

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/028658 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01D 15/08**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003108

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. September 2003 (19.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 43 529.4 19. September 2002 (19.09.2002) DE

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Körperschaft des öffentlichen Rechts, Schumannstrasse 22, 10098 Berlin (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten*

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **SCHLÜTER, Hartmut** [DE/DE]; Treitschkestrasse 23, 12163 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(74) Anwalt: **BOECKH, Tobias**; Hertin Anwaltssozietät, Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

(54) **Title:** METHOD FOR DISCOVERING SUITABLE CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR SEPARATING BIOLOGICAL MOLECULES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM AUFFINDEN GEEIGNETER CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN ZUR TREN-
NUNG BIOLOGISCHER MOLEKÜLE

(57) **Abstract:** The invention relates to a multiparallel chromatographic system for developing methods for purifying proteins and other biomolecules. Said system uses cavities of multi-well plates (e.g. 96-well plates) which are filled with chromatographic gels, and consists of various starting buffers in which the samples to be chromatographed are dissolved and by which means the gels are equilibrated, and solutions for desorbing (eluting) the biomolecules bonded to the gels. Said system comprises aids for interpreting the results which are deduced from the analyses (e.g. protein concentration determinations, bioassays etc.), following the chromatography, of the supernatants of the non-bonded biomolecules and/or the eluates. Said aids can consist of programmes into which the results are inputted and which, once the results have been processed, supply interpretations and suggestions for creating the steps for purifying a biomolecule.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein multiparalleles Chromatographie-System zur Methodenentwicklung zur Reinigung von Proteinen und anderen Biomolekülen. Das System nutzt Kavitäten von Multi-Well-Platten (z.B. 96-Well-Platten), die mit Chromatographiegelen befüllt sind und besteht aus diversen Startpuffern, in dem die zu chromatographierenden Proben gelöst werden und mit denen die Gele equilibriert sind und Lösungen zum Desorbieren (Eluieren) der an die Gele gebundenen Biomoleküle. Das System umfasst Hilfen zur Interpretation der Ergebnisse, die aus den sich an die Chromatographie anschließenden Analysen (z.B. Proteinkonzentrationsbestimmungen, Bioassays, etc.) der Überstände der nicht gebundenen Biomoleküle und/oder der Eluate hervorgehen. Diese Hilfen können auch aus Programmen bestehen, in die die Ergebnisse eingegeben werden und die nach Prozessierung der Ergebnisse Interpretationen und Vorschläge zur Gestaltung der Schritte zur Reinigung eines Biomoleküls liefern.

WO 2004/028658 A1

Verfahren zum Auffinden geeigneter Chromatographiebedingungen zur Trennung biologischer Moleküle

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein multiparalleles Verfahren zum schnellen Auffinden geeigneter Chromatographieparameter zur Trennung biologischer Moleküle.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein multiparalleles Chromatographie-System zur Methodenentwicklung zur Reinigung von Proteinen und anderen Biomolekülen. Das System nutzt Kavitäten von Multi-Well-Platten (z.B. 96-Well-Platten), die mit Chromatographiegele befüllt sind und besteht aus diversen Startpuffern, in dem die zu chromatographierenden Proben gelöst werden und mit denen die Gele equilibriert sind und Lösungen zum Desorbieren (Eluieren) der an die Gele gebundenen Biomoleküle.

Für die Entwicklung von chromatographischen Fraktionierungsschritten zur Reinigung von Biomolekülen werden gegenwärtig im wesentlichen drei verschiedene

- 2 -

Chromatographie-Systeme von den Firmen Amersham Bioscience (Äkta-Systeme: <http://www1.amershambiosciences.com>), Applied-Biosystems (BioCAD® 700E Workstation, www.appliedbiosystems.com) und BioRad (BioLogic DuoFlow, www.bio-rad.com) verwendet. Mit diesen Systemen können nacheinander eine Reihe von Parametern variiert werden, um geeignete Bedingungen für die Reinigung von Biomolekülen zu finden. Diese Suche nach den geeigneten Parametern zur Reinigung und Fraktionierung von beispielsweise Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren etc. ist zeitintensiv und in der Regel ineffektiv. So lehren Erfahrungswerte aus der biotechnologischen / medizinischen / chemischen Praxis, dass bei der Suche nach geeigneten Chromatographiebedingungen eine Vielzahl von chromatographischen Medien sowie eine Vielzahl von chromatographischen Elutionsparametern in möglichst kurzer Zeit auf ihre Brauchbarkeit getestet werden müssen, um aus den gewonnenen Daten effektive Reinigungs- bzw. Fraktionierungsschritte abzuleiten. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Ziele sich mit den oben genannten Systemen (Versuche mit dem Äkta-System) nur mit einem hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand erreichen lassen.

Aus der WO 01 / 77662 A2 ist ein Verfahren zum Auffinden von geeigneter Chromatographiebedingungen bekannt, bei dem keine Multiwell-Platten zum Einsatz kommen.

Die WO 99 / 24138 A1 beschreibt ein Verfahren, bei dem in den Kavitäten einer Multiwell-Platte unterschiedliche Chromatographie-Medien angeordnet sind. Diese Medien werden zur Analyse biologischer Substanzen im Rahmen sogenannter „Assay“ genutzt.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der Erfindung eine effektivere und leicht zu handhabendere Methode zur geeigneten Auswahl von Chromatographieparametern zum Aufbau von Reinigungs- bzw. Fraktionierungsschritten von biologischen Proben zu schaffen. Ferner ist es Ziel der Erfindung ein geeignetes Computer-Programm zur Erfassung und Interpretation der Ergebnisse der Chromatographie zur Verfügung zu stellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale.

- 3 -

Im Sinne der Erfindung werden unter „biologischer Probe“ gereinigte oder ungereinigte Proteine, Peptide, Nukleinsäuren aller Art, Kohlenhydrate, Lipide, niedermolekulare Metaboliten oder Gemische derselben verstanden. Dies beinhaltet insbesondere – aber nicht ausschließlich – komplexe Proteingemische von humanem, tierischen oder pflanzlichen Geweben oder Zellen sowie Zellen von Mikroorganismen. Die „biologische Probe“ wird im folgenden auch mit „Biomolekülen“ bezeichnet.

Im Sinne der Erfindung werden unter Chromatographiemedien zweierlei Arten verstanden:

- a) Materialien, Verbindungen oder Substanzen, die die biologische Probe zu binden vermögen. Dies sind beispielsweise (aber nicht ausschließlich) alle Arten von Ionenaustauscher (Anionenaustauscher, Kationenaustauscher), Metallaffinitätschromatographiemedien, Reversed-Phase-Materialien, Gele für die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Hydroxylapatit-Medien (HAP) Affinitätschromatographie-Medien mit Liganden jeglicher Art, aber auch Gele mit magnetischen Eigenschaften (Magneto-Beads, beschichtet oder unbeschichtet). Besonderes Merkmal derartiger Gele ist die Fähigkeit, die biologische Probe zu binden, wobei diese durch geeignete Elutionsmittel (Lösungen) von der bindenden Substanz auch wieder befreit werden können muss.
- b) Materialien, Verbindungen, Substanzen oder Lösungen, die die biologische Probe nicht zu binden vermögen. Dies sind beispielsweise (aber nicht ausschließlich) organische und/oder anorganische Säuren, Basen, Salze, deren Derivate oder Lösungsmittel aller Art einschließlich wässriger Lösungen. Besonderes Merkmal derartiger Lösungen und Substanzen (im weiteren Elutionslösungen genannt) ist die Fähigkeit zur Desorption (Elution) der biologischen Probe von dem Chromatographie-Gel, das heißt, zur Verschiebung der Gleichgewichte der Bindung der biologischen Probe an das Chromatographie-Gel in der Weise, dass die an das Chromatographie-Gel gebundenen Biomoleküle nach Zugabe der Elutionslösung keine bzw. nur noch geringe Affinitäten zum Chromatographie-Gel haben.

- 4 -

- Die Erfindung ist für die automatisierte Suche nach geeigneten Chromatographiemedien und den zugehörigen Puffer- und Elutionsbedingungen zur Reinigung von Peptiden und Proteinen, aber auch anderen Biomolekülen aus Homogenaten (Rohextrakten) geeignet. Die Erfindung basiert auf der Absorption von Biomolekülen an Gelpartikel, an die sogenannte stationäre Phase. Eine biologische Probe, bestehend aus Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden etc., gelöst im Startpuffer (mobile Phase), wird mit Gelpartikeln vermischt (sogenanntes Batch-Verfahren) und nach definierten Inkubationszeiten wird der flüssige Überstand, in dem sich die Biomoleküle befinden, die keine Affinität zum gewählten Gel unter den gewählten Bedingungen haben, von den Gelpartikeln entfernt. Die Gelpartikel werden anschließend mit Startpuffer gewaschen, um die nicht bindenden Moleküle möglichst weitgehend zu entfernen. Im nachfolgenden Schritt werden die an die Gelpartikel absorbierten Biomoleküle durch eine geeignete Elutionslösung (mobile Phase) von den Gelpartikeln wieder in Lösung gebracht, um nach Eintritt in die mobile Phase (Desorption bzw. Elution) und Abtrennung von den Gelpartikeln diversen Analysen- und Nachweissystemen (Photometer, Bioassays, etc.) zugeführt werden zu können. Auf diese Weise lassen sich unterschiedlichste Chromatographieparameter wie z.B. Gelmedien, Puffer, pH, Lösungsmittelzusätze oder Substanzen zur Stabilisierung von Biomolekülen ermitteln.
- Die Erfindung kann automatisiert durchgeführt werden, so dass die Ergebnisse aus der z.B. aus einer 96-Well-Chromatographie manuell oder mittels einem Computerprogramm ausgewertet, übersichtlich dargestellt und für die Interpretation vorbereitet werden können. Die gewonnenen Daten werden in der Weise interpretiert, dass als Resultate der Interpretation Vorschläge für die chromatographische Reinigung von (beispielsweise) Proteinen aus Proteinextrakten einer biologischen Probe hervorgehen. Als chromatographische Modi sind Frontal-Chromatographie, Displacement-Chromatographie oder Gradienten-Chromatographie möglich. Die Reinigung des Zielproteins kann auch mehrere verschiedene, sich aneinander anschließende Chromatographien (Kombinationen von Chromatographien) einschließen.
- Die Erfindung sieht ferner einen Kit vor, in dem das erfindungsgemäße Verfahren Anwendung findet. Dieser dient der wirtschaftlichen Verwertung und kann bestimmte Chromatographiemuster in Form ausgewählter Chromatographiemedien für unterschiedlichste Anwendungszwecke (in Abhängigkeit der zu untersuchenden biolo-

- 5 -

gischen Probe) beinhalten und dementsprechend ausgerüstet sein. Hierzu können die Multi-Well-Platten bereits vorgefertigt sein mit Chromatographiemedien zur Bindung der biologischen Probe (Gruppe B-Materialien) und einem Set von unterschiedlichsten Chromatographiemedien (Lösungen jeglicher Zusammensetzung) zur Elution (Gruppe NB-Materialien).

