



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 013 040 T2** 2009.07.02

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 697 416 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 16/06** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 013 040.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE2004/002007**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 809 180.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/061543**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.12.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.07.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.2006**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.07.2009**

(30) Unionspriorität:

0303532 23.12.2003 SE

(73) Patentinhaber:

GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE

(74) Vertreter:

**Hammonds LLP Rechtsanwälte Patentanwälte,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR**

(72) Erfinder:

**GLAD, Gunnar, S-751 84 Uppsala, SE;
JOHANSSON, Bo-Lennart, S-751 84 Uppsala, SE;
MALOISEL, Jean-Luc, S-751 84 Uppsala, SE;
NORRMAN, Nils, S-751 84 Uppsala, SE**

(54) Bezeichnung: **AUFREINIGUNG VON IMMUNGLOBULINEN**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Antikörperpräparation, insbesondere auf eine Trennungsmatrix zur Isolierung von Antikörpern. Des Weiteren umfasst die Erfindung eine Chromatographiesäule, welche die neuartige Matrix aufweist, und ein Verfahren zum Isolieren von Antikörpern.

Hintergrund

[0002] Das Immunsystem besteht aus vielen voneinander abhängigen Zelltypen, die den Körper gemeinsam nicht nur vor bakteriellen, parasitären, viralen und durch Pilze verursachten Infektionen schützen, sondern auch vor dem Wachstum von Tumorzellen. Die Wächter des Immunsystems sind die Makrophagen, die im Blutstrom ihres Wirts fortlaufend umherwandern. Wenn sie durch eine Infektion oder Immunisierung herausgefordert werden, antworten Makrophagen, indem sie Eindringlinge verschlingen, die mit als Antigene bekannten Fremdmolekülen markiert sind. Dieser durch T-Helferzellen vermittelte Vorgang löst eine komplizierte Kette von Antworten aus, die in der Stimulierung von B-Zellen resultieren. Diese B-Zellen erzeugen ihrerseits als Antikörper bezeichnete Proteine, die an den fremden Eindringling binden. Der Bindungsvorgang zwischen Antikörper und Antigen markiert den fremden Eindringling zur Zerstörung mittels Phagozytose oder Aktivierung des Komplementsystems. Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern bzw. Immunglobulinen, nämlich: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihren physiologischen Rollen, sondern auch in ihren Strukturen. Vom strukturellen Gesichtspunkt aus stellen IgG-Antikörper eine besondere Klasse von Immunglobulinen dar, die extensiv untersucht worden sind, vielleicht aufgrund der dominanten Rolle, die sie in einer vollentwickelten Immunantwort spielen.

[0003] Die biologische Aktivität, welche die Immunglobuline besitzen, wird heutzutage in einer Reihe verschiedener Anwendungen in der ärztlichen und tierärztlichen Diagnostik, der Gesundheitsvorsorge und dem therapeutischen Sektor genutzt. In der Tat sind in den letzten paar Jahren monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperkonstrukte zur größten Klasse von Proteinen geworden, die gegenwärtig in klinischen Studien erforscht werden und die Zulassung der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) als Therapeutika und Diagnostika erhalten. Komplementär zu Expressionssystemen und Herstellungsstrategien werden Aufreinigungsprotokolle entworfen, um hochreine Antikörper in einfacher und kosteneffizienter Weise zu gewinnen.

[0004] Herkömmliche Verfahren zur Isolierung von Immunglobulinen beruhen auf selektiver reversibler Fällung der die Immunglobuline umfassenden Proteinfraktion, während andere Proteingruppen in Lösung belassen werden. Typische Fällungsmittel sind Ethanol, Polyethylenglykol, lyotrope, also antichaotrope Salze, wie z. B. Ammoniumsulfat und Kaliumphosphat, und ferner Caprylsäure. Typischerweise ergeben diese Fällungsverfahren sehr unreine Produkte und sind zudem zeit- und arbeitsaufwendig. Darüber hinaus macht es die Zugabe des Fällungsmittels zum Rohmaterial schwer, den Überstand für andere Zwecke zu nutzen, und verursacht ein Entsorgungsproblem, das sich als besonders relevant erweist, wenn von Immunglobulinaufreinigung in großem Maßstab die Rede ist.

[0005] Die Ionenaustauschchromatographie stellt ein weiteres wohlbekanntes Verfahren zur Proteinfractionierung dar, das bei der Isolierung von Immunglobulinen häufig Anwendung findet. Da jedoch die geladenen Ionenaustauschliganden mit sämtlichen Verbindungen entgegengesetzter Ladung reagieren, kann die Selektivität der Ionenaustauschchromatographie etwas geringer ausfallen als jene anderer chromatographischer Trennungen.

[0006] Bei der Protein-A- und Protein-G-Affinitätschromatographie handelt es sich um beliebte und weitverbreitete Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Immunglobulinen, insbesondere zur Isolierung monoklonaler Antikörper, hauptsächlich aufgrund der einfachen Anwendung und der erzielten hohen Reinheit. Bei Einsatz in Kombination mit Ionenaustausch, hydrophober Interaktion, Hydroxylapatit- und/oder Gelfiltrationsschritten sind insbesondere Protein-A-basierte Verfahren für viele biopharmazeutische Unternehmen zum Antikörperaufreinigungsverfahren ihrer Wahl geworden. Allerdings besteht trotz deren gängiger Anwendung eine wachsende Notwendigkeit und ein zunehmender Bedarf für effiziente Alternativen, mittels derer vertraute Probleme angegangen werden, die mit Protein-A-basierten Medien einhergehen, wie z. B. die Kosten, das Lecken und die Instabilität bei erhöhten pH-Werten.

[0007] Chromatographie mit hydrophober Interaktion (HIC: Hydrophobic Interaction Chromatography) stellt

ebenfalls ein weithin beschriebenes Verfahren zur Isolierung von Immunglobulinen dar. Jedoch erfordern hydrophobe Matrizen die Zugabe lyotroper Salze zum Rohmaterial, um zu bewirken, dass das Immunglobulin wirksam bindet. Der gebundene Antikörper wird aus der Matrix freigesetzt, indem die Konzentration des lyotropen Salzes in einem kontinuierlichen oder schrittweisen Gradienten gesenkt wird. Falls ein hochreines Produkt erzielt werden soll, wird empfohlen, die hydrophobe Chromatographie mit einem weiteren Schritt zu kombinieren. So besteht ein Nachteil dieser Vorgehensweise im Erfordernis, lyotropes Salz zum Rohmaterial hinzuzugeben, wodurch sich für jenen, der das Verfahren in großem Umfang nutzt, erhöhte Kosten ergeben. Für andere Rohmaterialien als Zellkulturüberstände, z. B. Molke, Plasma und Eigelb, würde sich die Zugabe lyotroper Salze zu den Rohmaterialien bei großangelegten Anwendungen in vielen Fällen verbieten, weil das Salz jedwede wirtschaftlich machbare Verwendung des Immunglobulin-depletierten Rohmaterials verhindern könnte. Ein zusätzliches Problem bei Großanwendungen würde die Entsorgung mehrerer tausend Liter Abfallstoffe aufwerfen.

[0008] Die Chromatographie mit thiophiler Adsorption wurde als neuartiges chromatographisches Adsorptionsprinzip zur Isolierung von Immunglobulinen 1985 von J. Porath eingeführt (J. Porath, u. a.; FEBS Letters, Band 185, S. 306, 1985). In dieser Veröffentlichung ist beschrieben, wie mit Divinylsulfon aktivierte Agarose, gekoppelt mit verschiedenen Liganden, die eine freie Mercaptogruppe umfassen, eine spezifische Bindung von Immunglobulinen in Anwesenheit von 0,5 M Kaliumsulfat, d. h. einem lyotropen Salz, zeigen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Sulfongruppe, aus dem Vinylsulfon-Spacer, und der entstehende Thioether im Liganden eine strukturelle Notwendigkeit darstellen, um die beschriebene Spezifität und Fähigkeit zum Binden von Antikörpern zu erhalten. Später wurde jedoch nachgewiesen, dass der Thioether durch Stickstoff oder Sauerstoff ersetzt werden kann, falls der Ligand weiterhin ein aromatisches Radikal umfasst (K. L. Knudsen, u. a., Analytical Biochemistry, Band 201, S. 170, 1992). Obwohl die für thiophile Chromatographie beschriebenen Matrizen gemeinhin eine gute Leistung aufweisen, besitzen sie auch einen größeren Nachteil, nämlich den, dass lyotrope Salze zum Rohmaterial hinzugegeben werden müssen, um eine effiziente Bindung des Immunglobulins zu gewährleisten, und dies stellt aus den oben aufgezeigten Gründen ein Problem dar.

