



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 12 311 T2 2005.07.21**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 163 044 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 12 311.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/04745**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 911 955.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/50160**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **31.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **21.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.07.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **B01D 67/00**

**B01D 61/00, B01J 39/20, B01J 47/12,  
B01J 20/32**

(30) Unionspriorität:

**121668 P 25.02.1999 US**

(73) Patentinhaber:

**Pall Corp., East Hills, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**HOEGER, STELLRECHT & PARTNER  
Patentanwälte, 70182 Stuttgart**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, FR, GB, IT**

(72) Erfinder:

**HOU, Chung-Jen, Pensacola, US; KONSTANTIN,  
Peter, D-37627 Heinade, DE; YANG, Yujing,  
Pensacola, US**

(54) Bezeichnung: **NEGATIV GELADENE MEMBRANEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein negativ geladene Membranen und betrifft im Besonderen negativ geladene Membranen mit einem porösen Substrat und einer vernetzten Beschichtung. Die Membranen finden Verwendung in der Behandlung von Fluiden, welche positiv geladene Species, so etwa Proteine, enthalten, beispielsweise in der Ionenaustauschchromatographie.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Negativ geladene Ionenaustauschermembranen sind für die Trennung und/oder Reinigung von Biomolekülen, wie Proteinen, Aminosäuren und Nukleinsäuren, vorgeschlagen worden. Damit die Ionenaustauschermembran in den obengenannten Anwendungen ihre Aufgabe wirksam erfüllt, sollte die Membran mehrere wichtige Parameter erfüllen. Beispielsweise sollte die Membran hohe Fluidfließraten zeigen. Die Membran sollte ein hohes dynamisches Bindevermögen für Biomoleküle aufweisen und sollte zur selektiven Bindung der Biomoleküle, welche verschiedene Oberflächenladungen aufweisen, befähigt sein. Die Membran sollte also eine niedrige nichtspezifische Bindung zeigen, wie sie z.B. aus hydrophoben Wechselwirkungen resultiert. Die Membran sollte hohen Behandlungsfuidgeschwindigkeiten widerstehen können. Die Herstellung der Membran sollte keine Chemie und keine Prozesse involvieren, welche beschwerlich zu realisieren sind. Einige der bisher bekannten Kationenaustauschermembranen sind mit dem Mangel behaftet, dass sie einen oder mehrere der im Vorstehenden dargelegten Parameter nicht erfüllen.

**[0003]** Es besteht also Bedarf nach einer Kationenaustauschermembran, welche hohe Fluidfließraten zeigt. Es besteht ferner Bedarf nach einer Kationenaustauschermembran, welche eine hohe dynamische Bindungskapazität und Selektivität für Biomoleküle aufweist. Es besteht ferner Bedarf nach einer Membran mit einer niedrigen nichtspezifischen Bindung oder einer niedrigen Bindung, welche aus hydrophoben Wechselwirkungen resultiert. Es besteht ferner Bedarf nach einer Membran, welche hohen Fluidfließgeschwindigkeiten widerstehen kann. Ferner besteht Bedarf nach einer Membran, welche eine Herstellungsverfahren und/oder Prozesse involviert, welche nicht beschwerlich zu realisieren sind.

**[0004]** Diese Vorteile der vorliegenden Erfindung sowie weitere erfindungsgemäße Merkmale ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung der Erfindung.

**[0005]** US-Patent Nr. 5 021 160 offenbart Copolymere, synthetisiert aus 2-Acryl-amido-2-methyl-1-propansulfonsäure und entweder N-(Isobuto-

xymethyl)-acrylamid oder 2-Hydroxyethylmethacrylat, und ein Verfahren zur Herstellung anionischer ladungsmodifizierter mikroporöser Filtrationsmembranen.

**[0006]** WO 98/17377 offenbart geladene Membranen, umfassend ein poröses Substrat und einen vernetzten Polyelektrolyten oder Hydrogel, angeordnet in den Poren des Substrates.

**[0007]** Die europäische Patentanmeldung Nr. 0 474 617 A1 offenbart eine oberflächenmodifizierte Stützmembran, wobei die Stützmembran eine auf ihre Oberfläche aufgebrachte Hydrogelschicht aufweist.

**KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN**

**[0008]** [Fig. 1](#) zeigt die Durchbruchkurve für Lysozym, welche für eine Membran gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erhalten wird. Die x-Achse repräsentiert die Filtrationszeit, und die y-Achse repräsentiert die Extinktion des Filtrats bei 280 nm und zeigt die Proteinkonzentration an. Für zusätzliche Details siehe Beispiel 2.

**[0009]** [Fig. 2](#) zeigt die Durchbruchkurve für Lysozym, welche für eine Membran gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erhalten wird. Für die x-Achse und die y-Achse gilt das bezüglich [Fig. 1](#) Gesagte. Für zusätzliche Details siehe Beispiel 3.

**[0010]** [Fig. 3](#) zeigt die Durchbruchkurve für Lysozym, welche für eine Membran gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erhalten wird. Für die x-Achse und die y-Achse gilt das bezüglich [Fig. 1](#) Gesagte. Für zusätzliche Details siehe Beispiel 4.

**KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0011]** Viele der im Vorstehenden genannten Anforderungen werden von der vorliegenden Erfindung erfüllt, welche eine negativ geladene mikroporöse Membran bereitstellt, die ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung umfasst, wie in Anspruch 1 definiert. In Einklang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wie in Anspruch 27 definiert, kann die Membran hergestellt werden aus einer Zusammensetzung, welche ein ungesättigtes Monomer mit einer anionischen Gruppe, wenigstens ein oder mehrere N-(Hydroxyalkyl)- und/oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamide und ein hydrophiles ungesättigtes Monomer umfasst.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner eine negativ geladene mikroporöse Membran bereit mit einem Proteinbindevermögen von ca. 25 mg/ml Lysozym oder mehr, umfassend ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung, welche eine negative

Festladung bereitstellt. Die negativ geladene mikroporöse Membran gemäß der vorliegenden Erfindung, wie in Anspruch 1 definiert, umfasst ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung, umfassend ein Polymer mit anionischen Gruppen und Amid-Amid- und Amid-Ester-Vernetzungsstellen.

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Membranen sind vorteilhaft frei von kovalenten Bindungen oder Pfröpfungen mit dem Substrat.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren nach Anspruch 27 bereit zum Herstellen einer Ausführungsform der Membran.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung steht ferner ein Verfahren nach Anspruch 32 bereit zum Transferieren eines biologischen Materials von einem Elektrophoresegel, umfassend das Kontaktieren des Gels mit der erfindungsgemäßen Membran und Transferieren der Biomoleküle auf die Membran.

#### DETAILBESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0016]** Die vorliegende Erfindung stellt Ausführungsformen von negativ geladenen Membranen mit hoher Ladungsdichte, hohen Wasserfließraten, hohem dynamischen Proteinbindevermögen und niedrigem nichtspezifischem Proteinbindevermögen bereit. Die erfindungsgemäßen Membranen finden in der Kationenaustauschchromatographie und für die Trennung und/oder Reinigung von geladenen Species, insbesondere Biomolekülen wie Proteinen, Verwendung.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung stellt eine negativ geladene mikroporöse Membran bereit, wie in Anspruch 1 definiert, umfassend ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung mit anionischen Gruppen. Die vernetzte Beschichtung kann aus einer polymerisierten Zusammensetzung hergestellt sein, welche ein ungesättigtes Monomer mit einer anionischen Gruppe, wenigstens ein oder mehrere N-(Hydroxyalkyl)- oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamide und ein hydrophiles ungesättigtes Monomer umfasst. Die Zusammensetzung kann ferner einen Initiator enthalten. In bevorzugten Ausführungsformen ist das N-(Hydroxyalkyl)- oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamid so gewählt, dass die Alkylgruppe vier oder weniger Kohlenstoffatome aufweist; noch bevorzugter ist die Alkylgruppe Methyl.

