

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 2183

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.12.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.12.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19858892**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.02.2002**

(Věstník č. 2/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/09495**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/37156**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

B 01 D 15/02

(71) Přihlašovatel:

MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE;

(72) Původce:

**Britsch Lothar, Reute, DE;
Schulte Michael, Rüsselsheim, DE;
Strube Jochen, Hagen, DE;**

(74) Zástupce:

Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob kontinuálního oddělování látek podle
velikosti molekuly**

(57) Anotace:

Při způsobu kontinuálního chromatografického oddělování se analyty oddělují gelovou permeační chromatografií.

CZ 2001 - 2183 A3

Způsob kontinuálního oddělování látek podle velikosti molekuly

Oblast techniky

Vynález se týká použití způsobu chromatografického oddělování látek na základě vylučování podle velikosti (size exclusion chromatography, SEC) způsobem kontinuální chromatografie, zejména chromatografie simulovaného pohyblivého lože (simulated moving bed SMB).

Dosavadní stav techniky

Oddělování látek, zvláště makromolekulárních látek, podle velikosti molekul je široce rozšířeným způsobem chromatografického oddělování. Zvláště při čištění peptidů a proteinů se způsobů oddělování jako například chromatografií na základě vylučování podle velikosti (SEC), často označované jako gelová permeační chromatografie, používá v široké míře. Například G. Subramanian ("Process scale liquid chromatography", VCH Weinheim 1995), popsuje preparativní aplikace tohoto způsobu oddělování. Všechny tyto aplikace jsou však založeny na způsobu zpracování po dávkách, který se vyznačuje časo-prostorovou náročností. Při tomto způsobu se sloučeniny napřed dlouhou dobu uchovávají, což vyžaduje dlouhodobé cykly (dobu mezi dvěma injekcemi). Jelikož většina sloučenin použitých v SEC má jen malou stabilitu vůči tlaku, není možno zvýšit průtočnou rychlost k dosažení rychlejšího oddělování. Kromě toho většina nosičů má špatnou schopnost zatěžování (méně než objemově 5 % gelu). Některé z těchto problémů je možno vyřešit použitím kontinuálních způsobů. Dosud však nebylo možno aplikovat způsoby oddělování SEC kontinuálně; parametry pro kontinuální oddělování tohoto typu by musely být stanoveny vhodnými modelovými výpočty. Kromě toho musejí získané procesní parametry umožňovat trvalý provoz.

Kontinuálních chromatografických způsobů, jako je například chromatografie simulovaného pohyblivého lože (SMB), se tradičně používá ve velkém měřítku v petrochemickém průmyslu nebo při výrobě cukru. Dosud se však těchto způsobů požívalo v průmyslu čistých a farmaceutických chemikálií, v zásadě pro oddělování isomerů a enantiomerů, to znamená při problémech oddělování klasických dvousložkových směsí. Počáteční snahy izolovat složky z vícesložkových směsí byly rovněž popsány.

K získání vhodných procesních parametrů pro chromatografii SMB byla vyvinuta řada simulačních modelů, z nichž precizní procesní model SMB má největší dosah. Simulační postupy jsou popsány v literatuře (například Nicludem a kol., Nancy, 1993; a WO 97/34 918. Těmto způsobům je společné stanovení adsorpčních isotherm analytů; tyto výsledky měření jsou pak základem pro modelové výpočty. V nejnověji byla předvedena modelové oddělování binárních směsí na základě pravého protiproudného modelu (G. Sörti a kol., AlChE Journal 39, str. 471 až 472¹⁹⁹³; a E. Francotte a kol., J. Chromatogr. A 769, str. 239 až 248 1998). V dalším vývoji byly parametry optimalizovány od první souboru parametrů, použitím detailních procesní simulace (J. Strube, U. Altenhöner, M. Meurer a H. Schmidt-Traub, Chem. Ing. Tech. 69, str. 328 až 331, 1997; a dizertační práce J. Strube, University of Dortmund, 1996). Všechny tyto modely jsou však založeny na stanovení adsorpčních isotherm.

