



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 29 182 T2 2005.01.27

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 888 157 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 29 182.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/SE97/00237

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 903 706.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/029825

(86) PCT-Anmeldetag: 14.02.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 21.08.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.01.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.05.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27.01.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: B01D 15/08  
B01J 41/06

(30) Unionspriorität:

9600590 19.02.1996 SE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT, LI, LU, NL,  
SE

(73) Patentinhaber:

Amersham Biosciences AB, Uppsala, SE

(72) Erfinder:

BERGLUND, Rolf, S-754 49 Uppsala, SE;  
BERGSTRÖM, Jan, S-740 22 Bälinge, SE; BELEW,  
Makonnen, S-756 46 Uppsala, SE; SÖDERBERG,  
Lennart, S-755 98 Uppsala, SE

(54) Bezeichnung: PROZESS ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON PEPTIDEN UND NUCLEINSAURE  
UND NEUE IONENTAUSSCHERMATRIX MIT HOHER AFFINITÄT

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

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

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung befasst sich mit schwachen Anionenaustauschern, d.h. Ionenaustauschern, welche protonierte Formen von Primär-, Sekundär-, Tertiäraminen als Anionen austauschende Liganden aufweisen. Die Erfindung beruht auf unserer Erkenntnis, dass diese Art von Anionenaustauschern, falls sie gewisse Wasserstoff bindende, vom Stickstoff entfernte Atome in der schwachen Anionenaustauschergruppe des Liganden aufweisen, wie es in den unabhängigen Ansprüchen definiert ist, verbesserte Bindungseigenschaften an Peptide oder Nukleinsäure zeigen können. Da die Bindung durch Guanidin oder Harnstoff unterbrochen wird, wurde das als Zeichen für die Anwesenheit von Wasserstoffbindungen zwischen Peptid/Nukleinsäure und einem Anionen austauschenden Liganden angesehen.

**[0002]** Unsere Erkenntnis hat uns zu einem neuen Verfahren zur Trennung von Nukleinsäure bzw. Peptid geführt, und zu neuen Ionenaustausch-Adsorbenten (Ionenaustauschmatrizen), die in dieser Methode zur Verwendung gelangen können.

**[0003]** Man versteht unter Aminogruppe (Strukturen und Expression), falls es nicht anders angegeben wird, eine protonierte Primär-, Sekundär-, Tertiär-Aminogruppe, wie auch eine Quartär-Ammoniumgruppe.

**[0004]** Der Ausdruck "trennen" bezieht sich auf das Entfernen oder Abtrennen von einem oder mehreren Nukleinsäure/Peptiden aus einer mehr oder weniger komplexen Mischung von Substanzen. Die Trennung kann angewendet werden im Zusammenhang mit der Isolierung, Reinigung und Analyse von Nukleinsäure/Peptid. Die Trennung wird durch die Wechselwirkung von Substanzen mit den Liganden des Anionenaustauschers ausgeführt. Die Wechselwirkung ist unterschiedlich für unterschiedliche Substanzen, was die Trennung zur Folge hat.

**[0005]** Unter Nukleinsäure versteht man RNS wie auch DNS, einschließlich ihrer einzel- oder doppelsträngigen oder modifizierten Formen, wie Phosphothionat-Formen, die Schutzgruppen und Marker aufweisen (Isotope, Biotin, Hapten, usw.). Nukleinsäure kann ein Oligo- oder Polynukleotid sein. Die Anzahl von Basen und Basenpaaren, bzw. Oligonukleotiden, ist typischerweise  $\leq 200$ . Die Erfindung ist vorzugsweise anwendbar auf die Isolierung und Reinigung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden.

**[0006]** Als Peptide bezeichnet man Verbindungen, die eine Polypeptid-Struktur aufweisen, d.h. Proteine, wie Lipoproteine, Glycoproteine, Proteoglycan, usw. und Oligopeptide (d.h. Peptide, die 2–10 Aminosäuren enthalten).

## Stand der Technik

**[0007]** EP 276,138 und DE 3,935,098 beschreiben Anionenaustauscher mit schwachen Anionenaustauschgruppen, die eine Hydroxylgruppe in einem Abstand von zwei Kohlenstoffatomen von einem Stickstoffatom in der Ionenaustauschgruppe entfernt haben. Die Ionen austauschende Gruppe wurde unter Benutzung eines bifunktionellen Reagenzes eingebaut, welches sich durch eine Silangruppe an eine Glasmatrix und durch ein Epoxid an ein primäres oder sekundäres Amino –



bindet. Silanstrukturen sind relativ unbeständig und begrenzen den Bereich der zur Verfügung stehenden pH-Werte. EP 276,138 schlägt vor, dass die Matrix auch ein organisches Polymer sein kann. Hinsichtlich organischer Matrizen ist es jedoch ungewiss, ob genügend stabile Produkte auf die vorgeschlagene Art und Weise erhalten werden können. Beide Veröffentlichungen beziehen sich auf die Trennung von Polynukleotiden. DE 3,935,098 verwendet auch ein Elutionsmittel, das das Denaturierungsmitel Harnstoff enthält. Eine ausführlichere Erklärung wird nicht gegeben.

**[0008]** EP 167,488 beschreibt gleichfalls Anionenaustauscher mit schwachen Anionenaustauschgruppen, die eine Hydroxylgruppe in einem Abstand von zwei Kohlenstoffatomen von einem Stickstoffatom in der Ionenaustauschgruppe entfernt haben. Die Ionen austauschende Gruppe ist durch ein Amid an die Matrix gebunden. Keinerlei Angaben sind über die Trennung von Peptiden oder Nukleinsäure vorzufinden.

**[0009]** Die Erfinder von EP 276,138 lehnen unsere Ligandentypen ab, weil sie ihr Bindungsvermögen für zu stark halten. Diese Behauptung ist an und für sich falsch und das ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, warum sie nicht in der Lage sind, die Haupteigenschaft zu verstehen, auf der die starke Bindungsfähigkeit unserer

neuen Liganden beruht (Wasserstoff – Bindung). Wahrscheinlich haben sie nicht einmal die Notwendigkeit einer Bindung bei einer hohen Ionenstärke erkannt.

**[0010]** Eine relativ umfangreiche Literatur wird über ECTEOLA – Zellulose zur Reinigung von Nukleinsäure zur Verfügung gestellt. ECTEOLA – Zellulose wurde durch die Kupplung von Triethanolamin,  $N(CH_2CH_2OH)_3$  an Zellulose, unter Verwendung von Epoxid, hergestellt. Es wurde in Betracht gezogen, dass die resultierenden Gruppen  $-CH_2CHOHCH_2-N^+(CH_2CH_2OH)_3$  darstellen, d.h. dass ECTEOLA – Zellulose ein starker Ionen-austauscher ist. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass handelsübliche Varianten von ECTEOLA – Zellulose ein relativ hohes Pufferungsvermögen bei einem pH – Wert zwischen 7 und 10 aufweisen, was die Gegenwart schwacher Ionen austauschender Gruppen andeutet, was andererseits bedeutet, dass Hydroxygruppen in Triethanolamin zur Bindung an Zellulose verwendet wurden. Ionenaustauscher, die auf Triethanolamin basieren und die durch eine Reaktion mit Epoxid an Zellulose gebunden wurden, sind nicht in den neuen erfindungsgemäßen Matrizen enthalten.

**[0011]** Schwache Ionenaustauscher mit bezüglich einer Aminogruppe polyvalenten Liganden wurden früher zur Chromatofocussierung verwendet. Bei dieser Art Chromatographie wird ein interner pH-Gradient auf der Säule gebildet. Die Adsorption und Elution werden durchgeführt mit niedrigen Ionenstärken, um die Verdrängung gebundener Substanzen durch Salze im Puffer zu verhindern. Gebräuchliche zur Adsorption verwendete Ionenstärken umfassen  $< 50$  mM NaCl, typischerweise  $< 30$  mM. Zur Elution sind die Ionenstärken sogar niedriger angesetzt (fünfmal niedriger). Siehe Sluyterman et al., "Ten years of chromatofocusing: eine Diskussion" (J. Chromatog. 470(2) (1989) 417426). Laut dieser Definition ist die Chromatofocussierung nicht vom erfindungsgemäßen Verfahren umfasst.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0012]** In der Chromatographie besteht generell Bedarf für verbesserte Methoden zur Trennung von Peptiden und Nukleinsäure. Besonders kann auf die Reinigung von Proteinen aus durch Fermentation und anderen Zellkulturpflanzen gewonnenen Überständen hingewiesen werden. Diese Medien enthalten öfters hohe Salzanteile (Leitfähigkeit  $\geq 15$ – $20$  mS/cm) und erschweren somit eine direkte Verwendung bei gebräuchlichen Ionenaustauschern. Eine Vorbehandlung, z.B. durch Entsalzung bzw. Verdünnung, was zu erhöhten Verfahrenskosten führt, muss unternommen werden. Andererseits werden auch Ionenaustausch – Adsorbenten benötigt, welche bei hohen Ionenstärken adsorbieren, vorzugsweise bei Ionenstärken, die Leitfähigkeiten von  $\geq 15$ – $20$  mS/cm entsprechen, und die bei niedrigen Ionenstärken, z.B. bei einer einfachen pH- Wert- -Einstellung, desorbiert werden können.

**[0013]** Synthetisch hergestellte Oligonucleotide werden öfters mit Ionenaustauschern gereinigt. Neben den herzustellenden Oligonucleotiden, ergibt die Synthese normalerweise auch kürzere Varianten. Den gebildeten Oligonukleotide fehlt normalerweise die endständige Schutzgruppe. Das führt zu Schwierigkeiten bei der Reinigung und Verarbeitung. Es ist öfters erwünscht, die Chromatographie und Schutzgruppenabspaltung in einem einzigen Schritt zu unternehmen.

**[0014]** Man ist auch bestrebt, verbesserte Ionenaustauschmethoden zur Verfügung zu stellen, die eine verbesserte Dynamik, verbesserte Kapazität und eine reduzierte Anzahl von Schritten zur Reinigung und Isolierung von Peptiden und Nukleinsäure bieten.

#### Die Erfindung

**[0015]** Die Entdeckung der anfänglich bezeichneten verbesserten Bindungseigenschaften ermöglichte es uns, Anionenaustauscher (I) zur Verfügung zu stellen, welche eine größere Dynamik bei der Trennung von Proteinen und Nukleinsäure bieten. Das kann so ausgedrückt werden, dass die maximale Elutions-Ionenstärke im pH-Wert – Bereich von 2–14 für den Anionenaustauscher (I) höher ist, in bevorzugten Fällen  $\geq 125\%$ , in manchen Fällen  $> 140\%$ , sowie  $\geq 200\%$ , als die benötigte Elutions-Ionenstärke für einen quaternären Anionenaustauscher (II) mit einer Ionenaustauschgruppe  $(CH_3)_3N^+$  (=Q-Gruppe; dieselbe Matrix bzw. dieselbe Kupplungsgruppe des quaternären Stickstoffs und was die Matrix anbetrifft, derselbe Gehalt an Liganden wie für den Anionenaustauscher (I) und gemessen bei demselben pH – Wert), und zwar für die Desorption von wenigstens einem der im experimentellen Teil angegebenen Proteine (siehe **Fig. 3**), d.h. Transferrin, Ovalbumin I, Ovalbumin 2,  $\beta$ -Lactoglobulin I und  $\beta$ -Lactoglobulin 2. Die Streuung der Elutions – Ionenstärke mit dem pH des erfindungsgemäss zur Anwendung gelangenden Anionenaustauschers für bestimmte Proteine ist in **Fig. 2a** dargestellt.

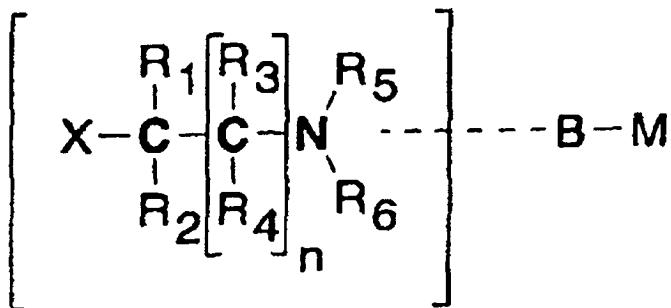
[0016] Dieses erfindungsgemäße Verfahren wird in Anspruch 1 definiert.

[0017] Die auf den Anionenaustauscher angewendete Lösung (einschließlich des Elutionsmittels) ist typischerweise wässrig und setzt sich aus Wasser, möglicherweise einer mit Wasser mischbaren Flüssigkeit wie z.B. Ethanol, Methanol, Acetonitril, und sonstigen mit Wasser vermischbaren Mischungen zusammen. Die Lösung kann auch irgendeine der obengenannten organischen Lösungsmittel umfassen. Die Lösungen, besonders Elutionsmittel, enthalten öfters Salze, Puffersubstanzen, Substanzen die Wasserstoffbindungen zerstören, usw.