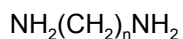
[0009] Weitere thiophile Liganden, gekoppelt an Epoxy-aktivierte Agarose, sind offenbart in (J. Porath, u. a., Makromol. Chem., Makromol. Symp., Band 17, S. 359, 1988) und (A. Schwarz, u. a., Journal of Chromatography B, Band 664, S. 83–88, 1995), z. B. 2-Mercaptopyridin, 2-Mercaptopyrimidin und 2-Mercaptothiazolin. Jedoch weisen all diese Affinitätsmatrizen nach wie vor Affinitätskonstanten auf, die inadäquat sind, um eine effiziente Bindung des Antikörpers ohne zugesetzte lyotrope Salze sicherzustellen.

[0010] US 6,498,236 (Upfront Chromatography) betrifft die Isolierung von Immunglobulinen. Das offenbarte Verfahren involviert die Schritte des Inkontaktbringens einer Lösung, die ein negativ geladenes Detergens umfasst und Immunglobulin(e) enthält, mit einer Festphasenmatrix, wodurch zumindest ein Teil der Immunglobuline an die Festphasenmatrix gebunden wird; und ferner des Inkontaktbringens der Festphasenmatrix mit einem Eluenten, um das Immunglobulin bzw. die Immunglobuline aus der Festphasenmatrix freizusetzen. Die Immunglobulin-haltige Lösung ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass sie einen pH-Wert im Bereich von 2,0 bis 10,0, einen Gesamtgehalt an Salz in Entsprechung zu einer ionischen Stärke von höchstens 2,0 und lyotrope Salze in einer Konzentration von maximal 0,4 M aufweist. Es wird angenommen, dass das Anhaften anderer Biomoleküle an die Matrix durch das in der Lösung vorhandene Detergens unterdrückt wird, und als Beispiele für dasselbe lassen sich Octylsulfat, Bromphenolblau, Octansulfonat, Natriumlaurylsarcosinat und Hexansulfonat anführen. Die Festphasenmatrix ist durch die Formel M-SP1-L definiert, wobei M das Matrix-Rückgrat und SP1 einen Liganden mit einer mono- oder bicyclischen aromatischen oder heteroaromatischen Einheit bezeichnet.

[0011] Liu, u. a. (Yang Liu, Rui Zhao, Dihua Shangguan, Hongwu Zhang, Guoquan Liu: Novel sulfmethazine ligand used for one-step purification of immunoglobulin G from human plasma, Journal of Chromatography B, 792 (2003) 177–185) untersuchten die Affinität von Sulfamethazin (SMZ) zu humanem IgG. So ist ein Ligand offenbart, der eine Sulfonylgruppe umfasst, wobei die R-Gruppe ein heterocyclischer Ring ist. Laut diesem Artikel wurde SMZ auf monodispersen, nicht porösen, vernetzten Poly(glycidylmethacrylat)-Kügelchen immobilisiert. Daraufhin wurden die Kügelchen in der Hochdruck-Affinitätschromatographie zur Isolierung von IgG aus humanem Plasma eingesetzt. Die maximale Adsorption wurde bei einem pH-Wert von 5,5 erzielt. Die Kügelchen wiesen eine minimale unspezifische Interaktion mit anderen Proteinen auf. Folglich waren die Liganden zum Adsorbieren von Antikörpern in der Lage, während ihre Interaktion mit anderen Proteinen gerade ausreichte, um eine Retardation derselben im verwendeten Adsorptionspuffer zu bewirken. Allerdings werden Esterverbindungen, etwa Methacrylat, bei erhöhten pH-Werten leicht hydrolysiert, was wohlbekannt ist. Ähnlich wie von Protein-A- und Protein-G-Matrizen wäre also von der darin offenbarten Trennungsmatrix zu erwarten, dass sie sich bei den üblicherweise eingesetzten CIP-(Cleaning in Place)-Verfahren als instabil erweist.

[0012] US 4,725,355 bezieht sich auf ein Medium zur Körperfluidreinigung, umfassend einen Träger und ein Adsorptionsmittel, das zumindest ein Sulfonamid beinhaltet, und zwar zum Adsorbieren und Entfernen einer pathogenen Substanz aus einem Körperfluid. Bei dem Sulfonamid handelt es sich um ein chemotherapeutisches Agens, insbesondere um ein Sulfonamid, das durch eine aromatische R-Gruppe bzw. aromatische R-Gruppen gekennzeichnet ist. Das Medium kann in einem Durchflussweg für das Körperfluid bereitgestellt werden, der in einem Behälter zwischen Ein- und Auslassöffnung für das Körperfluid vorgesehen ist.

[0013] EP 0 197 521 bezieht sich auf ein Immunglobulin-Adsorptionsmittel und eine Adsorptionsvorrichtung. Insbesondere ist ein Adsorptionsmittel für Immunglobulin offenbart, welches Adsorptionsmittel einen hydroxylhaltigen wasserunlöslichen Träger umfasst, an den eine Diaminverbindung gebunden worden ist. Die Diaminverbindung ist durch die folgende allgemeine Formel dargestellt:



wobei n für eine ganze Zahl mit einem Wert von 3 bis 9 steht. Die Verbindung ist durch ein Silankopplungsmittel oder ein Derivat desselben gebunden worden, wobei eine heterocyclische Verbindung durch ein difunktionelles Reagens an das Diamin gebunden ist. Somit sind die R-Gruppen aromatische Strukturen.

[0014] Allerdings besteht noch immer Bedarf für alternative Verfahren zur Aufreinigung von Antikörpern oder Antikörperkonstrukten, welche die Anforderungen bezüglich Reinheit, Sicherheit, Wirksamkeit und Kosteneffizienz erfüllen.

Kurzbeschreibung der vorliegenden Erfindung

[0015] Demzufolge besteht ein Aspekt der vorliegenden Erfindung in einer Trennungsmatrix, welche die Adsorption von Antikörpern bei geringen ionischen Stärken mit pH-Werten nahe neutral ermöglicht. Dies lässt sich durch eine Trennungsmatrix erreichen, wie sie in Anspruch 1 definiert ist.

[0016] Einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt eine Trennungsmatrix dar, die eine hochselektive Adsorption von Antikörpern ermöglicht.

[0017] Ein spezifischer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in einer Trennungsmatrix, an welche Antikörper adsorbiert werden, während andere Proteine ohne irgendeine wesentliche Interaktion durchgelassen werden.

[0018] Einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung bildet ein Verfahren zur Herstellung einer Matrix für die Trennung von Antikörpern, welche funktionelle Gruppen umfasst, welche die Adsorption von Antikörpern durch Interaktionen thiophiler Art, hydrophober Art und/oder Wasserstoffbindung ermöglichen, welches Verfahren es einfach macht, die Ligandenstruktur zu variieren. Dies ist erreichbar durch Immobilisieren von Aminen und/oder Polyaminen an einem porösen Träger und einen daran anschließenden Schritt, bei dem das Sulfonylieren der immobilisierten Amine erfolgt.

[0019] Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung besteht in einem Verfahren zum Isolieren von Antikörpern aus einer Flüssigkeit durch Adsorption derselben an eine Trennungsmatrix, welches Verfahren keinerlei Zugabe von Detergens erfordert, um eine Adsorption zu erzielen.

[0020] Weitere Aspekte und Vorteile der Erfindung gehen aus der folgenden detaillierten Beschreibung hervor.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0021] [Fig. 1](#) veranschaulicht einige ausgewählte Beispiele sulfonylierter Amine mit potentiellen Bindungspunkten an einem Träger.

Definitionen

[0022] Die Begriffe „Antikörper“ und „Immunglobulin“ werden hierin synonym gebraucht.

[0023] Unter dem Begriff „Ligand“ sind hierin Moleküle oder Verbindungen zu verstehen, die zur Interaktion mit Zielverbindungen, wie z. B. Antikörpern, in der Lage sind.