Zatímco dosud používané modely chromatografického oddělování pro způsoby SMB, například dělení enantiomerů nebo ionexová chromatografie, jsou založeny na adsorpčních procesech, je způsob SEC založen na úplně odlišném způsobu: pro analyty s různou velikostí molekul jsou k dispozici různé objemy v důsledku rozdělení velikostí pórů v sorbentu; větší molekuly tak eluuji dříve než menší. SEC je tak založena na difusním mechanismu se začleněním mechanismu vylučování velikostí, bez adsorpce analytů sorbentem. Proto nedochází k fázovým rovnováhám

jako u adsorpční chromatografie. Nemohou být tedy pro SEC použity dosud známé způsoby modelování, které poskytují parametry pro chromatografii SMB. Zejména vyvstává problém stabilizace rafinátové fronty složky zachycené nejkrátce v oblasti sekce IV, tedy mezi liniemi rafinátu a eluentu. Tento problém se dále zvyšuje, jelikož u mnohých způsobů oddělování SEC je část analytů eluována v prázdném objemu. Takové složky jsou převáděny zónou IV a kontaminují exahovanou složku. Dosud nebylo možno aplikovat procesní parametry z počítačových modelů po dávkách na kontinuální způsoby oddělování (například separační způsoby SMB) pro způsoby oddělování SEC a tedy zvláště k získání parametrů oddělování pro způsoby kontinuální oddělování, které dovolují stálý provoz.

Úkolem vynálezu tedy je vyvinout modely a způsoby, které poskytnou parametry oddělování pro způsoby kontinuálního oddělování, které umožní dosáhnout stálého provozu zvláště pro způsoby oddělování SEC.

Podstata vynálezu

Způsob kontinuální oddělování, zvláště způsoby SMB spočívá podle vynálezu v tom, že se analyty oddělují chromatografií vylučování podle velikosti (gelová permeační chromatografie).

Vynález blíže objasňuje následující popis a připojené obrázky.

Přehlad obrázků na výkresech

Na obr. 1 je oddělování SEC prášku odstředěného mléka na 600×16 mm Superformance^R sloupci plněném Fractogelem^R EMD BioSEC(S).

Na obr. 2 až 4 jsou chromatogramy jednotlivých složek:

obr. 2 kaseinová frakce RT 39,5; 53,92 min

obr. 3 β -laktoglobulin A RT 63,52 min

obr. 4 α -laktalbumin RT 71,60 min

Na obr. 5 je eluční chromatogram jednotlivých složek stanovená jako výsledek přesného modelování jednotlivých látek podle vynálezu.

Na obr. 6 je profil interní axiální koncentrace jednotky SEC/SMB s koncentracemi jednotlivých složek v individuálních zónách na konci doby cyklu.

Teoretický model výpočtu pro jednoduché systémy složek pro oddělování SEC při způsobu po dávkách popsal Rien Gu (Mathematic Modelling of Liquid Chromatography, Springer Verlag, 1955).

Zjistilo se, že stabilní procesní parametry pro použití SEC oddělování SEC při způsobech SMB lze získat následujícím způsobem podle vynálezu:

- a) Vypočtou se doby prodlevy v separačním sloupci oddělovaných látek a pás rozšíření píků látky. Doby prodlevy se vypočtou pomocí například shora uvedeného způsobu, který popsal Tien Gu (1995)
- b) Údajů získaných pomocí (analytických) chromatogramů po dávkách se použije k výpočtu efektivních porozit každé složky a dob prodlevy.
- c) Pás rozšíření se může vypočítat například z koeficientů efektivní molekulové difuze. Koeficienty efektivní molekulové difuze se mohou určit na bázi Stokes-Einsteinovy relace a molekulových hmotností složek.
- d) Zkontroluje se souhlas vypočtených hodnot (kroky b) & c)) s pozorovaným elučním profilem a v popřípadě se souhlas vypočtených hodnot s experimentálními opraví v dalších iterakčních krocích.
- e) Potřebné čisté poměry průtočných rychlostí procesu SMB se vypočtou z parametrů výpočtu změřeného modelu způsobu, které jsou v zásadě známy, jak vyznačeno například ve shora u-

vedené publikací G. Storti a kol. (1993) a v disertační práci Strubeho (1996).