Das System (Kit) beinhaltet Protokolle zur Durchführung der Experimente im Multi-Well-Format mit n Kavitäten ($n > 1$), auf Multi-Well-Platten verteilte, kommerziell verfügbare Chromatographiemedien, sowie auf Multi-Well-Platten verteilte Elutionsmittel, die an die jeweiligen Chromatographiemedien angepasst sind. Das System dient der systematischen Suche nach reproduzierbaren chromatographischen Reinigungsschritten für Biomoleküle. Das System ist auf die Kombination von Pipettier-Roboter ausgelegt, kann aber auch manuell genutzt werden. Bedingt durch die gewählten verschiedenen Chromatographie-Parameter (z.B. pH-Wert, Ionenkonzentration, etc.) werden unterschiedliche Populationen von Biomolekülen an die Gele in den verschiedenen Kavitäten binden. Wird beispielsweise als Chromatographiegel ein Anionenaustauschergel benutzt, werden an das Gel in B1 (Fig. 1, die Lösung in der Kavität B1 hat einen pH von 4 und eine NaCl-Konzentration von 50 mmol/l) Biomoleküle binden, die bei pH 4 noch ausreichend viele negative Ladungen besitzen, also einen niedrigen isoelektrischen Punkt haben. Die niedrige NaCl-Konzentration bewirkt, dass bereits Biomoleküle mit niedriger Affinität an das Gel binden. In der Kavität G11 (Fig. 1, die Lösung in der Kavität G11 hat einen pH von 7 und eine NaCl-Konzentration von 750 mmol/l) können Biomoleküle mit einem wesentlich höheren isoelektrischen Punkt erwartet werden. Gleichzeitig werden, bedingt durch die hohe NaCl-Konzentration nur Biomoleküle mit sehr hoher Affinität an die Gelpartikel binden, die überwiegende Mehrzahl der Biomoleküle wird in Lösung bleiben. Das System wird auch Protokolle enthalten, um die an den Gelpartikeln konzentrierten Biomoleküle weiter analysieren zu können, z.B. über die Proteinbestimmung oder die Elektrophorese.

Vorteile der Erfindung mithin bestehen in folgendem:

- Im Vergleich zu den kommerziell verfügbaren Methoden ermöglicht die Erfindung durch den Parallel-Ansatz im Multi-Well-Format das Auffinden ge-

eigneter Chromatographiemedien und der zugehörigen Elutionsmittel in sehr viel kürzerer Zeit als bisher.

- 5 • Die Suche nach geeigneten Bedingungen zur chromatographischen Reinigung bzw. Fraktionierung von Biomolekülen kann auch mit Rohextrakten durchgeführt werden. Für die Versuche müssen die Biomoleküle durch Homogenisierungsschritte lediglich in Lösung gebracht werden und die Homogenate durch einfache Zentrifugation von Partikeln befreit werden. In diesem Punkt ist die Erfindung anderen Methoden wie der Festphasen-Extraktion oder der Säulen-Chromatographie deutlich überlegen, da in beiden Fällen
10 ein Verstopfen der Säulen droht.
- Die bei Festphasen-Extraktionssystemen nachteiligen, in der Regel sehr kurzen Zeiten, in denen die Biomoleküle mit der stationären Phase des Chromatographiemediums in Kontakt treten können, können zur Folge haben, dass keine vollständige Adsorption der Biomoleküle an das Chromatographiemedium stattfindet. Diese Gefahr herrscht bei dem hier vorgestellten System nicht, da längere Inkubationszeiten gewählt werden können.
15
- Das System bedarf nicht, wie die Festphasen-Extraktion einer Vakuumquelle zum Entfernen der Elutionsmittel. Die mit der Vakuumtechnik verbundenen Probleme wie unvollständiges Absaugen der Elutionsmittel haben deshalb
20 keine Bedeutung.
- Das System kann zur Entwicklung von chromatographischen Reinigungsschritten von Biomolekülen eingesetzt werden. Die mit dem System gewonnenen Daten können für die Entwicklung von Chromatographie-Schritten im Frontal-Chromatographie-Modus, im Displacement-Chromatographie-Modus
25 oder im Gradienten-Chromatographie-Modus genutzt werden.
- Das System kann (z.B. in Kombination mit der Massenspektrometrie) für vergleichende Untersuchungen der Biomolekül-Profile ("Profiling") zweier verschiedener Zustände ("Differential Display") herangezogen werden, um Moleküle identifizieren zu können, die für einen definierten Zustand (z.B.
30 krank) charakteristisch sind.

- Das System kann als Probenvorbereitung für 2D-Elektrophorese-Strategien genutzt werden.

Es ergeben sich mithin Vorteile für die biotechnologische Industrie und für die Pharma-Industrie durch schnelle Methoden-Entwicklung zur chromatographischen Aufreinigung technologisch / therapeutisch / diagnostisch relevanter Proteine. Für die Proteomforschung (Pharma-Industrie, Biotechnologie, Biomedizinische Forschung) bestehen Vorteile in der Vorfraktionierung von Proteinen für die Proteomanalyse; grundsätzlich aber wird eine schnelle Methoden-Entwicklung zur chromatographischen Aufreinigung interessierender Proteine geschaffen.

10 Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten.
Die Erfindung ist in den anliegenden Zeichnungen dargestellt und wird nachfolgend
näher beschrieben; es zeigt

Figur 1 die schematische Darstellung einer 96 Well
Platte, hier belegt mit 96 diversen Startpuffern für die
multiparallele Kationenaustausch-Chromatographie;

Figur 2 die Darstellung der Ergebnisse einer multiparallelen Chromatographie eines Proteingemisches zum Auffinden geeigneter Parameter für die chromatographische Reinigung von 4 verschiedenen Zielproteinen. Die Grafik gibt die absoluten Ausbeuten der verschiedenen Zielproteine wieder (in %, bezogen auf die eingesetzte Menge des jeweiligen Proteins), nämlich von Ribonuclease A (oben links), Cytochrom C (oben rechts), Lysozym (unten links) und Myoglobin (unten rechts), in den Eluaten des multiparallelen Chromatographie-Systems.

Figur 3: die Darstellung der Ergebnisse einer multiparallelen Chromatographie eines Proteingemisches zum Auffinden geeigneter Parameter für die chromatographische Reinigung von 4 verschiedenen Zielpro-

30

teinen. Die Grafik gibt die spezifischen Ausbeuten der verschiedenen Zielproteine wieder (in %, bezogen auf die Gesamtmenge aller Proteine in jeweils einer Kavität).

5

Figur 4:

ein typisches Chromatogramm einer analytischen Reversed-Phase-Chromatographie zur Quantifizierung der individuellen Proteine des Proteingemisches, bestehend aus Ribonuklease A (Rib), Cytochrom C (Cyt C), Lysozym (Lys) und Myoglobin (Myo). Abs. Ausb.: Absolute Ausbeute bzw. Wiederfindungsrate: Dieser Wert bezieht sich auf die ursprünglich auf die Kationenaustausch-Säule injizierte Menge des jeweiligen Proteins (= 100 %).

10

Figur 5:

eine Eichgerade, erstellt mit dem Reversed-Phase-HPLC-System (Figur 4), zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin: Abhängigkeit der detektierten Peakfläche von der injizierten Proteinmenge.

15

Figur 6:

ein Chromatogramm der Kationenaustausch-Gradienten-Chromatographie eines Proteingemisches bestehend aus Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin gelöst in dem Probenauftragpuffer mit pH 3 und 0 mM NaCl (Parametersatz aus den Versuchen mit dem multiparallelen Chromatographie-System).

20

25

Figur 7:

ein Chromatogramm der Kationenaustausch-Gradienten-Chromatographie eines Proteingemisches bestehend aus Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin gelöst in einem Probenauftragpuffer mit pH 4 und 500 mM NaCl (Parametersatz

30

aus den Versuchen mit dem multiparallelen Chromatographie-System).

Figur 8: ein Chromatogramm der Kationenaustausch-Gradienten-Chromatographie eines Proteingemisches bestehend aus Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin gelöst in einem Probenauftragpuffer mit pH 6 und 0 mM NaCl (Parametersatz aus den Versuchen mit dem multiparallelen Chromatographie-System).

Figur 9: ein Chromatogramm der Kationenaustausch-Gradienten-Chromatographie eines Proteingemisches bestehend aus Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin gelöst in einem Probenauftragspuffer mit pH 7 und 200 mM NaCl (Parametersatz aus den Versuchen mit dem multiparallelen Chromatographie-System).

Figur 10 eine Darstellung der Ergebnisse eines 32-Well-Matrix-multiparallelen Kationenaustausch-Chromatographie-Experiments zur Ermittlung von Parametern zur chromatographischen Reinigung von Enzymen mit Angiotensin-Konversions-Enzym-ähnlicher Aktivität aus einem Proteinextrakt von Nierengewebe vom Schwein: Spezifische Enzymaktivitäten (Quotient aus absoluter Enzymaktivität (bestimmt mit der MES-Methode: Anal Biochem. 290, 324-9, 2001) und der Proteinkonzentration) der Eluate (Einstufenelution mit 2 mol/l NaCl) der 32 Fraktionen eines 32-Well-Matrix-Kationenaustausch-Chromatographie-Experiments in einer 96-Deep-Well-Platte; zum schnellen Erkennen der Fraktionen

- 10 -

mit der höchsten spezifischen Aktivität ist dieser Fraktion einer schwarzer Hintergrund zugeordnet.

Figur 11

5

10

15

eine Darstellung der Ergebnisse eines 12-Well-Matrix-Chromatographie-Experiments zur Ermittlung von Parametern zur chromatographischen Reinigung von Enzymen mit Angiotensin-Konversions-Enzym-ähnlicher Aktivität aus einer aktiven Fraktion aufgereingt aus Nierengewebe vom Schwein: Spezifische Enzymaktivitäten (bestimmt mit der MES-Methode; berechnet aus Proteinkonzentrationen und absoluter Enzymaktivität) der Eluate der 12 Fraktionen verschiedener Chromatographie-Medien (HAP: Hydroxyl-Apathit-Gel, HIC: Hydrophobe-Interaktionschromatographie-Gel, Chelat: Gel für die Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie). Zum schnellen Erkennen der Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität ist dieser Fraktion ein schwarzer Balken zugeordnet.

Figur 12

20

25

ein Chromatogramm einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie einer aktiven Fraktion aufgereingt aus Nierengewebe vom Schwein entsprechend dem in Figur 11 gezeigten Parametersatz. Dargestellt sind Profile der Proteinkonzentrationen und der spezifischen Enzymaktivitäten von ACE-ähnlichen Enzymen.

Figur 13

30

die Proteinkonzentrationen der Fraktionen einer Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution. Gradientenstufe 1: 0,5 mol/l NaCl; Gradientenstufe 2: 2 mol/l NaCl. UCE: Urotensin-generierende Aktivität.

- 11 -

Die Erfindung wird anhand von verschiedenen Fraktionierungsversuchen von Proteingemischen dargestellt.

Die Figur 1 zeigt beispielhaft eine 96 Well-Platte (Multi-Well-Platte), die durch Spalten (X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, wobei unterschiedliche Chromatographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matrizenpunkten der Platte angeordnet sind, deren einzelne Kavitäten mit jeweils gleichen Mengen Chromatographiegel belegt sind (z.B. mit einem Kationenaustauschergel), aber individuelle Kombinationen von pH-Werten und Kochsalzkonzentrationen besitzen. Kavität B1 zeigt im Beispiel der Fig. 1 einen pH von 4,5 und eine NaCl-Konzentration von 0,05 mol/l. Kavität G12 hätte einen pH von 7,0 und eine NaCl-Konz. von 1 mol/l.

Im ersten Fraktionierungsexperiment wird mit dem multiparallelen Chromatographiesystem ein Gemisch bekannter Proteine (Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin) fraktioniert (Fig. 2 und Fig. 3) und die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf die Gradientenchromatographie gezeigt (Fig. 6 – 9). Dargestellt sind die absoluten Ausbeuten (Fig. 2) bzw. die spezifischen Ausbeuten (Fig. 3) der verschiedenen Proteine, die in den Eluaten nach paralleler Chromatographie mit den unterschiedlichen Parametern gemessen werden. Um die Zusammensetzung der an das Gel gebundenen Proteine zu quantifizieren, werden die Eluate des multiparallelen Chromatographiesystems mit einer Reversed-Phase-Chromatographie analysiert. Figur 4 zeigt eine typische Reversed-Phase-HPLC-Trennung des Systems, mit der die Quantifizierung durchgeführt wurde. Das Chromatogramm stammt von der Trennung des Proteingemisches vor der Prozessierung mit dem multiparallelen Chromatographie-System. Mit dem Reversed-Phase-HPLC System wird für jedes Protein eine Eichgerade erstellt (Figur 5). Zur Bestimmung der Eichgeraden zur Quantifizierung der individuellen Proteine werden verschiedene definierte Mengen der individuellen Proteine injiziert. Zur Erstellung der Eichgerade werden die Peakflächen der Proteine gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen.