- [0024]** Der Begriff „Spacerarm“ bezeichnet hierin ein Element, das einen Liganden vom Träger einer Trennungsmatrix entfernt hält.
- [0025]** Ein „primäres Amin“ ist durch die Formel RNH_2 definiert, wobei R für eine organische Gruppe steht.
- [0026]** Ein „sekundäres Amin“ ist durch die Formel R_2NH definiert, wobei R für eine organische Gruppe steht.
- [0027]** Der Begriff „Sulfonamid“ wird hierin in seiner herkömmlichen Bedeutung verwendet, d. h. für jedwede chemische Verbindung, die ein oder mehrere Amide von Sulfonsäuren umfasst.
- [0028]** Eine Sulfonylgruppe ist durch die Formel $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ definiert, wobei R für eine organische Gruppe steht.
- [0029]** Der Begriff „Eluent“ wird in seiner auf diesem Gebiet herkömmlichen Bedeutung gebraucht, d. h. er bezeichnet einen Puffer mit passendem pH-Wert und/oder geeigneter ionischer Stärke, um eine oder mehrere Verbindungen aus der Trennungsmatrix freizusetzen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

- [0030]** In einem ersten Aspekt ist die vorliegende Erfindung eine Trennungsmatrix, die aus einem porösen Träger besteht, an dem Liganden immobilisiert worden sind, gegebenenfalls über Spacerarme, wobei die Liganden ein oder mehrere Sulfonamide umfassen und zumindest die R-Gruppe des Sulfonyls eine aliphatische Verbindung darstellt.
- [0031]** In einer Ausführungsform ist das Sulfonamid über seinen Stickstoff an den porösen Träger gekoppelt. Allerdings umfasst die vorliegende Erfindung auch Trennungsmatrizen, die aus Sulfonamiden bestehen, die in verschiedene Richtungen gekoppelt sind, also Liganden, die eine Mischung aus Amid-gekoppelten und Sulfon-gekoppelten Sulfonamiden darstellen.
- [0032]** In einer Ausführungsform umfassen die Liganden zumindest ein primäres oder sekundäres Amin.
- [0033]** Die Trennungsmatrix ist einsetzbar zur Isolierung, etwa zwecks Aufreinigung oder Analyse, von Antikörpern und anderen Verbindungen, welche äquivalente Bindungseigenschaften aufweisen, wie z. B. Fusionsproteine mit einem Immunglobulinteil oder Antikörperfragmente. Die Erfinder haben bewiesen, dass sich Antikörper bei hoher Kapazität und ausgezeichneter Selektivität mittels einer Trennungsmatrix aufreinigen lassen, die ein oder mehrere Sulfonamide umfasst. Im Gegensatz zur oben behandelten Erfindung aus US 6,498,236, welche aromatische oder heteroaromatische Einheiten als Ionenaustauschliganden zur Antikörperaufreinigung nutzt, erzielt die vorliegende Erfindung die Aufreinigung, ohne dass es notwendig wäre, Detergens zur Antikörper enthaltenden Flüssigkeit zu geben, bevor diese in Kontakt mit der Matrix kommt, welche ungeladene Liganden nutzt.
- [0034]** Wie wohlbekannt, besteht ein Sulfonamid aus einem Amin, wobei zumindest eine der R-Gruppen desamins eine Sulfonylgruppe darstellt. In einer Ausführungsform der vorliegenden Matrix ist die R-Gruppe des Sulfonyls eine aliphatische acyclische oder cyclische Gruppe, z. B. eine lineare Kette von 1–4, etwa 1 oder 2, Kohlenstoffen und/oder Heteroatomen, woraus ein oder mehrere Wasserstoffe mit Heteroatomen substituiert worden sein können. Während in einer Ausführungsform die aliphatische R-Gruppe des Sulfonyls eine Methylgruppe darstellt, bildet in einer alternativen Ausführungsform die aliphatische R-Gruppe des Sulfonyls eine Ethylgruppe.
- [0035]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Trennungsmatrix handelt es sich bei den Liganden um sulfonylierte Monoamine, wie z. B. Cysteamin oder Ammoniak. In einer alternativen Ausführungsform sind die Liganden sulfonylierte Polyamine, wie z. B. Triethylentetramin. Derartige sulfonylierte Polyamine können jedwede zweckmäßige Anzahl von Aminen umfassen, etwa 2–10. In einer veranschaulichenden Ausführungsform weist jedes Polyamin zwei bis sechs Amine auf.
- [0036]** In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Trennungsmatrix sind die Liganden in Form von Wiederholungseinheiten eines am Träger immobilisierten Polymers vorhanden. Beim Polymer kann es sich um ein beliebiges geeignetes Polyamin handeln, etwa um Polyalkylenimin. In einer Ausführungsform ist das Polymer ein Polyethylenamin. Wie Fachleute auf diesem Gebiet erkennen, ist es möglich, den Amingehalt eines solchen Polymers zu variieren, z. B. in einer Weise, dass es primäre und/oder sekundäre Amine in gewünschter Reihenfolge umfasst. So weist das Polymer in einer Ausführungsform zwei oder mehr verschiedene

Liganden auf. Aus geeigneten Monomeren lassen sich die Polymere problemlos nach Standardverfahren auf diesem Gebiet herstellen. Verfahren zum Koppeln der Polyamine an einen Träger sind ebenfalls wohlbekannt und von Fachleuten auf diesem Gebiet mühelos durchzuführen, z. B. mittels In-situ-Polymerisation oder Grafting von Polymeren, siehe z. B. PCT/SE02/02159 (Ihre, u. a.). Ein Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, dass sie die Möglichkeit eröffnet, die Eigenschaften der Trennungsmatrix zweckgemäß zu optimieren, z. B. durch Variation der Polymerlänge, -verzweigung, etc..

[0037] In einer Ausführungsform sind die Liganden acyclische Verbindungen.

[0038] Der poröse Träger der vorliegenden Trennungsmatrix kann aus einem beliebigen passenden Material bestehen. In einer Ausführungsform ist der Träger aus einem vernetzten Kohlenhydratmaterial, wie z. B. Agarose, Agar, Cellulose, Dextran, Chitosan, Konjac, Carrageen, Gellan, Alginat, etc.. Der Träger lässt sich gemäß Standardverfahren problemlos herstellen, etwa mittels der sog. Inverse Suspension Gelation (S. Hjertén: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393–398 (1964)). Als Alternative dazu ist der Träger im Handel als Produkt erhältlich, z. B. als Sepharose™ FF (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden). So handelt es sich in einer Ausführungsform der vorliegenden Matrix beim Träger um ein vernetztes Polysaccharid. In einer spezifischen Ausführungsform ist das Polysaccharid Agarose. Derartige Kohlenhydratmaterialien werden üblicherweise vor der Immobilisierung von Liganden derselben allyliert. Kurz umrissen, kann die Allylierung mit Allylglycidylether, Allylbromid oder irgendeinem anderen geeigneten Aktivierungsmittel unter Befolgung von Standardverfahren vorgenommen werden.

[0039] In einer alternativen Ausführungsform besteht der poröse Träger der vorliegenden Trennungsmatrix aus vernetzten synthetischen Polymeren, z. B. Styrol oder Styrolderivaten, Divinylbenzol, Acrylamiden, Acrylastern, Methacrylastern, Vinylestern, Vinylamiden, etc.. Träger derartiger Polymere sind gemäß Standardverfahren problemlos herzustellen, siehe z. B. „Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization“ (R. Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70–75 (1988)). Als Alternative dazu kann ein im Handel erhältliches Produkt, etwa Source™ (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden), erfindungsgemäß Oberflächen-modifiziert werden. Allerdings wird in dieser Ausführungsform die Oberfläche des Trägers vorzugsweise modifiziert, um dessen hydrophile Eigenschaften zu erhöhen, und zwar meist indem die Mehrheit der exponierten Rest-Doppelbindungen zu Hydroxylgruppen gewandelt wird.

[0040] Vorliegen kann die Trennungsmatrix in jedweder geeigneten Form, z. B. als Chromatographiematrix, etwa in Gestalt im Wesentlichen sphärischer Teilchen oder eines Monolithen; eines Filters oder einer Membran; eines Chips, einer Oberfläche, als Kapillaren oder dergleichen. So umfasst die vorliegende Erfindung weiterhin eine Chromatographiesäule, die mit einer Trennungsmatrix gepackt ist, wie oben beschrieben. In einer vorteilhaften Ausführungsform ist die Säule aus einem beliebigen herkömmlichen Material gefertigt, z. B. aus einem biokompatiblen Kunststoff wie Polypropylen oder aus Glas. Die Säule kann eine Größe besitzen, die sich für die Aufreinigung von Antikörpern im Labormaßstab oder im Großmaßstab eignet. In einer spezifischen Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Säule mit Luer-Adaptoren, Schlauchkonnektoren und Hutmuttern ausgestattet. Folglich umfasst die vorliegende Erfindung des Weiteren ein Kit, das besteht aus einer Chromatographiesäule, die mit einer Trennungsmatrix gepackt ist, wie oben beschrieben; aus zumindest einem Puffer und schriftlichen Anweisungen für die Aufreinigung von Antikörpern in separaten Fächern. In einer spezifischen Ausführungsform umfasst das vorliegende Kit außerdem Luer-Adapter, Schlauchkonnektoren und Hutmuttern.

