

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

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
22. November 2012 (22.11.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/156508 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

B01J 20/08 (2006.01) **B01J 20/28** (2006.01)
B01J 20/10 (2006.01) **B01J 20/32** (2006.01)
B01J 20/286 (2006.01) **B01J 20/22** (2006.01)
B01J 20/284 (2006.01) **B01D 15/08** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/059260

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Mai 2012 (18.05.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 101 880.1 18. Mai 2011 (18.05.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **SÜD-CHEMIE AG** [DE/DE]; Lenbachplatz 6,
80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SOHLING, Ulrich**
[DE/DE]; Alte Poststr. 49, 85356 Freising (DE). **RUF,**
Friedrich [DE/DE]; Schlossfeld 7, 84184 Aist (DE).
THIE, Gordon [DE/DE]; Am Hissenberg 8, 45527
Hattingen (DE). **KUHN, Hubert** [DE/DE]; Düsseldorf
Str. 79, 42697 Solingen (DE). **SANDER, Friederike**
[DE/DE]; Heesestr. 9a, 12169 Berlin (DE). **RALLA,**
Kathrin [DE/DE]; Ueckermünder Str. 9, 10439 Berlin
(DE). **BEUTEL, Sascha** [DE/DE]; Alte Döhrener Str. 7,
30169 Hannover (DE). **KASPER, Cornelia** [DE/AT];
Eckpergasse 26 Tür 12, A-1180 Wien (AT). **SCHEPER,**

Thomas [DE/DE]; Lange-Hop-Str. 47b, 30559 Hannover
(DE).

(74) Anwalt: **STOLMÁR SCHEELE & PARTNER;**
Blumenstr. 17, 80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SEPARATION MEDIA FOR PURIFICATION AND/OR ISOLATION OF ENZYMES
AND/OR PROTEINS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SEPARATIONSMEDIEN ZUR AUFRÄUIGUNG UND/ODER
ISOLIERUNG VON ENZYMEN UND/ODER PROTEINEN

(57) Abstract: The present invention relates to a process for producing a separation medium, to the separation medium to which at
least one metal fatty acid has been applied and is produced by the process, to the use of the separation medium for purification
and/or isolation of enzymes and/or proteins, and to a process for purifying and/or isolating proteins and/or enzymes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Separationsmediums, das nach dem
Verfahren hergestellte Separationsmedium, auf das mindestens eine Metallfettsäure aufgebracht ist, die Verwendung des
Separationsmediums zur Aufreinigung und/oder Isolierung von Enzymen und/oder Proteinen sowie ein Verfahren zur Aufreinigung
und/oder Isolierung von Proteinen und/oder Enzymen.



WO 2012/156508 A1

**Verfahren zur Herstellung von Separationsmedien zur
Aufreinigung und/oder Isolierung von Enzymen und/oder
Proteinen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Separationsmediums, das nach dem Verfahren hergestellte Separationsmedium, auf das mindestens eine Metallfettsäure aufgebracht ist, die Verwendung des Separationsmediums zur Aufreinigung und/oder Isolierung von Enzymen und/oder Proteinen sowie ein Verfahren zur Aufreinigung und/oder Isolierung von Proteinen und/oder Enzymen.

Um Proteine oder Enzyme mit festen Trennmedien aufzureinigen, sind die unterschiedlichsten Verfahren einsetzbar. In der Regel werden mehrere Schritte bzw. Adsorptionsmedien miteinander kombiniert. Üblicherweise wird ein Gemisch von Proteinen zunächst einmal durch eine Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Daran können sich ggf. weitere Schritte, wie z. B. eine hydrophobe Interaktionschromatographie oder eine Affinitätschromatographie, anschließen.

Ein spezielles Verfahren zur Protein- und/oder Enzymaufreinigung ist die sog. immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie, die im Englischen oft auch ,IMAC' abgekürzt wird. Die Abkürzung kommt von ,Immobilized Metal Affinity Chromatography'. Details zu dieser Methode sind insbesondere in dem Buch von L. Kagedal, Protein Purifications, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Kapitel 8, Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, Wiley-VCH (1998) angegeben. Dieses Verfahren

beruht auf einer Komplexbildung von insbesondere Histidingruppen der Proteine oder Enzyme mit dem Trennmedium. Als Ankergruppen werden dabei an Komplexbildnern immobilisierte Metallionen zur Verfügung gestellt. Hierzu ist es erforderlich, solche Trennmedien herzustellen, bei denen ein festes Adsorbens, bestehend aus einem anorganischen oder organischen Träger, mit einem Komplexbildner zunächst funktionalisiert wird. Üblicherweise wird hierzu ein Derivat von Aminodiessigsäure eingesetzt, welches beispielsweise eine Silangruppe tragen kann, um es auf Silicagelen zu verankern. Im nächsten Schritt wird das mit dem Komplexbildner funktionalisierte Trennmedium an Metallionen aufgebracht. Dieses Adsorbens kann nun eingesetzt werden, um histidinreiche Proteine über Komplexbildung zu adsorbieren. Um das entsprechende Protein wieder vom Trennmedium zu entfernen, kann man beispielsweise mit einem histidinreichen Puffer eluieren.

Um die Effizienz dieses Trennprozesses zu steigern, kann man das Zielprotein oder Zielenzym, wenn dieses gentechnologisch produziert wird, so modifizieren, dass es endständig noch mehrere Histidingruppen trägt. Man spricht von sog. his-tags. Dadurch wird die Wechselwirkung mit Metallchelatmedien noch weiter gesteigert.

Es ist im Stand der Technik bereits eine große Reihe von Metallchelatmedien kommerziell verfügbar. Trotzdem haben diese bereits bekannten Metallchelatmedien eine Reihe von Nachteilen: Einerseits arbeitet ein großer Teil der Metallchelatmedien mit relativ giftigen Schwermetallionen, wie z. B. Co^{2+} und Ni^{2+} . Dies schränkt die Möglichkeit ein, die Trennprozesse in technischem Maßstab beispielsweise für die Produktion von pharmazeutisch aktiven Proteinen oder im

Bereich der Lebensmittelproduktion einzusetzen. Weiterhin ist die Herstellung der bekannten Trennmedien sehr aufwendig und teuer, so dass sie auch deshalb noch keinen Eingang in die technischen Trennprozesse gefunden haben. Hier ist insbesondere die kostenintensive Entsorgung der Schwermetalle problematisch. Drittens ist es mit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren zur Einführung von komplexbildenden Gruppen nicht möglich, beliebige Substrate zu funktionalisieren. So werden im Stand der Technik entweder die Komplexbildner über kovalente organische Gruppen oder in Form von Silanfunktionalitäten an entsprechende Träger aufgebracht. Eine Herstellung von Metallchelatmedien über Physisorption ist bisher im Stand der Technik noch nicht näher untersucht worden.

Aufgrund des verstärkten Einsatzes von biotechnologischen Prozessen, sowohl bei der Herstellung von pharmakologisch aktiven Proteinen als auch bei der Herstellung von technischen Proteinen und Enzymen, besteht ein ständiger Bedarf an alternativen und effizienten Trennmedien. Dies gilt insbesondere auch für das Einsatzgebiet der Lebensmittelproduktion. Es ist daher dringend erforderlich, dass einerseits Oberflächenfunktionalisierungen gefunden werden, bei denen toxische Schwermetallionen, wie z. B. Ni^{2+} und Co^{2+} , durch weniger toxische Metallionen, wie z. B. $\text{Fe}^{3+/2+}$ und Zn^{2+} , ersetzt werden können. Nur dann können diese Metallchelatmedien auch zur Aufreinigung und Isolierung von Proteinen und Enzymen eingesetzt werden, die später Verwendung in pharmazeutischen und lebensmitteltechnologischen Prozessen finden. Weiterhin ist es notwendig, die Oberflächenfunktionalisierungen mit den aktiven komplexbildenden Gruppen zu vereinfachen, um so den Herstellungsprozess der Metallchelatmedien zu vereinfachen und damit auch zu vergünstigen.

Die Erfindung hat sich deshalb die Aufgabe gestellt, alternative Metallchelatmedien zur Verfügung zu stellen, die die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen und die auf kostengünstige Art und Weise auf die Trägermaterialien aufgebracht werden können. Erstaunlicherweise wurde nun gefunden, dass sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren beliebige Trägermaterialien mit einer Schicht aus Metallfettsäure überziehen lassen und dass die so imprägnierten Trägermaterialien geeignet sind, um als Metallchelatmedien auch in pharmakologischen und lebensmitteltechnologischen Verfahren eingesetzt zu werden.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nun überraschend gefunden, dass sich besonders vorteilhafte Separationsmedien, die sowohl in pharmakologischen wie auch lebensmitteltechnologischen Verfahren eingesetzt werden können, herstellen lassen, indem Metallfettsäuresalze in einem organischen Lösungsmittel auf die Trägermaterialien aufgebracht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher in einem ersten Aspekt ein

Verfahren zur Herstellung eines Separationsmediums umfassend die Schritte

- a) In-Kontakt-Bringen mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel;
- b) In-Kontakt-Bringen des Gemischs gemäß Schritt a) mit mindestens einem Trägermaterial;

c) Abtrennen des Trägermaterials.

Unter dem Begriff „Separationsmedium“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Medium verstanden, bei dem ein fester anorganischer oder organischer Träger mit einer Verbindung beaufschlagt ist, die mit mindestens einem der aufzutrennenden Proteine oder Enzyme eine Verbindung eingehen kann. Diese „beaufschlagte Verbindung“ bezeichnet man auch als „stationäre Phase“. Die aufzutrennenden Proteine oder Enzyme werden in der „mobilen Phase“ (Gas oder Flüssigkeit) eingesetzt.

Unter dem Begriff „in Kontakt Bringen mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede Art des in-Kontakt-Bringens verstanden, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Bevorzugt erfolgt das In-Kontakt-Bringen des Metallsalzes mit dem Lösungsmittel durch einfaches Mischen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird während des in-Kontakt-Bringens das Metallsalz der Fettsäure zumindest teilweise, besonders bevorzugt vollständig, in dem organischen Lösungsmittel gelöst.

Das „in Kontakt Bringen mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel“ erfolgt im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt bei einer Temperatur von 1 bis 80 °C, bevorzugter 5 bis 75 °C, weiter bevorzugt bei 15 bis 72 °C, ebenfalls bevorzugt bei 25 bis 70 °C, insbesondere bevorzugt bei 35 bis 65 °C und am meisten bevorzugt bei 45 bis 60 °C.

Weiter kann das „in Kontakt Bringen mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt bei Normaldruck erfolgen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird während des „in Kontakt Bringens mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel“ gerührt.

Das Mengenverhältnis (g Metallsalz : g organisches Lösungsmittel) liegt bevorzugt im Bereich 0,01 bis 1, bevorzugter im Bereich 0,1 bis 0,99, weiter bevorzugt im Bereich 0,15 bis 0,9, insbesondere bevorzugt im Bereich 0,2 bis 0,8, ebenfalls bevorzugt im Bereich 0,3 bis 0,75 und am meisten bevorzugt im Bereich 0,35 bis 0,7.