Shora uvedený postup výpočtu doby prodlevy a pásu rozšíření a výsledné parametry umožňují dříve známé modely (G. Storti a kol., 1993; a disertace Strubeho, 1996) použitelné i bez určení adsorpčních isotherm.

Ukázalo se, že navrhovaný model je dostatečně přesný, je-li kontrolován pro různé koncentrace a lineární rychlosti na individuálním sloupci. Rozdělení dob prodlevy se zde stanoví difusními parametry, jež platí pro interní objemy částic sorbentu. Efektivní koeficienty molekulární difuze se stanoví z molekulárních hmotností složek podle Stokes-Einsteinova vztahu a vezmou se v úvahu v modelu jako koeficienty přenosu materiálu.

Podle vynálezu může být použito obecně známých nosičů SEC; přednost se dává nosičům SEC stabilním vůči tlaku, které jsou pravděpodobně obchodně dostupné, například Fraktogel[®] EMD Bio-SEC (popsaný v německém patentovém spise číslo DE 43 16 136).

Podle vynálezu se použije pravděpodobně obchodně dostupných jednotek SMB. Těmi jsou například jednotky konstruované spojením dvoucestných ventilů nebo jednotek majících víceprůchodný ventil. Oddělování se provádí za isokratických podmínek a může být tedy automatizována v simulovaném systému pohyblivého lože.

Při izolování složek z několikásložkových směsí mohou být složky, které eluují jako první nebo poslední brány přímo v čisté formě. Pro izolace látek, které jsou z obou stran obloženy nečistotami, může být dosaženo vyčištění kombinací několikanásobných čisticích kroků SMB (jak je popsáno například ve světovém patentovém spise číslo WO 97/34 918).

Ke splnění zvláštních požadavků daných biotechnologickými problémy dělení několikasložkové směsi se obzvlášť dobře hodí k odstraňování nečistot s velkým rozměrem molekul tak zvaný otevřený (open mode) postup se 3 zónami bez uzavírání oběžného průtoku nebo akumulací z procesů, má-li být získán podíl s nízkou molekulovou hmotností a také pro přímé získání produktů s velkou molekulou přímo.

Ke splnění požadavků CIP (cleaning in place - čištění na místě), provozu s promývanými sloupci v zóně 1 až 4 (s funkcemi regenerace adsorbentu a čištění desorbentu) a promývání a rovněž regenerace a čištění adsorbentu a také sekcí potrubních dílů a součástí, je například hydroxid sodný rozhodující pro fungování a zabránění akumulace.

Způsob dělení podle vynálezu umožňuje zlepšené oddělování proteinů podle velikosti molekul, jelikož se může provádět kontinuálně a plně automatizovaně ve velkých jednotkách; těchto způsobů oddělování je možno používat zejména v následujících aplikačních oborech:

- čištění proteinů od transgenického zvířecího mléka,
- čištění proteinů, například faktorů VIII, vW a IX od krevní plasmy,
- čištění plasmidů,
- dalším velkoobjemovým způsobem je odsolování zaváděných směsí, jehož ekonomie je zlepšena kontinuální metodou SEC,
- v tak zvaném zacílování drog je záměrem dodávat drogy specificky do míst působení. K tomu se využívá například liposomů obohacených drogou. Problém přípravy takových liposomů spočívá v oddělování liposomů neobsahujících drogu od liposomů drogou obohacených. Toho se dá dosáhnout ve velkém měřítku kontinuální metodou SEC,
- kromě frakcionace přírodních makromolekul může být způsobu použito pro syntetické polymery, například pro polyethylenoxydy a silikony,

- v kombinaci s reaktivním nosičem, jak tomu je u reaktivních SMB, mohou být reakce a oddělování prováděny v jediné operaci. Možnou aplikací je odstraňování jednotek TAG z rekombinantních proteinů proteázou a současným odstraňováním jednotek TAG z cílových proteinů SEC/SMB,
- způsoby podle vynálezu se kromě toho hodí pro zbavování biologických produktů virů, pro odstraňování endotoxinů, zvláště v agregovaném stavu, nebo pro čištění virů.

