PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12P 21/00, C07K 3/18

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/02194

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. März 1990 (08.03.90)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00938

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. August 1989 (09.08.89)

(30) Prioritätsdaten:
P38 28 784.6 25. August 1988 (25.08.88) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* PHARMA BIOTECHNOLOGIE HANNOVER GMBH [DE/DE]; Feodor-Lynen-Straße 5, D-3000 Hannover 61 (DE).

(72) Erfinder;und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US) :* KLOSS, Michael [DE/DE]; Schubertstraße 4, D-3000 Hannover 1 (DE). KLAAR, Jürgen [DE/DE]; Kolberger Straße 2 A, D-3150 Peine (DE).

(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR SEPARATING SOLUBLE CONSTITUENTS OF CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ABTRENNUNG VON LÖSLICHEN ZELLINHALTSSTOFFEN

(57) Abstract

In a process for separating soluble constituents of cells from suspended cell fragments or suspended cells, which release the soluble constituents of cells, the constituents are selectively adsorbed onto a solid carrier and then dissolved out of the carrier. The solid carrier is added without prior separation of the cells or cell fragments. The carrier has either a) a particle size at least 5 times greater than that of the cells or cell fragments or b) a density which differs from that of the cells or cell fragments by at least 0.2 g/l. The cells or cell fragments are separated from the carrier in case a) by filtration through a filter medium permeable to the cells or cell fragments but not to the carrier, and in case b) by flotation or sedimentation of the carrier and settling or decantation of the suspension of cells or cell fragments. In both cases a) and b), the carrier is repeatedly suspended with fresh solvent or a suitable washing medium and repeatedly separated until at least 99 % of the cells or cell fragments are removed from the mixture.

(57) Zusammenfassung

Das Verfahren zur Abtrennung von löslichen Zellinhaltsstoffen aus suspendierten Zelltrümmern oder aus suspendierten Zellen, welche die löslichen Zellinhaltsstoffe nach außen abgeben durch selektive Adsorption der Zellinhaltsstoffe an einem festen Träger und anschließende Ablösung der Zellinhaltsstoffe von dem Träger erfolgt dadurch, daß der feste Träger ohne vorherige Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer zugesetzt wird, wobei ein Träger verwendet wird, der entweder a) um mindestens den Faktor 5 größere Teilchengrößen aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer oder b) ein mindestens um den Wert 0,2 g/l abweichendes spezifisches Gewicht aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer, woraufhin die Zellen oder Zelltrümmer von dem Träger abgetrennt werden im Fall a): durch Filtration über ein Filtermedium, welches zwar die Zellen oder Zelltrümmer durchläßt, nicht jedoch den Träger, oder im Fall b): durch Flotation oder Sedimentation des Trägers und Ablassen oder Dekantieren der Suspension der Zellen oder Zelltrümmer, woraufhin in beiden Fällen a) und b) der Träger mehrfach mit frischem Lösungsmittel oder einem geeigneten Waschmedium erneut suspendiert und erneut abgetrennt wird, bis mindestens 99 % der Zellen oder Zelltrümmer aus dem Gemisch entfernt sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Fasso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Verfahren zur Abtrennung von löslichen Zellinhaltsstoffen

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Abtrennung von löslichen Zellinhaltsstoffen aus suspendierten Zelltrümmern oder aus suspendierten Zellen, welche die löslichen Zellinhaltsstoffe nach außen abgeben, durch selektive Adsorption der Zellinhaltsstoffe an einem festen Träger und anschließender Ablösung der Zellinhaltsstoffe von dem Träger.

Es ist üblich, derartige Abtrennverfahren in zwei aufeinanderfolgen Verfahrensschritten durchzuführen, indem zunächst die suspendierten Zellen oder Zelltrümmer durch Zentrifugieren oder Filtrieren abgetrennt werden, woraufhin dann aus der flüssigen Phase, gegebenenfalls nach Aufkonzentrierung, die gewünschten löslichen Zellinhaltsstoffe durch selektive Adsorption an einen festen Träger abgetrennt werden. Diese Abtrennung erfolgt entweder im Batch-Verfahren oder durch Säulenchromatographie.