Um die Übertragbarkeit der mit dem multiparallelen Chromatographie-System ermittelten Parameter auf die Gradienten-Chromatographie zu zeigen, werden einige Parameter-Sätze (für den Probenbeladungs-Puffer) herausgesucht (pH 3 mM + NaCl; pH 3 + 0 mM NaCl; pH 4 + 0 mM NaCl; pH 6 + 0 mM NaCl; pH 7 + 200 mM NaCl) und das Proteingemisch unter diesen Bedingungen chromatographiert (Fig. 6-9). Die resultierenden Fraktionen der verschiedenen Gradienten-Chromatographien werden wiederum mit der Reversed-Phase-HPLC (Fig. 4) untersucht, um die Ausbeuten der individuellen Proteine des Gemisches zu bestimmen.

Der Fig. 3 ist zu entnehmen, dass die Ribonuklease A mit der höchsten spezifischen Ausbeute zu gewinnen ist, wenn das Proteingemisch in einem Puffer pH 3 und 0 mM NaCl auf den Kationenaustauscher aufgetragen wird. Ein Blick auf das Ergebnis in Fig. 2 verrät, dass unter diesen Bedingungen mit einer Koelution von Cytochrom C und Lysozym zu rechnen ist. Das Chromatogramm der Gradientenchromatographie der Proteinmischung, betrieben mit einem Puffer pH 3 und 0 mM NaCl als Start- und Probenaufgabepuffer, bestätigt die Erwartung. Ribonuklease eluiert zusammen mit Lysozym, unter dem Einfluß des Gradienten konnte Cytochrom C sogar noch von den anderen Proteinen abgetrennt werden.

Fig. 7 zeigt das Chromatogramm der Trennung des Proteingemisches mit einem Puffer pH 4 und 500 mM NaCl als Start- und Probenaufgabepuffer. Unter diesem Parametersatz wurde die höchste spezifische Ausbeute im Eluat des multiparallelen Chromatographie-Experiments für Myoglobin gefunden. Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnissen in Fig. 3 und Fig. 7 widersprüchlich. Erwartet wird nach Blick auf Fig. 3, dass Myoglobin mit höherer spezifischer Ausbeute auch durch die Gradientenchromatographie gewonnen werden kann. Stattdessen wurde Myoglobin während der Gradientenchromatographie komplett verloren. Die Ursache kann zum Teil der Fig. 2 entnommen werden sowie der Analyse der Myoglobin-Konzentration im Überstand der multiparallelen Chromatographie nach dem Auftragen des Proteingemisches. Hier zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen der aufgetragenen Menge Myoglobin und der Summe aus der Menge des im Eluat wiedergefundenen Myoglobins und des Myoglobins im Überstand. Diese Differenz deutet auf eine irreversible Bindung des Myoglobins an das Gel. Die irreversible Bindung des Myoglobins konnte durch die Beobachtung verifiziert werden, dass das Gel nach Elution mit NaCl rötlich gefärbt bleibt und erst durch intensives Waschen mit Natronlau-

ge wieder entfärbt werden kann. In der Gradientenchromatographie kommt dieser Effekt noch deutlicher zum Tragen, da für diese Trennungen typischerweise Gelmengen eingesetzt werden, die das ca. 10 fache der aufgetragenen Probe binden können. Aus diesem Beispiel leitet sich die Grundregel ab, dass chromatographische Parameter zu vermeiden sind, bei denen im multiparallelen Chromatographie-Experiment größere Differenzen zwischen aufgetragener Menge und der Summe der Ausbeuten im Eluat und im Überstand berechnet wurden. Die absoluten Ausbeuten in Fig. 2 weisen darauf hin, dass der Parametersatz pH 4 und 500 mM NaCl für die Reinigung der übrigen Proteine ebenfalls ungeeignet ist, was aus dem Gradientenchromatogramm (Fig. 7) ebenfalls hervorgeht.

Unter dem Parametersatz von pH 6 und 0 mM NaCl ergeben sich für die Reinigung für Myoglobin über die Gradientenchromatographie weitaus bessere Ergebnisse (Fig. 8), die sich auch aus den Versuchen mit dem multiparallelen Chromatographie-System vorhersagen lassen: Bei pH 6 ist kein Myoglobin im Eluat nachweisbar (Fig. 2), im Gegensatz zu den anderen Proteinen der Mischung, die unter pH 6 mit relativ hoher Affinität binden. Aus den Daten ergibt sich, dass Myoglobin sich mit hoher spezifischer Ausbeute über eine Frontal-Chromatographie über den im Experiment eingesetzten Kationenaustauscher mit einem Puffer von pH 6 reinigen läßt. Diese Schlußfolgerung wird von dem Chromatogramm in Fig. 8 bestätigt. Myoglobin eluiert in einer homogenen Fraktion im Durchbruch der Säule.

Eine hohe spezifische Ausbeute für Lysozym versprechen die Ergebnisse der multiparallelen Chromatographie bei einem Puffer mit einem pH von 7 und 200 mM NaCl (Fig. 3). Die mit diesem Parametersatz durchgeführte Gradientenchromatographie bestätigt die Erwartung. Kurz nach dem Anstieg des Gradienten ist eine Fraktion zu finden, die fast zu 100 % reines Lysozym enthält.

Um zu zeigen, dass die Methode auch für komplexe Proteinmischungen unbekannter Zusammensetzung geeignet ist, wurde eine Fraktionierungsversuchsreihe mit einem Proteinextrakt aus Schweine-Nieren durchgeführt. Wie in den unten genannten Beispielen gezeigt, werden hierzu Aliquots des Gewebeextrakts auf eine Multi-Well-Platte verteilt, in deren Kavitäten sich jeweils gleiche Mengen eines Kationene-

naustauschergels befinden. Die einzelnen Kavitäten unterscheiden sich in Bezug auf den pH-Wert und in Bezug auf die Ionenstärke. Das Ergebnis der Trennung wird über eine Bestimmung der Proteinkonzentration der an das Gel gebundenen Proteine der einzelnen Kavitäten erhalten.

- 5 Die Figur 10 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Fraktionen der Multi-Well-Kationenaustauschchromatographie entsprechend dem Ausführungsbeispiel 2. Für das Finden geeigneter Bedingungen für die Aufreinigung eines gesuchten Proteins können die Daten, die in Fig. 10 dargestellt sind, nach folgenden Regeln genutzt werden:

- 10 1. Die gewählte Chromatographie (hier Kationenaustauschchromatographie) kann dann als günstiger initialer Schritt zum Konzentrieren genutzt werden, wenn das gesuchte Protein, hier detektiert über seine enzymatische Aktivität, in einer Fraktion eluiert, in der eine im Vergleich zu den anderen Fraktionen niedrige Proteinkonzentration zu finden ist (z.B. Fig. 10 in der Fraktion pH 3,
15 500 mmol/l NaCl;), wenn also die spezifische Aktivität einen besonders hohen Wert erreicht.
2. Sollte die absolute Aktivität eines gesuchten Proteins in einer Fraktion zu finden sein, in der eine im Vergleich zu den anderen Fraktionen sehr hohe Proteinkonzentration vorkommt, sollten andere Chromatographiemedien wie
20 Anionenaustauscher darauf geprüft werden, ob das gesuchte Protein sich mit höherer spezifischer Aktivität wiederfinden lässt.
3. Liegt der unter Punkt 2 beschriebene Fall vor und es ist kein anderer Parametersatz zu finden, die die unter Punkt 1 beschriebenen Kriterien erfüllt, dann sollte der 2. Ansatz (Multi-Well-Chromatographie mit Stufengradienten-
25 Elution) genutzt werden, um geeignete Bedingungen zur Reinigung des gesuchten Proteins zu finden.

Neben dem Vorteil der Multi-Well-Chromatographie, in sehr kurzer Zeit eine große Zahl verschiedener Chromatographie-Parameter auf ihre Brauchbarkeit prüfen zu können, wird in der Fig. 10 ein weiterer Vorteil sichtbar, der mit bisherigen Gradienten-Chromatographie-Techniken nur mit großem Aufwand aufspürbar wäre, nämlich
30

- die Phänomene, die bei dem Puffer mit dem pH Werte 3. Hier sind bei Salzkonzentrationen von jeweils 500 mmol/l NaCl Maxima in der spezifischen Aktivität zu sehen, die hier nicht erwartet werden. Der Erwartung entspricht, dass die Konzentration der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine bei einer Startkonzentration von 0 mmol/l Salz am höchsten ist und die Konzentration der gebundenen Proteine mit steigender Salzkonzentration der Startlösung abnimmt. Das Auftreten der oben beschriebenen Maxima kann damit erklärt werden, dass die höheren Salzkonzentrationen hydrophobe Wechselwirkungen (unabhängig von den elektrostatischen Wechselwirkungen) zwischen Proteinen und dem Gel begünstigen, was zu einer verstärkten Absorption von Proteinen an das Gel führt. Es handelt sich hier also um Phänomene, die mit nicht-idealen Chromatographie-Mechanismen (Schlüter H, Zidek W. J. Chromatogr. 639. 17-23 (1993)) bezeichnet werden können, was bedeutet, dass (in diesem Fall) nicht nur elektrostatische Wechselwirkungen auf die Bindung der Proteine an die stationäre Phase sondern auch andere Wechselwirkungen (hier hydrophobe Wechselwirkungen) einen maßgeblichen Einfluss haben und damit vorteilhaft für die Trennung genutzt werden können. Phänomene dieser Art lassen sich durch empirische Strategien finden, das heißt, je mehr Parameter variiert werden können, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, die notwendigen Parameter zu finden und vorteilhaft nutzen zu können.
- Die Figur 11 zeigt zum 3. Ausführungsbeispiel spezifische Enzymaktivitäten von Renin-ähnlichen Enzymen der Fraktionen der Multi-Well-Chromatographie mit verschiedenen HIC-, Hydroxylapatit- und IMAC- (Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie-) Gelen. Gesucht wurde nach einem Parametersatz, mit dem eine aufgereinigte aktive Protein-Fraktion aus Schweinenierenextrakt mit einer Gradientenchromatographie weiter gereinigt werden kann. Figur 12 gibt das Chromatogramm einer Hydrophoben-Interaktions-(HIC)-Gradientenchromatographie wieder, die aus den Parametersätzen der multiparallelen Chromatographie des Experiments, dargestellt in Figur 11, abgeleitet wurde (Phenyl-HIC-Chromatographie). Die enzymatisch aktive Fraktion eluiert im Bereich des Gradienten, was zeigt, dass die Vorhersage zutrifft, dass das gesuchte Zielenzym sich unter den in Fig. 11 beschriebenen Bedingungen an eine Phenyl-HIC-Säulen binden und chromatographieren läßt.

Die Figur 13 zeigt Proteinkonzentrationen der Fraktionen einer Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution. Gradientenstufe 1: 0,5 mol/l NaCl; Gradientenstufe 2: 2 mol/l NaCl. UCE: Urotensin-generierende Aktivität. Es ist erkennbar, dass eine Urotensin-bildende Aktivität (UCE-Aktivität) lediglich in der Fraktion nachweisbar war, bei der der Proteinextrakt bei pH 8 auf das Gel aufgetragen wurde und die mit 2 mol/l NaCl eluiert wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit 0,5 mol/l (bei pH 4,5 bis 8) die höchsten Proteinmengen eluierbar sind. Die UCE-Aktivität eluiert in der Chromatographie mit dem pH 8-Puffer jedoch erst nach Elution mit einer 2 molaren Salzkonzentration. Dieses Ergebnis ist für die Aufreinigung des UC-Enzyms von großem Vorteil, da das UCE in einer Fraktion mit niedriger Proteinkonzentration eluiert und auf diese Weise eine große Menge der begleitenden Proteine (ca. 95 % der ursprünglich aufgetragenen Proteinmenge) abgetrennt werden können.

1. Ausführungsbeispiel:

Multiparallele Kationenaustausch-Chromatographie eines Gemisches von 4 Modell-Proteinen in 32 Wells mit verschiedenen Startbedingungen (Variation der pH-Werte (Ziffernreihe, „Zeilen“) und der Salzkonzentration (Buchstabenreihen, „Spalten“) und einstufiger Elution.