Další možné aplikace vyplývají z kolísavého rozdělení velikosti pórů použitých nosičů. Například systémů s jemně pórnými gely je možno použít k čištění peptidů, jako je například izulin.

I bez dalších podrobností se předpokládá že pracovníci v oboru budou schopni využít uvedeného popisu v nejširším míře. Výhodná provedení a příklady je proto třeba považovat za pouhé objasnění, které vynález nikterak neomezují. Popis doplňují odkazy na literaturu (patenty a publikace).

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad použití

Popisuje se odstraňování kaseinového podílu z odstředěného práškového mléka. Ke stanovení provozních parametrů se vzorek a hlavní jednotlivé složky podrobují chromatografii po dávkách:

Na obr. 1 je oddělování SEC prášku odstředěného mléka na sloupcovém plnění 600×16 mm Superformance^R s Fractogelem^R EMD BioSEC(S) a na obr. 2 až 4 jsou chromatogramy jednotlivých

složek:

obr. 2	kaseinová frakce	RT 39,5; 53,92 min
obr. 3	β -laktoglobulin A	RT 63,52 min
obr. 4	α -laktalbumin	RT 71,60 min

Na obr. 5 je eluční chromatogram jednotlivých složek stanovený jako výsledek přísného modelování jednotlivých látek podle vynálezu.

Na obr. 6 je profil interní axiální koncentrace jednotky SEC/SMB s koncentracemi jednotlivých složek v individuálních zónách na konci doby cyklu. Provozní parametry se stanoví způsobem podle vynálezu.

Označení složek:

Složka	Doba prodlevy	
A	106,86	
B	98,64	
C	71,39	α -laktalbumin
D	64,16	β -laktoglobulin
E	50,00	kasein
F	43,26	kasein

Jednotka SMB s uvedenými parametry je schopná produkovat složky E a F (kasein) a A-D v čistotě >99%.

Provozní parametry

průměr sloupce	26 mm
délka sloupce	150 mm
počet sloupců	8
segmentace	2:2:2:2

15.05.01

průtočné rychlosti:

vnitřní rychlost v zóně 1	2,7 ml/min
eluční činidlo	1,506 ml/min
extrakt	1,578 ml/min
napájení	0,84 ml/min
koncentrace napájení	100 mg/ml
doba cyklu	21 min

Porovnání způsobu po dávkách se způsobem SMB podle vynálezu:

Parametr	Dávkový	SMB
průměr sloupce	26 mm	26 mm
délka sloupce	600 mm	150 mm
počet sloupců	1	8
celkový objem sloupců	319 cm ³	637 cm ³
koncentrace napájení	100 mg/ml	100 mg/ml
průtočná rychlost napájení	-	0,84 ml/min
injekční objem	200 µl	-
doba cyklu	120 min	-
prosazení napájení/den	0,636 g/d	120,96 g/d
produktivita (g napájení /d×L objem sloupce)	1,99 g/d×L	189,9 g/d×L
spotřeba elučního činidla (ml/g napájení)	723,6 ml/g	17,78 ml/g
Porovnání výkonu	1	95,43
produktivita		
Spotřeba elučního činidla	40,69	1

Porovnání produktivity zpracování po dávkách a způsobu

SMB ukazuje velkou přednost kontinuálního konkurenčního způsobu díky ekonomičtějšimu využití.

Na rozdíl od mechanismů adsorpční separace se podle vynálezu nepředepisují žádné fázové rovnovážné isotermy, ale místo toho se jako parametrů používá první doba pro kontinuální způsob, rozdílné rychlosti difuze do částic adsorbentu, což je charakteristika složky oddělované způsobem SEC a rozdílné dostupné objemy pórů. Oba parametry, které jsou charakteristické pro efekty separace způsobem SEC jsou pro první dobu brány v úvahu realisticky v modelu na kterém je vynález založen.

