



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH** **706 332 A1**

(51) Int. Cl.: **B01J** **20/286** (2006.01)
G01N **30/02** (2006.01)
C07K **1/20** (2006.01)

Patentanmeldung für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 00439/12

(22) Anmeldedatum: 28.03.2012

(43) Anmeldung veröffentlicht: 30.09.2013

(71) Anmelder:
Zeochem AG, Seestrasse 108
8707 Uetikon am See (CH)

(72) Erfinder:
Mandy Erdmann, 8730 Uznach (CH)
Nicola Forrer, 8182 Glattpark (Opfikon) (CH)
David Gétaz, 1867 Olon (CH)
Massimo Morbidelli, 8046 Zürich (CH)
Susanna Bernardi, 62018 Potenza Picena (Macerata) (IT)
Rushd Khalaf, 8052 Zürich (CH)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co. AG Patent- und Markenanwälte VSP,
Vorderberg 11
8044 Zürich (CH)

(54) **Dotierte Materialien für die Umkehrphasen-Chromatographie.**

(57) Ein Material für die Umkehrphasen-Chromatographie umfasst oberflächenmodifizierende apolare und geladene Gruppen, die an einen festen Träger gebunden sind, wobei die geladenen Gruppen in Mengen von etwa 0.25 bis etwa 22 % bezogen auf die oberflächenmodifizierenden Gruppen vorhanden sind, oder in Mengen von etwa 0.01 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bis 0.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bezogen auf die Oberfläche des festen Trägers für ein Material mit einer Gesamtmenge an oberflächenmodifizierenden Gruppen von 3.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Ein solches Material und geeignete Reinigungsbedingungen für aktive pharmazeutische Inhaltsstoffe (APIs), wie Peptide, kann evaluiert werden mittels

- (a) Bestimmen des Isoelektrischen Punktes (pI) des interessierenden API,
- (b) Auswählen eines pH in einem Bereich, in dem das Material der festen Phase stabil ist,
- (c) Bestimmen der Differenz pI-pH und
- (d) falls die Differenz pI-pH positiv ist, auswählen eines Anionentauscher(AIEX)-Materials, oder, falls die Differenz pI-pH negativ ist, auswählen eines Kationentauscher(CIEX)-Materials.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Reinigung aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoffe, wie Peptiden, mittels Chromatographie, insbesondere Kieselgel basierte Materialien für die Umkehrphasen-Chromatographie.

Technologischer Hintergrund

[0002] Umkehrphasen-Chromatographie ist ein breit verwendetes Reinigungsverfahren für Peptide. Verschiedene Materialien zur Verwendung als stationäre Phasen der Flüssig-Chromatographie umfassen eine Unterlage oder einen Träger und daran angebracht funktionelle Gruppen. Ein solches Material ist auch bekannt als gebundene Phase. Ein üblicherweise verwendeter Träger ist Kieselgel, das mittels geeigneter Silane auf geeignete Weise oberflächenmodifiziert werden kann. Die Chemie von Silanen mit verschiedenen Oberflächen ist gut studiert. Eine allgemeine Diskussion der Reaktion von Silanen mit der Oberfläche von kieselensäurehaltigen Chromatographie-Trägermaterialien ist zu finden in HPLC Columns: Theory Technology, and Practice, U. D. Neue, Wiley-VCH, Inc., New York (1997). Weitere Details zur Reaktion von Silanen mit porösen Kieselensäuren sind offenbart in Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface, E. F. Vansant, et al., Elsevier Science B.V. New York (1995). Eine breite Beschreibung der Reaktionen von Silanen mit einer Vielzahl von Materialien findet sich in Silica Gel and Bonded Phases, Their Production, Properties and Use in LC, R. P. W. Scott, John Wiley & Sons, New York (1993).

[0003] Die Herstellung gebundener Phasen kann erfolgen unter Verwendung monofunktionaler, bifunktionaler und trifunktionaler Silane, was zu unterschiedlich stark gebundener Schichten führt.

[0004] Unabhängig davon, ob mono- bi- oder trifunktionelle Silane verwendet werden, ist es aufgrund von Gleichgewichtsreaktionen und sterischer Hinderung nicht möglich alle Silanolgruppen mit dem Silylierungsreagens zu reagieren. Es wird berichtet, dass selbst mit den aggressivsten Silanisierungsreaktionen nicht mehr als 50% der Silanol-Gruppen in ihre silylierten Derivate übergeführt werden können.

[0005] Aufgrund von Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit bei der Herstellung gebundener Phasen unter Verwendung bi- und trifunktionaler Silane, gründen die meisten kommerziell erhältlichen gebundenen Phasen auf monofunktionalen Silanen.

[0006] Da ein signifikanter Anteil der ursprünglichen Silanolgruppen zurück bleibt, können diese mit silanophilen Analyten reagieren, es sei denn diese werden abgeschirmt. Ein allgemein verwendetes Verfahren um diese Interaktionen zu vermindern ist das sogenannte «End-Capping». Dabei wird ein kleines monofunktionelles Silan (z.B. Trimethylchloresilan) mit der Kieselgel-Oberfläche reagiert um eine zusätzliche Bedeckung der Kieselgel-Oberfläche bereitzustellen.

[0007] US 7 125 488 B2 lehrt, die bisher bestehenden Probleme durch Bereitstellung eines polar modifizierten Stationären-Phase-Materials zu lösen, wobei dieses Material einen anorganischen Träger, wie Kieselgel, aufweist, der mit einem speziellen Silan, welches eine polare Modifikation bereitstellt, modifiziert ist. Die polare Modifikation umfasst Gruppen, wie -O-, -C(O)NH-, -OC(O)NH-, and -(CH₂CH₂O)_n.

[0008] Kürzlich wurde stark auf die Entwicklung stationärer Phasen mit bimodalen chemischen Oberflächeneigenschaften fokussiert. Umkehrphasen/Ionentauscher (RP/IEX)-Mixed-Mode-Stationäre Phasen sind bekannt und versprechen grosse Vielseitigkeit und Leistungsfähigkeit für das Zurückhalten und Auftrennen einer Vielfalt geladener polarer Verbindungen, zusätzlich zu weniger polaren ionischen und nichtionischen Analyten. Gemäss der Anordnung funktioneller Gruppen, können RP/IEX bimodale Säulen in vier Gruppen eingeteilt werden. Ein Materialtyp ist eine Mischung von RP und IEX Perlen. Ein anderer Materialtyp umfasst apolare Gruppen und polare Gruppen, wie Amine und Carbonsäuren, die an der gleichen Perle befestigt sind, ein dritter Materialtyp umfasst apolare Ketten mit aufgesetzten polaren Gruppen und ein vierter Typ von Mixed-Mode-Materialien umfasst eine anionisch oder kationisch geladene Gruppe, eingebettet in eine apolare Kette. Ebenfalls bereits bekannt sind trimodale Säulen, die auf Nanopolymer-Siliziumoxid-Hybridtechnologie gründen. Solche Säulen umfassen Acclaim® Trinity™ P1 von Dionex. Dieses Material besteht aus hochreinem, porösem, sphärischem Kieselgel, beschichtet mit geladenen Nanopolymer-Teilchen (z.B. derart, dass es eine Kationenaustausch-Funktionalität aufweist), und mit inneren Porenbereichen des Kieselgels, die mit einer organischen Schicht modifiziert sind, die RP und IEX Eigenschaften bereitstellt.

[0009] Andere Mixed-Mode-Materialien wurden entwickelt und sind unter dem Handelsnamen Kromasil™ (Akzo Nobel gehörend) beschrieben. Diese Ein-Teilchen-Mehrere Harze-Stationären-Phasen sind beschrieben als 50 % oder 25 % einer anderen Funktionalität, wie einer polaren Funktionalität (CN, NH₂, Diol) enthaltend. Obschon diese Phasen in diversen Fällen bessere Trennung bewirken, sind sie für eine Vielzahl von Anwendungen immer noch nicht zufriedenstellend.

[0010] Da die Materialien des Stands der Technik entweder hinsichtlich der Qualität der Auftrennung und/oder in Bezug auf die Retentionszeit und/oder – insbesondere, wenn sie für präparative Anwendungen gewünscht sind – in Bezug auf ihre Herstellungskosten, noch nicht zufriedenstellend sind, besteht immer noch ein Bedarf an verbesserten Materialien.

Darstellung der Erfindung

[0011] Ein allgemeiner Gegenstand der Erfindung ist deshalb, ein Material für die stationäre Phase in der Umkehrphasenchromatographie bereitzustellen, welches an die Reinigung oder Auftrennung spezifischer aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoffe (API) angepasst ist, insbesondere an die präparative Reinigung oder Auftrennung spezifischer API.

[0012] Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, welches es gestattet, geeignete Materialien für eine stationäre Phase und/oder geeignete Eluierbedingungen für die API-Reinigung mittels Umkehrphasen-Chromatographie auszuwählen.

[0013] Um diese und noch weitere Gegenstände der Erfindung auszuführen, die beim Fortschreiten der Beschreibung klarer hervortreten, ist das Material für die Umkehrphasen-Chromatographie verwirklicht durch die Merkmale, dass es oberflächenmodifizierende Gruppen enthält, die an einen festen Träger gebunden sind, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen geladene Gruppen sind, die geladenen Gruppen entweder positiv geladen oder negativ geladen sind, und die geladenen Gruppen in Mengen von etwa 0.25 bis etwa 22 % bezogen auf die oberflächenmodifizierenden Gruppen vorhanden sind, oder in Mengen von etwa 0.01 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bis 0.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bezogen auf die Oberfläche des festen Trägers für ein Material mit einer Gesamtmenge an oberflächenmodifizierenden Gruppen (d.h. apolaren, ungeladenen Gruppen und geladenen Gruppen) von 3.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.

[0014] Die gesamte Menge an oberflächenmodifizierenden Gruppen wird mittels Standardverfahren, wie Elementanalyse, bestimmt, und die Menge der geladenen Gruppen kann mittels ionischer Titration bestimmt werden.

[0015] Ein Material für die Umkehrphasen-Chromatographie gemäss der vorliegenden Erfindung wird auch als dotiertes Material bezeichnet oder als dotiertes Material für die Umkehrphasen-Chromatographie oder als dotiertes Umkehrphasenmaterial, weil es die geladenen Gruppen in geringen(dotierten) Mengen von höchstens 22%, vorzugsweise höchstens 20% oder 15% oder 10% enthält.

[0016] Der Begriff API, wie er hier verwendet wird, bezeichnet Moleküle mit apolaren und geladenen Gruppen, insbesondere Peptide, vorzugsweise Peptide mit bis zu etwa 50 Aminosäuren (aa).