[0018] Die Nukleinsäure/Peptid enthaltende Lösung kann ein Überstand einer Zellkultur aber auch eine synthetische Mischung, eventuell teilweise verarbeitet, oder auch ein Extrakt sein. Die Ionenstärke in der Lösung sollte derartig sein, dass sie die erwünschte Bindung/Adsorption an den Ionenaustauscher ermöglicht. In Abhängigkeit der zur adsorbierenden, Ionen austauschenden Gruppen und Proteinen bzw. Oligo/Polynukleotiden, kann die Ionenstärke/Leitfähigkeit über oder unter 15–20 mS/cm liegen.

#### NACH DEM ERFINDUNGSGEMÄSSEN VERFAHREN ZU VERWENDENDE ANIONENAUSTAUSCHER

[0019] Die Anionenaustauscher werden in Formel 1 dargestellt. Mittels einfacher im experimentellen Teil (Experiment 2C) dargestellter Versuche, kann der Fachmann bestimmen, ob ein Ionenaustauscher die obengenannten Kriterien für die Elutions-Ionenstärke erfüllt



Ligand

Ligandenarm (B)

plus Matrix (M)

#### FORMEL I

– bedeutet, dass der Ligandenarm eine  $R_{1-6}$  Gruppe oder einen Wasserstoff in irgendeiner der Gruppen  $R_{1-6}$  im Liganden substituiert. Vorzugsweise substituiert der Ligandenarm  $R_1$  oder  $R_5$  oder  $R_6$ .

[0020] Der Ligand weist öfters ein Molekulargewicht von < 1000 auf.

M ist eine Matrix und enthält zusätzlich ionenaustauschende Liganden, typischerweise gemäß Formel I. n ist 2.

$R_{1-6}$  wird aus Wasserstoff und einer linearen, verzweigten oder zyklisch gesättigten oder ungesättigten Wasserstoffgruppe ausgewählt, die ein- oder zweiwertig sein kann. Zweiwertige Gruppen setzen sich zusammen aus zwei verbundenen  $R_{1-6}$ -Gruppen, so dass ein 5- oder 6-gliedriger Ring zusammen mit irgendeinem der in Formel I mit fett gedruckten Buchstaben dargestelltem Atom gebildet wird.

[0021] Typische Beispiele von  $R_{1-6}$  – Paaren, die zweiwertige Gruppen bilden, sind  $R_5$  und  $R_6$ ,  $R_5$  und  $R_5$  oder  $R_1$  und  $R_6$ . In den betrachteten Wasserstoffgruppen kann die Kohlenstoffkette von einem oder mehreren Aminostickstoff – oder Etherstickstoffatomen (bzw.  $-NR_7$ - und  $-O-$ ) unterbrochen sein und/oder ein oder mehrere Wasserstoffe können durch eine Amino- ( $-N^+R_8R_9R_{10}$ ) oder eine  $OR_{11}$  Gruppe substituiert sein. Ein und dasselbe Kohlenstoffatom, abgesehen von einer Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffbindung, bindet sich typischerweise

maximal an ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom. In Betracht kommende Kohlenstoffketten, einschließlich möglicher Abtrennung von Sauerstoff- oder Stickstoffatomen umfassen meistens eine Länge von < 10 Atomen, vorzugsweise 6 oder weniger Atomen.  $R_{1-6}$  kann eins oder mehrere Wasserstoffatome, Hydroxygruppen oder Aminostickstoffatome in einem Abstand von 2 oder 3 Atomen, beabstandet vom Stickstoffatom, an welches  $R_5$  und  $R_6$  gebunden sind (besonders an  $R_5$  und  $R_6$ ) aufweisen.

**[0022]**  $R_1$ ,  $R_3$  und  $R_4$  sind vorzugsweise Wasserstoff. Falls  $n = 2$ , können  $R_3$  und  $R_4$  an einem der Kohlenstoffatome sich von denen an einem anderen Kohlenstoffatom unterscheiden.

**[0023]** Einer der oder beide Substituenten  $R_5$  und  $R_6$  können Wasserstoffe sein. Falls  $R_5$  oder  $R_6$  Wasserstoff sind, ist vorzugsweise der andere Substituent unsubstituiertes Alkyl ( $C_nH_{2n+1-}$  oder eine entsprechende zyklische Form von  $C_nH_{2n-}$ , wobei  $n$  eine ganze Zahl ist, normalerweise 1–10).  $R_5$  und  $R_6$  können nicht gleichzeitig zwischen Methyl und Ethyl ausgewählt werden.

**[0024]** Beispiele für  $R_{1-6}$  sind ein Niederalkyl (mit 1–6 Kohlenstoffatomen), wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, t-Butyl und Isobutyl, einschließlich entsprechender Formen, substituiert durch eine Gruppe  $-N^+R_8R_9R_{10}$  oder  $-OR_{11}$ . Beispielsweise substituierte Formen sind Hydroxymethyl; Hydroxyethyl; 2-Hydroxypropyl; 2-Hydroxy-1-methylethyl; 1-Hydroxymethyl-2-hydroxyethyl; 2-Hydroxybutyl; 1-(Hydroxymethyl)propyl; 1-Methyl-2-hydroxypropyl; 2-Hydroxy-1,1-di(Hydroxymethyl)ethyl; 1,1-Di(hydroxymethyl)ethyl; 1-Hydroxymethyl-1-methylethyl; 1,1-Di(hydroxymethyl)propyl; 2,3-Dihydroxypropyl; 2,3,4-Trihydroxybutyl; 2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl und 2,3,4,5,6-Pentahydroxyhexyl- und entsprechende Aminogruppen, bei denen z.B.  $-NH_2$  ein oder mehrere  $-OH$  substituiert.

**[0025]**  $R_{7-11}$  werden ausgewählt aus denselben Gruppen wie  $R_{1-6}$ , vorzugsweise sind eine, zwei, drei oder vier Gruppen  $R_{7-11}$  Wasserstoff oder Niederalkyl  $C_{1-6}$ . Falls sämtliche  $R_{8-10}$  Alkylgruppen sind, ist  $-N^+R_8R_9R_{10}$  eine quaternäre Ammoniumgruppe.

**[0026]** Zweiwertige Kohlenwasserstoffgruppen, die von Paaren von  $R_{1-6}$  Gruppen gebildet werden können, sind z.B.  $-CH_2CH_2-$  und  $-CH_2CH_2CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2-$ ;  $-CH_2OCH_2CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2CHOHCH_2CH_2-$  und  $-CH_2CH_2CH_2CH_2N^+(CH_3)_3-$ .

**[0027]** X ist  $-OH$  oder  $-NR_{12}R_{13}$  worin  $R_{12-13}$  aus denselben Gruppen wie  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_5$ , und  $R_6$  ausgewählt wird. In den am meisten üblichen Fällen, ist wenigstens eine Gruppe  $R_{12-13}$  Wasserstoff., d.h.  $-NHR_{12}$  oder  $-NHR_{13}$ .

**[0028]** Der Ligandenarm B ist eine organische Struktur, die bei den normalerweise für die Anionen-Austausch-Chromatographie benutzten pH – Bedingungen, d.h. bei pH – Werten zwischen 2 und 14, hydrolytisch stabil ist. Dem Ligandenarm fehlen normalerweise typische hydrolytisch labile Strukturen, wie Silan, Kohlenstoffsäureester ( $-COO-$ ) oder Kohlenstoffsäureamid ( $-CONH-$ ). Der Ligandenarm ist vorzugsweise eine lineare, verzweigte oder zyklisch gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffkette, welche optional von einem oder mehreren Ethersauerstoff- und/oder Aminostickstoffatomen ( $-NR'_7-$ ) unterbrochen oder durch eine oder mehrere  $N^+R'_8R'_9R'_{10}$  oder  $-OR_{11}$  Gruppen substituiert ist.  $R'_{7-11}$  wird nach denselben für  $R_{7-11}$  geltenden Regeln ausgewählt. Im üblichsten Fall sind  $R'_7$ ,  $R_{11}$  und wenigstens eine der Gruppen  $R''_{8-10}$  Wasserstoff, vorzugsweise zwei oder drei.

**[0029]**  $R_{7-11}$ , welche nicht Wasserstoff darstellen, sind typischerweise Niederalkyl (mit 1–6 Kohlenstoffatomen). Ein und dasselbe Kohlenstoffatom im Ligandenarm, abgesehen von einer Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffbindung, bindet sich typischerweise maximal an ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom.

**[0030]** Bevorzugte Ligandenarme B weisen öfters eine Länge von 0–20 Atomen auf. Der Ligandenarm B stammt öfters von Kupplungen, die an Reaktionen zwischen Epoxiden oder  $-CH_2X'$  teilnehmen (worin  $X' =$  Halogen ist, welches durch eine andere funktionell gleichwertige Gruppe wie Tosylat substituiert werden kann) sowie Ammonium, primär-, sekundär-Amino ( $NHR_5R_6$ , worin  $R_5$  und  $R_6$  mit dem übereinstimmen, was oben beschrieben wurde) oder Alkoholhydroxyl. Die  $-CH_2X'$  – Gruppe kann in Halohydrin, Alkylhalid, vicinale Dihalogenide usw. enthalten sein. Bevorzugte Kupplungen werden mittels Epoxid, Halohydrin und vicinalen Dihalogeniden hergestellt, da sie von sich aus zu einer Hydroxygruppe führen, d.h.  $\beta$  (2-Kohlenstoffatome entfernt) in Bezug zu einer Aminogruppe. Kupplungen durch Epoxide, Halohydrin und vicinale Dihalogenide heißt, dass in der Formel I  $n = 1$ ,  $X = OH$  und  $R_{3-4} = H$  ist, d.h. dass sich die zu  $NR_5R_6$  am nächsten befindliche Struktur in  $-CH_2CHOHCH_2-$  verwandelt. Beispiele bevorzugter Strukturen  $-B-CHXCR_3R_4-$  welche als Resultat dieser Art von Kupplungen gebildet werden können, sind  $-CH_2CHOHCH_2-O-CH_2CHOHCH_2-$ ;

$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-}$ ;  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-}$  etc., d.h. B ist  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ ;  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-O-(CH}_2)_4\text{-O-CH}_2\text{-}$ ;  $-\text{CH}_2\text{-}$ . Epoxid-/vicinale Dihalogenid / Halohydringruppen können in bekannter Weise durch Allylierung eines Hydroxygruppe(n) enthaltenden Polymers gebunden werden, z.B. mittels einer Reaktion mit Allylglycidilether und nachfolgender Halogenierung. Siehe z.B. Nochumsson S. (EP 87995) und Lindgren G (WO 9404192).

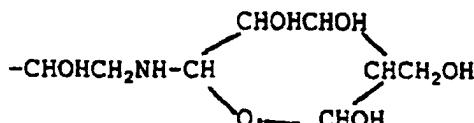
**[0031]** Der Ligandenarm B bindet sich typischerweise an die Matrix M mittels einer Etherstruktur, in welcher Ethersauerstoff von einem Hydroxyl in der Matrix derivatisiert wird.

**[0032]** Thioether (-S-) und Sulphonamid (-SO<sub>2</sub>NH-) haben eine vergleichbare hydrolytische Stabilität mit Ether und können daher gleichwertig Ether im Ligandenarm oder in den R<sub>1-13</sub>- oder R<sub>7-11</sub>-Gruppen substituieren.

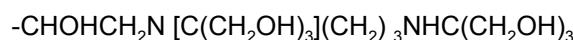
**[0033]** Bevorzugte Liganden werden gebildet, falls die folgenden Verbindungen mit an die Matrix gebundem Epoxid / Halogenid / vicinalem Dihalogenid in Reaktion gebracht werden.

Verbindung	Ligand (deprotonierte Form)
Ammonium	-CHOHCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
Propylamin	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Triethylentetramin	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
bis – Aminopropylamin	-CHOHCH <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> oder -CHOHCH <sub>2</sub> N[(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>
t-Butylamin	-CHOHCH <sub>2</sub> N[C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]
Ethanolamin	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
Diethanolamin	-CHOHCH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>
Tris (hydroxymethyl)-methylamin	-CHOHCH <sub>2</sub> NHC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>
2-Amino-1,3-propandiol	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH(CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>
3-Amino- 1,2-propandiol	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	-CHOHCH <sub>2</sub> NHC(CH <sub>3</sub> )(CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>
1-Amino-deoxysorbitol	-CHOHCH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> (CHOH) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH

### 2-Glucoseamin



Bis – (tris (hydroxymethyl)methylamino)propan



**[0034]** Die gezeigten Liganden wurden als Ergebnis der Kupplung durch Aminostickstoff gebildet. Alternativ kann die Kupplung bei einer Hydroxygruppe durchgeführt werden, wodurch sich andere Liganden laut Formel 1 ergeben. Das heißt, dass ein und derselbe erfindungsgemäße Anionenaustauscher öfters einen oder mehrere Liganden laut Formel 1 aufweist. Die Kupplungsreaktion kann so geführt werden, dass sie mehr oder weniger auf selektive Art und Weise bei Aminostickstoff oder Hydroxysauerstoff erfolgt. Anscheinend kann der Ligand Atome von der an die Matrix gebundenen Verbindung und auch von der für die Kupplung verwendeten reaktiven Gruppe enthalten.

