

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-169997
(P2014-169997A)

(43) 公開日 平成26年9月18日(2014.9.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/46 (2006.01)	GO 1 N 30/46 A	4 D O 1 7
GO 1 N 30/26 (2006.01)	GO 1 N 30/26 E	
GO 1 N 30/02 (2006.01)	GO 1 N 30/26 H	
BO 1 D 15/00 (2006.01)	GO 1 N 30/02 N	
BO 1 D 15/08 (2006.01)	BO 1 D 15/00 1 O 1 A	

審査請求 有 請求項の数 27 O L 外国語出願 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-31393 (P2014-31393)
 (22) 出願日 平成26年2月21日 (2014.2.21)
 (31) 優先権主張番号 13157388.3
 (32) 優先日 平成25年3月1日 (2013.3.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511163470
 クロマコン アーゲー
 スイス国 8005 チューリヒ テクノ
 パルクシュトラーセ 1
 (74) 代理人 100086759
 弁理士 渡辺 喜平
 (74) 代理人 100109128
 弁理士 岡野 功
 (74) 代理人 100112977
 弁理士 田中 有子
 (74) 代理人 100100608
 弁理士 森島 なるみ
 (74) 代理人 100142099
 弁理士 中山 真一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 濃縮及び単離のためのクロマトグラフィープロセス

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】天然抽出物、化学的又は生物学的合成に由来する混合物から目的化合物を濃縮及び又は単離するための反復的、循環的なクロマトグラフィープロセスを提供する。

【解決手段】目的化合物を、目的ではないその他の化合物を含む混合物から、少なくとも2本のクロマトグラフィー用カラムを使って濃縮するクロマトグラフィープロセスである。プロセスにおいて、少なくとも2本のカラムは、濃縮用と分離用として機能させ、プロセスの途中で、バルブ切換によりカラム位置を逆転させるシーケンスを繰り返す。原料を連続して供給し、目的化合物を系内に残しながら、一方でその他の化合物は、系から排出することにより、目的化合物の濃縮/単離が行われる。

【選択図】 図2

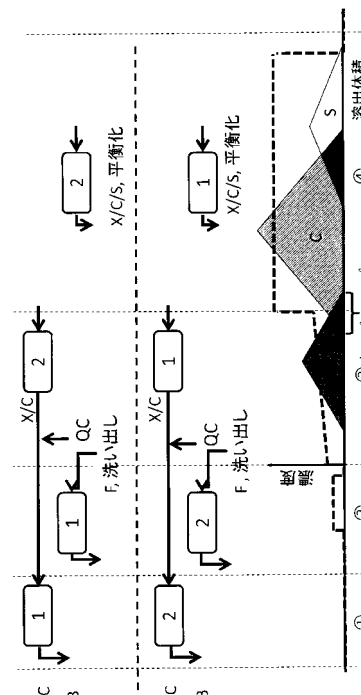


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を、前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) 及び目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W , C , S) を含む混合物 (F) から、少なくとも 2 本のクロマトグラフィー用カラムを使って濃縮するクロマトグラフィープロセスであって、以下の一連の工程を少なくとも含むクロマトグラフィープロセス：

(i) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィー用カラムが、相互接続相 (IC) とそれに続く非接続相 (B) において交互に又は同調して運転され、これら 2 つの相の後に、第 1 のカラム又はカラム群と第 2 のカラム又はカラム群とが位置を交換して、当該循環蓄積相の次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となる循環蓄積相であって、

前記相互接続相 (IC) 又は前記非接続相 (B) の少なくともひとつにおける前記カラム又はカラム群の少なくともひとつに、その入り口を經由して混合物 (F) が供給され、前記循環蓄積相の前記 2 つの相が連続的に M 回行われ、 $M > 1$ である、循環蓄積相；

(ii) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィー用カラムが、相互接続相 (IC) とそれに続く非接続相 (B) において交互に又は同調して運転され、分離サイクルを形成するこれらの 2 相の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、循環分離相の次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となる循環分離相であって、

前記カラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つの他の物質 (W , C , S) が系から排出され、

前記循環分離相の前記 2 相が連続的に N 回行われ、 $N = 0$ である循環分離相；及び

(iii) 相 (i) の終了時又は $N > 0$ の場合において相 (ii) の終了時に前記少なくとも 1 種の目的化合物 (X) を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を、出口を經由して抽出する溶出相。

