

5

Ionenaustauschermaterial mit hoher Salztoleranz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein vernetztes sulfoniertes Polymer oder ein mit einem Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymer beschichtetes vernetztes sulfoniertes Polymer zur Verwendung als Ionenaustauschermaterial mit hoher Salztoleranz zur Abtrennung von Makromolekülen aus einer Lösung, die aus einer biologischen Quelle stammt.

Die Coulomb-Wechselwirkung von Ionenaustauscherharzen ist die am meisten verwendete Wechselwirkung bei chromatographischen Reinigungsverfahren. Bei Ionenaustauscherharzen werden vorzugsweise ionische Gruppen, wie starke Säuren (zum Beispiel Sulfonsäure), starke Basen (zum Beispiel quartäre Amine), schwache Säuren (z.B. Carbonsäuren) und schwache Basen (z.B. primäre oder tertiäre Amine) als Gruppen kovalent auf ein starres Matrixmaterial aufgebracht. Diese ionischen Gruppen wechselwirken mit komplementären funktionellen Gruppen der zu reinigenden Moleküle, die somit an das Ionenaustauscherharz gebunden werden. Die Elution der durch ionische Wechselwirkung gebundenen Zielmoleküle wird üblicherweise durch einen Anstieg der Salzkonzentration im Elutionsmittel erzielt, sodass das Zielmolekül durch ein oder mehrere korrespondierende(s) Salz-Ion(en) ersetzt wird/werden. Relativ niedrige Salzkonzentrationen von weniger als 150 mmol/L sind üblicherweise ausreichend, um die Coulomb-Wechselwirkung zu brechen und das Zielmolekül zu eluieren.

In Abhängigkeit von dem Ursprung der Mischung, aus der das Zielmolekül getrennt werden soll, kann die Salzkonzentration

bereits höher sein, als Konzentrationen, die üblicherweise für die Elution verwendet werden können. Dies hat meist den Nachteil, dass die Zielmoleküle in Gegenwart der hohen Salzkonzentration am Ionenaustauscherharz nicht binden.

- 5 Insbesondere Lösungen, die aus biologischen Quellen, wie Fermentationsflüssigkeiten, Körperflüssigkeiten oder Pflanzenextrakten erhalten werden, ist die Konduktivität (elektr. Leitfähigkeit; eine korrespondierende Größe zur Salzkonzentration) normalerweise zu hoch für den direkten
- 10 Einsatz von Ionenaustauscherchromatographie. Deshalb ist oft ein unerwünschter Dilutionsschritt notwendig, um die Konduktivität der Mischung zu verringern (Verringerung der Salzkonzentration).
- 15 Es gibt etliche bekannte und verfügbare Ionenaustauscherharze, die in der Lage sind, Substanzen bei einer relativ hohen Salzkonzentration zu binden. Allerdings sind alle bisher bekannten Ionenaustauscherharze nicht mehr in der Lage, biologische Makromoleküle, wie beispielsweise Insulin, mit
- 20 einer ausreichenden Beladungskapazität bei Konzentrationen von mehr als 250 mmol/L Natriumchlorid zu binden. Natriumchlorid soll hier nur beispielhaft erwähnt sein; prinzipiell können jedoch auch andere Salze in dieser Molmenge vorliegen. Zudem sind bisher bekannte verwendete Ionenaustauscherharze nicht
- 25 über den gesamten pH-Bereich von pH 1 bis 14 stabil und somit nicht universell einsetzbar.

Es war deshalb eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Abtrennung von Makromolekülen bereitzustellen,

30 bei dem die Makromoleküle direkt aus einer Lösung, die aus biologischen Quellen stammt, abgetrennt werden können. Zudem ist es erwünscht, dass das verwendete Ionenaustauschermaterial über einen pH-Bereich von 1 bis 14 stabil ist. Aufgrund seiner hohen Salztoleranz soll das Ionenaustauschermaterial es

ermöglichen, dass kein zusätzlicher Dilutionsschritt durchgeführt werden muss, um die Salzkonzentration zu vermindern. Ein solches Verfahren hätte den Vorteil, dass die Kosten für Lösungsmittel für den zusätzlichen Dilutionsschritt und für die Aufbereitung von Abfallsubstanzen bei der Reinigung von Salz enthaltenden Mischungen vermindert werden könnten.

Zur Lösung der genannten Aufgabe stellt die vorliegende Anmeldung die Verwendung eines vernetzten sulfonierten Polymers zur Abtrennung eines Makromoleküls aus einer Lösung bereit, die aus einer biologischen Quelle stammt, wobei das vernetzte sulfonierte Polymer gebunden an sein Grundgerüst eine sulfonierte aromatische Einheit enthält, die mit einem aliphatischen Rest substituiert oder unsubstituiert ist.

In anderen Worten betrifft die vorliegende Anmeldung ein Verfahren zur Abtrennung eines Makromoleküls aus einer Lösung, die aus einer biologischen Quelle entstammt, unter Verwendung eines vernetzten sulfonierten Polymers, das gebunden an seinem Grundgerüst eine sulfonierte aromatische Einheit enthält, die mit einem aliphatischen Rest substituiert oder unsubstituiert ist.

Unter Makromolekülen versteht man erfindungsgemäß Moleküle, die ein Molekulargewicht von größer oder gleich 10000 g/mol aufweisen. Besonders bevorzugt ist das Makromolekül ein Biomolekül, wie beispielsweise Peptide und Proteine, DNA, RNA, Polysacharide und Lipopolysacharide, wie beispielsweise Endotoxine.

Unter dem Begriff „Abtrennung“ soll sowohl die Gewinnung/Reinigung eines Zielmoleküls aus der Lösung sowie auch die Entfernung von ungewünschten Makromolekülen aus der

Lösung verstanden werden, so dass das Zielmolekül in der gereinigten Lösung verbleibt.

Das Grundgerüst des vernetzten sulfonierten Polymers kann
5 jegliches bekannte polymere Grundgerüst sein, das aus kohlenwasserstoffhaltigen Wiederholungseinheiten besteht.