Als Modellproteine werden Ribonuclease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin zusammengemischt (1250 µg pro Protein). Pro Kavität werden je 100 µl Kationenaustauscher-Gel (Fractogel EMD (M) SO₄⁻ (Merck) auf 32 Kavitäten verteilt. Als Äquilibrierungspuffer (je 40 mM) werden für den Kationenaustauscher die folgenden Puffer vorbereitet (X-Richtung der Deep Well-Matrix):

Tabelle 1: Puffer für die multiparallele Kationenaustausch-Chromatographie

Puffer (je 40 mM)	pH
Zitronensäure	3
Ameisensäure	4
Essigsäure	5
Malonsäure	6
MES (2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure)	6,5
Phosphatpuffer	7
Phosphatpuffer	7,5
HEPES	8

5 NaCl wird in Y-Richtung der Deep Well-Matrix den Puffern zugemischt, so dass in den Kavitäten NaCl-Konzentrationen von 0 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 500 mM NaCl entstehen. Parallel wird eine 32-Well-Matrix-Pufferplatte mit den entsprechenden Puffern ohne Gel angesetzt. Die Gele werden 3mal mit je 300 µL des jeweiligen Äquilibrierungspuffer (aus der 32-Well-Matrix-Pufferplatte, Tabelle 1) gewaschen. Aliquots des Proteingemisches werden in dem jeweiligen (200 µl) Proben-

10 aufgabepuffer (Tabelle 1) gelöst und auf die Gele in den verschiedenen Kavitäten aufgetragen. Nach dem Waschen mit den passenden Puffern (Tabelle 1) werden die Proteine mit 3 x 100 µl einer 2 M NaCl Lösung eluiert. Die Zusammensetzung der Eluate wird mit einem Reversed-Phase-HPLC-System quantifiziert (Figur 4 und Figur 5). In der Abb. 4 wurden 100 µl des Proteingemisches (je Protein 50 µg), gelöst in 0,1% TFA, über eine Reversed-Phase-Säule (TSKgel Super-Octyl 4,6 mm ID x 5,0 cm L; Tosohaas Biosep) getrennt. Als HPLC-System wird eine SMART-Anlage benutzt (Fa. Amersham). Die mobile Phase besteht aus 0,1% TFA in destilliertem Wasser (Lösung A) und 0,1% TFA in Acetonitril (Lösung B). Die Chromatographie

15 wird mit einem Fluss von 1 ml/min und einem Gradienten von 23 % bis 44 % Lösung B in 12,3 min durchgeführt. Die Absorption wird in Abhängigkeit von der Zeit bei 214 nm gemessen. In Abb. 5 sind die Eichgeraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym und Myoglobin dargestellt.

25 Zur Demonstration der Übertragbarkeit der Parameter, gewonnen mit der multiparallelen Chromatographie, werden die Gemische mit dem gleichen Kationenaustauschergel, das für die multiparallele Chromatographie eingesetzt wurde, im Gradientenchromatographiemodus chromatographiert. Es wurde eine selbst gestopfte Kationenaustauschersäule (HR10/30 mit 2 ml Fractogel EMD SO³⁻ (M), Merck) verwendet. Die mobile Phase bestand aus 40 mM Zitronensäurepuffer, pH 3 ohne NaCl (Puffer A) und 40 mM Zitronensäurepuffer, pH3 mit 2 M NaCl (Puffer B). Die Chro-

30

matographie wurde bei einer Flussrate von 2,0 ml/min. Der Gradient hatte eine Steigung von 0% bis 75% Puffer B in 90 min. Die Zusammensetzung der Fraktionen mit UV-Absorption wurden mit der Reversed-Phase-HPLC analysiert (Figur 4). Die Ergebnisse sind in den Tabellen in der Figur 4 gelistet. In den Figuren 7 bis 9 werden
5 folgende Äquilibrierungs- und Probenaufgabe-Puffer (jeweils Puffer A) eingesetzt. 40 mM Ameisensäure, pH 4 und 500 mM NaCl (Fig. 7), 40 mM Malonsäure, pH 6 und 0 mM NaCl (Fig. 8), 40 mM Phosphatpuffer, pH 7 und 200 mM NaCl. Als Puffer B werden jeweils den Puffern A 2 M NaCl zugesetzt.

2. Ausführungsbeispiel:

10 *Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit verschiedenen Startbedingungen (Variation der pH-Werte (Ziffernreihe, „Zeilen“) und der Salzkonzentration (Buchstabenreihen, „Spalten“)) und einstufiger Elution.*

A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

15 Für die Herstellung von Proteinextrakten werden Nieren von Schweinen verwendet. Direkt nach ihrer Entnahme im Schlachthof werden diese in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl-Lösung) bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. Das Nierengewebe wird (bei Temperaturen von 4 bis 6°C) in ca. 1 cm³ große Stücke geschnitten, in vorgekühlte Lyophilisationsgefäße gefüllt, in Flüssigstickstoff eingefroren und
20 über Nacht bei -80°C gelagert. In der Lyophilisationsanlage (Typ 2040 der Fa. Snijders Tilbug, Holland) werden die Gewebestücke ca. eine Woche 1 Woche vollständig getrocknet. Die wasserfreien Gewebestücke werden dann mit einer Getreidemühle (Varius, der Fa. Messerschmidt) auf feinsten Stufe pulverisiert. 2 g des Pulvers werden in 20 ml Puffer (10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,3) gelöst. Hierfür wird
25 ein Homogenisator (Ultra Turrax T 25 der Fa. Jahnke-Kunkel) verwendet.

B. Vorbereitung des Kationenaustauscher-Gels (Fractogel EMD-SO3; Merck, Darmstadt) und Durchführung der Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit einstufiger Elution:

Das Gel (bei einer Befüllung von 300 µl / Kavität: ca. 0,3 ml x 100 = 30 ml) wird mit dem 5-fachen Gelvolumen mit 2 molarer wässriger NaCl-Lösung und anschließend mit dem 10fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Die Leitfähigkeit nach dem letzten Waschvorgang sollte dem des Wassers entsprechen.

- 5 Anschließend wird das Gel (300 µl / Kavität) auf 32 Kavitäten einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt und je 1000 µl Puffer (40 mmol/l) bezeichnet mit A bis H in der Tabelle 2, in die Kavitäten der Reihen 1 bis 8 zugegeben, so dass sich jeweils in einer Reihe (bezeichnet mit einem Buchstaben) der 96-Well-Platte ein und derselbe Puffer mit identischem pH-Wert befindet. Anschließend werden in die Kavitäten je-
- 10 weils 400 µl der Salzlösungen (NaCl, in mmol/l (Endkonzentration): 1: 0; 2: 100; 3: 200 und 4: 500) pipettiert, so dass beispielsweise alle Kavitäten der Bezeichnung 2 die Salzkonzentration von 100 mmol/l beinhalten. Parallel werden eine oder mehrere Kopien der Puffer gemäß des oben genannten Pipettierschemas angelegt, mit dem später die individuellen Kavitäten gewaschen werden.
- 15 Nach dem Equilibrieren werden in jede der 32 Kavitäten jeweils 300 µl der proteinhaltigen Probe (Proteinextrakt, siehe oben unter A.) gegeben.

Tabelle 2: Puffer für den Kationenaustauscher

Microtiterplatte Reihe	Puffer (40 mM Endkonzentration)	pH
A	Zitronensäure	3
B	Ameisensäure	4
C	Essigsäure	5
D	Malonsäure	6
E	MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	6,5
F	Phosphorsäure	7
G	Phosphorsäure	7,5
H	HEPES	8

- Nach der Zugabe der Probe werden Probe und Gel suspendiert und 10 min inkubiert. Danach wird die 96-Well Platte zentrifugiert (Speed-Vac Zentrifuge: 1 min). Der Überstand wird auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) aufgehoben. Die 32 verschiedenen individuellen Proben-Gel-Suspensionen in der 96-Well-Platte werden mit den entsprechenden, individuellen Pufferlösungen (jeweils 300 µl, die Puffer werden aus einer 96-Deepwell-Platte kopiert, in der sich entsprechend dem oben angegebenen Schema die individuellen Lösungen befinden) suspendiert, um die 32 Gele zu waschen, anschließend zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert und verworfen, um die nicht-bindenden Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird 2 mal wiederholt. Nach dem Waschen werden die bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten eine 2 molare NaCl-Lösung (pro Kavität 100 µl) zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf ein oder mehrere 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.
- 15 Die Analytik der Fraktionen der Multi-Well-Chromatographie-Fraktionen kann die Bestimmung der Protein-Konzentration, der Enzymaktivität, dem Nachweis einer Proteineigenschaft, z.B. mit einem Antikörper, sowie die Zusammensetzung der Fraktion (Elektrophorese, 2D- Elektrophorese) umfassen.
- 20 Die Vorteile dieser Versuchsausführung liegen darin, auf diese Weise im Idealfall (d.h. wenn das gesuchte Protein eine hohe Affinität zum Säulenmaterial hat) Chromatographie-Bedingungen zu finden, unter denen das gesuchte Protein bindet, jedoch ein Großteil der begleitenden Proteine nicht binden und auf diese Weise deren Abtrennung gelingt. Hat das gesuchte Protein lediglich eine schwache Affinität, lassen sich Bedingungen finden, bei denen das gesuchte Protein nicht bindet, jedoch
- 25 ein großer Teil der nicht interessierenden Proteine. Die Resultate können dann für eine Frontal-Chromatographie benutzt werden. Auf diese Weise lassen sich somit Chromatographie-Parameter (Chromatographiemedien, pH, Puffer, Salzkonzentrationen, Zusätze) zum Konzentrieren von Proteinen auffinden, insbesondere aus Rohextrakten, ferner kann das chromatographische Verhalten eines unbekannten, gesuchten Proteins ermittelt werden und letztlich können Bindungskapazitäten be-
- 30 stimmt werden.

3. Ausführungsbeispiel:

Multi-Well-Chromatographie mit verschiedenen Chromatographiegelen (Hydrophobe-Interaktions-(HIC)-Gele, Hydroxylapatit-Gele, Metallaffinitätschromatographie-Gele) und einstufiger Elution.

5 A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

10 Siehe hierzu oben unter 1. Ausführungsbeispiel, Ziffer A.. Der Proteinextrakt wurde anschließend über eine Kationenaustauschersäule im Self-Displacementverfahren chromatographiert. Als Äquilibrations- und Probenaufgabe-Puffer wurden die in Fig. 10 ermittelten Parameter genutzt: Die Probe wurde in einem 40 mM Puffer mit einem pH von 3 und einem Zusatz von 500 mM NaCl gelöst und auf die Self-Displacement-Säulen aufgetragen. Die resultierenden Fraktionen wurden nach Angiotensin-II generierenden Aktivitäten durchsucht. Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde als Probe für den nun folgenden Versuch eingestetzt.

15 B. Vorbereitung der HIC-Gele (Fractogel EMD Phenyl (S) Merck; Fractogel EMD Propyl 650 (S), Merck; Octyl Sepharose 4 Fast Flow Amersham Bioscience; Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Bioscience), HAP-Gele (Hydroxyl-Apathit-Gel, BioRad) und des Chelat-Gels (Gel für die Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie, Amersham Bioscience), Durchführung der Multi-Well-HIC-Chromatographie:

20 Die Gele (bei einer Befüllung von 500 µl / Kavität: ca. 0,5 ml x 8 = 4 ml) werden mit dem 10-fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Anschließend werden die Gele (50 µl / Kavität) in die Kavitäten 1A bis 4A (HIC-Gele), 5A (HAP-Gel) und 6A-12A (Chelat-Gel) einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt. Zu den Gelen werden je 1000 µl Puffer (Tabelle 2) in die Kavitäten der Reihen 1A bis 12A zugegeben, so dass sich
25 jeweils in den Kavitäten der 96-Well-Platte beziffert mit 1 bis 12 die Puffer entsprechend der Tabelle 2 befinden. Parallel werden eine oder mehrere Kopien der Puffer gemäß Tabelle 2 angelegt, mit dem später die individuellen Kavitäten gewaschen werden. In jede der 8 Kavitäten werden jeweils 50 µl der proteinhaltigen Probe (Proteinkonzentration 0,3 µg/µl; Proteinextraktgewinnung, siehe oben unter A.) gegeben.

