albertson bekannt, siehe insbesondere das Phasendiagramm auf Seite 264). Bei diesem Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystem läßt sich der Verteilungskoeffizient insbesondere durch die Ionenzusammensetzung beeinflussen, d. h. durch die Zugabe unterschiedli-

35

cher Salze, wobei die Lithiumionen den Verteilungskoeffizienten K steigern, während die anderen Alkalikationen den entgegengesetzten Effekt ausüben.

- 5 Bei der hier durchgeführten Trennung werden daher im Phasenpaar die folgenden Elektrolyte verwendet:

10 mM Natrium-Cacodylat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0

10 3 mM Natriumazid

1 mM Natriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
+ 0,2 M Natriumacetat.

Die Trennung erfolgt bei einer Temperatur von 37°C in der
15 thermostatisierten Chromatographiesäule.

Die Probenmengen sind in OD_{254} -Einheiten angegeben, d. h. als optische Dichte bei einer Wellenlänge von 254 nm, wobei 25 OD_{254} 1 mg RNA entsprechen.

20

Die bei diesen Trennungen erhaltenen Ergebnisse sind in den beigefügten Fig. 1 bis 6 dargestellt, wobei diese Figuren im einzelnen folgendes zeigen:

25 Fig. 1 Vergleichsversuch: Chromatographie einer 10 OD_{254} -Probe an einer Säule, die mit Grundträgerteilchen aus nicht mit Polyacrylamid beschichtetem "Lichrosorb[®]"-Diol gefüllt ist. Säulenvolumen: 55 ml, Flußrate: 18 ml/h;

30

Fig. 2 Erfindungsgemäßer Versuch: Trennung einer farbstoffhaltigen 50 OD_{254} -Probe an einer Säule, die mit polyacrylamidbeschichteten Grundträgerteilchen aus "Lichrosorb[®]"-Diol beschickt ist. Säulenvolumen: 8,4 ml, Flußrate: 15 ml/h;

35

Fig. 3 Vergleichsversuch: Chromatographie einer
19 OD₂₅₄-Probe an einer mit Grundträgerteil-
chen aus "Superose[®]" beschichteten Säule,
Säulenvolumen: 10 ml, Flußrate: 9 ml/h;

5

Fig. 4 Erfindungsgemäßer Versuch: Trennung einer
50 OD₂₅₄-Probe an einer Säule, die mit Poly-
acrylamid beschichteten "Superose[®]"-Teil-
chen beschickt ist, Säulenvolumen: 60 ml,
Flußrate: 20 ml/h;

10

Fig. 5 Vergleichsversuch: Chromatographie einer
35 OD₂₅₄-Probe an einer mit Grundträgerteil-
chen aus "TSK-HW-40(S)" beschickten Säule,
Säulenvolumen: 65 ml, Flußrate: 15 ml/h;

15

Fig. 6 Erfindungsgemäßer Versuch: Trennung einer
35 OD₂₅₄-Probe an einer Säule, die mit Poly-
acrylamid beschichteten "TSK-HW-40(S)"-Grund-
trägerteilchen beschickt ist, Säulenvolumen:
65 ml, Flußrate: 15 ml/h.

20

Aus den obigen Figuren ist ersichtlich, daß mit Hilfe der
erfindungsgemäßen Phasenträger im Vergleich zu Säulen,
25 die die unbeschichteten Grundträgerteilchen enthalten,
eine überraschend saubere Trennung der Bestandteile des
eingesetzten Trenngemisches möglich ist. Damit ist aber
ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Phasenträger eine
unerwartet vorteilhafte Eignung für die Trennung von
30 biologischen Makromolekülen besitzen, die in keiner Weise
vorausgesehen werden konnte, und mit großem Vorteil für
Trennverfahren und medizinisch-diagnostische Verfahren
angewandt werden können.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Phasenträger für die Verteilungschromatographie von Makromolekülen, g e k e n n z e i c h n e t d u r c h nichtadsorptive, in dem Phasensystem unlösliche Grundträgerteilchen mit einer durchschnittlichen Teilchengröße im Bereich von 7 bis 2000 μm , deren Oberfläche mit einem in dem Phasensystem unlöslichen, fest anhaftenden Material mit Affinität für eine der Phasen des Phasensystems für die Verteilungschromatographie beschichtet ist.
2. Phasenträger nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen aus einem anorganischen und/oder organischen Material bestehen.
3. Phasenträger nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen aus Aluminiumoxid, einem Silicat, Kieselgur, Kieselgel, Cellulose, einem Cellulosederivat, einem vernetzten Dextran, einer vernetzten Agarose oder einem Polymer oder Copolymer auf der Grundlage von Acrylsäure, Acrylamid, Acrylsäureestern, Methacrylsäure, Methacrylamid, Methacrylsäureestern und/oder Vinylverbindungen oder Gemischen aus diesen Monomeren bestehen.
4. Phasenträger nach Anspruch 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen aus einem der angegebenen Materialien in hydroxylierter Form bestehen.