Unter dem Grundgerüst des Polymers versteht man die Hauptkette des Polymers, an die in der Form von Seitenketten

10 Nebengruppen, wie die sulfonierte aromatische Einheit, gebunden sein können. Neben der sulfonierten aromatischen Einheit kann das Polymer auch noch weitere Seitenketten enthalten, die nicht zum Grundgerüst zu rechnen sind, sondern - wie benannt - zu den Seitenketten zu zählen sind. In anderen
15 Worten zählen zu dem Grundgerüst alle Atome, die die Hauptkette des Polymers aufbauen und mit mindestens zwei weiteren mindestens bivalenten Atomen der Hauptkette verknüpft sind. Einfach-bindende Atome, wie Wasserstoffatome, die an die genannten Atome binden, zählen ebenso zu Atomen des
20 Grundgerüsts. In dem Fall, in dem das vernetzte sulfonierte Polymer vernetztes Polystyrol ist, wären die verknüpften Vinyleinheiten das Grundgerüst und die sulfonierten Phenylgruppen die Seitenketten.

25 Unter kohlenwasserstoffhaltigen Wiederholungseinheiten versteht man alle denkbaren Verbindungen, die überwiegend aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut sind, aber auch Heteroatome enthalten können. Die Verknüpfung der Wiederholungseinheiten zu einem Polymer kann durch jegliches
30 bekannte Polymerisationsverfahren erfolgen. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die radikalische, kationische oder anionische Olefinpolymerisation. Besonders bevorzugt ist das Grundgerüst ein Polyvinylgerüst. Das Grundgerüst ist vorzugsweise ein vernetztes Grundgerüst, sodass ein vernetztes

Polymer entsteht. Insbesondere im Falle eines Polyvinylgerüsts entsteht die Vernetzung durch Copolymerisation eines Vinylgruppen-haltigen Monomers mit einem Monomer, das zwei Vinylgruppen enthält. Es ist aber prinzipiell auch denkbar, dass zunächst ein Polymer hergestellt wird, das ein lineares Grundgerüst aufweist. Die anschließende Vernetzung kann dann anschließend durch Reaktion von funktionellen Gruppen in der Seitenkette mit einem Vernetzungsreagenz erfolgen.

Das erfindungsgemäß verwendete vernetzte sulfonierte Polymer enthält vorzugsweise Sulfonsäure-Gruppen in der Seitenkette. Die Seitenketten sind im erfindungsgemäßen vernetzten sulfonierten Polymer sulfonierte aromatische Einheiten wie weiter unten detailliert beschrieben. Die sulfonierten aromatischen Einheiten sind vorzugsweise durch eine kovalente Einfachbindung an das Grundgerüst gebunden. Die sulfonierten aromatischen Einheiten können zudem mit einem aliphatischen Rest substituiert sein. Besonders bevorzugt ist es, dass die sulfonierten aromatischen Einheiten durch eine kovalente Einfachbindung direkt an ein Atom des Grundgerüsts gebunden sind.

Unter einer aromatischen Einheit versteht man in der vorliegenden Erfindung ein mit einem aliphatischen Rest substituiertes oder unsubstituiertes mono- oder polyzyklisches aromatisches Ringsystem. Unter einem aromatischen Ringsystem versteht man im Sinne dieser Erfindung vorzugsweise ein aromatisches Ringsystem mit 6 bis 60 Kohlenstoffatomen, bevorzugt 6 bis 30, besonders bevorzugt 6 bis 10 Kohlenstoffatomen. Diese aromatischen Ringsysteme können monozyklisch oder polyzyklisch sein, d.h. sie können einen Ring (z.B. Phenyl) oder zwei oder mehr Ringe aufweisen, welche auch kondensiert (z.B. Naphthyl) oder kovalent verknüpft sein

können (z.B. Biphenyl), oder eine Kombination von kondensierten und verknüpften Ringen beinhalten.

Bevorzugte aromatische Ringsysteme sind zum Beispiel Phenyl, Biphenyl, Triphenyl, Naphthyl, Anthracyl, Binaphthyl, Phenanthryl, Dihydrophenanthryl, Pyren, Dihdropyren, Crysen, Perylen, Tetracen, Pentacen, Benzpyren, Fluoren und Inden. Besonders bevorzugt sind die aromatischen Ringsysteme Phenyl, Biphenyl oder Naphthyl, besonders bevorzugt Phenyl.

Wie bereits erwähnt können die aromatischen Ringsysteme durch eine aliphatische Gruppe substituiert sein. Hierbei ist es denkbar, dass das aromatische Ringsystem nicht nur durch eine sondern durch zwei oder mehrere aliphatische Gruppen substituiert ist. Ein aliphatischer Rest ist vorzugsweise ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 20, bzw. 1 bis 10 Kohlenstoffatomen. Erfindungsgemäße aliphatische Kohlenwasserstoffreste sind vorzugsweise lineare bzw. verzweigte oder cyclische Alkyl-Gruppen, bei denen auch ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Fluor ersetzt sein können. Beispiele der aliphatischen Kohlenwasserstoffreste mit 1 bis 20 Kohlenwasserstoffatomen schließen die folgenden ein: Methyl, Ethyl, n-Propyl, Iso-Propyl, n-Butyl, Iso-Butyl, sec-Butyl (1-Methylpropyl), tert-Butyl, Iso-Pentyl, n-Pentyl, tert-Pentyl (1,2-Dimethylpropyl), 1,2-Dimethylpropyl, 2,2-Dimethylpropyl (Neopentyl), 1-Ethylpropyl, 2-Methylbutyl, n-Hexyl, Iso-Hexyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 2-Methylbutyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethylbutyl, 1-Methylbutyl, 1,1-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl, 2-Ethylhexyl, Trifluormethyl, Pentafluorethyl und 2,2,2-Trifluorethyl.