30 Tabelle 2: Puffer für die Multiparallele-Chromatographie

- 22 -

Reihe Gel	Beladungspuffer (Chelat) Äquilibrierungs- u. Probenaufgabe-Puffer Elutionspuffer	PH
1	2 M NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
7,5 µl Phenyl HIC	0.1 M NaHCO ₃	8,3
2	2 M NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
4 µl Propyl HIC	0.1 M NaHCO ₃	8,3
3	2 M NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
6 µL Octyl	0.1 M NaHCO ₃	8,3
4	2 M NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
20 µL Butyl	0.1 M NaHCO ₃	8,3
5	40 mM Kaliumphosphat	7
50 µl HAP	40 mM Kaliumphosphat + 500 mM	
6	100 mM Calciumchlorid	
40 µl Ca-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
7	100 mM Magnesiumchlorid	
40 µl Mg-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
8	100 mM Nickelsulfat	
40 µl Ni-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
9	100 mM Cobaltchlorid	
40 µl Co-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
10	100 mM Kupfersulfat	
40 µl Cu-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
11	100 mM Zinkchlorid	
40 µl Zn-IMAC	20 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	7.2
	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
12	100 mM Eisensulfat	
40 µl Fe-IMAC	100 mM Natriumacetatpuffer 1 M NaCl	7.7

	100 mM Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl	3
--	--	---

Nach dem Probenauftrag (15 µg, gelöst im Äquilibrationpuffer) werden die Gele 2malig mit Äquilibrationpuffer gewaschen und anschließend die bindenden Proteine mit 3fachen Gelvolumen Elutionspuffer eluiert. Die Eluate werden auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) eingesetzt. Die Bestimmung der Angiotensin-Konversionsenzym-ähnlichen Enzymaktivität erfolgte wie in Jankowski et al. 2001 beschrieben (Jankowski, J. et al. (2001) Anal Biochem. 290, 324-9). Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt.

Der Vorteil dieser Anwendung liegt u.a. darin, dass für die Planung einer Gradientenelution (kontinuierlicher bzw. Stufen-Gradient), einer Frontalchromatographie oder einer Displacement-Chromatographie mit diesem System die Parameter erkundet werden können, unter denen das Zielprotein mit hohen absoluten bzw. spezifischen Ausbeuten chromatographisch aufgereinigt werden kann. Für dieses Ausführungsbeispiel kann es ferner vorteilhaft sein, Ergebnisse aus dem Ausführungsbeispiel 1 in den experimentellen Ansatz einfließen zu lassen, z.B. das dort ermittelte optimale Gel oder eine geeignete Startbedingung zu verwenden.

Die Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem oben beschriebenen multiparallelen Chromatographie-Experiment auf die Gradienten-Chromatographie wird mit dem folgenden Experiment überprüft. Eine Säule wird mit einem HIC-Gel gefüllt (Fractogel EMD Phenyl (S) Merck. Säulenvolumen: 2.5 mL, Durchmesser: 1 cm, Höhe: 3 cm) und mit dem Puffer A (0.1 M NaHCO₃ pH 8.3) mit einer Flußrate von 1 ml/min equilibriert. Als Probe wird nach der Equilibrierung einer enzymatisch-aktiven Fraktion aus Schweine-Nieren-Protein-Extrakt, gewonnen über eine Kationenaustausch-Displacement-Chromatographie, mit einer Proteinmenge von 3 mg, in 1 ml Puffer A gelöst und auf die Säule injiziert. Puffer B besteht aus Puffer A, dem 2 M NaCl zugesetzt sind. Der Gradient wird von 0 auf 100 % B in 10 Säulenvolumina entwickelt.

4. Ausführungsbeispiel:

Im folgenden werden einige Beispiele für unterschiedliche Parameter und deren Variationen gegeben, die bei der Auswahl geeigneter Chromatographiebedingungen von Bedeutung sind (für verschiedene Multi-Well-Chromatographien)

- 5 1. Variation der Salz-Anionen zum Eluieren der Biomoleküle vom Anionenaustauscher: ClO_4^- , SCN^- , p-tosyl, I^- , Br^- , NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^- , CH_3COO^- , F^-
- 10 2. Variation der Zusätze zur Stabilisierung der Biomoleküle wie z.B.: Glycerol, Sucrose, Natriummolybdat, Ethylenglycol, Urea, Guanidiniumchloride, Betain, Taurin, DTE, DTT, Monothioglycerol, Detergentien, Polyethylenglykol (PEG), Chloroform, Methanol, H_2O , Proteaseinhibitoren (EDTA, EGTA, PMSF, DFP, Benzamidine, Aprotinin, Pefabloc SC, TLCK, TPCK, Phosphoramidon, Antipain, Leupeptin, Pepstatin A, Hirudin).
3. Ionenaustausch-Chromatographie-Medien (Beispiele):

Tabelle 3

Gel	Matrix
DEAE-Sephadex A-25	Dextrane
DEAE-Sephadex A-50	
QAE-Sephadex A-25	
QAE-Sephadex A-50	
DEAE-Sepharose CL-6B	Agarose, cross-linked
DEAE-Trisacryl M	Copolymer ³
DEAE-Sephacel	Cellulose, beaded
DE 51	Cellulose
DE 52	
DE 53	
DE 92	
QA 52	
QA 92	
Express-Ion D	
Express-Ion Q	

- 25 -

DEAE A-200 Cellufine	Cellulose
DEAE A-500 Cellufine	
DEAE A-800 Cellufine	
DEAE-Spherox M	Dextran-coated Silica
DEAE-Spherox LS	
DEAE Thruput	Agarose
Q Thruput	
DEAE-Sepharose FF	Agarose

4. Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC):

- Variation der Hydrophobizität des Gels (z.B. Butyl-Sepharose < Octyl-Sepharose < Phenyl-Sepharose)

- Variation der Gelmatrix

5

- Variation von pH Werten
- Variation von Salzen gemäß der Hofmeister-Reihe
- Zusätze von organischen Lösungsmitteln zum Startpuffer bzw. zur Elutionslösung

5. Metallaffinitätschromatographie (IMAC):

10

- Variation der Metallionen: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}
- Variation der komplexierenden Gruppe (Chelat) des Gels (z.B.): Imino-diessigsäure (IDA), Tris(carboxymethyl)ethylendiamin (TED), Nitrilotriessigsäure (NTA).

15

- Variation des Startpuffers (z.B.): 0,5 bis 2 M NaCl.
- Variation der Gelmatrix.

- Variation der Elution: a) pH Gradient (variation der pH-Werte in Richtung sinkender pH-Werte). b) Elution mit einem kompetitiven Liganden (z.B. Ammonium chloride, Sulfat, Imidazol, oder Histamin). c) Elution mit Chelaten (EDTA, EGTA).

5 6. Hydroxylapatit : Variation des Startpuffers (Phosphatpuffer)

7. Reversed-Phase (RP):

- Variation des Startpuffers:

a) Variation der Konzentration organischer Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol, Ethanol, Isopropanol),

10 b) Variation von Ionenpaarreagenzien (z.B. Trifluoressigsäure (TFA), Triethylammoniumacetat (TEAA), etc.)

- Variation der Elutionsparameter

a) Art der organischen Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol, Ethanol, Isopropanol)

15 b) Konzentrationen der organischen Lösungsmittel

c) Zusammensetzung der organischen Lösungsmittel

- Variation der Geleigenschaften

a) Hydrophobizität des Gels (z.B. C4, C8, C18)

b) Matrix des Gels (Silica oder Polymer)

20 c) poröse Gele, nicht poröse Gele

8. Affinitätschromatographie:

- Variation der Gele (Gele mit Farbstoffliganden, Gele mit immobilisierten Biomolekülen (Coenzymen etc.)
- Variation der Startpufferbedingungen (pH, Ionenstärke)
- Variation der Elutionsbedingungen (Elution mit kompetitiven Liganden, Elution durch Variation der Ionenstärke oder des pHs)

5. Ausführungsbeispiel:

Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution

A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

- 10 Siehe hierzu oben unter 1. Ausführungsbeispiel, Ziffer A.. Die Homogenisation des gefriergetrockneten Nierenextrakts wurde hier im jeweiligen Startpuffer durchgeführt: Als Startpuffer (je 20 mmol/l) wurden verwendet: (1) Citrat-Puffer, pH 3; (2) Citrat-Puffer pH 3,5; (3) Formiat-Puffer pH 4; (4) Succinat-Puffer pH 4,5; (5) Essigsäure pH 5; (6) Malonat-Puffer pH 5,5; (7) Malonat-Puffer pH 6; (8) Phosphat-Puffer pH 7; (9) HEPES-Puffer pH 7,5; (10) HEPES-Puffer pH 8. Für jeden Ansatz wurden
- 15 ca. 200 mg Nierengewebe-Pulver in 3 ml Puffer gelöst.

B. Vorbereitung des Kationenaustauscher-Gels (Fractogel EMD-SO₃; Merck, Darmstadt) und Durchführung der Multi-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution:

- 20 Das Gel (bei einer Befüllung von 500 µl / Kavität : ca. 0,5 ml x 100 = 50 ml) wird mit dem 5-fachen Gelvolumen mit 2 molarer wässriger NaCl-Lösung und anschließend mit dem 10-fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Die Leitfähigkeit nach dem letzten Waschvorgang sollte dem des Wassers entsprechen. Anschließend wird das Gel (500 µl / Kavität) auf die 10 Kavitäten einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt
- 25 und je 1000 µl Puffer (20 mmol/l) der unter A. angegebenen Puffer ((1) Citrat-Puffer, pH 3; (2) Citrat-Puffer pH 3,5; (3) Formiat-Puffer pH 4; (4) Succinat-Puffer pH 4,5; (5) Essigsäure pH 5; (6) Malonat-Puffer pH 5,5; (7) Malonat-Puffer pH 6; (8) Phos-

phat-Puffer pH 7; (9) HEPES-Puffer pH 7,5; (10) HEPES-Puffer pH 8.) in die Kavitäten der Reihen 1 bis 10 zugegeben. Parallel werden die Puffer gemäß des oben genannten Pipettierschemas in Deepwell-Platten gefüllt, mit dem später die Gele gewaschen werden.

- 5 In jede der 96 Kavitäten werden jeweils 10 mg der proteinhaltigen Proben, gelöst im jeweiligen Startpuffer (1 bis 10; Proteinextrakt, siehe oben unter A.) gegeben. Nach der Zugabe der Probe werden Probe und Gel suspendiert und 10 min inkubiert. Danach wird die 96-Well Platte zentrifugiert (Speed-Vac Zentrifuge: 1 min). Der Überstand wird auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) aufgehoben. Die 10 verschiedenen individuellen Proben-Gel-Suspensionen in der 96-Well-Platte werden mit den entsprechenden, individuellen Pufferlösungen (jeweils 500 µl, die Puffer werden aus einer 96-Deepwell-Platte kopiert, in der sich entsprechend dem oben angegebenen Schema die individuellen Lösungen befinden) suspendiert, um die Gele in den 10 Kavitäten zu waschen, anschließend zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert und verworfen, um die nicht-bindenden Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt.

- 20 Nach dem Waschen werden die bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten 600 µl einer jeweils 0,5 molaren NaCl-Lösung zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf eine 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.

- 25 Nach der Elution mit der 1. Gradientenstufe werden die noch bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten 600 µl einer jeweils 2 molaren NaCl-Lösung zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf eine 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.

- 30 Für den Enzymassay werden aus den Eluaten 470 µl abgenommen und mit 100 µl eines 100 mM NaHCO₃-Kopplungspuffers gemäß der Vorschrift zur Immobilisierung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose (Amersham-Bioscience) gemischt, so dass ein pH-Wert von 8,3 erreicht wird. Dieses Gemisch zu 200 µl BrCN-aktivierten Sepharose Beads geben, und diese bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend

folgten Deaktivierungsschritte mit Glycin sowie Wasch-Schritte, gemäß der Vorschrift zur Immobilisierung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose (Amersham-Bioscience). Der Nachweis der Enzymaktivität eines Urotensin generierenden Enzyms (UCE) erfolgte nach Jankowski et al. 2001. Für die Bestimmung der Protein-Konzentration (nach Bradford; Kit von Pierce) der Eluate werden jeweils 10 µl
5 abgenommen.