Průmyslová využitelnost

Způsob kontinuální gelové permeační chromatografie pro účinné oddělování látek na základě velikosti jejich molekul.

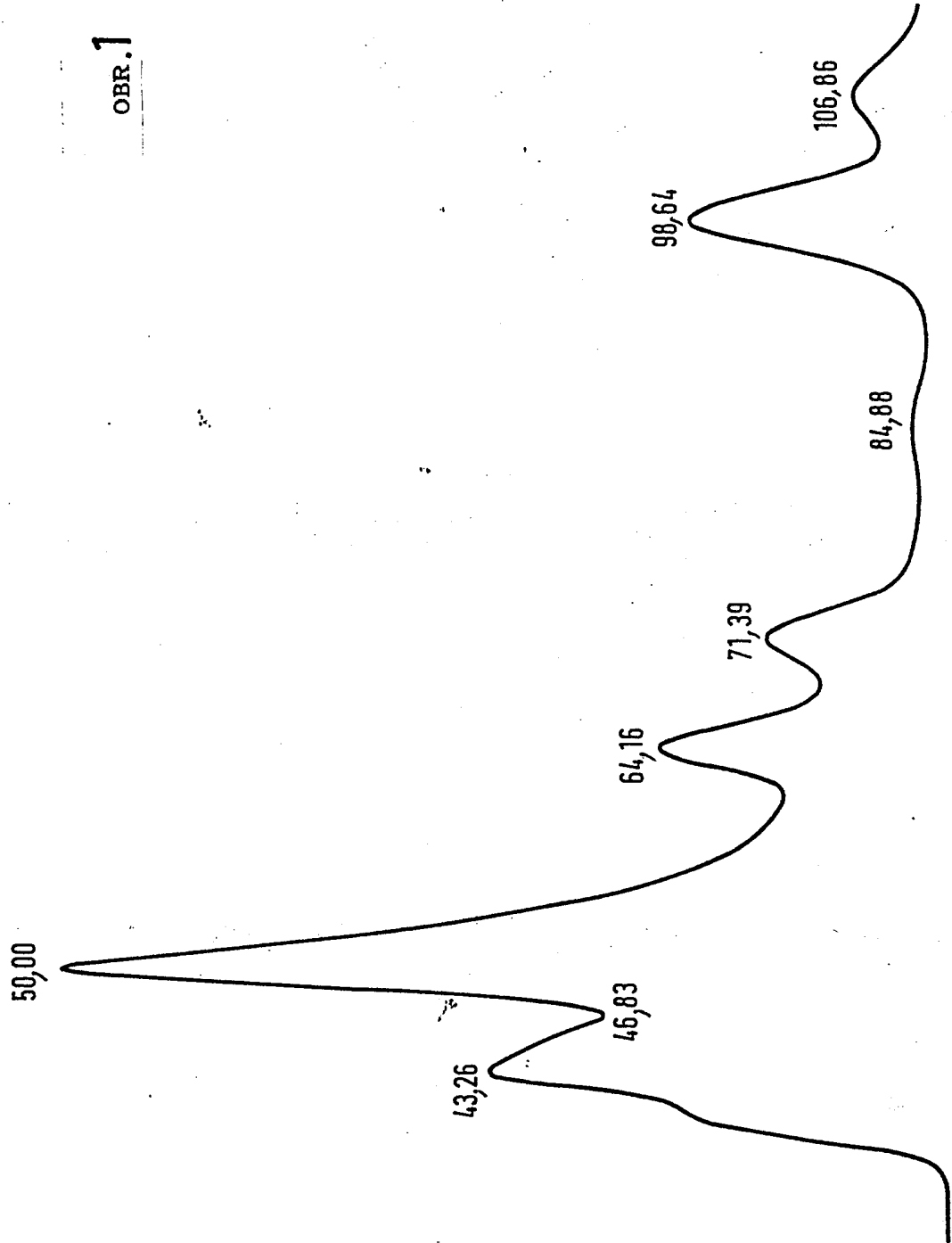
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob kontinuálního chromatografického odělování, v y -
z n a č u j í c í s e t í m, že se analyty oddělují chro-
matografií na základě vylučování podle velikosti (gelovou per-
meační chromatografií).