5. Phasenträger nach Anspruch 4, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen aus
einem diolsubstituierten Kieselgel, einem hydrophilisier-
ten Polymethacrylat, einem Silicat mit stärkeartiger Be-
schichtung oder einem porösen Polymer auf Vinylbasis be-
stehen.
6. Phasenträger nach den Ansprüchen 1 bis 5, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grund-
trägerteilchen eine durchschnittliche Teilchengröße von
7 bis 100 μm , vorzugsweise von 10 bis 50 μm , aufweisen.
7. Phasenträger nach den Ansprüchen 1 bis 6, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grund-
trägerteilchen mit einem polymeren Material beschichtet
sind.
8. Phasenträger nach den Ansprüchen 1 bis 7, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß das polymere
Material chemisch an das Material der Grundträgerteilchen
gebunden ist.
9. Phasenträger nach Anspruch 8, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen mit
einem durch Aufpfropfen der monomeren Bestandteile auf die
Grundträgerteilchen gebildeten synthetischen Polymer oder
Copolymer beschichtet sind.
10. Phasenträger nach Anspruch 9, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen mit
einem aufgepfropften Polyacrylamid beschichtet sind.
11. Phasenträger nach Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß die Grundträgerteilchen
mit einem aufgepfropften linearen oder schwach vernetzten
Polyacrylamid beschichtet sind.

12. Verfahren zur Herstellung eines Phasenträgers gemäß den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Grundträgerteilchen chemisch mit dem in Form einer Oberflächenschicht aufgebracht polymeren Material verbunden werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Grundträgerteilchen durch Pfropfpolymerisation mit der Oberflächenschicht aus dem polymeren Material versehen werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Grundträgerteilchen aus einem hydroxylierten Material in einer das bzw. die Monomeren enthaltenden Lösung suspendiert werden und das Aufpfropfen des polymeren Materials im Zuge einer Redoxpolymerisation unter Sauerstoffausschluß bewirkt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Polymerisationskatalysator Cer(IV)-ionen verwendet werden.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Monomer Acrylamid in wäßriger Lösung eingesetzt wird.

17. Verwendung der Phasenträger gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 zur verteilungschromatographischen Trennung von Makromolekülen, Biopolymeren, subzellulären Einheiten und ganzen Zellen insbesondere im wäßrigen Polyethylenglykol-Dextran-Zweiphasensystem.