[0017] Da der feste Träger als solcher im Wesentlichen abgeschirmt ist, kann jeder für chromatographische Zwecke bekannte Träger verwendet werden. Aufgrund der Silanol-Gruppen an der Oberfläche, die einfaches Befestigen der modifizierenden Gruppen mittels Reaktion mit z.B. Silanen gestattet, ist jedoch Kieselgel bevorzugt. Geeignete Silane sind z.B. monofunktionelle Silane, wie monoChlor substituierte Silane oder trifunktionelle Silane, wie Trimethoxysilane. Derzeit sind Trimethoxysilane bevorzugt, da diese in der Lage sind, mit bis zu drei benachbarten Silanolgruppen zu reagieren und dadurch die Silanolgruppen abzuschirmen und gleichzeitig die Verankerung der modifizierenden Substituenten zu verstärken. Zusätzlich erwies sich die Oberfläche als ausreichend mit Substituenten/oberflächenmodifizierenden Gruppen bedeckt, selbst wenn trifunktionelle Silane verwendet wurden. Zudem wurden bisher im Stand der Technik für trifunktionelle Silane beschriebene Reproduzierbarkeitsprobleme nicht beobachtet.

[0018] Geeignete Kieselgele sind hochreine Kieselgele mit Porosität von 50 bis 300 Å, vorzugsweise etwa 100 Å, und Teilchengrößen von 5 bis 100 μm , vorzugsweise von 10 bis 20 μm .

[0019] Bevorzugte apolare, ungeladene Gruppen sind lineare C4- bis C18-Alkyl-Gruppen, insbesondere C8-Alkylgruppen, obschon Alkenyl- und Alkynyl-Gruppen auch verwendet werden können. Alkyl-Gruppen sind bevorzugt, da sie maximale Bewegungsfreiheit geniessen.

[0020] Die geladenen Gruppen sind vorzugsweise auf aliphatischen Ketten kürzerer oder ähnlicher Länge wie die apolaren Gruppen angeordnet, um sicherzustellen, dass die geladenen Gruppen die ungeladenen, apolaren Gruppen nicht dominieren. Deshalb können die Kohlenwasserstoff-Ketten, welche eine geladene Gruppe tragen, C1- bis C18-Ketten sein. Obschon es bekannt ist, geladene Gruppen in die Kohlenwasserstoff-Kette einzubetten, ist derzeit terminale Position des Substituenten bzw. Position an der Spitze der Kohlenwasserstoffkette bevorzugt.

[0021] Die geladenen Substituenten haben die Wirkung, dass sie identisch geladene Aminosäuren abstossen und entgegengesetzt geladene Aminosäuren anziehen. Während die Ladung der geladenen Substituenten nicht kritisch ist, sind derzeit einfach geladene Substituenten, wie $-\text{NR}_3^+$ mit R = Wasserstoff oder C1–C2-Alkyl, oder $-\text{SO}_3^-$ bevorzugt gegenüber mehrfach geladene Substituenten. Bereits einfach geladene Substituenten zeigen in geringen Mengen ausreichende Wirkung.

[0022] Abhängig vom zu reinigenden API und den Trennungsbedingungen können unterschiedlich dotierte Umkehrphasen-Materialien geeignet sein. Das beste Material und die besten API-Reinigungsbedingungen können ausgewählt werden durch

- (a) Bestimmen des isoelektrischen Punktes (pI) des interessierenden API,
- (b) Auswählen eines pH in einem Bereich, in dem das Material der festen Phase stabil ist,
- (c) Bestimmen der Differenz pI–pH und

- (d) falls die Differenz $pI-pH$ positiv ist ($pI > pH$), auswählen eines Anionentauscher-Materials (AIEX), oder falls die Differenz $pI-pH$ negativ ist ($pI < pH$), auswählen eines Kationentauscher-Materials (CIEX).

[0023] Deshalb schliesst die vorliegende Erfindung auch ein

(i) die Verwendung eines Materials für die Umkehrphasen-Chromatographie, welches an einen festen Träger gebundene oberflächenmodifizierende Gruppen umfasst, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen positiv geladene Gruppen sind, insbesondere ein positiv geladenes Material, wie oben definiert, für die Umkehrphasen-Reinigung eines Proteins unter Bedingungen worin $pI > pH$ ist, und

(ii) die Verwendung eines Materials für die Umkehrphasen-Chromatographie, welches an einen festen Träger gebundene oberflächenmodifizierende Gruppen umfasst, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen negativ geladene Gruppen sind, insbesondere ein negativ geladenes Material, wie oben definiert, für die Umkehrphasen-Reinigung eines Proteins unter Bedingungen worin $pI < pH$ ist.

[0024] Bestimmung des isoelektrischen Punktes schliesst die experimentelle Bestimmung, die Berechnung aus den aa Sequenzen, aber auch die Suche nach entsprechender Information in der Literatur oder anderen Quellen, einschliesslich persönlichen Wissens, ein.

[0025] Der pH sollte derart gewählt werden, dass die Lebensdauer des Materials nicht beeinträchtigt wird. Für Kieselgel ist ein pH zwischen 3 und 9 bevorzugt, stärker bevorzugt ist ein pH zwischen 4 und 7.

[0026] Wenn ein Material ausgewählt worden ist, kann eine gewünschte Retentionszeit festgelegt werden und dann können die Eluierbedingungen darauf angepasst werden durch Ermittlung der Ionenstärke des Puffers und/oder durch Ermittlung des Lösungsmittelsystems der mobilen Phase (Eluentensystem) und des Gradienten.

[0027] Mögliche Eluentensysteme enthalten oder bestehen aus mindestens einem polaren Lösungsmittel, vorzugsweise einer Kombination aus Wasser, wie Wasser eines speziellen pH, und mindestens einem weiteren polaren Lösungsmittel mit einer Polarität, die geringer ist als die Polarität von Wasser. Solche weniger polare Lösungsmittel können z.B. ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend oder bestehend aus Methanol, Ethanol, Isopropanol, Tetra-hydrofuran (thf), Acetonitril und Kombinationen derselben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird nicht nur Wasser eines speziellen pHs verwendet, sondern eine gepufferte wässrige Lösung.

[0028] Ein Eluentensystem, welches sich als für verschiedene Trennungsanwendungen geeignet erwiesen hat, ist ein wässriger Puffer und Acetonitril. Die Ausgangs-Zusammensetzung und die End-Zusammensetzung des Eluentensystems sowie der Gradient können mittels üblicher Routinemethoden gefunden werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0029] Die Erfindung wird besser verstanden werden und Gegenstände, die oben nicht dargelegt sind, werden sich zeigen, wenn die folgende detaillierte Beschreibung derselben berücksichtigt wird. Diese Beschreibung nimmt Bezug auf die angehängten Zeichnungen, worin:

- Fig. 1 zeigt eine Beziehung zwischen anionischen funktionellen Gruppen ($-SO_3^-$) in der Reaktionsmischung und anionischen funktionellen Gruppen, gebunden ans Kieselgel.
- Fig. 2 zeigt eine Beziehung zwischen kationischen funktionellen Gruppen ($-NR_3^+$) in der Reaktionsmischung und kationischen funktionellen Gruppen gebunden ans Kieselgel.
- Fig. 3 zeigt die Wirkung der Pufferkonzentration (Fig. 3a für 300 mM Acetat, Fig. 3b für 500 mM Acetat, Fig. 3c für 800 mM Acetat) auf die Retentionszeit eines positiv geladenen API auf verschiedenen Säulen.
- Fig. 4 zeigt die Wirkung eines modifizierten Acetonitril-Gradienten auf die Retentionszeit, wobei Fig. 4a die Retentionszeit der spezifischen Säulen unter Verwendung identischer Eluierbedingungen zeigt, während Fig. 4b zeigt, dass die Retentionszeiten durch Variation der Anfangs-Zusammensetzung und/oder des Gradienten zusammengebracht werden können.
- Fig. 5 zeigt die Selektivität für die Auftrennung von Insulin/Desamido-Insulin (Insulin $pI=5.3$) auf verschiedenen Säulenmaterialien und bei zwei verschiedenen pH- Werten.
- Fig. 6 zeigt die präparative Reinigung eines synthetischen Peptids 1 gemäss Beispiel 5.
- Fig. 7 zeigt die präparative Reinigung eines synthetischen Peptids 2 gemäss Beispiel 6.
- Fig. 8 zeigt die präparative Reinigung eines synthetischen Peptids 3 gemäss Beispiel 7.

Wege zur Ausführung der Erfindung

[0030] Gemäss dem derzeit bevorzugten Verfahren für die Oberflächenmodifizierung, werden alle oberflächenmodifizierenden Gruppen gleichzeitig aus einer flüssigen Lösung, welche die apolaren Gruppen und die polaren, geladenen Gruppen umfasst, angebracht. Abhängig von den verwendeten Substituenten wurde gefunden, dass die Reaktion die geladenen oder die apolaren Gruppen mehr oder weniger stark begünstigen kann. Deshalb muss das tatsächlich erhaltene Material mittels beispielsweise ionischer Titration bestimmt werden.

[0031] Es ist auch möglich, die Reaktion in mehreren Schritten durchzuführen, d.h. zuerst Anbringen der apolaren Gruppen, gefolgt von den geladenen Gruppen oder umgekehrt. Bei diesem Verfahren sind jedoch die Reaktionsbedingungen so zu wählen, dass im ersten Schritt einige der verfügbaren Silanolgruppen nicht reagiert werden. Auf jeden Fall müssen auch in einem Zwei- (oder Mehr-)stufigen Verfahren die tatsächlich angebrachten ionischen Gruppen, z.B. mittels ionischer Titration, bestimmt werden.

[0032] Die bevorzugten und/oder erhältlichen Bereiche geladener Gruppen können von geladener Gruppe zu geladener Gruppe variieren. Für $-\text{SO}_3^-$ beträgt der übliche Bereich von $0.01 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ bis $0.04 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ und für $-\text{NR}_3^+$ beträgt der übliche Bereich von $0.01 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ bis $0.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ obschon grössere Mengen einfach hergestellt werden können (siehe Beispiele unten). Höher $-\text{NR}_3^+$ -dotierte Materialien mit z.B. $\text{R} = \text{CH}_3$, wurden jedoch als weniger gut festgestellt (siehe Figuren 3 und 4). Die untere Grenze der Menge ionischer Gruppen entspricht der minimale Anzahl dotierter ionischer Gruppen, die vorhanden sein muss, um eine sichtbare Wirkung zu erzielen. Die obere Grenze ist gegeben durch die Stärke bzw. Schwäche der Adsorption. Es könnten deshalb grössere Mengen als die angegebenen Mengen ionischer Gruppen verwendet werden, aber mit möglicherweise schlechterer Trennung und/oder ungeeigneten Retentionszeiten.