6. Ausführungsbeispiel:

Entsalzung bzw. Umpufferung von Fraktionen der MULTI-Well-Chromatographie

Verschiedene Analyse-Techniken erfordern Protein-Fraktionen, die in definierten
10 Puffern vorliegen. Um eine schnelle Entsalzung bzw. Umpufferung von maximal 96 Proben zu ermöglichen wurde ein Protokoll für diese Zwecke entwickelt. Ein 96-Deepwell-Platte mit einem Filter (20 µm, Macherey & Nagel) wird mit einem Größenausschlußgel (je 1000 µl/Kavität, Biogel P6, BioRad) gefüllt. Das Größenausschlußgel sollte mit einem Puffer equilibriert sein, der elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und dem Gel unterbindet. In einer Versuchsreihe
15 wurde festgestellt, dass eine Umsalzung einer Proteinlösung von 2 mol/l NaCl auf 0,29 mol/l NaCl gelingt, wenn auf die mit 1000 µl Gel gefüllten Kavitäten 350 µl Probe aufgetragen werden. Die Entsalzung geschieht durch Zentrifugation der Probe durch das Größenausschlußgel. Bei diesem Versuchsansatz wurde eine Proteinausbeute von 79 % erzielt. Die Salzkonzentration im Eluat kann auf 0,2 mol/l reduziert werden, wenn das Probenvolumen der umzupuffernden Probe auf 300 µl reduziert wird. Die Proteinausbeute sinkt in diesem Fall jedoch auf 67 %.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Auffinden geeigneter Chromatographieparameter zur Trennung biologischer Moleküle, bestehend aus folgenden Verfahrensschritten

- 5 a) auf einer Multi-Well-Platte, die durch Spalten (X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, werden unterschiedliche Chromatographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matrizenpunkten der Platte in den jeweiligen dortigen Kavitäten angeordnet, wobei die Chromatographiemedien einerseits aus die-biologische-Probe-bindenden Materialien (B) und andererseits aus die-biologische-Probe-nicht-bindenden Materialien (NB) besteht,
- 10 b) in den jeweiligen Kavitäten werden die unterschiedlichen Chromatographiemedien mit einer biologischen Probe in Kontakt gebracht,
- 15 c) wobei die Chromatographiemedien derart in den einzelnen Kavitäten der Multi-Well-Platte angeordnet sind, dass in jeder einzelnen Kavität zum einen ein Chromatographiemedium der Gruppe B und der Gruppe NB vorhanden ist, zum anderen aber sich diese Chromatographiemedium der Gruppe B und der Gruppe NB wenigstens in einem einzigen Parameter unterscheiden,
- 20 d) die in den jeweiligen Kavitäten befindliche biologische Probe wird in an-bindende-Materialien-gebundene und nicht-gebundene Biomoleküle separiert,
- e) die gebundenen und nicht-gebundenen Moleküle der biologischen Probe werden für jede einzelne Kavität in Abhängigkeit des in der jeweiligen Kavität befindlichen Chromatographiemediums analysiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei der biologischen Probe um gereinigte oder ungereinigte Proteine, Peptide, Nukleinsäuren aller Art, Kohlenhydrate, Lipide und andere Biomolekülstoffklassen oder niedermolekulare Stoffwechselprodukte oder Gemische derselben handelt.
- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Chromatographiemedien der die biologische Probe bindenden Materialien (Gruppe B) ausgewählt sind aus Feststoffpartikel, die die Eigenschaft besitzen, Biomoleküle zu absorbieren, wie z.B. Affinitäts-Chromatographie-Medien, Anionenaustauscher, Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Medien, Hydroxylapatit-Chromatographie-Medien, 10 Kationenaustauscher, Metallaffinitäts-Chromatographie-Medien, Reversed-Phase Materialien.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Chromatographiemedien der die biologische Probe nicht-bindenden Verbindungen (Gruppe NB) ausgewählt sind aus organischen und/oder anorganischen Säuren, Basen, Salzen, deren Derivaten oder Lösungsmitteln aller Art sowie deren wäßrigen Lösungen. 15
5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Mittel zur Stabilisierung der biologischen Probe ausgewählt werden aus zum Beispiel: Glycerol, Sucrose, Natriummo-lybdat, Ethylenglycole, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Betain, Taurin, DTE, DTT, EDTA, EGTA, Monothioglycerol, Detergentien, Polyethylenglykol 20 (PEG), Chloroform, Methanol, H₂O, Proteaseinhibitoren
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zeitdauer des Inkontaktbringens der biologischen Probe mit den Chromatographiemedien frei wählbar ist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, wobei das Verfahren automatisiert ist.
- 25 8. Kit zum Auffinden geeigneter Chromatographiebedingungen bei der Trennung biologischer Moleküle nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 7, bestehend aus zumindest

- 32 -

- a) einer Multi-Well-Platte, die durch Spalten (X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, wobei unterschiedliche Chromatographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matrizenpunkten der Platte angeordnet sind,
 - 5 b) unterschiedlichen Chromatographiemedien zur Bestückung der Matrizenpunkte.
9. Kit nach Anspruch 8, wobei dieser eine Software zur Auswertung, Identifizierung und Interpretation der durch das Verfahren gem. Anspruch 1 bis 6 enthält.