Die selektive Adsorption der Zellinhaltsstoffe an einen festen Träger erfolgt in zunehmendem Maße durch Träger, die für Affinitätschromatographien geeignet sind. Da derartige Träger jedoch relativ teuer sind, wurde oftmals eine Adsorption an einen unspezifischen Träger vorgeschaltet. Es wurde dann nur die Fraktion der Affinitätschromatographie unterworfen, die zuvor durch den unspezifischen Träger aus der Suspension abgetrennt wurde.

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, die bekannten Verfahren zur Abtrennung von löslichen Zellinhaltsstoffen aus suspendierten Zelltrümmern oder aus suspendierten Zellen, welche lösliche Zellinhaltsstoffe nach außen abgeben, zu vereinfachen, zu beschleunigen, effizient zu gestalten und dabei den Verbrauch an Chromatographiematerial und Lösungsmitteln zu vermindern.

Diese Aufgabe kann bei dem eingangs genannten Verfahren überraschend einfach dadurch gelöst werden, daß der feste Träger ohne vorherige Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer zugesetzt wird, wobei ein Träger verwendet wird, der entweder

a) um mindestens den Faktor 5 größere Teilchengrößen aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer oder
b) ein mindestens um den Wert 0,2 g/l abweichendes spezifisches Gewicht aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer,

woraufhin die Zellen oder Zelltrümmer von dem Träger abgetrennt werden

im Fall a):

durch Filtration über ein Filtermedium, welches zwar die Zellen oder Zelltrümmer durchläßt, nicht jedoch den Träger,

oder im Fall b):

durch Flotation oder Sedimentation des Trägers und Ablassen oder Dekantieren der Suspension der Zellen oder Zelltrümmer,

woraufhin in beiden Fällen a) und b) der Träger mehrfach mit frischem Lösungsmittel oder einem geeigneten Waschmedium erneut suspendiert und erneut abgetrennt wird, bis mindestens 99 % der Zellen oder Zelltrümmer aus dem Gemisch entfernt sind.

Besonders einfach und effizient kann das erfindungsgemäße Verfahren dadurch abgeändert werden, daß der

Träger die Merkmale a) und b) aufweist und die Abtrennung des Trägers von Zellen oder Zelltrümmern durch eine Kombination von Filtration einerseits und Ablassen bzw. Dekantieren andererseits erfolgt.

Als Träger für das erfindungsgemäße Verfahren können prinzipiell alle Träger verwendet werden, die ausreichend selektiv die gewünschten, gelösten Zellinhaltsstoffe adsorbieren können. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß auch unmittelbar mit Trägern gearbeitet werden kann, die für Affinitätschromatographie geeignet sind.

Um lösliche Zellinhaltsstoffe aus Mikroorganismen zu gewinnen, ist es meist nötig, die Zellen zu zertrümmern und aus dieser Suspension von Zelltrümmern die gewünschten Zellinhaltsstoffe abzutrennen. Dieses Verfahren wird insbesondere bei Bakterien wie Escherichia coli angewendet, wenn es sich bei den löslichen Zellinhaltsstoffen um Peptide handelt, die von diesem Mikroorganismus nicht nach außen abgegeben werden. Zu den Zellen, welche lösliche Zellinhaltsstoffe, insbesondere Peptide nach außen abgeben, zählen beispielsweise Hefen.

Zu den erfindungsgemäß abtrennbaren löslichen Zellinhaltsstoffen gehören aber nicht nur Peptide, sondern auch andere lösliche Zellinhaltsstoffe mit mittlerem bis höherem Molekulargewicht wie Antibiotika, Steroide, Prostaglandine, Antikörper, Lectine etc. Wesentlich ist, daß diese Zellinhaltsstoffe löslich sind, wobei als Lösungsmittel nicht nur Wasser und wäßrige Medien, sondern auch organische Lösungsmittel in Frage kommen.

