

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 290 144 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) B 01 D 13/00
G 01 N 30/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD B 01 D / 331 589 6

(22) 08.08.89

(44) 23.05.91

(71) siehe (73)

(72) Jäschke, Andres, Dipl.-Chem.; Cech, Dieter, Dr. sc. nat.; Ehwald, Rudolf, Dr. sc. nat.; Klein, Ulrich, Dr. rer. nat., DE

(73) Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Postfach 1297, O - 1086 Berlin, DE

(54) Verfahren zur Fraktionierung makromolekularer polydisperser Stoffe nach dem Polymerisationsgrad

(55) Membrantrennung; Chromatographie; Zellwandvesikeln; polydisperse Makromoleküle; Nucleinsäuren

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Fraktionierung makromolekularer Stoffe nach dem Polymerisationsgrad durch Membrantrennung. Das Verfahren erfordert die Einführung der zu trennenden Stoffe in den Retentatraum eines Membransystems, z. B. in den Innenraum dünnwandiger Mikrokapseln. Der Retentatraum wird durch eine semipermeable Membran mit dünner Trennschicht, scharfer Trenngrenze und großer spezifischer Oberfläche mit einem offenen Permeatraum verbunden, in dem sich ein mobiles flüssiges Dispersionsmittel befindet. Durch schrittweise oder kontinuierliche Veränderung der Zusammensetzung des Dispersionsmittels im durchströmten Permeatraum wird die Molekülgröße der zu trennenden Stoffe im Verhältnis zur Trenngrenze der Membran schrittweise oder kontinuierlich herabgesetzt, wodurch die zuvor eingeschlossenen makromolekularen polydispersen Stoffe geordnet nach zunehmendem Polymerisationsgrad eluiert werden.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Fraktionierung makromolekularer polydisperser Stoffe nach dem Polymerisationsgrad, **dadurch gekennzeichnet**, daß zu fraktionierende hochmolekulare diffusionsfähige Stoffe mit dispersionsmittelabhängigem effektiven Molekül- oder Teilchendurchmesser in den Retentatraum bzw. Innenraum von Mikrokapseln oder den Retentatraum von anderen semipermeablen Membransystemen mit einer weniger als 10 µm dicken Trennschicht und einer, bezogen auf den Retentatraum, großen spezifischen Membranoberfläche von mehr als 20 cm²/ml und scharfer, in bestimmten Flüssigkeiten innerhalb des Dispersitätsgebiets der zu fraktionierenden hochmolekularen Stoffe liegender Trenngrenze der Membran eingeführt werden, das Membransystem in Kontakt mit einem mobilen flüssigen Dispersionsmittel, in dem die effektive Molekül- oder Teilchengröße der polydispersen Stoffe deutlich über ihrem Minimum und zum Teil über der Trenngrenze der Membran liegt und das sich in einem offenen Permeatraum befindet, gebracht wird, der Permeatraum mit Dispersionsmittel durchströmt und die Zusammensetzung des Dispersionsmittels nach bekannten Gesetzmäßigkeiten schrittweise oder kontinuierlich so geändert wird, daß sich der effektive Durchmesser der polydispersen Teilchen in Beziehung zur Trenngrenze der Membran verringert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als zu fraktionierende Stoffe hydrophile Makromoleküle, als Dispersionsmittel eine wäßrige Lösung oder Wasser eingesetzt werden und anschließend mit Wasser mischbare organische Flüssigkeiten zum wäßrigen Dispersionsmittel