Unter dem Begriff „Fettsäure“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Monocarbonsäuren, also Verbindungen, die aus einer Carboxygruppe ($-\text{COOH}$) und aus einer unterschiedlich langen, aber fast ausschließlich unverzweigten Kohlenwasserstoffkette bestehen, verstanden. Geeignete Fettsäuren sind beispielsweise gesättigte Fettsäuren mit 8 bis 24 Kohlenstoffatomen, ungesättigte Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe Ölsäure, Elaidinsäure, Linolsäure und Linolensäure, Hydroxyfettsäuren wie Ricinolsäure und Epoxyfettsäuren wie Vernolsäure. Unter dem Begriff „Fettsäurederivate“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Fettsäurederivate subsumiert, d.h. Fettsäuren, die beispielsweise durch Hydroxy-, Alkyl-, Keto-, und/oder Methoxygruppen modifiziert wurden. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten die Fettsäuren keine primären, sekundären und/oder tertiären Aminogruppen. Besonders geeignet sind dabei ungesättigte Fettsäuren und Fettsäurederivate wie Hydroxyfettsäuren, die für das Metallion eine verbesserte

Zugänglichkeit aufweisen und/oder mit dem Metallion besser komplexieren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können auch Mischungen von zwei oder mehr der vorgenannten Fettsäuren und Fettsäurederivate eingesetzt werden.

Bei dem Metallsalz der Fettsäure handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung um ein Zink-, Eisen-, Magnesium- oder Calciumsalz einer Fettsäure, wobei ein Zink oder Eisensalz besonders bevorzugt ist. Prinzipiell können Fe^{2+} und Fe^{3+} Fettsäuren eingesetzt werden, wobei Fe^{3+} Fettsäuren bevorzugt sind, da diese weniger oxidationsanfällig sind. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können auch Mischungen von zwei oder mehreren unterschiedlichen Fettsäure-Metallsalzen eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Metallsalze sind Zinksalze von Fettsäuren, wie Zinkoleat und Zinricinoleat.

Bei dem organischen Lösungsmittel handelt es sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt um einen Alkohol oder ein Alkohol-haltiges Lösungsmittel, wobei ein Ethanol-haltiges Lösungsmittel besonders bevorzugt ist. Weitere geeignete Lösungsmittel sind Aceton, Cyclohexanon, iso-Octan, Cyclohepanon sowie Alkane deren Siedepunkt oberhalb des Schmelzpunktes der Metallfettsäure liegt und deren Mischungen.

Besonders bevorzugt ist es dabei, wenn der Ethanolanteil des Lösungsmittels bei 1 bis 99 Vol.-%, bevorzugter 5 bis 98 Vol.-%, besonders bevorzugt 15 bis 95 Vol.-%, weiter bevorzugt 25 bis 93 Vol.-%, insbesondere bevorzugt 35 bis 92 Vol.-%, ebenfalls bevorzugt 45 bis 91 Vol.-% und am meisten bevorzugt bei 50 bis 85 Vol.% liegt. Ebenfalls bevorzugt ist ein Ethanolgehalt von 100%.

Bei dem Trägermaterial kann es sich um ein organisches oder anorganisches Material handeln. Bevorzugte Trägermaterialien sind anorganische Metalloxide (wie beispielsweise Aluminiumoxid), Kieselgel, Cellulose, Dextran und deren Mischungen. Ebenfalls möglich ist, dass als Trägermaterial in dem erfindungsgemäßen Verfahren bereits eine fertige Filtereinheit oder Tiefenfilterschicht eingesetzt wird, wie beispielsweise Membranen oder poröse monolithische stationäre Phasen.

Unter dem Begriff „in Kontakt Bringen des Gemischs eines Metallsalzes einer Fettsäure und eines Lösungsmittels mit dem Trägermaterial“ gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird jede Art des in-Kontakt-Bringens verstanden, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Bevorzugt erfolgt das In-Kontakt-Bringen des Gemischs des Metallsalzes einer Fettsäure und des Lösungsmittels mit dem Trägermaterial durch Immersion des Trägermaterials in das Gemisch oder durch Aufsprühen des Gemisches auf das Trägermaterial. Durch das „in-Kontakt-Bringen des Gemischs eines Metallsalzes einer Fettsäure und eines Lösungsmittels mit dem Trägermaterial“ gemäß Schritt b) wird die mindestens eine Metallfettsäure auf dem Trägermaterial adsorbiert.

Das „in Kontakt Bringen des Gemischs eines Metallsalzes einer Fettsäure und eines Lösungsmittels mit dem Trägermaterial“ gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt bevorzugt bei einer Temperatur von 1 bis 80 °C, bevorzugter 5 bis 75 °C, weiter bevorzugt bei 15 bis 72 °C, ebenfalls bevorzugt bei 25 bis 70 °C, insbesondere bevorzugt bei 35 bis 65 °C und am meisten bevorzugt bei 45 bis 60 °C.

Weiter kann das „in Kontakt Bringen des Gemischs eines Metallsalzes einer Fettsäure und eines Lösungsmittels mit dem Trägermaterial“ gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens im Rahmen der vorliegenden Erfindung bei Normaldruck erfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann das Abtrennen des Trägermaterials gemäß Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens von dem Lösungsmittelgemisch auf jede Weise erfolgen, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Bevorzugt erfolgt das Abtrennen indem das Lösungsmittel bzw. das Lösungsmittelgemisch verdampft wird. Das Verdampfen erfolgt bevorzugt bei einer Temperatur von 50 bis 90 °C, bevorzugter von 60 bis 85 °C, weiter bevorzugt von 65 bis 75 °C.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Separationsmedium, das gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren, wie vorstehend definiert, hergestellt wurde.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Separationsmedium umfassend ein Trägermaterial, auf das mindestens eine Metallfettsäure aufgebracht ist.

Das „Aufbringen“ erfolgt im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch Adsorbieren der mindestens einen Metallfettsäure auf dem Trägermaterial. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die mindestens eine Metallfettsäure zusammen mit einem Lösungsmittel mit dem Trägermaterial in Kontakt gebracht wird (siehe hierzu auch vorstehende Ausführungen). Ebenfalls möglich ist auch ein Aufbringen der mindestens einen Metallfettsäure auf das Trägermaterial in Form eines Pulvers

oder einer Suspension. Unter dem Begriff „aufgebracht“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung somit verstanden, dass die mindestens eine Metallfettsäure auf dem Trägermaterial adsorbiert ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der mindestens einen aufgetragenen Metallfettsäure um Zinkfettsäure.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt die Verwendung eines Separationsmediums wie vorstehend definiert zum Aufreinigen und/oder Isolieren von Enzymen und/oder Proteinen.

Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zum Aufreinigen und/oder Isolieren von Enzymen und/oder Proteinen umfassend die Schritte

- i) In-Kontakt-Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit einem Separationsmedium wie vorstehend definiert;
- ii) Abtrennen des Separationsmediums.

Unter dem Begriff „in Kontakt Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem Separationsmedium“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede Art des in-Kontakt-Bringens verstanden, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Bevorzugt erfolgt das In-Kontakt-Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem

Separationsmedium durch Immersion des Separationsmediums in die Lösung. Es ist jedoch ebenfalls bevorzugt, wenn das In-Kontakt-Bringen erfolgt, indem die Lösung über eine Säule geleitet wird, in der das Separationsmedium enthalten ist. Möglich sind auch Kartuschen zum einmaligen Gebrauch.

Das „in Kontakt Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem Separationsmedium“ erfolgt im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt bei einer Temperatur von 1 bis 60 °C, bevorzugter 5 bis 55 °C, weiter bevorzugt bei 10 bis 50 °C, ebenfalls bevorzugt bei 15 bis 55 °C, insbesondere bevorzugt bei 20 bis 50 °C und am meisten bevorzugt bei 21 bis 35 °C. In speziellen Ausführungsformen, beispielsweise in dem Fall, dass Enzyme und/oder Proteine eingesetzt werden, die über eine geringere Stabilität verfügen und/oder leicht proteolytisch abgebaut werden, erfolgt das „in Kontakt Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem Separationsmedium“ bevorzugt bei einer Temperatur von 1 bis 25 °C, bevorzugter 2 bis 20 °C, weiter bevorzugt bei 3 bis 15 °C und am meisten bevorzugt bei 4 bis 10 °C.

Weiter kann das „in Kontakt Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem Separationsmedium“ im Rahmen der vorliegenden Erfindung bei Normaldruck oder bei einem Druck von 1,5 bis 50 bar, bevorzugt 2 bis 45 bar, weiter bevorzugt 3 bis 40 bar, ebenfalls bevorzugt bei 4 bis 35 bar. Ein gegenüber dem Normaldruck erhöhter Druckbereich ist beispielsweise von Vorteil, wenn das „in Kontakt Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit dem Separationsmedium“ in einer Säule durchgeführt wird.

Unter dem Begriff „Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym“ wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede Flüssigkeit verstanden, die mindestens ein Protein und/oder Enzym enthält. Geeignete Lösungen sind Lyophilisate von Bakterien, Schimmelpilzen und/oder Hefen bzw. mit Hilfe von Bakterien, Hefen und/oder Schimmelpilzen fermentierte Flüssigkeiten. Diese fermentierten Flüssigkeiten können mit oder ohne die Mikroorganismen eingesetzt werden, durch die sie fermentiert wurden. Zudem können die noch in der fermentierten Flüssigkeit enthaltenen Mikroorganismen vor dem In-Kontakt-Bringen der Lösung mit dem Separationsmedium lyophilisiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine und/oder Enzyme modifizierte Proteine und/oder Enzyme beispielsweise modifiziert durch das Hinzufügen von ein oder mehreren Histidiningruppen.

Bevorzugt enthält die Flüssigkeit einen Anteil an H₂O, der besonders bevorzugt bei 1 bis 99 Vol.-%, bevorzugter bei 2 bis 95 Vol.-%, weiter bevorzugt bei 5 bis 90 Vol.-%, insbesondere bei 10 bis 85 Vol.-%, bevorzugter bei 15 bis 80 Vol.-% und am meisten bevorzugt bei 20 bis 75 Vol.-% liegt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Flüssigkeit einen Anteil eines Puffers, bevorzugt eines MES-Puffers oder eines TRIS-Puffers. Weitere mögliche Puffer sind ausgewählt aus der Gruppe BIS-TRIS, PIPES, BES, MOPS, Phosphat Puffer, TES, HEPES und Tricin. Weitere mögliche Bestandteile sind Salze, wie beispielsweise NaCl. NaCl kann vorteilhaft in der Flüssigkeit eingesetzt werden um Wechselwirkungen unspezifischer Art (z.B. elektrostatische Wechselwirkungen) zu verringern. Geeignete Konzentrationen von NaCl sind 5 bis 500 mM, bevorzugt 50 bis 450 mM, bevorzugter 100 bis 400 mM,

insbesondere bevorzugt 150 bis 350 mM und am meisten bevorzugt 170 bis 320 mM, besonders bevorzugt in einem Anteil von 1 bis 99 Vol.-%, bevorzugter bei 2 bis 95 Vol.-%, weiter bevorzugt bei 5 bis 90 Vol.-%, insbesondere bei 10 bis 85 Vol.-%, bevorzugter bei 15 bis 80 Vol.-% und am meisten bevorzugt bei 20 bis 75 Vol.-%.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Lösung desweiteren einen oder mehrere Bestandteile ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Natriumchlorid, Glykol, Harnstoff.

Das Abtrennen des Separationsmediums gemäß Schritt ii) kann auf jede Art und Weise erfolgen, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Möglich ist beispielsweise ein Abfiltrieren des Separationsmediums.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren zum Aufreinigen und/oder Isolieren von Enzymen und/oder Proteinen desweiteren den Schritt

- iii) In-Kontakt-Bringen des Separationsmediums gemäß Schritt ii) mit mindestens einer Pufferlösung.

