(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 30 682 T2** 2004.02.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 749 440 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 682.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/01593**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 908 808.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024418**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.05.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 1/14**
B01D 15/08, B01D 39/00, B01J 20/28

(30) Unionspriorität:
209700 **10.03.1994** **US**

(73) Patentinhaber:
Minnesota Mining and Mfg. Co., St. Paul, Minn., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB, IT, SE

(72) Erfinder:
HEILMANN, M., Steven, Saint Paul, US; DRTINA, J., Gary, Saint Paul, US; EITZMAN, D., Philip, Saint Paul, US; HADDAD, C., Louis, Saint Paul, US; HYDE, W., Frederick, Saint Paul, US; JOHNSON, W., Todd, Saint Paul, US; RASMUSSEN, K., Jerald, Saint Paul, US; WILLIAMS, G., Michael, Saint Paul, US

(54) Bezeichnung: **Methode zur Isolierung und Reinigung eines Biomakromoleküls**

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 eingelegt, 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] Diese Erfindung betrifft ein Verfahren, insbesondere in großem Umfang, zur Abtrennung und Reinigung eines Biomakromoleküls von einer Lösung, die ein Biomakromolekül oder eine Vielzahl von Biomakromolekülen umfasst. Die gereinigten Biomakromoleküle sind nützliche therapeutische oder diagnostische Mittel.

[0002] Biomakromoleküle sind Bestandteile oder Produkte lebender Zellen und schließen Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Nucleinsäuren ein. Der Nachweis und die mengenmäßige Erfassung sowie auch die Abtrennung und Reinigung dieser Materialien stellen schon lange Aufgaben der Forscher dar. Der Nachweis und die mengenmäßige Erfassung sind für die Diagnose, zum Beispiel als Indikatoren für verschiedene physiologische Zustände, wie Erkrankungen, wichtig. Die Abtrennung und Reinigung von Biomakromolekülen sind für therapeutische Zwecke, zum Beispiel wenn sie Patienten verabreicht werden, denen es an einem bestimmten Biomakromolekül mangelt, wenn sie als biologisch verträglicher Träger irgendeines Medikamentes verwendet werden, und in der biomedizinischen Forschung wichtig. Biomakromoleküle, wie Enzyme, die eine spezielle Klasse von Proteinen darstellen, die chemische Umsetzungen katalysieren können, sind auch industriell nützlich; Enzyme wurden auch abgetrennt, gereinigt und dann für die Herstellung von Süßstoffen, Antibiotika und einer Vielzahl organischer Verbindungen, wie Ethanol, Essigsäure, Lysin, Asparaginsäure, und biologisch nützlicher Produkte, wie Antikörper und Steroide, verwendet.

[0003] In ihrem natürlichen Zustand in vivo bleiben die Strukturen und die entsprechenden biologischen Aktivitäten dieser Biomakromoleküle im Allgemeinen innerhalb ziemlich enger Bereiche des pH und der Innenstärke erhalten. Folglich muss jedes Trenn- und Reinigungsverfahren diese Faktoren in Betracht ziehen, damit das entstehende, behandelte Biomakromolekül Wirksamkeit besitzt.

[0004] Die Chromatographie ist ein Trenn- und Reinigungsverfahren, das bei biologischen Produktgemischen oft durchgeführt wird. Es ist eine Technik, die auf dem Austausch eines gelösten Stoffes zwischen einer sich bewegenden Phase, die ein Gas oder eine Flüssigkeit sein kann, und einer stationären Phase basiert. Das Abtrennen verschiedener gelöster Stoffe eines Lösungsgemisches erfolgt aufgrund der unterschiedlichen bindenden Wechselwirkungen jedes gelösten Stoffs mit der stationären Phase; stärker bindende Wechselwirkungen führen, im Vergleich mit gelösten Stoffen, die weniger stark in Wechselwirkung treten, im Allgemeinen zu längeren Retentionszeiten, wenn sie den die Bindung aufhebenden Wirkungen einer mobilen Phase unterzogen werden, und auf diese Weise kann eine Abtrennung und Reinigung erfolgen.

[0005] Versuche, polydisperse Teilchen als stationäre Phasen zum Abtrennen von Biomakromolekülen auszunutzen, indem sie in eine poröse Fasermatrix eingeführt werden, sind in US-Patenten 4,384,957 und 4,488,969 offenbart. Die entstehenden Komposit-Blattstrukturen wurden zu Kreisen geschnitten und gestapelt, wodurch Säulen hergestellt wurden.

[0006] Im Verlauf der Jahre wurden Filterpatronen für Flüssigkeiten entwickelt, die ein sehr wirksames Format für die Wechselwirkung eines flüssigen Stroms und einer festen Matrix darstellen. Diese Filter arbeiten zudem bei relativ hohen Strömungsraten, z. B. Liter pro Minute, und relativ geringen Drücken.

[0007] In Membranfilterpatronen mit einer tangentialen oder radialen Strömung wird das Filterelement in einer zur Strömung des Flüssigkeitsstroms parallelen Ebene präsentiert, und es werden zwei Abflüsse oder Permeate erzeugt, einer ist filtriert oder behandelt worden, indem er durch das Filterelement hindurchgegangen ist, und der andere nicht. Obwohl dieser Filteraufbau bei geringen Drücken arbeitet, und das nicht behandelte Permeat theoretisch im Kreislauf zurückgeführt werden kann, sind diese Systeme aufgrund des relativ langsamen Stroms durch das Element an sich komplizierter und langsamer, um einen Flüssigkeitsstrom vollständig zu behandeln; auch wenn die Filterelemente auf gewisse Weise modifiziert werden, um Biomakromoleküle zurückzuhalten, wäre das vollständige Zurückhalten in einem Durchgang durch das Element erforderlich.

[0008] Bei Filtern mit "einem geschlossenen Ende" wird das Filterelement senkrecht zur Strömungsrichtung des Flüssigkeitsstroms präsentiert. Der gesamte flüssige Strom muss durch das Element hindurch gehen, und es wird nur ein Permeat erzeugt. Als Trenneinheit betrachtet, in der die Trennung durch Wechselwirkung mit einer stationären Phase auf oder im Filterelement erfolgt, wäre eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende einer sehr breiten jedoch niedrigen Säule analog. Bei hohen Strömungsraten kann das Zurückhalten des Biomakromoleküls in einem einzigen Durchgang relativ gering sein, durch wiederholte Kreislaufführung des Abflusses können jedoch hohe Prozentsätze des Biomakromoleküls zurückgehalten werden.

[0009] Es wurden biologische Trennungen unter Verwendung modifizierter Filterpatronen durchgeführt. US-Patent 5,155,144 offenbart mikroporöse Schichten, die modifizierte Polysaccharidteilchen, wie Diethylaminoethylcellulose, eine typische stationäre Phase für die Ionenaustauschchromatographie, umfassen, die in einem polymeren Medium dispergiert sind. Es wird vorgeschlagen, dass diese Schichten zudem zu einer Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende konfiguriert werden können. Unter Anwendung der Kreislaufführung des Abflusses wurde ein mit Bleiionen behandeltes Harz als niedrige Säule zwischen zwei Gittern aus rostfreiem Stahl bei der analytischen Trennung von D-Xylose ausgewertet (siehe A. M. Wilhelm und J. P. Riba, J. Chromatog., 1989, 484, 211–223). Das entstandene Reaktorsystem mit einem gepackten Bett wurde ausgewertet, um die hydrodynamischen Bedingungen für die Teilchen bei der abschließenden Verwendung in Säulen

für die Produktion durch Flüssigchromatographie bei relativ hohen Systemdrücken und geringen Strömungsraten zu bestimmen.

[0010] US-Patent 4,774,004 offenbart die Verwendung von Filterpatronen, die mit Filterhilfsmitteln "beladen" sind, die Schichtsilicate, die im Wesentlichen als Ionenaustauschmedium wirken, und gegebenenfalls Kieselgur oder Aktivkohle sind. Die entstehenden Strukturen waren nützlich, um oberflächenaktive Mittel und "gelösten Schmutz" aus Lösungsmitteln für die chemische Reinigung zu entfernen. Die Einzelheiten zu dem Beladungsverfahren, den Mengen der verwendeten Filterhilfsmittel, den Strömungsraten des Umlaufs und den Systemdrücken des Verfahrens sind unzulänglich. Es wurde keine Trennung von einem Biomakromolekül oder mehreren durchgeführt oder in Betracht gezogen.

[0011] Kurz zusammengefasst stellt die Erfindung ein Verfahren zur Abtrennung (das das Reinigen einschließen kann) eines Biomakromoleküls bereit, das die Schritte umfasst: a) Bereitstellen eines Trennsystems, enthaltend eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende, die ein Komposit-Filtermedium umfasst, das eine Filterschicht einschließt, die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit Teilchen der stationären Phase beladen ist, die ein Biomakromolekül binden können, ein Reservoir, das eine Lösung enthält, die mindestens ein Biomakromolekül als gelösten Stoff umfasst, und eine Pumpe und eine damit verbundene Leitung, wodurch ein Aufbau in Form eines geschlossenen Kreislaufs gebildet wird, b) Pumpen der Lösung im Kreislauf durch die Filterpatrone, so dass das eine Biomakromolekül oder im Falle verwandter Makromoleküle mehr als ein Makromolekül an die Teilchen der stationären Phase gebunden wird bzw. werden, wodurch ein Produkt aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase erzeugt wird und c) gegebenenfalls Pumpen einer eluierenden Lösung, die die bindende Wechselwirkung des Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase umkehren kann, durch den Aufbau in Form eines geschlossenen Kreislaufs, so dass das Biomakromolekül freigesetzt wird.

[0012] Für die Verwendung in diesem Verfahren beschreibt die Erfindung ein Filterelement, das ein Komposit-Filtermedium umfasst, wobei das Komposit-Filtermedium eine Filterschicht umfasst, die auf der stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit unlöslichen Teilchen der stationären Phase beladen ist, wobei die Teilchen ein Biomakromolekül binden können.

[0013] Für die Verwendung in dieser Erfindung wird eine Filterpatrone beschrieben, die das vorstehend beschriebene Filterelement einschließt.

[0014] Für die Verwendung in dieser Endung wird ein Trennfilteraufbau beschrieben, der die Filterpatrone und ein Filterpatronengehäuse umfasst, wobei die Teilchen der stationären Phase des Komposit-Filtermediums dieser Erfindung ein Biomakromolekül binden können.

[0015] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Abtrennung, Reinigung oder Einengung eines gelösten Biomakromoleküls von einer Lösung, die andere gelöste biomakromolekulare Verbindungen enthält, bereit. Das Verfahren erfolgt bei einem relativ geringen Druck und ist für biologische Trennungen in großem Umfang besonders geeignet.