**[0035]** Am Prioritätsdatum waren die bevorzugten Liganden für die Trennung von Nukleinsäure die, die gebildet werden, wenn die an vicinale Dihalogenide, Halohydrin oder Epoxid gebundene Matrix mit t-Butylamin, 2-Amino-1,3-dihydroxypropan, Tris (hydroxymethyl)methylamin, Ethanolamin or n-Propylamin zur Reaktion gebracht wird.

**[0036]** Die bevorzugten Anionentauscher für die Trennung von Peptiden erfordern Elutions-Ionenstärken vor mehr als typischerweise  $\geq 125\%$ , in manchen Fällen  $\geq 140\%$ , sowie  $> 200\%$  der Elutions-Ionenstärken die in Übereinstimmung mit den obigen Angaben für einen quaternären Ionenaustauscher mit Q-Gruppen zur Desorption von wenigstens einem der im experimentellen Teil (**Fig. 3**) bezeichneten Proteine erforderlich sind.

**[0037]** Die Matrix M der Erfindung ist normalerweise ein wasserunlösliches hydrophiles Polymer, das auch

hydrophobe Polymere umfasst, die derart derivatisiert worden sind, dass sie hydrophil werden. Beispiele sind auf Polysacchariden basierende Polyhydroxy – Polymere, Agarose, Dextran, Zellulose, Stärke, Pullulan usw., und rein synthetische Polymere, wie Polyacrylamid, Polymethacrylamid, Poly(hydroxyalkyl-vinylether), Poly(hydroxyalkyl-acrylat) und entsprechende Polymethacrylate, Polyvinylalkohole, und auf Styrol und Divinylbenzol (DVB) basierende Polymere und Copolymere, in welche entsprechende Monomere integriert sind. Wasserlösliche Polymere können unlöslich derivatisiert werden, z.B. mittels Vernetzung oder Befestigung durch Adsorption oder kovalente Bindung an einem unlöslichen Körper. Hydrophile Gruppen können in hydrophobe Polymere (z.B. Styrol-DVB-Copolymer) durch Polymerisation zusammen mit Monomeren mit in OH verwandelbaren Gruppen, oder durch Hydrophilisierung des endgültigen Polymers, z.B. durch Adsorption von geeigneten Verbindungen, wie hydrophile Polymere, eingefügt werden. Die Matrix ist oft porös, um die Oberfläche, die mit einer umgebenden Flüssigkeit Kontakt herstellt, zu vergrößern. Polymerarme (Tentakel) können ebenfalls in die Matrix eingefügt werden, wobei jeder Arm einen oder mehrere Liganden aufweist, die über den Ligandenarm B laut Formel I gebunden sind.

**[0038]** Bevorzugte Matrizen beinhalten keine hydrolytisch instabilen Gruppen, wie Silan-, Esther- und Amidgruppen.

**[0039]** Die Konzentration an Liganden mit Formel I in den erfindungsgemäßen Ionenaustauschern und in den Ionenaustauschern, welche entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, liegt im Allgemeinen im Bereich von 0.001–4 mmol, vorzugsweise 0.01–1 mmol pro ml wassergesättigte Matrix. Mögliche bzw. bevorzugte Bereiche werden durch die Matrixstruktur festgelegt. Die Konzentration des Liganden für auf Agarose basierte Matrizen befindet sich allgemein im Bereich von 0.1–0.3 mmol pro ml geschwollene Matrix (Gel). Bei auf Dextran basierten Matrizen kann der Bereich ausgedehnt werden bis zu 0.5–0.6 mmol pro ml geschwollene Matrix (Gel). In Frage kommende Konzentrationen an Liganden werden wie im experimentellen Teil gezeigt bestimmt.

#### DIE NEUEN ERFINDUNGSGEMÄSSEN ANIONENAUSTAUSCHER

**[0040]** Diese sind entsprechend der Formel I wie in Anspruch 1 definiert, mit den zusätzlichen Bedingungen, dass im Falle eines oder mehrerer der ein oder mehrere Stickstoffatome enthaltenden R<sub>5</sub> – und R<sub>6</sub> – Gruppen, wenigstens eine der Gruppen auch ein oder mehrere Sauerstoffatome umfasst (-OR<sub>11</sub>, worin R<sub>11</sub> wie oben definiert ist). R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> können nicht gleichzeitig zwischen Methyl und Ethyl ausgewählt werden. Bevorzugte Formen des erfindungsgemäßen Ionenaustauschers weisen Elutions-Ionenstärken in Übereinstimmung mit obigen Angaben auf. Anionenaustauscher die durch die Kupplung von Triethanolamin über eine Epoxidreaktion hergestellt wurden, sind nicht in diesem Aspekt der Erfindung enthalten. Die Bedeutung von –, n, B, M, X, R<sub>1–4</sub>, R<sub>7–11</sub> und R'<sub>7–11</sub> ist dieselbe wie für Formel I. Die erfindungsgemäßen Anionenaustauscher sind in Anspruch 17 definiert.

#### VERFAHRENSSCHRITTE

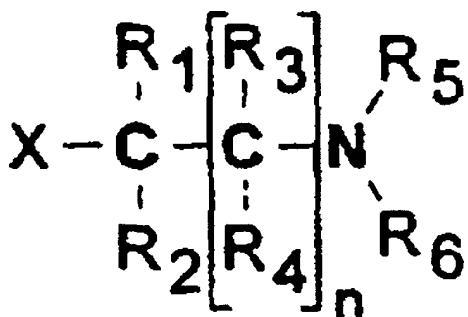
**[0041]** Die Adsorption im erfindungsgemäßen Verfahren wird in der obengenannten Art und Weise abgewickelt.

**[0042]** Indem man, nach der Adsorption, gegebenenfalls nach der Zwischenreinigung, die Ionenstärke in einem wässrigen Elutionsmittel erhöht und/oder ein denaturierendes Mittel hinzufügt und/oder indem der pH – Wert verändert wird, ist es auf bekannte Weise möglich, adsorbierte Substanzen selektiv zu desorbieren, z.B. Peptide und Nukleinsäure und die gewünschte Substanz in einer gereinigten Form im Eluat zu sammeln. Änderungen der Ionenstärke, das Zufügen der denaturierenden Mittel und Änderungen des pH – Werts können schrittweise (ein oder mehrere Schritte) oder in der Form eines kontinuierlichen Gradienten durchgeführt werden.

**[0043]** Die Desorption, besonders im Fall von Peptiden, kann bei höheren Ionenstärken abgewickelt werden als es zur Desorption derselben Substanz von einem quaternären Ionenaustauscher mit Q-Gruppen, wie oben angegeben erforderlich ist.

**[0044]** Typische Mittel, welche Wasserstoffbindungen aufbrechen (Denaturierungsmittel) sind Guanadin und Harnstoff. Informationen über Wasserstoffbindungen aufbrechende Mittel können in Levine et al., Biochemistry 2 (1963), 168-175 gefunden werden. In Abhängigkeit von der Stärke mit der die zu desorbierende Verbindung an den Liganden gebunden ist und je nach der Auswahl von Wasserstoffbindungen aufbrechenden Mitteln, kann die Konzentration von Wasserstoff aufbrechenden Mitteln von 0 M bis zu Löslichkeit für das jeweilige Mit-

tel variieren. Typische Konzentrationen von Wasserstoffbindungen aufbrechenden Mitteln befinden sich im Bereich von 0.1 M bis zu 5 M. Als Wasserstoffbindungen aufbrechendes Mittel durch Desorption, kann der Ligand der ionenaustauschenden Matrix auch potentiell in freier Form oder eine ähnliche Verbindung in Übereinstimmung mit folgender Formel zur Anwendung gelangen.



FORMEL II

worin R<sub>1-6</sub>, n und X dieselbe Bedeutung wie in Formel I aufweisen. Eine Änderung des pH – Werts kann zur Aufbrechung von Wasserstoffbindungen führen.

**[0045]** Der Gebrauch von Denaturierungs/Wasserstoffbindungen aufbrechenden Mitteln kann besonders zur Trennung von Nucleinsäure dienen, und kann einfach mit einem Salzgradienten (= Leitfähigkeitsgradienten) oder Änderungen des pH – Werts kombiniert werden.

**[0046]** Falls allgemein die Adsorption bedeutende Anteile an Wasserstoffbindungen umfaßt, kann die Desorption bei relativ niedrigen Ionenstärken durchgeführt werden, falls Wassserstoffbindungen aufbrechende Mittel (d.h. freie Liganden) in die Desorptionslösung einbezogen werden oder durch Erhöhung des pH, so dass der Ligand entfernt wird und die Wasserstoffbindungen beeinträchtigt werden.

**[0047]** Eine Salzdesorption (eventuell in Form eines Gradienten) kann für Peptid wie auch für Nucleinsäure zur Verwendung gelangen, was eine höhere Salzkonzentration (Ionenstärke) zur Folge hat. Die Erhöhung kann zwischen 0 M bis zur Löslichkeit des betreffenden Salzes variieren. Öfters liegt die Erhöhung im Bereich von 0.01 bis 4 M.

**[0048]** Der pH – Wert für die anfänglich verwendete wässrige Lösung und das Elutionsmittel können sich verändern. Für Peptide, die hauptsächlich durch eine Ionenwechselbeziehung an den Adsorbenten gebunden sind, werden die größten Unterschiede bezüglich der Eluierungs-Ionenstärken für unterschiedliche Proteine bei einem pH – Wert erreicht, bei dem die schwachen Ionen austauschenden Gruppen positiv aufgeladen sind, wobei das zu trennende Peptid negativ aufgeladen ist. Das bedeutet allgemein, dass zu hohe pH Werte ( $\geq 10$ ) und zu niedrige ph-Werte vermeidet werden sollen. Die Wechselbeziehung mit Wasserstoff bindendem Charakter bedeutet, dass die vorliegende Art von Anionenaustauscher auch schwach positiv geladene Proteine anbinden kann (siehe **Fig. 2a**).

**[0049]** Der pH – Wert des zur Desorption von adsorbiert Nukleinsäure/Peptid verwendeten Elutionsmittels wird vorzugsweise reguliert, so dass die Pufferkomponenten sich nicht an den Liganden des Anionenaustauschers anbinden können, d.h. sie sind positiv geladen. Geeignete Pufferkomponenten sind kationische Basen und Säuren, wie Amine und Zwitterionen. Pufferkomponente in verwendeten Elutionsmitteln liegen typischerweise innerhalb des Konzentrationsbereichs von 10 bis 50 mM.

**[0050]** Bei dem obigen erfindungsgemäßen Verfahren werden die Anionenaustauscher entsprechend den obigen Angaben unter der Bedingung benutzt, dass die obige Chromatofokussierung und die Trennung mit Hilfe der ECTEOLA-Zellulose nicht mit eingeschlossen sind.

**[0051]** Die Erfindung kann bei der konventionellen Chromatographie bei einem Festbett und einem Fliessbett in einer Säule, bzw. bei diskontinuierlichen Adsorptionsverfahren verwendet werden. Die Matrizen können in Form von Partikeln (Perlen), monolithisch oder oberflächenartig (z.B. in Sensoren) vorliegen.

## FIGUREN

## I. Resultate der Protein-Chromatographie

**[0052]** **Fig. 1:** Chromatographie zum Vergleich von Agarose-Gel mit oben bezeichneten Tris-Liganden laut folgender Formel I =  $(HOCH_2)_3CH_2NCH_2CHOH-$ , Ligandenarm  $-CH_2OCH_2CHOHCH_2-$ ) und mit einem Q-Liganden (Ligand =  $(CH_3)_3N+CH_2CHOH-$ , Ligandenarm  $-CH_2OCH_2CHOHCH_2-$ ). Das Chromatogramm (unterbrochene Linie) bezieht sich auf den Q-Liganden (Q-Sepharose® HP, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Das Chromatogramm (kontinuierliche Linie) bezieht sich auf den Tris-Liganden.