**[0018]** Die vernetzte Beschichtung kann hergestellt werden aus der Zusammensetzung, welche ein hydroxylreiches Material, z.B. ein Polysaccharid, und optional einen Initiator umfasst. Die resultierende negativ geladene mikroporöse Membran umfasst ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung, welche ein Polymer mit anionischen Gruppen und

Amid-Amid- und Amid-Ester-Vernetzungsstellen aufweist.

**[0019]** Die erfindungsgemäße Membran enthält feste anionische Gruppen. Die anionische Gruppe kann eine beliebige negativ geladene Gruppe – eine Sulfonsäure-, Carbonsäure-, Phosphonsäuregruppe und dergleichen sein, bevorzugt eine Sulfon- oder Carbonsäuregruppe. Die Beschichtungszusammensetzung umfasst ein ungesättigtes Monomer mit einer anionischen Gruppe. Es kann ein beliebiges ungesättigtes Monomer – ein Vinyl-, aromatisches Vinyl-, Acryl- oder anderes Monomer verwendet werden.

**[0020]** Das ungesättigte Monomer ist bevorzugt ein Acryl-Monomer. Das Acryl-Monomer kann ein Acrylat oder ein Acrylamid sein. Das Acryl-Monomer ist bevorzugt ein Acrylamid. Der Ausdruck "Acrylamid" im vorliegenden Text bezieht sich auf unsubstituierte sowie substituierte Monomere mit einer  $-C=C-(C=O)-N$ -Gruppe. Die Stickstoff- und die  $C=C$ -Kohlenstoffatome können an Wasserstoff oder andere nichtpolare Substituenten gebunden sein. Ein Beispiel für derartige Substituenten ist Alkyl. Das substituierte Acrylamid kann also Alkylacrylamid sein. Der Ausdruck "Alkyl" im vorliegenden Text bezieht sich auf eine Alkylgruppe mit 1 bis ca. 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt 1 bis ca. 6 Kohlenstoffatomen, noch bevorzugter 1 bis ca. 3 Kohlenstoffatomen. Ein Beispiel für ein Acrylamid-Monomer mit einer Sulfonsäuregruppe ist Acrylamido-N-alkylsulfonsäure, bevorzugt 2-Acrylamido-2-methyl-1-propan-sulfonsäure. Bevorzugte Beispiele für Acryl-Monomere mit einer Carbonsäuregruppe sind 3-Acrylamido-3-methylbutansäure (AMBA), 2-Acrylamidoglycol-säure und  $\beta$ -Carboxyethylacrylat.

**[0021]** Die Beschichtungszusammensetzung umfasst ferner ein hydrophiles ungesättigtes Monomer, z.B. ein nichtionisches hydrophiles ungesättigtes Monomer. Es kann ein beliebiges geeignetes hydrophiles ungesättigtes Monomer verwendet werden, bevorzugt ein Acryl-Monomer. Das Monomer enthält eine oder mehrere polare Gruppen, welche Hydrophilie beisteuern. Beispiele für derartige Gruppen umfassen Hydroxy-, Alkoxy-, Hydroxyalkyl- und Amidogruppen. Bevorzugte hydrophile Gruppen sind Hydroxyl und Hydroxyalkyl. Bevorzugte hydrophile Acryl-Monomere sind also Hydroxyacryl- und Hydroxyalkylacryl-Monomere. Das Acryl-Monomer kann ein Acrylatester oder ein Acrylamid sein. Ein Beispiel für ein bevorzugtes Hydroxyalkylacrylat-Monomer ist Hydroxypropylmethacrylat.

**[0022]** Die Beschichtungszusammensetzung umfasst ein Vernetzungsmittel, welches mindestens ein oder mehrere N-(Hydroxyalkyl)- und/oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamide umfasst. Bevorzugte Vernetzungsmittel umfassen N-(Alkoxyethyl)-acrylamid und

N-(Hydroxymethyl)-acrylamid. Weiter bevorzugt ist N-(Isobutoxymethyl)-acrylamid.

**[0023]** Die Beschichtungszusammensetzung umfasst bevorzugt einen Initiator. Es kann ein beliebiger geeigneter Initiator – ein radikalischer Initiator, Photo-initiator und dergleichen – verwendet werden. Ein radikalischer Initiator ist bevorzugt. Ein Beispiel für einen geeigneten radikalischen Initiator ist ein Persulfat, so etwa Ammoniumpersulfat.

**[0024]** Ohne Beschränkung auf eine bestimmte Theorie wird davon ausgegangen, dass die Verwendung der drei Monomere in gewissen Ausführungsformen zu einer erhöhten räumlichen Ladungstrennung beiträgt. Es wird also angenommen, dass die Entfernung zwischen den anionischen Gruppen erhöht wird. Diese erhöhte Entfernung ist ungünstig für eine Assoziation der anionischen Gruppen. Dementsprechend wird eine Inter- und/oder Intrakettenassoziation von anionischen Gruppen vermindert, verglichen mit einem System, worin nur ein anionisches Monomer und ein Vernetzungsmonomer verwendet werden, insbesondere in einem Zweimonomerensystem, worin ein hydrophiles oder hydroxylreiches Material, wie ein Polysaccharid, nicht verwendet wird. Die verminderte Assoziation macht die negativ geladenen Gruppen für die Wechselwirkung mit positiv geladenen Molekülen in dem behandelten Fluid verfügbar. Dies führt beispielsweise zu einem verbesserten dynamischen Proteinbindevermögen.

**[0025]** In einigen Ausführungsformen ist die Membran aus einer Beschichtungszusammensetzung hergestellt, welche ein hydroxylreiches Material umfasst, bei dem es sich um ein kleines Molekül oder ein Polymer mit einer Mehrzahl von Hydroxylgruppen, z.B. zwei, drei, vier oder mehr Hydroxylgruppen pro Molekül, handeln kann. Beispiele für hydroxylreiche Materialien umfassen Polysaccharide und Polyvinylalkohol, bevorzugt Polysaccharide. Ohne Beschränkung auf einen bestimmten Mechanismus wird davon ausgegangen, dass die Hydroxylgruppen des hydroxylreichen Materials bei der Wasserstoffbrückenbindung mit dem Fluid involviert sind. Die Saccharid-Ring-Struktureinheiten üben sterische Effekte aus. Das Auftreten eines dieser Mechanismen oder beider Mechanismen führt zu einer erhöhten Ladungstrennung unter den anionischen Gruppen. Es wird angenommen, dass die erhöhte Ladungstrennung die Anionenassoziation vermindert und die Wechselwirkung zwischen den anionischen Plätzen und den positiv geladenen Species in dem behandelten Fluid erleichtert.

**[0026]** Es kann ein beliebiges geeignetes Polysaccharid verwendet werden, bevorzugt ein wasserlösliches Polysaccharid. Ein Beispiel für ein bevorzugtes Polysaccharid ist Dextran. Das Molekulargewicht des Dextrans liegt unterhalb von ca. 40 000 000, z.B. in

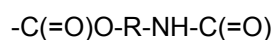
einem Bereich von ca. 10 000 bis ca. 2 000 000, bevorzugt ca. 10 000 bis ca. 500 000, noch bevorzugter ca. 10 000 bis ca. 300 000. Als besondere Beispiele für geeignete Molekulargewichte lassen sich nennen 110 000 und 148 000.