Besonders bevorzugt als aliphatischer Kohlenwasserstoffrest ist Methyl oder Ethyl.

Außerordentlich bevorzugt ist es, dass die mit einem
5 aliphatischen Rest substituierte oder unsubstituierte
sulfonierte aromatische Einheit des vernetzten sulfonierten
Polymers eine Phenylsulfonsäure-Gruppe oder ein Derivat davon
ist. Im Falle des Derivats der Phenylsulfonsäure-Gruppe sind
Derivate gemeint, die mit einem aliphatischen Rest
10 substituiert sind. In diesem Fall befindet sich vorzugsweise
eine Sulfonsäure-Gruppe am Phenylrest in para-Stellung zu der
zu dem Grundgerüst bindenden Stelle am Phenylring. Der
aliphatische Rest ist hierbei vorzugsweise eine Methyl- oder
Ethyl-Gruppe, die sich in ortho- und/oder meta-Stellung an der
15 Phenyl-Gruppe zu der zu dem Grundgerüst bindenden Stelle am
Phenylring befindet.

Besonders bevorzugt ist es jedoch, dass die sulfonierte
aromatische Einheit nicht substituiert ist. Hierbei kommt
20 insbesondere ein sulfoniertes vernetztes Polystyrol in
Betracht. Die Vernetzung des sulfonierten Polystyrols erfolgt
vorzugsweise durch die Copolymerisation von Styrol mit
Divinylbenzol, gefolgt von der Sulfonierung der Phenylgruppen.
Aber auch jegliche anderen zwei Vinyl-Gruppen enthaltenden
25 Vernetzungsmittel sind hier zur Herstellung eines vernetzten
Copolymers denkbar.

Der Vernetzungsgrad des vernetzten sulfonierten Polymers
beträgt erfindungsgemäß vorzugsweise 0,5 bis 50 %, besonders
30 bevorzugt 5 bis 45 % und am bevorzugtesten 10 bis 35 %. Unter
der Angabe des Vernetzungsgrads in Prozent wird in der
vorliegenden Erfindung der prozentuale Molanteil der
eingesetzten zwei Vinyl-Gruppen enthaltenden Verbindung zu der

Gesamtanzahl der zu polymerisierenden Monomereinheiten verstanden.

Der Sulfonierungsgrad des vernetzten sulfonierten Polymers beträgt vorzugsweise 1 bis 80 %, stärker bevorzugt 3 bis 60 % und am bevorzugtesten 5 bis 40 %. Die Angabe des Sulfonierungsgrads in Prozent bezieht sich auf die Molanzahl von Sulfonsäure-Gruppen im Verhältnis zu allen zur Polymerisation eingesetzten Monomereinheiten, die eine sulfonierbare Gruppe aufweisen. Zu den zur Polymerisation eingesetzten Monomereinheiten, die eine sulfonierbare Gruppe aufweisen, versteht man alle Monomereinheiten, die die sulfonierbare aromatische Einheit enthalten, als auch alle die Monomereinheiten, die eine sulfonierbare Gruppe, vorzugsweise eine aromatische Einheit, enthalten sowie optional alle Verbindungen, die die Vernetzung verursachen, sofern diese eine sulfonierbare oder sulfonierbare Gruppe enthalten. Wird als vernetztes sulfoniertes Polymer sulfoniertes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer verwendet, so bezieht sich der Sulfonierungsgrad in Prozent auf die Anzahl von Sulfonsäure-Gruppen im Verhältnis zu allen im Polymer enthaltenen Phenyl- bzw. Phenylen-Gruppen.

Das in dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzte vernetzte sulfonierbare Polymer liegt vorzugsweise in Form von regulär oder irregulär geformten Harzpartikeln vor. Unter dem Begriff „regulär geformt“ versteht man in der vorliegenden Erfindung Formen, die sich durch Symmetrioperationen wie Flächenspiegelung, Punktspiegelung oder Drehachsen oder Kombinationen davon darstellen lassen. Besonders bevorzugt ist hier die kugelförmige Form zu nennen. Unter dem Begriff „kugelförmig“ versteht man nicht nur rein symmetrische Kugeln, sondern auch davon abweichende Formen wie beispielsweise Ellipsen. Es

sollen aber auch zwei miteinander zu Hanteln verbundenen kugelförmige Körper hierbei mit eingeschlossen sein. Unter einer irregulären Form versteht man jegliche gebrochene Form, die keine Symmetrie aufweist. Die Harzpartikel weisen vorzugsweise einen gemittelten durchschnittlichen Durchmesser von 1 bis 1000 μm , stärker bevorzugt von 5 bis 100 μm und besonders bevorzugt von 10 bis 50 μm auf.

Das in dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzte vernetzte sulfonierte Polymer besitzt vorzugsweise Poren, in denen die eigentliche Wechselwirkung mit den zu trennenden Stoffen stattfindet. Es handelt sich somit vorzugsweise ein poröses Polymermaterial. Diese Poren weisen vorzugsweise einen durchschnittlichen Durchmesser von 6 bis 400 nm, besonders bevorzugt von 30 bis 100 nm auf. Der Porendurchmesser wird durch eine inverse Größenausschlußchromatographie bestimmt: Dabei wird das zu untersuchende Phasenmaterial in eine Chromatographiesäule gepackt und eine Reihe von Polymergrößenstandards injiziert. Aus dem Verlauf der Kurve bei der Auftragung des Logarithmus der Molmasse des jeweiligen Standards gegen das Elutionsvolumen kann nach literaturbekannten Methoden die Verteilung der Porendurchmesser und somit der mittlere Porendurchmesser bestimmt werden.