Als „Pufferlösung“ wird bevorzugt eine Lösung gewählt, die die Desorption der auf dem Separationsmedium adsorbierten Proteine und/oder Enzyme fördert. Besonders bevorzugt handelt es sich um eine Pufferlösung, die Phosphat und/oder Imidazol enthält. Die Anteile liegen in bevorzugten Ausführungsformen bei beispielsweise 50 bis 1000 mM, bevorzugt 75 bis 750 mM, bevorzugter 100 bis 500 mM und am meisten bevorzugt 150 bis 250 mM Imidazol und/oder 1 bis 250 mM Phosphat, bevorzugt 5 bis 200 mM, bevorzugter 10 bis 150 mM und am meisten bevorzugt

50 bis 100 mM. Besonders bevorzugt ist Natrium-Phosphat, das allein oder in Kombination mit Imidazol eingesetzt wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, wird das Separationsmedium in Schritt iii) des erfindungsgemäßen Verfahrens vor dem in-Kontakt-Bringen mit einer Pufferlösung, die die Desorption der auf dem Separationsmedium adsorbierten Proteine und/oder Enzyme fördert, mit mindestens einem Waschpuffer in Kontakt gebracht. Bei dem Waschpuffer handelt es sich bevorzugt um einen sauren oder basischen Waschpuffer. Bevorzugte saure Waschpuffer sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetatpuffern und Formiatpuffern, bevorzugte basische Waschpuffer sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus TRIS Puffer und CAPS Puffer.

Messmethoden und Verfahren*Bacillus stearothermophilus* Esterase (Bste)

Mittels rekombinanter *E. coli* wurde eine *Bacillus stearothermophilus* Esterase (Bste) gewonnen. Bste ist am C-Terminus mit einem His-Tag versehen und hat ein Molekulargewicht von etwa 31 kDa.

Zur Untersuchung der Bindung von Bste an die erfindungsgemäßen Materialien wurde lyophilisierter Überstand aus dem Zellaufschluss in demineralisiertem H₂O gelöst (2 mg/mL und mit dem Bindungspuffer (0,5 mL gelöstes Überstandslyophilisat und 0,5 mL Bindungspuffer) versetzt.

Beispiele und Figuren

Die nachfolgenden Beispiele und Figuren dienen der näheren Erläuterung der vorliegenden Erfindung und stellen lediglich mögliche Ausführungsformen dar. In keinster Weise wird der Umfang der vorliegenden Erfindung durch den Offenbarungsgehalt der Beispiele und Figuren beschränkt.

Es zeigt

Fig.1: die SDS-Gele der Überstände von Adsorptions-, Wasch- und Desorptionsschritt an Adsorbens 1

AD: Adsorption

W: Waschen in Adsorptionsspeicher

D1: Desorption mit 100 mM Imidazol

D2: Desorption mit 250 mM Imidazol

D3: Desorption mit 500 mM Imidazol

D4: Desorption mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, pH 8

Fig.2: einen Stufengradient in einer Stufe mit 250 mM Imidazol.

Fig.3: SDS-PAGE der Fraktionen aus dem Chromatogramm in Figur 2.

Fig.4: Stufengradient in einer Stufe mit 500 mM Imidazol

Fig.5: Stufengradient in zwei Stufen mit 250 mM Imidazol und 500 mM Imidazol

Fig.6: Stufengradient in drei Stufen mit 100 mM Imidazol, dann 250 mM Imidazol und 500 mM Imidazol

- Fig.7: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 4
- Fig.8: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 5
- Fig.9: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 6
- Fig.10: Stufengradient in einer Stufe mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8)
- Fig.11: Stufengradient in einer Stufe mit 500 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8)
- Fig.12: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 10
- Fig.13: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 11
- Fig.14: Stufengradient in einer Stufe mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8) (A)
- Fig.15: Stufengradient in einer Stufe mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8) (B)
- Fig.16: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 14
- Fig.17: Fraktionen aus dem Chromatogramm aus Figur 15

Beispiel 1: Beschichtung von Aluminiumoxid mit Zinkricinoleat und Zinkoleat

Die entsprechenden Mengen Zinkricinoleat (2g, 3g, 5g) wurden mit 30 ml Ethanol bei 60°C bis 70°C in einem 250ml Becherglas unter Rühren aufgelöst. Nach dem Auflösen des Zinkricinoleats wurden sofort 90g Aluminiumoxid 90 (Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben. Je nach Füllhöhe des Becherglases musste Ethanol zugegeben werden, damit das zu belegende Substrat vollständig von der Zinkricinoleat-Ethanol-Lösung umgeben war.

Bei 60°C bis 70°C wurde so lange weitergerührt, bis der überwiegende Teil des Ethanols verdampft und das Substrat fast trocken war. Noch vorhandenes Ethanol wurde anschließend bei 75°C im Trockenschrank verdampft. Die so erhaltenen Adsorbentien wurden zu Experimenten zur Auftrennung von Proteinen und Enzymen benutzt.

Analog lässt sich Aluminiumoxid mit weiteren Zinkfettsäuren beschichten, wie z. B. mit Zinkoleat (z. B. Adsorbens 2 in Beispiel 3)

Beispiel 2: Bindung von *Bacillus stearothermophilus* Esterase (Bste) aus Zellaufschluß an Adsorbens 1 (2 % ZnRi₂ aus Aluminiumoxid 90)

Bindung in Abhängigkeit von der Ionenstärke und dem pH-Wert

Zur Untersuchung der Bindung von Bste wurde lyophilisierter Überstand aus dem *E. coli*-Zellaufschluss in ddH₂O gelöst (2 mg/mL) und zusammen mit Bindungspuffer (0,5 mL gelöstes Lyophilisat und 0,5 mL Bindungspuffer MES oder TRIS) zu den

Materialien (100 mg) pipettiert und für 1 Stunde in einem Überkopfmischer bei ca. 0,5 rpm inkubiert.

Nach Abzentrifugation der Materialien wurde der Überstand einer SDS-PAGE unterzogen. Die Bindung wurde an mit Zinkricinoleat beschichteten und entsprechenden unbeschichteten Materialien untersucht:

Folgende Bindungspuffer wurden verwendet:

pH-Wert	Puffer (50 mM)	Ionenstärke (NaCl)
6	MES	0 mM / 500 mM / 1000 mM
7		
8	TRIS	
9		

Die Tabelle 1 gibt an, unter welchen Bedingungen möglichst viel Bste an die ZnRi₂ belegten Materialien gebunden wurde.

Dem gegenüber gestellt sind die Bedingungen, unter welchen eine möglichst geringe Bindung von Bste an die unbelegten Materialien erfolgte. Die schraffierten Felder der Tabelle 1 kennzeichnen die die anhand der SDS-PAGE als optimal eingeschätzten Bedingungen, unter welchen bei einer hohen Bste-Bindung an die ZnRi₂-Materialien zugleich eine niedrige Bindung von Bste an die unbeschichteten Materialien (wenig unspezifische Bindung) erfolgt.

Tabelle 1: Vergleich der Bste-Bindung an Adsorbens 1 und unbeschichtetes Al₂O₃ bei unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen.

	2 % ZnRi₂ auf Aluminiumoxid 90 (Adsorbens 1)			Aluminiumoxid 90 unbelegt		
	hohe Adsorption von Bste			wenig Adsorption von Bste		
	Ionenstärke (mM NaCl)			Ionenstärke (mM NaCl)		
pH	0	500	1000	0	500	1000
6	x	x			x	x
7				x	x	x
8				x	x	x
9				x	x	x

Im Fall von 2 % Zinkricinoleat auf Aluminiumoxid 90) wurde bei pH 7 und unter Zugabe von 500 mM NaCl bei möglichst hoher Bste-Adsorption eine möglichst geringe Adsorption der Bste an das unbeschichtete Material gefunden.

Beispiel 3: Elution von *Bacillus stearothermophilus* Esterase des Adsorbens aus Beispiel 2

Zur Untersuchung der Desorption wurden unterschiedliche Imidazolkonzentrationen (100 mM, 250 mM und 500 mM) mit pH-Werten zwischen 8 und 8,5 sowie ein IMAC-Elutionspuffer nach Sigma (HIS-Select® Elution Buffer H5413 mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl und 50 mM Na-Phosphat, pH 8) verwendet. Bei

Imidazol handelt es sich um die funktionelle Gruppe der Aminosäure Histidin. Imidazol konkurriert bei der Metallchelatchromatographie mit gebundenem Histidin um Metallbindungsplätze. Die Adsorption erfolgte wie unter Abschnitt vorstehend beschrieben. Im Anschluss an die Adsorption erfolgte ein Waschschrift im Bindungspuffer, daran anschließend die Desorption. Nach jeden Schritt wurde ein Aliquot für SDS-PAGE aufbewahrt. Figur 1 zeigt die SDS-Gele der Überstände von Adsorptions-, Wasch- und Desorptionsschritt.

Bei dem auf Aluminiumoxid basierten Material kann eine Zunahme der Desorption mit steigender Imidazolkonzentration beobachtet werden. Der IMAC-Elutionspuffer nach Sigma (250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, pH 8) zeigt hier den stärksten Effekt. Bei diesem Material erfolgte keine sichtbare Desorption von Host Cell Protein (HCP).

Beispiel 4: Bste-Isolierung mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung der erfindungsgemäßen Materialien aus Beispiel 1

Im Folgenden wurde die Isolierung von Bste im Säulenmodus untersucht. Das entsprechende Material wurde in eine 7,5 mm x 50 mm Omnifit-Quarzglassäule gefüllt und mit 50 mM MES-Puffer, pH 7 bzw. 50 mM MES-Puffer, pH 7 mit 500 mM NaCl bis zum Erreichen einer geraden Basislinie (UV-Detektor, 280 nm) equilibriert (ca. 20 mL Puffer). Nach der Equilibrierung erfolgte die Injektion der Probe. Es wurden unterschiedliche Elutionsgradienten getestet. Die Durchlauf- und Elutionsfraktionen wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE untersucht.

Um den Einfluss der Konzentration an Zinkricinoleat auf dem Trägermaterial auf die Aufreinigung des Enzyms unter diesen Bedingungen zu testen, wurden das Aluminiumoxid gemäß Beispiel 1 mit 2,5 und 10 Gew.-% ZnRi belegt. Außerdem wurde noch mit 10 % Zinkoleat belegtes Aluminiumoxid untersucht.

Material Adsorbens 1 (2 % Zinkricinoleat auf Aluminiumoxid 90)

Beim folgenden Versuch wurden je 500 mg des Adsorbens 211800801 eingesetzt. Die Bindung erfolgte in 50 mM MES-Puffer mit 500 mM NaCl bei pH 7. Es wurde ein Probenvolumen von 1500 µL (2 mg/mL) injiziert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Elution wurde mittels Stufengradient mit 250 mM Imidazol mit 300 mM NaCl in 50 mM Na-Phosphat bei pH 8 durchgeführt.

Abbildung 2 zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines unter den genannten Bedingungen durchgeführten FPLC-Durchlaufes. Die Fraktionen 4-6 und 13-15 wurden aufgefangen und einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel ist in Abbildung 3 dargestellt.

Diese ersten Versuche zeigen, dass eine präparative chromatographische Isolierung von Bste mit diesem Material prinzipiell möglich ist.

Adsorbens 2 (10 % Zinkoleat auf Aluminiumoxid 90)

Bei den folgenden Versuchen wurden je 500 mg des Adsorbens 2 eingesetzt. Die Bindung erfolgte in 50 mM MES-Puffer (pH 7). Es wurde je ein Probenvolumen von 1500 µL (2 mg/mL) injiziert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Es wurden unterschiedliche Stufengradienten zur Elution untersucht. Die Chromatogramme sind in Abbildung 4-6 gezeigt. Abbildung 7-9 zeigen die SDS-Gele der aufgefangenen Fraktionen.