[0041] In einem zweiten Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zum Herstellen einer Matrix für die Trennung von Antikörpern, welches Verfahren einen ersten Schritt umfasst, in welchen Amine und/oder Polyamine an einem porösen Träger immobilisiert werden, und einen nachfolgenden Schritt, in welchem das Sulfonylieren der Amine erfolgt. Der poröse Träger kann so sein, wie oben erläutert, und zur Immobilisierung lassen sich beliebige Standardverfahren einsetzen, siehe z. B. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Hermanson, u. a., Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia und Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992. Wie allerdings Fachleute auf diesem Gebiet erkennen, lassen sich, in Abhängigkeit von der Art des Liganden, einige der Trennungsmatrizen genauso gut durch Immobilisierung von Sulfonamiden direkt am Träger herstellen.

[0042] In einem dritten Aspekt ist die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Isolieren von Antikörpern aus einer Flüssigkeit, welches Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Bereitstellen einer Flüssigkeit, die zumindest einen Antikörper umfasst;
- (b) Inkontaktbringen der Flüssigkeit mit einer Trennungsmatrix, umfassend einen porösen Träger, an dem ein oder mehrere Sulfonamidgruppen immobilisiert worden sind, wodurch ein oder mehrere Antikörper an

die Matrix adsorbiert werden; und gegebenenfalls

- (c) Laufenlassen eines Eluenten über die Matrix, um einen oder mehrere Antikörper freizusetzen; und
- (d) Wiedergewinnen zumindest eines Antikörpers aus einer Fraktion des Eluenten.

[0043] In diesem Zusammenhang ist es selbstverständlich, dass der Begriff „Antikörper“ auch Antikörperfragmente und jedwedes Fusionsprotein einschließt, das einen Antikörper oder ein Antikörperfragment umfasst. So ist das vorliegende Verfahren nützlich zur Isolierung jedes beliebigen Immunglobulin-artigen Moleküls, das die Bindungseigenschaften eines Antikörpers aufweist. Bei der einen Antikörper enthaltenden Flüssigkeit kann es sich beispielsweise um eine Flüssigkeit handeln, die aus einer Antikörper erzeugenden Zellkultur stammt, oder um eine Fermentationsbrühe, aus der ein oder mehrere Antikörper aufgereinigt werden sollen. Alternativ dazu kann die Flüssigkeit Blut oder Blutplasma sein, aus dem ein oder mehrere Antikörper entfernt werden sollen, um eine diesbezüglich reine Flüssigkeit zu erhalten. Somit umfasst in einer Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens die in Schritt (a) bereitgestellte Flüssigkeit auch ein oder mehrere weitere Proteine, welche keine Antikörper sind. Wie im nachstehenden Versuchsteil dargelegt, ermöglicht das vorliegende Verfahren allgemein die selektive Adsorption von Antikörpern bei verhältnismäßig niedrigen ionischen Stärken. Unerwartet haben die Erfinder herausgefunden, dass die Verwendung einer porösen Trennungsmatrix, die eine oder mehrere Sulfonamidgruppen aufweist, die Adsorption von Antikörpern ermöglicht, während andere Proteine, welche keine Antikörper sind, nicht adsorbiert werden. Dementsprechend bietet das vorliegende Verfahren reine Antikörperpräparationen mit hohen Ausbeuten. Fachleute auf diesem Gebiet sind in der Lage, die optimalen Bedingungen für jede Sulfonamidligandenstruktur mittels Routineversuchen problemlos auszuwählen, wie nachstehend im Versuchsteil dargelegt. Beispielsweise ist es auf diesem Gebiet wohlbekannt, dass sich die Eigenschaften einer Trennungsmatrix optimieren lassen, und zwar durch Variation entweder der Natur des Gels – in diesem Fall der R-Gruppe des Sulfonamids – oder des Substitutionsgrads, d. h. der Ligandendichte auf dem Träger. Die Salzkonzentration im Adsorptionspuffer kann ebenfalls für jeden Liganden optimiert werden. So ist in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Adsorption aus Schritt (b) bei einer Salzkonzentration von etwa 0,25 M Na_2SO_4 vorgesehen. In einer spezifischen Ausführungsform umfassen die Liganden Monoamine, und Schritt (b) erfolgt bei einer Salzkonzentration über etwa 0,5 M Na_2SO_4 .

[0044] Im vorliegenden Verfahren kann eine Trennungsmatrix jedweder geeigneten Form genutzt werden, wie z. B. eine Chromatographiematrix, etwa in Gestalt im Wesentlichen sphärischer Teilchen oder eines Monolithen; eines Filters oder einer Membran; eines Chips oder dergleichen. Folglich ist in einer vorteilhaften Ausführungsform die Trennungsmatrix aus Schritt (b) in einer Chromatographiesäule vorgesehen.

[0045] Beim Träger und den Liganden der Trennungsmatrix aus Schritt (b) kann es sich um einen beliebigen Träger bzw. beliebige Liganden aus den oben beschriebenen handeln.

[0046] Wie zuvor erwähnt, hat die vorliegende Erfindung unerwartet gezeigt, dass der Einsatz der neuartigen Trennungsmatrix gemäß der Erfindung eine hochselektive Adsorption von Antikörpern bei neutralem pH-Wert ermöglicht. So wird in einer Ausführungsform Schritt (b) bei einem pH-Wert von 6,5–8,3, wie etwa bei 7,5–7,6, z. B. bei ungefähr 7,4, vorgenommen.

[0047] Die an die Säule adsorbierten Antikörper werden durch Standardelution leicht freigesetzt, z. B. durch die Benutzung eines Eluenten abnehmender ionischer Stärke. Demnach ist in einer Ausführungsform Schritt (c) eine Gradientenelution, deren Durchführung erfolgt, indem ein Eluent abnehmender Salzkonzentration zur Trennungsmatrix gegeben wird, vorzugsweise indem man den Eluenten über die Matrix laufen lässt. Der Gradient kann eine beliebige Form aufweisen, z. B. kann es sich um einen linearen oder schrittweisen Gradienten handeln. Weitere Elutionsschemen sind ebenfalls von Nutzen, wie z. B. das Hinzugeben eines kompetitiven Bindemittels zum Eluenten, das Hinzufügen einer Verbindung zum Eluenten, welche die adsorbierten Antikörper auf der Matrix deplaciert, z. B. ein Alkohol, ein Salz etc., oder das Vornehmen einer Temperaturveränderung, etc..

[0048] Als Alternative dazu wird die Elution aus Schritt (c) mithilfe einer Regulierung des pH-Werts durchgeführt, z. B. einer Senkung oder Erhöhung des pH-Werts. Eine Regulierung des pH-Werts kann auch mit einem Salzgradienten kombiniert werden, wie oben dargelegt. In einer spezifischen Ausführungsform wird Schritt (b) bei einem pH-Wert über neutral vorgenommen, und Schritt (c) besteht in einer Gradientenelution, die durch Hinzugeben eines Eluenten abnehmenden pH-Werts erfolgt.

[0049] Das vorliegende Verfahren ist von Nutzen, um jedwede Art von monoklonalem oder polyklonalem Antikörper zurückzugewinnen, wie z. B. Antikörper, die aus Säugerwirten stammen, etwa aus Mäusen, Nagern, Primaten und Menschen, oder Antikörper, die aus kultivierten Zellen, etwa aus Hybridomen, stammen. In einer

Ausführungsform sind die in Schritt (d) zurückgewonnenen Antikörper menschliche oder an den Menschen angepasste Antikörper. Die Antikörper können jeder beliebigen Klasse zugehören, d. h. sie können aus jener Gruppe ausgewählt sein, die sich aus IgA, IgD, IgE, IgG und IgM zusammensetzt. In einer spezifischen Ausführungsform handelt es sich bei den in Schritt (d) zurückgewonnenen Antikörpern um Immunglobulin G (IgG). Ferner umfasst die vorliegende Erfindung die Aufreinigung sowohl von Fragmenten jedes beliebigen der oben erwähnten Antikörper als auch von Fusionsproteinen, welche derartige Antikörper umfassen.