Des Weiteren ist es bevorzugt, wenn das vernetzte sulfonierte Polymer ein Porenvolumen im Bereich von 1 bis 3 mL/g aufweist. Das Porenvolumen wird durch die Messung der Wasseraufnahmekapazität bestimmt: Das Phasenmaterial, dessen Gewicht im trockenen Zustand bestimmt wurde, wird mit dem Lösungsmittel versetzt für das das Porenvolumen bestimmt werden soll (unterschiedliche Lösungsmittel können aufgrund unterschiedlicher Benetzbarkeit verschiedene Ergebnisse zeigen). Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird Wasser

als Lösungsmittel verwendet. Überschüssiges Lösungsmittel wird abfiltriert und das Phasenmaterial in der Zentrifuge von weiterem im Zwischenkornvolumen befindlichen Lösungsmittel befreit. Anschließend wird das Material neu gewogen. Allein
5 die Poren sollten noch mit dem Lösungsmittel gefüllt sein. Über die Massendifferenz zwischen gefüllten und leeren Poren sowie der Dichte des Lösungsmittels kann das Porenvolumen errechnet werden.

10 Das im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in der erfindungsgemäßen Verwendung eingesetzte vernetzte sulfonierte Polymer weist den Vorteil auf, dass es neben dem lipophilen Grundgerüst mit den aromatischen Einheiten in der Seitenkette auch ionisierbare Gruppen wie Sulfonsäure-Gruppen enthält. Auf
15 diese Weise ist es geeignet, sowohl durch ionische Wechselwirkungen als auch lipophile Wechselwirkungen mit dem Makromolekül zu interagieren. Hierbei dienen die Sulfonsäure-Gruppen vorzugsweise als anionische -SO_3^- -Gruppen, die in der Lage sind, ionische Wechselwirkungen mit Kationen des
20 Makromoleküls einzugehen. Zudem weisen Makromoleküle aus biologischen Quellen, wie beispielsweise Proteine, DNA oder RNA auch lipophile Bereiche auf, die mit den aromatischen Einheiten des vernetzten sulfonierten Polymers als lipophile Matrix wechselwirken können. Auf diese Weise ist es möglich,
25 Lösungen, die aus einer biologischen Quelle stammen, einzusetzen, die einen sehr hohen Salzgehalt von bis zu 1 mol/L Salz enthalten können, ohne, dass es zu einer Elution der Makromoleküle von dem Ionenaustauschermaterial kommt.

30 Das erfindungsgemäß verwendete vernetzte sulfonierte Polymer wird vorzugsweise zur Gewinnung bzw. Reinigung von Kationen-Gruppen enthaltenen Makromolekülen eingesetzt. Das Makromolekül ist vorzugsweise ein biologisches Makromolekül. Das biologische Makromolekül ist vorzugsweise ein Peptid. Ganz

besonders bevorzugt ist das Peptid Insulin. In anderen Worten betrifft die vorliegende Erfindung also vorzugsweise eine Verwendung des vernetzten sulfonierten Polymers zur Reinigung bzw. Gewinnung von Insulin aus einer Lösung, die aus einer biologischen Quelle stammt.

Die Herstellung des vernetzten sulfonierten Polymers erfolgt vorzugsweise durch Sulfonierung eines bereits vernetzten Polymers durch Einsatz von Schwefelsäure und ähnlichen Materialien, wie dies beispielsweise bei der Herstellung von sulfoniertem vernetzten Polystyrol aus den britischen Patentschriften GB 1116800 und GB 1483587 bekannt ist. Die Herstellung vernetzter Polymere ist Stand der Technik und kann von jedem Fachmann auf dem Gebiet der Polymerchemie ohne erfinderisches Zutun durchgeführt werden.

Besonders bevorzugt wird jedoch die Sulfonierung folgendermaßen durchgeführt: Je nach angestrebtem Sulfonierungsgrad wird beispielsweise ein Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer in einem Gemisch aus Schwefelsäure und Wasser mit einem Wasseranteil von 2 bis 15% bei Temperaturen von 20°C bis 80°C für 1 bis 6 Stunden gerührt. Die Steigerung des Schwefelsäuregehaltes, der Temperatur und der Reaktionszeit führt jedes für sich zu einer Steigerung des Sulfonierungsgrades. Durch Einstellung aller drei Parameter kann der angestrebte Sulfonierungsgrad relativ exakt erreicht werden. Nach der Reaktion wird das Polymer mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser gespült.

Erfindungsgemäß ist es auch bevorzugt, dass das vernetzte sulfonierte Polymer mit einem Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymer beschichtet ist.

Das Grundgerüst des Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers ist vorzugsweise das Gleiche wie oben für das vernetzte sulfonierte Polymer genannt. Besonders bevorzugt ist das Grundgerüst also auch hier ein Polyvinylgerüst. An dieses Polyvinylgerüst sind vorzugsweise durch kovalente Einfachbindungen Amino-Gruppen direkt an Atome des Grundgerüsts geknüpft.

Unter Amino-Gruppen versteht man erfindungsgemäß primäre, sekundäre tertiäre oder quartäre Amino-Gruppen so wie auch Amidin- oder Guanidin-Gruppen. Das die Amino-Gruppen enthaltende vernetzte Polymer ist jedoch besonders bevorzugt ein vernetztes Polyvinylamin.

Die Vernetzung des Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers wird vorzugsweise durchgeführt, indem ein lineares Polymer, das primäre oder sekundäre Amino-Gruppen enthält, mit einem Vernetzungsreagens umgesetzt wird, das an zwei Enden kovalente Bindungen mit den Amino-Gruppen eingehen kann. Hierfür ist prinzipiell jedes denkbare Vernetzungsreagens einsetzbar. Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß jedoch Vernetzungsreagenzien eingesetzt, bei denen alle für die Vernetzung verwendeten Amino-Gruppen nach der Vernetzung immer noch in Form einer Amino-Gruppe vorliegen. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Amino-Gruppen durch Protonierung/Alkylierung immer noch in der Lage sind, als kationische Ionenaustauscher-Gruppen zu fungieren. Dies führt zu einer hohen Dichte von Ionenaustauschergruppen auf der ansonsten lipophilen Matrix. Nach der Vernetzung liegen die zuvor primären oder sekundären Amino-Gruppen dann als sekundäre oder tertiäre Amino-Gruppen vor.