[0033] Die Wirkung der Dotierung ist, dass im Falle eines positiv geladenen APIs (isoelektrischer Punkt $\text{pI} - \text{pH} = \text{positive}$, bzw. $\text{pI} > \text{pH}$) die Adsorption auf einem AIEX Material, z.B. $-\text{NR}_3^+$ dotiertem Material, schwach ist (Abstossung) und auf einem CIEX Material, z.B. $-\text{SO}_3^-$ dotiertem Material, stark (Anziehung) und umgekehrt.

[0034] Wie oben angegeben, sind die apolaren Gruppen vorzugsweise mindestens C4-Gruppen und üblicherweise nicht länger als C18-Gruppen, wobei derzeit C8-Gruppen bevorzugt sind. Die geladenen Gruppen schliessen jegliche geladenen Substituenten ein, bevorzugt geladene Substituenten, die an einen C1- bis C18-Kohlenwasserstoff gebunden sind, stärker bevorzugt geladene Substituenten, die an einen Kohlenwasserstoff gebunden sind, der eine wenig kürzere oder etwa die gleiche Länge hat, wie die apolare Kette. Aufgrund der Tatsache, dass der Substituent grösser ist als ein Wasserstoff, haben die Gruppen, die einen geladenen Substituenten tragen, üblicherweise und bevorzugt eine gering kürzere Kette, z.B. C3 verglichen mit C8 der apolaren Gruppe. Ohne den Wunsch, den Umfang der Erfindung durch eine Interpretation zu beschränken, nehmen die Erfinder an, dass das Anbinden der ionischen Gruppen über eine kürzere Kohlenwasserstoff-Kette zu einer schwachen Abschirmung der ionischen Gruppen führt und damit zu einer geringeren Anziehung oder Abstossung der Moleküle im Analyt.

[0035] Die Erfindung wird nun anhand einiger Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

[0036] Verschiedene CIEX- und AIEX-Materialien wurden hergestellt, indem diese gemäss Standardverfahren Zusammensetzungen ausgesetzt wurden, welche die C8-Verbindung Octyltrimethoxysilan und (0%), 5%, 10%, 15% oder 50 % der $-\text{SO}_3^-$ -geladenen oder der $-\text{NR}_3^+$ -geladenen C3-Verbindung umfassten.

[0037] Die $-\text{NR}_3^+$ -Materialien ($\text{R} = \text{Methyl}$) wurden hergestellt indem die gewünschte Menge Kieselgel mit Octyltrimethoxysilan N-trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammoniumchlorid und p-Toluolsulfonsäure (Katalysator) zusammengegeben und unter Rückfluss während 6 Stunden in Toluol gekocht wurde.

[0038] Die gewünschten Mengen waren wie folgt: Octyltrimethoxysilan in einer Konzentration von $(1-x) \cdot 5.6 \cdot 10^{-6} \text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{M} \cdot \text{MWt}$, worin

x die gewünschten Gewichts-% der $-\text{NR}_3^+$ -Gruppen,

S die spezifische Oberfläche des Kieselgels [m^2/g],

M die Masse des verwendeten Kieselgels [g] und

MWt das Molekulargewicht von Octyltrimethoxysilan [g/mol] bedeuten.

N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammoniumchlorid wurde als 50 Gew.-%-Lösung des Silans in Methanol verwendet und die verwendete Menge an Lösung war

$x \cdot 2 \text{g}/\text{g} \cdot \text{M}$, worin

x die Prozente der $-\text{NR}_3^+$ -Gruppen, wie oben beschrieben, und

M die Masse Kieselgel [g] bedeuten.

p-Toluolsulfonsäure (Katalysator) wurde in einer Konzentration von $8 \cdot 10^{-3} \text{g}/\text{g}$ des Octyltrimethoxysilans und des N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammoniumchlorids verwendet.

[0039] Nach 6 Stunden wurde das Material mit Endkappen versehen (endcapped), d.h. nicht reagierte, weiterhin verfügbare Silanol-Gruppen wurden mittels Standardverfahren mit Trimethylchlorsilan reagiert und mit einer Abfolge von Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Polarität gewaschen.

[0040] Die -SO_3^- -Materialien wurden durch Zusammengebens der gewünschten Mengen Kieselgel, Octyltrimethoxysilan, Mercaptopropyltrimethoxysilan, and p-Toluolsulfonsäure, in Toluol und Kochen unter Rückfluss während 6 Stunden hergestellt.

[0041] Die gewünschten Mengen waren wie folgt: Octyltrimethoxysilan in einer Konzentration von $(1-x) \cdot 5.6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{M} \cdot \text{MWt}$, worin
 x die gewünschten Gewichts-% der -SO_3^- -Gruppen,
 S die spezifische Oberfläche des Kieselgels [m^2/g],
 M die Masse des verwendeten Kieselgels [g] und
 MWt das Molekulargewicht des Silans [g/mol] bedeuten.

[0042] Mercaptopropyltrimethoxysilan wurde in einer Konzentration verwendet von $x \cdot 5.6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{M} \cdot \text{MWt}$, worin
 x die gewünschten Gewichts-% der -SO_3^- -Gruppen,
 S die spezifische Oberfläche des Kieselgels [m^2/g],
 M die Masse des verwendeten Kieselgels [g] und
 MWt das Molekulargewicht des Silans [g/mol] bedeuten.

[0043] p-Toluolsulfonsäure wurde in einer Konzentration von $8.6 \cdot 10^{-3} \text{ g/g}$ der verwendeten Gesamtmenge an Octyltrimethoxysilan und Mercaptopropyltrimethoxysilan eingesetzt.

[0044] Das Material wurde dann unter Verwendung von Standardverfahren mit Endkappen versehen (endcapped) und mit einer Abfolge von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gewaschen.

[0045] -SO_3^- -Gruppen wurden durch Oxidieren der Mercapto-Gruppen wie folgt hergestellt: Das Material wurde in eine Lösung von 30 Vol.-% Aceton in H_2O_2 (30 Gew.-% in Wasser) gegeben und während 12 Stunden bei Raumtemperatur in der Lösung gehalten. Schliesslich wurde das Material mit Wasser und Methanol gewaschen.

[0046] Die Menge gebundener geladener Gruppen als Funktion der Konzentration in Lösung und ermittelt mittels ionischer Titration ist in Fig. 1 für die anionische funktionelle Gruppe -SO_3^- und in Fig. 2 für die kationische funktionelle Gruppe -NR_3^+ gezeigt.

[0047] Die derart hergestellten CIEX-Säulen wurden bezeichnet als C5 (5% anionische Gruppen in Lösung), C10 (10% anionische Gruppen in Lösung), C15 (15% anionische Gruppen in Lösung), C50 (50% anionische Gruppen in Lösung), and C100 (100% anionische Gruppen in Lösung), die neutrale Säule als RP (0% ionische Gruppen in Lösung), und die AIEX-Säulen als A5 (5% kationische Gruppen in Lösung), A10 (10% kationische Gruppen in Lösung), A15 (15% kationische Gruppen in Lösung), und A50 (50% kationische Gruppen in Lösung). Die Menge der gebundenen geladenen Gruppen (ermittelt mittels Titration) kann aus den Fig. 1 und 2 abgeleitet werden.

Beispiel 2

[0048] Ein Peptid (synthetisches Peptid 1) mit pI zwischen 11 und 12 wurde einer Trennung mit verschiedenen Säulen und unterschiedlichen Ionenstärken des verwendeten Acetatpuffers von pH 4.8 und identischem Acetonitril (AcN)-Gradient von 0.51 Vol.-%/Minute, beginnend bei etwa 19 % AcN, unterzogen.

[0049] Wie von jeder der Fig. 3a bis 3c gesehen werden kann, ist die Adsorption eines positiv geladenen Peptids auf $\text{-NR}_3^+/\text{C8}$ -Materialien gering (Abstossung), während sie auf $\text{-SO}_3^-/\text{C8}$ -Materialien hoch ist (Anziehung). Mehrere Säulen wurden unter identischen Bedingungen getestet und die Retentionszeiten miteinander verglichen. Wie gesehen werden kann, hat die Säule A15 nahezu keine Adsorption bzw. starke Abstossung, während das Material C15 starke Adsorption und damit lange Retentionszeit hat. Das A15-Material ist nicht verwendbar, da das interessierende Peptid nicht adsorbiert wird, während das C15-Material in ökonomischer Hinsicht nicht so gut ist, weil der Reinigungsprozess zu langsam ist und eine wesentliche Menge an Lösungsmittel verlangt.

[0050] Wie aus einem Vergleich der Fig. 3a bis 3c ersichtlich ist, hat Säule A15 mit etwa $1 \mu\text{mol/m}^2$ nicht nur eine unerwünschte kurze Retentionszeit von weniger als 5 Minuten, sondern sie reagiert auch nicht auf Änderungen in der Ionenstärke (Pufferkonzentration). Dies ist ein weiteres Beweisstück dafür, dass dieses Material für die vorgesehene Verwendung nicht geeignet ist.

[0051] Im Gegensatz dazu reagierten die weniger dotierten Materialien sehr empfindlich auf geänderte Reaktionsbedingungen, was diese alle zu wertvollen Umkehrphasen-Materialien macht. Durch Erhöhen der Pufferkonzentration von 300 mM Acetat auf 800 mM Acetat, konnte die Retentionszeit auf C15 von mehr als 30 Minuten auf weniger als 25 Minuten erniedrigt werden. Zudem näherten sich die Retentionszeiten auf allen Säulen bei höheren Pufferkonzentrationen an, was ein Hinweis darauf ist, dass das Salz (Acetat) die Ladungen abschirmt, so dass die dotierten Materialien sich ähnlich verhalten wie das nicht dotierte RP-Material.

[0052] Wie oben bereits angegeben, wurde nur für die A15-Säule keine Wirkung gefunden. Ohne durch eine Interpretation in irgendeiner Art eingeschränkt werden zu wollen, nehmen die Erfinder an, dass dieses unerwartete Verhalten darauf hinweisen könnte, dass dieses Material derart abstossend ist, dass die verwendeten Puffer-Konzentrationen nicht ausreichend sind um diese Abstossung zu überwinden.