【請求項 2】

以下の一連の工程を少なくとも含む請求項 1 に記載のクロマトグラフィープロセス：

(i) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィー用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流のカラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群の少なくとも一方にその入り口を經由して前記混合物 (F) が供給され、かつ前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W , C , S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環蓄積相であって、これらの 2 相 (IC , B) の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となり、蓄積の全サイクルを形成し、

そして好ましくは、前記相 (IC , B) の少なくとも一方における前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 種のその他の化合物 (W , C , S) が系から排出され、

前記循環蓄積相の前記 2 相が連続的に M 回行われ、 $M > 1$ である前記循環蓄積相；

(ii) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィー用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群はいずれもその入り口を經由して混合物 (F) が供給されず、しかし前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W , C , S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環分離相であって、これらの2相(IC, B)の後に、前記第1及び第2のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相(IC)及び非接続相(B)となり、分離の全サイクルを形成し、

前記循環分離相の前記2相が連続的にN回行われ、N = 0である前記循環分離相；及び(iii)相(i)の終了時又はN > 0の場合において相(ii)の終了時に前記少なくとも1つの目的化合物(X)を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも1つの目的化合物(X)を出口を経由して抽出する前記溶出相。

【請求項3】

前記蓄積相(i)の非接続相(B)において、その前の相互接続相(IC)において下流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群にその入り口を経由して混合物(F)が供給されるか、又は、前記蓄積相(i)の非接続相(B)において、その前の相互接続相(IC)において上流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群に、その入り口を経由するか、又は、洗浄しかつ平衡化した後のカラムを経由して、混合物(F)が供給される、請求項1又は2に記載のクロマトグラフィープロセス。

10

【請求項4】

前記蓄積相(i)の相互接続相(IC)において、上流のカラム又はカラム群を出る液流の性質を、好ましくはバッファー、溶媒及び/又は変性剤を上流のカラム又はカラム群と下流のカラム又はカラム群との間に導入することにより変える、請求項1～3のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項5】

前記蓄積相(i)の非接続相(B)において、その入り口を経由して混合物(F)が供給されるカラム又はカラム群は、前記非接続相(B)の第1の相においてその入り口を経由して混合物(F)が供給され、前記非接続相(B)の第2の相において、混合物(F)無しに、バッファー、及び/又は溶媒及び/又は変性剤が供給される、請求項1～4のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

20

【請求項6】

前記溶出相(iii)において、溶出される目的化合物(X)を出口分画に供する、請求項1～5のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項7】

前記溶出相(iii)において、前記目的化合物(X)が、第1の上流カラム又はカラム群の出口が第2の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続されている構成において、好ましくはその前の相互接続相(IC)のカラム配置、又はその前の非接続相(B)に続く相互接続相(IC)のカラム配置を使って溶出される、請求項1～6のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

30

【請求項8】

前記目的化合物(X)がクロマトグラフィープロファイル中の吸着性の弱い画分(W)である場合には、前記循環蓄積相(i)の非接続相(B)において、前記循環分離相(ii)のN > 0の場合、混合物(F)が供給されないカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物(C, S)を溶出するように運転され、そしてまた平衡化されることが好ましく、及び/又は、前記目的化合物(X)がクロマトグラフィープロファイル中の吸着性の強い画分(S)である場合には、前記循環蓄積相(i)の非接続相(B)において、前記循環分離相(ii)のN > 0の場合、混合物(F)が供給されないカラム又はカラム群は、平衡化するように運転され、混合物(F)が供給されるカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも1つのその他のより弱く吸着する化合物(W, C)を溶出するように運転されるか、又は、少なくとも1つのその他のより弱く吸着する化合物(W, C)を続く相互接続相(IC)において洗い出すように運転され、及び/又は、

40

前記目的化合物(X)が中間的な吸着性の画分(C)である場合には、前記循環蓄積相(i)の非接続相(B)において、前記循環分離相(ii)のN > 0の場合、混合物(F)が供給されないカラム又はカラム群は、目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物