im durchströmten Permeatraum bis zu einer Konzentration, die zwischen der für die Ausfällung der Polymeren erforderlichen Konzentration und 1/10 dieser Fällungskonzentration liegt, zugesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als zu fraktionierende Stoffe polydisperse hydrophile Polyelektrolyte, als Dispersionsmittel anfangs Wasser oder eine wäßrige Lösung eingesetzt werden und anschließend die Ionenstärke des wäßrigen Dispersionsmittels im durchströmten Permeatraum vergrößert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Mikrokapseln bekannte, durch Extraktionsbehandlung aus abgetöteten pflanzlichen Gewebeteilchen oder Mikroorganismen hergestellte vesikuläre Träger für die Chromatographie, in denen eine unveränderte oder modifizierte Zellwand als Membran den Retentatraum abgegrenzt, eingesetzt werden.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist in der Biotechnologie, Molekularbiologie und der Polymerenchemie anwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Methoden zur Größenfraktionierung von Polymeren gehören zu den Voraussetzungen für eine erfolgreiche Forschung auf den Gebieten der Polymerenchemie und Molekularbiologie und sind ebenso wichtig für die Produktaufbereitung in der Biotechnologie. Insbesondere die Gelpermeationschromatographie ist eine verbreitete Routinemethode zur Größenfraktionierung von Makromolekülen geworden. Dem – vor allem bei Biopolymeren bedeutsamen – Vorteil der äußerst schonenden Trennung steht bei dieser Methode der Nachteil der methodisch bedingten geringen Selektivität gegenüber. Der genannte Nachteil gilt auch für Methoden der Größenfraktionierung von Polymeren, die auf Fällung oder Fällungschromatographie beruhen (vergl. Glöckner, Polymerencharakterisierung durch Flüssigchromatographie, VEB Verlag der Wissenschaften Berlin, 1980). Fällung und Adsorption von biologisch bedeutsamen Makromolekülen führen außerdem häufig zur Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstrukturen und damit zum Verlust biologischer Aktivität. Methoden zur Größenfraktionierung von Polyelektrolyten mit Hilfe der Elektrophorese sind nur für bestimmte Stoffgruppen (z. B. Nucleinsäuren) hochauflösend, im präparativen Maßstab sind sie, wie die Ultrazentrifugation, sehr aufwendig. Für präparative Zwecke geeignete und ökonomische Verfahren zur Größenfraktionierung von Makromolekülen beruhen auf dem Einsatz von Ultrafiltermembranen bzw. Dialysmembranen, die in zahlreichen Varianten auf unterschiedlicher chemischer Grundlage mit unterschiedlichen Trenngrenzen kommerziell verfügbar sind. Abgesehen davon, daß bei der Ultrafiltration und Dialyse an künstlichen Membranen anstelle einer scharfen Trenngrenze meist ein breiter Trennbereich auftritt, ermöglichen die bekannten Membrantrennverfahren in einem Schritt lediglich die Gewinnung von zwei Fraktionen – des Permeats und des Retentats. Soll eine Auftrennung der Probe in mehr als zwei Fraktionen erreicht werden, dann können Permeat oder Retentat an Membranen mit veränderten Trennbereichen nochmals fraktioniert werden. Dies trifft auch sinngemäß für die Vesikelausschlußchromatographie gemäß DD 247 570 A3 und DD 269 744 A3 zu. Sie stellt eine Synthese von Chromatographie