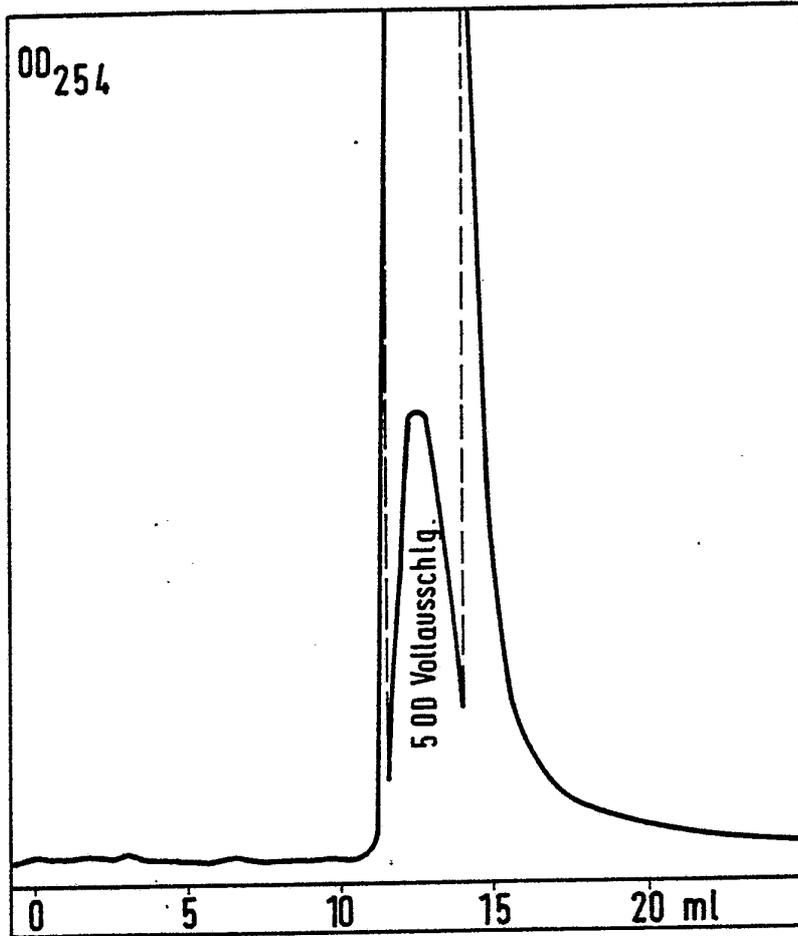


FIG. 1

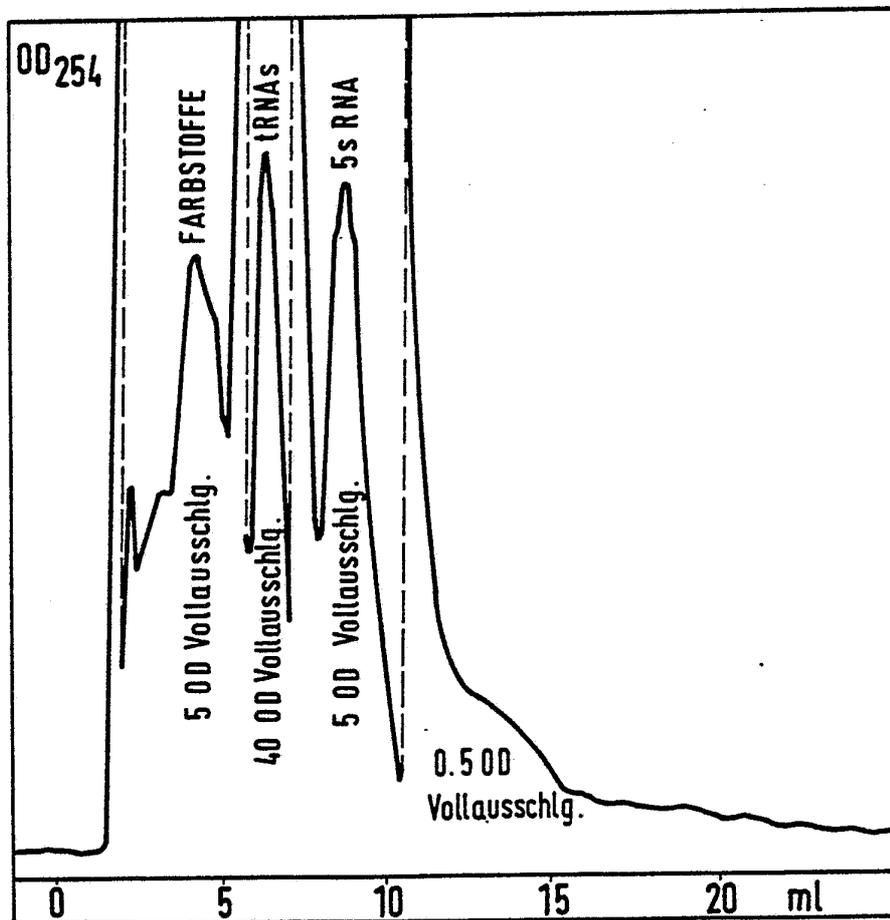


FIG. 2

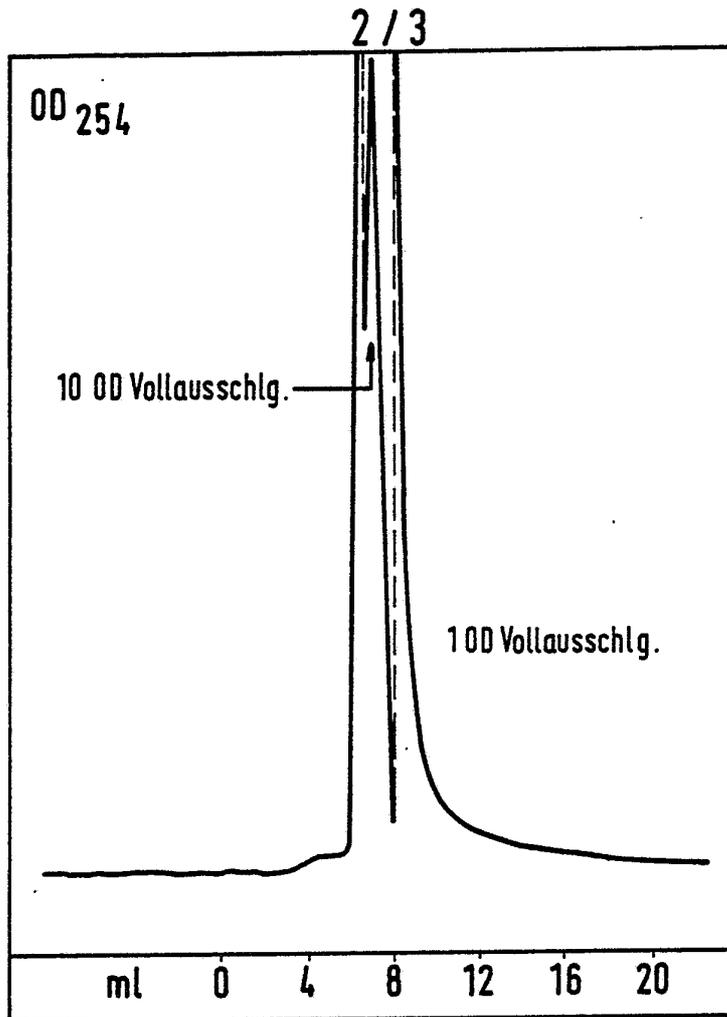


FIG. 3

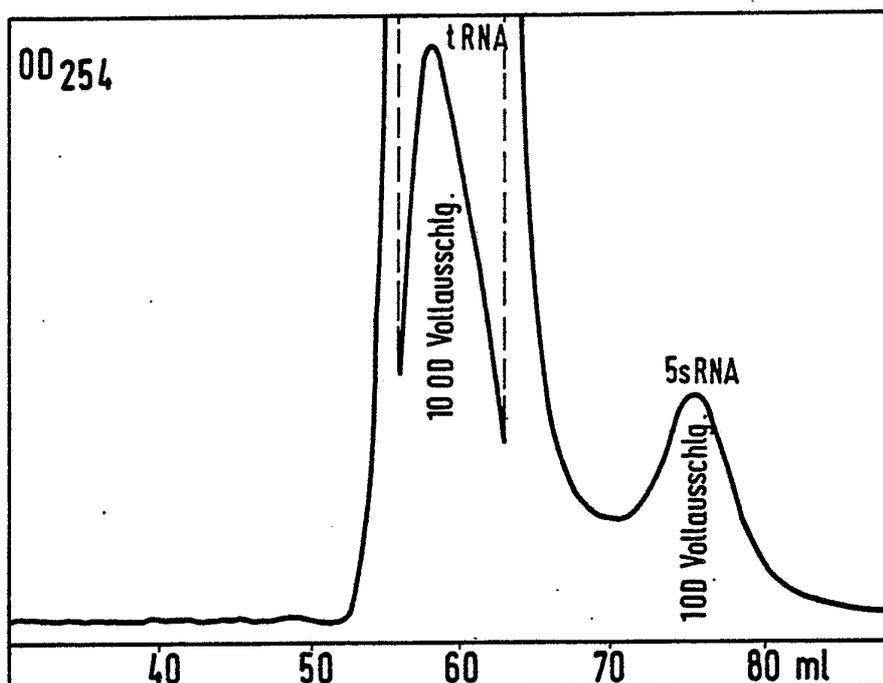


FIG. 4

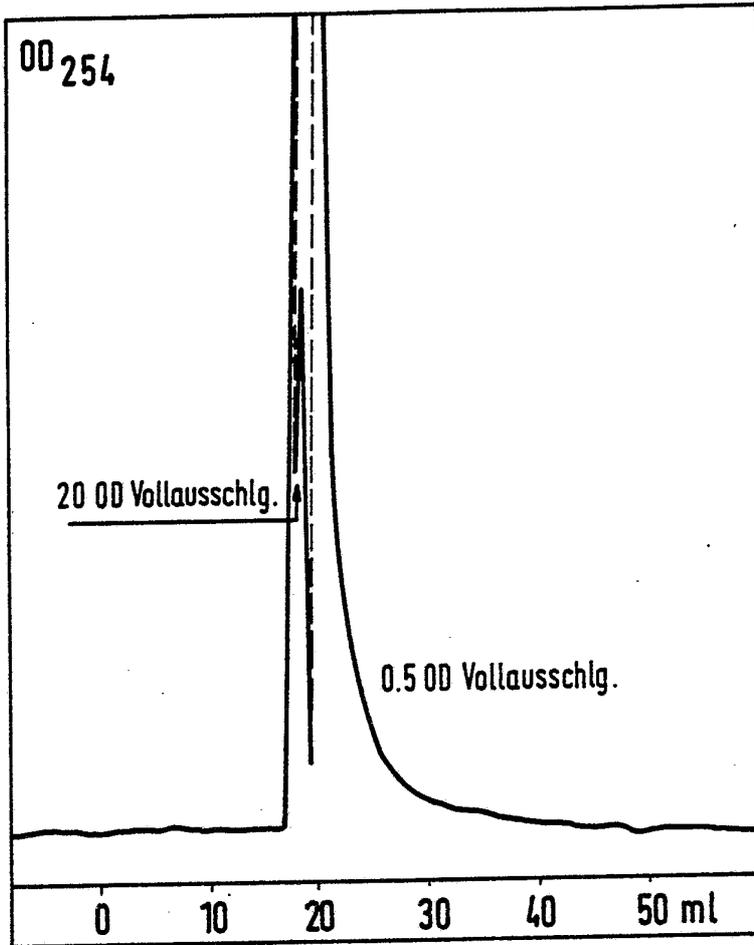


FIG. 5

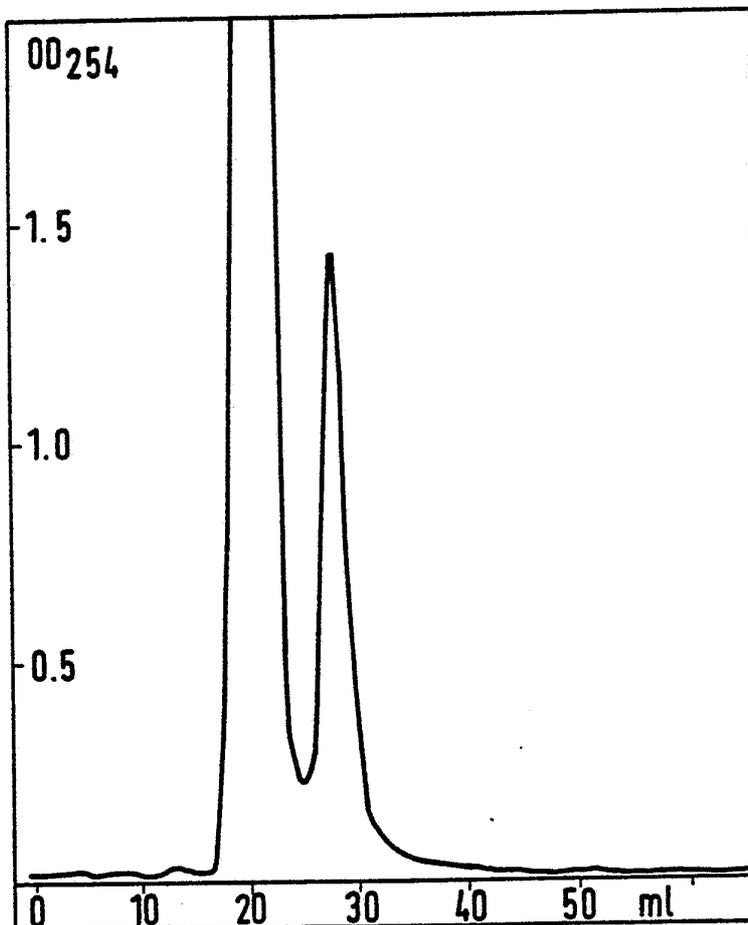


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 85/00054

International Application No

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC. ⁴ : B 01 J 20/32; B 01 D 15/08; G 01 N 30/48		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
IPC. ⁴ :	B 01 J ; B 01 D; G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁴		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ⁶	Citation of Document, ¹⁴ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
Y	DE, A, 2709094 (BOEHRINGER MANNHEIM) 07 September 1978, see page 11, line 32 – page 14, line 9; page 19, line 1 – page 24, line 8; page 25, lines 11– 18; page 27, line 1 – page 29, line 14	1, 17 2–5, 7–14, 16
A		
Y	DE, A, 2712344 (MÜLLER) 28 September 1978, see page 23, line 16 – page 24, line 27; page 29, line 20 – page 31, line 12	1, 17