Um den Amino-Gruppen eine positive Ladung zu verleihen, können diese protoniert werden. Alternativ dazu können aber auch

primäre, sekundäre oder tertiäre Amino-Gruppen durch tri-, bi- oder Monoalkylierung mit einem Alkylierungsreagenz in quartäre Amoniumionen überführt werden.

- 5 Der Vernetzungsgrad des Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers liegt vorzugsweise im Bereich von 5 bis 80 %, besonders bevorzugt im Bereich von 6 bis 60 % und am bevorzugtesten im Bereich von 10 bis 40%. Die Prozentzahl bezieht sich hierbei auf die Anzahl der zur Vernetzung
10 verwendeten Amino-Gruppen im Verhältnis zu allen Amino-Gruppen des unvernetzten Polymers.

- Besonders bevorzugt ist es, wenn das Massenverhältnis des Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers zu dem
15 vernetzten sulfonierten Polymer im Bereich von 0,05 bis 0,3, besonders bevorzugt von 0,08 bis 0,25 und am bevorzugtesten von 0,11 bis 0,20 liegt.

- Das vernetzte Amino-Gruppen enthaltende Polymer liegt
20 vorzugsweise in Form einer Schicht/Beschichtung auf dem vernetzten sulfonierten Polymer vor. Hierbei wird das vernetzte sulfonierte Polymer vorzugsweise in der Form von Harzpartikeln eingesetzt und mit dem unvernetzten Amino-Gruppen enthaltenden Polymer beschichtet und anschließend mit
25 dem Vernetzungsmittel vernetzt. Auf diese Weise kann eine hohe Konzentration von Amino-Gruppen auf der Oberfläche verwirklicht werden, ohne dass durch dieses Verfahren vollständig die liphophilen Eigenschaften der Matrix verloren gehen. Somit wird ein Ionenaustauscherharz bereitgestellt, das
30 durch Protonierung/Alkylierung der Amino-Gruppen in der Lage ist, mit anionischen Gruppen des Makromoleküls zu wechselwirken. Zusätzlich kann die lipophile Matrix auch lipophile Wechselwirkungen mit dem Makromolekül eingehen.

Das auf der Oberfläche des sulfonierten Polymers befindliche Amino-Gruppen enthaltende vernetzte Polymer wird vorzugsweise in den Poren der Harzpartikel des sulfonierten Polymers abgeschieden, d.h. es befindet sich vorzugsweise in den Poren des sulfonierten Polymers.

Das Amino-Gruppen enthaltende vernetzte Polymer weist vorzugsweise ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von 20000 bis 50000 g/mol, stärker bevorzugt 30000 bis 46000 g/mol auf.

Besonders bevorzugt werden durch dieses kationische Ionenaustauscherharz Makromoleküle wie DNA oder RNA aus den Lösungen entfernt, so dass die Lösung von dieser gereinigt ist, und erwünschte Zielmoleküle ohne DNA oder RNA aus der Lösung gewonnen werden können.

Ebenso bevorzugt werden durch das erfindungsgemäße Ionenaustauscherharz (Anionenaustauscher) Makromoleküle wie Endotoxine aus den Lösungen entfernt, so dass diese an dem Ionenaustauscherharz zunächst gebunden bleiben und die Lösung größtenteils frei von den Endotoxinen vorliegt. Entweder kann so die ursprüngliche Lösung von den Endotoxinen befreit werden und weitergenutzt werden, oder die Endotoxine können durch Elution von dem Ionenaustauscherharz mit einer geeigneten Lösung gewonnen werden. Unter Endotoxinen versteht man eine Klasse biochemischer Stoffe. Sie sind Zerfallsprodukte von Bakterien, die im Menschen zahlreiche physiologische Reaktionen auslösen können. Endotoxine sind Bestandteil der äußeren Zellmembran (OM = outer membrane) von gramnegativen Bakterien oder Blaualgen. Chemisch sind es Lipopolysaccharide (LPS), die aus einem hydrophilen Polysaccharid- und einem lipophilen Lipidanteil aufgebaut sind. Im Gegensatz zu den Bakterien, aus denen sie stammen, sind Endotoxine sehr

hitzestabil und überstehen sogar die Sterilisation. Die derzeit empfindlichste Methode zur Messung der Endotoxine funktioniert über die Aktivierung der Gerinnungskaskade im Lysat von Amöbozyten, die aus Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus polyphemus*) isoliert wurden. Dieser Test ist allgemein als LAL-Test bekannt.

Wie bereits erwähnt, stammen die erfindungsgemäßen Makromoleküle aus biologischen Quellen. Hierbei weisen die Makromoleküle vorzugsweise ein Molekulargewicht im Bereich von 1000 bis 0,2 kDa, stärker bevorzugt 500 bis 1 kDa und am stärksten bevorzugt von 300 bis 5 kDa auf.

Unter einer Lösung, die aus einer biologischen Quelle stammt, versteht man Lösungen, die beispielsweise durch Fermentation oder Gärungsprozesse erhalten werden, Körperflüssigkeiten oder Pflanzenextrakte, die vorzugsweise eine Ionenleitfähigkeit im Bereich von 0,1 mS/cm bis 120 mS/cm, stärker bevorzugt im Bereich von 1 bis 60 mS/cm und am stärksten bevorzugt von 10 bis 20 mS/cm aufweisen. Diese Lösungen sind vorzugsweise wässrige Lösungen. Sie weisen vorzugsweise einen Salzgehalt von bis zu 1,2 mol/L auf. Besonders bevorzugt liegt deren Salzgehalt im Bereich von 0,01 bis 1,2 mol/L, stärker bevorzugt im Bereich von 0,05 bis 1,0 mol/L und am stärksten bevorzugt im Bereich von 0,25 bis 0,6 mol/L. Unter einem Salz versteht man in der vorliegenden Erfindung jegliches Salz, wie anorganische und organische Salze, die vorzugsweise in biologischen Flüssigkeiten vorliegen. Hierbei versteht man unter diesen Lösungen nicht nur Lösungen, die direkt aus den biologischen Quellen gewonnen und verwendet werden, sondern auch Lösungen, die bereits in irgendeiner Weise prozessiert wurden. Unter „prozessiert“ versteht man, dass die Lösungen in irgendeiner Weise vorbehandelt wurden, beispielsweise die

Veränderung des pH-Wertes oder die Abtrennung von Substanzen vor der erfindungsgemäßen Verwendung.