Beispiel 3

[0053] In diesem Beispiel wurde die Wirkung einer geänderten Anfangskonzentration und eines Gradienten auf die Retentionszeiten auf den verschiedenen Säulen untersucht. Um die Wirkung des Puffersalzes zu minimieren, wurden nur 100 mM Acetatpuffer verwendet. Auch in diesem Beispiel war der API das synthetische Peptid 1 mit pI von 11 bis 12.

[0054] Der AcN Gradient war 0.25 Vol.-%/Minute.

[0055] In einem Experiment war die AcN Anfangskonzentration 22 % AcN (siehe Fig. 4a), in einem zweiten Experiment wurde die AcN Anfangskonzentration verändert um eine Retentionszeit $t_R=30 \pm 3$ Min. sicherzustellen (Fig. 4b).

[0056] Wie aus einem Vergleich von Fig. 4a mit Fig. 4b ersichtlich ist, sind die Retentionszeiten stark abhängig von der AcN Anfangskonzentration.

[0057] Die Bedingungen, die zu den in Fig. 4b gezeigten Resultaten führten, sind für alle Säulen unten in Tabelle 1 aufgeführt:

Tabelle 1:**[0058]**

Säule	AcN Beginn [v%]	AcN Ende [v%]	Gradient Zeit [min]	Gradient [v%/min]	Retentionszeit [min]
C15	31.7	47.3	61.2	0.25	28.5
C10	29.5	45.1	61.2	0.25	29.8
C5	24.2	39.8	61.2	0.25	32.8
RP	21.9	37.5	62.4	0.25	28.0
A5	14.8	30.4	61.3	0.25	27.2
A10	10.8	26.4	61.2	0.25	28.6
A15	6.3	21.9	61.3	0.25	dead time

Beispiel 4

[0059] Die Selektivität der verschiedenen Säulen bei der Trennung von Insulin/Desamido-Insulin (Insulin $pI=5.3$) bei pH 4.8 und pH 6.8 wurde untersucht. Die Resultate sind in Fig. 5 gezeigt.

[0060] Die experimentellen Bedingungen waren:

- Eluent: 240 mM Acetat (pH 4.8 bzw. 6.8) und AcN in einer Menge um eine Retentionszeit t_R von Insulin von etwa 32 Minuten sicherzustellen; und
- isokratische Eluierung.

[0061] Die Insulin/Desamido-Insulin Selektivität bei pH 4.8 war

- $S < 1$ auf einem CIEX Material
- $S > 1$ auf dem RP
- $S \approx 1$ auf den CIEX-RP Materialien
- $S \gg 1$ auf den AIEX-RP Materialien

[0062] Wie aus Fig. 5 ersichtlich ist, zeigen die – $NR_3^+/C8$ -Materialien bei pH 4.8 (···◆···) stark erhöhte Selektivität verglichen mit dem reinen C8-Material. Bei höherem pH (—■—) war die Selektivität umgekehrt. Deshalb sind die abstossenden Materialien besser als die anziehenden Materialien, d.h. $-SO_3^-/C8$.

Beispiel 5

[0063] Dieses Beispiel beschreibt die Reinigung eines synthetischen Peptids 1, das für einen pI zwischen 11 und 12 ausgewählt worden war. Der pH der mobilen Phase war unterhalb des pI des Peptids, d.h. das Peptid war positiv geladen.

[0064] Die mobile Phase hatte einen pH=4.8, 500 mM Natriumacetat-Puffer + Acetonitril.

[0065] Die Informationen zur Ausgangskonzentration und zum Gradienten sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2:**[0066]**

Säule	AcN Beginn	AcN Ende	Gradient Zeit
-------	------------	----------	---------------

CH 706 332 A1

	[v%]	[v%]	[min]
C50	28.6	33	80
C5	17	33	80
RP	15.9	32.2	80
A5	13.9	30	80
A10	11.7	26.4	80

[0067] Resultat: Wie aus Fig. 6 ersehen werden kann, konnte durch Verwendung eines ALEX-RP-Materials (A10) die Ausbeute bei einer festgelegten Reinheit von 94% um 25% erhöht werden.

Beispiel 6

[0068] Dieses Beispiel beschreibt die Reinigung eines synthetischen Peptids 2, das für einen pI zwischen 9 und 10 ausgewählt worden war. Der pH der mobilen Phase war unterhalb des pI des Peptids, d.h. das Peptid war positiv geladen.

[0069] Die mobile Phase hatte einen pH=4.8, 120 mM Natriumacetat-Puffer + Acetonitril.

[0070] Die Informationen zur Ausgangskonzentration und zum Gradienten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3:

[0071]

Säule	AcN Beginn [v%]	AcN Ende [v%]	Gradient Zeit [min]
C5	28.6	48.6	80
RP	21.9	39.3	80
A5	17.5	35.7	80
A10	14.8	32.2	80

[0072] Resultat: Wie aus Fig. 7 ersehen werden kann, konnte durch Verwendung eines ALEX-RP-Materials (A10) die Ausbeute bei einer festgelegten Reinheit von 94% um 7.4% erhöht werden.

Beispiel 7

[0073] Dieses Beispiel beschreibt die Reinigung eines synthetischen Peptids 3, das für einen pI zwischen 4.5 und 5.5 ausgewählt worden war. Der pH der mobilen Phase war oberhalb des pI des Peptids, d.h. das Peptid war negativ geladen.

[0074] Die mobile Phase hatte einen pH=6.5, 100 mM Ammoniumacetat-Puffer + Acetonitril.

[0075] Die Informationen zur Ausgangskonzentration und zum Gradienten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4:

[0076]

Säule	AcN Beginn [v%]	AcN Ende [v%]	Gradient Zeit [min]
15C	20.2	34.7	60
IOC	20.2	34.7	60
5C	20.7	35.2	60
RP	21.7	36.2	60
A5	24.6	39.1	60
A10	28.4	42.9	60

[0077] Resultat: Wie aus Fig. 8 ersehen werden kann, zeigen in diesem Fall, wegen der negativen Ladung auf dem API, die -SO₃/C8-Materialien die bessere Performance. Auch hier sind die abstossenden Materialien besser. Unter Verwendung eines CLEX-RP-Materials (CIO) konnte die Ausbeute bei einer festgelegten Reinheit von 87% um 5.9% erhöht werden.

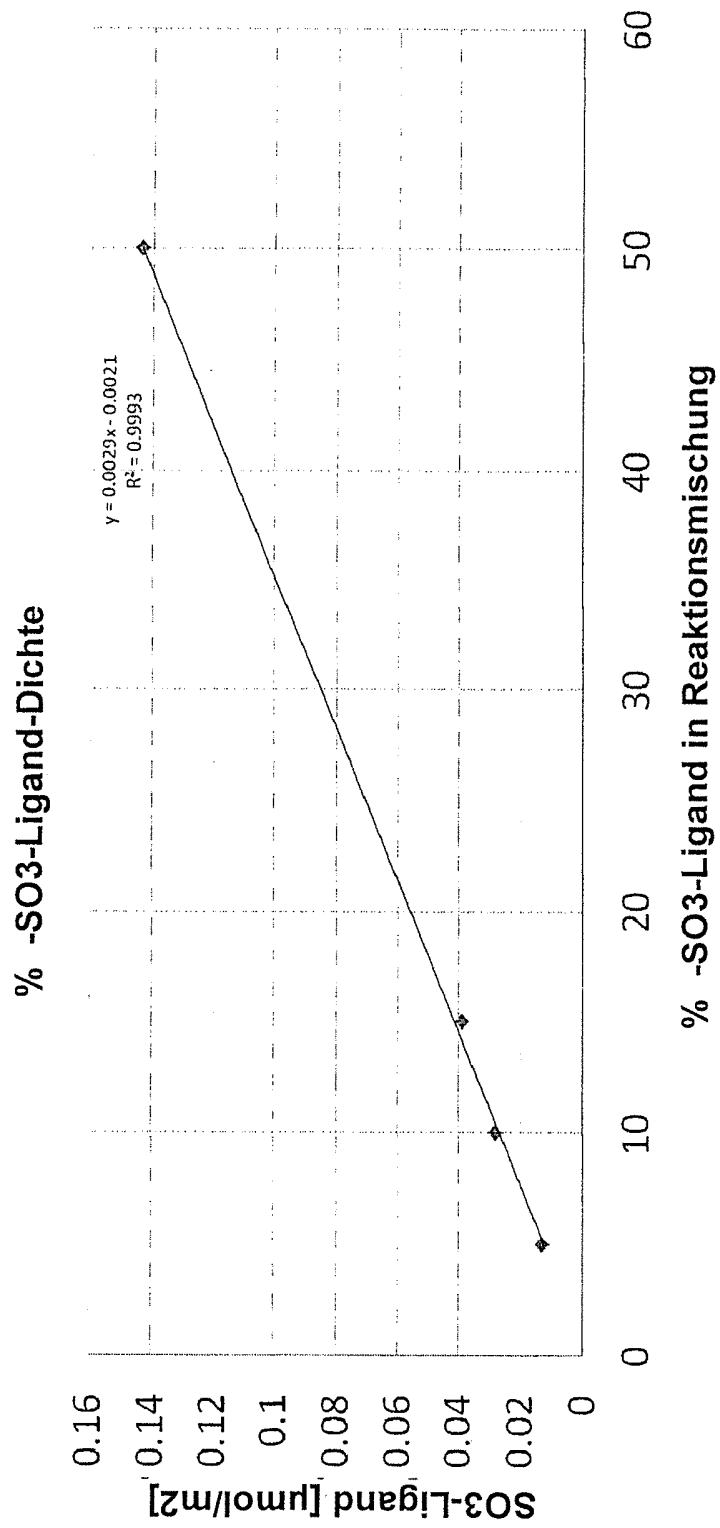
Schlussfolgerung:

[0078] Alle Experimente zeigen, dass abstossend dotierte Materialien verbesserte Performance haben. Dies steht im Widerspruch zur allgemeinen Meinung, dass für verbesserte Performance zusätzliche Adsorptionsstellen geschaffen werden müssen. Die derzeitigen Resultate zeigen, dass die Performance des Materials durch das Schaffen abstossender Stellen verbessert wird.