**[0027]** In gewissen Ausführungsformen kann die Beschichtungszusammensetzung hergestellt werden durch Kombinieren und Polymerisieren des Acryl-Monomers mit einer anionischen Gruppe, dem nichtionischen hydrophilen Monomer, dem Vernetzungsmittel und dem Initiator.

**[0028]** Die Polymerisation kann in einem Lösemittel durchgeführt werden, bevorzugt in Wasser oder einer Wasser/Methanol-Lösung. Die Polymerisation wird bevorzugt vor Bildung eines Gels oder übermäßiger Vernetzung angehalten. Die Viskosität der Polymerisationslösung kann überwacht werden, um den Polymerisationsgrad zu begrenzen. Die Polymerisation wird für eine beliebige geeignete Zeitdauer durchgeführt, z.B. ca. 4 Stunden oder mehr. In Einklang mit gewissen Ausführungsformen wird die Polymerisation für einen Zeitraum von ca. 4 Stunden bis ca. 5 Stunden durchgeführt. In Einklang mit gewissen anderen Ausführungsformen wird die Polymerisation für einen Zeitraum von ca. 16 Stunden bis ca. 24 Stunden durchgeführt. Die Viskosität der Lösung liegt typisch unter ca. 2000 cps (2 Pa.s), z.B. bevorzugt in einem Bereich von ca. 50 cps (0,05 Pa.s) bis ca. 500 cps (0,5 Pa.s), noch bevorzugter ca. 100 cps (0,1 Pa.s) bis ca. 500 cps (0,5 Pa.s). In Einklang mit gewissen Ausführungsformen liegt die Viskosität in einem Bereich von ca. 100 cps (0,1 Pa.s) bis ca. 250 cps (0,25 Pa.s).

**[0029]** Die Polymerisationslösung kann das anionische Acryl-Monomer (A), das Vernetzungsmittel (B) und das nichtionische hydrophile Monomer (C) in einem geeigneten Verhältnis enthalten. Der prozentuale Anteil jedes Monomers (A, B oder C) kann in einem Bereich von ca. 0,1 bis 30 Gew.-%, bevorzugt ca. 0,1 bis 20 Gew.-% angesiedelt sein.

**[0030]** Die vernetzte Beschichtung umfasst Amid-Ester-Vernetzungsstellen, welche sich als eine Folge der Reaktion des nichtionischen hydrophilen Monomers mit dem Vernetzungsmittel bilden. So bilden sich diese Bindungen zum Beispiel infolge der Reaktion der Hydroxylgruppen in dem Hydroxyalkylacrylat mit dem N-(Isobutoxymethyl)-acrylamid. Ferner bilden sich Amid-Amid-Vernetzungsstellen als eine Folge der Reaktion zwischen zwei N-(Isobutoxymethyl)-acrylamid-Monomeren. Beispielsweise kann die Amid-Ester-Vernetzung die Formel



aufweisen, worin R ein zweiwertiges Radikal, bevorzugt ein Alkoxyalkyl-Radikal, noch bevorzugter

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  ist. Die Amid-Amid-Vernetzung kann die Formel



aufweisen, worin R ein zweiwertiges Radikal, bevorzugt ein Alkoxyalkyl-Radikal, noch bevorzugter  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  ist.

**[0031]** Die Beschichtungslösung enthält das wie im Vorstehenden beschrieben hergestellte anionische Polymer und optional ein Polysaccharid, bevorzugt ein Dextran. Das anionische Polymer und das Polysaccharid können in der Beschichtungslösung in einem Verhältnis von ca. 100:1 bis ca. 1:100 vorliegen, bevorzugt ca. 10:1 bis ca. 1:10, noch bevorzugter ca. 5:1 bis ca. 1:5.

**[0032]** Die Beschichtungslösung enthält das anionische Polymer und optional Dextran in einer Menge von ca. 0,01 Gew.-% bis ca. 15 Gew.-%, bevorzugt von ca. 0,1 Gew.-% bis ca. 10 Gew.-%, noch bevorzugter von ca. 0,5 Gew.-% bis ca. 5 Gew.-% der Beschichtungslösung. Beispielsweise kann die Beschichtungslösung 4,5 Gew.-% des Polymers und 1,5 Gew.-% Dextran enthalten.

**[0033]** Der pH-Wert der Beschichtungslösung kann geeignet eingestellt werden. Beispielsweise kann der pH-Wert der Beschichtungslösung, welche ein carboxyliertes Polymer enthält, auf ca. 3,0 bis ca. 4,0, bevorzugt ca. 3,75 eingestellt werden. Der pH-Wert der Beschichtung kann durch die Zugabe einer Säure oder Base eingestellt werden. Ein Beispiel für eine geeignete Base ist eine 2N wässrige NaOH-Lösung.

**[0034]** Die Beschichtungslösung wird auf ein poröses Substrat aufgebracht, bevorzugt ein hydrophiles Substrat. Das hydrophile poröse Substrat kann aus einem beliebigen geeigneten Material hergestellt sein; bevorzugt umfasst das Substrat ein Polymer. Beispiele für geeignete Polymer umfassen Polyaromaten, Polysulfone, Polyolefine, Polystyrole, Polycarbonate, Polyamide, Polyimide, Fluorpolymere, cellulosische Polymere, wie Celluloseacetate und Cellulosenitrate, und PEEK. Aromatische Polysulfone sind bevorzugt. Beispiele für aromatische Polysulfone umfassen Polyethersulfon, Bisphenol-A-Polysulfon und Polyphenylsulfon. Polyethersulfon ist besonders bevorzugt. Das poröse Substrat kann eine beliebige geeignete Porengröße aufweisen, z.B. eine Porengröße von unter ca. 10 µm, z.B. ca. 0,01 µm bis ca. 10 µm, bevorzugt ca. 0,1 µm bis ca. 5 µm, noch bevorzugter ca. 0,2 µm bis ca. 5 µm. Das poröse Substrat kann asymmetrisch oder – in einer bevorzugten Ausführungsform – symmetrisch sein.

**[0035]** Das poröse Substrat kann nach Verfahren hergestellt werden, wie sie dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. Beispielsweise kann das poröse

Substrat nach einem Phaseninversionsprozess hergestellt werden. Hierbei wird eine Gießlösung, welche das Polymer, ein Lösemittel, einen Porenbildner, ein Benetzungsmittel und optional eine kleine Menge eines Nicht-Lösemittels enthält, durch Kombinieren und Mischen der Bestandteile, bevorzugt bei erhöhter Temperatur, hergestellt. Die resultierende Lösung wird gefiltert, um Verunreinigungen zu entfernen. Die Gießlösung wird in die Form eines Flachmaterials oder einer Hohlaser gegossen oder extrudiert. Das resultierende Flachmaterial oder die resultierende Faser wird als eine phaseninvertierte Membran erstarrt oder gelieren gelassen. Die erstarrte Membran wird dann ausgelaugt, um das Lösemittel und andere lösliche Bestandteile zu entfernen.

**[0036]** Das Beschichten des porösen Substrates mit der Beschichtungslösung kann nach Verfahren durchgeführt werden, welche dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, zum Beispiel durch Tauchbeschichtung, Sprühbeschichtung, Meniscusbeschichtung und dergleichen. Beispielsweise kann eine Tauchbeschichtung wie folgt durchgeführt werden. Das Substrat wird für eine gegebene Zeitspanne, die ausreichend ist, um vollständiges oder nahezu vollständiges Beschichten der Porenwände zu gewährleisten, in die Lösung getaucht. Die Tauchzeit kann von ca. 1 s bis ca. 1,0 min reichen, bevorzugt von ca. 0,1 min bis ca. 0,5 min, noch bevorzugter von ca. 1/6 min bis ca. 1/3 min. Nach dem Tauchen wird die Überschussbeschichtungslösung auf dem Substrat entfernt, indem unter der Einwirkung der Schwerkraft oder unter Zuhilfenahme einer Rakel oder Luft rakel ablaufen gelassen wird. Das resultierende beschichtete Substrat wird gehärtet, um das Härten oder Vernetzen der Beschichtungszusammensetzung zu bewirken.