[0016] Insbesondere beschreibt das erfindungsgemäße Verfahren eine Flüssigkeitsfilterpatrone, die ein Komposit-Filtermedium umfasst, das in einem geeigneten Gehäuse enthalten ist, das mit einer Pumpe und einem Lösungsreservoir verbunden ist. Das neue Komposit-Filtermedium wird durch ein Verfahren hergestellt, bei dem eine Suspension, die mindestens eine stationäre Phase aus Chromatographieadsorptions-, Ionenaustausch-, Affinitäts- und/oder hydrophoben Teilchen in einer Flüssigkeit (im Allgemeinen Wasser) umfasst, hindurchgepumpt wird, um eine Filterschicht teilweise zu beladen, so dass die Teilchen der stationären Phase grundsätzlich auf der stromaufwärtigen Oberfläche der Filterschicht angeordnet sind. Dann wird eine Lösung eines zu trennenden biologischen Gemisches durch die Filterpatrone gepumpt, um den gelösten biologischen Stoff, der von Interesse ist, durch eine bindende Assoziation mit der stationären Phase von der Lösung abzutrennen. Die entstandene Lösung, von der der ausgewählte gelöste biomakromolekulare Stoff entfernt worden ist (oder bei der dessen Konzentration abgenommen hat), kann verwendet werden. Das Verfahren wird jedoch noch üblicher durchgeführt, um den abgetrennten gelösten biologischen Stoff zu gewinnen. Beim Eluieren oder einem Abtrennschritt wird dann eine Lösung, die eine Umkehr der Bindung an die stationäre Phase bewirken kann, vorzugsweise in einem Volumen der Lösung, das kleiner als das Anfangsvolumen des biologischen Lösungsgemisches ist, durch die Filterpatrone gepumpt. Das Binden des ausgewählten gelösten Biomakromoleküls aus einer Lösung, die durch das Filterelement strömt, kann durch Sorption oder chemische Umsetzung erfolgen. Bevorzugte Bindungsmechanismen schließen die Adsorption, den Ionenaustausch, eine hydrophobe Assoziation und eine Affinitätsbindung ein. In einem getrennten Schritt kann die Bindung umgekehrt werden, so dass das vorher gebundene Biomakromolekül abgetrennt und gereinigt wird.

[0017] In dieser Anmeldung bedeuten:

"Biomakromolekül" eine Komponente oder ein Produkt einer Zelle, wie Protein, Kohlenhydrat, Lipid oder Nucleinsäure, mit einem Molekulargewicht von mindestens 500;

"Filterschicht " ein blattartiges gewebtes oder vliesartiges poröses Material, das eine oder mehrere einzelne Schichten umfassen kann, die zu einen einzigen Blatt kombiniert sein können; die mittlere Porengröße ist größer als 1 μm und reicht bis zu 50 μm;

"Komposit-Filtermedium" eine Filterschicht , die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit Teilchen der stationären Phase beladen ist; das Medium kann eine Durchflussrate von mindestens 0,01 cm/min bei einem Filterpatronendruck von höchstens 0,25 Megapascal (MPa) aushalten;
"Filterelement" oder "filterndes Element" oder "Filtrationselement" ein Komposit-Filtermedium, das für den Durchgang eines Fluids gestaltet ist; es ist die tatsächliche Komponente eines Trennfilteraufbaus, die das Filter/Trenn/Reinigungs-Verfahren durchführt;
"Filterpatrone" eine Filtereinrichtung mit einem geschlossenen Ende, die vorzugsweise eine zylindrische Form hat;
"Filterpatronengehäuse" eine haltende Struktur für die Filterpatrone;
"Trennfilteraufbau" ein Gehäuse, das eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende enthält, die ein Komposit-Filtermedium umfasst, auf dessen stromaufwärtiger Oberfläche Teilchen der stationären Phase angeordnet sind;
"Trennsystem" ein Lösungsgemisch, das mindestens einen in einem Reservoir enthaltenen, gelösten, biomakromolekularen Stoff, einen Trennfilteraufbau, eine Pumpe und eine zugehörige Leitung umfasst;
"Durchflussrate" die Geschwindigkeit eines Flüssigkeitsstroms, der durch das Filterelement fließt, und die gleich der Strömungsrate geteilt durch die Oberfläche der Filterschicht ist. Auf diese Weise kann die Strömung eines Flüssigkeitsstroms gekennzeichnet werden und hängt nicht von der Größe der Filterschicht ab. Die Durchflussrate trägt auch zum Druckabfall innerhalb des Filters bei, d. h. erhöhte Durchflussraten bedeuten im Allgemeinen erhöhte Systemdrücke. Bei der kommerziellen Verwendung von Filterpatronen ist es sehr erwünscht, einen Filter mit minimaler Größe bereitzustellen, der eine maximale Menge des Flüssigkeitsstroms behandelt. Deshalb ist es erwünscht, dass die Durchflussrate erhöht wird, indem die Strömungsrate erhöht wird;
"Teilchen der stationären Phase" unlösliche teilchenförmige Materialien, die eine bindende Assoziation mit der biomakromolekularen Komponente, die von Interesse ist, in einem Lösungsgemisch eingehen kann. Bestimmte bindende Assoziationen schließen ein: Adsorption, Ionenaustausch, hydrophobe Wechselwirkung und Affinitätswechselwirkung;
"Kryo-arm" Blutplasma, aus dem die ungelösten Feststoffe nach einem Gefrier/Auftau-Zyklus entfernt worden sind;
"unlöslich", dass sich bei 23°C nicht mehr als 1 Teil Teilchen in 100 Teilen Lösungsmittel lösen, und
"Filterpatronendruck" den Unterschied zwischen dem Druck am Einlass, oder Stromaufwärts, und am Auslass, oder stromabwärts, innerhalb der Filterpatroneneinheit in einem Trennsystem.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren löst die Probleme herkömmlicher Filterpatronen, die für die Trennung von Biomakromolekülen verwendet wurden. Herkömmliche Filter, die in einem Filterelement Teilchen der stationären Phase enthalten, stellen eine Herausforderung bei der Herstellung dar und zeigen nur begrenzte Kapazitäten. Die Gefahren von Teilchen in der Luft sind allgemein bekannt und zu den damit verbundenen Herstellungsproblemen kann es bei der Herstellung von Filterpatronen, die kleine Teilchen der stationären Phase umfassen, die in einem Filterelement eingeschlossen sind, leicht kommen. Herkömmliche Systeme haben auch eine begrenzte Kapazität, da mehr Teilchen in ein Filterelement gefüllt werden müssen um die Menge des abgetrennten Biomakromoleküls zu erhöhen. Eine höhere Beladung mit Teilchen führt zu einem Filterelement mit geringerer Porosität und damit verbundenen höheren Betriebsdrücken des Systems.

[0019] Die vorliegende Erfindung löst diese Probleme herkömmlicher Filter, indem die Handhabung von trockenen Teilchen der stationären Phase deutlich verringert wird und eine hohe Beladungskapazität der Teilchen bei relativ geringen Filterpatronendrücken geboten wird.

[0020] **Fig.** 1 ist eine schematische Darstellung eines Querschnitts eines erfindungsgemäßen Komposit-Filtermediums;

[0021] Fig. 2 ist eine Perspektivansicht des geprägten Profils eines erfindungsgemäßen Komposit-Filtermediums;

[0022] **Fig.** 3 ist eine Perspektivansicht eines zylindrisch gefalteten erfindungsgemäßen Filterelementes;

[0023] **Fig.** 4 ist eine Perspektivansicht der Halteteile für eine erfindungsgemäße zylindrische Filterpatrone;

[0024] **Fig.** 5 ist eine Perspektivansicht eines erfindungsgemäßen Trennfilteraufbaus;

[0025] **Fig.** 6 ist eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Trennsystems; und

[0026] **Fig.** 7 zeigt die Gelelektrophoresediagramme für ein gefärbtes Protein von ergleichsweisen Proteinen und dem gereinigten Protein dieser Erfindung.

[0027] **Fig.** 1 ist eine schematische Darstellung eines Querschnitts eines Komposit-Filtermediums **10**, das als Oberflächenfilterschicht **11** eine bevorzugte vliesartige Bahn umfasst, die aus einer oder mehreren einzelnen Schichten bestehen kann, auf deren stromaufwärtiger Oberfläche unlösliche Teilchen **12** der stationären Phase angeordnet sind. Die vliesartige Filterschicht **11**, die eine gleichmäßige Porosität und ausreichend definierte Poren besitzt, kann eine stromaufwärtige grobe Vorfilterschicht **13**, Filterschichten **14**, die mehrere vliesartige Filterschichten; deren Porosität stromabwärts immer feiner wird umfassen, und eine stromabwärtige vliesartige Deckschicht **15** umfassen.

[0028] **Fig.** 2 ist eine Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung. Es ist eine Perspektivansicht eines nicht gefalteten Teils eines Musters aus geprägten Formen **22** auf dem Komposit-Filtermedium **20** gezeigt, das zur Herstellung von Filterpatronen verwendet wird. Das Prägen erfolgt, um die Oberfläche der Vorderseite zu vergrößern und die Oberfläche des Filterelementes vollständiger zu definieren. Wegen der besseren Übersicht sind die unlöslichen Teilchen der stationären Phase in dieser Darstellung weggelassen worden.

[0029] Fig. 3 ist eine Perspektivansicht eines länglichen zylindrischen gefalteten Filterelementes **30** gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung; es sind die radialen Falten **32** des bevorzugten erfindungsgemäßen gemischten, radial gefalteten Filterelementes 30 gezeigt; der Klarheit halber sind die Teilchen der stationären Phase wiederum weggelassen worden.

[0030] **Fig.** 4 ist eine Perspektivansicht, die die inneren und äußeren ergänzenden Halteteile für die zylindrische Filterpatrone **40** zeigt, die eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung darstellt. Die äußere Haltestruktur **41**, wie ein Gitterstoff oder ein Sieb mit einer Vielzahl von Löchern, kann bei einer Fluidströmung von innen nach außen einen zusätzlichen Halt bieten, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zerbrechens des Filterelementes geringer wird. In ähnlicher Weise kann eine innere Haltestruktur **42**, die aus einem Gitterstoff oder einem Sieb besteht, oder ein poröses Gehäuse oder ein ähnlicher Aufbau einen Halt bieten, um im bevorzugten Fall mit einer Fluidströmung von außen nach innen das Zusammenbrechen des Filterelementes (nicht gezeigt) bei der Anwendung eines hohen Drucks zu verhindern. In beiden Fällen sind die zusätzlichen Haltestrukturen normalerweise an die Endstücke **43** der Filterpatrone angebracht, wodurch eine integrierte Einheit bereitgestellt wird.

[0031] **Fig.** 5 ist eine Perspektivansicht des erfindungsgemäßen Trennfilteraufbaus **70**, dies stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar. Das Filtergehäuse **71** enthält eine Filterpatrone (nicht gezeigt). In diesem Trennkreis ermöglicht die Einlassöffnung **72**, dass das Lösungsgemisch die Filterpatrone in der bevorzugten Richtung von außen nach innen betritt. Die Flüssigkeit verlässt den Trennfilteraufbau **70** durch die Auslassöffnung **73**. Bei einem bevorzugten Aufbau ist ein Trennkopf **74** mit einer mechanischen Klemmeinrichtung **75**, die einen mit Gewinde versehenen Bolzen (nicht gezeigt) mit einem die Spannung einstellenden Regelknopf **76** verwendet, an das Filtergehäuse **71** angebracht. Im Trennkreis ermöglicht die Einlassöffnung **77**, dass die die Bindung umkehrende Lösung in der bevorzugten Richtung von außen nach innen in die Filterpatrone gelangt, und die entstandene Lösung, die nun das gelöste gewünschte Biomakromolekül enthält, verlässt den Trennfilteraufbau **70** durch die Auslassöffnung **78**.

[0032] Fig. 6 ist eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Trennsystems **80**. Das Reservoir **81** enthält die wässrige Suspension 82 der Teilchen der stationären Phase und/oder das Biomakromolekül-Lösungsgemisch **82**, wobei mit einer Rührvorrichtung **83** gerührt wird: Die Suspension oder Lösung **82** wird mit der Pumpe **85** aus der Auslassleitung **84** durch den Trennfilteraufbau **86** (der die Teilchen der stationären Phase enthält, die auf der stromaufwärtigen Oberfläche der Filterschicht der Filterpatrone (nicht gezeigt) angeordnet sind) und durch die Einlassleitung **87** zurück in das Reservoir gepumpt (die Pfeile zeigen die Strömungsrichtung der Flüssigkeit).