Unabhängig vom eingesetzten Stufengradient kann jeweils in der ersten Elutionsfraktion eine relativ hohe Reinheit der Bste erreicht werden. Auch dieses Material zeigt eine prinzipielle Eignung für die chromatographische Aufreinigung von Bste.

Adsorbens 3 (5 % Zinkrizinoleat auf Aluminiumoxid 90)

Bei den folgenden Versuchen wurden je 1000 mg des Adsorbens 02070940 eingesetzt. Die Bindung erfolgte in 50 mM MES-Puffer mit 500 mM NaCl (pH 7). Es wurde je ein Probevolumen von 1000 µL (2 mg/mL) injiziert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Elution wurde mittels Stufengradient mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8) durchgeführt. Abbildung 10 und 11 zeigen Chromatogramme zweier FPLC-Durchläufe (Elution mit 250 mM bzw. 500 mM Imidazol im Elutionspuffer). Die Fraktionen 4+5 und 9-13 bzw. 14 wurden aufgefangen und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Gele sind in Abbildung 12 und 13 dargestellt.

Die Elutionsfraktionen weisen im Fall dieses Materials eine relativ hohe Reinheit auf. Die Belegung mit 5 % Zinkrizinoleat scheint über eine relativ hohe His-tag-spezifische Adsorptionskapazität zu verfügen, so dass dieses Material besonders für eine Isolierung der Bste geeignet ist.

Adsorbens 4(10 % Zinkrizinoleat auf Aluminiumoxid 90)

Bei den folgenden Versuchen wurden je 1000 mg (A) bzw. 2000 mg (B) des Adsorbens 4 eingesetzt. Die Bindung erfolgte in 50 mM MES mit 500 mM NaCl (pH 7). Es wurde je ein Probevolumen von 1000 µL (4 mg/mL) injiziert. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die Elution wurde mittels Stufengradient mit 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat (pH 8) durchgeführt. Abbildung 14 und 15 zeigen die Chromatogramme der durchgeführten FPLC-Durchläufe. Die Fraktionen wurden aufgefangen und mittels SDS-

PAGE untersucht. Die SDS-Gele sind in Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

Auch dieses Material weist eine prinzipielle Eignung zur Bste-Aufreinigung auf. Anhand der SDS-PAGE betrachtet scheint die Verwendung des Aluminuimoxid basierten Materials mit 5 % ZnRi_2 allerdings zu einer höherern Reinheit der eluierten Bste-Fraktionen zu führen. Eine höhere Ligandendichte kann sterische Behinderungen auf der Oberfläche zur Folge zu haben, was sich negativ auf die spezifische Adsorptionskapazität auswirken kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Separationsmediums umfassend die Schritte
 - a) In-Kontakt-Bringen mindestens eines Metallsalzes einer Fettsäure mit einem organischen Lösungsmittel;
 - b) In-Kontakt-Bringen des Gemischs gemäß Schritt a) mit mindestens einem Trägermaterial;
 - c) Abtrennen des Trägermaterials.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem mindestens einen Metallsalz um ein Zink oder Eisensalz einer Fettsäure handelt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei dem organischen Lösungsmittel um Ethanol, Aceton, Cyclohexanon, iso-Octan, Cyclohepanon oder deren Mischungen handelt.
4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Trägermaterial ausgewählt ist aus anorganischen Metalloxiden, Kieselgel, Cellulose, Dextran, und deren Mischungen.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Abtrennen gemäß Schritt c) durch Verdampfen des Lösungsmittels erfolgt.
6. Separationsmedium umfassend ein Trägermaterial auf das mindestens eine Metallfettsäure aufgebracht ist.

7. Separationsmedium gemäß Anspruch 6, wobei es sich bei der Metallfettsäure um Zinkfettsäure handelt.
8. Verwendung eines Separationsmediums wie in einem der Ansprüche 6 oder 7 definiert zum Auftrennen und/oder Isolieren von Enzymen und/oder Proteinen.
9. Verfahren zum Auftrennen und/oder Isolieren von Enzymen und/oder Proteinen umfassend die Schritte
 - i) In-Kontakt-Bringen einer Lösung enthaltend mindestens ein Protein und/oder Enzym mit einem Separationsmedium wie in einem der Ansprüche 6 oder 7 definiert;
 - ii) Abtrennen des Separationsmediums;
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Lösung mindestens einen weiteren Bestandteil ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Natriumchlorid, Harnstoff und Glykol enthält.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, weiter umfassend den Schritt
 - iii) In-Kontakt-Bringen des Separationsmediums gemäß Schritt ii) mit einer Pufferlösung.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei die Pufferlösung mindestens einen Bestandteil ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Imidazol, Phosphat, NaCl enthält.