**[0037]** So kann die Membran beispielsweise bei einer Temperatur unterhalb 150 °C, z.B. bei einer Temperatur im Bereich von ca. 60 °C bis ca. 130 °C, bevorzugt bei einer Temperatur von ca. 80 °C bis ca. 130 °C, für eine geeignete Zeitspanne, welche in einem Bereich von ca. 5 min bis ca. 120 min, bevorzugt ca. 5 min bis ca. 60 min, angesiedelt sein kann, gehärtet werden. In Einklang mit bestimmten Ausführungsformen wird die Membran bei einer Temperatur von ca. 120 °C bis ca. 125 °C für eine Zeitspanne von ca. 20 min bis ca. 30 min gehärtet.

**[0038]** Die resultierende Membran kann gewaschen werden, um Extrahierbares in der Membran auszulaugen. Bestimmte Ausführungsformen der Membran, insbesondere eine Membran mit Carboxyl-Funktionalität, werden in einer basischen Lösung, bevorzugt bei einem pH-Wert von ca. 8 bis ca. 12, gewaschen oder ausgelaugt. Die Auslaugeflüssigkeit kann hergestellt werden durch Zugabe einer Base, z.B. Natriumhydroxid, Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat. Die Base kann als ein Feststoff oder als

eine Lösung zugegeben werden. Besondere Beispiele für die pH-Werte der Auslaugeflüssigkeit sind ca. 11,9, ca. 11,4 und ca. 8,1. Diese pH-Werte können durch die Verwendung von z.B. einer 2N NaOH-Lösung, Natriumcarbonat oder Natriumbicarbonat erzielt werden.

**[0039]** Beispielhaft kann eine carboxylierte Membran bei einer Temperatur im Bereich von ca. 37 °C bis ca. 93 °C oder höher, bevorzugt ca. 54 °C bis ca. 73 °C oder höher gewaschen oder ausgelaugt werden. Eine sulfonsäurehaltige Membran kann bei einer Temperatur von ca. 54 °C bis ca. 93 °C oder höher gewaschen oder ausgelaugt werden. Ausführungsformen der Membran können auch in heißem deionisiertem Wasser ausgelaugt werden, z.B. in deionisiertem Wasser, welches bei über 73 °F gehalten wird. Das Waschen oder Auslaugen kann für eine geeignete Zeitdauer durchgeführt werden, z.B. ca. 20 bis ca. 30 min oder mehr. In Einklang mit bestimmten Ausführungsformen der Membran kann das Waschen oder Auslaugen für ca. 1 h oder mehr durchgeführt werden. Die resultierende Membran wird dann in Luft oder in einem Ofen getrocknet, um das Wasser zu entfernen.

**[0040]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren bereit wie in Anspruch 27 definiert zum Herstellen einer negativ geladenen mikroporösen Membran, umfassend ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung mit angehängten anionischen Gruppen. Eine Ausführungsform des Verfahrens umfasst:

- (a) Bereitstellen eines porösen Substrates;
- (b) Kontaktieren des Substrates mit einem hydroxylreichen Material und einer Zusammensetzung, umfassend ein ungesättigtes Monomer mit einer anionischen Gruppe, mindestens ein oder mehrere N-(Hydroxyalkyl)- und/oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamide, ein hydrophiles ungesättigtes Monomer und optional einen Initiator;
- (c) Härten des in (b) erhaltenen Substrates, um die negativ geladene Membran zu erhalten; und
- (d) optional, Extrahieren der in (c) erhaltenen Membran, um extrahierbare Reste darin zu entfernen

**[0041]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die vernetzte Beschichtung hergestellt aus einer Zusammensetzung, umfassend ein ungesättigtes Monomer mit einer anionischen Gruppe, ein N-(Hydroxymethyl)- oder N-(Alkoxymethyl)-acrylamid, ein nichtionisches hydrophiles Acryl-Monomer und einen Initiator.

**[0042]** In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die vernetzte Beschichtung hergestellt aus einer Zusammensetzung, umfassend ein Acryl-Monomer mit einer anionischen Gruppe, ein N-(Hydroxymethyl)- oder N-(Alkoxymethyl)-acrylamid, ein nichtionisches hydrophiles Acryl-Monomer

und einen Initiator.

**[0043]** Die erfindungsgemäße Membran kann in einer Vorrichtung enthalten sein, z.B. in einer Filtervorrichtung, einer chromatographischen Vorrichtung, einer Vorrichtung für den makromolekularen Transfer, einer Strömungsverteileranordnung und/oder einem Membranmodul, welche eine oder mehrere negativ geladene Membranen in Einklang mit der vorliegenden Erfindung umfassen können. Die Vorrichtung kann in einer beliebigen geeigneten Form vorliegen. Beispielsweise kann die Vorrichtung ein Filterelement umfassen, welches die negativ geladene Membran in einer im Wesentlichen planaren oder gefalteten Form umfasst. Das Element kann eine hohle, im Wesentlichen zylinderförmige Gestalt aufweisen. Falls gewünscht, kann die Vorrichtung das Filterelement in Kombination mit einer aufstromseitigen und/oder abstromseitigen Stütz- oder Drainageschicht umfassen. Die Vorrichtung kann eine Mehrzahl von Membranen aufweisen, z.B. um ein mehrschichtiges Filterelement bereitzustellen, oder in gestapelter Form, um ein Membranmodul bereitzustellen, z.B. ein Membranmodul zur Verwendung in der Membranchromatographie. Filterpatronen können konstruiert werden durch Einbeziehung von einem Gehäuse und Endkappen, um eine Fluidichtung bereitzustellen, sowie von mindestens einem Einlass und mindestens einem Auslass. Die Vorrichtungen können so konstruiert sein, dass sie im Querstrom-(Crossflow-) oder Tangentialstrombetrieb sowie im statischen (Dead-end-)Betrieb arbeiten. Dementsprechend kann das zu behandelnde Fluid beispielsweise tangential zur Membranoberfläche geführt werden, oder es kann senkrecht zur Membranoberfläche strömen gelassen werden.

**[0044]** Für Ausführungsformen der Membran, welche als ein Rohr oder eine Faser oder als Bündel von Rohren oder Fasern vorliegen, kann die Membran als Module konfiguriert sein, z.B. nach Einbetten ihrer Enden in einem Klebemittel. Zwecks einer Beschreibung beispielhafter chromatographischer Vorrichtungen, Modulen mit porösen Medien und Strömungsverteileranordnungen, siehe U.S. Provisional Patent Application Nr. 60/121 667 und Nr. 60/121 701, beide mit Einreichungsdatum vom 25. Februar 1999; U.S. Provisional Patent Application Nr. 60/168 738 und 60/168 750, beide mit Einreichungsdatum vom 6. Dezember 1999; und International Applications mit Einreichungsdatum vom 25. Februar 2000 und mit dem Titel "Positively Charged Membrane" von Xiaosong Wu, Chung-Jen Hou, Jayesh Dharía, Peter Konstantin und Yujing Yang; "Chromatography Devices and Flow Distributor Arrangements Used in Chromatography Devices" von Mark Hurwitz, Thomas Sorensen, John Stempel und Thomas Fendya; und "Chromatography Devices, Porous Medium Modules Used in Chromatography Devices and Methods for Making Porous Medium Modules" von Mark Hurwitz, Thomas

Fendya und Gary Bush. Siehe auch UK Patent Application GB 2 275 626 A.