50

(S)を溶出するように運転され、そしてまた平衡化されることが好ましく、混合物(F)が供給されるカラム又はカラム群は、目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物(W)を溶出するように運転されるか、又は、目的物ではない少なくとも1つのその他のより弱く吸着する化合物(W, C)を続く相互接続相(IC)において洗い出すように運転され、

これらのいずれの場合においても、前記目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物(W, C, S)に隣接して、前記目的化合物(X)の一部も溶出する程度は、好ましくは溶出相(iii)の最終的な溶出液中での前記目的化合物(X)の望ましい濃縮及び/又は絶対濃度の関数として適合される、請求項1~7のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項9】

気体又は超臨界流体が溶媒として使用され、及び/又は、1つの相、特に前記溶出相(iii)が、経時的な移動相の組成変化を含む、請求項1~8のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項10】

M > 2であり、好ましくはM > 6であり、最も好ましくはM > 10であり、好ましくは前記溶出相(iii)で得られる溶出液中における前記目的化合物(X)の絶対濃度が、供給混合物(F)中のそれよりも高い、請求項1~9のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項11】

N > 0であり、好ましくはN > 2であり、最も好ましくはN > 4である、請求項1~10のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項12】

前記循環蓄積相(i)において、2回の非接続相(B)で1回のみ、カラムにその入り口を經由して混合物(F)が供給され、4相(IC, B)の後にのみ、前記第1及び第2のカラム又はカラム群が位置を交換して、前記循環蓄積相の次の相互接続相(IC)と非接続相(B)となり、

及び/又は、前記循環分離相(ii)において、2回の非接続相(B)で1回のみ、目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物(C)が系から排出され、4相(IC, B)の後にのみ、前記第1及び第2のカラム又はカラム群が位置を交換して、前記循環蓄積相の次の相互接続相(IC)と非接続相(B)となる、請求項1~11のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項13】

目的化合物を濃縮、単離、又は発見するための、請求項1~12のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスの使用であって、好ましくは前記プロセスが前記目的化合物を含有する混合物の処理から得られる全クロマトグラフィープロファイルの標的領域について系統的に行われる、使用。

【請求項14】

目的化合物(X)を含有するクロマトグラム中の異なる標的画分を前記クロマトグラフィープロセスに供することにより、又は、同じ標的画分を1回より多い回数前記クロマトグラフィープロセスに供することにより、前記方法を反復して実施する、請求項1~12のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスの使用。

【請求項15】

前記最終溶出相で回収される前記目的化合物の画分を手動又は自動で行われるさらなる処理及び/又はオンライン分析に供し、好ましくは前記さらなる処理が各画分の分析を含み、及び/又は、クロマトグラフィープロセスを含み、及び/又は、質量分析を含み、及び/又は、データベースとの付き合わせを含み、及び/又は、結合アッセイの使用を含み、及び/又は、細胞に基づいたアッセイの使用を含む、請求項1~12のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスの使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然抽出物及び／又は化学的合成及び／又は生物学的合成に由来する混合物から目的化合物を濃縮及び／又は単離するための反復的、循環的なクロマトグラフィープロセスに関する。

【背景技術】

【0002】

従来技術ならびに本発明に関する以下の説明において、「濃縮」及び「単離」という用語は極めて重要であるため、最初にこれらを定義する。

10

【0003】

本明細書の文脈における用語「濃縮」とは、目的化合物及び（目的物ではない）それ以外の化合物を含む混合物から出発して、目的化合物の絶対濃度を連続的又は段階的に増加させるクロマトグラフィープロセスを意味する。従って、クロマトグラフィープロセスの終了時には、結果として得られる混合物中において、目的化合物の濃度は、それ以前よりも絶対的に高い。目的物ではないそれ以外の化合物の絶対濃度は、このようなクロマトグラフィープロセス中に減少することが好ましいが、一定のままであってもよく、又は同様に増加してもよいが、目的化合物の濃度と同程度までには至らないことが好ましい。所望な又は必要な「濃縮」の程度は、目的化合物が必要とされる目的に依存する。例えば、比較的感度の低い方法を、元の混合物中に検出限界又はそれより低い濃度で存在する目的化合物を検出するために使用する場合、必要となる濃縮の程度は非常に高くなるであろう。