**[0053]** **Fig. 2A und 2B:** pH-Wert- Abhängigkeit der Elutions-Ionenstärke für Proteine bei den obengenannten Agarose – Gels mit Tris-Ligand (2A) bzw. Q-Ligand (2B).

**[0054]** **Fig. 3:** Elutions-Ionenstärke – Vergleich zwischen verschiedenen Anionenaustauscher-Liganden:

- A-C. Q-Ligand 0.03, 0.11 bzw. 0.17 mmol/ml;
- D. Ammonium 0.10 mmol/g;
- E. Bis – aminopropylamin 0.31 mmol/g;
- F. Propylamin 0.13 mmol/g;
- G. t-Butylamin 0.15 mmol/g;
- H. Ethanolamin 0.14 mmol/g;
- I. Diethanolamin 0.15 mmol/g;
- J. Triethanolamin 0.06 mmol/g;
- K. 2-Amino-1,3-propandiol 0.14 mmol/g;
- L. 3-Amino-1,2-propandiol 0.14 mmol/g;
- M. 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol 0.15 mmol/g;
- N. Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0.12 mmol/g
- O. Bistrispropan 0.11 mmol/g);
- P. Aminosorbitol 0.1 1 mmol/g;
- Q. Methylmorpholin 0.12 mmol/g;
- R. Morpholin 0.28 mmol/g

## II. Resultate der Chromatographie von Nukleinsäure.

**[0055]** **Fig. 4:** Experiment 1. Elution bei pH 7 mit Salz und nachfolgend Harnstoff.

**[0056]** **Fig. 5:** Experiment 2. Elution bei pH 7 mit Harnstoff und nachfolgend Salz.

**[0057]** **Fig. 6:** Experiment 3. Elution bei pH 7 mit Salzgradient.

**[0058]** **Fig. 7:** Experiment 4. Elution bei pH 9 mit Salz, pH – Wert für geladene Probe 8.2.

**[0059]** **Fig. 8A:** Experiment 5. pH für geladenes Muster 6.8. Elution mit Salz und nachfolgend Salz plus Harnstoff.

**[0060]** **Fig. 8B:** Experiment 6. pH für geladene Probe 9.0. Elution mit Salz.

## EXPERIMENTELLER TEIL

## 1. SYNTHESE DES IONENAUSTAUSCHERS.

## A. Standardmethode (erfindungsgemäßer Ionenaustauscher).

**[0061]** Vernetzte Agarose (30 $\mu$  Partikel), vorbereitet durch Reaktion zwischen Epichlorohydrin und Agarose in Anwesenheit von NaOH nach Porath et al (J. Chromatog. 60 (1971) 167-77 und U.S. 3,959,251), wurde mit Allylglycidylether mit NaOH als Base in einer Allyl-Konzentration ( $CH_2=CHCH_2OCH_2CHOHCH_2-$ ) von 0.18-0.22 mmol/ml) zur Reaktion gebracht. 40 g der vernetzten, allylierten mit Wasser gewaschenen Agarose wurden zu 160 ml destilliertem Wasser und 9.2 g Natriumsulphat in einem 400 ml Becher, der mit einem suspendierten magnetischen Rührer ausgerüstet war, mit nachfolgender Zugabe von Bromwasser zur restlichen gelblichen Einfärbung hinzugefügt. Die Reduktion des überschüssigen Broms wurde mit Natriumformiat durchgeführt,

und nachfolgend wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen (> 5 Bett Volumen) und während 15–30 Minuten trocken gesaugt. Nachfolgend wurde das bromierte Gel zu 60 ml destilliertem Wasser und 60 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= Tris, ergibt den Liganden  $(HOCH_2)_3CH_2NCH_2CHOH$ - (Laut Formel I wird dieser Ligand als Tris-Ligand bezeichnet und der Ionenaustauscher wird als Tris-Ionenaustauscher bezeichnet) in einen dreihalsigen 100 ml Bellco-Becher mit suspendierten magnetischem Stab gegeben. Anfänglich betrug der pH-Wert 10.9. Die Reaktion wurde über Nacht bei 40° C fortgesetzt (23 Stunden). Nach Abschluss der Reaktionszeit war der pH – Wert 10.0. Nachfolgend wurde das Gel gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen (>10 Bettvolumen) und die mögliche Aufbewahrung in destilliertem Wasser vorgenommen, das 23% (Gewichtsprozent) Ethanol enthielt.

**[0062]** Die direkt an der substituierten Matrix mit einer NaOH-Lösung durchgeführte Wendepunkt-Titrierung ergab eine Ligandenkonzentration von 0.13 mmol/g trockengesaugtes Gel.

**[0063]** Ausgehend von der vernetzten Allylhydroxypropyl-Agarose, wurden wie oben angegeben Ammoniak (0.10 mmol/ml) Bisaminopropylamin (0.31 mmol/ml), Propylamin (0.13 mmol/ml), t-Butylamin (0.15 mmol/ml), Ethanolamin (0.14 mmol/ml), Diethanolamin (0.15 mmol/ml), Triethanolamin (0.06 mmol/ml), 2-Amino-1,3-propanediol (0.14 mmol/ml), 3-Amino-1,2-propandiol (0.14 mmol/ml), 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (0.15 mmol/ml), Bis-tris-propan (0.11 mmol/ml); Aminosorbitol (0.11 mmol/ml) und Methylmorpholin (0.12 mmol/ml) in analoger Weise gekuppelt. Die Ionenaustauschkapazität für jeden vollständigen Ionenaustauscher ist in Klammern angegeben.

B. Quaternäre Ionenaustauscher (Q-Ionenaustauscher; vergleichbare Ionenaustauscher).

**[0064]** Diese wurden aus vernetzter Agarose, die nach obigen Angaben hergestellt worden war, substituiert mit Alkylgruppen in einem Mengenverhältniss, welches einer vorbestimmten Ionenaustauschkapazität entspricht, hergestellt. Die allylierte Agarose wurde mit Brom behandelt und mit Trimethylamin zur Reaktion gebracht. Es wurden Ionenaustauscher mit drei Kapazitäten hergestellt (0.03 mmol/l, 0.11 mmol/l und 0.17 mmol/l).

#### Bestimmung der Ligandenkonzentration

**[0065]** Es wurde eine Wendepunkttitration unter Gleichgewichtsbedingungen direkt am Ionenaustauscher im pH – Wert – Bereich von 2 bis 11 für schwache Ionenaustauscher durchgeführt. Starke Ionenaustauscher wurden mit  $Cl^-$  gesättigt und der Überschuss wurde mit destilliertem Wasser entfernt und nachfolgend wurden die adsorbierten Choridionen mit einer  $AcO^-$  Lösung eluiert und durch  $AgNO_3$  – Titration des Eluats bestimmt.

## 2. CHROMATOGRAPHIE (PROTEINE)

### A. Chromatographie zum Vergleich des obigen Agarose-Gels mit Tris- und Q-Ligand.

**[0066]** Q-Sepharose® HP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) mit einer Kapazität von  $0.17 \pm 0.3$  mmol/ml und derselben Kupplungschemie und Matrix wie im Experiment 1B.

**[0067]** Das obige Gel wurde in eine HR 5/5 (Pharmacia Biotech AB) Säule bis zur Gelhöhe von 5–6 cm und mit einem Packungsdruck von etwa 5 bar eingebracht.

Probe: Transferrin 1 mg/ml, Ovalbumin 2 mg/ml, Lactoglobulin 2 mg/ml, Probenschleifenvolumen 50  $\mu$ l  
Puffer A: Piperazin 20 mM, pH 6.0

Puffer B: Piperazin 20 mM, NaCl 1.0 M, pH 6.0

Fluss: 0.2 ml/min

Gradientenvolumen: 40ml

UV-Detektor: 280 nm 0.05 AU

**[0068]** Leitfähigkeitsmesser Maximum = 100 mS/cm Resultat: Der Tris-Ionenaustauscher ergab eine bedeutend höhere Dynamik im Vergleich zum quaternären Ionenaustauscher. Siehe **Fig. 1**.

B. pH- Wert – Abhängigkeit der Elutions-Ionenstärke für Proteine bei den obengenannten Agarose Gels mit Tris-Ligand bzw. Q-Ligand.

**[0069]** Säule und Gel wie 2 A. Fluss 1 ml/min. Gradient: 20 ml bis 0.5 M NaCl (40 ml bis 1.0 M NaCl wo es

angebracht war). Die Proben sind in den **Fig. 2A** und **2B** dargestellt.

**[0070]** Puffer bei entsprechendem pH – Wert.

pH 4 Hepes 20 mM-HCl  
 pH 4.6 Piperazin 20 mM-HCl  
 pH 5 Piperazin 2.0 mM-HCl  
 pH 5.5 Piperazin 20 mM-HCl  
 pH 6 Piperazin 20 mM-HCl  
 pH 7 Bes20 mM  
 pH 7.5 Hepes 20 mM-NaOH  
 pH 8.0 Hepes 20 mM-NaOH  
 pH 8.2 Tris 20 mM-HCl  
 pH 9 Taurin 20 mM-NaOH

#### Resultat

**[0071]** Siehe **Fig. 2A** und **2B**, in welchen die maximale Leitfähigkeit in Bezug auf den pH – Wert dargestellt ist. Die **Fig. 2A** zeigt die Eluierungs-Ionenstärke für die verschiedenen Proteine beim quaternären Ionenaustauscher und **Fig. 2B** beim Tris-Ionenaustauscher. Es ist offensichtlich, daß die Eluierungs-Ionenstärke für den Tris-Ionenaustauscher im pH Bereich von 6 +/- beträchtlich höher als für den quaternären Ionenaustauscher liegt. Außerdem ist der Unterschied zwischen der Eluierungs-Ionenstärke für das an das Gel am stärksten bindende Protein und das am schwächsten an das Gel bindende beträchtlich größer beim Tris-Ionenaustauscher als beim quaternären Ionenaustauscher (pH bis zu etwa 7.5). Das deutet auf die Möglichkeit hin, die Trennungsdynamik zu erhöhen (erweiterter Ionenstärke – Bereich) bei Verwendung von schwachen erfindungsgemäßen Ionenaustauschern.

C. Vergleich zwischen verschiedenen anionenaustauschenden Liganden, gebunden an vernetztes Agarose Gel, entsprechend den obigen Angaben.

**[0072]** Säule wie 2 A. Gel wie 1 A.

Probe: Transferrin 1 mg/ml, Ovalbumin (1 mg/ml), Lactoglobulin (1 mg/ml).

Puffer A: Piperazin 20 mM, pH 6.0

Puffer B: Piperazin 20 mM, NaCl 1.0 M, oder 0.5 M, pH 6.0

Gradientenvolumen: 40 ml (bis 1 M) und bzw 20 ml (bis 0.5 M)

**[0073]** Die anderen Parameter sind gleich den oben angegeben.

#### Resultat

**[0074]** Die **Fig. 3** gibt die Eluierungs – Ionenstärke in mS/cm bei dem pH – Wert 6.0 für Ionenaustauscher an, die für die untersuchten Modellproteine vorbereitet worden sind. Es kann festgestellt werden, dass Ionenaustauscher, die eine primäre- bzw. sekundäre Aminogruppe aufweisen, bei einem zwei Kohlenstoffatomen entsprechenden Abstand von einer Wasserstoff bindenden Gruppe, sich von einem quaternären Liganden durch die Fähigkeit unterscheiden, die untersuchten Modellproteine mittels Anionenaustausch-Chromatographie voneinander zu trennen.

### 3. CHROMATOGRAPHIE (NUCLEINSÄURE)

#### MATERIAL

#### Liganden

**[0075]** Die Experimente wurden mit denselben Liganden wie für die Proteine durchgeführt. Es sind nur die Resultate für die Tris-Ionenaustauscher dargestellt.

#### Säulen

**[0076]** HR 5/5 Säule die in ein Bettvolumen von ca. 1 ml eingebracht ist.

## Puffer

- A. 20 mM Natriumphosphat, pH 7.0.
- B. 2M NaCl in Puffer A, pH 7.0.
- C. 2 M NaCl & 4 M Harnstoff in Puffer A, pH 7.0.
- D. 4 M Harnstoff in Puffer A, pH 7.0.
- E. 20 mM Gly/NaOH, pH 9.0.
- F. 2 M NaCl in Puffer E, pH 9.0.

## Probe

**[0077]** Synthetisches Phosphorthioat 25-mer Oligonucleotid (mol- Gewicht 7 500 Dalton) mit entfernter Schutzgruppe (Trityl). Die Konzentration war 1.08 mmol/ml (8.1 mg/ml) und die Leitfähigkeit etwa 2 mS/cm. Nach der Synthese und der Abspaltung von Tritylschutzgruppen, wurde die Probe im Rotationsverdampfer eingedampft (um Ammonium zu entfernen) und wieder in entionisiertem Wasser aufgelöst. Der pH – Wert in der Lösung wurde typischerweise auf 8.2 eingestellt, bevor die Probe in die Säule eingefüllt wurde (HR 5/5 Bettvolumen 1 ml).