1 / 17

Fig. 1

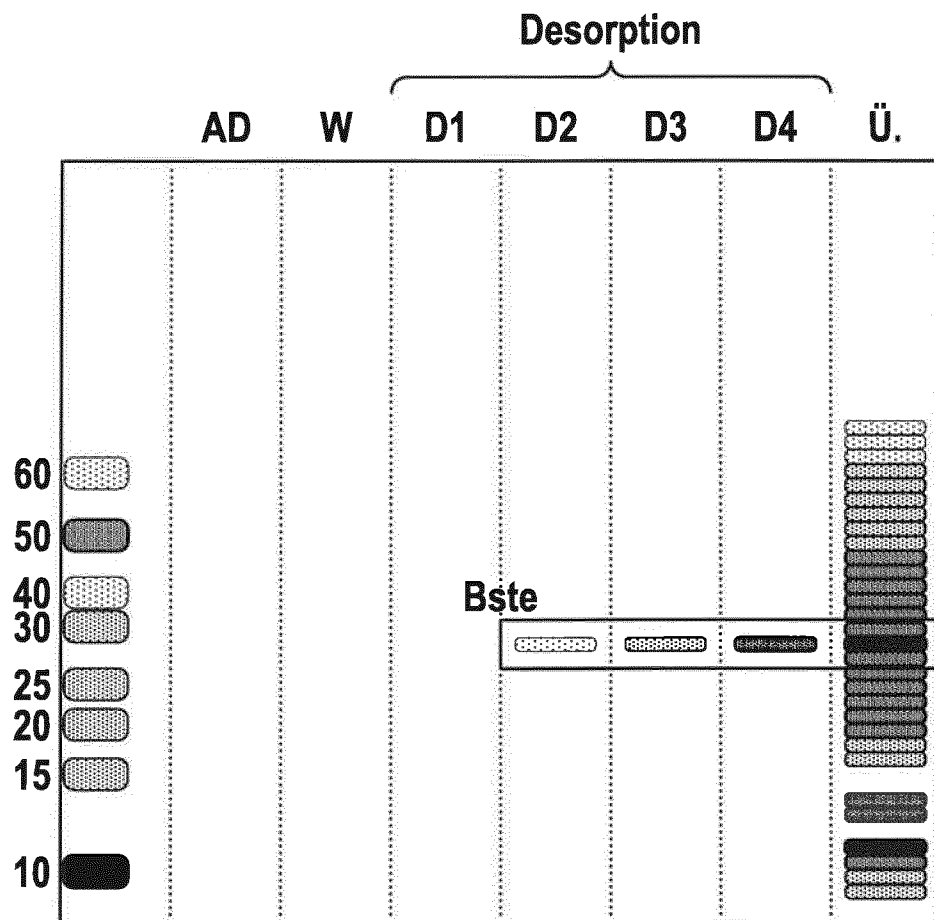


Fig. 2

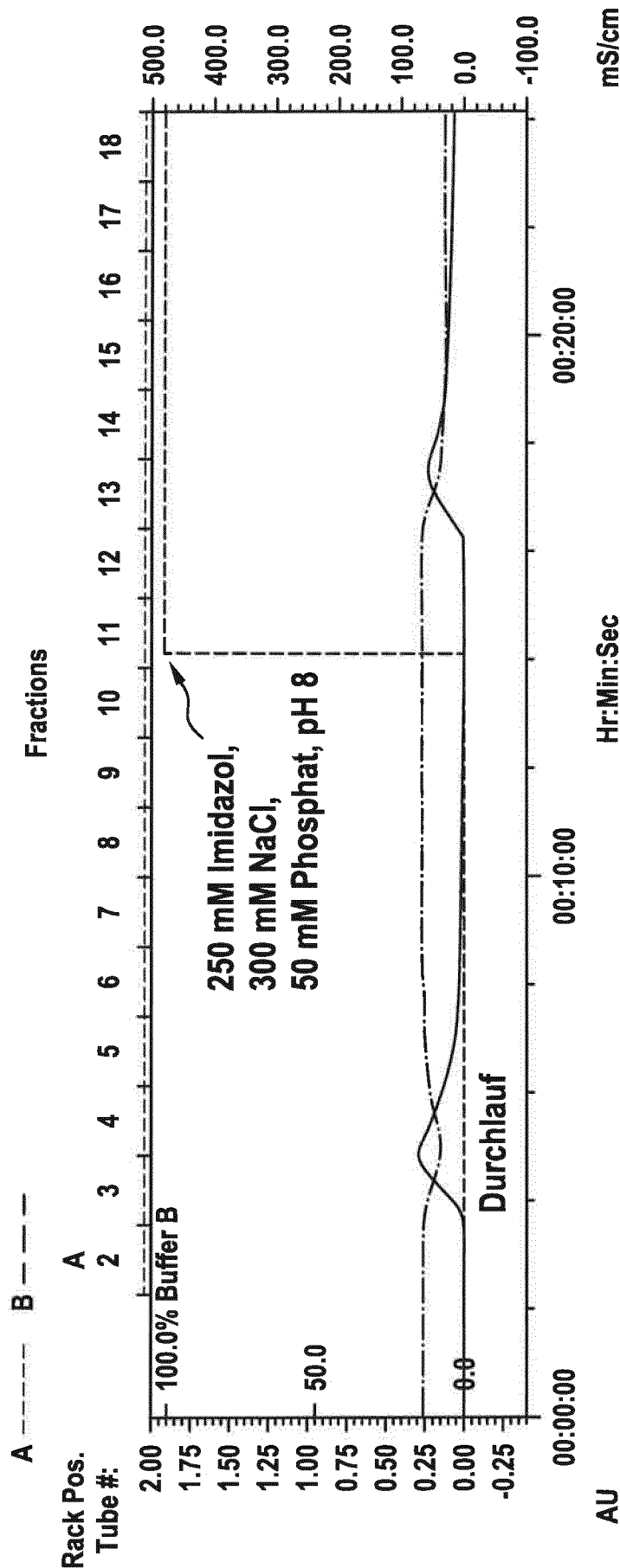


Fig. 3

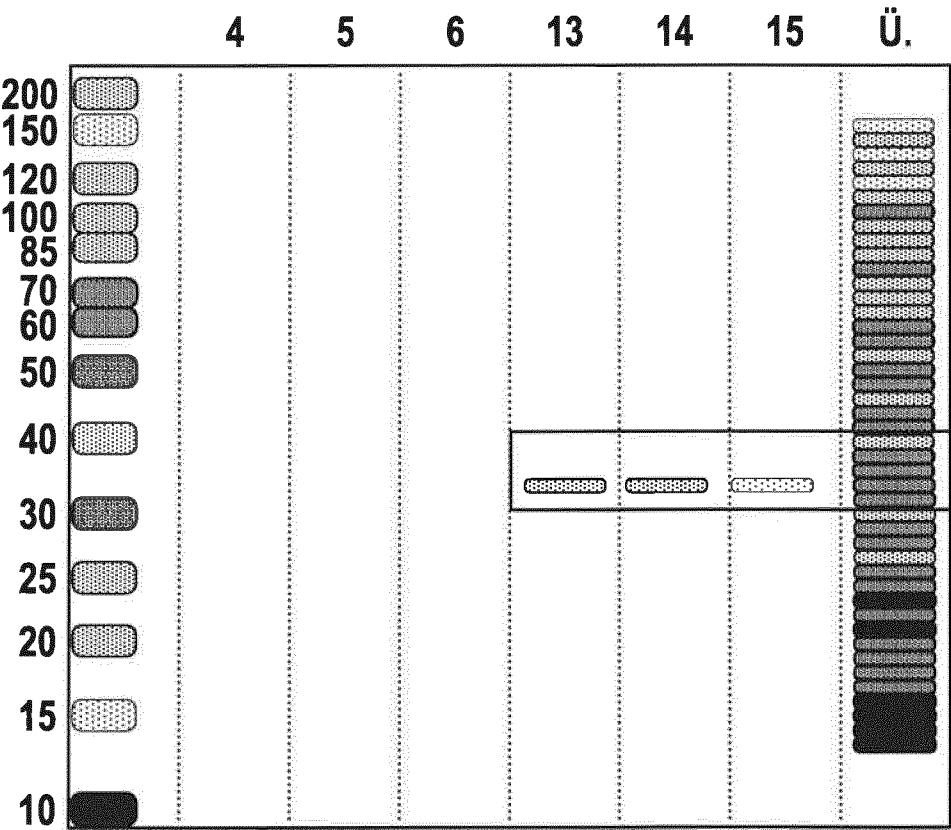


Fig. 4

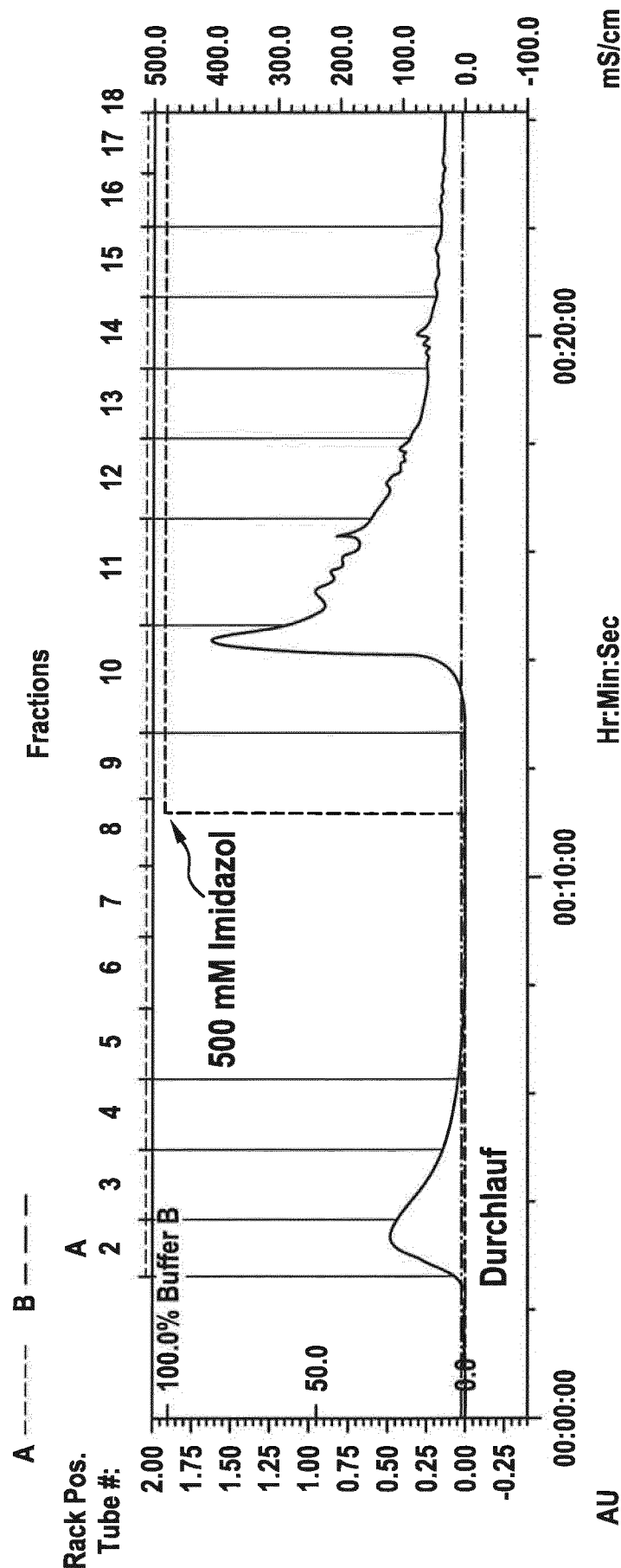


Fig. 5

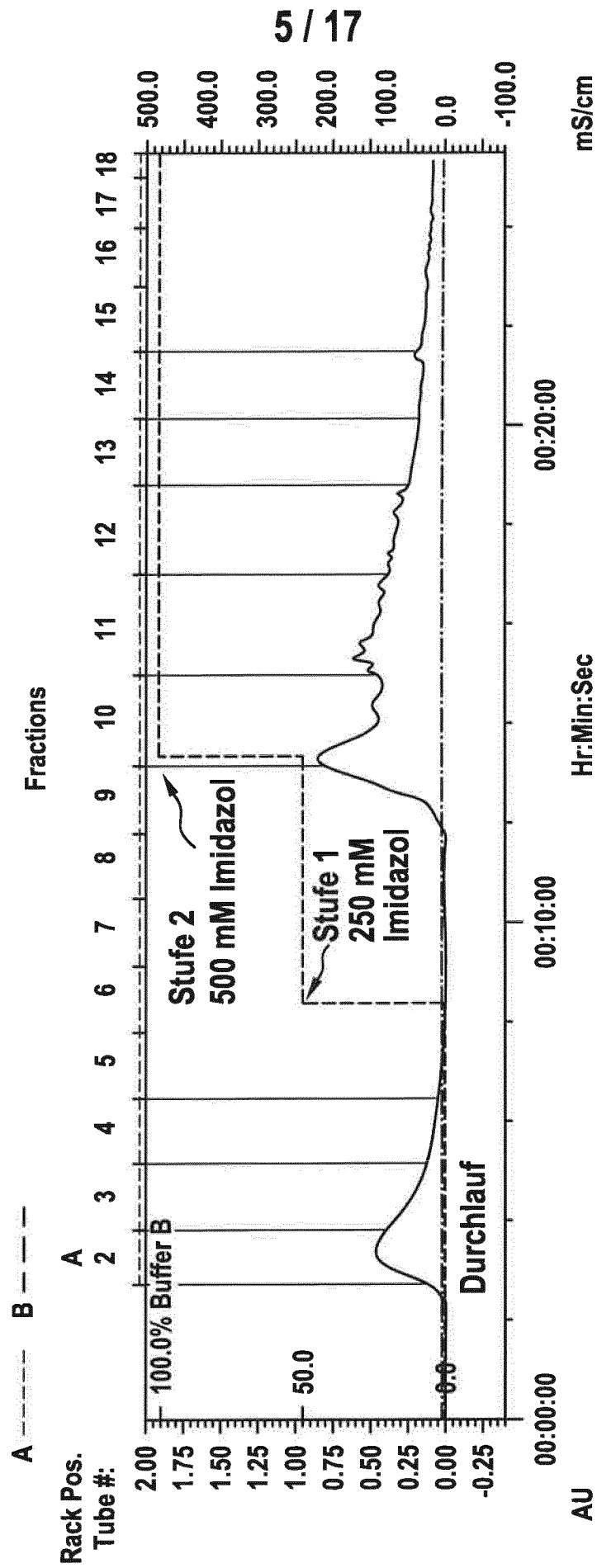
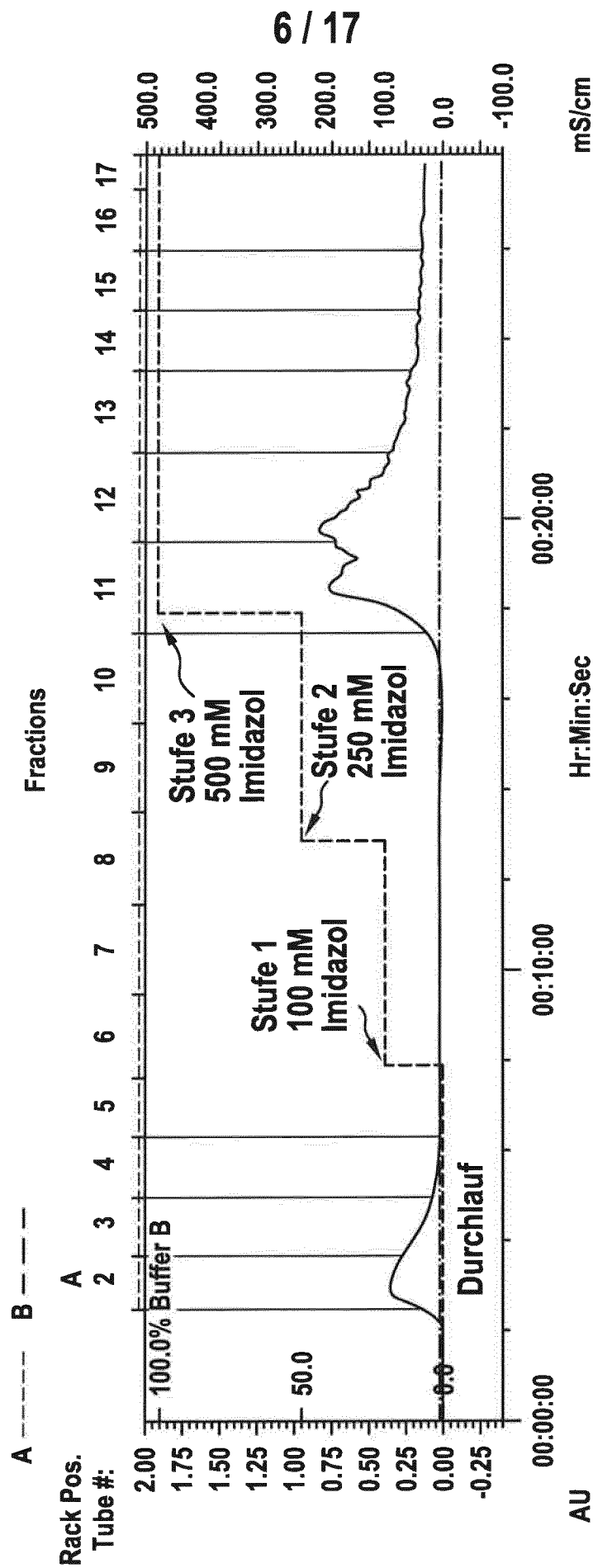
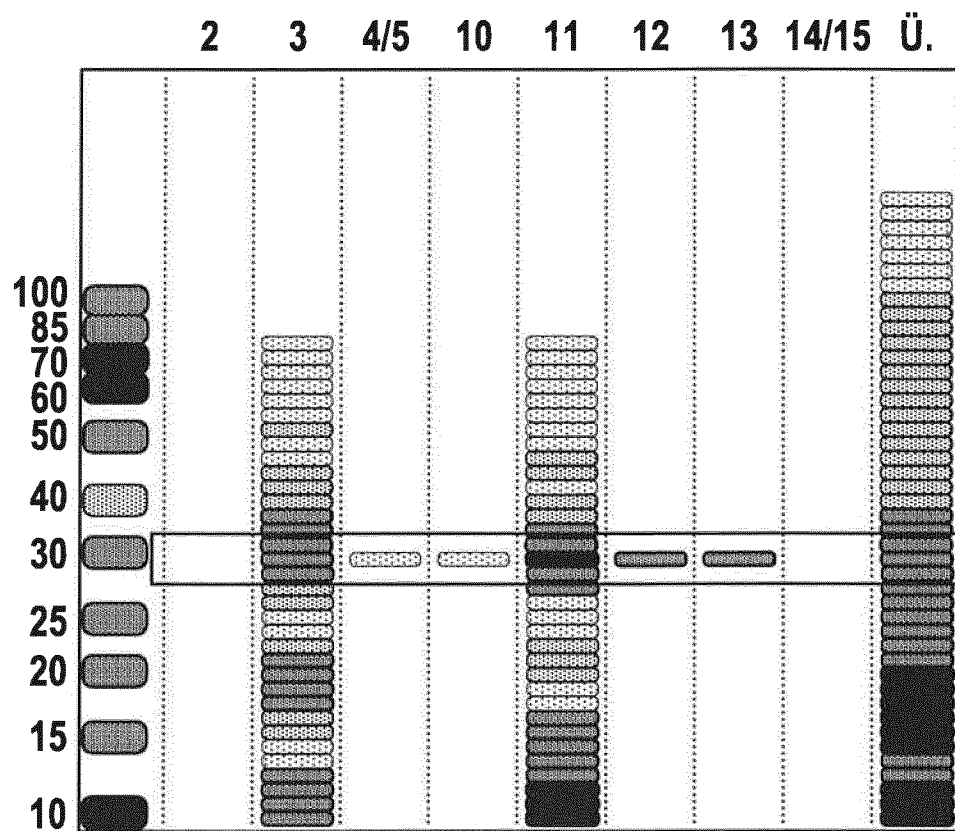