[0033] **Fig.** 7 zeigt ein Elektrophoresegel **90** aus gefärbtem Polyacrylamid. Die Spur A zeigt das Elektrophoresediagramm für die Proteinabtrennung, das mit einem käuflichen Gemisch (von Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden erhältlich) bekannter Proteine erhalten wurde (in der Größenordnung der zunehmenden Wanderungsdistanz vom Ursprung aufgeführt; es ist auch das ungefähre Molekulargewicht in Dalton angegeben): Phosphorylase b (94000), Rinderserumalbumin (67000), Ovalbumin (43000), Carboanhydrase (30000), Trypsin-Inhibitor der Sojabohne (20100) und α-Lactalbumin (14400). Die Spur B zeigt die große Anzahl von Proteinen, die Kryo-armes Human-Blutplasma umfassen. Die Spur C zeigt das Elektrophoresediagramm für Proteine von käuflichen Human-Immunoglobulinen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), und die Spur D zeigt das Elelctrophoresediagramm für Proteine des Proteineluats von Beispiel 5.

[0034] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Abtrennung und Reinigung eines Biomakromoleküls bereit, das ein Trennsystem umfasst, das eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende enthält, die ein Komposit-Filtermedium umfasst, das eine Filterschicht einschließt, die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit Teilchen der stationären Phase beladen ist, die ein Makromolekül binden können. Der Trennfilteraufbau umfasst eine Flüssigkeitsfilterpatrone, die das vorstehend beschriebene Filterelement einschließt, und ein geeignetes Patronengehäuse für das Filterelement, das mit einem Reservoir einer Lösung verbunden ist, die ein Biomakromolekül oder vorzugsweise zwei oder mehr Biomakromoleküle umfasst. Die Filterpatrone ist durch eine geeignete Leitung mit einer Pumpe verbunden, die. die Lösung, die ein ausgewähltes Biomakromolekül einschließen kann, das durch Binden an ein Teilchen abgetrennt werden soll, oder eine eluierende Lösung, um das gebundene Biomakromolekül freizusetzen, durch das Filterelement und wieder in das Reservoir leiten kann, so dass die entstandene Lösung wiederholt im Kreislauf durch das Filterelement geleitet werden kann, um ein weiteres ungebundenes Biomakromolekül einzufangen, wodurch die Trennung abgeschlossen wird, oder, falls erwünscht, das gebundene Biomakromolekül eluiert wird.

[0035] Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zur Abtrennung oder Reinigung eines Biomakromole-

küls bereit, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
1) Bereitstellen eines Trennsystems, enthaltend eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende, die ein Komposit-Filtermedium umfasst, das eine Filterschicht einschließt, die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit Teilchen der stationären Phase beladen ist, die durch Adsorption, Ionenaustausch, hydrophobe Bindung oder Affinitätsbindung ein Biomakromolekül binden können, ein Reservoir, das ein Lösungsgemisch enthält, das ein oder mehr als ein Biomakromolekül als gelösten Stoff umfasst, eine Pumpe und eine damit verbundene Leitung, wodurch ein Aufbau in Form eines geschlossenen Kreislaufs gebildet wird;
2) Pumpen des Lösungsgemisches im Kreislauf durch den Filterpatronenaufbau, so dass das ausgewählte Biomakromoleküls an Teilchen der stationären Phase gebunden wird, wobei das Pumpen durch das Filterelement mit einer Durchflussrate von mindestens 0,01 cm/min, vorzugsweise mindestens 0,10 cm/min und stärker bevorzugt mindestens 0,30 cm/m n bei einem Filterpatronendruck von höchstens 0,25 MPa erfolgt;
3) gegebenenfalls Waschen des Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase mit einer geeigneten Flüssigkeit, um unerwünschte Biomakromoleküle und andere gelöste Stoffe zu entfernen, die nicht durch die ausgewählte bindende Wechselwirkung durch Adsorption, Ionenaustausch, hydrophobe Bindung oder Affinität an die Teilchen der stationären Phase gebunden sind, in einem offenen Kreislauf oder einem Verfahren mit einmaligem Durchlauf, und
4) gegebenenfalls Pumpen, vorzugsweise eines geringeren Volumens (verglichen mit dem ursprünglichen Volumen des Lösungsgemisches) einer die Bindung aufhebenden Lösung, die einen gelösten Stoff enthält, die die bindende Wechselwirkung des Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase umkehrt, so dass das abgetrennte und gereinigte Biomakromolekül freigesetzt wird.

[0036] In Stand der Technik erfolgte das Entfernen der Teilchen durch Filtration von flüssigen Strömen, indem einer der folgenden Filtrationsmechanismen oder eine Kombination davon angewendet wurde, und gegenwärtig sind Flüssigfilterpatronen kommerziell erhältlich, die nach jedem Mechanismus arbeiten. Die vorliegende Erfindung verwendet eine Modifikation dieser Filterpatronen, wobei die Filterschichten in einem Durchfluss-Trennungssystem Teilchen der stationären Phase zurückhalten.

i) Tiefenfiltration

[0037] Dieses Verfahren ist eines, bei dem ein Teilchen enthaltender flüssiger Strom einem Filterelement gegenübersteht, das eine Verteilung von bemessenen Löchern oder Poren aufweist und dem Teilchen eine ziemlich gewundenen Weg durch die Filterschicht bietet. Im Stand der Technik wurden die Teilchen hauptsächlich durch Adsorption und/oder Einfangen in der Filterschicht selbst entfernt. Die Tiefenfiltration, oft das grobe oder erste Filtrationsverfahren, das bei einem System angewendet wird, und ein Verfahren, das so gestaltet ist, um Teilchen mit einer Größe von einigen hundert µm (im Durchmesser – größte Abmessung) bis etwa 1 µm zu entfernen, zeigt die Probleme des unvollständigen Entfernens der Teilchen aufgrund unzureichend definierter Porengrößen und konstanter schnell ansteigender Filterpatronendrücke, wenn der Filter beladen wird.

ii) Oberflächen(Kuchen)-Filtration

[0038] Dieses Verfahren ist in der vorliegenden Erfindung bevorzugt und erfolgt bei der Behandlung eines Flüssigkeitsstroms oft im Anschluss an die Tiefenfiltration. Im Stand der Technik wurde es im Allgemeinen mit mehreren Schichten aus Glas- oder Polymermikrofasern durchgeführt, die gut definierte Porengrößen aufwiesen, und die Teilchen drangen im Allgemeinen nicht in die Filterschicht ein sondern blieben auf der stromaufwärtigen Oberfläche der Schicht gefangen. Teilchengrößen hinunter bis zu etwa 1,0 µm wurden mit einer Wirksamkeit von 99,99% aufgefangen. Hohe Durchflussraten ließen sich leicht erreichen, und es wurden relativ große Mengen von Teilchen bei relativ geringen Systemdrücken entfernt, bis der Filter fast voll war. In der vorliegenden Erfindung kann es System entfernt, bis der Filter fast voll war. In der vorliegenden Erfindung kann es vorteilhaft sein, die Filterteilchen auf der Oberfläche der Filterschicht zu entfernen oder umzugruppieren, indem der Flüssigkeitsstrom mehrmals umgekehrt wird; diese Möglichkeit gibt es bei Tiefenfiltern nicht.

iii) Membran(Gitter oder Sieb)-Filtration

[0039] Dieser Filtermechanismus ist der Oberflächenfiltration sehr ähnlich, außer dass exakt definierte, sehr kleine Poren vorliegen, die praktisch alle Teilchen mit einer Größe von nur 0,05 µm entfernen können. Obwohl eine "absolute" Kontrolle der im Strom verbleibenden Teilchen möglich ist, begleiten diesen Filtermechanismus ebenfalls die Probleme geringer Strömungsraten, einer geringen Kapazität, hohe Drücke und des Verstopfens.
[0040] Die vorteilhaften erfindungsgemäßen Oberflächenfilterpatronen schließen die üblichen senkrechten gefalteten Filter gemäß US-Patent 3,058,594 und besonders bevorzugt die waagerechten gemischten radial gefalteten Filter gemäß US-Patent 4,842,739 ein. Die waagerechte Anordnung der Falten (wie in **Fig.** 3 ge-

zeigt) ist in der vorliegenden Erfindung bevorzugt, da die Filterpatronen im Allgemeinen senkrecht verwendet werden und in den waagerechten Falten ein höherer Prozentsatz von Teilchen zurückgehalten wird, wenn der Strom unterbrochen wird und die Patrone zwischen den Anwendungen gelagert wird. Andere Filterpatronen, wie Tiefenfilter mit einer aufgewickelten Schnur, mit Harz gebundene oder sprühgesponnene Tiefenfilter können ebenfalls verwendet werden, ihnen fehlt jedoch im Allgemeinen die Fähigkeit, soviel Partikel wie die Oberflächenfilter aufzunehmen, während gleichzeitig relativ geringe Systemdrücke beibehalten werden.

[0041] Übliche zylindrische, senkrecht gefaltete Filterpatronen sind von Ameteck Inc. (Sheboygan, WI in vielen Größen, z. B. 4,8 × 24,8 cm (Durchmesser × Höhe), 6,7 × 24,8 cm, 6,7 × 50,8 cm, 11,4 × 24,8 cm und 11,4 × 50,8 cm, mit Materialien des Filterelementes, z. B. Cellulose, Cellulose-Polyester, Glas-Cellulose, Polyester, Polypropylen und Keramik, und mit mittleren nominellen Porengrößen, z. B. 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 und 50 μm erhältlich. Bevorzugte zylindrische, waagerechte, radial gefaltete, gemischte Oberflächenfilterpatronen, die nur aus Polypropylen aufgebaut sind, können von 3M Filtration Products (St. Paul, MN) in vielen Größen, z. B. 6,4 × 25,0 cm, 6,4 × 50,0 cm, 6,4 × 75,0 cm und 18,0 × 100,0 cm, und mit durchschnittlichen nominellen Porengrößen von 2, 5, 10 und 20 μm geliefert werden. Kleinere Wegwerf-Kapselfilter, die für Trennungen im kleineren Umfang vorteilhaft sind, sind von Gelman Sciences, Inc. (Ann Arbor, MI) in vielen Größen, z. B. 6,3 × 6,4 cm, 5,8 × 17 cm und 8,6 × 14 cm, mit Materialien des Filterelementes, z. B. Polyamid, wie mit Acryl beschichtetes Nylon und Polypropylen, und mit durchschnittlichen nominellen Porengrößen, z. B. 1,3 und 5 μm, erhältlich.

[0042] Obwohl die Wechselwirkungen beim Binden (Trennschritt) und Eluieren (Isolationsschritt) mit Filterpatronengehäusen durchgeführt werden können, die von den Herstellern von Filterpatronen erhältlich sind, besitzen diese Gehäuse im Allgemeinen nur einen Satz Einlass- und Auslassöffnungen. Dadurch lässt sich die sehr erwünschte Konzentration des gereinigten Biomakromoleküls nur schwer erreichen, wenn die die Bindung aufhebende Lösung eingeführt wird. Ein bevorzugtes Filterpatronengehäuse, das nur aus Polypropylen aufgebaut ist und das von Ultra Filter Systems (Brooklyn Center, MN) erhältlich ist, besitzt einen zusätzlichen Satz Einlass- und Auslassöffnungen mit geringerer Größe. Dieser Satz kleinerer Öffnungen kann vorteilhaft ausgenutzt werden, um die Aufhebung der Bindung des Biomakromoleküls in einem im Allgemeinen deutlich geringeren Gesamtvolumen der Lösung durchzuführen, so dass das gereinigte Biomakromolekül in diesem Verfahren auch in einer stärker konzentrierten Lösung erhalten wird.