## TESTPROTOKOLLE MIT RESULTATEN

**[0078]** Die Probe (2 ml mit 16 mg synthetischem Oligonukleotid, insgesamt  $A_{260} = 440$ ) wurde in die Säule eingebracht (HR 5/5,  $V_t=1$  ml), die mit dem Puffer A oder E voräquilibriert worden war, mit nachfolgender Waschung der nicht gebundenen Komponenten mit Puffer A oder E. Die Elution wurde mit Puffer B und Puffer C (für Durchläufe bei pH 7.0) oder mit Puffer F (für Durchläufe bei pH 9.0) (Elutionsrate 153 cm/St, Temperatur 21 ° C) durchgeführt. Das Eluat wurde als Fraktion A, B, C usw. gewonnen. Die Adsorption bei 260 nm wurde für jede Fraktion gemessen. Die Prozentsatzverteilung in Beziehung zu der Gesamtabsorption der Säule wurde für jede Fraktion errechnet. Die anfallenden Fraktionen wurden durch Sephadex® G-25 entsalzt und mit entionisiertem Wasser äquilibriert. Dann wurde für jede Fraktion ein geeignetes Volumen durch Kapillar-Elektrophorese analysiert, um die Reinheit festzustellen.

## Experiment 1. Elution bei pH 7:

**[0079]** Eluierungsverlauf wie in **Fig. 4**. Die Probe wurde in eine mit Puffer A äquilierte Säule eingebracht. Nach der Eluierung des ungebundenen Materials (Fraktion A.) mit dem Äquilibrierungspuffer wurde gebundenes Material mit Puffer B (Fraktion B) gefolgt von Puffer C (Fraktion C) eluiert. Basierend auf den Adsorptionsmessungen bei  $A_{260}$ , war die Verteilung von Oligonucleotiden wie folgt: Fraktion A 6%, Fraktion B 32% und Fraktion C 62%. Die Kapillar-Zonelektrophorese von Fraktionen B und C zeigte, daß Fraktion B fast ausschließlich niedermolekulare Verunreinigungen enthielt, während Fraktion C 25-mer mit einer Reinheit von mindestens 90% enthielt. Die Tatsache, dass diese Fraktion mit einem 2 M NaCl und 4 M Harnstoff enthaltenen Puffer eluiert wurde, zeigt, dass Ionen- bzw. Wasserstoffbindungen an der Bindung von Oligonucleotiden an den schwachen Anionenaustauscher bei pH 7 beteiligt sind.

**[0080]** Das Experiment wurde mit der doppelten Probenmenge wiederholt (32 mg 25-mer). Die Resultate waren allgemein dieselben wie bereits angegeben und zeigen, dass der Anionenaustauscher eine hohe Adsorptionsfähigkeit für diese Arten von Oligonucleotiden aufweist. Das Gegenstück von Fraktion C zeigte sogar einen höheren Reinheitsgrad, der auf eine Verschiebung von Probe zu Probe mit verbessertem Reinigungsgrad für die am festesten gebundene Komponente (in diesem Fall 25-mer) hinweist.

## Experiment 2. Wirkung von Harnstoff , Elution pH 7.

**[0081]** Das Eluierungsmuster ist aus Tabelle 5 ersichtlich. In diesem Experiment wurde das Experiment 1 wiederholt, mit der Ausnahme, daß, nachdem mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen worden war, die Säule zuerst mit dem Puffer D (4 M Harnstoff) und dann mit dem Puffer C eluiert wurde. Die **Fig. 4** zeigt, dass kleine Mengen von nicht gebundenem Material mit dem Äquilibrierungspuffer (Fraktion A) gewaschen wurden, dass nicht gebundene Komponenten nur mit dem Puffer D eluiert wurden, aber dass die quantitative Eluierung durch den Puffer C (Fraktion B) erreicht wurde. Die Resultate bestätigen, daß die Bindungsfähigkeit an den schwachen Anionenaustauscher über eine Interaktion der Ionen- und Wasserstoffbindung bewirkt wird. Die Prozentsatzverteilung zwischen den Fraktionen war wie folgt – Fraktion A 6% und Fraktion B 93%. Die Analyse durch Kapillar-Elektrophorese deutete an, dass Fraktion B 78% reines 25-mer mit einigen kleinen niedermolekularen Peaks war. Es wird deutlich, dass eine intermediäre Waschung der Säule mit 2 M NaCl (Puffer B, siehe Expe-

riment 1) eine Elution der Mehrheit der niedermolekularen Komponenten und einen hohen Reinheitsgrad von 25-mer in Fraktion C ergibt.

#### Experiment 3. Gradient- Elution bei pH 7.

**[0082]** Das Eluierungsmuster ist aus der **Fig. 6** ersichtlich. In diesem Experiment, wurde das Experiment 1 wiederholt, mit der Ausnahme, daß, nachdem mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen worden war, die Säule mit einem linearen Gradienten von Puffer A zum Puffer C (wobei die Konzentration von NaCl & Harnstoff gleichzeitig und linear erhöht wurde) oder von Puffer D zu Puffer C eluiert wurde. In letzterem Fall wurde die Säule zuerst mit Puffer D gewaschen, um sie mit dem den 4 M Harnstoff enthaltenden Puffer zu äquilibrieren. In beiden Experimenten trat die Eluierung des gebundenen Materials als ausgedehnter Peak mit einigen Schultern, besonders im Vorderteil auf. Dieser Peak wurde in der Form von zwei Fraktionen (es waren die Fraktion B und Fraktion C, wobei die Fraktion A nach der Waschung mit dem Äquilibrierungspuffer folgte ) erhalten. Die Analyse durch Elektrophorese im Kapillarbereich, zeigte, dass der Vorderteil (Fraktion B ) die Mehrheit der niedermolekularen Verunreinigungen mit einer Reinheit von ca. 40% für 25-mer enthielt. Der letztere Teil der Elutionskurve (Fraktion C) enthielt fast ausschließlich 25-mer – Oligonucleotide, mit einer Reinheit von ca. 94%.

#### Experiment 4. Elution bei pH 9.

**[0083]** Das Experiment 1 wurde wiederholt, mit der Ausnahme, dass die Adsorption und Elution der Mischung von Oligonucleotiden bei einem pH – Wert von 9, unter Verwendung von Puffer E und F durchgeführt wurde. Der pH – Wert der Probe wurde auf pH 8.2 eingestellt und 2 ml (16.2 g Oligonucleotid) der Säule zugegeben, die mit dem Puffer E äquilibriert worden war. Nach der Elution der ungebundenen Fraktion (A) mit Puffer E, wurde die gebundene Komponente (Fraktion B) mit dem Puffer F eluiert. Auf Grundlage von  $A_{260}$  für die Fraktionen A und B, wurde die Prozentsatzverteilung von 47% in Fraktion A und 49% in der Fraktion B errechnet. Das Eluierungsmuster ist in **Fig. 7** ersichtlich. Die erhaltenen Resultate sind wie folgt:

1. Im Gegensatz zu den Elutions-Resultaten bei einem pH – Wert von 7, wurden die gebundenen Komponenten vollkommen mit 2 M NaCl (Puffer F) eluiert. Bei diesem pH waren die Oligonucleotide scheinbar ausschließlich vermittels Ion-Interaktion ohne irgendwelche Wasserstoffbindungen gebunden.
2. Die Analyse durch die Kapillar-Elektrophorese zeigte, dass die ungebundenen Komponenten (Fraktion A) Verunreinigungen enthielten und dass die Fraktion B einen Reinheitsgrad von mindestens 60% aufwies. Der Reinheitsgrad von Fraktion B wurde auf ca. 90% erhöht , während die Elution mit einem linearen Gradienten von Puffer E zu Puffer F durchgeführt wurde.

#### Experimente 5 und 6. (Bedeutung des pH der Probe).

**[0084]** Es wurde festgestellt, dass die Trennung der Oligonucleotide bei pH 9 nicht reproduzierbar war. Das war prinzipiell die Folge eines pH – Unterschieds der in die Säule eingebrachten Probe, was aus dem Elutionsmodell in **Fig. 8A** und **8B** ersichtlich ist. Die Experimente sind identisch mit dem obigen Experiment 4.

**[0085]** Die **Fig. 8A** zeigt ein erhaltenes Elutionsmuster bei einem pH – Wert von 6.8 der verwendeten Probe. Ungefähr 75% der gebundenen Komponente wurden durch den Puffer F eluiert, aber ein kleinerer Anteil (Fraktion C, 10% des verwendeten  $A_{260}$ ) ist scheinbar so fest gebunden, dass der Puffer F zur Elution benötigt wird. Das Resultat ist ähnlich dem im Experiment 1 erhaltenen Resultat und zeigt an, dass die verwendeten Oligonucleotide an den Anionenaustauscher durch Ionen- und Wasserstoffbindungskräfte gebunden sind. Das kann auf die große Dichte der bei den Oligonucleotiden eingebrachten Gruppen zurückzuführen sein, welche ihnen eine intensive Pufferkapazität gibt. Das Resultat könnte sein, dass der pH – Wert des Anionenaustauschers effektiv unter dem Gleichgewichts-pH liegt, wenn die Nucleotidlösung (reguliert auf pH 6.8) den Anionenaustauscher durchläuft. Diese Hypothese ist wahrscheinlich, da Tris(hydroxymethyl)aminomethan schwach bei pH 9 getrennt wird. Unsere Resultate unterstützen diese Hypothese, da der pH-Wert in der ungebundenen Fraktion (Fraktion) 8.9 war, während der pH-Wert für die gebundene Fraktion (B) 8.2 war, obwohl der pH-Wert im Elutionspuffer während des Experiments 9.0 war.

**[0086]** **Fig. 8B** zeigt das erhaltene Elutionsmuster, wobei der pH-Wert der geladenen Probe 9.0 war. In diesem Fall war die Mehrheit der geladenen Proben ungebunden (88%), und ca. 10% sind mit Puffer F eluiert worden. Dies ist offenbar im Gegensatz zu den in der **Fig. 8A** angedeuteten Resultaten und zeigt, dass Oligonucleotide nur über Ionenkräfte an den Anionenaustauscher gebunden sind. Die Bindungsfähigkeit des Anionenaustauschers ist bedeutend niedriger, da Tris(hydroxymethyl)aminomethan bei diesem pH-Wert nur

schwach ionisiert ist.

**[0087]** Die in Experiment 5 erreichten Resultate zeigen, dass die Trennung von Oligonucleotiden am verwendeten Tris-Ionenaustrauscher vom pH – Wert der Probe, so wie auch vom pH – Wert des Anionenaustauschers beeinflusst wird. Der pH-Wert kann zwischen 7 und 9 zur Optimierung der Reinigung eines Rohproduktes, welches eine Mischung von synthetisch hergestellten Oligonucleotiden enthält, eingestellt werden.

#### Experiment 7. Elution mit linearem pH-Gradienten.

**[0088]** Experiment 1 wurde wiederholt, mit der Ausnahme, dass nach der Elution der ungebundenen Fraktion A, an die Matrix gebundene Oligonucleotide mit einem linearen Gradienten (10 Bettvolumen) eines Puffers A (pH 7.0) zum Puffer F (pH 9.0) eluiert wurden. Das Resultat zeigte, dass gebundene Oligonucleotide von der Matrix zu eluieren begannen, während der pH-Wert des Ausflusses ca. 8.5 war. Der eluierte Peak war breit und die Reinheit des stark gebundenen Komponenten war vergleichbar mit dem in dem obigen Experiment 3 erreichten Grad. Das Resultat zeigt, dass das synthetische Oligonucleotid (25-mer) durch eine Kombination von Ionen- und Wasserstoffbindungen bis zum pH – Wert von 8.5 und durch Ionen-Interaktionen nur mit höheren pH-Werten an die Matrix gebunden ist.

#### Experiment B. Verdrängungselution mit Tris-HCl Puffer.

**[0089]** Der Zweck dieses Experiments war, herauszufinden, ob eine hohe Konzentration des Tris-HCl Puffers (1 M, pH 7.0) an die Matrix gebundene Oligonucleotide verdrängen könnte. Die Säule wurde mit 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.0 (Puffer 1) äquilibriert, und 2 ml der Probe wurden auf die äquilierte Säule gegeben (Vergleich: Experiment 1 wie oben angegeben). Nach Eluierung der ungebundenen Fraktion (A) durch den Äquilibrierungspuffer, wurde die Säule mit den folgenden Puffern wie folgt gewaschen:

Puffer II: 3 M NaCl im Äquilibrierungspuffer (Puffer I)

Puffer III: 1 M Tris-HCl Puffer, pH 7.0, und

Puffer IV: 2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7.0.