Fig. 6



7 / 17

Fig. 7



8 / 17

Fig. 8

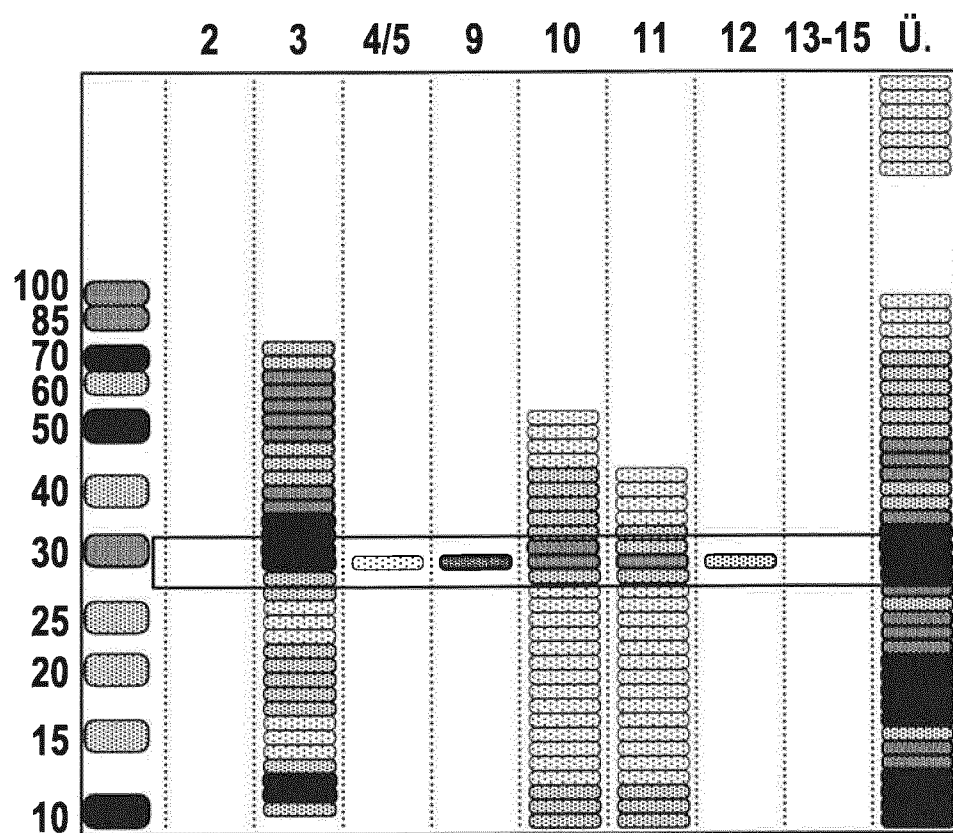


Fig. 9

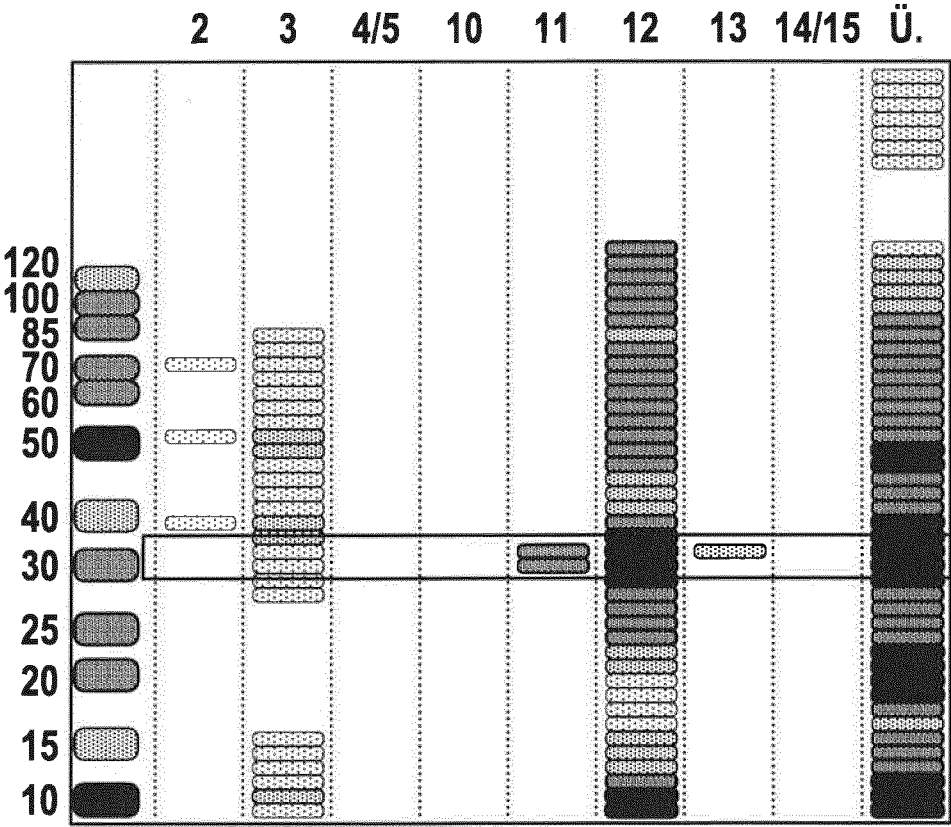


Fig. 10

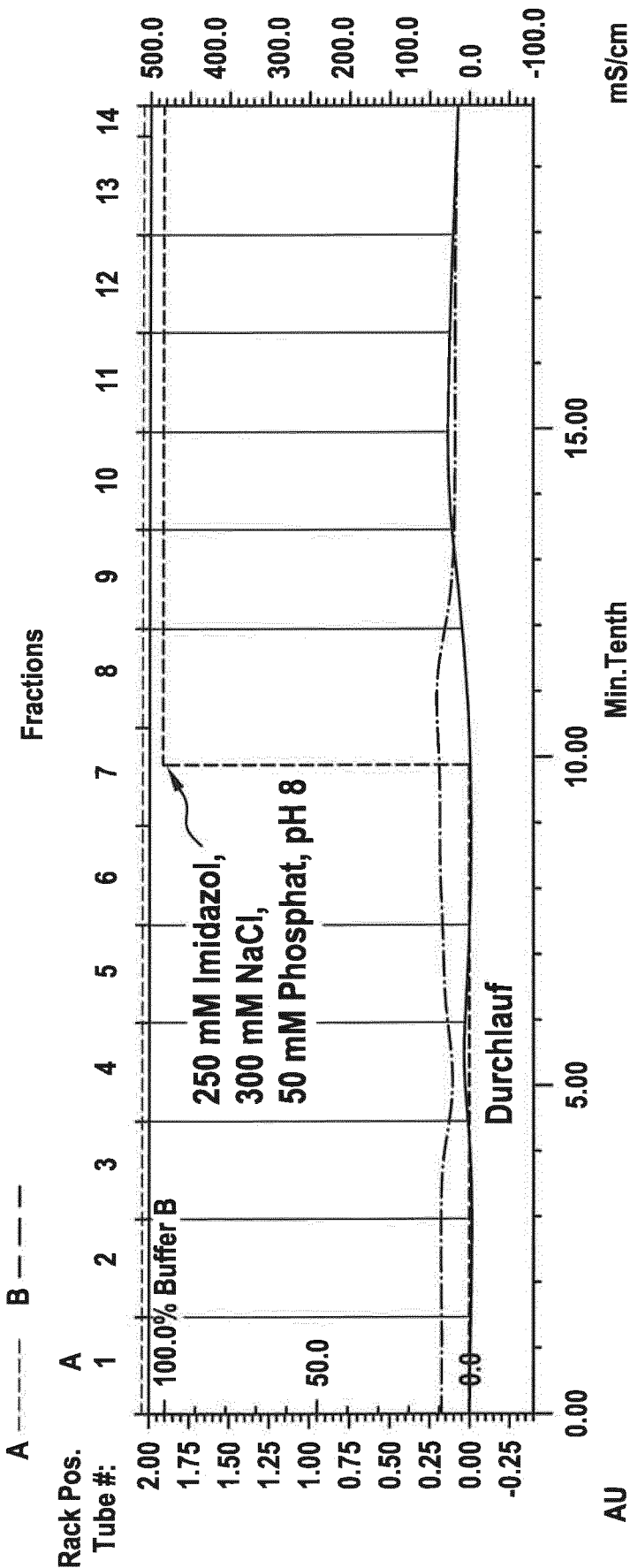
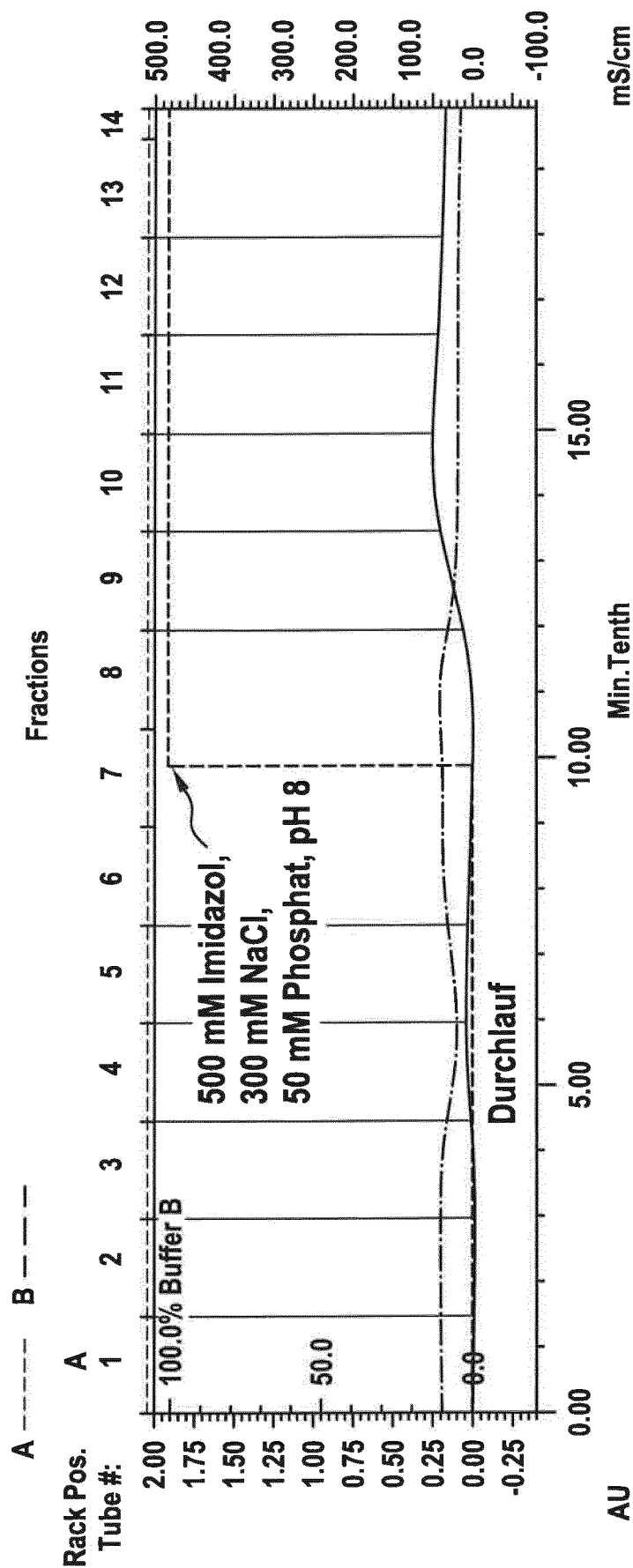