[0043] Die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Filtermediums umfasst vorzugsweise eine oder mehrere vliesartige Schichten, auf deren stromaufwärtige Oberfläche unlösliche Teilchen der stationären Phase regellos- angeordnet sind. Aus mechanischer Sicht und im Hinblick auf die verwendeten Lösungsmittel sind die Zusammensetzungen der Filtermedien nicht kritisch, wenn die Trennungen durchgeführt werden, da fast ausschließlich Wasser verwendet wird und im Wesentlichen alle vorstehend genannten Materialien der Filterschicht in Wasser im Allgemeinen gut arbeiten. Aufgrund seiner Verfügbarkeit, seiner Kosten und Inertheit stellt Polypropylen ein bevorzugtes Material dar.

[0044] Die Auswahl der Porengröße der Filterschicht hängt direkt vom Größenbereich der Teilchen der stationären Phase ab, die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche zurückgehalten werden sollen, und entspricht im Allgemeinen der kleinsten Teilchengröße. Es wurde jedoch bestimmt, dass selbst dann vorteilhafte Komposit-Filtermedien erhalten werden können, wenn ein Teil der Teilchen kleiner als die Porengröße der Filterschicht ist. Aufgrund des vorstehend genannten Verfahrens zur Herstellung von teilweise beladenen Filtermedien gelangen diese kleineren Teilchen in den ersten Zyklen durch das Filterelement, in den späteren Zyklen, wenn sich die Teilchen zu einem Bett ansammeln, nimmt die Vorrichtung die Eigenschaft eines Tiefenfilters an, und diese kleineren Teilchen können in dieser Erfindung ebenfalls entfernt und verwendet werden. Im Interesse der zeitlichen Ausbeute und der Ausnutzung der Filterpatrone ist es jedoch bei der bevorzugten Art der Oberflächenfiltration bevorzugt, eine Einheit einer Oberflächenfilterpatrone zu verwenden, bei der mindestens 95% der Teilchen der stationären Phase im ersten Durchgang durch den Filter entfernt werden. Im Allgemeinen erfüllt eine Filterpatrone, die nominell für durchschnittlich 1 bis 10 μm ausgelegt ist, diese Kriterien und stellt ein wirksames Filterelement für die in dieser Erfindung verwendeten Teilchen bereit und kann auch relativ hohe Durchflussraten bei geringen Filterpatronendrücken liefern. Filterschichten mit durchschnittlichen Porengrößen von weniger als 1,0 μm, wie poröse, faserfreie Membranen, sind im Allgemeinen nicht vorteilhaft, da sie dazu neigen, nicht nur durch zufällige Teilchen, die vorhanden sein können, sondern sogar durch suspendiertes biologisches Material zu verstopfen, das oft mit hochkonzentrierten biologischen Lösungsgemischen verbunden ist.

[0045] Für die Zwecke dieser Erfindung kommt es durch eine der nachstehenden Wechselwirkungen oder eine Kombination davon dazu, dass die Teilchen der stationären Phase die Biomakromoleküle, die in den Lösungsgemischen von Interesse sind, binden oder eine starke Assoziation damit eingehen: Adsorption, Innenaustausch, hydrophobe Assoziation und Affinitätsbindung. Die Größen der Teilchen der stationären Phase, die in dieser Erfindung vorteilhaft sind, kann eine Verteilung aufweisen, bei der ein kleiner Anteil, zum Beispiel weniger als 5%, Submikrongröße hat (größter Durchmesser), und die bis zu einigen Millimetern reicht, wobei dies von der Art der verwendeten Filterpatrone abhängt. Eine Diskussion und Einwendungen bezüglich der Unter-

grenze der Größe der Teilchen wurden bereits im Zusammenhang mit der Auswahl einer Filterschicht mit der geeigneten Porengröße aufgeführt. Die Obergrenze für die Teilchengröße hängt von der bestimmten Art der Filterpatrone ab und wird letztendlich durch die Trennung der Falten- oder Knickspitzen bestimmt. Die Teilchengrößen müssen kleiner als der Abstand zwischen den Einlässen der Falten- oder Knickspitzen sein, so dass das Eindringen in und auf die stromaufwärtige Oberfläche der Falten oder Knicke des Filterelementes erfolgen kann. Als praktische Arbeitsrichtlinie hat die Erfahrung gezeigt, dass vorzugsweise eine deutlich kleinere Teilchengröße, das heißt etwa 1/5 oder weniger des Abstandes zwischen den Falten/Knickspitzen, verwendet wird, um zu verhindern; dass Teilchenaggregate den Abstand zwischen den Falten/Knickspitzen überwinden. Eine wichtige Eigenschaft der vorliegenden Erfindung ist, dass im Allgemeinen eine größere Menge des ausgewählten Biomakromoleküls abgetrennt werden kann, wenn ein teilchenförmiger Träger verwendet wird, der eine relativ große Oberfläche besitzt. Die Oberfläche beträgt vorzugsweise mindestens 10 m^2/g, stärker bevorzugt mindestens 50 m^2/g und besonders bevorzugt mindestens 100 m^2/g und sogar bis zu 5000 m^2/g (durch Gasadsorptionsmessungen bestimmt). Die Teilchengrößen der Materialien der stationären Phase liegen vorzugsweise bei einem Durchmesser im Bereich von Submikron bis 400 µm, stärker bevorzugt von 1 bis 200 µm und besonders bevorzugt von 10 bis 100 µm.

[0046] Verschiedene Wechselwirkungen zwischen den gelösten Stoffen und den Teilchen der stationären Phase können relativ schwache Anziehungskräfte, wie Dipol-Dipol-, Ionen-Dipol- und Ionen-Ionen-Wechselwirkungen, beinhalten. Dass in der vorliegenden Erfindung die Biomakromoleküle mit einem Molekulargewicht von mindestens 500 wirksam gebunden werden, beruht darauf dass einige dieser Wechselwirkungen innerhalb eines relativ großen Kontaktbereichs zwischen Biomakromolekül und stationärer Phase auftreten können, was zu einer starken reinen Anziehungskraft führt.

[0047] Die Adsorptionschromatographie nutzt die bindende Assoziation polarer Gruppen auf der stationären Phase und die große Vielfalt polarer Gruppen auf den Biomakromolekülen aus. Diese bindenden Assoziationen liegen im Allgemeinen in Form von Dipol-Dipol- und Ionen-Dipol-Wechselwirkungen vor. Die Bindungs- oder Trennphase des Reinigungsverfahrens erfolgt gewöhnlich aus einer wässrigen gepufferten Lösung mit einer relativ geringen Innenstärke, so dass die vorstehend genannten bindenden Assoziationen zwischen der stationären Phase und dem gelösten Biomakromolekül auf einen Höchstwert gebracht werden können, so dass das Binden erfolgt. Nach dem Waschen mit einer gepufferten wässrigen Lösung mit geringer Innenstärke enthält die gewöhnlich verwendete eluierende Lösung eine relativ große Menge gelöster Salze und weist eine damit verbundene hohe Ionenstärke auf, so dass die Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den gelösten Salzen das Biomakromolekül aus der stationären Phase verdrängen und sich das Biomakromolekül wieder löst und in reinerer Form aus dem Trennsystem gewonnen werden kann.

[0048] Bevorzugte Teilchen der adsorbierenden stationären Phase schließen Hydroxyapatit (von BioRad Laboratories, Richmond, CA erhältlich), Aluminiumoxid (von EM Separations, Gibbstown, NJ erhältlich), Kieselgel (ebenfalls von EM Separations erhältlich) und Zirconiumdioxid (in US-Patent 5,015,373 offenbart) ein.

[0049] Die Ionenaustauschchromatographie nutzt die Tatsache aus, dass viele Biomakromoleküle ionisch geladen sind. Außerdem können viele dieser ionisch geladenen Gruppen, z. B. protoniertes Amin und Carboxylat, durch eine Änderung des pH neutral oder ungeladen werden. Das bietet ein empfindliches und sehr leistungsfähiges Verfahren zum Abtrennen von Biomakromolekülen auf der Basis ihrer isoelektrischen Punkte, die oft mit einem pI-Wert angegeben werden, der der pH-Wert ist, bei dem die Ladungsneutralität vorliegt oder die Anzahl der negativ geladenen Gruppen und der positiv geladenen Gruppen in einer Struktur gleich ist. Wenn der pH oberhalb des pI gehalten wird, kann ein Anionenaustauschharz zum Binden des Biomakromoleküls verwendet werden; wenn andererseits der pH kleiner als der pI ist, kann ein Kationenaustauschharz das Binden und Entfernen des Biomakromoleküls aus dem Lösungsgemisch vornehmen. Mit diesem Verfahren können selbst kleine Unterschiede der zugänglichen oder Oberflächenladungen auf den Biomakromolekülen zu wirksamen Trennungen führen. Nach dem Waschen des unlöslich gemachten Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase erfolgt im Allgemeinen das Eluieren des gebundenen Biomakromoleküls aus einem Ionenaustauschteilchen der stationären Phase durch Einbringen einer relativ hohen Konzentration einer Salzlösung, deren entsprechende Ionen das Biomakromolekül von den Teilchen der stationären Phase austauschen und verdrängen.

[0050] Vorteilhafte Ionenaustauschteilchen der stationären Phase sind von verschiedenen Händlern erhältlich, einschließlich Pharmacia LKB Biotechnology, Inc. (Piscataway, NJ), Toso Haas (Philadelphia, PA), EM Separations (Gibbstown, NJ) und Biosepra, Inc. (Marlborough, MA). Vorteilhafte Anionenaustauschharze sind Agarose, Dextran und Cellulosepolymere, die so modifiziert wurden, dass sie Diethylaminoethyl- und quaternäre Ammoniumgruppen enthalten. Kationenaustauschharze sind die gleichen Basispolymere, weisen jedoch Carboxylat- und Sulfonatgruppen auf.

[0051] Die Chromatographie durch hydrophobe Wechselwirkung nutzt das Prinzip "Gleiches löst sich gleich" und die Hydrophobie vieler Biomakromoleküle aus. Die Einlagerung hydrophober Teile eines Biomakromoleküls in hydrophobe Taschen der Teilchen der stationären Phase führt zu einer bindenden Assoziation und Trennung des Biomakromoleküls aus dem Lösungsgemisch. Das Verfahren erfolgt gewöhnlich durch Binden aus

einer wässrigen Lösung mit relativ hoher Innenstärke. Auf diese Weise hat das Biomakromolekül eine etwas ungewisse Löslichkeit, das fängt damit an, dass es fast aus der Lösung "ausgesalzt" wird und sich leicht mit einem hydrophoben festen Träger bindet. Das Eluieren erfolgt gewöhnlich unter Verwendung einer wässrigen Lösung mit einer geringeren Innenstärke (und einer höheren Wirksamkeit des Lösungsmittels für das Biomakromolekül); in einer anderen Ausführungsform können organische Lösungsmittel, wie Aceton, Acetonitril, Ethanol, Methanol und N,N-Dimethylformamid in Mengen bis zu 50 Gew.-% mit Wasser als Colösungsmittel verwendet werden, um das Biomakromolekül aus dem unlöslichen Komplex mit dem Teilchen der stationären Phase zu entfernen.