**[0045]** Die erfindungsgemäße Membran weist eine oder mehrere vorteilhafte Eigenschaften auf, einschließlich hoher Wasserdurchlässigkeit, dynamischer Proteinbindungskapazität und Ladungsdichte. Beispielsweise weist die Membran bevorzugt eine Wasserfließrate von mehr als 5 ml/min/cm<sup>2</sup>, bevorzugt mehr als 10 ml/min/cm<sup>2</sup>, z.B. ca. 20 ml/min/cm<sup>2</sup> bis ca. 160 ml/min/cm<sup>2</sup>, bevorzugt ca. 25 ml/min/cm<sup>2</sup> bis ca. 100 ml/min/cm<sup>2</sup>, bei 24 in.Hg auf. Die Membran ist robust und kann hohen Behandlungsfluidfließraten widerstehen. So kann die Membran Fließraten von bis zu 10 cm/min, z.B. von ca. 1 cm/min bis 10 cm/min bei 10 psi (68,9 kPa) ausgesetzt werden. Die Membran zeigt einen Öffnungs-Wasser-Blasenpunkt (Bubble-Point), der unter ca. 70 psi (482 kPa) liegt, z.B. in einem Bereich von ca. 2,5 psi (9,39 kPa) bis ca. 70 psi (482 kPa), bevorzugt ca. 5 psi (34,47 kPa) bis ca. 50 psi (344,7 kPa).

**[0046]** Die erfindungsgemäße Membran weist eine hohe Ladungsdichte auf. Die Ladungsdichte kann nach Verfahren bestimmt werden, wie sie dem Durchschnittsfachmann bekannt sind. So kann die Ladungsdichte beispielsweise über das Vermögen der Membran, einen positiv geladenen Farbstoff zu binden, gemessen werden. Beispielhaft weist die Membran eine Methylenblau-Farbstoff-Bindungskapazität von mindestens 10 ml auf, z.B. ca. 10 ml bis ca. 1000 ml, bevorzugt ca. 100 ml bis ca. 800 ml, bei Prüfung mit einer 10 ppm-Farbstofflösung in Wasser. Methylenblau ist ein positiv geladener Farbstoff.

**[0047]** Das Farbstoffbindevermögen wird gemessen durch Filtrieren einer 10 Gew.-ppm-Lösung von Methylenblau-Farbstoff, pH 6,6, bei einem Unterdruck von 24 in.Hg durch eine Membranscheibe mit einem Durchmesser von 25 mm und Überwachen des Volumens des Filtrats, bis eine Spur des Farbstoffs im Filtrat zu erscheinen beginnt.

**[0048]** Die erfindungsgemäße Membran weist ein hohes spezifisches Proteinbindevermögen auf. Die Membran weist ein spezifisches Lysozym-Bindevermögen von mehr als 10 mg/ml, z.B. ca. 10 mg/ml bis ca. 130 mg/ml, bevorzugt ca. 25 mg/ml bis ca. 120 mg/ml auf. Das spezifische Bindevermögen kann nach der folgenden beispielhaften Methode bestimmt werden. Ein Fluid, welches ein Lysozym-Protein in 10 mM MES-Puffer, pH 5,5, enthält, wird filtriert, indem es bei 1 cm/min durch eine Membran geleitet wird, und die Konzentration des Proteins in dem Filtrat wird als eine Funktion der Zeit gemessen. Die Konzentration des Proteins kann spektrophotometrisch bestimmt werden, z.B. durch Messen der Extinktion des Proteins bei 280 nm. Eine Durchbruchkurve, wie die in [Fig. 1](#) gezeigte, kann dann erstellt werden, wobei die x-Achse die Zeit des Filtrationsexperimentes an-

gibt und die y-Achse die Proteinkonzentration im Filtrat angibt. Die Membran weist ein hohes spezifisches Proteinbindevermögen und eine niedrige nichtspezifische oder hydrophobe Bindung auf. Die Steigung der für die Membran erhaltenen Durchbruchkurve ist vertikal oder im Wesentlichen vertikal. Diese Charakteristik bietet eine verbesserte Auflösung und Trennung von Proteinen. Die Membran weist ferner eine hohe dynamische Proteinbindungskapazität auf.

**[0049]** Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Membran besteht darin, dass keine Leckage von Proteinen vor dem Durchbruch auftritt. Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass die Komponenten der Membran sorgfältig gewählt sind, so dass die Membran frei oder im Wesentlichen frei von Pfropfungen oder kovalenten Bindungen zwischen der Beschichtung und dem Substrat ist. Die Herstellung von negativ geladenen Membranen in Einklang mit der vorliegenden Erfindung beinhaltet eine Chemie und Verfahren, welche relativ einfach und leicht zu realisieren sind.

**[0050]** Die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Membranen machen sie attraktiv zur Verwendung bei der Detektion, Trennung und/oder Reinigung von Biomolekülen, z.B. Proteinen, Aminosäuren, Nukleinsäuren und Viren. Beispiele für Nukleinsäuren umfassen modifizierte oder unmodifizierte, synthetische oder natürliche RNA und DNA.

**[0051]** Die erfindungsgemäßen Membranen finden Verwendung in verschiedenen Anwendungen, z.B. in der Filtration von Fluiden, welche positiv geladene Atome, Moleküle und Partikel enthalten, und beim makromolekularen Transfer von Elektrophoresegelelen, z.B. beim Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen von Elektrophoresegelelen auf eine Immobilisierungsmatrix. Die Membran kann Anwendung finden in der Trennung oder Reinigung von Komponenten, welche in biologischen Fluiden vorliegen. So kann die Membran zum Beispiel Anwendung finden bei der Trennung von Humanalbuminen vom Serum, bei der therapeutischen Blutfraktionierung und bei der Trennung von Komponenten in genmanipulierten Zellkulturen oder Fermentationsbouillons. Die Membran kann für die Reinigung von z.B. viralen Vakzinen und Gentherapievektoren, z.B. adenoassoziierten Viren, Verwendung finden.

**[0052]** Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren bereit zum Behandeln eines Biomoleküle enthaltenden Fluids, wie in Anspruch 33 definiert. Die an der Membran adsorbierten positiv geladenen Materialien können durch Elution mit einem geeigneten Solventeluans wiedergewonnen werden. Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit zum selektiven Adsorbieren eines oder mehrerer Biomoleküle aus einem Fluid, welches



eine Mischung von Biomolekülen enthält, umfassend das Inkontaktbringen des Fluids mit der Membran unter Bedingungen, welche vorteilhaft für die Adsorption von ausgewählten Biomolekülen sind. Das eine oder die mehreren Biomoleküle können aus der erfindungsgemäßen Membran selektiv freigesetzt werden durch Kontaktieren der adsorbierte Biomoleküle aufweisenden Membran mit einem Elutionsmittel unter Bedingungen, welche vorteilhaft für die Freigabe der ausgewählten Biomoleküle sind. Die vorliegende Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit für den makromolekularen Transfer von einem Elektrophoresegel, umfassend das Kontaktieren einer erfindungsgemäßen Membran mit dem Elektrophoresegel und Transferieren der Makromoleküle von dem Gel auf die Membran.