**[0090]** Das Resultat zeigte, dass vom geladenen Material:

1. 12.5% nicht an die Säule angebunden wurden
2. 43% durch Puffer II eluiert wurden
3. % durch Puffer III eluiert wurden
4. 11 % durch Puffer IV eluiert wurden.

**[0091]** Es ist daher klar, dass die Mehrheit der fest gebundenen Oligonucleotide (ca. 34%) mit 1 M Tris-HCl Puffer, pH 7.0 eluiert wird. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass die Kombination von Tris(hydroxymethyl)methylamin und dem Gegenion  $\text{Cl}^-$  Wasserstoff- bzw. Ion-Bindungen zwischen dem Liganden und gebundenen Oligonucleotiden schwächt. Diese Erklärung ist in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus für die Adsorption von Oligonucleotiden im Tris-Liganden und seinen Analogen. Das Resultat zeigt auch, dass eine höhere Ionenstärke (siehe Puffer IV) für die Eluierung der am stärksten gebundenen Fraktion nötig ist. Das unterstützt weiterhin unsere Hypothese, dass eine Bindung bei einem pH – Wert von 7.0 von synthetischen Oligonucleotiden an eine Matrix mit Tris-Liganden auf die Ionen-Interaktion mit einer beträchtlichen Verbesserung durch die Wasserstoffbindung zurückzuführen ist.

#### Experiment 9. Trennung von synthetischen "Trityl- ON" – von synthetischen "Trityl- OFF" – Oligonucleotiden.

**[0092]** Dieses Experiment wurde bei einem pH – Wert von 9.0 durchgeführt und folgte den in obigem Experiment 4 angegeben Verfahrensschritten. Die Rohprobe enthielt eine Mischung von synthetischen "Trityl-on" – und synthetischen "Trityl-off" – Nucleotiden. Ungefähr 16 mg der Probe in 1 ml entionisiertem Wasser wurden auf die Säule geladen, und das Experiment wurde wie Experiment 4 durchgeführt. Die Eluierung mit Puffer E (2 M NaCl in 20 mM Gly/NaOH Puffer, pH 9.0) ergab zwei gut getrennte Fraktionen (B und C). Die Prozentsatzverteilung des bei 260 nm ( $A_{260}$ ) adsorbierenden Materials in den vereinigten Fraktionen war wie folgt: Fraktion A = 14 %, Fraktion B = 45 %, und Fraktion C = 44 %. Die Analyse durch eine Kapillar-Zonenelektrophorese gab an, dass die Fraktion A ausschließlich niedermolekulare Verunreinigungen enthielt, während die Fraktion B prinzipiell die "Trityl-off" – Variante der synthetischen Nucleotide, mit einem Reinheitsgrad von 80 % enthielt und die am meisten zurückgebliebene Fraktion C einen Reinheitsgrad von mindestens 80% aufwies und die "Trityl-on" – Variante der 25-mer Oligonucleotide enthielt.

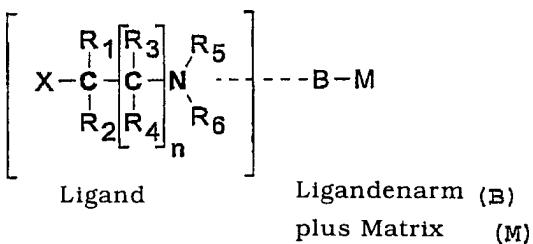
**[0093]** Dieses Resultat, im Zusammenhang mit den früher beschriebenen Ergebnissen, veranschaulicht das große Potential der Erfindung als chromatographisches Verfahren für die einfache Reinigung von synthetischen Oligonucleotiden mit hoher Ausbeute und Reinheitsgrad. Durch die Auswahl optimaler Bedingungen während des Adsorptionsverfahrens, kann die Kapazität für das Nucleotid 5 der verwendeten Matrix größer als der 20 mg/ml – Adsorbent sein.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Abtrennen eines Peptids oder einer Nucleinsäure, umfassend das Kontaktieren einer wässrigen Lösung, enthaltend das Peptid oder die Nucleinsäure, mit einem Anionenaustauscher (I) unter solchen Bedingungen, dass der Anionenaustauscher (I) Substanzen in der Lösung bindet, sodass das erwünschte Peptid oder die Nucleinsäure von mindestens einer Substanz in der Lösung losgelöst wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass

- a. der Anionenaustauscher (I) Liganden zeigt, welche
  - i. eine primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe enthalten, und
  - ii. kovalent, möglicherweise über ein organische Brücke, an ein organisches Polymer (Matrix) gebunden sind,
  - b. an einem Kohlenstoffatom in einem Abstand von 2 oder 3 Atomen weg von einem Aminstickstoff eine Hydroxylgruppe oder eine primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe vorliegt, und
  - c. die maximale Elutions-Ionenstärke in dem pH-Bereich 2–14 für mindestens eines der Proteine Transferrin, Ovalbumin 1, Ovalbumin 2,  $\beta$ -Lactoglobulin 1 und  $\beta$ -Lactoglobulin 2 auf dem Anionenaustauscher (I) höher ist, vorzugsweise mindestens 125% höher ist als die Elutions-Ionenstärke, welche erforderlich ist auf einem quaternären Anionenaustauscher (II) mit Q-Gruppe  $((\text{CH}_3)_3\text{N}^+)$ ; gleiche Matrix, gleiche Kupplungsgruppe von dem quaternären Stickstoff und in Richtung der Matrix, gleicher Level an Ligand wie für den Anionenaustauscher (I), und die Elutions-Ionenstärke für die Anionenaustauscher I und II bei gleichem pH gemessen, mit der Maßgabe, dass Chromatofokusierung und Abtrennung auf ECTEOLA-Cellulose nicht eingeschlossen sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Anionenaustauscher die Struktur besitzt



FORMEL 1

worin

- a. – bedeutet, dass der Ligandenarm B eine Gruppe  $\text{R}_{1-6}$  oder einen Wasserstoff in irgendeiner der Gruppen  $\text{R}_{1-6}$  in dem Liganden ersetzt,
- b. M eine Polymermatrix ist, welche weitere anionenaustauschende Liganden enthält,
- c. B eine organische Struktur ist, der es an hydrolytisch instabilen Strukturen mangelt, wie Silan, Carbonsäureester (-COO-) oder Carbonsäureamid (-CONH-), und welche Kohlenwasserstoffketten enthält, gewählt unter den gleichen Kohlenwasserstoffketten wie  $\text{R}_{1-6}$ ,
- d. n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist, typischerweise 1,
- e.  $\text{R}_{1-6}$  gewählt sind unter Wasserstoff oder linearer, verzweigter oder cyclischer, gesättigter oder ungesättigter Kohlenwasserstoffgruppe, die einwertig oder zweiwertig sein kann, mit einer Kohlenstoffkette, die wahlweise unterbrochen ist durch ein oder mehrere Aminstickstoff- oder Ethersauerstoffatome (-NR<sub>7</sub>- respektive -O-) und/oder bei der ein oder mehrere Wasserstoffe durch eine Aminogruppe (-N<sup>+</sup>R<sub>8</sub>R<sub>9</sub>R<sub>10</sub>) oder durch eine Gruppe -OR<sub>11</sub> ersetzt sind, mit der Maßgabe, dass
- A. wenn  $\text{R}_{1-6}$  eine zweiwertige Gruppe ist, diese dann zwei Gruppen  $\text{R}_{1-6}$  umfasst, welche zusammen mit mindestens einem der in der Formel I in Fettbuchstaben geschriebenen Atome einen 5- oder 6-gliedrigen Ring bilden, und
- B beide R5 und R6 nicht unter Methyl und Ethyl gewählt werden können
- f. R<sub>7-11</sub> unter den gleichen Gruppen gewählt sind wie R<sub>1-6</sub>, vorzugsweise niederes unsubstituiertes Alkyl (C1–6) und Wasserstoff,
- g. X -OH oder -NR<sub>12</sub>R<sub>13</sub> ist, wobei R<sub>12-13</sub> unter den gleichen Gruppen wie R<sub>1-6</sub> gewählt sind,

h. Anionenaustauscher, die durch Kupplung von Triethanolamin an Cellulose über Epoxid hergestellt worden sind, nicht eingeschlossen sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass B R<sub>1</sub> oder R<sub>2</sub> ersetzt.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–3, dadurch gekennzeichnet, dass B eine lineare, verzweigte oder cyclische gesättigte Kohlenwasserstoffkette ist, wahlweise unterbrochen durch Ethersauerstoffatome, und welche wahlweise ein oder mehrere Wasserstoffe durch Hydroxyl ersetzt hat.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–4, dadurch gekennzeichnet, dass B -CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>- ist.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–5, dadurch gekennzeichnet, dass n 1 ist und R<sub>1–4</sub> Wasserstoff sind.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–6, dadurch gekennzeichnet, dass RS und/oder R6 Wasserstoff ist.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–7, dadurch gekennzeichnet, dass X eine Hydroxylgruppe ist.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines von R<sub>5–6</sub> eine Gruppe -N<sup>+</sup>R<sub>8</sub>R<sub>9</sub>R<sub>10</sub> oder -OR<sub>11</sub> enthält, in einem Abstand von zwei Kohlenstoffatomen entfernt von dem Stickstoffatom, an welches R<sub>5–6</sub> binden, worin R<sub>8–11</sub> unter den gleichen Gruppen gewählt sind, wie R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub>, vorzugsweise Wasserstoff oder Niederalkyl (1–6 Kohlenstoffatome).

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–9, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand gewählt ist aus:

- CHOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CHOHCH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>; -CHOHCH<sub>2</sub>N[CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>,NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>;
- CHOCH<sub>2</sub>NH [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]; - CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CHOHCH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>;
- CHOCH<sub>2</sub>NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>; -CHOHCH<sub>2</sub>NHCH (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>;
- CHOCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH; -CHOHCH<sub>2</sub>NHC(CH)<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>;
- CHOCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub> (CHOH)<sub>4</sub> CH<sub>2</sub>OH;
- CHOCH<sub>2</sub>N[C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid abgetrennt wird, und dass der Anionenaustauscher Liganden zeigt, gewählt aus:

- CHOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NH (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; -CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH ;
- CHOHCH<sub>2</sub>NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH;
- CHOCH<sub>2</sub>NHC(CH<sub>3</sub>) (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>;
- CHOCH<sub>2</sub>N [C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>] (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1–11, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid abgetrennt wird durch Adsorption an den Anionenaustauscher, und dass adsorbiertes Peptid eluiert wird durch

- a. ein Mittel, das Wasserstoffbindungen aufbricht, beispielsweise Harnstoff oder Guanidin und/oder
- b. Salz und/oder
- c. Änderung des pH.

13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1–12, dadurch gekennzeichnet, dass ein Peptid abgetrennt wird, und dass das Peptid auf den Anionenaustauscher in einer Lösung mit einer Ionenstärke von  $\geq 15$  mS/cm aufgebracht wird.

14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–10, dadurch gekennzeichnet, dass Nucleinsäure abgetrennt wird, und dass der Anionenaustauscher Liganden zeigt, gewählt aus:

- CHOCH<sub>2</sub>N [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]; -CHOHCH<sub>2</sub>NHCH (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>;
- CHOHCH<sub>2</sub>NHC (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>; -CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>OH;
- CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–10 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass Nucleinsäure abgetrennt wird durch Adsorption an den Anionenaustauscher, und dass adsorbierte Nucleinsäure

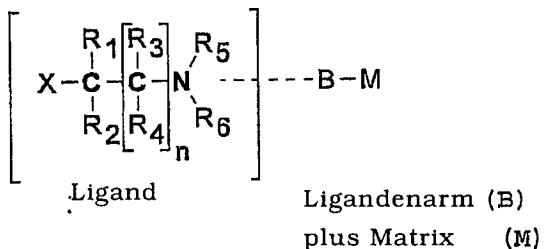
nachfolgend eluiert wird durch

- a. ein Mittel, das Wasserstoffbindungen aufbricht, beispielsweise Harnstoff oder Guanidin und/oder
  - b. Salz und/oder
  - c. Erhöhung des pH, sodass die Liganden vollständig oder teilweise ungeladen sind.

16. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2–10 und 14–15, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure ein synthetisches Oligonucleotid ist.

17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1–16, dadurch gekennzeichnet, dass der Anionenaustauscher gemäß mindestens einem der Ansprüche 18–24 ist.