Fig. 11



12 / 17

Fig. 12

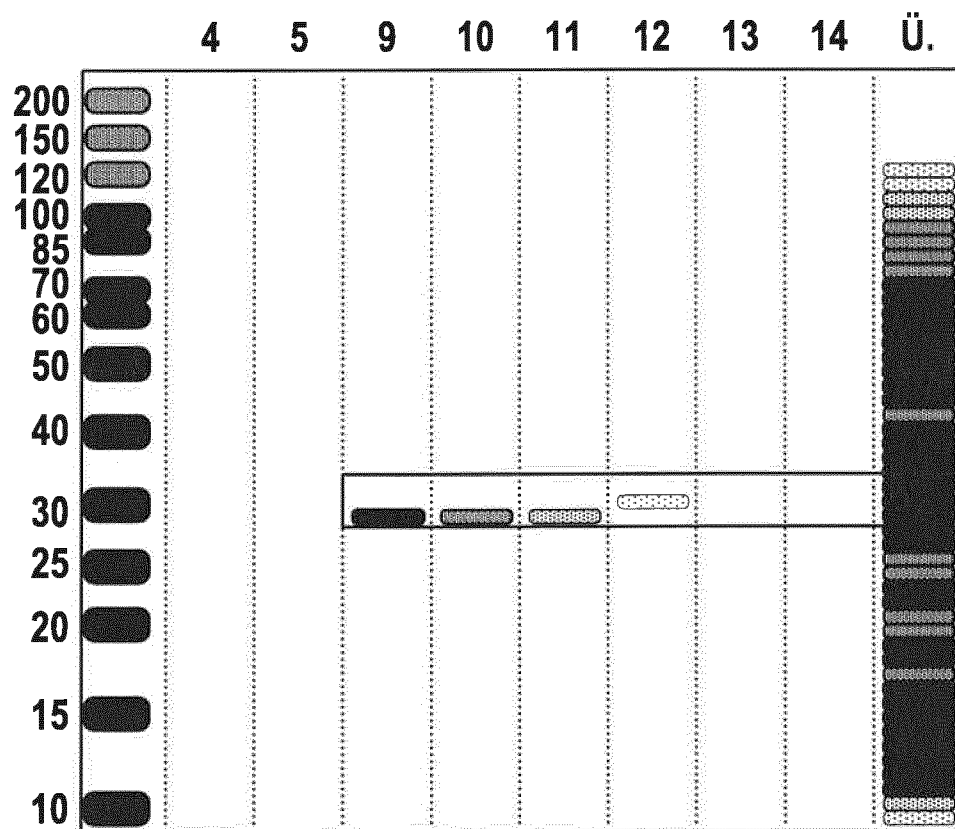


Fig. 13

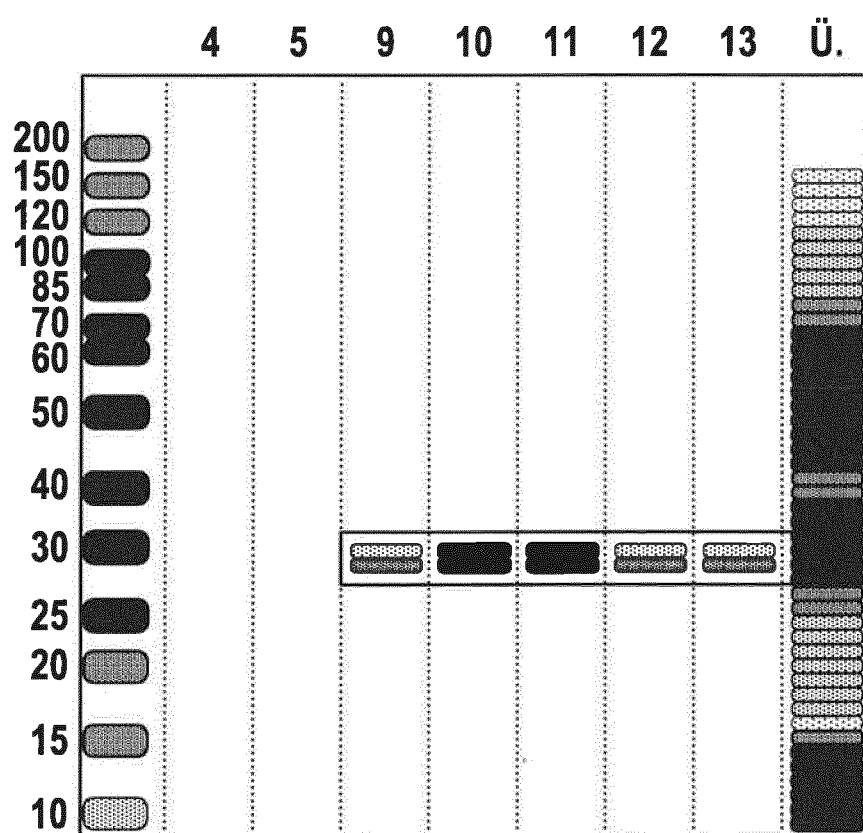


Fig. 14

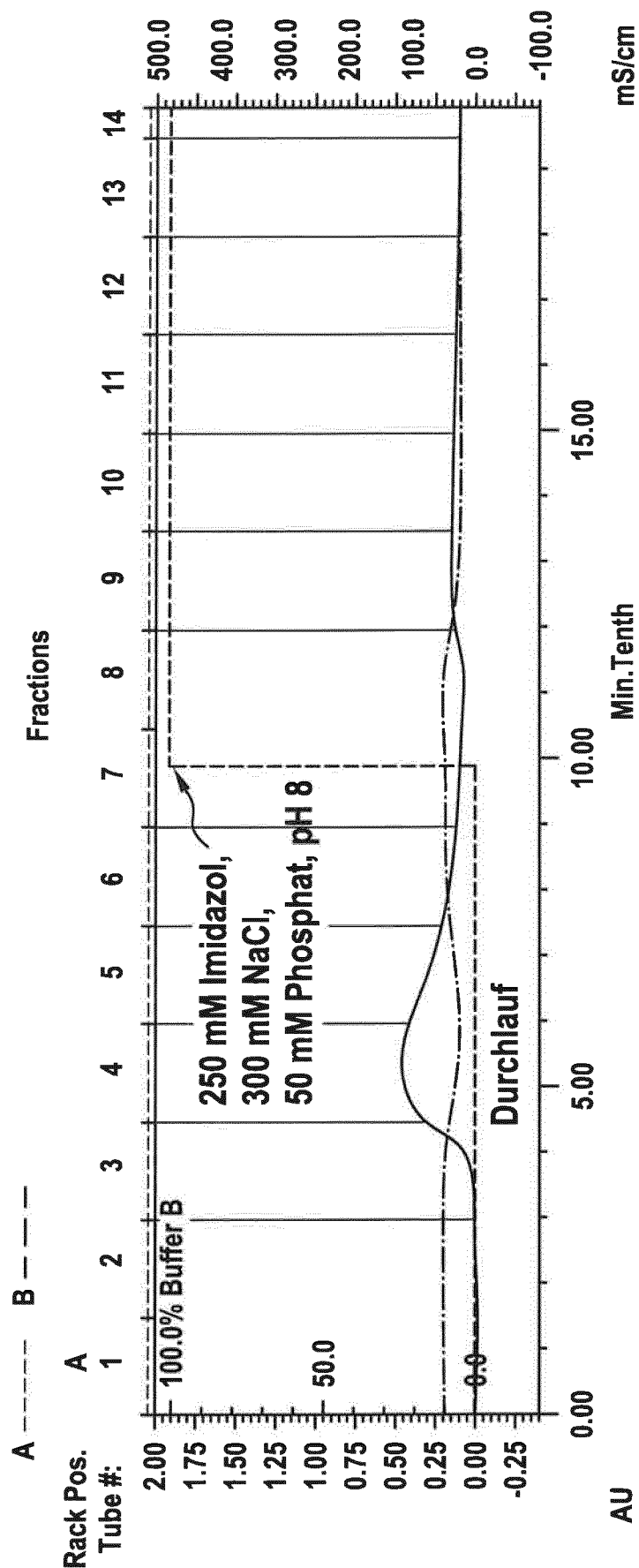
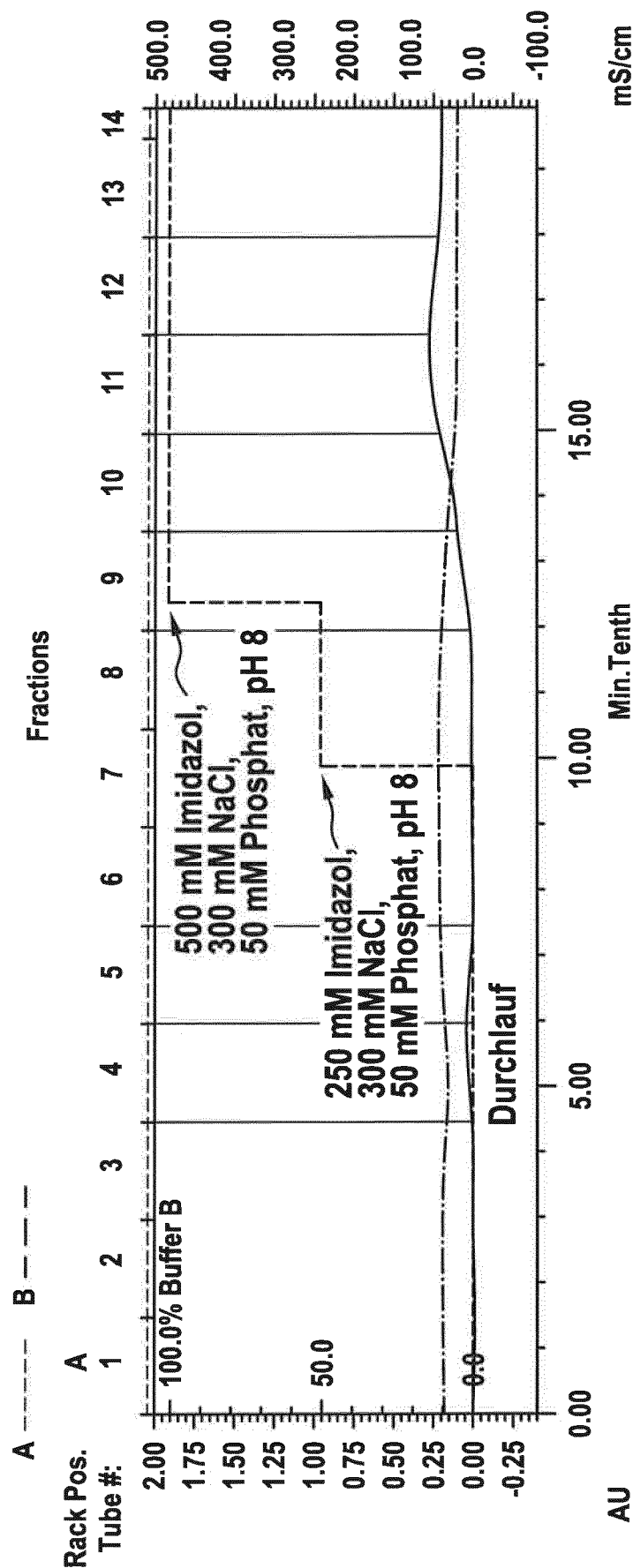
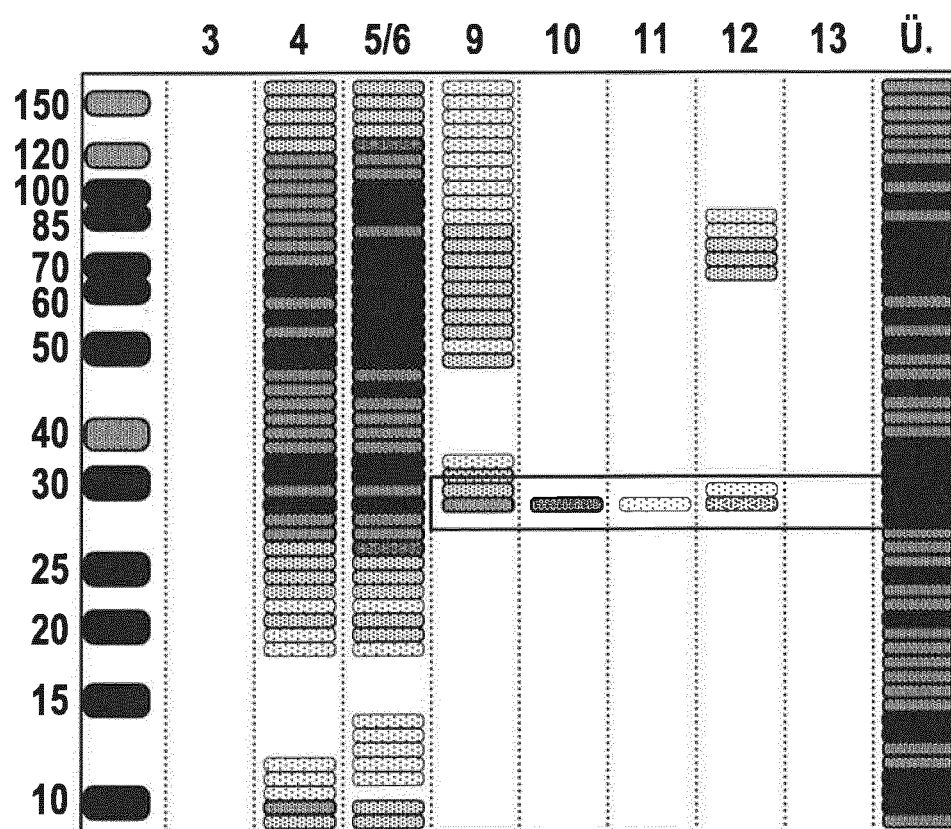