Fig. 1

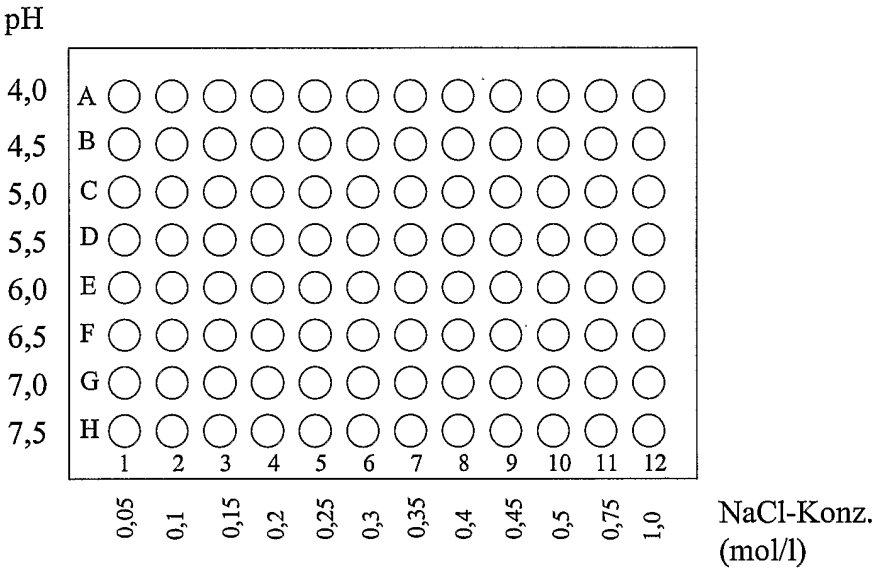


Fig. 2

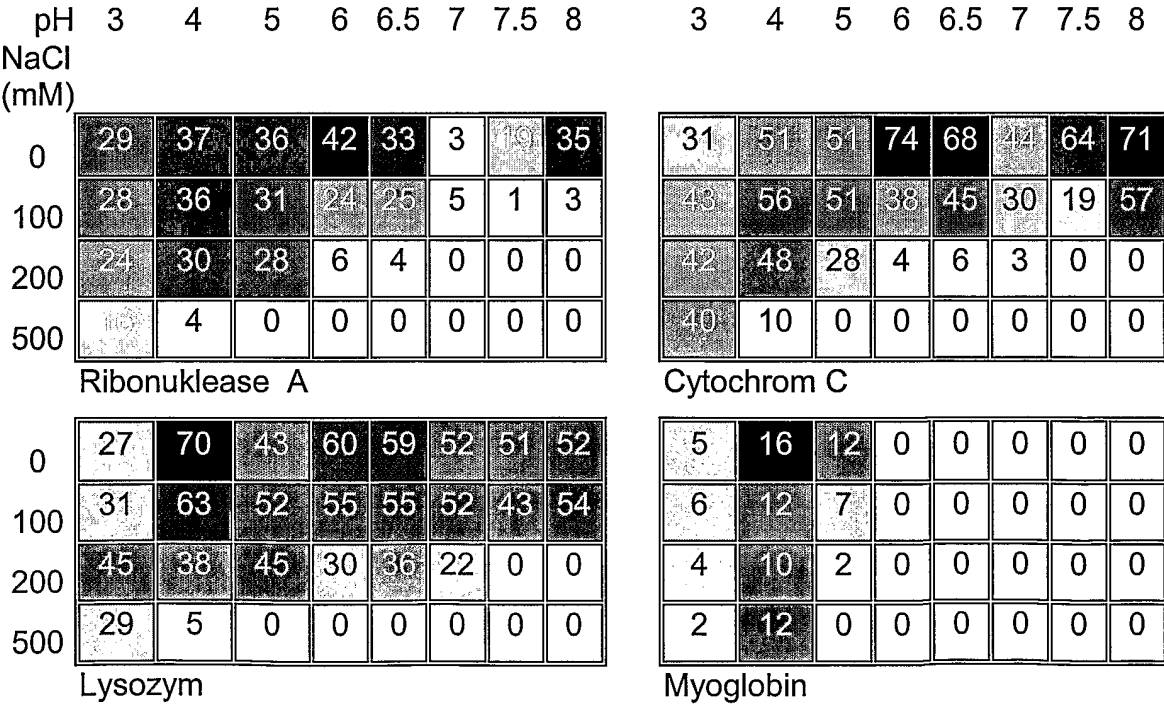


Fig. 3

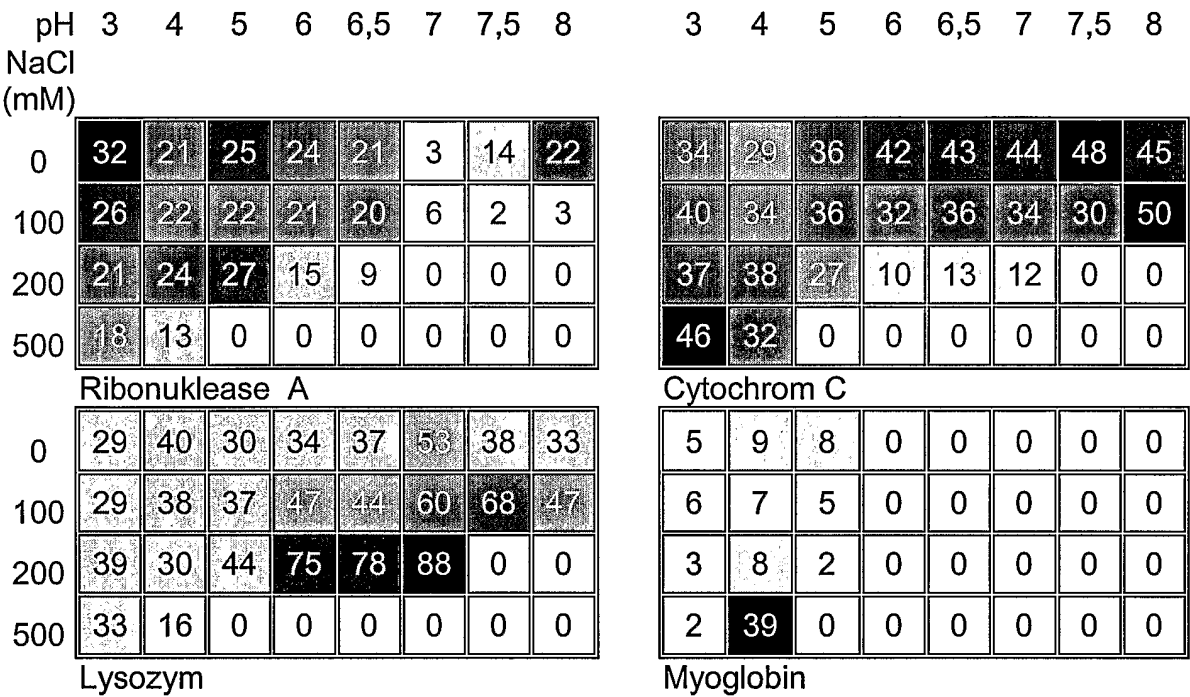


Fig. 4

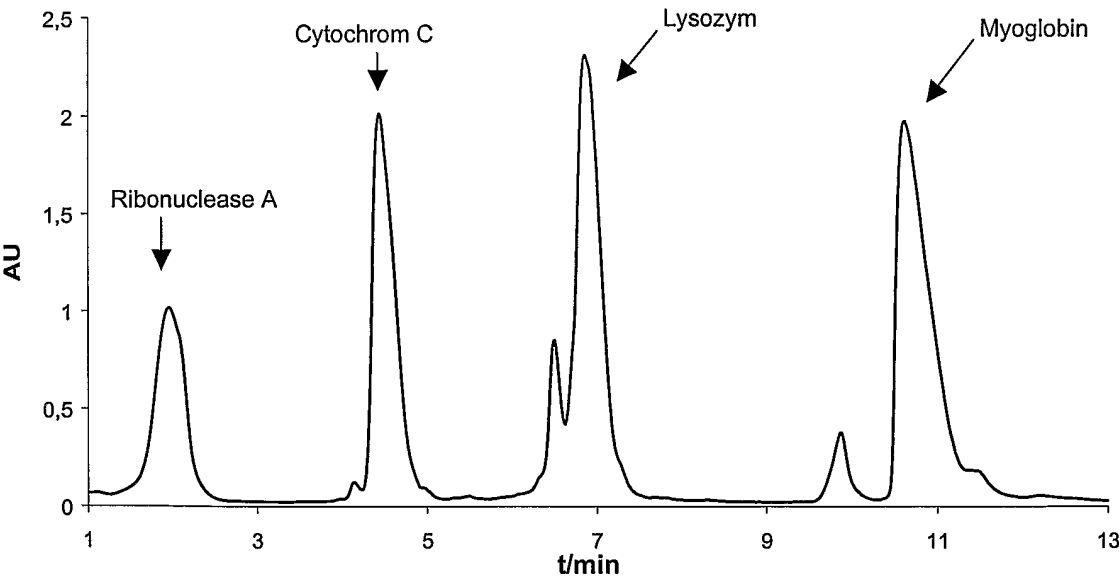


Fig. 5

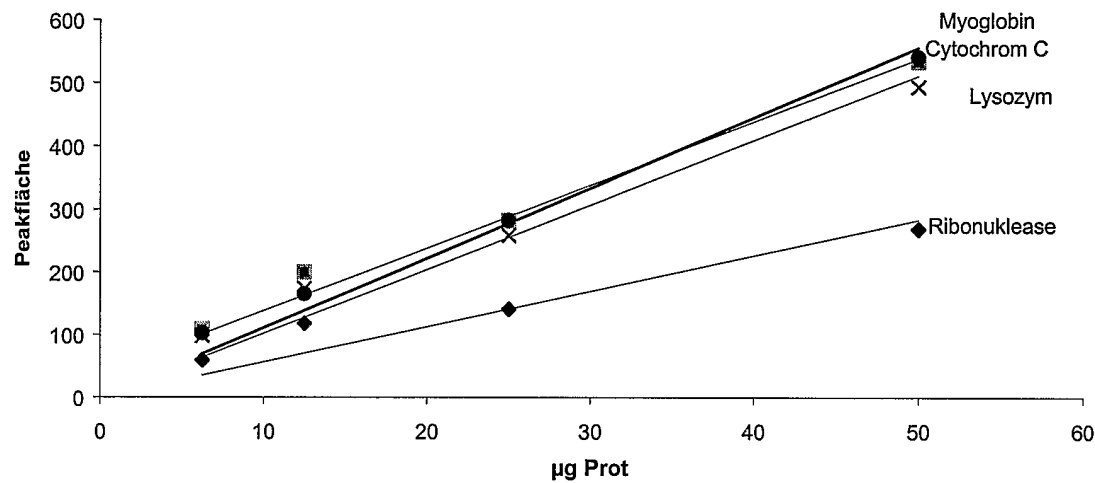


Fig. 6

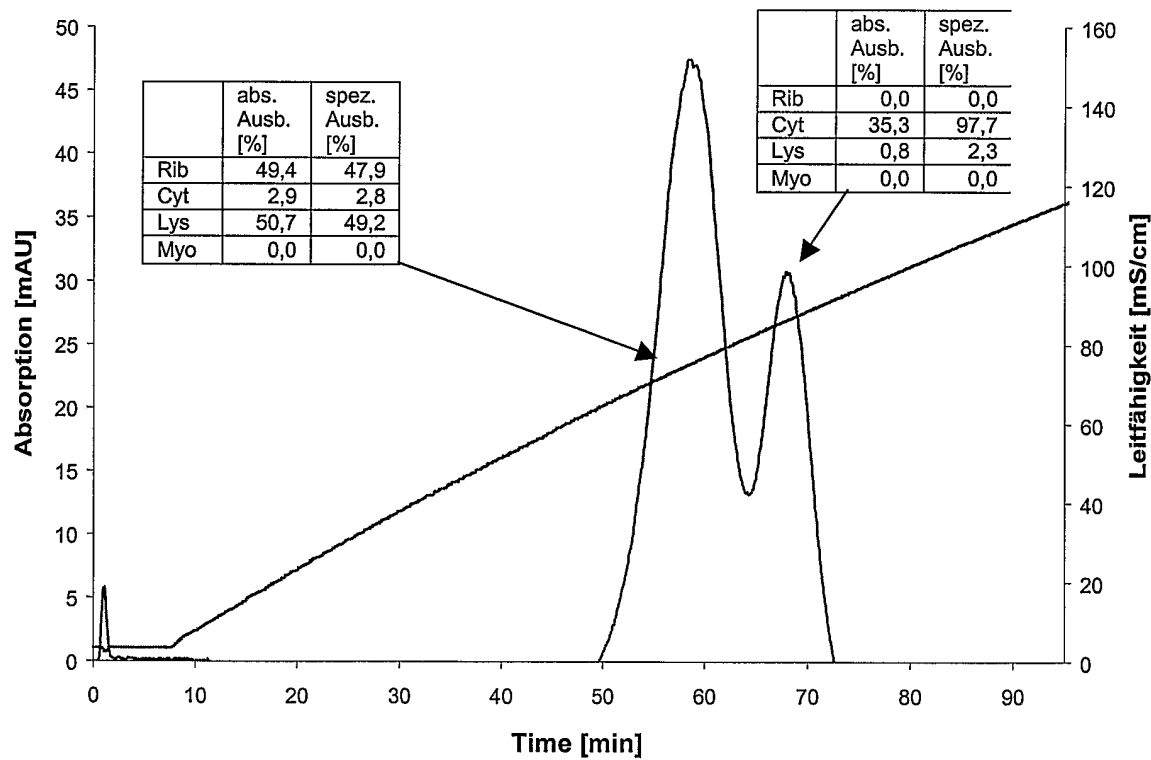


Fig. 7

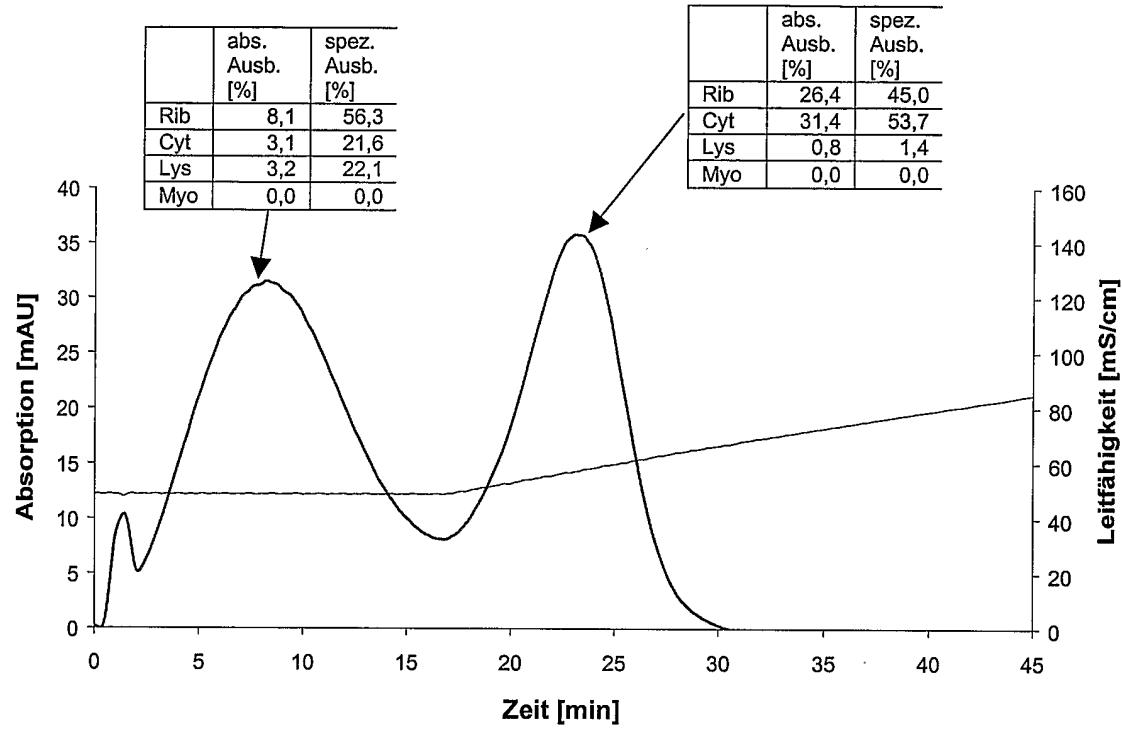


Fig. 8

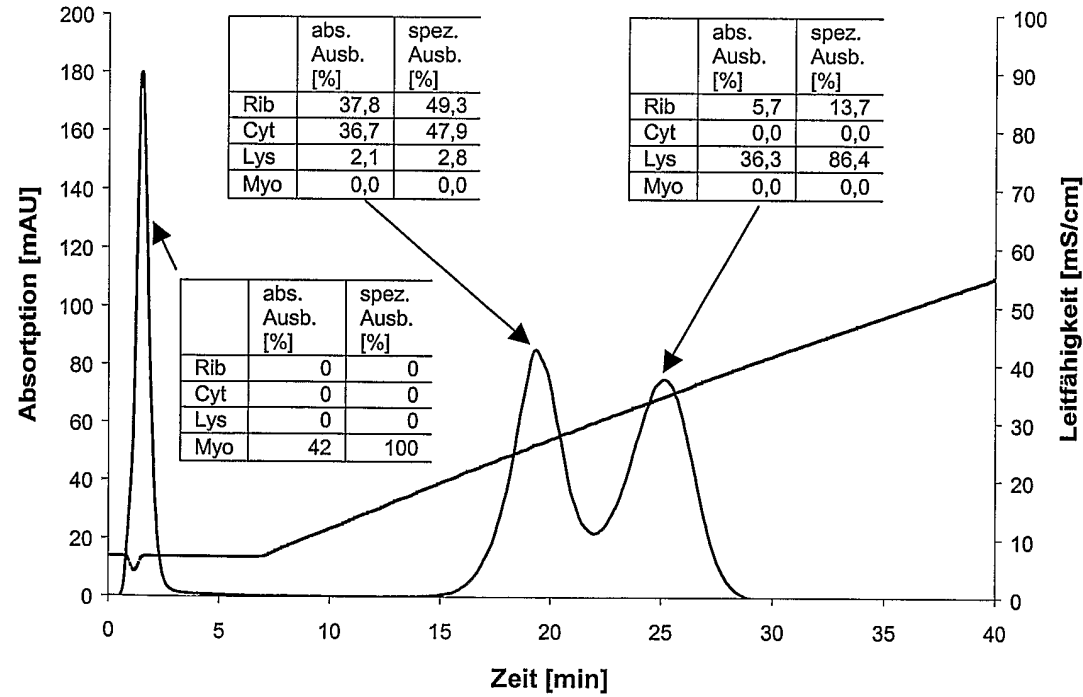


Fig. 9

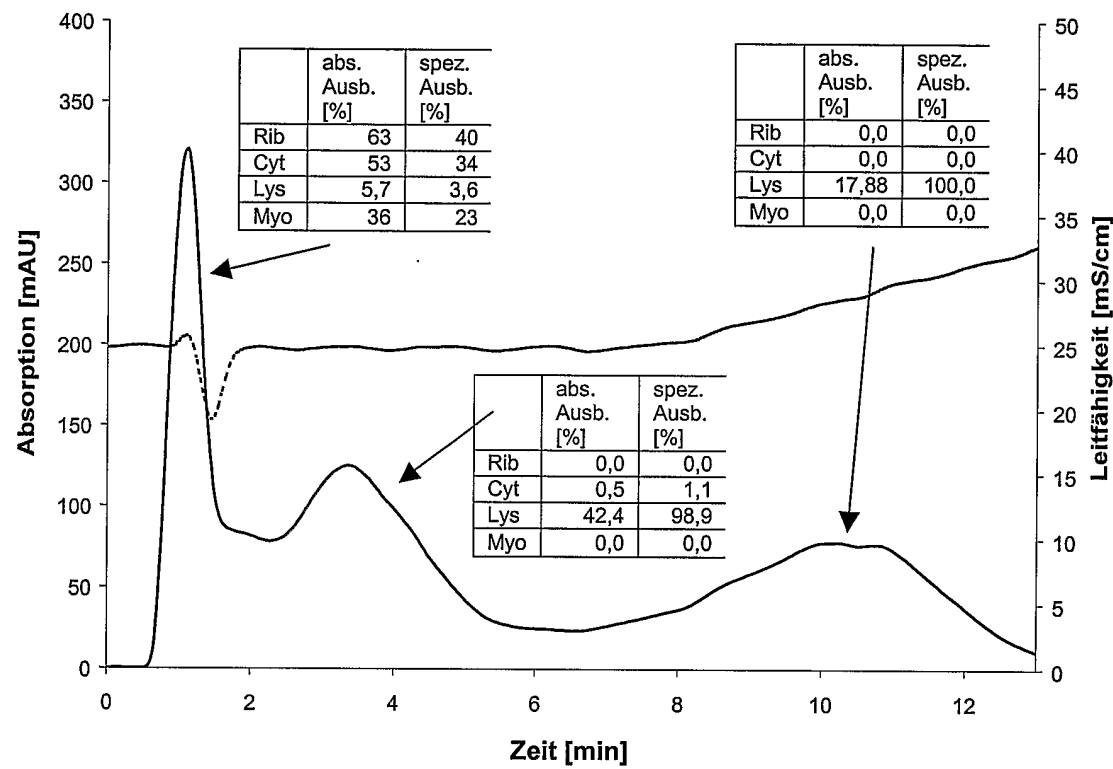


Fig. 10

NaCL	0 mM	100 mM	200 mM	500 mM
pH				
3	542	927	1024	1062
4	78	150	159	136
5	203	111	419	83
6	119	140	219	117
6,5	96	206	183	174
7	308	98	640	144
7,5	82	111	201	228
8	296	181	237	283

Fig. 11

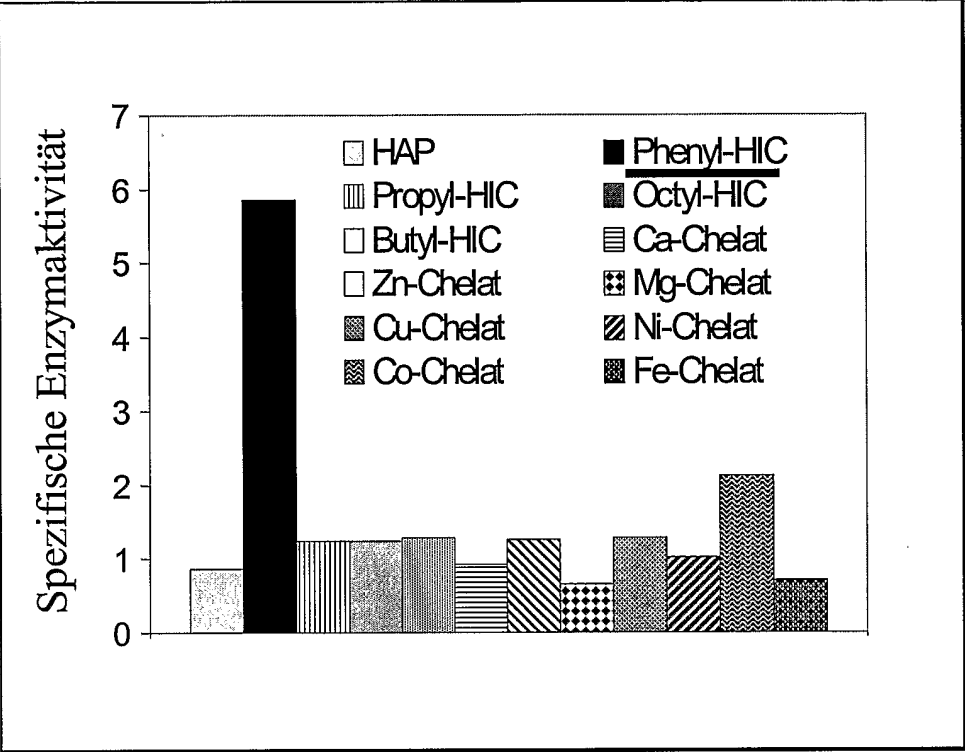


Fig. 12

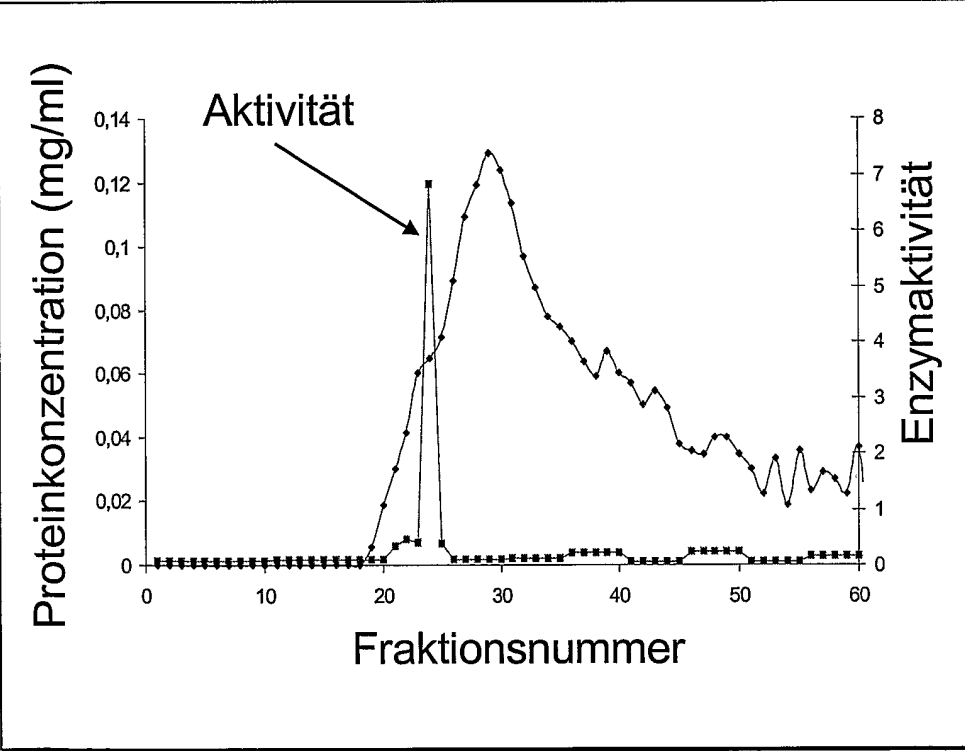
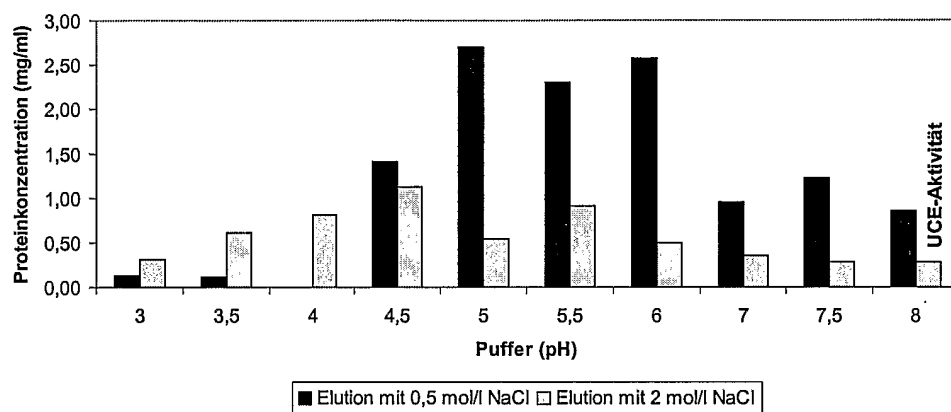


Fig. 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 03/03108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01D15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2001/047086 A1 (S.M. CRAMER) 29 November 2001 (2001-11-29) page 3, paragraph 46 - page 4, paragraph 57; figure 1	1-9
A	DE 100 49 079 A (MERCK PATENT GMBH) 18 April 2002 (2002-04-18)	
A	WO 99/24138 A (BIOSEPPA INC) 20 May 1999 (1999-05-20) cited in the application	
A	WO 01/77662 A (PROCTER & GAMBLE) 18 October 2001 (2001-10-18) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 2004

Date of mailing of the international search report

27/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001047086	A1	29-11-2001	NONE