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m,
že způsobem kontinuální chromatografické separace je způsob
SMB.

1/5

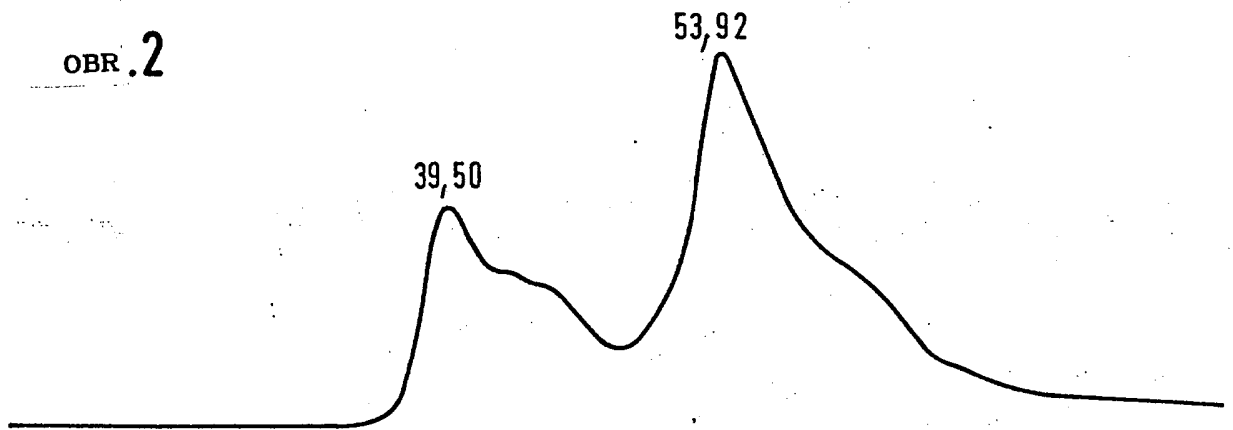
OBR. 1



15.08.01 PV 2001-2183

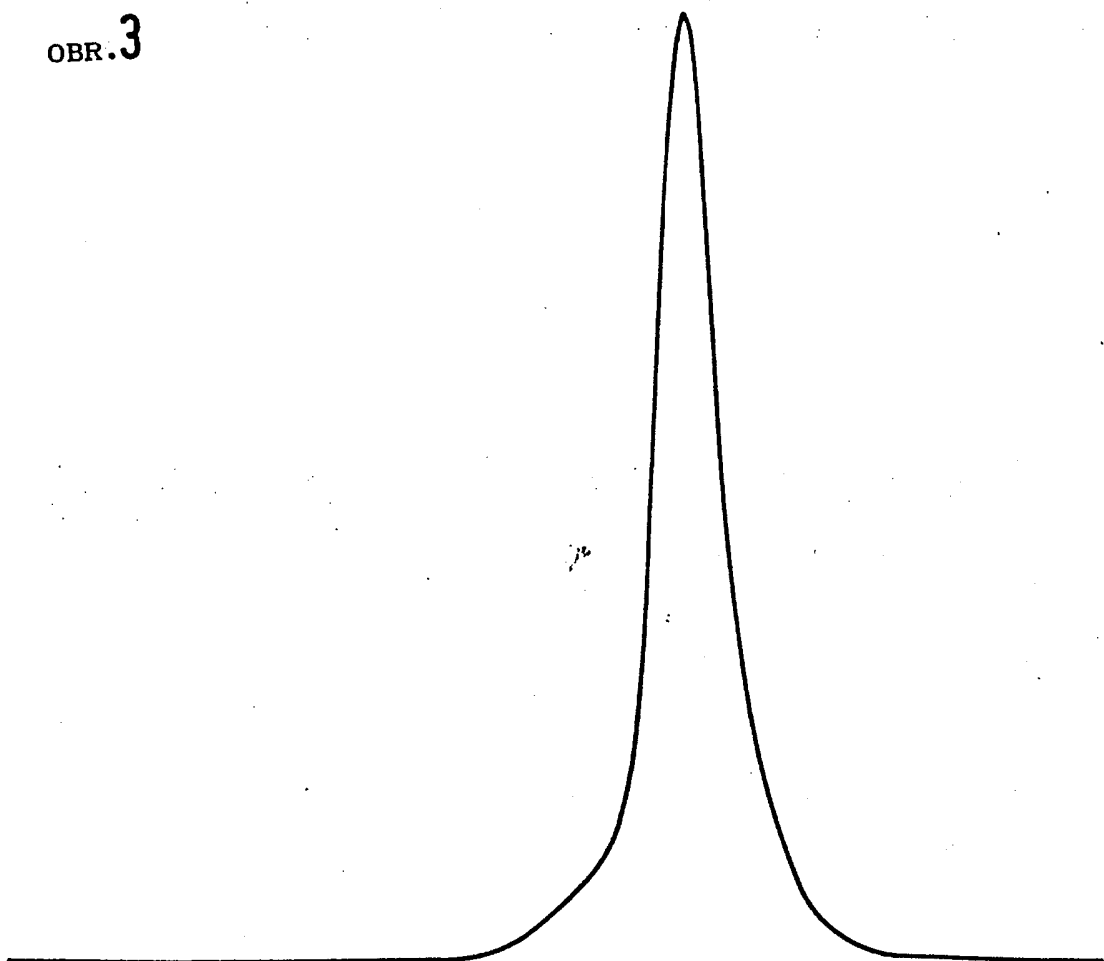
2/5

OBR.2