Die Ionenleitfähigkeit wird erfindungsgemäß mit einem

5 Leitfähigkeitsmeßgerät der Firma Greisinger Typ GMH 3430 bestimmt.

Mit den erfindungsgemäß verwendeten vernetzten sulfonierten Polymeren, oder den mit einer Schicht von einem Amino-Gruppen
10 enthaltenden vernetzten Polymer überzogenen vernetzten sulfonierten Polymeren können somit biologische Makromoleküle aus Lösungen mit einem extrem hohen Salzgehalt gebunden werden, ohne dass die Lösungen zuvor durch zusätzliche Dilutionsschritte oder Dialysen verdünnt werden müssen. Auf
15 diese Weise stellt die vorliegende Erfindung ein kostengünstiges Verfahren/eine kostengünstige Verwendung zur Reinigung von biologischen Makromolekülen, vorzugsweise Insulin, monoklonale Antikörper, DNA oder RNA bereit.

Zusätzlich weisen die verwendeten Ionenaustauschermaterialien
20 den Vorteil auf, dass sie im gesamten pH-Bereich von 1 bis 14, wie er in aus biologischen Quellen stammenden Flüssigkeiten vorkommt, eingesetzt werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft zudem auch die weiteren
25 Ausführungsformen:

- (i) Verfahren zur Abtrennung eines Makromoleküls aus einer Lösung, die aus einer biologischen Quelle stammt, unter Verwendung eines vernetzten sulfonierten Polymers, das
30 gebunden an sein Grundgerüst eine sulfonierte aromatische Einheit enthält, die mit einem aliphatischen Rest substituiert oder unsubstituiert ist.

- (ii) Verfahren nach Ausführungsform (i), worin das Grundgerüst ein vernetztes Polyvinylgerüst ist.
- (iii) Verfahren nach Ausführungsform (i) oder (ii), worin die
5 aromatische Einheit eine Phenylsulfonsäure-Gruppe ist.
- (iv) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (iii), worin das vernetzte sulfonierte Polymer ein sulfoniertes Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer ist.
- 10 (v) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (iv), worin der Vernetzungsgrad des vernetzten sulfonierten Polymers 0,5 bis 50 % beträgt.
- 15 (vi) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (v), worin der Sulfonierungsgrad 1 bis 80 % beträgt, bezogen auf die Molanzahl von Sulfonsäure-Gruppen im Verhältnis zu allen zur Polymerisation eingesetzten sulfonierbaren Monomereinheiten.
- 20 (vii) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (vi), worin das vernetzte sulfonierte Polymer in Form von Harzpartikeln vorliegt.
- 25 (viii) Verfahren nach Ausführungsform (vii), worin die Harzpartikel einen mittleren durchschnittlichen Durchmesser von 1 bis 1000 µm aufweisen.
- (ix) Verfahren nach Ausführungsform (vii) oder (viii), worin
30 die Harzpartikel Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 10 bis 400 nm aufweisen.
- (x) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (ix), worin das Makromolekül ein Peptid ist.

(xi) Verfahren nach Ausführungsform (x), worin das Peptid Insulin ist.

5 (xii) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (i) bis (ix), worin das vernetzte sulfonierte Polymer mit einem Amino-Gruppe enthaltenden vernetzten Polymer beschichtet ist.

10 (xiii) Verfahren nach Ausführungsform (xii), worin der Vernetzungsgrad des Amino-Gruppen enthaltenden Polymers im Bereich von 5 bis 80 % liegt.

15 (xiv) Verfahren nach Ausführungsform (xii) oder (xiii), worin das Amino-Gruppen enthaltende vernetzte Polymer vernetztes Polyvinylamin ist.

20 (xv) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (xii) bis (xiv), worin alle für die Vernetzung verwendeten Amino-Gruppen nach der Vernetzung in Form eines Amins vorliegen.

25 (xvi) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (xii) bis (xv), worin das Massenverhältnis des vernetzten sulfonierten Polymers zu dem Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers im Bereich von 3 bis 20 liegt.

30 (xvii) Verfahren nach einer der Ausführungsformen (xii) bis (xvi), worin das Makromolekül ein Endotoxin, DNA oder RNA ist.

Im Nachfolgenden soll die Erfindung anhand von Figuren und Beispielen erläutert werden, die jedoch nicht einschränkend auf den Schutzzumfang zu verstehen sind.

Figuren:

Figur 1: Vergleich eines erfindungsgemäß verwendeten Ionenaustauschers mit den nicht erfindungsgemäßen Verwendungen zweier Ionenaustauscher nach dem Stand der Technik durch Messung der Beladungskapazität mit Insulin in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.

Figur 2: Auftrag der Extinktion des Eluats gegen die Zeit nach Durchfluss einer Fermentationslösung durch ein erfindungsgemäß verwendetes Anionentauschermaterial.

Figur 3: Vergleich eines erfindungsgemäß verwendeten Ionenaustauschers mit den nicht erfindungsgemäßen Verwendungen zweier Ionenaustauscher nach dem Stand der Technik durch Messung der Beladungskapazität mit DNA in Abhängigkeit von der Salzkonzentration.

Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung eines Kationenaustauscherharzes auf Basis eines vernetzten sulfonierten Polymers

Ziel des Ansatzes: Sulfonierung des Polystyrolträgers Amberchrom XT 30 (käuflich erwerblich bei The Dow Chemical Company, ehemals Rohm & Haas) bei 20°C.