Als feste Träger kommen prinzipiell alle Träger in Frage, die zur selektiven Adsorption von löslichen Zellinhaltsstoffen geeignet sind. Sofern die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer nur durch Filtration gemäß Fall a) erfolgen soll, muß nur dafür gesorgt werden, daß die Träger um mindestens den Faktor 5 größere Teilchengrößen aufweisen als die Zellen oder Zelltrümmer, und Filtermedien verwendet werden, welche zwar die Zellen oder Zelltrümmer durchlassen, nicht jedoch den Träger. Es kommen somit hierfür auch die Träger aus organischen Polymeren, vernetzten Dextranen, Cellulose, Cellulosederivaten, Stärkederivaten etc. in Frage.

Um auch von der Abtrennung durch Flotation oder Sedimentation des Trägers und Ablassen oder Dekantieren der Suspension der Zellen oder Zelltrümmer Gebrauch machen zu können, ist es jedoch notwendig, daß der Träger ein um mindestens um den Wert 0,2 g/l abweichendes spezifisches Gewicht aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer. Derartige Abweichungen des spezifischen Gewichtes des Trägers erzielt man entweder durch Verwendung von ganz oder teilweise geschlossenporigen Schäumen oder durch Träger auf Basis von anorganischen Materialien wie Gläsern, Silicaten, Aluminaten oder Polymerisation mit eingelagerten, spezifisch schweren Füllstoffen, die auch das spezifische Gewicht der Teilchen entsprechend erhöhen. Ein Material, das sowohl das Merkmal a) als auch das Merkmal b) aufweist, ist beispielsweise Glas, wobei dieses insbesondere in Form von porösem Glasgrieß zur Anwendung kommen kann. Glasgrieß wird im Handel angeboten. Seine Oberfläche kann gewünschtenfalls so modifiziert werden, daß es selektiv nur noch bestimmte Stoffe oder Stoffgruppen adsorbiert. Seine Oberfläche kann auch durch Auftragen von hochselektiven Gruppen für die Affinitätschromatographie verwendet werden.

Als Filtermedien, die zwar die Zellen oder Zelltrümmer, nicht jedoch die Träger durchlassen, können handelsübliche Fritten oder Siebe, insbesondere Glasfritten verwendet werden. Um ein Verstopfen dieser Glasfritten durch Zellen oder Zelltrümmer zu vermeiden, muß die Porenweite der Fritten ausreichend groß gewählt werden. Um unerwünschte Verluste an Träger oder ein Verstopfen der Poren durch den Träger zu vermeiden, muß die Teilchengröße der Träger mindestens um den Faktor 5 größer sein, vorzugsweise wird ein Träger verwendet, der um den Faktor 10 bis 100 größer ist als die Zellen bzw. Zelltrümmer.

Um von der Methode der Flotation oder Sedimentation des Trägers gemäß b) Gebrauch machen zu können, muß das spezifische Gewicht des Trägers ausreichend von dem spezifischen Gewicht der Zellen oder Zelltrümmer abweichen. Eine Abweichung um den Wert von 0,2 g/l reicht aus, insbesondere wenn der Träger Teilchengrößen aufweist, die mindestens gleich groß, vorzugsweise jedoch deutlich größer sind als die der Zellen oder Zelltrümmer, da bekanntlich die Geschwindigkeit der Flotation oder Sedimentation auch von der Teilchengröße der Träger abhängt.