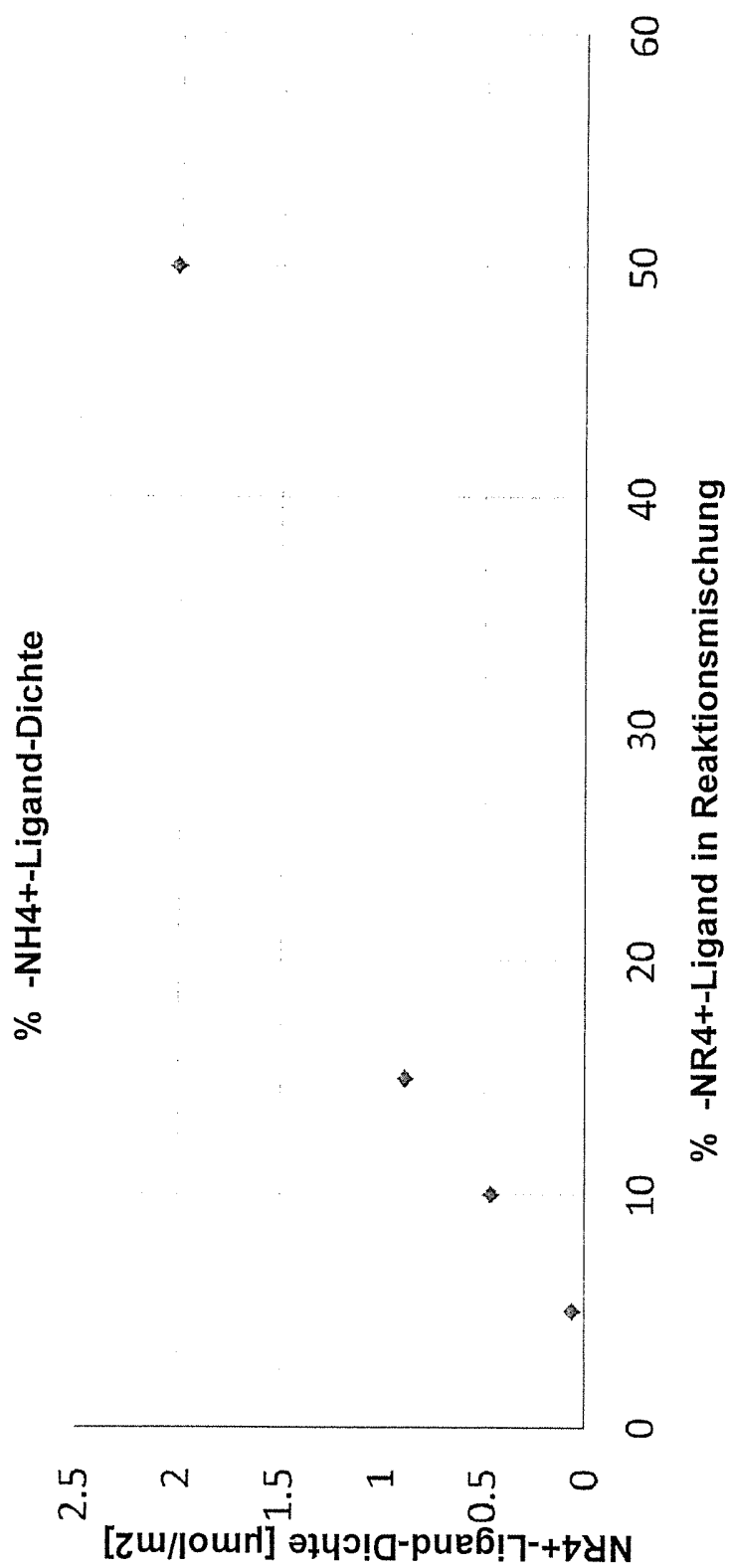
[0079] Während hier derzeit bevorzugte Ausführungen der Erfindung beschrieben sind, ist klar darauf hinzuweisen, dass die Erfindung nicht auf diese beschränkt ist, sondern innerhalb des Umfangs der folgenden Ansprüche auch auf andere Weise vielfältig ausgeführt und praktiziert werden kann.

Patentansprüche

1. Ein Material für die Umkehrphasen-Chromatographie umfassend oberflächenmodifizierende Gruppen, die an einen festen Träger gebunden sind, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen geladene Gruppen sind, die geladenen Gruppen entweder positiv geladen oder negativ geladen sind, und die geladenen Gruppen in Mengen von etwa 0.25 bis etwa 22 % bezogen auf die oberflächenmodifizierenden Gruppen vorhanden sind, oder in Mengen von etwa 0.01 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bis 0.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bezogen auf die Oberfläche des festen Trägers für ein Material mit einer Gesamtmenge an oberflächenmodifizierenden Gruppen von 3.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$.
2. Das Material gemäss Anspruch 1, worin die apolaren ungeladenen Gruppen lineare C4- bis C18-Alkylgruppen sind, vorzugsweise C8-Gruppen, und die geladenen Gruppen terminale Substituenten aliphatischer C1-bis C18-Gruppen, wie C3-Gruppen, sind.
3. Das Material gemäss Anspruch 1 oder 2, worin die aliphatischen Gruppen der geladenen Gruppen eine kürzere oder ähnliche Länge verglichen mit der Länge der apolaren Gruppen haben, wie geladene C3-Gruppen in Kombination mit apolaren C8-Gruppen.
4. Das Material gemäss irgendeinem der vorangehenden Ansprüche, worin die geladenen Gruppen ausgewählt sind aus $-\text{NR}_3^+$, vorzugsweise NR_3^+ worin R Wasserstoff oder C1–C2-Alkyl ist, wie Methyl, oder $-\text{SO}_3^-$.
5. Das Material gemäss irgendeinem der vorangehenden Ansprüche, worin der feste Träger ein Kieselgel ist, vorzugsweise ein hochreines Kieselgel mit einer Porosität von 50 bis 300 Å, vorzugsweise etwa 100 Å, und Porengrössen von 5 bis 100 μm , vorzugsweise von 10 bis 20 μm .
6. Ein Verfahren zur Auftrennung pharmazeutischer Inhaltsstoffe (API), vorzugsweise Peptiden, mittels Umkehrphasen-Chromatographie, wobei das Verfahren das Evaluieren des geeigneten Umkehrphasen-Materials, insbesondere eines Umkehrphasen-Materials gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5, und API-Reinigungs-Bedingungen umfasst, mittels
 - (a) Bestimmen des isoelektrischen Punktes (pI) des interessierenden API,
 - (b) Auswählen eines pH in einem Bereich, in dem das Material der festen Phase stabil ist,
 - (c) Bestimmen der Differenz pI-pH und
 - (d) falls die Differenz pI-pH positiv ist ($\text{pI} > \text{pH}$), auswählen eines Anionentauscher(AIEX)-Materials, oder falls die Differenz pI-pH negativ ist ($\text{pI} < \text{pH}$), auswählen eines Kationentauscher (CIEX)-Materials.
7. Das Verfahren gemäss Anspruch 6, welches ferner den Schritt umfasst
 - (e) Evaluieren einer geeigneten Retentionszeit mittels Adaptieren der Eluierbedingungen.
8. Das Verfahren gemäss Anspruch 7, worin die Eluierbedingungen die Bestimmung der Ionenstärke eines Puffers umfassen.
9. Das Verfahren gemäss Anspruch 7 oder 8, worin die Eluierbedingungen die Bestimmung des Eluentensystems, der Anfangskonzentration des Eluenten und des Gradienten umfassen.
10. Das Verfahren gemäss irgendeinem der Ansprüche 6 bis 9, worin das Eluentensystem ein wässriger Puffer und Acetonitril ist.
11. Das Verfahren gemäss irgendeinem der Ansprüche 6 bis 10, worin der pH gewählt ist zwischen 3 und 9, vorzugsweise zwischen 4 und 7.
12. Verwendung eines Materials für die Umkehrphasen-Chromatographie umfassend oberflächenmodifizierende Gruppen gebunden an einen festen Träger, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen positiv geladene Gruppen sind, insbesondere ein positiv geladenes Material gemäss irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, für die Umkehrphasen-Reinigung eines Proteins unter Bedingungen worin $\text{pI} > \text{pH}$.
13. Verwendung eines Materials für die Umkehrphasen-Chromatographie umfassend oberflächenmodifizierende Gruppen gebunden an einen festen Träger, wobei die oberflächenmodifizierenden Gruppen apolare ungeladene Gruppen und polare Gruppen umfassen, wobei die polaren Gruppen negativ geladene Gruppen sind, insbesondere ein negativ geladenes Material gemäss irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, für die Umkehrphasen-Reinigung eines Proteins unter Bedingungen worin $\text{pI} < \text{pH}$.