A	US, A, 3983299 (REGNIER) 28 August 1976, see column 10, lines 23–26; column 12, lines 25–28; columns 12–14; claims 1–21; column 4, lines 1–10; figures 1–4	1–9, 17
A	US, A, 3478886 (HORNBECK) 18 November 1969, see column 9, claims 1–9	1, 2, 8–10
A	GB, A, 1310872 (SIMPSON) 21 March 1973, see page 2, lines 72–126	1–4, 7, 9
A	US, A, 4159966 (ROBERTS) 03 July 9 1979	
A	US, A, 4140653 (IMURA) 20 February 1979	
<p>⁶ Special categories of cited documents: ¹⁴</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ²	Date of Mailing of this International Search Report ²	
13 May 1985 (13.05.85)	18 June 1985 (18.06.85)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ²⁰	
European Patent Office		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/EP 8500054 (SA 8926)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 07/06/85

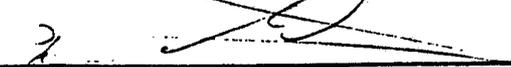
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A- 2709094	07/09/78	NL-A- 7802022	05/09/78
		FR-A, B 2416721	07/09/79
		JP-A- 53131294	15/11/78
		AT-B- 362147	27/04/81
		GB-A- 1597891	16/09/81
		GB-A- 1597892	16/09/81
		AT-B- 364734	10/11/81
		CA-A- 1122208	20/04/82
		US-A- 4335226	15/06/82
		CA-A- 1131225	07/09/82
		SE-A- 7802249	03/09/78
		US-A- 4394487	19/07/83