20

【0004】

本明細書の文脈における用語「単離」とは、目的化合物及び（目的物ではない）それ以外の化合物を含む混合物から出発して、目的化合物の濃度を、その混合物の（目的物ではない）それ以外の化合物の濃度に比べて増加させるクロマトグラフィープロセスを意味する。それ故、「単離」プロセスの目的は、混合物からそれ以外の化合物を部分的に又は完全に除去することであり、結果として得られる混合物中における目的化合物の絶対濃度は、元の混合物におけるよりも高いことが好ましいが、同等か又は低くてもよい。それ故、「単離」は、目的化合物をより高い純度で得ることを表す。必要な純度水準は、「単離」の目的に依存する。例えば、目的化合物を、他の妨害化合物に非常に敏感なアッセイのために単離する場合は、必要な「単離」の水準は非常に高いであろう。

30

【0005】

クロマトグラフィープロセスにおいては、濃縮と単離の両方が同時に達成できること、即ち、目的化合物が、供給混合物中のそれよりも高い絶対濃度と純度で得られることが理想的である。

【0006】

しかしながら、標準的なクロマトグラフィープロセスにおいては、大抵、多化合物混合物から化合物の濃縮と単離を同時に達成することは満足にはできない。これは、従来のシングルカラムクロマトグラフィープロセス（アフィニティークロマトグラフィープロセスを除く）においては一般に、目的化合物は低濃度で存在し、かつ類似の吸着特性及び／又は分子的特性を持つ多数の妨害不純物（目的物ではないその他の化合物）に取り囲まれているためである。固定相の単位体積当たりの供給混合物の供給量を増加させること（負荷量増加）により濃縮しようとしても、一般的には、目的化合物と妨害不純物のより強いオーバーラップをもたらす。従って、これらのアプローチは、純度を悪化させる。一般に、濃縮における改善は、単離、即ち、結果として得られる純度の程度を妥協させる。負荷量を増やすとオーバーラップが増加するのは、供給混合物中の化合物のクロマトグラフィープロセスに対する吸着特性（等温線効果）と、輸送特性（物質移動特性）のためであり、それぞれ、ピークの変形とピークのブロード化をもたらす。これらの効果は、分析及び分取クロマトグラフィープロセスの両方による目的化合物の濃縮と単離を阻害する。その結果、分析クロマトグ

40

50

ラフィー（少量が負荷される）において、一般的には、目的化合物の濃縮は単に負荷量を増やすだけでは達成できない。分離能を妥協させることなくより多量の目的化合物を得るには、分析クロマトグラフィーにおけると同様の低負荷量を維持しながらクロマトグラフィーカラムをスケールアップする（これは、分析クロマトグラフィー用固定相の高コストと分析クロマトグラフィーの低生産性のため、一般的には経済的に実行不可能である）が、分析の手順を繰り返し行えばよい。従来技術としては、多くの場合、後者が行われる（「回数増加」）。これはサンプリングとハンドリングにおいて多大の労力を意味し、現状においては、経済的に合理的な努力では完全には自動化できない。さらに、分析クロマトグラフィーは通常非常に希釈的であるため、分析クロマトグラフィーを繰り返しても目的化合物は低濃度でしか得られず、その結果、目的化合物の絶対濃度を上げるための時間と資源を消費するその後の諸工程が必要となる。さらに、分析クロマトグラフィーにおけるように少量のサンプルを負荷する場合、十分な濃縮ができず、潜在的な目的化合物の濃度は使用する分析機器の検出限界未満に留まる可能性がある。従って、「回数増加」によって、分離と濃縮は無関係になる。さらなる問題は、クロマトグラフィープロセスの後に、高度に精製された目的化合物の低い濃度を、さらなる用途/分析の目的に適切な濃度値まで上げるのは非常に困難で負担となり、又は現実的にはほとんど不可能であることである。クロマトグラムにおいて混合物中のその他の化合物と完全にオーバーラップする目的化合物を分離する場合（現実にはしばしば見られるケース）、従来のシングルカラムクロマトグラフィーでは限られた純度しか得られない。場合によっては、目的化合物の濃縮度合いと純度は、最初のクロマトグラフィー実施による最も純度の高いサンプルを、供給混合物又は他の純度の高いサンプルと混合してからクロマトグラフィーカラムに再負荷（再クロマトグラフィー）すれば増加させることができる。これは、面倒で時間がかかることのほか、クロマトグラフィーの実施が失敗した場合、部分的に精製した目的化合物を失う危険性を意味するため魅力的ではない。