Figur 1



Figur 2

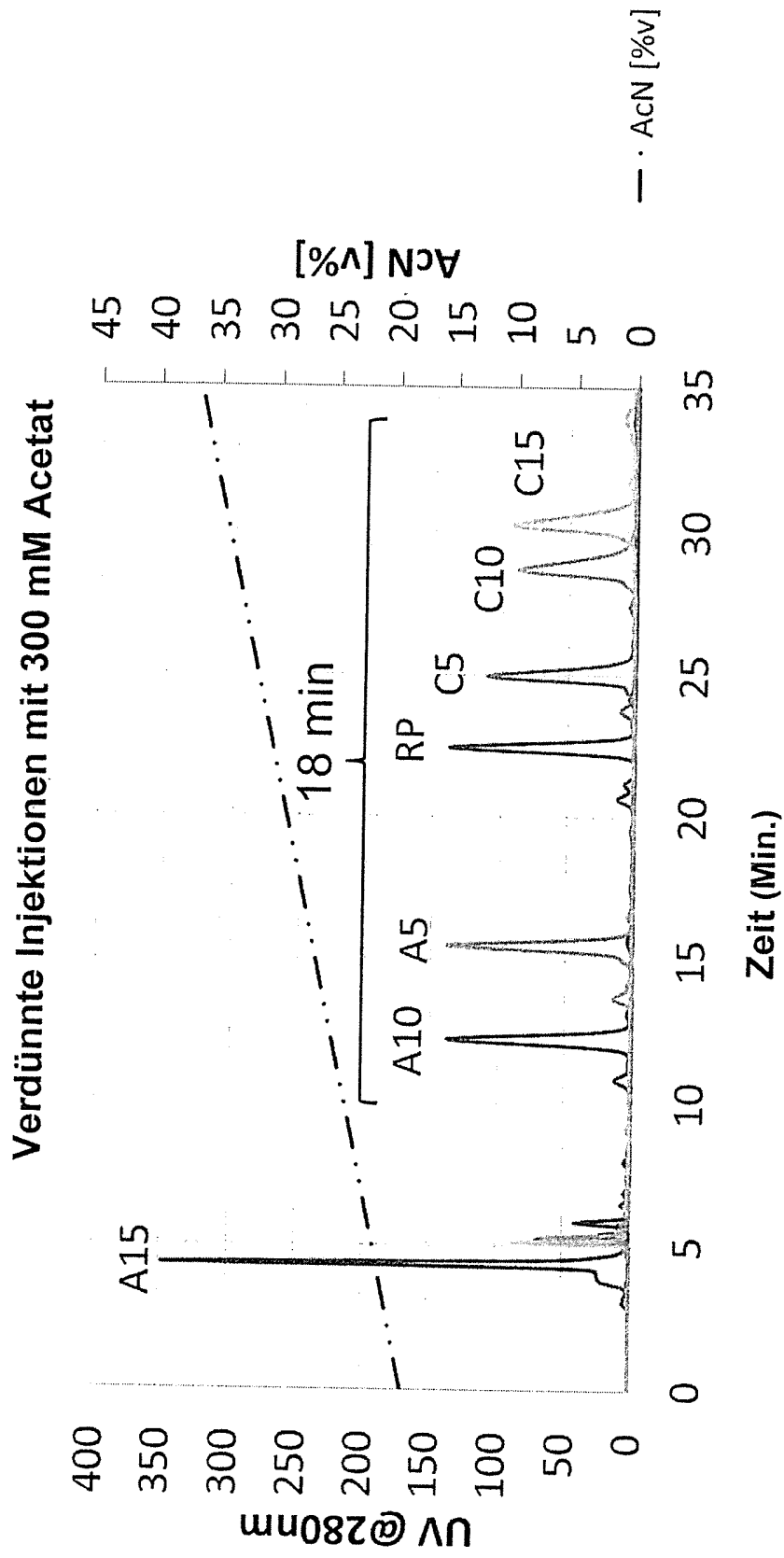
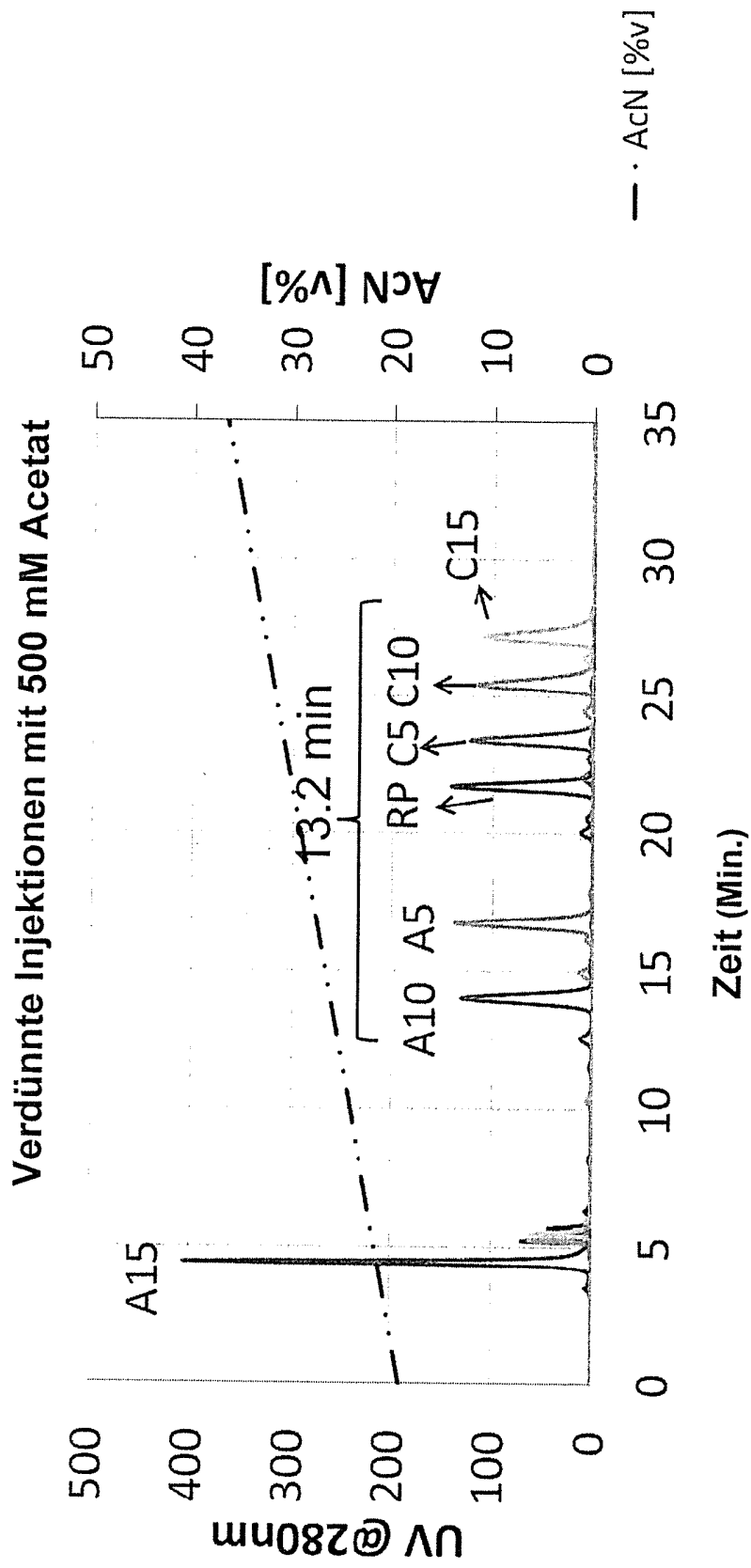
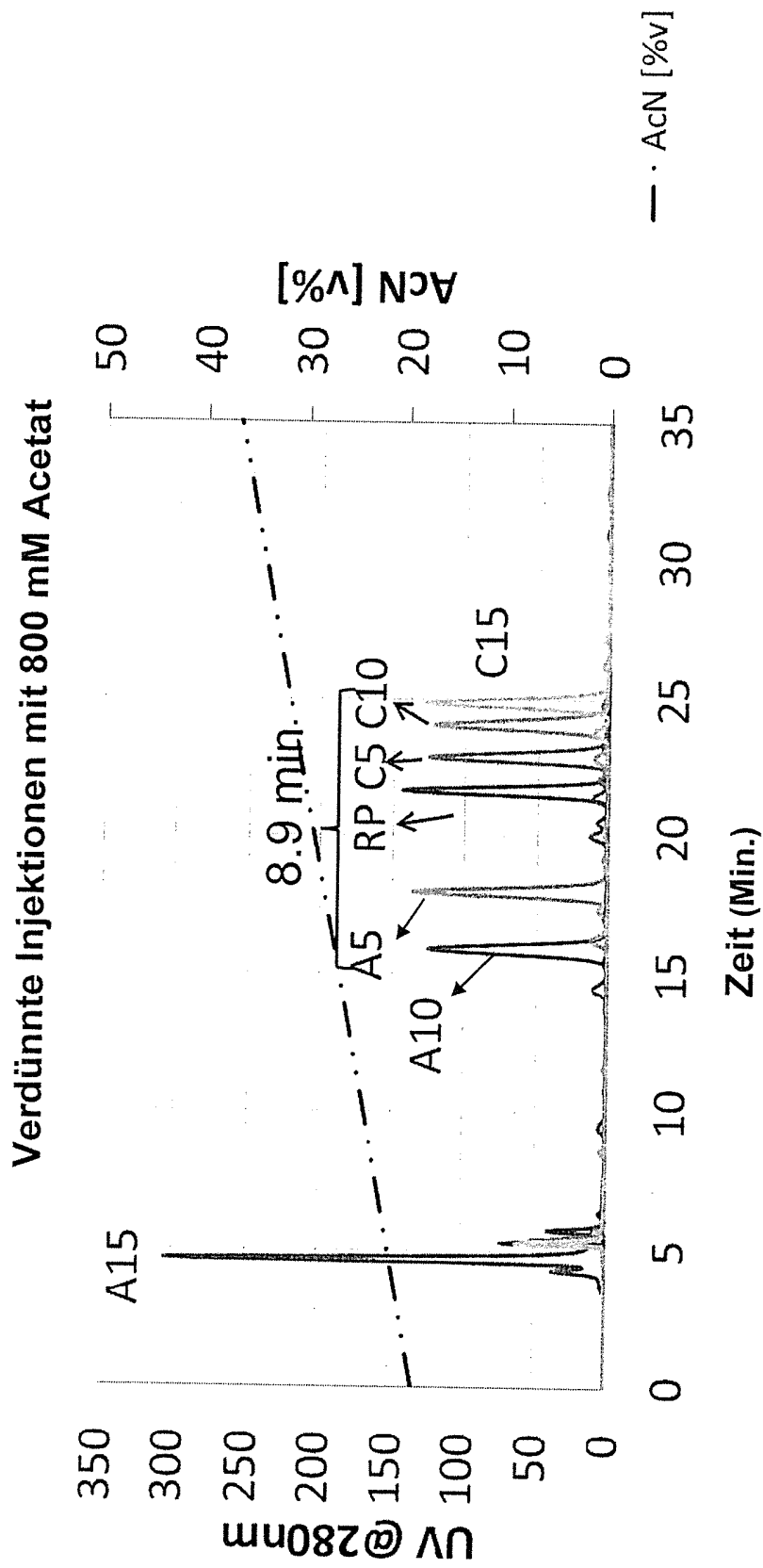