		DE-A- 2712344	28/09/78
GB-A- 1597182	03/09/81		
US-A- 3983299	28/09/76	None	
US-A- 3478886	18/11/69	None	
GB-A- 1310872	21/03/73	None	
US-A- 4159966	03/07/79	None	
US-A- 4140653	20/02/79	None	

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 85/00054

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
(Int. Cl. *) B 01 J 20/32; B 01 D 15/08; G 01 N 30/48		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
(Int. Cl. *)	B 01 J; B 01 D; G 01 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	DE, A, 2709094 (BOEHRINGER MANNHEIM) 7. September 1978, siehe Seite 11, Zeile 32 - Seite 14, Zeile 9; Seite 19, Zeile 1 - Seite 24, Zeile 8; Seite 25, Zeilen 11-18; Seite 27, Zeile 1 - Seite 29, Zeile 14	1,17
A	--	2-5,7-14,16
Y	DE, A, 2712344 (MÜLLER) 28. September 1978, siehe Seite 23, Zeile 16 - Seite 24, Zeile 27; Seite 29, Zeile 20 - Seite 31, Zeile 12	1,17
A	--	1-9,17
A	US, A, 3983299 (REGNIER) 28. August 1976, siehe Spalte 10, Zeilen 23-26; Spalte 12, Zeilen 25-28; Spalten 12-14; Ansprüche 1-21; Spalte 4, Zeilen 1-10; Figuren 1-4	1-9,17
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
13. Mai 1985	18 JUN 1985 Kruidenberg	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten	