18. Anionenaustauscher, dadurch gekennzeichnet, dass er die Struktur besitzt



## FORMEL 1

worin

- a. – bedeutet, dass der Ligandenarm B eine Gruppe  $R_{1-6}$  oder einen Wasserstoff in irgendeiner der Gruppen  $R_{1-4}$  in dem Liganden ersetzt,

b. M eine Polymermatrix ist, welche weitere anionenaustauschende Liganden enthält,

c. B eine organische Struktur ist, der es an hydrolytisch instabilen Strukturen mangelt, wie Silan, Carbonsäureester (-COO-) oder Carbonsäureamid (-CONH-), und welche Kohlenwasserstoffketten enthält, gewählt unter den gleichen Kohlenstoffketten wie  $R_{1-4}$ ,

d. n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist, typischerweise 1,

e. i.  $R_1, R_2, R_3$  und  $R_4$  gewählt sind aus Wasserstoff und linearer, verzweigter oder cyclischer gesättigter oder ungesättigter Kohlenwasserstoffgruppe, die einwertig oder zweiwertig sein kann, mit einer Kohlenstoffkette, die wahlweise durch ein oder mehrere Aminostickstoff- oder Ethersauerstoffatome ( $-NR_7-$  respektive  $-O-$ ) unterbrochen ist und/oder bei der ein oder mehrere Wasserstoffe ersetzt sind durch eine Aminogruppe ( $-N^+R_8R_9R_{10}$ ) oder durch eine Gruppe  $-OR_{11}$ , mit der Maßgabe, dass

A. wenn irgendeine der Gruppen zweiwertig ist, diese dann zwei Gruppen  $R_{1-6}$  umfasst, welche zusammen mit mindestens einem der in Formel I in Fettbuchstaben geschriebenen Atome einen 5- oder 6-gliedrigen Ring bilden,

ii.  $R_5$  und  $R_6$  gewählt sind unter den gleichen Gruppen wie  $R_{1-4}$  mit den Maßgaben, dass

B. wenn eine oder zwei der Gruppen  $R_5$  und  $R_6$  ein oder mehrere Stickstoffatome enthalten, dann enthält mindestens eine der Gruppen ebenso ein oder mehrere Sauerstoffatome ( $-OR_{11}$ , worin  $R_{11}$  gemäß nachstehendem Absatz f ist),

C. beide  $R_5$  und  $R_6$  nicht gleichzeitig unter Methyl und Ethyl gewählt werden können,

f.  $R_{7-11}$  gewählt sind unter den gleichen Gruppen wie  $R_{1-4}$ , vorzugsweise niederes unsubstituiertes Alkyl ( $C_{1-6}$ ) und Wasserstoff,

g. X -OH oder  $-NR_{12}R_{13}$  ist, worin  $R_{12}$  und  $R_{13}$  unter den gleichen Gruppen gewählt sind wie  $R_{1-6}$ ,

h. Anionenaustauscher, die durch Kuppeln von Triethanolamin an Cellulose über eine Reaktion mit Epoxid hergestellt sind, nicht eingeschlossen sind.

## 19. Anionenaustauscher nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass B R<sub>1</sub> oder R<sub>2</sub> ersetzt.

20. Anionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 18–19, dadurch gekennzeichnet, dass B eine lineare, verzweigte oder cyclische gesättigte Kohlenwasserstoffkette ist, welche wahlweise unterbrochen ist durch Ethersauerstoffatome, und bei der wahlweise ein oder mehrere Wasserstoffe durch Hydroxyl ersetzt sind.

21. Anionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 18–20, dadurch gekennzeichnet, dass B  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-O-CH}_2$ ;  $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-O-CH}_2$  oder  $-\text{CH}_2$  ist.

22. Anionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 18–21, dadurch gekennzeichnet, dass n 1 ist und dass R<sub>1–4</sub> Wasserstoff sind.

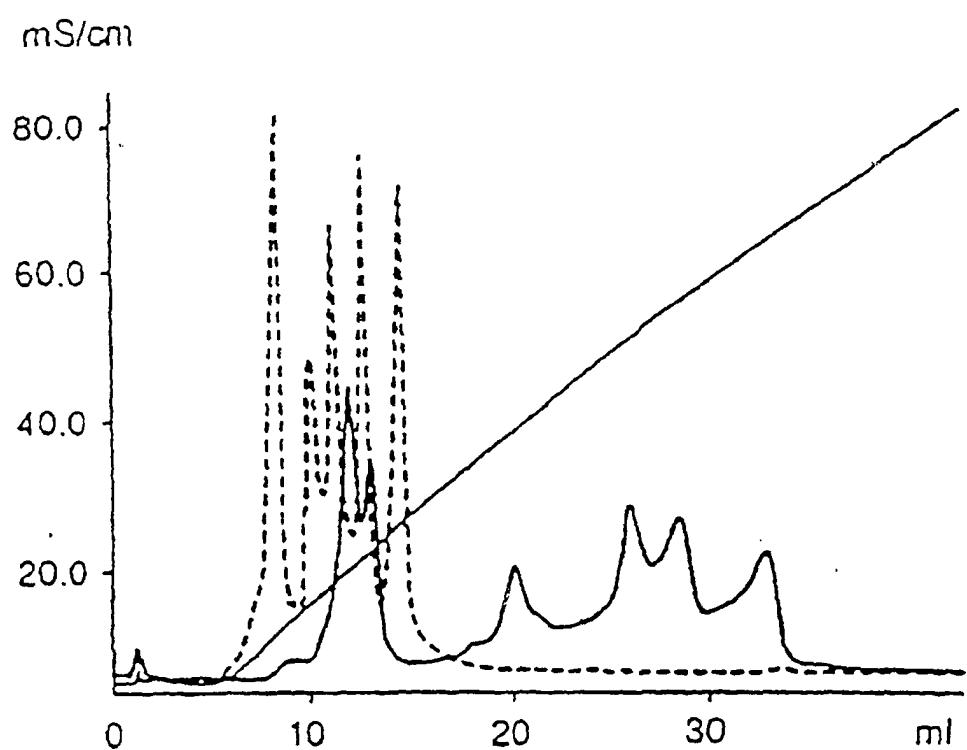
23. Anionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 18–22, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>5</sub> und/oder R<sub>6</sub> Wasserstoff ist.

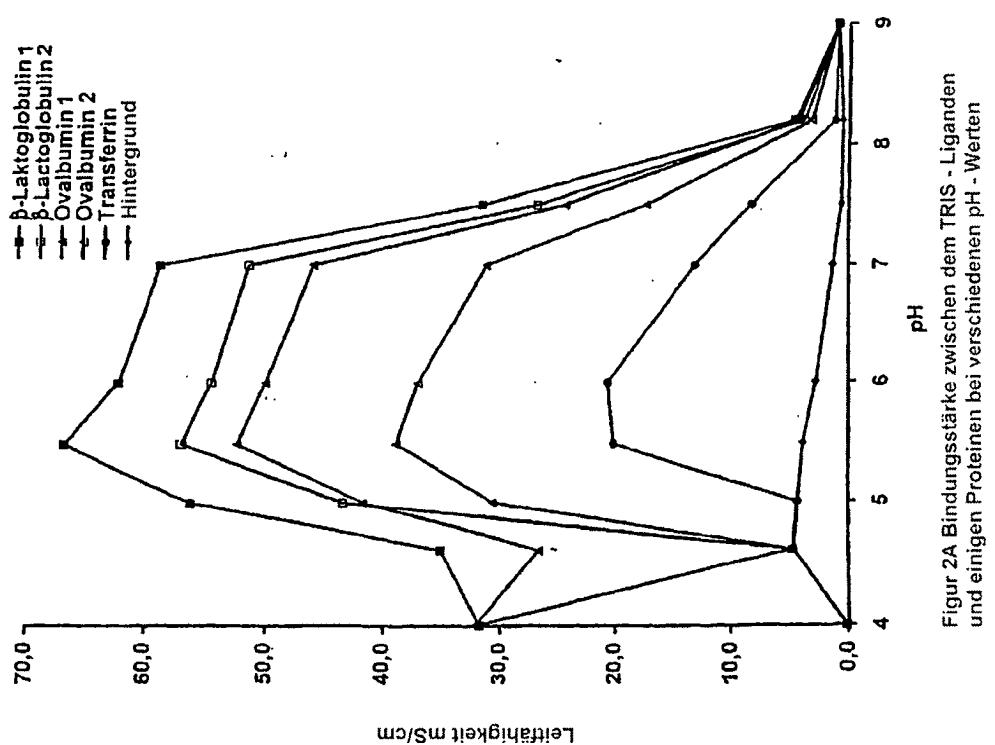
24. Anionenaustauscher nach mindestens einem der Ansprüche 18–23, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand gewählt ist aus:

- CHOHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NH [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]
- CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; - CHOHCH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>;
- CHOHCH<sub>2</sub>NHCH(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; - CHCHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH;
- CHOHCH<sub>2</sub>NHC(CH<sub>3</sub>) (CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; - CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>(CHOH)<sub>4</sub> CH<sub>2</sub>OH;
- CHOHCH<sub>2</sub>N[C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>] (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> NHC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> -CHOHCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH.

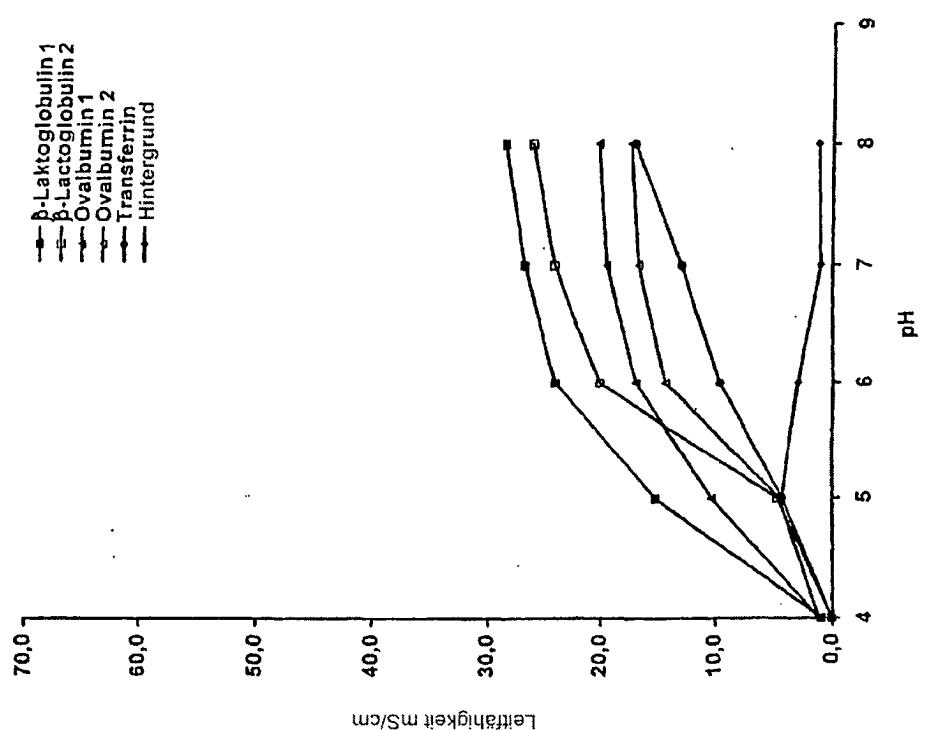
Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