Fig. 15



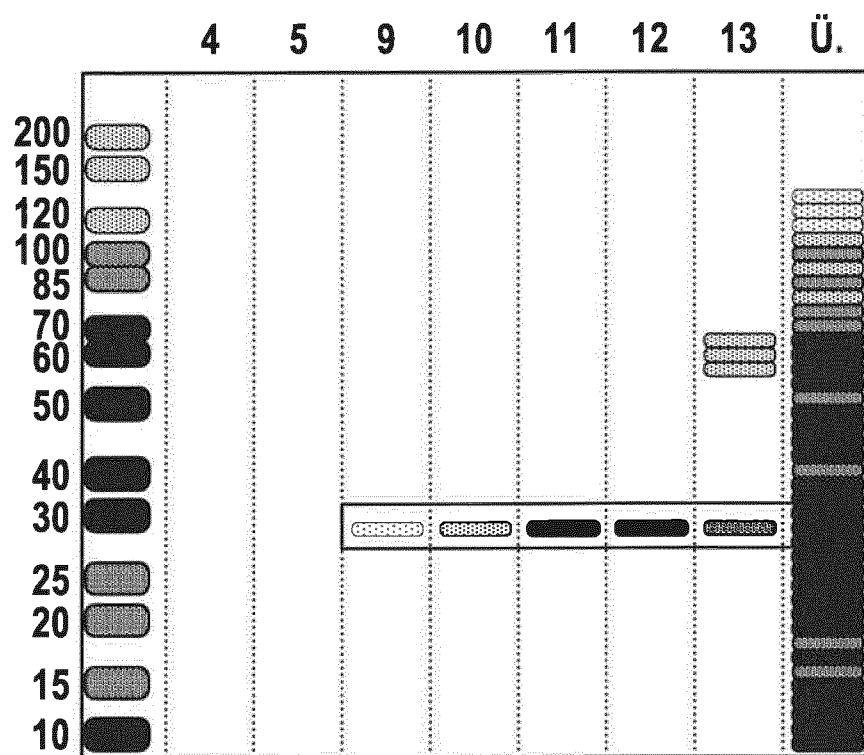
16 / 17

Fig. 16



17 / 17

Fig. 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/059260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. B01J20/08 B01J20/10 B01J20/286 B01J20/284 B01J20/28
B01J20/32 B01J20/22 B01D15/08

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01J B01D

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89/11493 A1 (CASCO NOBEL AB [SE]) 30 November 1989 (1989-11-30)	1,6,8
A	abstract page 7; example 3 -----	2-5
X	EP 1 413 882 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]) 28 April 2004 (2004-04-28)	6
Y	abstract	9-12
A	column 2, paragraph 0007 - paragraph 0008 column 11; example 4 -----	1-5
Y	DE 41 30 475 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]) 18 March 1993 (1993-03-18)	9-12
A	abstract page 7 - page 8; example 7 ----- -/-	8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 2012

Date of mailing of the international search report

29/08/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Klemps, Christian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/059260

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAN H ET AL: "Effect of stearic acid, zinc stearate coating on the properties of synthetic hydromagnesite", APPLIED SURFACE SCIENCE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 257, no. 7, 15 January 2011 (2011-01-15), pages 2677-2682, XP027585415, ISSN: 0169-4332 [retrieved on 2010-10-16] abstract Abschnitt: "2. Experimental"; page 2677 - page 2678 -----	6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/059260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8911493	A1	30-11-1989	SE 461149 B 15-01-1990 WO 8911493 A1 30-11-1989
EP 1413882	A1	28-04-2004	EP 1413882 A1 28-04-2004 JP 2004138575 A 13-05-2004 US 2004144715 A1 29-07-2004
DE 4130475	A1	18-03-1993	CA 2078094 A1 14-03-1993 DE 4130475 A1 18-03-1993 EP 0537461 A1 21-04-1993 JP 3174637 B2 11-06-2001 JP 5203636 A 10-08-1993 US 6074555 A 13-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/059260

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. B01J20/08 B01J20/10 B01J20/286 B01J20/284 B01J20/28 B01J20/32 B01J20/22 B01D15/08 ADD. Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC																													
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) B01J B01D Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data																													
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN <table border="1"> <thead> <tr> <th>Kategorie*</th> <th>Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile</th> <th>Betr. Anspruch Nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 89/11493 A1 (CASCO NOBEL AB [SE]) 30. November 1989 (1989-11-30)</td> <td>1,6,8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Zusammenfassung Seite 7; Beispiel 3 -----</td> <td>2-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>EP 1 413 882 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]) 28. April 2004 (2004-04-28)</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Zusammenfassung</td> <td>9-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Spalte 2, Absatz 0007 - Absatz 0008 Spalte 11; Beispiel 4 -----</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DE 41 30 475 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]) 18. März 1993 (1993-03-18)</td> <td>9-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Zusammenfassung Seite 7 - Seite 8; Beispiel 7 -----</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td></td> <td>-/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	X	WO 89/11493 A1 (CASCO NOBEL AB [SE]) 30. November 1989 (1989-11-30)	1,6,8	A	Zusammenfassung Seite 7; Beispiel 3 -----	2-5	X	EP 1 413 882 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]) 28. April 2004 (2004-04-28)	6	Y	Zusammenfassung	9-12	A	Spalte 2, Absatz 0007 - Absatz 0008 Spalte 11; Beispiel 4 -----	1-5	Y	DE 41 30 475 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]) 18. März 1993 (1993-03-18)	9-12	A	Zusammenfassung Seite 7 - Seite 8; Beispiel 7 -----	8		-/-	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.																											
X	WO 89/11493 A1 (CASCO NOBEL AB [SE]) 30. November 1989 (1989-11-30)	1,6,8																											
A	Zusammenfassung Seite 7; Beispiel 3 -----	2-5																											
X	EP 1 413 882 A1 (SHINWA KAKO KK [JP]) 28. April 2004 (2004-04-28)	6																											
Y	Zusammenfassung	9-12																											
A	Spalte 2, Absatz 0007 - Absatz 0008 Spalte 11; Beispiel 4 -----	1-5																											
Y	DE 41 30 475 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]) 18. März 1993 (1993-03-18)	9-12																											
A	Zusammenfassung Seite 7 - Seite 8; Beispiel 7 -----	8																											
	-/-																												
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie																													
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist																													
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 20. August 2012		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 29/08/2012																											
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Klemps, Christian																											

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAN H ET AL: "Effect of stearic acid, zinc stearate coating on the properties of synthetic hydromagnesite", APPLIED SURFACE SCIENCE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 257, Nr. 7, 15. Januar 2011 (2011-01-15), Seiten 2677-2682, XP027585415, ISSN: 0169-4332 [gefunden am 2010-10-16] Zusammenfassung Abschnitt: "2. Experimental"; Seite 2677 - Seite 2678 -----	6,7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/059260

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8911493	A1	30-11-1989	SE 461149 B 15-01-1990
		WO 8911493 A1	30-11-1989
EP 1413882	A1	28-04-2004	EP 1413882 A1 28-04-2004
		JP 2004138575 A	13-05-2004
		US 2004144715 A1	29-07-2004
DE 4130475	A1	18-03-1993	CA 2078094 A1 14-03-1993
		DE 4130475 A1	18-03-1993
		EP 0537461 A1	21-04-1993
		JP 3174637 B2	11-06-2001
		JP 5203636 A	10-08-1993
		US 6074555 A	13-06-2000