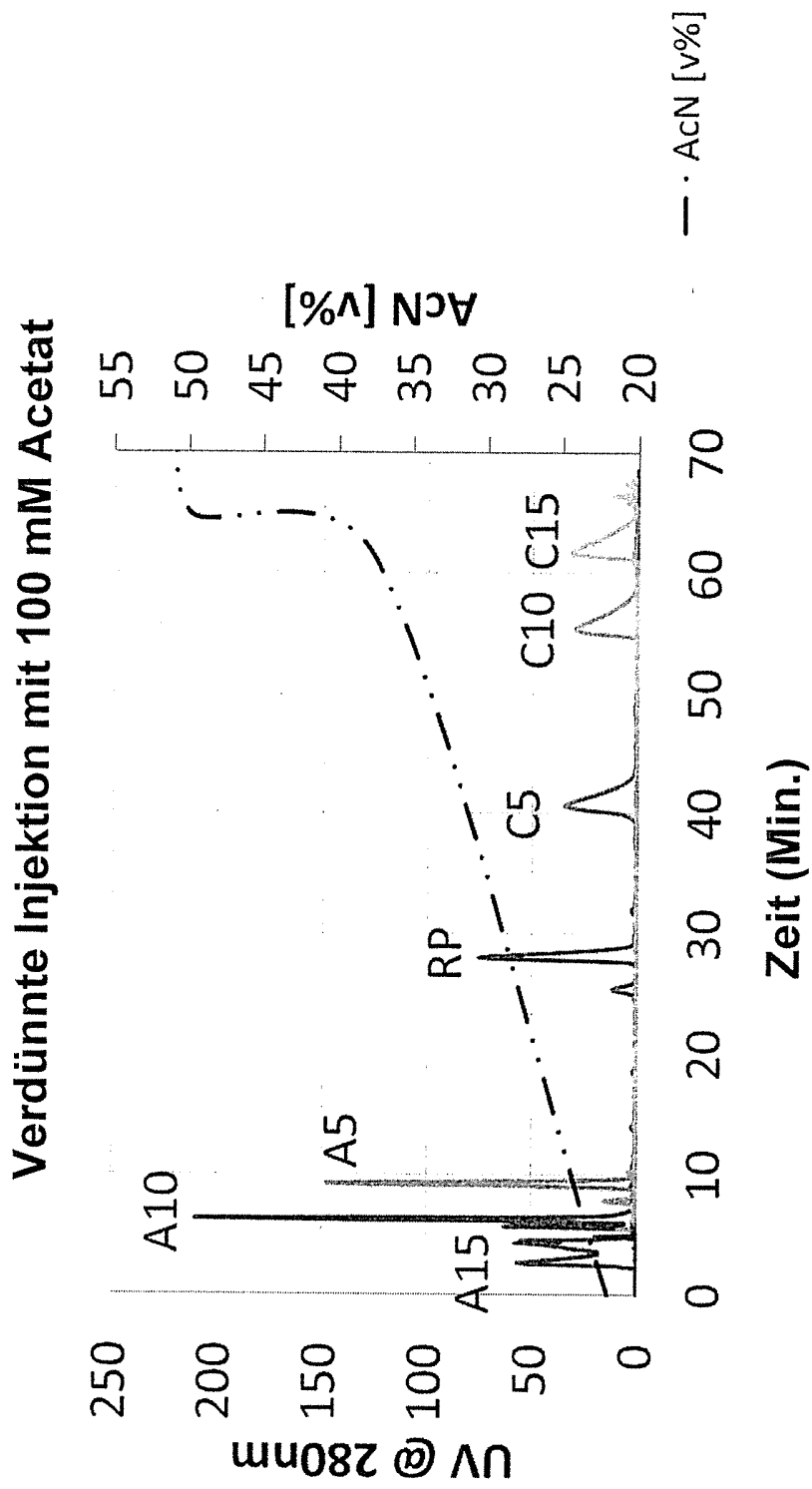
Figure 3a



Figur 3b



Figur 3c



Figur 4a

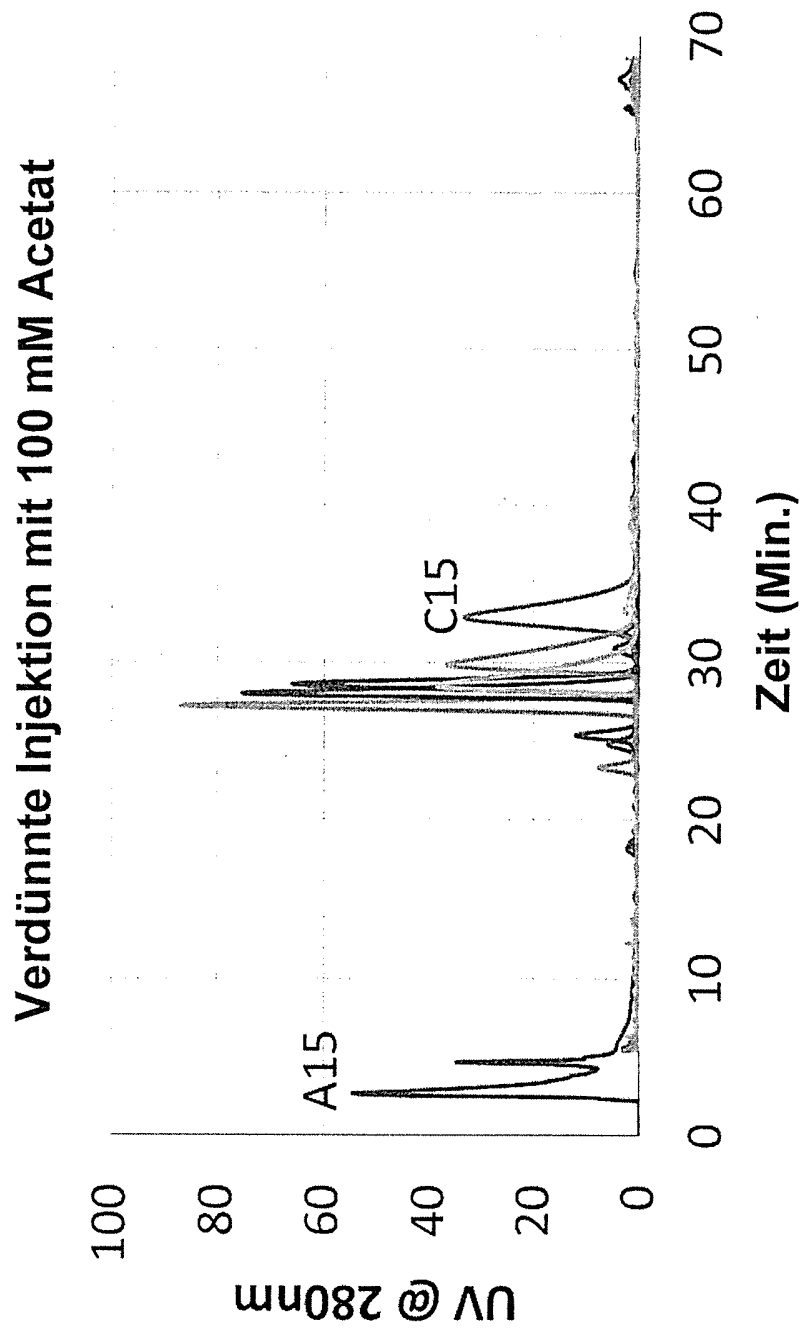
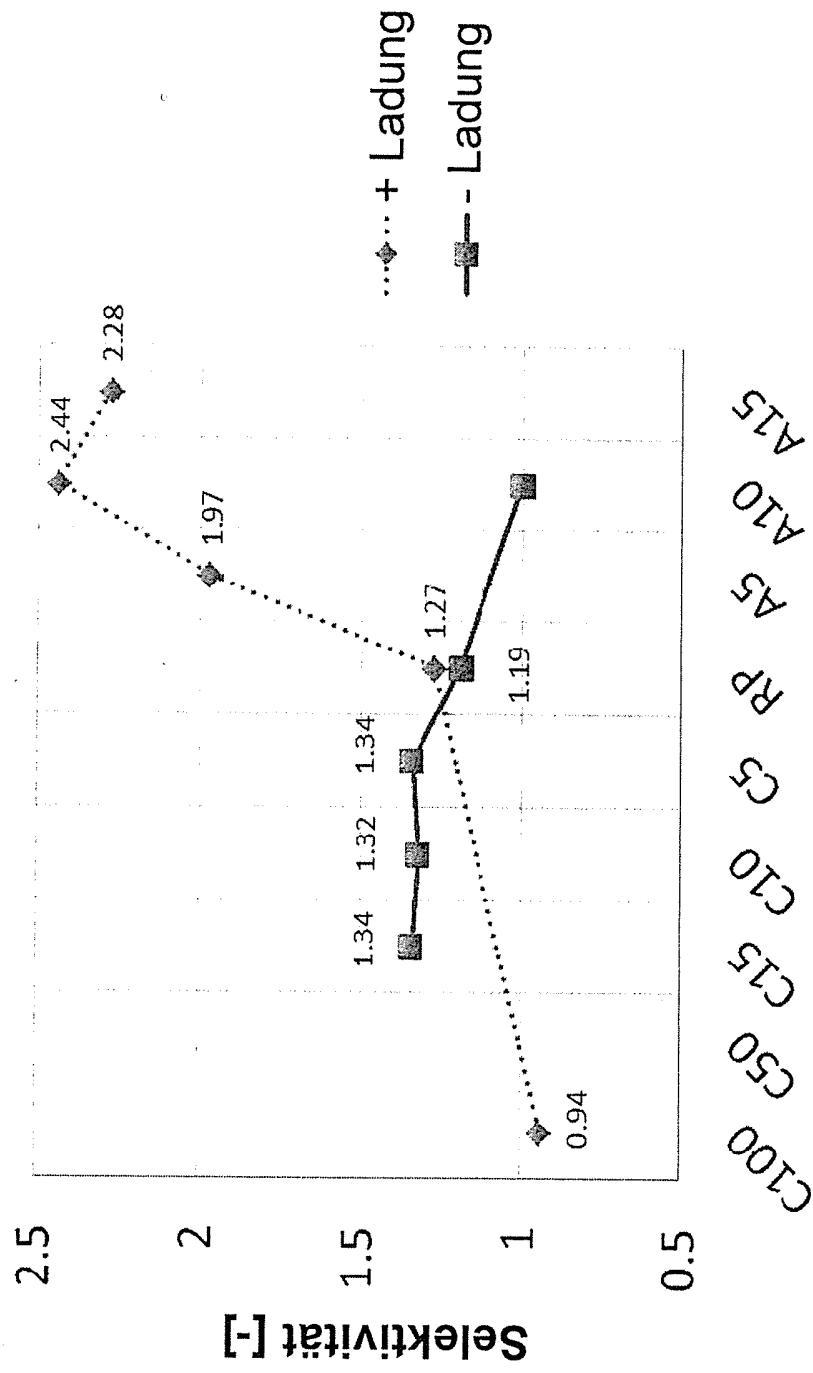
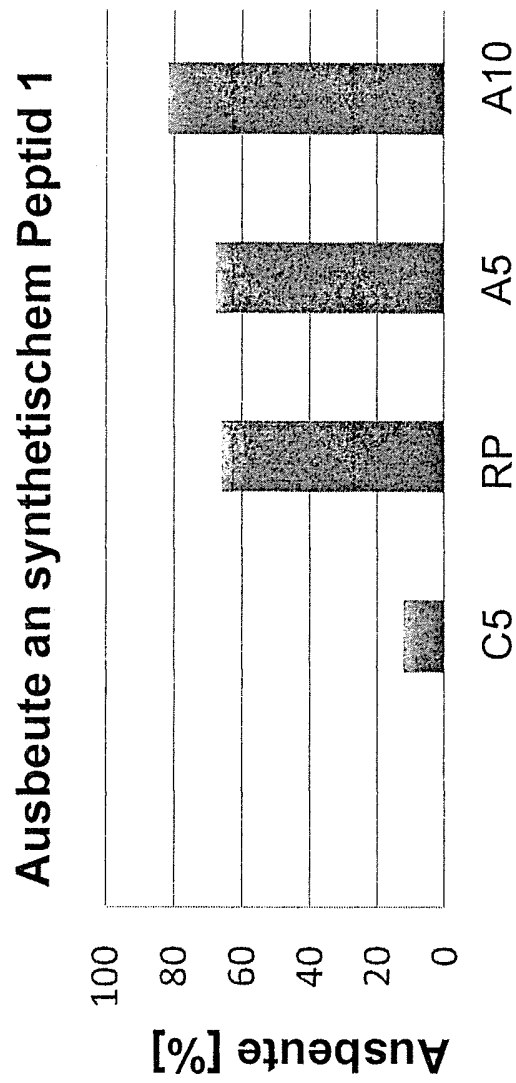