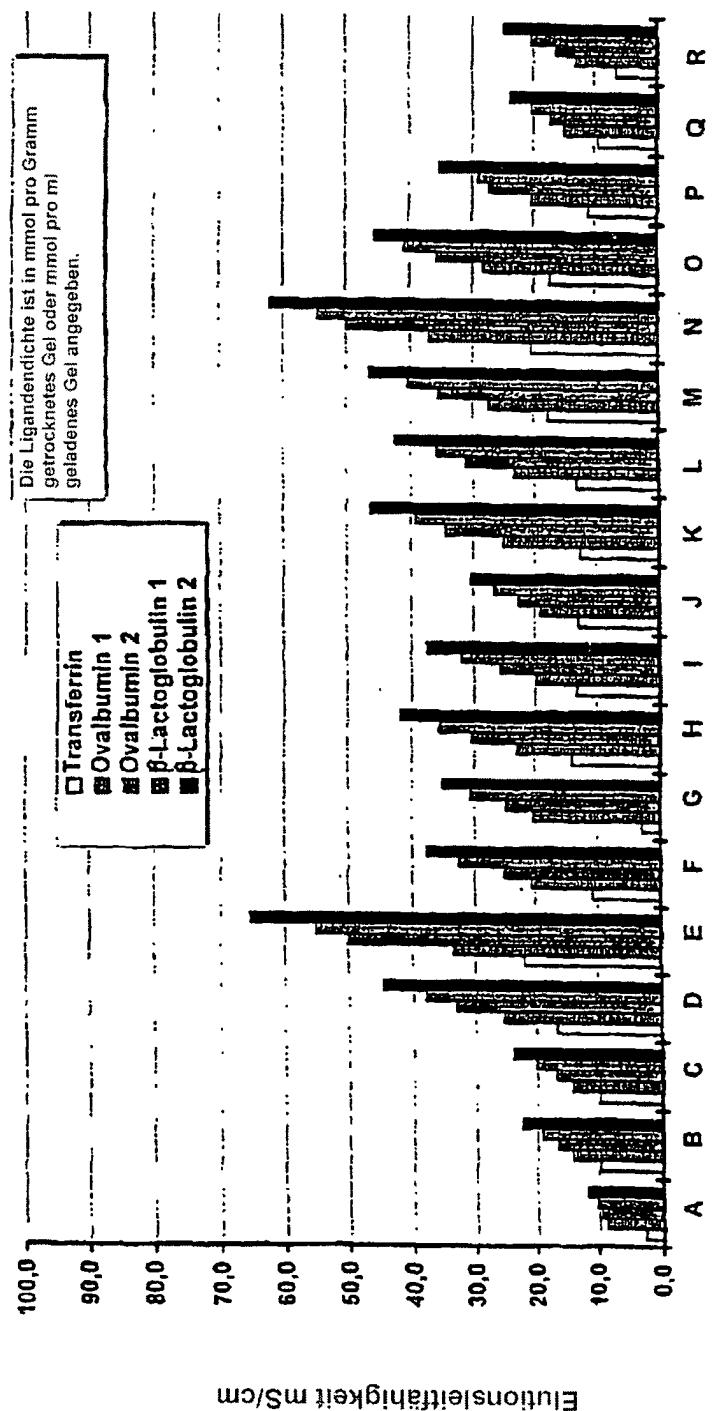




Figur 2A Bindungsstärke zwischen dem TRIS - Liganden und einigen Proteinen bei verschiedenen pH - Werten



Figur 2B Bindungsstärke zwischen dem Q - Liganden und einigen Proteinen bei verschiedenen pH - Werten



Figur 3 Vergleich von Anionenaustauschliganden bei einem pH - Wert von 6,0

Fig. 4

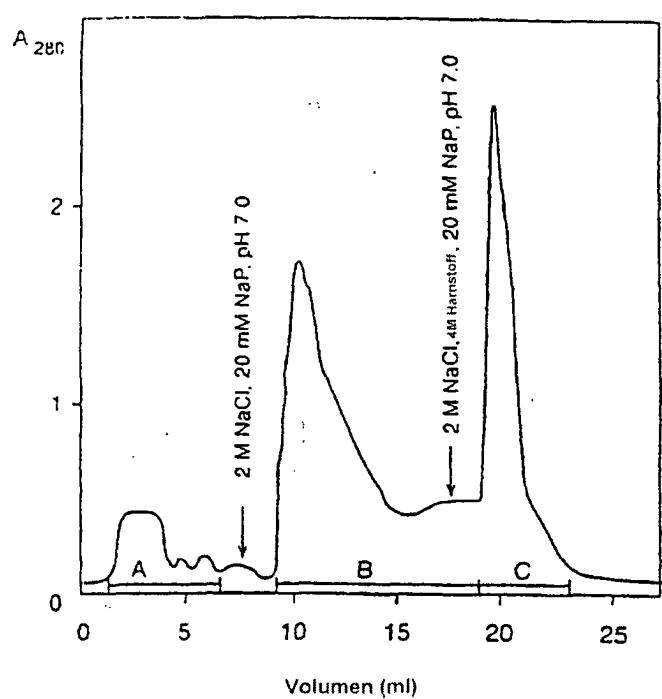


Fig. 5

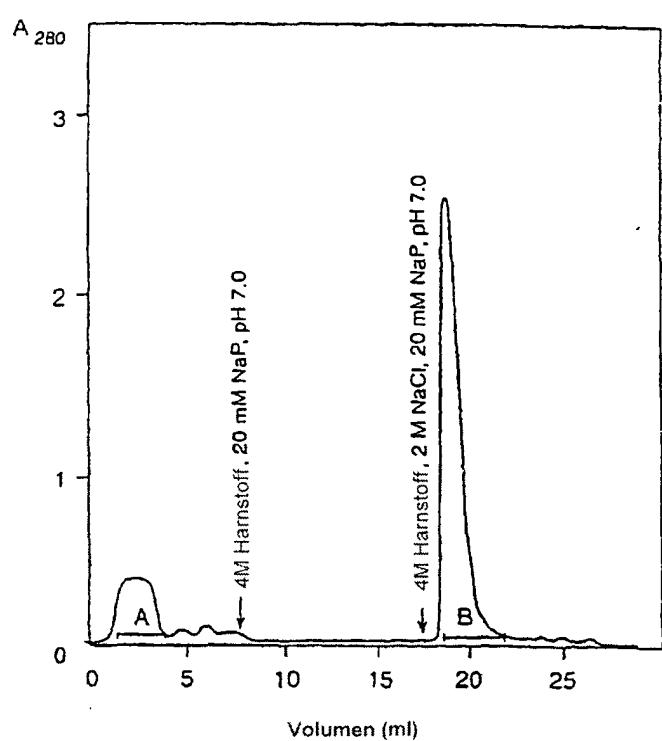
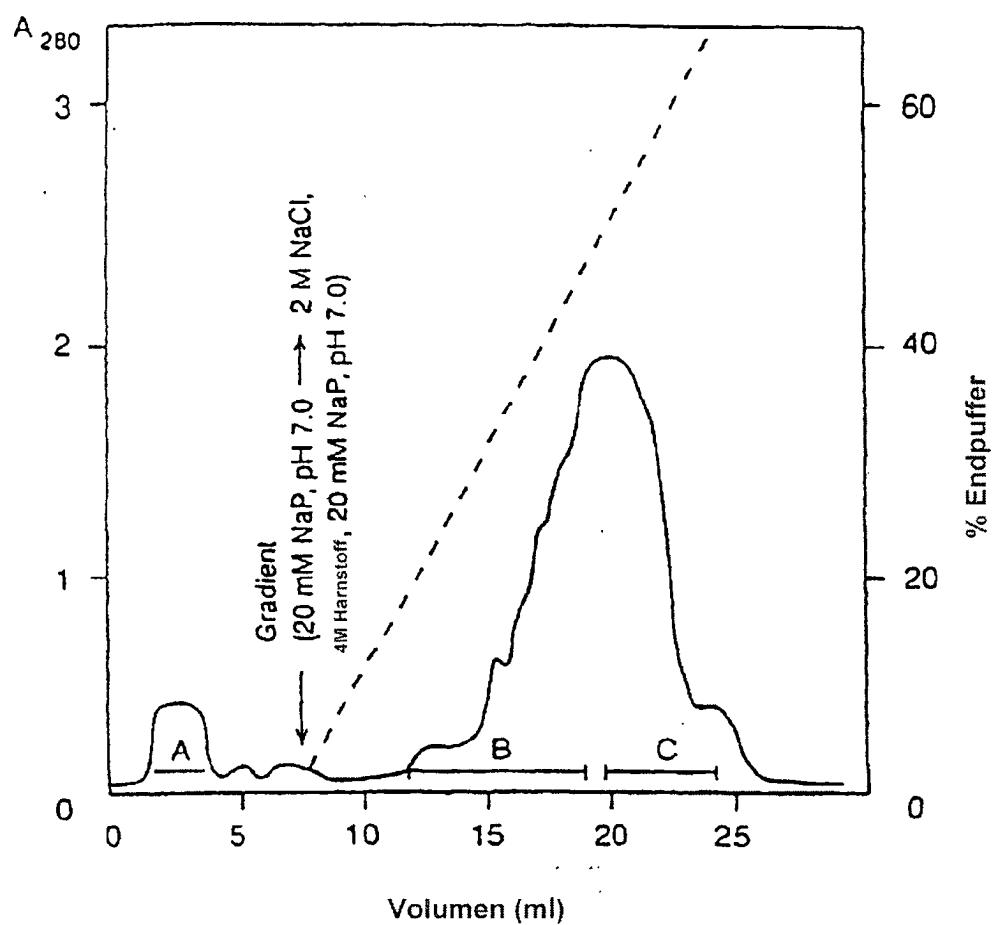


Fig. 6



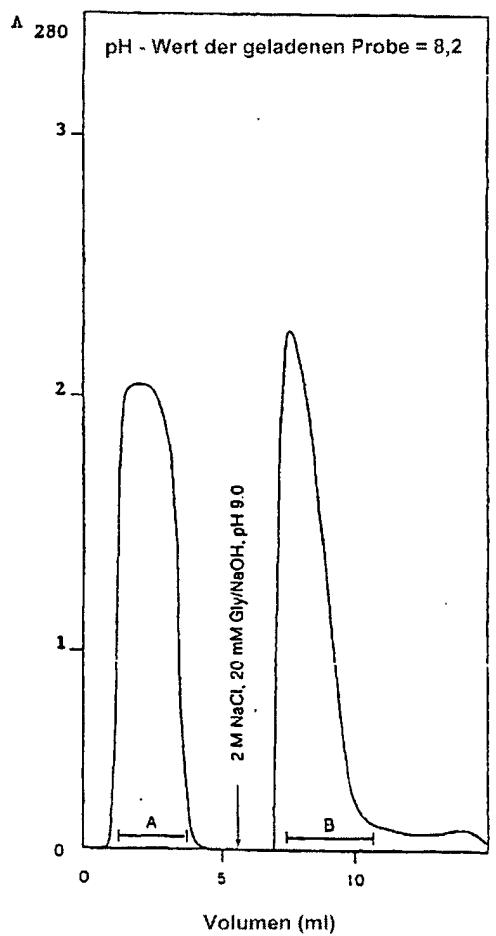


Fig. 7

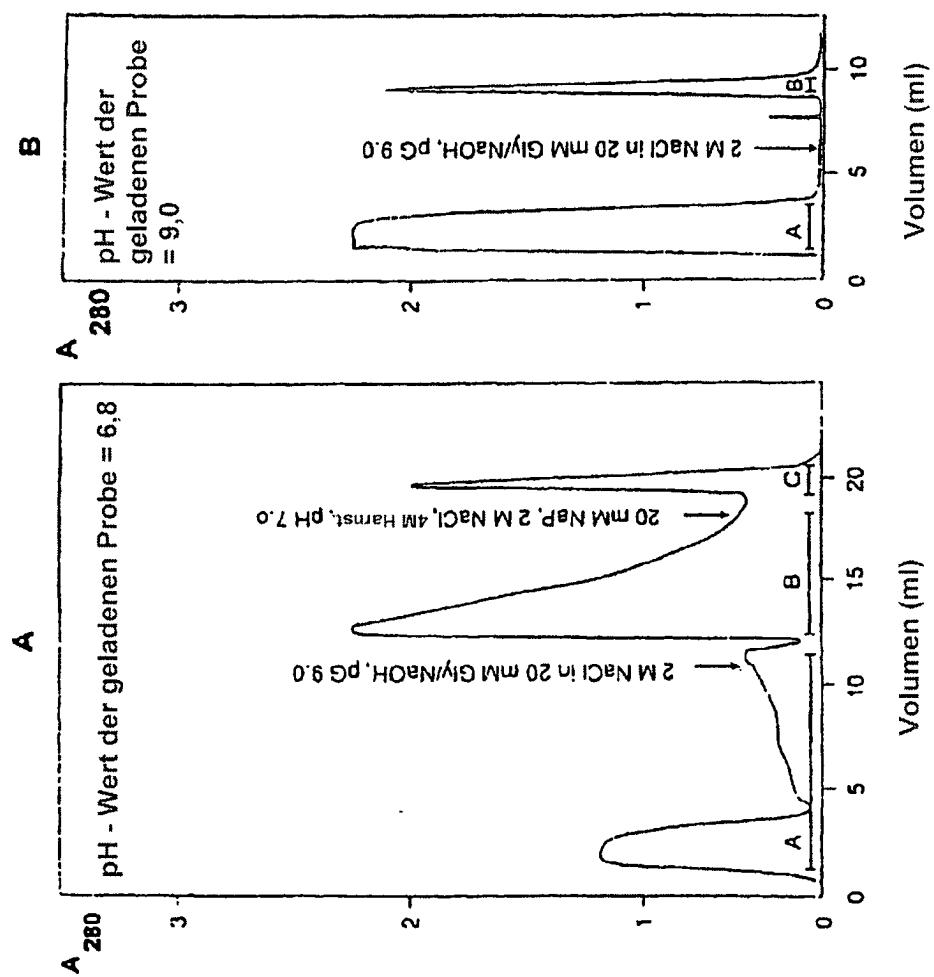


Fig. 8A  
Fig. 8B