**[0053]** Die erfindungsgemäße negativ geladene Membran ist besonders geeignet zur Behandlung von Fluiden, welche Biomoleküle enthalten, die eine positive Oberflächenladung für den gegebenen pH-Wert des Fluids aufweisen. So weist z.B. Lysozym einen isoelektrischen Punkt von 11,25 auf und kann mittels der erfindungsgemäßen negativ geladenen Membran aus einem Fluid mit einer niedrigen Salinität, z.B. 10 mM MES, pH 5,5, abgetrennt werden. Proteine mit verschiedenen Oberflächenladungen können ebenfalls mittels der erfindungsgemäßen Membran abgetrennt werden; als Beispiel sei die Abtrennung von Lysozym aus Cytochrom C genannt.

**[0054]** So wird z.B. eine Mischung von Lysozym und Cytochrom C wie folgt getrennt. 80 µl eines Fluids, welches 3 mg/ml Lysozym und 1 Cytochrom C enthält, kann auf eine chromatographische Säule oder Stapel von fünf Lagen einer erfindungsgemäßen negativ geladenen Membran mit einem Durchmesser von 25 mm gegeben werden. Die Säule oder der Stapel kann mit einem Gradienten eluiert werden – 7 ml von 10 mM MES-Puffer bei einem pH von 5,5 zu 1M NaCl-10 mM MES-Puffer bei einem pH von 5,5. Die Fließrate kann 4 ml/min betragen. Cytochrom C wird als erstes eluiert, danach Lysozym.

**[0055]** Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung weiter veranschaulichen.

#### BEISPIEL 1

**[0056]** Dieses Beispiel zeigt ein Verfahren zur Herstellung einer Polymerzusammensetzung zur Herstellung einer Ausführungsform der negativ geladenen Membran gemäß der vorliegenden Erfindung.

**[0057]** 2-Acrylamido-2-methyl-1-propansulfonsäure, N-(Isobutoxymethyl)-acrylamid und Hydroxypropylmethacrylat wurden in einem Gewichtsverhältnis von 8,0:2,5:1,5 in einem Methanol-Wasser-Medium kombiniert, um eine Polymerisationslösung mit einem Feststoffgehalt von 12 Gew.-% zu erhalten. Am-

moniumpersulfat wurde als Initiator mit 0,3 Gew.-% der Lösung verwendet. Die Polymerisation wurde für einen Zeitraum von ca. 10–15 h bei Umgebungstemperatur (20–25 °C) durchgeführt. Die resultierende Lösung hatte eine Viskosität von 166 cps (0,166 Pa.s).

#### BEISPIEL 2

**[0058]** Dieses Beispiel zeigt ein Verfahren zur Herstellung einer Ausführungsform der negativ geladenen Membran gemäß der vorliegenden Erfindung. Dieses Beispiel zeigt ferner die Eigenschaften dieser Ausführungsform.

**[0059]** Eine Beschichtungslösung wurde hergestellt durch Mischen der in Beispiel 1 beschriebenen Polymerisationslösung und einer wässrigen Lösung von Dextran, Molekulargewicht 148 K, so dass die resultierende Lösung Polymer und Dextran im Gewichtsverhältnis von 3:1 enthält.

**[0060]** Ein hydrophiles mikroporöses Polyethersulfon-Substrat mit einer Porengröße von ca. 0,8 µm wurde mit der obigen Beschichtungslösung beschichtet. Das beschichtete Substrat wurde in einem Ofen bei 100–110 °C für 1 h gehärtet, anschließend in siedendem DI-Wasser für 1 h gewaschen. Die resultierende Membran wurde in einem Ofen getrocknet, um eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

**[0061]** Die wie oben beschrieben erhaltene Membran wurde auf Behandlung einer lysozymhaltigen Lösung getestet. Die Lösung enthielt 206,4 µg pro ml von 10 mM MES-Puffer bei pH 5,5. Die Behandlungsfluidflußrate betrug 4 ml/min. Zwei Membranscheiben mit einem Durchmesser von 25 mm wurden übereinander angeordnet. Die erhaltene Durchbruchkurve ist in [Fig. 1](#) dargestellt. Die Membran hatte eine Lysozym-Bindungskapazität von 97 mg/ml. Die während der ersten 10 Minuten der Behandlung erhaltene relativ flache Kurve bestätigte, dass die Membran keine Leckage zeigte. Die nahezu vertikale Steigung zeigt an, dass die Membran in der Lage war, eine hohe Auflösung bereitzustellen.

#### BEISPIEL 3

**[0062]** Dieses Beispiel zeigt ein Verfahren zur Herstellung einer Ausführungsform der negativ geladenen Membran gemäß der vorliegenden Erfindung. Dieses Beispiel zeigt ferner die Eigenschaften dieser Ausführungsform.

**[0063]** Eine Beschichtungslösung wurde hergestellt durch Mischen der in Beispiel 1 beschriebenen Polymerisationslösung und einer wässrigen Lösung von Dextran, Molekulargewicht 148 K, so dass die resultierende Lösung Polymer und Dextran im Gewichts-



verhältnis von 4:1 enthält.

**[0064]** Ein hydrophiles mikroporöses Cellulosenitrat-Substrat mit einer Porengröße von ca. 0,8 µm wurde mit der obigen Beschichtungslösung beschichtet. Das beschichtete Substrat wurde in einem Ofen bei 100–110 °C für 1 h gehärtet, anschließend in siedendem DI-Wasser für 1 h gewaschen. Die resultierende Membran wurde in einem Ofen getrocknet, um eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

**[0065]** Die wie oben beschrieben erhaltene Membran wurde mit einer lysozymhaltigen Lösung getestet. Die Lösung enthielt 201,3 µg pro ml von 10 mM MES-Puffer bei pH 5,5. Die Behandlungsfluidflußrate betrug 4 ml/min. Zwei Membranscheiben mit einem Durchmesser von 25 mm wurden übereinander angeordnet. Die erhaltene Durchbruchkurve ist in [Fig. 2](#) dargestellt. Die Membran zeigte ein Lysozym-Bindungsvermögen von 77 mg/ml. Die während der ersten 10 Minuten der Behandlung erhaltene relativ flache Kurve bestätigte, dass die Membran keine Leckage zeigte. Die nahezu vertikale Steigung zeigt an, dass die Membran in der Lage war, eine hohe Auflösung bereitzustellen.

#### BEISPIEL 4

**[0066]** Dieses Beispiel zeigt ein Verfahren zur Herstellung einer weiteren Ausführungsform der negativ geladenen Membran gemäß der vorliegenden Erfindung. Dieses Beispiel zeigt ferner die Eigenschaften dieser Ausführungsform.

**[0067]** 2-Acrylamidoglycolsäure, 2-Carboxyethylacrylat, N-(Isobutoxymethyl)-acrylamid, N-(Hydroxymethyl)-acrylamid und Hydroxypropylacrylat wurden in einem Gewichtsverhältnis von 5,0:5,0:3,0:1,5:1,5 in einem Methanol-Wasser-Medium kombiniert, um eine Polymerisationslösung mit einem Feststoffgehalt von 16 Gew.-% zu erhalten. Ammoniumpersulfat wurde als Initiator mit 0,4 Gew.-% der Lösung verwendet. Die Polymerisation wurde für einen Zeitraum von ca. 16–24 h bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Die resultierende Lösung hatte eine Viskosität von 116 cps (0,116 Pa.s). Eine Beschichtungslösung wurde hergestellt durch Mischen der Polymerisationslösung und einer wässrigen Lösung von Dextran, Molekulargewicht 148 K, so dass die resultierende Lösung 4 Gew.-% Polymer und 1,33 Gew.-% Dextran enthielt.