[0050] Das vorliegende Verfahren ermöglicht die quantitative Adsorption von Antikörpern. So umfasst es in einer Ausführungsform ein Verfahren gemäß der obigen Definition und zusätzlich einen Schritt (e), der im spektrometrischen Bestimmen der Antikörpermenge besteht. Solche Verfahren und die entsprechende Ausrüstung sind Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt. Ferner erweist sich das vorliegende Verfahren bei analytischen Vorgängen als dienlich.

[0051] Schließlich bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf eine Trennungsmatrix, die aus einem porösen Träger besteht, an dem Liganden, gegebenenfalls über Spacerarme, immobilisiert worden sind, wobei die Liganden eine oder mehrere Acetamidgruppen umfassen. Bei derartigen Acetamidgruppen kann es sich z. B. um Triethylentetramin handeln. Der Träger kann so beschaffen sein, wie oben in Bezug auf die Sulfonamidmatrix dargestellt. Die Immobilisierung von Acetamidgruppen an einem porösen Träger wird von Fachleuten auf diesem Gebiet unter Befolgung von Standardverfahren, etwa den obengenannten, problemlos vorgenommen. Ferner umfasst dieser Aspekt der Erfindung ein Verfahren der Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer Trennungsmatrix mit Acetamidliganden. Ein derartiges Verfahren ist nützlich zur Trennung von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, Viren, Nukleinsäuren, etwa DNA oder RNA, Plasmiden, etc.. Passende Bedingungen für Adsorption und Elution werden von Fachleuten auf diesem Gebiet mühelos ausgewählt.

Detaillierte Beschreibung der Zeichnung

[0052] [Fig. 1](#) veranschaulicht einige ausgewählte Beispiele sulfonylierter Amine mit potentiellen Anbindungspunkten an einen Träger. Insbesondere zeigt [Fig. 1](#) von links nach rechts Cysteamin und Ammoniak (in der oberen Zeile) sowie Diethylentriamin und Triethylentetramin (in der unteren Zeile).

VERSUCHSTEIL

[0053] Die vorliegenden Beispiele sind lediglich zu Anschauungszwecken angeführt und nicht als Einschränkung des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung aufzufassen, wie er durch die beigefügten Ansprüche definiert ist. Alle Quellenangaben, die nachstehend und an anderer Stelle in der vorliegenden Spezifikation erfolgen, sind hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen.

Beispiel 1: Herstellung einer Sulfonamid-Trennungsmatrix

[0054] Nachstehend wird die Herstellung einer Trennungsmatrix gemäß der Erfindung erläutert, wobei es sich bei der R-Gruppe des Sulfonyls um aliphatische Gruppen handelt.

Allgemeines:

[0055] Die Matrixvolumen beziehen sich auf das Volumen des Betts nach dem Packen.

[0056] In Gramm angegebene Matrixgewichte beziehen sich auf das Saug-Trockengewicht. Selbstverständlich handelt es sich bei diesen Matrizen nach wie vor um Wassersolvatisiertes Material.

[0057] Hinsichtlich einer Reaktion in großem Maßstab bezieht sich der Begriff „durchmischen“ auf einen motorgetriebenen Hängerührer, da der Einsatz eines Magnetstabrührers unverzüglich zur Beschädigung der Kügelchen führen würde. Reaktionen in kleinem Maßstab (bis zu 20 ml bzw. g Gel) wurden in verschlossenen Fläschchen durchgeführt, und der Begriff „durchmischen“ bezieht sich hierbei auf den Einsatz eines Schütteltisches.

[0058] Herkömmliche Verfahren wurden zur Analyse der Funktionalität und zur Bestimmung des Grads der Allylierung, der Epoxidierung oder des Grads der Substitution von Ionenaustauschergruppen auf den Kügelchen angewandt. Diese Verfahren wurden schließlich durch eine zusätzliche Elementaranalyse der Gels, insbesondere auf Schwefelatome, ergänzt.

[0059] Ein Weg zur Herstellung einer Trennungsmatrix gemäß der Erfindung ist nachstehend exemplarisch aufgeführt, und zwar ausgehend von einem vernetzten Agarosegel (Sepharose™ 6 FF, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Für jeden Schritt ist ein spezifisches Beispiel erläutert.

A. Einbringung einer Allylgruppe auf der Matrix

[0060] Sepharose™ wurde mit Allylglycidylether in der folgenden Weise aktiviert: Eine Menge von 100 g Sepharose™ 6 FF wurde auf 78 g sauggetrocknet, mit 0,4 g NaBH₄, 11 g Na₂SO₄ und 60 ml 50%-iger wässriger NaOH-Lösung vermischt. Bei 50°C wurde das Gemisch eine Stunde lang durchmischt. Nach Zugabe von 80 ml Allylglycidylether wurde die Suspension bei 50°C weitere zwanzig Stunden lang kräftig durchmischt. Nach Filtration des Gemischs wurde das Gel nacheinander mit 500 ml destilliertem Wasser, 500 ml Ethanol, 200 ml destilliertem Wasser, 200 ml 0,2 M Essigsäure und 500 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Titration ergab einen Substitutionsgrad von 0,4 mmol Allyl/ml Gel.

B. Einbringung von Amingruppen auf der Matrix

[0061] Abgesehen von Cysteamin, dessen Immobilisierung unter spezifischen Bedingungen radikalischer Addition erfolgte, wurden die Amingruppen auf der Matrix direkt via das Stickstoffatom der Amingruppen eingebracht. In einer typischen Vorgehensweise wurde das Koppeln an die Matrix vorzugsweise mittels der Bromierung der Allylgruppe und der nukleophilen Substitution unter basischen Bedingungen vorgenommen.

Cysteamin-Sepharose™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

[0062] Eine Menge von 10 g Allyl-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde mit Dioxan gewaschen und in ein Reaktionsgefäß transferiert, das eine Lösung von Cysteamin-HCl (1 g) in 12 ml Dioxan enthielt. Die Reaktion wurde auf 70°C erhitzt, und AIBN (0,9 g) wurde hinzugegeben. Bei 70°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml Dioxan, 3 × 10 ml Ethanol, 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml wässriger 0,5 HCl und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Das Cysteamin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,34 mmol Amine/ml Gel erhalten.

Aktivierung von Allyl-Sepharose™ via Bromierung

[0063] Brom wurde zu einer durchmischten Suspension aus 100 ml Allyl-aktivierter Sepharose™ 6 FF (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel), 4 g AcONa und 100 ml destilliertem Wasser gegeben, bis eine beständige gelbe Farbe erhalten wurde. Daraufhin wurde Natriumformiat hinzugefügt, bis die Suspension vollständig entfärbt war. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Gel mit 500 ml destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurde das aktivierte Gel direkt in ein Reaktionsgefäß transferiert und mit dem geeigneten Liganden weiter umgesetzt.

Diethylentriamin-Sepharose™

[0064] Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung von Diethylentriamin (12,5 ml) enthielt. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml wässriger 0,5 HCl und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Diethylentriamin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,56 mmol Amine/ml Gel erhalten.

Triethylentetramin-Sepharose™

[0065] Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung von Triethylentetramin (12,5 ml) enthielt. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml wässriger 0,5 HCl und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Triethylentetramin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,62 mmol Amine/ml Gel erhalten.

Pentaethylenhexamin-Sepharose™

[0066] Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung von Pentaethylenhexamin (12,5 ml) enthielt. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml wässriger 0,5 HCl und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Pentaethylenhexamin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,61 mmol Amine/ml Gel erhalten.

Polyethylenimin-Sepharose™

[0067] Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung aus 12,5 ml Polyethylenimin (50% in Wasser) enthielt. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml wässriger 0,5 HCl und schließlich mit 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Polyethylenimin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,45 mmol Amine/ml Gel erhalten.

Ammoniak-Sepharose™

1) Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,32 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung von Natriumazid (1 g) in Wasser (3 ml) enthielt, die durch Zugabe einer 50%-igen wässrigen NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 12 reguliert worden ist. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 20 ml destilliertem Wasser und 3 × 10 ml DMF gewaschen. Das entwässerte Gel wurde in einer Lösung von DTE (1,5 g) und DBU (1,2 ml) in DMF (7,5 ml) weiter reduziert und achtzehn Stunden lang bei Raumtemperatur durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml DMF, 3 × 10 ml Ethanol und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Das Amin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,21 mmol Amingruppe/ml Gel erhalten.