und Membrantrennung dar. Hinsichtlich des Mechanismus der Trennung handelt es sich dabei um eine wiederholte Dialyse durch die in einer chromatographischen Packung angeordneten, in sich geschlossenen Mikrokapseln bzw. Hohlmembransysteme (Vesikuläre Träger). Resultat einer chromatographischen Trennung mit vesikulären Trägern sind eine ausgeschlossene und eine permeierende Fraktion, wobei erstere bei 40, letztere bei 90% des Packungsvolumens die chromatographische Säule verläßt. Da gemäß DD 269744 A3 die sehr scharfe Ausschlußgrenze bestimmter für die Vesikelausschlußchromatographie eingesetzter Trennmembranen durch Pektinextraktion und Elutionsmitteleinflüsse hinsichtlich der maximalen Molmasse der permeablen Moleküle verändert werden kann, ermöglichen wiederholte chromatographische Trennungen mit vesikulären Trägern bei veränderter Ausschlußgrenze die Gewinnung von mehr als zwei Molekülgrößenfraktionen aus einer polydispersen Mischprobe. Günstiger wäre es, eine Größenfraktionierung polydisperser Stoffe an ein und demselben Membransystem durchzuführen, wobei nacheinander mehrere voneinander verschiedene Molekül- oder Teilchengrößenfraktionen erscheinen. Hierfür ist bisher kein Verfahren bekannt.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines hochauflösenden Membrantrennverfahrens zur Fraktionierung makromolekularer polydisperser Stoffe nach dem Polymerisationsgrad.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe besteht in der Entwicklung eines Membrantrennverfahrens zur Größenfraktionierung polydisperser hochmolekularer Stoffe, z. B. von Nucleinsäuren, Dextranen oder Polyethylenglycolen, das einen Vorteil der Vesikelausschlußchromatographie (hohe Selektivität der Trennung) mit einem wesentlichen Vorteil der Gelchromatographie (Möglichkeit zur Gewinnung zahlreicher Fraktionen in einem einzigen Prozeß) vereinigt. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß diffusionsfähige hochmolekulare Stoffe mit dispersionsmittelabhängiger Molekül- oder Teilchengröße in den Innenraum von Mikrokapseln oder den Retentatraum von anderen semipermeablen Membransystemen mit großer spezifischer Oberfläche, sehr dünner Trennschicht und scharfer Trenngrenze eingeführt und das Membransystem in einem flüssigen Dispersionsmittel mit einem Permeatraum in Verbindung gebracht wird. Der Permeatraum wird mit Dispersionsmittel durchströmt, wobei die Zusammensetzung des mobilen Dispersionsmittels unter Ausnutzung bekannter Gesetzmäßigkeiten schrittweise oder kontinuierlich so geändert wird, daß sich die Molekül- oder Teilchengröße der hochmolekularen Stoffe schrittweise oder kontinuierlich im Verhältnis zur Trenngrenze der Membran verringert. Für eine erfolgreiche erfindungsgemäße Fraktionierung ist wesentlich, daß die Trenngrenze der Membran in bestimmten Dispersionsmitteln im Dispersitätsgebiet der Makromoleküle liegt, und daß anfangs ein Dispersionsmittel eingesetzt wird, in dem die effektiven Molekül- oder Teilchengrößen der zu fraktionierenden Stoffe deutlich über ihrem Minimum und zum Teil über der Trenngrenze der Membran liegen. Die Herabsetzung der Molekülgröße bzw. Teilchengröße (Stokesscher Durchmesser) relativ zur Trenngrenze der Membran erfolgt durch Veränderung der Zusammensetzung des Dispersionsmittels in mehreren Stufen oder in einem kontinuierlichen Gradienten. Sollen hydrophile Polyelektrolyte fraktioniert werden, kann dies durch Erhöhung der Ionenstärke im Dispersionsmittel erreicht werden (Reinert, K. E., und H. Triebel, in: Strukturuntersuchungen an Biopolymeren mit spektroskopischen und hydrodynamischen Methoden, Akademie-Verlag Berlin, 61-164, 1976). Die Herabsetzung der effektiven Teilchengröße relativ zur Trenngrenze der Membran ist bei hydrophilen Polymeren mit flexibler Sekundärstruktur auch durch Zusatz mit Wasser mischbarer organischer Flüssigkeiten zum wäßrigen Dispersionsmittel in einer Konzentration, die zwischen der für die Ausfällung der hydrophilen Polymeren erforderlichen Konzentration (Fällungskonzentration) und $\frac{1}{10}$ dieser Konzentration liegt, möglich. Die desolvatisierende Wirkung organischer Flüssigkeiten wie einwertiger Alkohole, Aceton und weiterer Ketone sowie zahlreicher anderer mit Wasser mischbarer organischer Flüssigkeiten bei hydrophilen Makromolekülen ist bekannt und wurde gemäß DD 269744 A 3 bereits im Zusammenhang mit der Vesikelausschlußchromatographie zur Vergrößerung der maximalen Molmasse für die Permeation durch die Vesikelmembran eingesetzt.