**[0068]** Ein hydrophiles mikroporöses Polyethersulfon-Substrat mit einer Porengröße von ca. 0,8 µm wurde mit der obigen Beschichtungslösung beschichtet. Das beschichtete Substrat wurde in einem Ofen bei 100–110 °C für 1 h gehärtet, anschließend in siedendem DI-Wasser für 1 h gewaschen. Die resultierende Membran wurde in einem Ofen getrock-

net, um eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

**[0069]** Die wie oben beschrieben erhaltene Membran wurde mit einer lysozymhaltigen Lösung getestet. Die Lösung enthielt 213,6 µg pro ml von 10 mM MES-Puffer bei pH 5,5. Die Behandlungsfluidflußrate betrug 4 ml/min. Zwei Membranscheiben mit einem Durchmesser von 25 mm wurden übereinander angeordnet. Die erhaltene Durchbruchkurve ist in [Fig. 3](#) dargestellt. Die Membran zeigte ein Lysozym-Bindungsvermögen von 45 mg/ml. Die während der ersten 10 Minuten der Behandlung erhaltene relativ flache Kurve bestätigte, dass die Membran keine Leckage zeigte. Die nahezu vertikale Steigung zeigt an, dass die Membran in der Lage war, eine hohe Auflösung bereitzustellen.

#### Patentansprüche

1. Negativ geladene mikroporöse Membran, umfassend ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung, wobei die vernetzte Beschichtung erhalten werden kann durch Polymerisieren einer Mischung, die ein ungesättigtes Monomer mit einer negativ geladenen Gruppe, ein hydrophiles nichtionisches ungesättigtes Monomer und ein N-(Hydroxyalkyl)- oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamid-Monomer umfasst, wobei die vernetzte Beschichtung Amid-Ester- und Amid-Amid-Vernetzungsstellen aufweist.

2. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 1, wobei das hydrophile nichtionische ungesättigte Monomer ein Acryl-Monomer ist.

3. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das N-(Hydroxyalkyl)- oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamid-Monomer eine Alkylgruppe mit 4 oder weniger Kohlenstoffatomen enthält.

4. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die vernetzte Beschichtung ein hydroxylreiches Material mit zwei oder mehr Hydroxylgruppen pro Molekül oder Einheit umfasst, wobei die Menge des hydroxylreichen Materials in der vernetzten Beschichtung so ist, dass das Verhältnis des Polymers zu dem hydroxylreichen Material in einem Bereich von 100:1 bis 1:100 angesiedelt ist.

5. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 4, wobei das hydroxylreiche Material ein Polysaccharid ist.

6. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die negativ geladene Gruppe eine Sulfon- oder Carbonsäuregruppe ist.

7. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 2, wobei das Acryl-Monomer ein Acrylat oder Acrylamid ist.

8. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 7, wobei das Acryl-Monomer ein Acrylamid ist.

9. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 8, wobei das Acrylamid ein Alkylacrylamid ist.

10. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 9, wobei das Acrylamid eine Sulfonsäuregruppe enthält.

11. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 10, wobei das Acrylamid Acrylamido-N-alkylsulfonsäure ist.

12. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 9, wobei das Alkylacrylamid eine Carbonsäuregruppe enthält.

13. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 12, wobei die Mischung ein weiteres Acryl-Monomer umfasst, welches eine Carbonsäuregruppe enthält.

14. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 13, wobei das weitere Acryl-Monomer ein Acrylat ist.

15. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 14, wobei das Acrylat  $\beta$ -Carboxyethylacrylat ist.

16. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 4, wobei das Acryl-Monomer ein Hydroxyacryl-Monomer ist.

17. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 16, wobei das Hydroxyacryl-Monomer ein Hydroxyacrylamid oder ein Hydroxyacrylat ist.

18. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die Mischung ein N-(Alkoxymethyl)-acrylamid umfasst.

19. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 18, wobei das N-(Alkoxymethyl)-acrylamid N-Isobutoxymethylacrylamid ist.

20. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 5, wobei das Polysaccharid Dextran ist.

21. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die Mem-

bran ein dynamisches Protein-Bindevermögen von ca. 25 mg/ml Lysozym oder mehr aufweist.

22. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei das Substrat bildende Material ein Polymer umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, welche aus Polyaromaten, Polysulfonen, Polyolefinen, Polystyrolen, Polyamiden, Polyimiden, Celluloseacetaten, Cellulosenitrat, Polycarbonaten, Polyestern und Fluorpolymeren besteht.

23. Negativ geladene mikroporöse Membran nach Anspruch 22, wobei das Substrat ein Polysulfon umfasst.

24. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 23, wobei das poröse Substrat hydrophil ist.

25. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei eine ungesättigte Einheit, welche eine negativ geladene Gruppe umfasst, 0,1 % bis 20 % w/w der vernetzten Beschichtung bildet.

26. Negativ geladene mikroporöse Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 25, wobei 0,1 % bis 15 % w/w der vernetzten Beschichtung aus dem Polymer bestehen oder 0,1 % bis 15 % w/w der vernetzten Beschichtung aus dem Polymer und Dextran bestehen.

27. Verfahren zum Herstellen einer negativ geladenen mikroporösen Membran nach Anspruch 1, umfassend ein poröses Substrat und eine vernetzte Beschichtung mit negativ geladenen Gruppen, umfassend:

- (a) Bereitstellen eines porösen Substrates;
- (b) Bilden einer Mischung, umfassend ein ungesättigtes Monomer mit einer negativ geladenen Gruppe, ein hydrophiles nichtionisches ungesättigtes Monomer und ein N-(Hydroxyalkyl)- oder N-(Alkoxyalkyl)-acrylamid-Monomer, und Polymerisieren der Mischung, um ein Polymer zu bilden;
- (c) Kontaktieren des Substrates mit dem Polymer; und
- (d) Härten des in (c) erhaltenen Substrates, um die negativ geladene mikroporöse Membran zu erhalten, welche eine vernetzte Beschichtung mit negativ geladenen Gruppen umfasst.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die negativ geladene Gruppe eine Sulfon- oder Carbonsäuregruppe ist.

29. Verfahren nach Anspruch 27 oder Anspruch 28, wobei das ungesättigte Monomer, welches eine negativ geladene Gruppe aufweist, ein Acrylmonomer ist, welches eine Sulfon- oder Carbonsäuregrup-

pe enthält.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Acryl-Monomer, welches eine Sulfon- oder Carbonsäuregruppe aufweist, ein Acrylat oder ein Acrylamid ist.

31. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Verfahren umfasst: Kontaktieren des Substrates mit einem hydroxylreichen Material, welches zwei oder mehr Hydroxylgruppen pro Molekül enthält, vor dem Härten des Substrates, so dass die Menge des hydroxylreichen Materials in der vernetzten Beschichtung so ist, dass das Verhältnis des Polymers zu dem hydroxylreichen Material in der Membran in einem Bereich von 100:1 bis 1:100 angesiedelt ist.