10

20

30

40

50

【0007】

分取シングルカラムクロマトグラフィーには同様の不利益があるが、分取クロマトグラフィーの固定相は、一般に、より大きい容量とより大きな粒子が特色であり、より高い処理量が許容されるため、濃縮により適している。しかしながら、より大きな粒子とより広い粒径分布のために、物質移動特性は小粒子の分析用固定相よりも悪く、得られる純度を大幅に低下させる。

【0008】

前述の濃縮と分離の同時達成という課題を提起する多成分混合物の例は、医薬製品の特性評価や医薬品開発における不純物プロファイリングという応用分野でしばしば見出され、製品に関連する不純物の濃縮と分離を包含する。具体例としては、化学合成によって製造されたペプチド化合物、DNA/RNA断片、治療用タンパク質のアイソフォーム、断片、凝集体、グリコフォームの単離と濃縮が挙げられるが、これらに限定されない。

【0009】

さらなる例は、生物学的/化学的物質又は天然抽出物に由来する化合物の混合物中にある薬物リードの発見という応用分野において見出される。これらの混合物の多くは、多数の潜在的に有効な物質を含有するが、これらは非常に低濃度でしか存在しないため、さらなる特性評価のために十分な量で分離することはもちろん、検出することは不可能か又は少なくとも非常に困難となる。

【0010】

さらなる例は、生体液からのバイオマーカーの分離や血漿プロテオームの分析のような診断の分野で見いだされる。

【0011】

マルチカラムクロマトグラフィープロセスは、目的化合物の高収率、高純度な精製を可能にする。しかし、ほとんどの場合、目的化合物は吸着性がより弱い又はより強い不純物を伴い、これらは代表的なクロマトグラムにおいて目的化合物とオーバーラップしており、三元分離が必要となる（目的化合物は中央画分に存在する）。先行技術の模擬移動床

クロマトグラフィー（SMB）プロセスは、2元及び擬3元分離にしか適さないため、このプロセスでは目的化合物を満足に同時的に単離及び濃縮することはできない。

【0012】

さらに、同時的な単離と濃縮の課題は、少なくともある応用分野については、マルチラム向流溶媒グラジエント精製法（MCSGP、特にWO2006/116886参照）-MCSGPは3元及びさらに高次の分離に適しているが-によっても最適な状態では実現できない。MCSGPにおいては、分離すべき供給混合物は周期的に分離工程に導入され、目的物は工程から周期的に除かれる。従って、一定の製品プロファイルが維持されるが、それにより低濃縮の2、3の化合物の単離が可能になるだけである。

【発明の概要】

【0013】

上記の2方法SMBとMCSGPは、工業的な大規模精製プロセスにおいて関心が高い、一定の製品品質プロファイルを有する目的化合物の周期的な精製/製造のために設計された。従って、これらの方法は、しばしば上述の応用分野、即ち同時的な濃縮と単離にとって最適なプロセスではない。不純物を含む隣接画分を内部循環させ、再処理することにより、SMB/MCSGPは、等温線と物質移動効果によるピークのブロードニングの影響を補正する。しかしながら、常に目的化合物を供給しかつ単離することで、これらのプロセスでは濃縮はあまりできない（SMBについては、例えばJuza M, Mazzotti M, Morbidelli M, 模擬移動床クロマトグラフィーとそのキラルテクノロジーへの応用、2000、Trends in Biotechnology 18, p 108-118参照；MCSGPについてはWO2006/116886号公報参照）さらに、これらの方法は、多成分の目的化合物の単離用には設計されていない（SMB）か、又は多種製品単離のためにはハードウェア面でかなりの取り組みが必要である（MCSGP、WO2010/079060も参照）。

【0014】

ここに記載の発明は、模擬移動床技術を使用して目的化合物の濃縮を行う新しい方法を提案するものであり、特に混合物から化合物を同時的に濃縮しかつ単離するのに適した反復的、循環的なツインラムクロマトグラフィープロセスに関する。ツインラムという表現は、しかし、ツインのうち的一方又は両方がまた2本以上のラムを直列又は並列に配置したものであり得るという状況を包含する。