Die Flotation oder Sedimentation des Trägers kann zwar prinzipiell auch durch Zentrifugieren beschleunigt werden. Es ist jedoch relativ schwierig, Zentrifugen so zu steuern und zu überwachen, daß die eine Festkörperkomponente abgeschieden wird und die andere in der Suspension verbleibt.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht auch darin, daß auf die Abtrennung mit Zentrifugen völlig verzichtet werden kann und die sonst

übliche zweistufige Abtrennung in zwei getrennten Apparaturen erfindungsgemäß in einem Schritt und in einer Apparatur durchgeführt werden kann. Während es bisher stets üblich war, die suspendierten Zelltrümmer oder suspendierten Zellen abzutrennen, ehe man einen festen Träger zur Adsorption der Zellinhaltsstoffe zugab, werden erfindungsgemäß Suspensionen erzeugt, die sowohl die Zelltrümmer oder Zellen einerseits und den festen Träger andererseits enthalten, um dann diese gemischten Suspensionen in der Weise wieder aufzutrennen, daß die festen Träger von den suspendierten Zelltrümmern oder suspendierten Zellen wieder abgetrennt werden. Eine derartige Auftrennung ist verfahrenstechnisch schwieriger als die zweimalige aufeinanderfolgende Abtrennung von Zelltrümmern oder Zellen aus einer Suspension einerseits und einem festen Träger andererseits.

Überraschenderweise führt das erfindungsgemäße Verfahren jedoch zu einer Reihe von nicht vorhersehbaren Vorteilen, so daß es durchaus sinnvoll und wirtschaftlich ist, von den an sich ungewöhnlichen Verfahrensmaßnahmen Gebrauch zu machen. Außer der bereits erwähnten Einsparung einer zweiten Verfahrensstufe und einer hierfür notwendigen zweiten Apparatur, führt das erfindungsgemäße Verfahren nämlich zu geringeren Verlusten und damit höheren Ausbeuten an löslichen Zellinhaltsstoffen. Weiterhin wird erfindungsgemäß weniger Lösungsmittel oder Waschmedium benötigt als nach dem Stand der Technik. Bereits durch mehrmaliges Suspendieren mit nahezu gleichgroßen Mengen an frischem Lösungsmittel oder geeignetem Waschmedium wird ein so großer Anteil an suspendierten Zelltrümmern oder suspendierten Zellen aus dem Gemisch entfernt, daß mehr als 99 % aus dem Gemisch entfernt sind. Gewünschtenfalls kann durch Wiederholung des Suspendierens und erneutes Abtrennen die

Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer soweit voran getrieben werden, daß 99,99 % entfernt werden. Derartige geringfügige Verunreinigungen des Trägers mit den daran selektiv adsorbierten löslichen Zellinhaltsstoffen stören bei der weiteren Aufarbeitung nicht, zumal die hochgereinigten löslichen Zellinhaltsstoffe sowieso im allgemeinen einer Sterilfiltration unterzogen werden.

Besonders rasch und effizient arbeitet das erfindungsgemäße Verfahren, wenn der Träger die Merkmale a) und b) aufweist und daher die Abtrennung des Trägers von den Zellen oder Zelltrümmern durch Kombination von Filtration einerseits und Ablassen bzw. Dekantieren andererseits folgen kann. Hierbei hat sich insbesondere bewährt, zunächst von der Flotation oder Sedimentation des Trägers Gebrauch zu machen und dann die restlichen Zellen oder Zelltrümmer durch Filtration zu entfernen. Dabei können beide Trennmethoden in derselben Apparatur durchgeführt werden, die obendrein einfach und preiswert ist, da sie im Prinzip nur aus einem Gefäß besteht, das einen Frittenboden und einen Dekantierstutzen bzw. Ablaßhahn aufweist.

Sofern lösliche Zellinhaltsstoffe aus suspendierten Zellen gewonnen werden, welche die löslichen Zellinhaltsstoffe nach außen abgeben, ist es sogar möglich, die suspendierten Zellen in den Fermenter zurückzuleiten und erneut für die Produktion einzusetzen.

In den nachfolgenden Beispielen ist das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert.