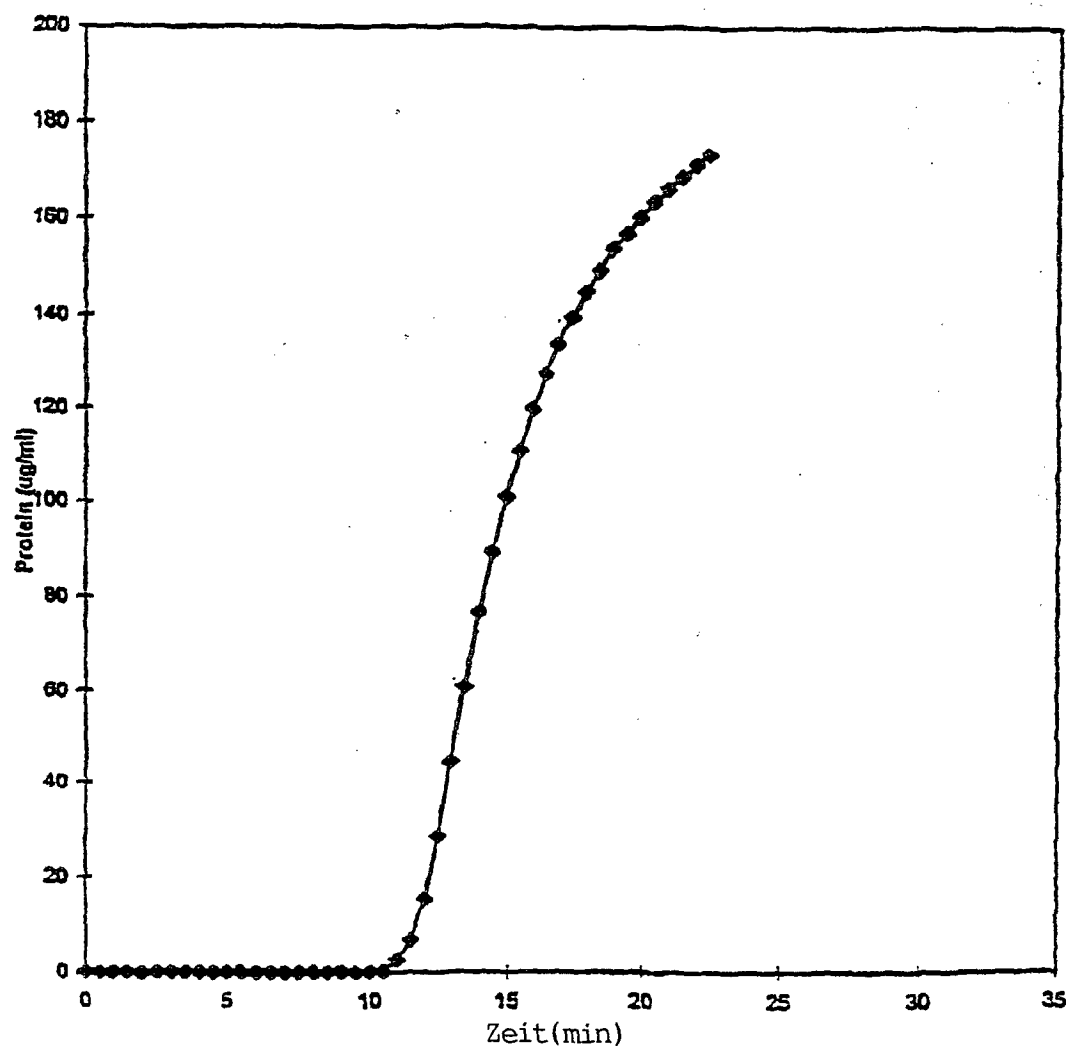
32. Verfahren zum Transferieren eines biologischen Materials von einem Elektrophoresegel, umfassend das Kontaktieren des Elektrophoresegels mit der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 26 und Transferieren eines Proteins, eines Polypeptids, einer Aminosäure, einer Nukleinsäure oder deren Kombinationen von dem Gel auf die Membran.

33. Verfahren zum Abtrennen positiv geladener Biomoleküle von einem Fluid, wobei die Biomoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe, welche aus Proteinen, Aminosäuren, Nukleinsäuren und Viren besteht, wobei das Verfahren umfasst: Inkontaktbringen des Fluids mit der negativ geladenen mikroporösen Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 26, um die positiv geladenen Biomoleküle an der Membran zu adsorbieren.

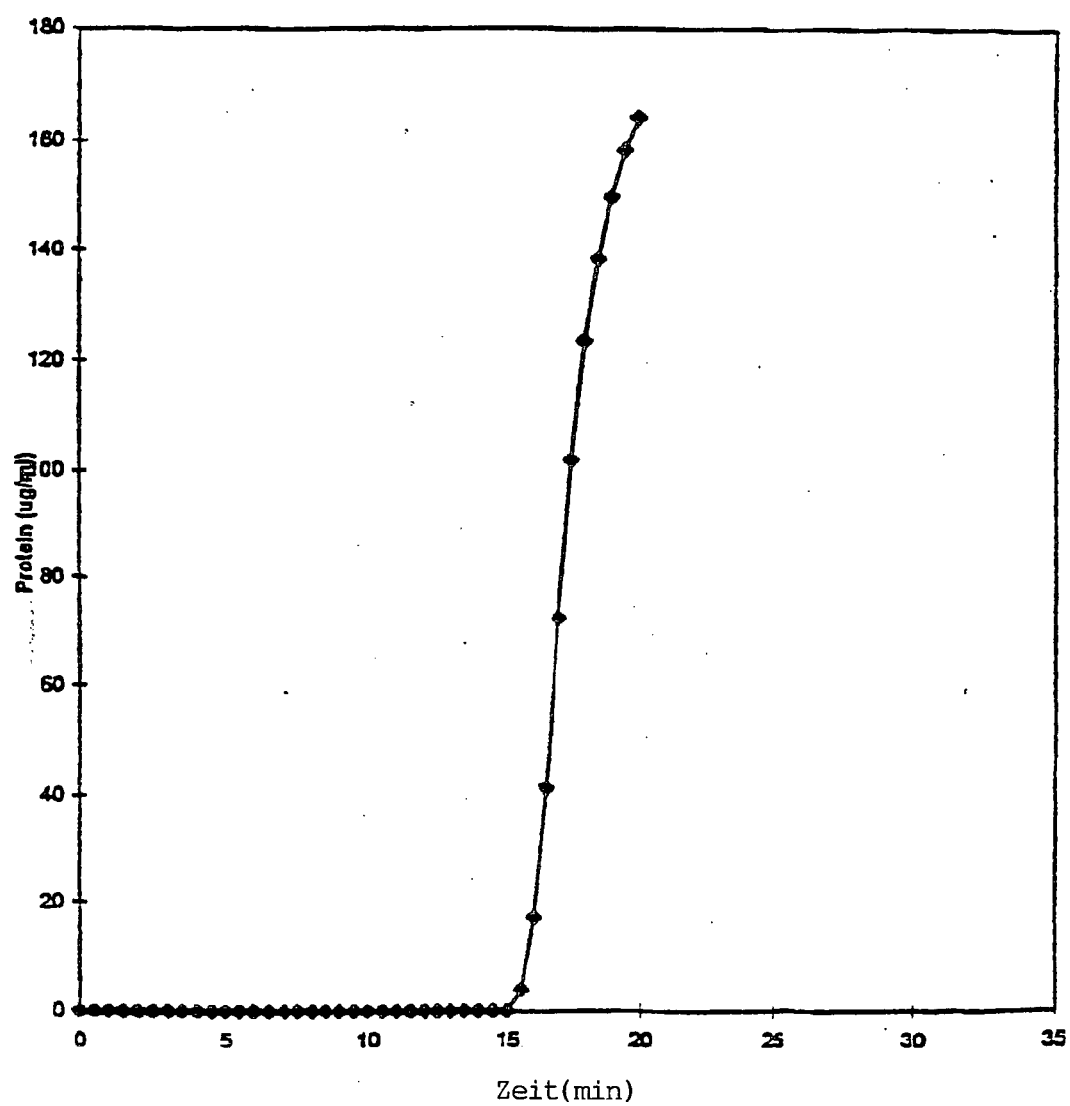
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3