2) Eine Menge von 10 g Brom-aktiviertem Gel (0,4 mmol Allylgruppen/ml entwässertes Gel) wurde in ein Reaktionsfläschchen transferiert, das eine Lösung von Natriumazid (1 g) in Wasser (3 ml) enthielt, die durch Zugabe einer 50%-igen wässrigen NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 12 reguliert worden ist. Bei 50°C wurde die Reaktion siebzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 20 destilliertem Wasser und 3 × 10 ml DMF gewaschen. Das entwässerte Gel wurde in einer Lösung von DTE (1,5 g) und DBU (1,2 ml) in DMF (7,5 ml) weiter reduziert, und achtzehn Stunden lang bei Raumtemperatur durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml DMF, 3 × 10 ml Ethanol und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen. Das Amin-Sepharose™-Gel wurde mit einem Substitutionsgrad von 0,26 mmol Amingruppe/ml Gel erhalten.

C. Derivatisierung mit Sulfonylchlorid

Allgemeines Verfahren

[0068] Eine Menge von 5 g Amin-gekoppeltem Gel wurde mit 3 × 10 ml Ethanol gewaschen, gefolgt von 3 × 10 ml DCM (Dichlormethan). Das Gel wurde in ein Fläschchen transferiert, und DCM (2 ml) und 3,3 Äquivalente von DIPEA wurden ebenfalls hinzugegeben, woraufhin das Gemisch fünf Minuten lang durchmischt wurde. Nach der tropfenweise Zugabe von 3 Äquivalenten Methylsulfonylchlorid, gelöst in DCM (3 ml), wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur achtzehn Stunden lang durchmischt. Nach Filtration des Reaktionsgemischs wurde das Gel nacheinander mit 3 × 10 ml DCM, 3 × 10 ml Ethanol, 3 × 10 ml destilliertem Wasser, 3 × 10 ml 0,5 M HCl und schließlich 3 × 10 ml destilliertem Wasser gewaschen.

Beispiel 2: Selektive Adsorption von IgG

[0069] Um zu testen, ob die neuen nichtaromatischen Sulfonamidliganden gemäß der Erfindung humanes Immunglobulin (IgG) selektiv adsorbieren, wurde die Adsorptivität bezüglich IgG und drei verschiedenen Modellproteinen bei unterschiedlichen Bedingungen überprüft. Das Prinzip des Testverfahrens bestand darin, dass Proteine (15 µl) in eine mit dem (ein Salz und eine Pufferkomponente enthaltenden) A-Puffer äquilibrierte HR5/5-Säule injiziert wurden, (welche die an Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala,

Schweden) immobilisierten Sulfonamidliganden enthielt). Daraufhin wurden 15 ml A-Puffer durch die Säule gepumpt; dann wurde ein 5 ml-Linear-Gradient von A-Puffer zu B-Puffer eingesetzt (wobei der B-Puffer eine Pufferkomponente ohne Salz enthielt). (Siehe das nachstehende UNICORNTM-Verfahren). Überwacht wurden die chromatographischen Profile bei 280, 254 und 215 nm.

[0070] Um die adsorbierte Probenmenge und die eluierte Probenmenge aus der Säule zu evaluieren, wurde die gleiche Probenmenge, die für die Säule eingesetzt worden war, direkt in die Überwachungseinrichtung injiziert, und die Antwort wurde integriert.

Versuche

[0071] Verwendet wurden sechs Kombinationen aus Adsorptions-(Puffer A#) und Desorptions-(Puffer B#) Puffer:

1. Puffer A1: 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 0,50 M Na₂SO₄
Puffer B1: 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4)
2. Puffer A2: 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 0,25 M Na₂SO₄
Puffer B1: 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4)
3. Puffer A3: 20 mM Acetatpuffer (pH 4,0) mit 0,50 M Na₂SO₄
Puffer B2: 20 mM Acetatpuffer (pH 4,0)
4. Puffer A4: 20 mM Acetatpuffer (pH 4,0) mit 0,25 M Na₂SO₄
Puffer B2: 20 mM Acetatpuffer (pH 4,0)
5. Puffer A2: 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 0,25 M Na₂SO₄
Puffer B3: 100 mM Acetatpuffer (pH 4,0)
6. Puffer A5: 20 mM Glycinpuffer (pH 10,0) mit 0,50 M Na₂SO₄
Puffer B4: 20 mM Glycinpuffer

Proben

[0072] Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Rinderserumalbumin (BSA: Bovine Serum Albumin), Ribonuklease A (RIB A), Transferrin (TRANSF) und humanes Immunglobulin (IgG, Gammanorm). Die Proteine wurden in den A-Puffern mit einer Konzentration von 15 mg/ml gelöst, und in der Säule wurde jeweils nur ein Protein verwendet.

Instrumente

Vorrichtung

[0073]

Flüssigkeitschromatograph

(LC)-System:	ÄKTA TM Explorer (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Software:	10 XT oder Entsprechendes
Injektionsschleife:	UNICORN TM
Säule:	Superloop TM 15 µl
	HR 5/5

Instrumentenparameter

Flussrate:	0,5 ml/min
Detektorzelle:	10 mm
Wellenlänge:	280, 254 und 215 nm

UNICORNTM-Verfahren

[0074]

Hauptverfahren:

0,00 Basis Säulenvolumen, 1,00 {ml}, beliebig
 0,00 SäulenPosition PositionIBypass
 0,00 AutoZeroUV
 0,00 Wellenlänge 280 {nm} 254 {nm} 215 {nm}
 1,00 Wellenlänge 280 {nm} 254 {nm} 215 {nm}
 1,10 InjectionPartial (1)#VIAL, 10#INJVOL1 {µl}, Nein, KeineLuft
 1,10 AutoZeroUV
 4,00 SäulenPosition (Position2)KOLONN
 5,00 InjectionPartial (1)#VIAL2,10#INJVO2 {µl}, Nein, KeineLuft
 20,00 Gradient 100 {%B}, 2,00 {Basis}
 25,00 Gradient 100 {%B}, 0,00 {Basis}
 25,10 Gradient 0 {%B}, 1 {Basis}
 29,00 Gradient 0 {%B}, 0 {Basis}
 34,00 Gradient 0 {%B}, 0 {Basis}
 34,10 Ende des Verfahrens

Ergebnisse und Erläuterung

1 (a) Sulfonamidliganden: Adsorption bei pH-Wert 7,4 und Bedingungen für Desorption

[0075] Um zu belegen, ob nichtaromatische Sulfonamidliganden Immunglobuline selektiv adsorbieren, wurde humanes IgG bei einer 1 ml-Säule (HR 5/5) eingesetzt, die mit den neuartigen Matrizen gemäß der Erfindung gepackt war. Zusätzlich wurden die Proteine Rinderserumalbumin (BSA), Ribonuklease A (RIB A) und Transferrin (TRANSF) verwendet. Als Adsorptionspuffer wurden fünf verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Salzgehalten (Na_2SO_4) benutzt. In Tabelle 1 und 2 sind die Ergebnisse bei einem pH-Wert von 7,4 (Puffer A1 und A2) aufgeführt. Wie aus der nachstehenden Tabelle 1 hervorgeht, wurden BSA, RIB A und TRANSF nicht an die untersuchten Liganden adsorbiert, wenn 0,25 M Na_2SO_4 zur mobilen Phase gegeben wurden. Allerdings wurde IgG quantitativ an drei der vier auf Polyaminen basierenden Liganden adsorbiert, und 90% des verwendeten IgG wurde an den vierten Liganden, d. h. den auf Triethyltetramin basierenden Liganden, adsorbiert. Ferner wurde IgG nur von einem der Ammoniak (Monoamine), d. h. dem auf Cysteamin basierenden Liganden adsorbiert.

Tabelle 1

Adsorbierte Menge von Rinderserumalbumin (BSA), Ribonuklease A (RIB A), Transferrin (TRANSF) oder humanem Immunglobulin (IgG) an verschiedenen Sulfonamidliganden unter Verwendung von 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,25 M Na_2SO_4 (Puffer A2) als Adsorptionspuffer.				
Sulfonamidliganden ^a	Relative adsorbierte Menge (%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
Cysteamin	0	0	0	50
Triethyltetramin	0	0	0	90
Diethylentriamin	0	0	0	100
Pentaethylenhexamin	0	0	0	100
Polyethylenimin	0	0	0	100
Ammoniak 1	0	0	0	0
Ammoniak 2	0	0	0	0
^a Die Liganden sind mittels Umsetzung mit $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ zu Sulfonamid gewandelt worden. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien.)				
^b Relative adsorbierte Menge: $((\text{adsorbierte Menge} / \text{angewandte Menge}) \times 100)$. Die adsorbierte Menge wurde berechnet gemäß: $(\text{angewandte Menge} - \text{die mit dem Adsorptionspuffer eluierte Menge})$.				