[0052] Vorteilhafte Teilchen der stationären Phase mit einer hydrophoben Wechselwirkung können neben anderen Händlern von Pharmacia bezogen werden und sind Agarose- Grundträger. Alle Teilchen der stationären Phase mit hydrophober Wechselwirkung können modifiziert werden, indem Butyl-, Octyl- und Phenylgruppen eingeführt werden.

[0053] Die Affinitätschromatographie arbeitet im Allgemeinen durch kovalentes Binden eines Liganden oder eines biospezifischen Effektors an das Teilchen der stationären Phase. Dieser Ligand oder Effektor wird aufgrund seiner Fähigkeit ausgewählt, durch eine "Schlüssel-Schloss"-Wechselwirkung mit einem Biomakromolekül in Wechselwirkung zu treten. Wenn zum Beispiel ein Protein das Biomakromolekül darstellt, dessen Abtrennung erwünscht ist, ist der kovalent gebundene Ligand oder Effektor oft ein Substrat oder Inhibitor ("Schlüssel"-Molekül), das eine starke Bindung mit der aktiven Stelle (dem "Schloss") des Proteins eingeht. Die hohe Selektivität dieses Verfahrens ermöglicht die Reinigung eines Biomakromoleküls aus einem komplexen Gemisch in einem Schritt. Obwohl das Eluieren oft durch einfache Änderung des pH erfolgt, sind die die Bindung aushebende Lösungen und Verfahren für jedes Paar aus Biomakromolekül-Ligand spezifisch, und vom Hersteller kann man bestimmte Instruktionen bekommen.

[0054] Vorteilhafte Teilchen der stationären Phase für die Affinitätschromatographie sind von Pharmacia, Toso Haas, EM Separations, Biosepra, Inc. und 3M Bioapplications (St. Paul, MN) erhältlich. Es steht eine Vielzahl von teilchenförmigen Grundträgern, einschließlich Agarose, Cellulose und Vinylpolymere, z. B. von Pharmacia, Piscataway; NJ zur Verfügung, die verschiedene Liganden (mit entsprechenden Affinitäten für das Biomakromolekül) aufweisen, einschließlich: Arginin und Benzamidin (Serinproteasen), Cibacron Blue (Enzyme, die Adenyl enthaltende Cofaktoren erfordern; Albumin, Coagulationsfaktoren, Interferon), Calmodulin (ATPasen, Proteinkinasen, Phosphodiesterasen, Neurotransmitter), Gelatine (Fibronectine), Glutathion (S-Transferasen, von Glutathion abhängige Proteine, Fusionsproteine), Heparin (Wachstumsfaktoren, Gerinnungsproteine, Steroidrezeptoren, Restriktions-Endonucleasen, Lipoproteine, Lipasen), Proteine A und G (IgG und Unterklassen), L-Lysin (Plasminogen, Plasminogen-Aktivator, Ribosomen-RNA), Procion red ($NADP^+$-abhängige Enzyme, Carboxypeptidase G), Concanavalin A und Lectine (Glycoproteine, Membranproteine, Glycolipide, Polysaccharide) und DNA (DNA-Polymerase, RNA-Polymerasse, T_4-Polynucleotid-Kinase, Exonucleasen).

[0055] Nachdem die Filterpatronen, die Filtergehäuse und die Teilchen der stationären Phase beschrieben worden sind, wird nunmehr das Verfahren ausführlich beschrieben, durch das die Trennsysteme hergestellt werden. Dieses Verfahren beinhaltet die Schritte:

i) Bereitstellen eines Aufbaus mit einem geschlossenen Kreislauf, umfassend eine Filterpatrone, die ein erfindungsgemäßes Komposit-Filtermedium umfasst, die in einem Gehäuse. enthalten ist, ein Reservoir, das eine Suspension der unlöslichen Teilchen der stationären Phase in einer Flüssigkeit enthält, und eine Pumpe und eine damit verbundene Leitung, die eine Durchflussrate von mindestens 0,01 cm/min liefern kann;

ii) Pumpen der Suspension durch die Filterpatrone im Umlauf, bis die gewünschte Menge der Teilchen der stationären Phase aufgebracht ist; der Filterpatronendruck ist vorzugsweise kleiner als etwa 0,15 MPa, stärker bevorzugt kleiner als 0,10 MPa und besonders bevorzugt kleiner als 0,05 MPa; und

iii) Einführen eines biologischen Lösungsgemisches, das mindestens einen gelösten biomakromolekularen Stoff umfasst, in das Reservoir, so dass er in dem Trennfilteraufbau zirkulieren kann, damit eine Abtrennung des Biomakromoleküls erfolgt.

[0056] In dieser Erfindung vorteilhafte Pumpen liefern Durchflussraten durch die Filterpatrone von mehr als 0,01 cm/min, vorzugsweise mehr als 0,10 cm/min und stärker bevorzugt mehr als 0,30 cm/m n. Die Pumpen und die zugehörige Abdichtung und die zugehörigen Schläuche/Leitungen, durch die die Suspension und/oder das Lösungsgemisch, die bzw. das mehr als ein gelöstes Biomakromolekül aufweist, strömen, bleiben von der Lösung vorzugsweise chemisch relativ unbeeinflusst. Bevorzugte Pumpen schließen peristaltische Pumpen, Diaphragma-, Zahnrad- und Zentrifugalpumpen ein, bei denen die tatsächlichen Pumpenkomponenten, die mit der Lösung in Kontakt kommen, aus rostfreiem Stahl oder Polytetrafluorethylen (PTFE) aufgebaut sind. Die meisten Arten von Gummi- oder Plastikschläuchen/leitungen sind für in wässrigen Medien ausgeführte Packungen und Trennungen geeignet, wenn jedoch wässrige Gemische organischer Lösungsmittel verwendet werden, werden vorzugsweise Schläuche aus Polypropylen, Polyethylen, PTFE, rostfreiem Stahl und Glas verwendet. Bevorzugte Dichtungsmaterialien als Grenzfläche der Verbindung zwischen Filterpatronen und Filtergehäusen und dem Rest des Trennsystems schließen PTFE und Polypropylen ein.

[0057] Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren zur Herstellung einer "trockenen" Packung sichert das "feuchte" Packen der Teilchen auf der Filterschicht unter Verwendung eines flüssigen Trägers, dass die Teilchen in den Bereichen des Filterelementes angeordnet sind, in denen sie anschließend den Lösungsgemischen zugänglich sind. Die Teilchen werden in dem Sinne regellos auf der Filterschicht angeordnet, dass ihre Positionen nicht vorbestimmt sind, obwohl der Strom des flüssigen Trägers die letztendliche Anordnung der Teilchen beeinflussen kann. Beim Packen der Filterpatrone mit dem vorstehend genannten Verfahren ist es erwünscht, bei jeder Packfolge ziemlich schwache Konzentrationen der Teilchen in der Flüssigkeit zu verwenden, um eine relativ gleichmäßige partielle Beladung des Filterelementes zu erreichen: Die Teilchen können dem Reservoir portionsweise (entweder ohne Lösungsmittel, falls geeignet dicht und mit Wasser benetzbar, oder bereits suspendiert) zugesetzt werden, wobei zwischen jeder Portion der Inhalt des Reservoirs optisch klar erscheint. Die Durchflussrate des Packverfahrens beträgt vorzugsweise mindestens 0,01 cm/min, stärker bevorzugt mindestens 0,10 cm/m n und besonders bevorzugt mindestens 0,30 cm/min. Zusätzlich zu einer wirksamen Abtrennung der gewünschten Biomakromoleküle in Bezug auf Quantität und Zeit während der Trennphase sind während der Phase des Einfüllens der Teilchens insbesondere bei den bevorzugten gemischten radial gefalteten Filterpatronen relativ hohe Durchflussraten erwünscht, so dass die Teilchen besser in die Falten des gefalteten Filterelementes eindringen können, womit mehr vom Filterelement zugänglich und eine hohe Beladung erleichtert wird. Die Flüssigkeit, die zum Suspendieren der Teilchen der stationären Phase verwendet wird, ist im Allgemeinen das Lösungsmittel des Lösungsmittelgemisches und im Allgemeinen Wasser, vorzugsweise gepuffertes Wasser. Bei Teilchen der stationären Phase mit einer hydrophoben Wechselwirkung kann es besonders beim Elutionsschritt notwendig sein, in Kombination mit Wasser organische Flüssigkeiten zu verwenden. Vorteilhafte organische Flüssigkeiten schließen Methanol, Ethanol, Isopropanol, Acetonitril und N,N-Dimethylformamid – in Mengen von bis zu 50 Gew.-% ein.

[0058] Die Teilchen werden in das Reservoir gefüllt und schließlich auf die stromaufwärtige Oberfläche des Filterelementes gebracht, bis der Filterpatronendruck nicht mehr als 0,15 MPa, vorzugsweise nicht mehr als 0,10 MPa und stärker bevorzugt nicht mehr als 0,05 MPa erreicht. Ein praktischer Grenzwert für den Filterpatronendruck für eine bevorzugte vollständig beladene, gemischte, radial gefaltete Filterpatrone beträgt etwa 0,25 MPa. Als allgemeine Regel bei der Anwendung von Filterpatronen gilt, wenn Filterpatronendrücke von mehr als etwa 0,05 MPa erreicht werden, führt das anschließende Beladen mit weiteren Teilchen zu immer höheren Filterpatronendrücken. Besonders bei den empfohlenen geringeren Filterpatronendrücken bleiben die Durchflussraten der durch die Filtepatronen strömenden Lösungen jedoch hoch und in einem für die Zwecke dieser Erfindung erwünschten Bereich. Auf diese Weise kann die Einheit noch auf zusätzliche Teilchen reagieren, die wahrscheinlich mit anschließenden Trenn- und Behandlungsverfahren verbunden sind. Wenn ein Teil der Teilchenbeladungskapazität für den tatsächlichen Betrieb reserviert wird, werden Abschaltungen aufgrund einer Filterverstopfung vermieden und die Haltbarkeit der Filterpatrone kann verlängert werden.

[0059] Die mit Teilchen der stationären Phase beladene Filterpatrone ist nun als Trennfilter aufbau verwendungsbereit, um ein Biomakromolekül von einem hindurchströmenden Lösungsgemisch abzutrennen. Der Trennfilteraufbau und die Patrone sind in den **Fig.** 1 bis 5 schematisch gezeigt.

[0060] Nachdem die Teilchen aufgebracht sind, wodurch die Komposit-Filtermedien bereitgestellt werden, werden die Enden Einlass- und Auslassschläuche vom Reservoir entfernt (oder verbleiben, wenn das Packungsreservoir auch als Trennreservoir wirkt) und werden an ein Reservoir angebracht, das ein biologisches Lösungsgemisch enthält. Biologische Lösungsgemische können mehr als ein gelöstes Biomakromolekül umfassen, das eine Komponente oder ein Produkt einer Zelle ist (oder einmal war). Das gewünschte Biomakromolekül kann ein Produkt, das von einer Zelle ausgeschieden worden ist, oder eine intrazelluläre Komponente sein, die nach der Auflösung der äußeren Membran der Zelle oder der Zellwand erhalten worden ist. Vorteilhafte biologische Lösungsgemische schließen Fermentationsmedien, Zelllysate und Körperflüssigkeiten, wie Blut und Blutbestandteile, Bauchwasser und Urin ein.