Europäisches Patentamt		

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US, A, 3478886 (HORNBECK) 18. November 1969, siehe Spalte 9, Ansprüche 1-9 --	1,2,8-10
A	GB, A, 1310872 (SIMPSON) 21. März 1973, siehe Seite 2, Zeilen 72-126 --	1-4,7,9
A	US, A, 4159966 (ROBERTS) 3. Juli 1979	
A	US, A, 4140653 (IMURA) 20. Februar 1979 -----	

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT UBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/EP 8500054 (SA 8926)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 07/06/85

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A- 2709094	07/09/78	NL-A- 7802022	05/09/78
		FR-A,B 2416721	07/09/79
		JP-A- 53131294	15/11/78
		AT-B- 362147	27/04/81
		GB-A- 1597891	16/09/81
		GB-A- 1597892	16/09/81
		AT-B- 364734	10/11/81
		CA-A- 1122208	20/04/82
		US-A- 4335226	15/06/82
		CA-A- 1131225	07/09/82
		SE-A- 7802249	03/09/78
		US-A- 4394487	19/07/83
		DE-A- 2712344	28/09/78
GB-A- 1597182	03/09/81		
US-A- 3983299	28/09/76	Keine	
US-A- 3478886	18/11/69	Keine	
GB-A- 1310872	21/03/73	Keine	
US-A- 4159966	03/07/79	Keine	
US-A- 4140653	20/02/79	Keine	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82