[0076] Wie aus der nachstehenden Tabelle 2 hervorgeht, wurde Transferrin teilweise an einige der Liganden

adsorbiert (Tabelle 2) und IgG wurde an alle Liganden adsorbiert, wenn eine mobile Phase mit einer höheren ionischen Stärke (Puffer A1; 0,50 M Na₂SO₄) eingesetzt wurde. Die selektivsten Liganden waren die auf Diethylentriamin, Polyethylenimin und Ammoniak 1 basierenden Sulfonamidliganden (Tabelle 2), da BSA, RIB A und TRANSF nicht an diese Liganden adsorbiert wurden.

Tabelle 2

Adsorbierte Menge von Rinderserumalbumin (BSA), Ribonuklease A, Transferrin (TRANSF) oder humanem Immunglobulin (IgG) an verschiedenen Sulfonamidliganden unter Verwendung von 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A1) als Adsorptionspuffer.				
Sulfonamidliganden ^a	Relative adsorbierte Menge (%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
Cysteamin	10	5	5	95
Triethylentetramin	0	0	0	95
Diethylentriamin	0	0	0	100
Pentaethylenhexamin	0	0	10	100
Polyethylenimin	0	0	0	100
Ammoniak 1	0	0	0	100
Ammoniak 2	0	0	0	60
^a Die Liganden wurden mittels Umsetzung mit CH ₃ SO ₂ Cl zu Sulfonamid gewandelt. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien). ^b Relative adsorbierte Menge: ((adsorbierte Menge/angewandte Menge) × 100). Die adsorbierte Menge wurde berechnet gemäß: (angewandte Menge – die mit dem Adsorptionspuffer eluierte Menge).				

[0077] Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Adsorptionspuffers mit pH-Wert 7,4 verschiedene Sulfonamidliganden als optimal für die IgG-Adsorption erweisen.

[0078] Ein ideales Adsorptionsmittel für Immunglobulin muss nicht nur über erhebliche Selektivität verfügen, sondern sollte auch in der Lage sein, eine effiziente Elution zu ermöglichen. Der Großteil des adsorbierten IgG ließ sich problemlos mit 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) ohne Zugabe von Salz desorbieren. Die Adsorption von IgG unter Verwendung von Puffer A1 als mobile Phase resultierte in einer Rückgewinnung von 70–100% des adsorbierten IgG bei Verwendung von Desorptionspuffer B1. Allerdings erwies sich das Eluieren von IgG als schwerer, wenn es mit Puffer A2 adsorbiert wurde, jedoch ließ es sich unter Verwendung von Puffer B3 leicht desorbieren (100 mM Acetatpuffer, pH-Wert 4,0).

1 (b): Sulfonamidliganden: Adsorption bei pH-Wert 4,0 und Bedingungen für die Desorption

[0079] Wie aus den nachstehenden Tabellen 3 und 4 hervorgeht, fällt die Adsorption von IgG bei acidischen Bedingungen eindeutig weniger selektiv aus als die Adsorption bei einem pH-Wert von 7,4. Unter Verwendung von 20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) bei Zugabe von 0,25 M Na₂SO₄ (Puffer A4) als Adsorptionspuffer adsorbieren die auf Cysteamin, Triethylentetramin und Diethylentriamin basierenden Liganden jeweils 40, 40 und 60% der angewandten IgG-Menge (Tabelle 3). Bei den gleichen Bedingungen werden Ribonuklease A und Transferrin nicht adsorbiert. Allerdings werden jeweils 90, 10 und 100% des angewandten Rinderserumalbumins an die Liganden adsorbiert, die auf Cysteamin, Triethylentetramin und Diethylentriamin basieren.

Tabelle 3

Adsorbierte Menge von Rinderserumalbumin (BSA), Ribonuklease A (RIB A), Transferrin (TRANSF) oder humanem Immunglobulin (IgG) an verschiedenen Sulfonamidliganden unter Verwendung von 20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) mit 0,25 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A4) als Adsorptionspuffer.				
Sulfonamidliganden ^a	Relative adsorbierte Menge (%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
Cysteamin	90	0	0	30
Triethylentetramin	10	0	0	30
Diethylentriamin	100	0	0	60
Pentaethylenhexamin	0	0	0	10
Polyethylenimin	0	0	0	0
Ammoniak 1	20	0	0	0
Ammoniak 2	na	na	na	0
^a Die Liganden wurden mittels Umsetzung mit CH ₃ SO ₂ Cl zu Sulfonamid gewandelt. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien.) ^b Relative adsorbierte Menge: ((adsorbierte Menge/angewandte Menge) × 100). Die adsorbierte Menge wurde berechnet gemäß: (angewandte Menge – die mit dem Adsorptionspuffer eluierte Menge). na: nicht analysiert				

[0080] Die obigen Ergebnisse belegen, dass der auf Triethylentetramin basierende Ligand der selektivste der auf IgG getesteten Liganden ist. Die IgG-Probe enthält Subklassen verschiedener Immunglobuline (59% von IgG 1, 36% von IgG 2, 4,9% von IgG 3 und 0,5% von IgG 4). Wenn der Salzgehalt im Adsorptionspuffer zunimmt, nimmt die Selektivität bezüglich IgG als Ergebnis der Adsorption der anderen Proteine ab. In Tabelle 4 sind Ergebnisse für den als Adsorptionspuffer benutzten Puffer A3 dargestellt (20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) mit 0,50 M Na₂SO₄). Es geht klar hervor, dass sowohl Ribonuklease A als auch Transferrin an einige der Liganden adsorbiert werden. Des Weiteren wird Rinderserumalbumin bei Puffer A3 zu einem höheren Grad adsorbiert als bei Puffer A4 (Tabelle 3 und 4). Jener Ligand, der bei Verwendung von Puffer A3 am selektivsten ist, scheint der auf Pentaethylenhexamin basierende zu sein, da jeweils nur 10, 20 und 10% der angewandten Menge von BSA, RIB und TRANSF adsorbiert werden. Dies kann verglichen werden mit IgG, wo 50% der angewandten Menge adsorbiert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4

Adsorbierte Menge von Rinderserumalbumin (BSA), Ribonuklease A (RIB A), Transferrin (TRANSF) oder humanem Immunglobulin (IgG) an verschiedenen Sulfonamidliganden unter Verwendung von 20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) mit 0,5 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A3) als Adsorptionspuffer.				
Sulfonamidliganden ^a	Relative adsorbierte Menge (%) ^b			
	BSA	RIB A	TRANSF	IgG
Cysteamin	100	80	70	100
Triethylentetramin	50	80	45	70
Diethylentriamin	100	100	0	100
Pentaethylenhexamin	10	20	10	50
Polyethylenimin	0	40	0	10
Ammoniak 1	100	30	0	100
Ammoniak 2	10	40	0	20
^a Die Liganden wurden mittels Umsetzung mit CH ₃ SO ₂ Cl zu Sulfonamid gewandelt. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien.) ^b Relative adsorbierte Menge: ((adsorbierte Menge/angewandte Menge) × 100). Die adsorbierte Menge wurde berechnet gemäß: (angewandte Menge – die mit dem Adsorptionspuffer eluierte Menge).				

[0081] Die quantitative Desorption aller adsorbierten Proben wurde mittels Puffer B2 (20 mM Acetatpuffer, pH-Wert 4,0) problemlos erreicht.

1 (c): Sulfonamidliganden: Adsorption bei pH-Wert 10,0 und Bedingungen für die Desorption

[0082] Ein paar Versuche wurden bei pH-Wert 10,0 durchgeführt, und anhand Tabelle 5 ist ersichtlich, dass IgG an die auf Cysteamin und Triethylentetramin basierenden Liganden quantitativ adsorbiert wird unter Verwendung von Adsorptionspuffer A5 (20 mM Glycinpuffer (pH-Wert 10,0) mit 0,5 M Na₂SO₄). Allerdings konnten nur 10% der adsorbierten IgG-Menge mit Desorptionspuffer B4 (20 mM Glycinpuffer) eluiert werden. Um eine quantitative Desorption von IgG zu erhalten, muss der pH-Wert zu acidischen Bedingungen geändert werden, beispielsweise durch Einsatz von Desorptionspuffer B3 (100 mM Acetatpuffer, pH-Wert 4,0).