Es wurde 165 mL konz. H_2SO_4 in einen temperierbaren 250 mL Reaktor gegeben. Zu der Schwefelsäure wurden 30,0 g des Trägermaterials gegeben und das Einwaagefläschen drei Mal mit je 20 mL konz. Schwefelsäure nachgespült. Nach der Zugabe des Trägermaterials wurde die Suspension gerührt und auf 20°C temperiert. Nach 2 h Reaktionszeit wurde die Suspension aus den Reaktor abgelassen und auf zwei 150 mL Spritzen verteilt.

Die Schwefelsäure wurde abgesaugt und die Phase nacheinander mit 200 mL verdünnter (62%iger) Schwefelsäure, 125 mL Wasser, 175 mL Methanol, 125 mL Wasser und abschließend mit 175 mL Methanol gespült. Die Phase wurde trockengesaugt und

5 anschließend bei 50°C im Vakuum getrocknet.

Die Bestimmung der Sulfonsäuregruppen erfolgt in einer HPLC-Säule durch Beladung mit Ammoniumacetat, anschließender Elution des gebundenen Ammoniums und Nachweis über

10 Indophenolblau. Es ergab sich ein Sulfonsäuregehalt von 375 µmol/mL. Dies entspricht einem Sulfonierungsgrad von näherungsweise 13 %. Die Partikelgröße beträgt im Mittel 30 µm. Die Partikel sind sphärisch mit einem mittleren Porendurchmesser von 22 nm und einem mittleren Porenvolumen
15 von 1,25 mL/g.

Beispiel 2: Herstellung eines Anionenaustauschers auf Basis eines mit einem Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymer
20 überzogenen vernetzten sulfonierten Polymers:

Als Basis für das Ionentauschermaterial wird Amberchrom CG1000S von Rohm & Haas verwendet. Dieses wird, wie in Beispiel 1 erläutert, bei 80°C mit 98%iger Schwefelsäure für 3
25 Stunden sulfoniert. Man erhält dabei Partikel mit einer mittleren durchschnittlichen Größe von 30 µm und einem mittleren Porendurchmesser von 22 bis 25 nm. Von dem resultierenden sulfonierten Polystyrol wird die Wasseraufnahmekapazität, bzw. das Porenvolumen bestimmt, indem
30 das getrocknete, sulfonierte Polystyrol gewogen, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt wird und anschließend überschüssiges Wasser abzentrifugiert wird. Das in den Poren befindliche Wasser bleibt dabei an seinem Ort. Nach nochmaligem Wiegen kann aus der Wägedifferenz zum trockenen

Polystyrol das Porenvolumen zu etwa 1,2 bis 1,3 mL/g ermittelt werden.

Zum Beschichten des Polystyrols wird eine wässrige
5 Polyvinylaminlösung bereitet, die aus Polyvinylamin mit einem mittleren Molgewicht von 35000 g/mol besteht. Der pH-Wert wird auf 9,5 eingestellt. Die Menge des Polyvinylamins beträgt hierbei 15% des zu beschichtenden Polystyrols, und das Volumen der Lösung beträgt 95% des ermittelten Porenvolumens des
10 Polystyrols. Die Polyvinylaminlösung wird zusammen mit dem Polystyrol in eine fest verschlossene PE-Flasche gegeben und für 6 Stunden auf einem Siebrüttler bei hoher Frequenz geschüttelt. Dabei muß auf eine ausreichende Durchmischung geachtet werden. Nach der Prozedur hat sich die
15 Polyvinylaminlösung in die Poren des Polystyrols gearbeitet. Das Polystyrol wird anschließend bei 50°C im Vakuumtrockenschrank zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zur Vernetzung des Polyvinylamins wird das beschichtete Polystyrol im dreifachen Volumen Isopropanol aufgenommen und
20 mit 5% Diethylenglycoldiglycidylether, bezogen auf die Aminogruppenzahl des Polyvinylamins, versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für sechs Stunden im Reaktor bei 55°C gerührt. Anschließend wird es auf eine Glasfilternutsche überführt und mit 2 Bettvolumina Isopropanol, 3 Bettvolumina
25 0,5 M TFA-Lösung, 2 Bettvolumina Wasser, 4 Bettvolumina 1M Natronlauge und abschließend 8 Bettvolumina Wasser gespült.

Beispiel 3: Reinigung von Insulin durch den in Beispiel 1 hergestellten Kationenaustauscher

30

Die Bestimmung der Beladbarkeit mit Insulin des salztoleranten in Beispiel 1 hergestellten Ionentauschers erfolgt mit einer Lösung von 10 mg/mL Insulin in 30% Isopropanol mit 50 mM Milchsäure bei pH 3,5 und unterschiedlichen Konzentrationen

NaCl. Die Beladbarkeit wurde bei 10% Durchbruch bestimmt und mit zwei Konkurrenzmaterialien verglichen. Die Ergebnisse sind in Figur 1 gezeigt. Als Vergleichsmaterialien wurden die käuflich erwerblichen Ionenaustauschermaterialien „Eshumo S“ der Fa. Merck (Polyvinylether, Ionenkapazität 50–100 $\mu\text{mol/mL}$, Partikelgröße 75–95 μm) und „Source 30S“ der Fa. GE Healthcare (Polystyrol/Divinylbenzol, Partikelgröße 30 μm) verwendet.

Während die Vergleichsmaterialien bei 250 mM NaCl-Gehalt im Laufmittel nur noch sehr geringe Kapazität zeigen, die bei höheren Salzgehalten nicht mehr meßbar ist, zeigt der erfindungsgemäß verwendete Ionentauscher noch eine deutliche Kapazität bis 1 M NaCl. Dies ist eindeutig aus Figur 1 abzulesen.