Wesentlich für die hier dargestellte Erfindung ist, daß die Fraktionierung durch Veränderung der Dispersionsmitteleigenschaften im Verlauf eines Elutionsprozesses erreicht wird. Das Verfahren erfordert den Einschluß der makromolekularen polydispersen Stoffe im Retentatraum eines Membransystems unter Nutzung der Ultrafilterwirkung der Membran und die anschließende Elution mit einem kontinuierlichen oder stufenförmigen Dispersionsmittelgradienten. Dabei ist von Bedeutung, daß das Membransystem eine große spezifische Oberfläche besitzt, weil bekanntlich bei einer spezifischen Oberfläche unter $10 \text{ cm}^2/\text{ml}$ Retentatvolumen bereits die Diffusion durch die unbewegte Flüssigkeit im Retentatraum des Membransystems Zeiträume von mehreren Minuten zur Gleichgewichtseinstellung erfordert. Ein für den vorteilhaften Verlauf der erfindungsgemäßen Fraktionierung erforderlicher Mindestwert der Geschwindigkeitskonstanten für die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes der permeationsfähigen Polymeren zwischen der flüssigen Phase des Retentatraumes und derjenigen des Permeatraumes von $0,01 \text{ s}^{-1}$ ist erst bei einer spezifischen Oberfläche der Trennmembran von mehr als $20 \text{ cm}^2/\text{ml}$ Retentatvolumen möglich. Außerdem ist für die erfolgreiche Durchführung der Fraktionierung in kurzer Zeit eine sehr hohe Permeabilität der Membran vorauszusetzen, die ebenso wie die erforderliche scharfe Trenngrenze nur bei einer dünnen Trennschicht mit geringem Feststoffgehalt auftritt. Diese Voraussetzungen sind in idealer Weise bei den aus Zellwänden aufgebauten vesikulären Trägern gemäß DD 247570 A3 erfüllt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist prinzipiell auch mit künstlichen Membranen durchführbar. Die erforderliche Trenngrenzscharfe läßt sich z. B. mit Hilfe von S-Schichten (Sára und Sleytr, Biotechnology, Vol. 6b, ed. by H.-J. Rehm and G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, 1988) erreichen. Eine hohe spezifische Membranoberfläche, bezogen auf den Retentatraum, eine hohe Austauschrate, eine dünne Trennschicht und eine scharfe Trenngrenze sind beispielsweise auch bei Kapillarmembransystemen mit asymmetrischer Trennschicht zu erreichen, wenn die gequollene hochporöse Stützschiicht der Membran als Retentatraum und der Hohlraum innen als Permeatraum genutzt werden.