[0061] Es ist normalerweise erwünscht, die größte Menge des gereinigten Biomakromoleküls innerhalb kürzester Zeit zu erhalten. Die Geschwindigkeit, mit der ein Lösungsgemisch durch das Komposit-Filtermedium strömt, d. h. die Durchflussrate, und im Kreislauf geführt wird, wurde in der vorliegenden Erfindung als wichtiges Leistungskriterium bestimmt. Ein sehr wichtiger Faktor ist, dass ein erfindungsgemäßer Trennfilteraufbau hauptsächlich aufgrund eines geringen Betriebsdrucks die Behandlung größerer Volumina der Lösungsgemische in einer vorgegebenen Zeit erlaubt. Andere Faktoren, die zu den hohen Leistungen des erfindungsgemäßen Trennfilteraufbaus beitragen können, sind: 1) die Möglichkeit, kleinere Teilchen der stationären Phase zu verwenden, die im Vergleich mit größeren Teilchen, die in gepackten Kolonnen verwendet werden, relativ große Oberflächen und geringere Diffusionsbeschränkungen aufweisen; 2) ein besseres Schermischen der gelösten Biomakromoleküle und der Teilchen der stationären Phase bei höheren Durchflussraten und 3) der Zugang zu einer größeren Anzahl von Teilchen, die tiefer in den Falten oder Knicken des Filterelementes enthalten sind, bei höheren Durchflussraten. Ein Durchflussrate des hindurchströmenden Lösungsgemischen von mindestens 0,01 cm/min ist bevorzugt, stärker bevorzugt sind mindestens 0,10 cm/min und besonders bevorzugt mindestens 0,30 cm/min.

[0062] Die erfindungsgemäßen Filterelemente finden bei einer Vielzahl biologischer Trennungen, einschließlich Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Nucleinsäuren und anderen biologischen Materialien, Verwendung. Die abgetrennten und gereinigten Makromoleküle sind vorteilhafte therapeutische und diagnostische Mittel.
[0063] Die Aufgaben und Vorteile der Erfindung werden durch die folgenden Beispiele weiter erläutert, die in diesen Beispielen genannten bestimmten Materialien und deren Mengen sowie auch der anderen. Bedingungen und Einzelheiten sollten diese Erfindung jedoch nicht unzulässig einschränken.

Beispiel 1

[0064] Dieses Beispiel beschreibt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Trennfilteraufbaus beim Abtrennen eines Biomakromoleküls aus einem Lösungsgemisch unter Ausnutzung der Adsorptions-Wechselwirkung.
[0065] Das in **Fig.** 6 gezeigte Trennsystem wurde aufgebaut, wobei ein 6 1 Becher als Packungs- und Trennreservoir; ein Trennfilteraufbau, bestehend aus einer waagerechten gemischten radial gefalteten Filterpatrone mit einer nominellen Porengröße von 2 µm, die nur als Polypropylen aufgebaut war und eine Filterschicht mit einer Oberfläche auf der Vorderseite von 0,84 m^2 aufwies (Modell 313 B, von 3M Filtration Products, St. Paul, MN erhältlich), und einem Filtergehäuse Lexan (Modell PSCL, von Ametek, Sheboygan, WI erhältlich); eine peristaltische Pumpe Masterflex (Modell 7549-30, von Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL. erhältlich); und ein Schlauch Masterflex Pharmed Norprene (Modell Nr. 6485-73, ebenfalls von Cole-Parmer erhältlich) verwenden wurden.
[0066] Eine Pufferlösung (410,005 M Natriumdihydrogenphosphat und 0,005 M Dinatriumhydrogenphosphat mit pH = 6,5) wurde in das Reservoir gegeben und Hydroxyapatit (Biogel HTP®, von Bio Rad Laboratories, Richmond, CA erhältlich) (60 g in Teilmengen von 5 g) wurde auf die stromaufwärtige Oberfläche der Filterpatrone aufgebracht, wobei eine Strömungsrate von 3800 ml/min (Durchflussrate = 0,45 cm/min) angewendet wurde. Ein Druckmessgerät, das sich auf der stromaufwärtigen Seite des Trennfilteraufbaus befand, zeichnete während des Beladungsverfahrens nur einen Druckanstieg von 0,02 MPa auf.

Trennphase:

[0067] Der Pufferlösung im Reservoir wurden 3,25 g Hämoglobin (vom Rind, von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO erhältlich) zugesetzt, das vorher in 500 ml Puffer gelöst worden war, und die Pumpe wurde mit einer Geschwindigkeit von 3800 ml/min gestartet. Innerhalb von 5 Minuten zeigte die UV-Analyse (Absorption bei 408 nm), dass 95% des Hämoglobins aus der Lösung im Reservoir entfernt worden waren.

Isolationsphase:

[0068] Der Inhalt des Reservoirs wurde weggegossen, und der Trennfilteraufbau wurde (in einem Durchlauf) mit 4 1 destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde eine eluierende Lösung (0,25 M Natriumdihydrogenphosphat und 0,25 M Dinatriumhydrogenphosphat mit pH = 6,5) (3300 ml) in das Reservoir gegeben. Das Pumpen begann mit 3800 ml/min, und 81% des gebundenen Hämoglobins, auf der Basis der UV-Absorptionen, wurde in 3 Minuten in 3300 ml der Lösung wiedergewonnen.

Beispiel 2

[0069] Dieses Beispiel zeigt das Prinzip der Verwendung und die Vorteile eines Trennfilter aufbaus mit unterschiedlichen Trenn- und Isolationskreisen, um die Konzentration eines Biomakromoleküls zu erhöhen.
[0070] Es wurde der in **Fig.** 5 gezeigte Trennfilteraufbau verwendet, der von Ultrafilter Systems (Brooklyn Center, MN) erhalten wurde. Die Einheit war ein reiner Polypropylenaufbau und eine Filterpatrone von 3M (Modell 313 B); die Passstücke des Trennkreises hatten einen Durchmesser von 1,50 cm (Innendurchmesser), wohingegen die Passstücke des Isolationskreises einen Durchmesser von 0,50 cm hatten. Wie in Beispiel 1 beschrieben wurde Hydroxyapatit (60 g) auf die Filterpatrone gegeben, wobei die gleiche Pufferlösung, die gleichen Mengen und die gleiche Durchflussrate verwendet wurden.

Trennphase:

[0071] Mit den 1,50 cm Passstücken und der in Fig. 6 gezeigten allgemeinen Anordnung mit einem Schlauch mit 0,90 cm (Innendurchmesser) wurde Hämoglobin (2,00 g) aus einem Gesamtvolumen des Systems von 6100 ml an Hydroxyapatit gebunden, wobei eine Durchflussrate von 0,45 cm/min verwendet wurde. Nach 30 Minuten zeigte die UV-Analyse, dass 95,8% des Hämoglobins aus der Lösung im Reservoir entfernt worden waren. Dann wurde die Einheit (in einem Durchlauf) mit destilliertem Wasser (**41**) gewaschen.

Isolations- und Konzentrationsphasen:

[0072] Das im Trennfilteraufbau verbleibende destillierte Wasser wurde durch die mittlere
[0073] Auslassöffnung (Passstück 0,50 cm) abgelassen. Mit dem Satz der kleineren Passstücke als beim Isolationskreis und einer kleineren Masterflex-Pumpe (Modell 7021-36), die mit einem Schlauch mit 0,50 cm (Innendurchmesser) ausgestattet war, wurde dann eine eluierende Lösung (650 ml) 3 Minuten mit 500 ml/min im Kreislauf durch die Patrone gepumpt, wie es in Beispiel 1 offenbart ist; die UV-Analyse der Lösung, die anschließend aus dem Aufbau gepumpt und abgelassen worden war, zeigte eine Wiedergewinnung von Hämoglobin von 51 %. Weitere 650 ml einer in ähnlicher Weise verwendeten, die Bindung umkehrenden Lösung entfernten weitere 19%. Folglich wurden 70% des Hämoglobins abgetrennt und in einer entfernten weitere 19%. Folglich wurden 70% des Hämoglobins abgetrennt und in einer stärker konzentrierten Form in 1300 ml Lösung, verglichen mit dem ursprünglichen Volumen von 6100 ml, aufgefangen.

Beispiel 3

[0074] Dieses Beispiel beschreibt die Verwendung von Ionenaustauschteilchen der stationären Phase zum Abtrennen eines Biomakromoleküls aus einem Lösungsgemisch, das mehr als ein Biomakromolekül enthält. Bei pH = 8,0 wurde Cytochrom C (pI = 9,6) (von Pferdeherzen, von Sigma erhältlich) positiv geladen und von den positiv geladenen, protovierten Diethylaminoethyl(DEAE)-funktionellen Teilchen der stationären Phase nicht gebunden. Auf der anderen Seite wurde Rinderserumalbumin (BSA, pI = 5,5) (von Miles Diagnostics, Kankakee, IL erhältlich) negativ geladen und bei pH = 8,0 gebunden.
[0075] Es wurde das Trennsystem von **Fig.** 6 verwendet, bei dem der Trennfilteraufbau aus einer Filterpatrone {Modell 313 B, 3M Filtration Products) und einem Filterpatronengehäuse, wie es in **Fig.** 5 gezeigt ist (Ultra Filter Systems), bestand. Das Reservoir enthielt 4 l Natriumcitrat-Pufferlösung (pH = 6,0), und DEAE Sepharose Fast Flow® (110–160 mÄqu./ml, von Sigma erhältlich) (500 ml) wurde im Verlauf von 30 Minuten portionsweise aufgebracht, wobei mit 3800 ml/min gepumpt wurde (Durchflussrate = 0,45 cm/min). Innerhalb des Packzeitraums wurde ein entsprechender Filterpatronendruck von etwa 0,01 MPa beobachtet. Eine Lösung (25 mM, 3 1) des Puffers EPPS (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[3-propansulfonsäure]) (pH = 8,0) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wurde dann durch den Trennfilteraufbau gepumpt (ein Durchlauf), um den Citratpuffer der Packung zu ersetzen.

Trennphase:

[0076] Die Lösung im Reservoir wurde durch 3850 ml 25 mM EPPS-Puffer (pH = 8,0) ersetzt. Ein Lösungsgemisch, das aus 100 mg Cytochrom C (von Pferdeherzen, von Sigma erhältlich), 500 mg BSA und 40 ml EPPS-Puffer bestand, wurde dem Reservoir zugesetzt, womit das gesamte Volumen des Trennsystems auf 5350 ml gebracht wurde (3850 ml + 40 ml + 1460 ml (Volumen im Trennfilteraufbau und im Schlauch)). Das UV-Spektrum der Lösung im Reservoir wurde aufgezeichnet, wobei der Absorption bei 280 nm besondere Aufmerksamkeit zukam, die 0,199 betrug (hauptsächlich aufgrund von BSA); Cytochrom C zeigte einen hauptsächlichen Peak bei 408 nm (A = 0,231). Die Pumpe arbeitete mit 3000 ml/min (Durchflussrate = 0,36 cm/min), und alle 2 Minuten wurden aliquote Mengen aus dem Reservoir entnommen. Es musste etwa 20 Minuten im Kreislauf gepumpt werden, bis die Absorption bei 280 nm nicht mehr abnahm; die Absorption bei 408 nm blieb in allen aliquoten Mengen im Wesentlichen unverändert. Somit blieb Cytochrom C in Lösung, wohingegen BSA auf den Teilchen der stationären Phase im Trennfilteraufbau ionisch

Isolationsphase:

[0077] Zuerst wurde der Trennfilteraufbau mit 3 125 mM EPPS gewaschen (ein Durchlauf). Dann wurde mit dem gleichen Kreis, d. h. den 1,5 cm Passstücken, 1 m NaCl durch die Einheit gepumpt (ein Durchlauf) (Durchflussrate = 0,36 cm/m n). Die UV-Analyse des Elutionsmittels zeigte, dass in den ersten 3 1 67% des gereinigten BSA erhalten worden waren.