Beispiel 4: Abtrennung von DNA durch Einsatz des in Beispiel 2 hergestellten Anionenaustauscherharzes:

Der erste Schritt im Prozess der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus Fermentationslösungen ist die Abreicherung der enthaltenen DNA. Dies funktioniert, indem man die Fermentationslösung über eine Phase des in Beispiel 2 hergestellten Anionentauschers „filtriert“. Die DNA bindet in diesem Schritt an die Phase, und die quantitativ durchlaufende Fermentationslösung wird so von der DNA annähernd befreit. Dafür wird der in Beispiel 2 hergestellte Anionentauscher in eine 270 x 10 mm-Säule mit einem Bettvolumen von 21,2 mL gepackt und mit zunächst 500 mM NaKPO_4 pH 7,0 und anschließend mit 50 mM NaKPO_4 pH 7,0 äquilibriert. Die Fermentationslösung wird über einen 0,45 μm -Filter filtriert und von Niederschlägen befreit. 300 mL der Fermentationslösung werden über eine externe Pumpe auf die Säule gegeben. Es wird der Durchfluß, das Eluat mit 1 M NaCl pH 6,5 und der Spülschritt mit 1 M NaOH aufgefangen.

Der als Durchfluss bezeichnete teil in Figur 2 enthält fast ausschließlich den monoklonalen Antikörper und keine DNA. Eine Elution der DNA erfolgt jedoch erst durch das Aufbringen von NaOH.

Der Gehalt an DNA im Durchfluß und in der Fermentationslösung wird mit einem Picogreen-Assay nach Herstellerangaben bestimmt.

Tabelle 1:

dsDNA Fermentationslösung (gefiltert)	dsDNA Durchfluß
4767 µg	30 µg
100%	0.7 %
9046 ppm	57 ppm

5 Aus Tabelle 1 geht hervor, dass 99,3% der DNA bei der
Filtration über das Phasenmaterial entfernt werden konnten.
Die gebundene DNA eluiert nicht im 1 M NaCl-Schritt, sondern
erst durch Spülen mit 1 M NaOH, da hier die Aminogruppen der
Phase deprotoniert werden und keine Bindung zur DNA mehr
10 vorliegt.

Alternativ zu dem in Beispiel 2 hergestellten
Anionenaustauscher wurden auch die käuflich erwerblichen
Materialien zu Q Sepharose FF der Fa. Amersham Biosciences und
15 Fractogel TMAE der Fa. Merck als Trennmittel wie in Beispiel 4
verwendet. Bei der Bestimmung der statischen Kapazität bei
verschiedenen Salzgehalten im Vergleich zu Q Sepharose FF und
Fractogel TMAE ergibt sich eine höhere Beladbarkeit des
entwickelten Ionentauschers auch bei hohen Salzgehalten.

20

Beispiel 5: Abtrennung von Endotoxinen aus
Fermentationslösungen durch Einsatz des in Beispiel 2
hergestellten Anionenaustauscherharzes:

25 Eine Fermentationslösung, die Endotoxine enthält, wird über
eine Phase des in Beispiel 2 hergestellten Anionentauschers
„filtriert“. Die Endotoxine binden in diesem Schritt an die

Phase, und die quantitativ durchlaufende Fermentationslösung wird so von den Endotoxinen annähernd befreit.

Dafür wird der in Beispiel 2 hergestellte Anionentauscher in eine 270 x 10 mm-Säule mit einem Bettvolumen von 21,2 mL

5 gepackt. Die Fermentationslösung wird über einen 0,45 µm-Filter filtriert und von Niederschlägen befreit. 300 mL der Fermentationslösung werden über eine externe Pumpe auf die Säule gegeben.

10 Der Durchfluss aus der Säule enthält mindestens 90% weniger an Endotoxinen als die Fermentationslösung. Zum Nachweis des Endotoxingehalts wurde der LAL-Test verwendet. Auf diese Weise konnte die Fermentationslösung von einem Großteil der Endotoxine befreit werden. Die Endotoxine wurden anschließend
15 mit einem geeigneten Eluat von dem Ionenaustauscher gewaschen.

20

25

Patentansprüche

1. Verwendung eines vernetzten sulfonierten Polymers zur
Abtrennung eines Makromoleküls aus einer Lösung, die aus
einer biologischen Quelle stammt, wobei das vernetzte
sulfoniertere Polymer gebunden an sein Grundgerüst eine
sulfoniertere aromatische Einheit enthält, die mit einem
aliphatischen Rest substituiert oder unsubstituiert
vorliegt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Grundgerüst ein
vernetztes Polyvinylgerüst ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin die sulfoniertere
aromatische Einheit eine Phenylsulfonsäuregruppe ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das
vernetzte sulfoniertere Polymer ein sulfoniertes
Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin der
Vernetzungsgrad des vernetzten sulfonierten Polymers 0,5
bis 50 % beträgt.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der
Sulfonierungsgrad 1 bis 80 % beträgt, bezogen auf die
Molanzahl von Sulfonsäuregruppen im Verhältnis zu allen
zur Polymerisation eingesetzten sulfonierbaren
Monomereinheiten.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das
vernetzte sulfoniertere Polymer in Form von Harzpartikeln
vorliegt.

8. Verwendung nach Anspruch 7, worin die Harzpartikel einen mittleren durchschnittlichen Durchmesser von 1 bis 1000 μm aufweisen.
- 5 9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Harzpartikel Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 10 bis 400 nm aufweisen.
- 10 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das Makromolekül ein Peptid ist.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin das Peptid Insulin ist.
- 15 12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das vernetzte sulfonierte Polymer mit einem Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymer beschichtet ist.
- 20 13. Verwendung nach Anspruch 12, worin der Vernetzungsgrad des Amino-Gruppen enthaltenden vernetzten Polymers im Bereich von 5 bis 80 % liegt.
- 25 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, worin das Amino-Gruppen enthaltende vernetzte Polymer vernetztes Polyvinylamin ist.
- 30 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, worin alle für die Vernetzung verwendeten Amino-Gruppen nach der Vernetzung in Form eines Amins vorliegen.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, worin das Makromolekül ein Endotoxin, DNA oder RNA ist.