Überraschend zeigte sich, daß bei der Elution von in vesikulären Trägern eingeschlossenen Dextranen oder Nucleinsäuren in einem Stufengradienten des Elutionsmittels bei ansteigendem Ethanol- oder $MgCl_2$ -Gehalt scharf abgegrenzte Fraktionen mit unterschiedlichem Dispersitätsgrad nachweisbar sind, wobei die Zahl der Fraktionen mit der Zahl der Stufen übereinstimmt. Ein Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß die Fraktionen vollständig voneinander getrennt werden können, da nach jedem Increment der Konzentration des die effektive Teilchengröße herabsetzenden Zusatzes eine zeitlich begrenzte Elution in Form eines Peaks erfolgt.

Ausführungsbeispiele

1. Fraktionierung von Ribonucleinsäure an vesikulärem Trägermaterial

Gemäß DD 246920 hergestellte und getrocknete vesikuläre Träger werden in einem 200mM $MgCl_2$ enthaltenen Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7,5) suspendiert und in eine Chromatographiesäule (Innendurchmesser 16mm) gefüllt. Das Bettvolumen beträgt 5 ml. Die Säule wird mit einem UV-Detektor mit Durchflußküvette (Wellenlänge 254 nm), einer Durchfluß-Leitfähigkeitsmeßzelle, einem Fraktionsammler und einem Schreiber verbunden. Das chromatographische Bett wird solange mit dem 200mM $MgCl_2$ enthaltenen Puffer gespült, bis die Extinktion im Eluat auf Null gefallen ist. Anschließend erfolgt der Wechsel zu einem Puffer, der 20 mM $MgCl_2$ enthält. Mit diesem wird gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Eluats gleich der des reinen Puffers ist. 50 µl einer Lösung von polydisperser Ribonucleinsäure (RNA aus Hefe, Boehringer Mannheim, 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) wird auf die Säule aufgebracht und nach Einsaugen der Probe in kleinen Portionen mit magnesiumchloridfreiem Puffer gespült. Da das chromatographische Verhalten der RNA bei Konzentrationen von 0 und 20 mM $MgCl_2$ unterschiedlich ist (Abb. 1), die Moleküle in einem Fall in den Innenraum permeieren können, im anderen jedoch ausgeschlossen werden, verbleibt infolge des Pufferwechsels ein Teil der Nucleinsäuremoleküle (10 bis 30%) im Innenraum der Träger eingeschlossen und kann diesen vorerst nicht verlassen. Die nicht eingeschlossenen Moleküle werden zuerst eluiert.

Abb. 1 zeigt das Chromatogramm einer RNA-Probe in 10mM Tris-Puffer pH 7,5 (durchgezogene Linie) und mit dem gleichen Puffer, der zusätzlich 20 mM $MgCl_2$ enthält (gestrichelte Linie). Abb. 2 zeigt die schrittweise Elution der zurückgehaltenen (eingeschlossenen) Moleküle einer RNA-Probe durch Puffer ansteigender $MgCl_2$ -Konzentration.

Probe: RNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 1 mg/ml in 10mM Tris-HCl, pH 7,5, Probenvolumen: 50 µl, Säule: 16mm x 23mm
Nach Spülen der Säule mit magnesiumchloridfreiem Puffer (mindestens 2 Säulenvolumina bzw. 10 ml) erfolgt die fraktionierte Freisetzung der eingeschlossenen Moleküle durch Puffer mit stufenweise ansteigender Magnesiumchloridkonzentration:

0 bis 40 ml	0,2 mM
40 bis 70 ml	2,0 mM
70 bis 80 ml	20 mM

Anhand der Extinktion bei 254 nm können deutlich drei verschiedene, scharf abgegrenzte Fraktionen detektiert werden. In entsprechender Weise wurden darüber hinaus mit vergleichbarem Ergebnis fraktioniert:

- degradierte Desoxyribonucleinsäure aus Heringssperma (SERVA, Heidelberg)
- degradierte Polygalakturonsäure aus Citrus (SERVA, Heidelberg).

2. Fraktionierung von Dextran an vesikulärem Trägermaterial

Eine analog Beispiel 1 hergestellte Chromatographiesäule mit Zellwandvesikeln wird bis zur Ionenfreiheit des Eluats (konduktometrische Kontrolle) mit einer Ethanol-Wasser-Mischung (30 Vol.-% Ethanol) eluiert. Anschließend wird ein Volumen von 0,1 ml einer Lösung eines polydispersen Dextrans in Phosphatpuffer (50 mg/ml, 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 unter Zusatz von 0,05% Natriumazid, Dextran T 250 der Fa. Pharmacia, Schweden) aufgetragen und nach zweimaligem Nachspülen mit jeweils 0,1 ml des Phosphatpuffers mit einer größeren Phosphatpuffermenge unter polarimetrischer Kontrolle eluiert, bis im Eluat kein Dextran mehr nachgewiesen wird. Ein Teil des aufgetragenen Dextrans (etwa 20%) wird dabei durch den Wechsel der Zusammensetzung des Elutionsmittels im Innenraum der Zellwandvesikeln eingeschlossen und kann nicht eluiert werden. Im Anschluß daran erfolgt die Elution in mehreren Stufen, zunächst mit dem verwendeten Phosphatpuffer unter Zusatz von 15 Vol.-% Ethanol, wobei die erste Fraktion eluiert wird, dann mit einer Ethanol-Wasser-Mischung (20 Vol.-% Ethanol), wobei eine Fraktion mit mittlerer Molekülgröße eluiert wird, zuletzt mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser (35% Ethanol), die zur vollständigen Elution (eingeschlossene Dextranmoleküle mit dem größten Molekulargewicht) führt.