Beispiel 4

[0078] Dieses Beispiel beschreibt die Abtrennung von BSA und Cytochrom C durch hydro phobe bindende Wechselwirkung.
[0079] Der Träger Macro Prep® t-Butyl HIC Support (von Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA erhältlich), der eine Kohlenwasserstoffpolymerhauptkette und gebundene t-Butylgruppen aufweist, wurde. als Teilchen der stationären Phase mit hydrophober Wechselwirkung verwendet. Der Träger bestand aus Kügelchen, die einen nominellen Kugeldurchmesser von 50 µm aufweisen; das Material war als Suspension in 20 Gew.-% Etha-

nol-Wasser erhältlich, und der Trockengehalt des Polymers betrug 18,6 Gew.-%. Dieses Material (40 ml der Suspension, 7,68 g) wurde in 5 ml Portionen in ein Reservoir gegeben, der 2 M Ammoniumsulfat enthielt. Die Teilchen wurden nach dem Verfahren von Beispiel 1 auf die stromaufwärtige Oberfläche einer Polypropylenfilterpatrone gegeben (3M, Modell **313B**), die mit der Konfiguration verwendet wurde, wie sie in dem in **Fig.** 6 gezeigten Trennsystem darstellt ist, wobei eine Strömungsrate von 4926 ml/min (Durchflussrate = 0,59 cm/min) verwendet wurde; das Gesamtvolumen des Systems betrug 6004 ml und der pH lag bei 5,4.

[0080] Es erfolgten vorläufige UV-Analysen wuden bei Cytochrom C und in Kombination mit einem gleichen Gewicht von BSA. Die Absorptionsverhältnisse bei 280 nm/408 nm für Cytochrom C betrugen 0,148/0,453 = 0,327 und in Kombination mit BSA betrug das Absorptionsverhältnis 0,179/0,461 = 0,388.

[0081] Dann wurde das Trennsystem mit 300 mg Cytochrom C und 300 mg BSA beaufschlagt, indem die Proteinfeststoffe in das Reservoir gegeben wurden und gerührt wurde. Nach dem Auflösen begann die Pumpe mit der vorstehend genannten Durchflussrate, und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aliquote Mengen mit 1 ml abgezogen, und es wurden die optischen Dichten bei 280 und 408 nm gemessen. Die Werte sind in der nachstehenden Tabelle 1 gezeigt.

TABELLE 1

Zeit (min)	Optische Dichte (OD) bei 280 nm	OD bei 408 nm	Verhältnis 280/408
5	0,174	0,466	0,373
10	0,174	0,460	0,366
15	0,167	0,460	0,363
30	0,163	0,456	0,357
45	0,161	0,452	0,356
60	0,164	0,455	0,360

[0082] Die Werte in Tabelle 1 zeigen, dass das stärker polare Cytochrom C in der Lösung verblieb, wohingegen das relativ hydrophobe BSA (in der Nähe seines pI von 5,6) selektiv auf den Teilchen der stationären Phase des Trennfilteraufbaus gebunden wurde.

[0083] Zu diesem Zeitpunkt kann der Aufbau in einem Durchlauf mit 2 M Ammoniumsulfat gewaschen werden, um alle nicht spezifisch gebundenen Biomakromoleküle zu entfernen.

[0084] Das BSA kann dann abgetrennt werden, indem eine eluierende Lösung, die aus einer Lösung mit geringerer Innenstärke, wie 0,1 m Ammoniumsulfat besteht, vorzugsweise beim gleichen pH, durch die Einheit geleitet wird.

Beispiel 5

[0085] Dieses Beispiel beschreibt die Verwendung eines erfindungsgemäßen Trennfilteraufbaus, um bestimmte Biomakromoleküle von einem Lösungsgemisch abzutrennen, das viele Biomakromoleküle umfasst, wobei die Affinitäts-Wechselwirkung ausgenutzt wird.

[0086] Es wurde eine modifizierte Version des Trennsystems von **Fig.** 6 verwendet, bei der die Filterpatrone einen waagerechten, gemischten radial gefaltete Filter mit einer nominellen Porosität von 2 µm umfasste, der eine Oberfläche von 0,37 m^2 aufwies (von 3M Filtration Products, St. Paul, MN erhältlich). Die stromabwärtige Seite des Trennfilteraufbaus enthielt auch einen direkten Monitor für die UV-Absorption (Modell UA-5, von ISCO Instrument Co., Lincoln, NE erhältlich): Eine Pufferlösung (4 1), die aus 0,15 M Natriumchlorid, 0,003 M Natriumdihydrogenphosphat und 0,017 M Dinatriumhydrogenphosphat bestand (pH = 7,4), wurde in das Reservoir gegeben und mit einer Strömungsrate von 4000 ml/min (Durchflussrate = 1,08 cm/min) im Kreislauf durch das System geführt. Der Filteraufbau wurde sorgfältig entlüftet, um die gesamte eingeschlossene Luft zu entfernen. EMPHAZE® Biosupport Media, mit rekombinantem Protein A derivatisiert (80 ml, von 3M Bioapplications, St. Paul, MN erhältlich) wurde in aliquoten Mengen von 20 ml in das Packungsreservoir gegeben und auf die stromaufwärtige Oberfläche des Filterelementes aufgebracht, wobei mit 4000 ml/min im Kreislauf gepumpt wurde. Nachdem alle Protein Afunktionellen Teilchen der stationären Phase aufgebracht worden waren, wurde die Strömungsrate des Systems 2 Minuten auf 6000 ml/min erhöht, um sicherzugehen, dass die Teilchen in den Faltenknicken abgelagert wurden. Dann wurde die Strömungsrate des Systems auf 1000 ml/min verringert, und der Aufbau wurde in einem Durchlauf mit 6 1 Pufferlösung gewaschen. Zu diesem Zeit-

punkt wurde der Strom des Systems unterbrochen, und das Packungsreservoir wurde durch ein 41 Polypropylenreservoir ersetzt, das mit einem Magnetrührstab ausgestattet war, um das Trennverfahren durchzuführen.

Trennphase:

[0087] Das Trennreservoir wurde mit 2000 ml der eben beschriebenen Pufferlösung gefüllt, und die Strömungsrate des Systems betrug 1000 ml/min (Durchflussrate = 0,27 cm/min). Dem Reservoir wurde filtriertes Kryo-armes Human-Blutplasma (350 ml, von American Red Cross St. Paul Regional Blood Center, St. Paul, MN erhältlich) zugesetzt, und der Umlauf wurde 30 Minuten fortgesetzt. Dann wurde das System in einem Durchlauf mit 4 1 frischer Pufferlösung gewaschen.

Isolationsphase:

[0088] Das im Trennfilteraufbau eingefangene Protein wurde dann mit einer Lösung (2 l) eluiert, die aus 0,1 M Glycin und 2 Vol.-% Essigsäure bestand (pH = 2,2). Diese Lösung wurde 15 Minuten mit 1000 ml/min im Kreislauf durch den Aufbau gepumpt. Das eluierte Protein wurde dann abgetrennt, indem ein Durchlauf durch das System gepumpt wurde und dem Reservoir frischer Puffer zugesetzt wurde, bis insgesamt 4000 ml aufgefangen worden waren.
[0089] Dann wurde das Elutionsmittel analysiert, um die Identität, Reinheit und Konzentration der abgetrennten Proteine festzustellen. Die Analyse der chemisch reduzierten Proben des Eluats durch SDS-Gelelektrophorese (Pharmacia PhastGel®, Gel mit einem Gradienten von 8 bis 25% mit Silberfärbung) (**Fig.** 7) zeigte durch einen Vergleich mit einer authentischen kommerziellen Probe, dass das eluierte Protein fast völlig aus Immunoglobulinen bestand. Die Messung der optischen Dichte des gewonnenen Eluats bei 280 nm zeigte, dass die Proteinkonzentration etwa 0,27 g/l betrug. Folglich wurden aus 350 ml Blutplasma etwa 1,08 g reine Human-Immunoglobuline gewonnen. Das entspricht einer Ausbeute von etwa 31%, wenn die Immunoglobulinkonzentration im Kryo-armen Human-Plasma mit 10 g/l angenommen wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Abtrennung eines Biomakromoleküls, umfassend die Schritte:
a) Bereitstellen eines Trennsystems, enthaltend eine Filterpatrone mit einem geschlossenen Ende, die ein Komposit-Filtermedium umfasst; das eine Filtrationsschicht einschließt, die auf ihrer stromaufwärtigen Oberfläche teilweise mit Teilchen der stationären Phase beladen ist, die ein Biomakromolekül binden können, ein Reservoir, das ein Lösungsgemisch enthält, das mindestens ein Biomakromolekül als gelösten Stoff umfasst, und eine Pumpe und eine damit verbundene Leitung, wodurch ein Aufbau in Form eines geschlossenen Kreislaufs gebildet wird,
b) Pumpen des Lösungsgemischs im Kreislauf durch die Filterpatrone mit einer Durchflussrate von mindestens 0,01 cm/min, so dass das zumindest eine Biomakromolekül an die Teilchen der stationären Phase gebunden wird, wodurch ein Produkt aus B omakromolekül:Teilchen der stationären Phase erzeugt wird,
c) gegebenenfalls Waschen des Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase mit Flüssigkeit, um unerwünschte Biomakromoleküle und andere gelöste Stoffe zu entfernen, die nicht an die Teilchen der stationären Phase gebunden sind, und
d) gegebenenfalls Pumpen einer eluierenden Lösung, die die bindende Wechselwirkung des Produktes aus Biomakromolekül:Teilchen der stationären Phase umkehren kann, so dass das Biomakromolekül freigesetzt wird durch den Aufbau in Form eines geschlossenen Kreislaufs.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Teilchen der stationären Phase aus Teilchen ausgewählt sind, die durch Adsorption, Innenaustausch, hydrophobe Bindung und Affinitätsbindung binden können.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Pumpen des Lösungsgemischs durch die Filterpatrone bei einem Druck der Filterpatrone von höchstens 0,25 mPa mit einer Durchflussrate von mindestens 0,01 cm/min erfolgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Biomakromolekül aus einem Protein, einem Kohlenhydrat, einem Lipid und einer Nucleinsäure ausgewählt ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Komposit-Filtermedium ein gewebtes oder vliesartiges poröses Material umfasst.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Material des Filtermediums aus Cellulose, Glas, Polyolefin, Polyester, Polyamid und Keramik ausgewählt ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Material des Filtermediums Polypropylen ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei die Teilchen der adsorbierenden stationären Phase aus Hydroxyapatit, Aluminiumoxid, Kieselgel und Zirconiumdioxid ausgewählt sind.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Teilchen Teilchen der stationären Phase für die Affinitätschromatographie sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Biomakromolekül enthaltende Lösungsgemisch ein Gemisch umfasst, das aus Fermentationsmedien, Zelllysaten und Körperflüssigkeiten ausgewählt ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