Tabelle 5

Adsorbierte Menge humanen Immunglobulins (IgG) an zwei verschiedenen Sulfonamidliganden unter Verwendung von 20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A3), 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A1) oder 20 mM Glycinpuffer (pH-Wert 10,0) mit 0,5 M Na ₂ SO ₄ (Puffer A5) als Adsorptionspuffer.			
Sulfonamidliganden ^a	Relative adsorbierte Menge von IgG (%) ^b		
	pH-Wert 4,0	pH-Wert 7,4	pH-Wert 10,0
Cysteamin	100	95	100
Triethylentetramin	70	95	100
^a Die Liganden wurden mittels Umsetzung mit CH ₃ SO ₂ Cl zu Sulfonamid gewandelt. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien.) ^b Relative adsorbierte Menge: ((adsorbierte Menge/angewandte Menge) × 100). Die adsorbierte Menge wurde berechnet gemäß: (angewandte Menge – die mit dem Adsorptionspuffer eluierte Menge).			

Beispiel 3: Vergleich zwischen CH₃SO₂Cl- und CH₃COCl-modifizierten Aminliganden (Methylsulfonamid- und Acetamidliganden)

[0083] Um zu verifizieren, dass erfindungsgemäße Sulfonamidstrukturen mit Antikörpern stärker interagieren als Acetamidliganden wurden zwei Liganden jedes Typs hergestellt auf Grundlage der beiden Aminliganden

Triethylentetramin und Cysteamin (entsprechend Beispiel 2 des obigen Versuchsabschnitts). in der nachstehenden Tabelle 6 sind die Ergebnisse der IgG-Adsorption für vier verschiedene Puffersysteme (Puffer B1-3 und B5) aufgelistet. Wie aus Tabelle 6 klar hervorgeht, adsorbieren die erfindungsgemäßen Sulfonamidstrukturen IgG bei allen untersuchten Bedingungen effizienter als die Acetamidliganden. Der auf Cysteamin basierende Acetamidligand war der einzige Ligand, der zur Adsorption von IgG in der Lage war (50% der angewandten Menge), wenn die Puffer A1 und A5 als Adsorptionspuffer zum Einsatz kamen. Allerdings war dieser Ligand nicht zur Adsorption von IgG fähig, wenn die Salzkonzentration von 0,5 M auf 0,25 M Na₂SO₄ in 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) abnahm. Beide Methylsulfonamidliganden adsorbierten IgG bei allen untersuchten Bedingungen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass erfindungsgemäße Methylsulfonamidliganden bessere IgG-Adsorptionsmittel darstellen als Acetamidliganden.

Tabelle 6

Adsorbierte Menge humanen Immunglobulins (IgG) an Sulfonamid- und Acetamidliganden bei vier verschiedenen Adsorptionspuffern.				
Liganden	Relative adsorbierte IgG-Menge (%)			
	Puffer A1 ^a	Puffer A2 ^b	Puffer A3 ^c	Puffer A5 ^d
Methylsulfonamidderivat ^e von Triethylentetramin	95	90	100	100
Methylsulfonamidderivat ^e von Cysteamin	95	50	70	100
Acetamidderivat ^f von Triethylentetramin	0	0	0	0
Acetamidderivat ^f von Cysteamin	50	0	0	50
^a Puffer A1: 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ ^b Puffer A2: 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit 0,25 M Na ₂ SO ₄ ^c Puffer A3: 20 mM Acetatpuffer (pH-Wert 4,0) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ ^d Puffer A5: 20 mM Glycinpuffer (pH-Wert 10,0) mit 0,50 M Na ₂ SO ₄ ^e Der Ligand wurde mittels Umsetzung mit CH ₃ SO ₂ Cl zu Sulfonamid gewandelt. (Siehe den Abschnitt über die Herstellung von Sulfonamidmedien.) ^f Der Ligand wurde mittels Umsetzung mit CH ₃ COCl zu Amid gewandelt. (Siehe den entsprechenden Abschnitt über die Herstellung.)				

Patentansprüche

1. Trennungsmatrix, bestehend aus einem porösen Träger, an dem Liganden immobilisiert worden sind, gegebenenfalls über Spacerarme, wobei die Liganden ein oder mehrere Sulfonamide umfassen, wobei die R-Gruppe des Sulfonyls eine aliphatische Verbindung ist.
2. Matrix nach Anspruch 1, wobei das Sulfonamid gekoppelt ist an den porösen Träger über seinen Stickstoff.
3. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die R-Gruppe eine Methylgruppe ist.
4. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Stickstoff des/der Sulfonamid/Sulfonamide ein primäres oder sekundäres Amin ist.
5. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Liganden Monoamine sind.
6. Matrix nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Liganden Polyamine sind.
7. Matrix nach Anspruch 6, wobei jedes Polyamin 2 bis 6 Amine umfasst.
8. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Liganden vorhanden sind als Wiederholungseinheiten eines Polymers, das an dem Träger immobilisiert ist.
9. Matrix nach Anspruch 8, wobei das Polymer ein Polyethylenimin ist.

10. Matrix nach Anspruch 8 oder 9, wobei das Polymer 2 oder mehr unterschiedliche Ligandengruppen aufweist.
11. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Liganden aliphatische Verbindungen sind.
12. Matrix nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Träger ein vernetztes Polysaccharid ist.
13. Chromatographiesäule, gepackt mit einer Trennungsmatrix wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. Chromatographiesäule nach Anspruch 13, die im wesentlichen steril ist.
15. Chromatographiesäule nach Anspruch 13 oder 14, die entsorgbar ist.
16. Verfahren zum Herstellen einer Matrix zur Trennung von Antikörpern, wobei das Verfahren umfasst einen Schritt des Immobilisierens von Aminen und/oder Polyaminen an einem porösen Träger und einen nachfolgenden Schritt des Sulfonylierens der Amine, um aliphatische Sulfonamidliganden bereitzustellen.
17. Verfahren zum Herstellen einer Matrix zur Trennung von Antikörpern, wobei das Verfahren umfasst einen ersten Schritt des Aktivierens eines porösen Trägers und einen nachfolgenden Schritt des Bindens der Sulfonamide an die aktivierten Stellen über ihre Schwefelatome, um aliphatische Sulfonamidliganden bereitzustellen.
18. Verfahren zum Isolieren von Antikörpern aus einer Flüssigkeit, wobei das Verfahren umfasst die Schritte
 - (a) Bereitstellen einer Flüssigkeit, die mindestens einen Antikörper umfasst;
 - (b) Inkontaktbringen der Flüssigkeit mit einer Trennungsmatrix, umfassend einen porösen Träger, an dem ein oder mehrere aliphatische Sulfonamidliganden immobilisiert worden sind, um einen oder mehrere Antikörper an der Matrix zu adsorbieren; und, gegebenenfalls,
 - (c) Laufenlassen eines Eluenten über die Matrix, um einen oder mehrere Antikörper freizusetzen; und
 - (d) Wiedergewinnen mindestens eines Antikörpers aus einer Fraktion des Eluenten.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Flüssigkeit, die in Schritt (a) bereitgestellt ist, auch ein oder mehrere andere Proteine umfasst.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Trennungsmatrix des Schritts (b) vorgesehen ist in einer Chromatographiesäule.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Trennungsmatrix des Schritts (b) ist wie definiert in einem der Ansprüche 1 bis 12.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Schritt (b) ausgeführt wird bei einem pH nahe neutral, wie pH 7,2–7,6, bevorzugt ungefähr 7,4.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei der Schritt (c) eine Gradientenelution ist, die ausgeführt wird durch Zugabe eines Eluenten einer abnehmenden Salzkonzentration zur Trennungsmatrix.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 23, wobei der Schritt (b) ausgeführt wird bei einem pH von oder oberhalb neutral, und der Schritt (c) eine Gradientenelution ist, die ausgeführt wird durch Zugabe eines Eluenten einer abnehmenden pH.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die Antikörper, die in Schritt (d) wiedergewonnen werden, menschliche oder an den Menschen angepasste Antikörper sind.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 25, wobei die Antikörper, die in Schritt (d) wiedergewonnen werden, Immunglobulin G (IgG) sind.
27. Verfahren zum Bestimmen der Menge eines Antikörpers, wobei das Verfahren umfasst ein Verfahren wie definiert in einem der Schritte 18 bis 26 und zusätzlich einen Schritt (e) des spektrophotometrischen Be-

stimmens der Menge des Antikörpers.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