-4- 290144

Abb. 1

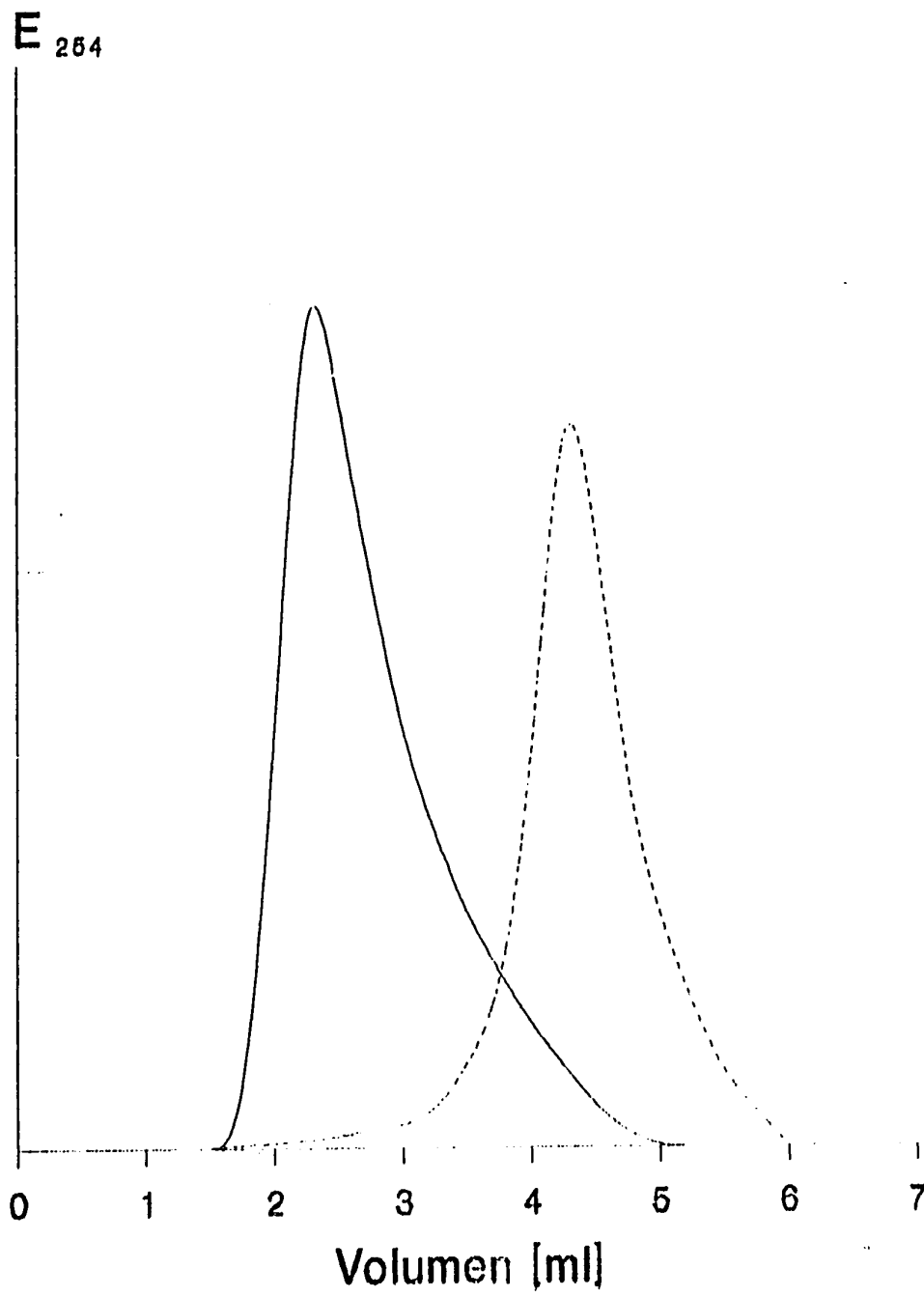


Abb. 2