Beispiel 1

Verwendet wurde eine Hefezellsuspension, die durch gentechnologische Veränderungen der Hefe in der Lage war, ein humanes Peptid zu synthetisieren und zu exprimieren. Die etwa 40 %-ige Hefesuspension wurde im Anschluß an die Fermentation ohne weiteren Zwischenschritt homogenisiert und in einem gerührten, gekühlten Behälter mit Glasgrieß vermischt, wobei das Peptid bis zur Sättigungsgrenze an den Glasgrieß gebunden wurde. Die Suspension wurde dann über eine Fritte mit einer Porenweite von 0,1 mm abgezogen. Die Teilchengröße des Glasgrießes war größer als 500 µm im Durchmesser. Der Glasgrieß wurde daher von der Fritte zurückgehalten, während die Hefezellen durch die Fritte hindurchtreten konnten. Der Glasgrieß wurde mehrfach mit seinem eigenen Volumen an Waschmedium von den verbleibenden Heferesten gereinigt und anschließend bis zur vollständigen Klärung des Ablaufs im Durchlaufverfahren gewaschen. Eine Untersuchung ergab folgenden Verlauf der Abtrennung: 100 g Glasgrieß wurden mit 500 ml und 40 %-iger Hefesuspension vermischt. Demzufolge waren 200 g Hefezellen zu entfernen. Nach Abziehen der Suspension befanden sich im Ablauf bereits 140 g Hefe. Beim Glasgrieß verblieben somit 60 g Hefe. Nach dem ersten Waschen mit 100 ml Waschlösung fanden sich im Ablauf 40 g Hefe. Im Glasgrieß befanden sich somit noch 20 g Hefe. Nach dem zweiten Waschen mit 100 ml Waschlösung fanden sich im Ablauf 15 g Hefe, so daß am Glasgrieß noch 5 g Hefe verblieben. Bereits nach der sechsten Waschung fanden sich sowohl im Ablauf wie am Glasgrieß weniger als 0,5 g Hefe. Danach wurde mit 500 ml im Durchfluß gewaschen. Im Ablauf fanden sich noch 0,098 g Hefe. Am Glasgrieß fanden sich 0,002 g Hefe. Das Peptid wurde von dem Glasgrieß mit einem geeigneten Lösungsmittel

eluiert, wobei bereits eine 3,75-fache Anreicherung gegenüber der Suspension festgestellt wurde. Die Ausbeute war ca. 10 % höher als bei zweistufiger Auftrennung.

Beispiel 2:

1000 ml eines 10 %-igen Zellhomogenates wurden mit 100 ml Glasgrieß verrührt, wobei diese Menge ausreichte, das zu gewinnende Produkt zu adsorbieren. Die Vermischung des Zellhomogenates mit dem Glasgrieß erfolgte in einem Wirbelbett. Im nächsten Schritt wurde der Glasgrieß sedimentieren gelassen. Überstehende Hefesuspension wurde aus dem Wirbelbettreaktor mittels einer Dekantieröffnung, die oberhalb des Glasgrießbettes angebracht war, dekantiert und dann wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Nach kurzer Verwirbelung wurde der Glasgrieß wiederum sedimentieren gelassen und der Überstand erneut dekantiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Im Anschluß daran wurde der Glasgrieß, wie im Beispiel 1 beschrieben, über eine Glasfritte bis zur restlosen Entfernung der Zelltrümmer im Durchlauf gewaschen. Bei diesem kombinierten Verfahren konnten die Zelltrümmer mit 30 bis 50 % geringerem Waschvolumen vom Glasgrieß entfernt werden. Die Ablösung des Produktes vom Glasgrieß erfolgte wie im Beispiel 1.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Abtrennung von löslichen Zellinhaltsstoffen aus suspendierten Zelltrümmern oder aus suspendierten Zellen, welche die löslichen Zellinhaltsstoffe nach außen abgeben durch selektive Adsorption der Zellinhaltsstoffe an einem festen Träger und anschließende Ablösung der Zellinhaltsstoffe von dem Träger, dadurch gekennzeichnet, daß der feste Träger ohne vorherige Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer zugesetzt wird, wobei ein Träger verwendet wird, der entweder