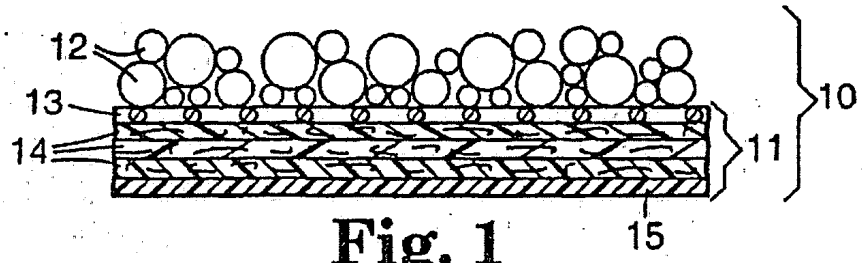

Fig. 1

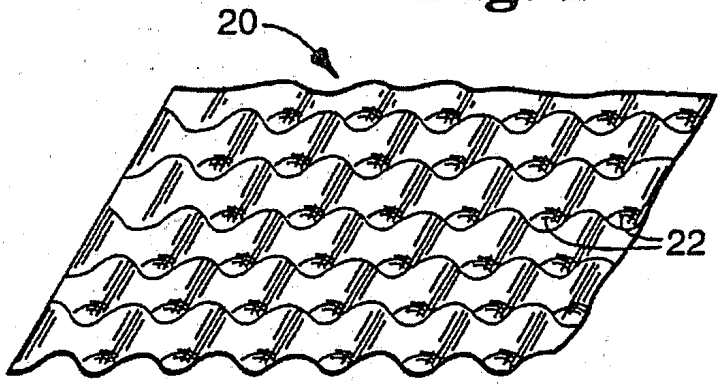

Fig. 2

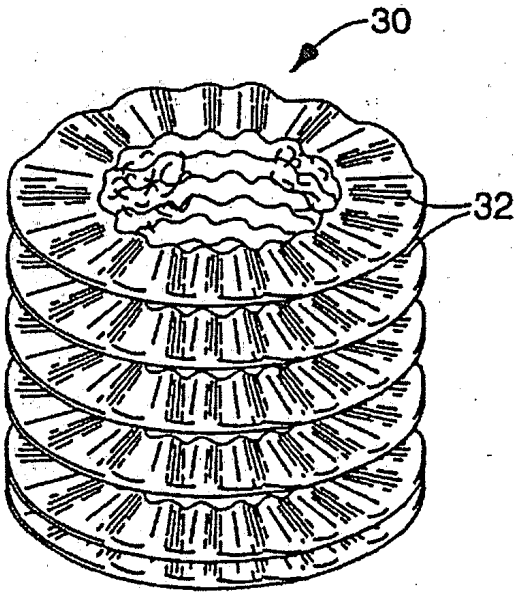

Fig. 3

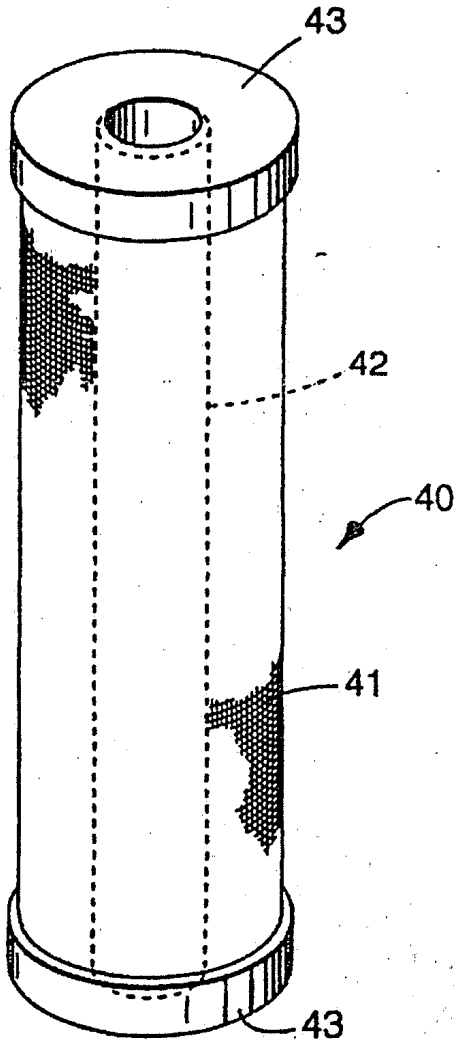

Fig. 4

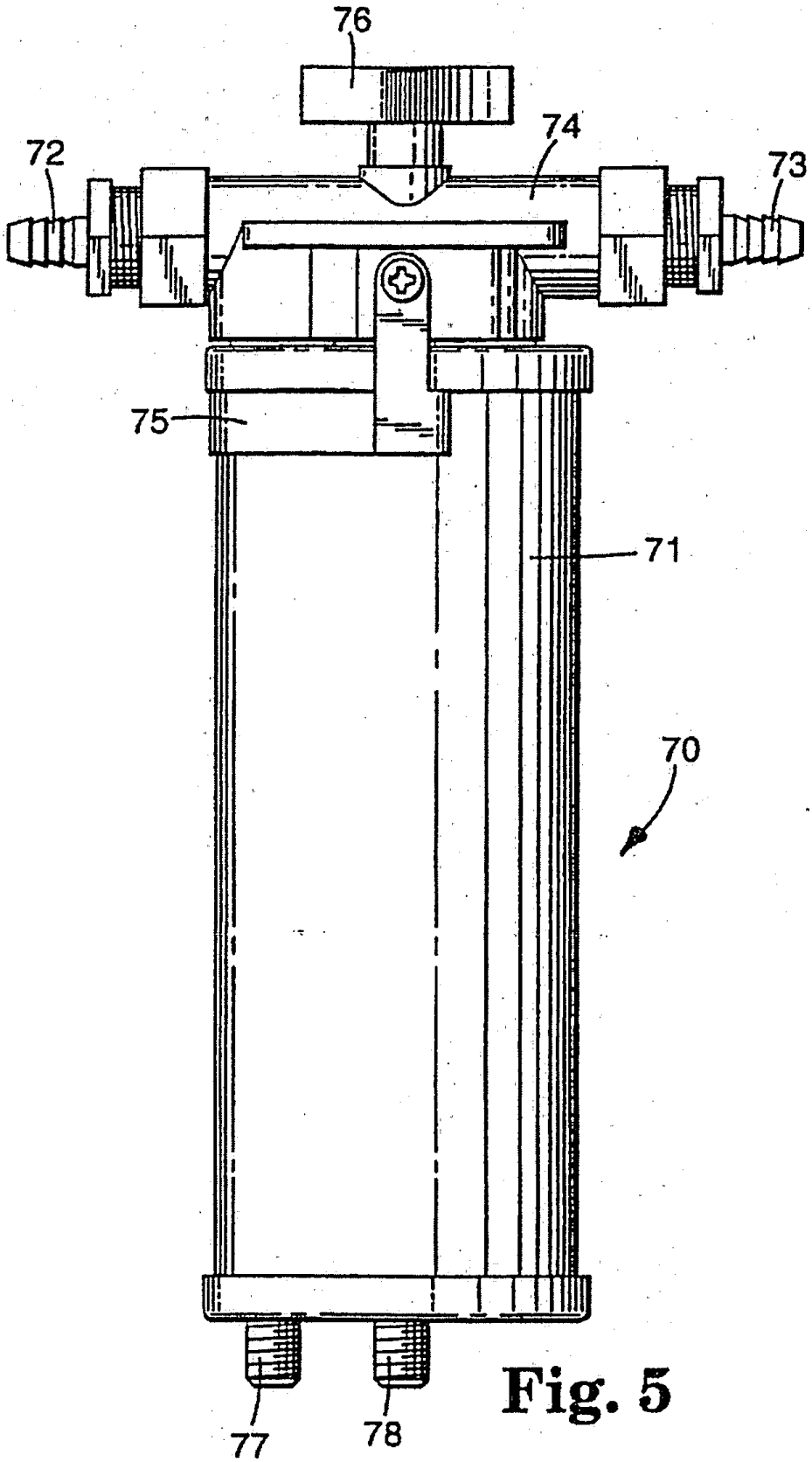

Fig. 5

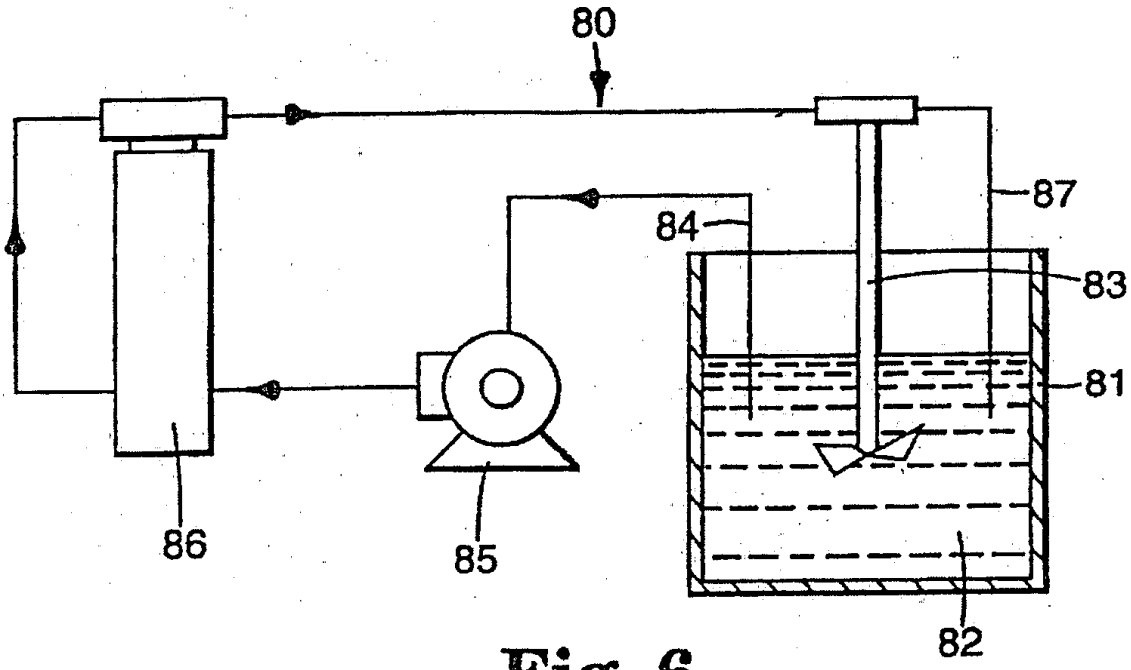

Fig. 6

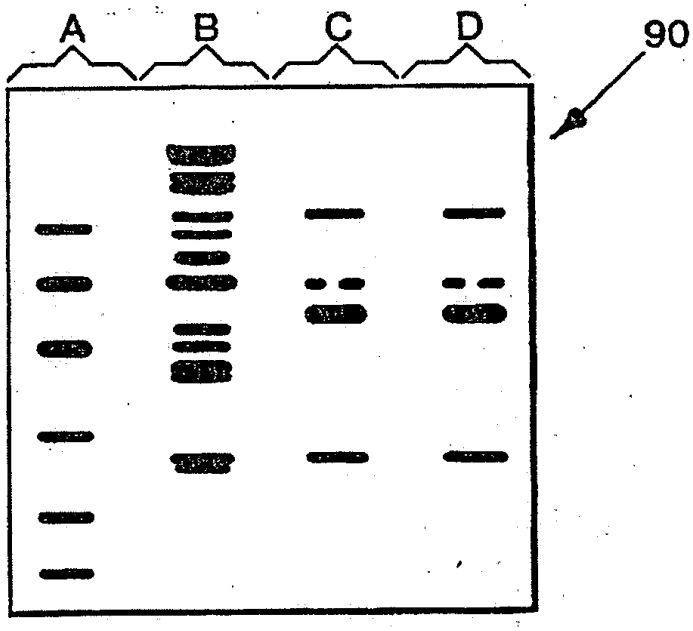

Fig. 7