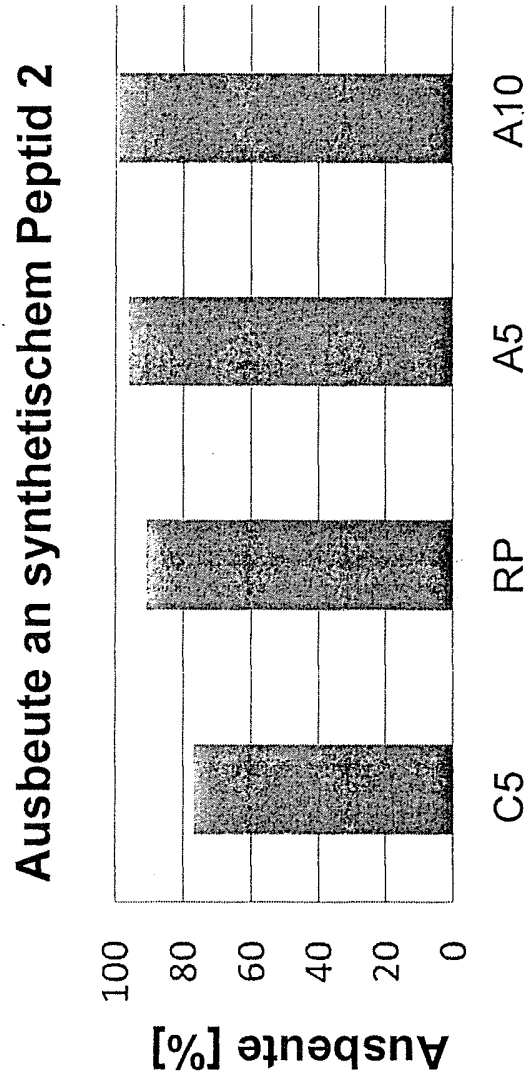
Figure 4b



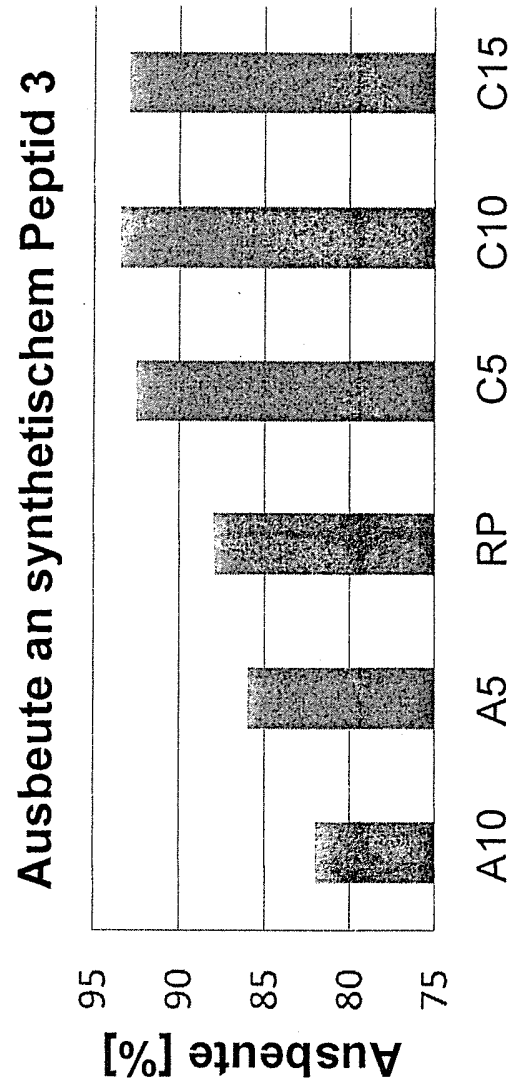
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8

**RECHERCHENBERICHT ZUR
SCHWEIZERISCHEN PATENTANMELDUNG**

Anmeldenummer: CH00439/12

Klassifikation der Anmeldung (IPC):
B01J20/286, G01N30/02, C07K1/20**Recherchierte Sachgebiete (IPC):**
B01D, G01N, B01J**EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE:**

(Referenz des Dokuments, Kategorie, betroffene Ansprüche, Angabe der massgeblichen Teile(*))

- 1 [Online] Epoque, WPI / Thomson, 2011-B41464 [14], WO2011012019 A1 ((CASX) CAS DALIAN CHEM&PHYSICAL INST; (CHSC-N) CHINESE ACAD SCI DALIAN CHEM PHYS INST) 03.02.2011
 Kategorie: **X** Ansprüche: **1-5**
 * Zusammenfassung *
- & WO2011012019 A1 (DALIAN CHEMICAL PHYSICS INST [CN]; GUO ZHIMOU [CN]; LIANG TU [CN]; JIN GAOWA [CN]; LIANG XINMIAO [CN]) 03.02.2011
 Kategorie: **X** Ansprüche: **1-5**
 * Abstract; Abbildungen Seiten 2,7,8,12 *
- 2 [Online] Epoque, WPI / Thomson, 2010-M88537 [68], CN101829551 A ((UYWU) UNIV WUHAN) 15.09.2010
 Kategorie: **A** Ansprüche: **1-5**
 * Zusammenfassung *
- & CN101829551 A (UNIV WUHAN) 15.09.2010
 Kategorie: **A** Ansprüche: **1-5**
 * Abbildungen Seite 2 *
- 3 GB2074892 A ((A B); VARIAN ASSOCIATES) 11.11.1981
 Kategorie: **A** Ansprüche: **1-13**
 * Seite 3, Zeile 68-83;Seite 2, Zeile 76-88 *
- 4 GB2431399 A (AGILENT TECHNOLOGIES INC [US]) 25.04.2007
 Kategorie: **A** Ansprüche: **1-5**
 * Seite 21, § [0075]Seite 2-3 § [0006]-[0007] *

KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE:

X:	stellen für sich alleine genommen die Neuheit und/oder die erfinderische Tätigkeit in Frage	D:	wurden vom Anmelder in der Anmeldung angeführt
Y:	stellen in Kombination mit einem Dokument der selben Kategorie die erfinderische Tätigkeit in Frage	T:	der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze
A:	definieren den allgemeinen Stand der Technik ohne besondere Relevanz bezüglich Neuheit und erfinderischer Tätigkeit	E:	Patentdokumente, deren Anmelde- oder Prioritätsdatum vor dem Anmeldedatum der recherchierten Anmeldung liegt, die aber erst nach diesem Datum veröffentlicht wurden
O:	nichtschriftliche Offenbarung	L:	aus anderen Gründen angeführte Dokumente
P:	wurden zwischen dem Anmeldedatum der recherchierten Patentanmeldung und dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht	&:	Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument

Die Recherche basiert auf der ursprünglich eingereichten Fassung der Patentansprüche. Eine nachträglich eingereichte Neufassung geänderter Patentansprüche (Art. 51, Abs. 2 PatV) wird nicht berücksichtigt.

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt, für die die erforderlichen Gebühren bezahlt wurden.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT

Das Institut betrachtet die vorliegende Patentanmeldung als nicht einheitlich im Sinne von Art. 52 PatG in Verbindung mit Art. 30 PatV. Sie umfasst mehrere technisch nicht zusammenhängende Erfindungen.

Die Patentanmeldung enthält die unabhängigen Patentansprüche 1,6,12 und 13. Damit die Einheit dieser Anmeldung gegeben ist, müssen die Erfindungen, die in diesen unabhängigen Ansprüchen definiert sind, eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen (Art. 52 Abs. 2 PatG). Im vorliegenden Fall scheint uns dieser Zusammenhang von den in Patentanspruch 7, 12 und 13 definierten Verfahren bzw. Verwendung zu dem in den Patentanspruch 1-6 definierten Material durch die Verwendung des Begriffs "in particular" nur optional.

Für die Recherche der Ansprüche 6-11, 12 und 13 wurde dieser Zusammenhang als zwingend angesehen, d.h. die Patentansprüche 6-11, 12 und 13 wurden nur in Zusammenhang mit dem Material, welches in den Patentansprüchen 1-5 definiert ist, durchgeführt.

Da die recherchierbaren Patentansprüche mit einer Recherche erfasst werden konnten, wurde auf die Erhebung von zusätzlichen Recherchegebühren verzichtet.

Rechercheur:	Widmer Christian
Recherchebehörde, Ort:	Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum, Bern
Abschlussdatum der Recherche:	22.06.2012

FAMILIENTABELLE DER ZITIERTEN PATENTDOKUMENTE

Die Familienmitglieder sind gemäss der Datenbank des Europäischen Patentamtes aufgeführt. Das Europäische Patentamt und das Institut für Geistiges Eigentum übernehmen keine Garantie für die Daten. Diese dienen lediglich der zusätzlichen Information.

WO2011012019 A1	03.02.2011	NONE	
CN101829551 A	15.09.2010	NONE	
GB2074892 A	11.11.1981	CA1144138 A1	05.04.1983
		DE3117732 A1	04.03.1982
		GB2074892 A	11.11.1981
		GB2074892 B	08.08.1984
		JP57003043 A	08.01.1982
		US4298500 A	03.11.1981
GB2431399 A	25.04.2007	GB0619984 D0	15.11.2006
		GB2431399 A	25.04.2007
		US2007090052 A1	26.04.2007