DE 10049079	A	18-04-2002	DE 10049079 A1 18-04-2002 AU 1048502 A 15-04-2002 WO 0229401 A1 11-04-2002 EP 1342080 A1 10-09-2003
WO 9924138	A	20-05-1999	AU 1315699 A 31-05-1999 WO 9924138 A1 20-05-1999
WO 0177662	A	18-10-2001	US 2002010566 A1 24-01-2002 AU 5525401 A 23-10-2001 CA 2402155 A1 18-10-2001 EP 1295116 A2 26-03-2003 JP 2003530572 T 14-10-2003 WO 0177662 A2 18-10-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International Aktenzeichen

PCT/DE 03/03108

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01D15/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2001/047086 A1 (S.M. CRAMER) 29. November 2001 (2001-11-29) Seite 3, Absatz 46 - Seite 4, Absatz 57; Abbildung 1	1-9
A	DE 100 49 079 A (MERCK PATENT GMBH) 18. April 2002 (2002-04-18)	
A	WO 99/24138 A (BIOSEPPA INC) 20. Mai 1999 (1999-05-20) in der Anmeldung erwähnt	
A	WO 01/77662 A (PROCTER & GAMBLE) 18. Oktober 2001 (2001-10-18) in der Anmeldung erwähnt	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Februar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hilgenga, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/DE 03/03108

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2001047086	A1	29-11-2001	KEINE		
DE 10049079	A	18-04-2002	DE	10049079 A1	18-04-2002
			AU	1048502 A	15-04-2002
			WO	0229401 A1	11-04-2002
			EP	1342080 A1	10-09-2003
WO 9924138	A	20-05-1999	AU	1315699 A	31-05-1999
			WO	9924138 A1	20-05-1999
WO 0177662	A	18-10-2001	US	2002010566 A1	24-01-2002
			AU	5525401 A	23-10-2001
			CA	2402155 A1	18-10-2001
			EP	1295116 A2	26-03-2003
			JP	2003530572 T	14-10-2003
			WO	0177662 A2	18-10-2001