   a) um mindestens den Faktor 5 größere Teilchengrößen aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer oder

   b) ein mindestens um den Wert 0,2 g/l abweichendes spezifisches Gewicht aufweist als die Zellen oder Zelltrümmer,

   woraufhin die Zellen oder Zelltrümmer von dem Träger abgetrennt werden

   im Fall a):

   durch Filtration über ein Filtermedium, welches zwar die Zellen oder Zelltrümmer durchläßt, nicht jedoch den Träger,

   oder im Fall b):

   durch Flotation oder Sedimentation des Trägers und Ablassen oder Dekantieren der Suspension der Zellen oder Zelltrümmer,

   woraufhin in beiden Fällen a) und b) der Träger mehrfach mit frischem Lösungsmittel oder einem geeigneten Waschmedium erneut suspendiert und erneut abgetrennt wird, bis mindestens 99 % der Zellen oder Zelltrümmer aus dem Gemisch entfernt sind.

2. Abänderung des Verfahrens gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger die Merkmale a) und b) aufweist und die Abtrennung des Trägers von den Zellen oder Zelltrümmern durch eine Kombination von Filtration einerseits und Ablassen bzw. Dekantieren andererseits erfolgt.

3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger solche verwendet werden, die für Affinitätschromatographie geeignet sind.

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 89/00938

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.[5]: C 12 P 21/00 , C 07 K 3/18

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.[5]:	C 12 P, C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category [10]	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
Y	EP, A, 0263518 (PHILLIPS PETROLEUM CO.) 13 April 1988, see claim 1	1-3
Y	R.K. Scopes: "Protein purification. Principles and Practice", 2nd Edition, 1982, 1987, Springer Verlag New York Inc. (New York, US), pages 88-93, see the whole article	1-3
Y	"Protein Purification. Micro to Macro", Proceedings of a Cetus-Ucla Symposium, Frisco, Colorado, 29 March - 4 April 1987, publisher R. Burgess, publishing house Alan R. Liss, Inc. (New York, US), E. Sulkowski: "Controlled pore glass chromatography of proteins", pages 177-195, see the whole article	1-3

* Special categories of cited documents: [10]

"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

"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.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
19 October 1989 (19.10.89)	17 November 1989 (17.11.89)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
European Patent Office	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 8900938 SA 30328

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 14/11/89
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0263518	13-04-88	US-A- 4777242	11-10-88
		AU-A- 7817387	14-04-88
		JP-A- 63105694	10-05-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 89/00938

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

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

Int Cl 5: C 12 P 21/00, C 07 K 3/18

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff[7]

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int. Cl. 5	C 12 P, C 07 K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen[8]

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN[9]

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung[11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile[12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
Y	EP, A, 0263518 (PHILLIPS PETROLEUM CO.) 13. April 1988, siehe Anspruch 1 --	1-3
Y	R.K. Scopes: "Protein purification. Principles and Practice", 2. Auflage, 1982,1987, Springer Verlag New York Inc. (New York, US), Seiten 88-93, siehe den ganzen Artikel --	1-3
Y	"Protein Purification. Micro to Macro", Proceedings of a Cetus-UCLA Symposium, Frisco, Colorado, 29. März - 4. April 1987, Ausgeber R. Burgess, Verlag Alan R. Liss, Inc. (New York, US), E. Sulkowski: "Controlled pore glass chromatography of proteins", Seiten 177-195, siehe den ganzen Artikel ----	1-3

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen[10]:

"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 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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19. Oktober 1989	17 NOV 1989
Internationale Recherchenbehörde	**Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten**
Europäisches Patentamt	T.K. WILLIS

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 8900938
SA 30328

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 14/11/89
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0263518	13-04-88	US-A- 4777242	11-10-88
		AU-A- 7817387	14-04-88
		JP-A- 63105694	10-05-88

EPO FORM P0473