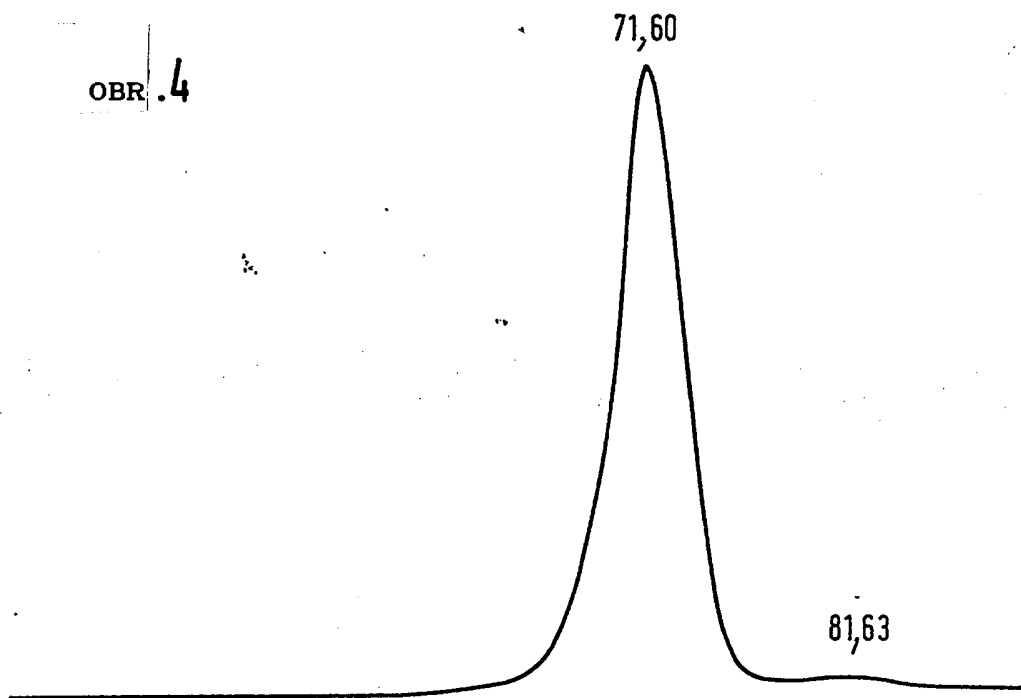
OBR.3

63,52

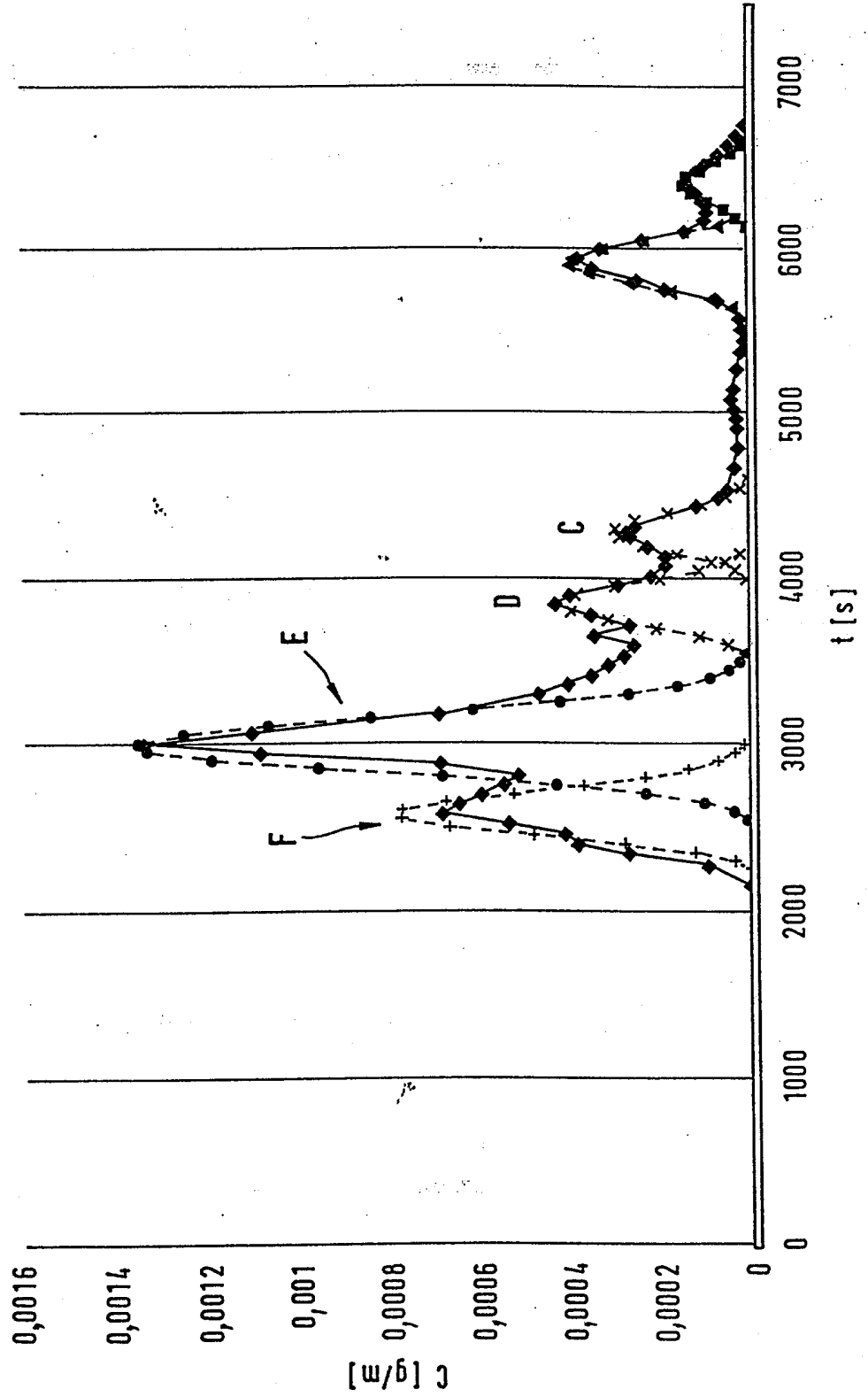


15.08.01 PV 2001-2183

3/5



OBR. 5



OBR. 6