【0015】

従って一般的に言えば、本発明は、下記に関する。

少なくとも1つの目的化合物（X）を、前記少なくとも1つの目的化合物（X）及び目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物（W, C, S）を含む混合物（F）から、少なくとも2本のクロマトグラフィー用ラムを使って濃縮するクロマトグラフィープロセスであって、以下の一連の工程を少なくとも含むクロマトグラフィープロセス：

(i) 前記少なくとも2本のクロマトグラフィー用ラムが、相互接続相（IC）とそれに続く非接続相（B）において交互に又は同調して運転され、これら2つの相の後に、第1のラム又はラム群と第2のラム又はラム群とが位置を交換して、当該循環蓄積相の次の相互接続相（IC）及び非接続相（B）となる循環蓄積相であって、

前記相互接続相（IC）又は前記非接続相（B）の少なくともひとつにおける前記ラム又はラム群の少なくともひとつに、その入り口を經由して混合物（F）が供給され、

前記循環蓄積相の前記2つの相が連続的にM回行われ、 $M > 1$ である、循環蓄積相；

(ii) 前記少なくとも2本のクロマトグラフィー用ラムが、相互接続相（IC）とそれに続く非接続相（B）において交互に又は同調して運転され、分離サイクルを形成するこれらの2相の後に、前記第1及び第2のラム又はラム群が位置を交換して、循環分離相の次の相互接続相（IC）及び非接続相（B）となる循環分離相であって、

前記ラム又はラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも1つの他の物質（W, C, S）が系から排出され、

前記循環分離相の前記2相が連続的にN回行われ、 $N \geq 0$ である循環分離相；及び

(iii) 相(i)の終了時又は $N > 0$ の場合において相(ii)の終了時に前記少なくとも

10

20

30

40

50

1種の目的化合物(X)を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも1つの目的化合物(X)を、出口を経由して抽出する溶出相。

前記循環的濃縮相と前記循環分離相において、カラムの位置の交換は、2つのカラム(又はカラム群)が、1回のIC相と1回のB相の後に交換され、前の上流カラム(又はカラム群)が下流カラム(又はカラム群)になり、前の下流カラム(又はカラム群)が上流カラム(又はカラム群)になることを意味する。この交換はそれぞれのバルブの切り替えによって行われる。

【0016】

例えばMCSGP(WO2006/116886)のような従来技術による方法とは対照的に、前記目的化合物(X)はこのように全ての工程において系外に取り出されず、本方法は、原料を連続して供給しながら目的化合物(X)は系内に残し、一方でその他の化合物は、好ましくは系から排出されることができる。その結果、最終溶出液内の目的化合物(X)の絶対濃度は、供給混合物中におけるよりも高くなり、しかもその他の化合物が系から同時に排出される場合、その他の目的ではない化合物に対する目的化合物(X)の相対濃度は劇的に増加する。従って、その結果は濃縮であり、特にNが0よりも大、好ましくは1又は2よりも大であるように選択すると、目的物ではない化合物が系から本質的に完全に除去された単離の状態にまで進めることができる。

10

【0017】

尚、前記非接続相(B、バッチモード)と前記相互接続相(IC)は、順序的には下記に説明するとおりでかつ2つのカラムを使用する場合に実現される通りであってもよいし、また前記2相を同時に行うことも可能であるが、この場合は3つ以上のカラムが必要である。

20

【0018】

本方法の循環相において(即ち前記濃縮相また及び/又は前記分離相)、カラムは相互接続配置「IC」及び非接続配置「B」で操作される。相互接続配置においては、上流のカラムの出口は下流のカラムの入り口に流体接続され、化合物を上流カラムから下流のカラム(又はそれぞれのカラム群)に洗い出すことが可能になる。非接続の配置においては、カラムは独立した液体入り口と出口を有する(カラムのバッチモード)。

【0019】

本方法の循環相中、非接続と相互接続のカラム配置は、規定された時間の後交代する。これらの2種の配置は、以下において「非接続相」(B)及び「相互接続相」(IC)と称する。相互接続相(IC)と非接続相(B)のシーケンスが完了すると、上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになるようにカラムが位置を変えて、このシーケンスが繰り返される。実際には、切り替えはカラムを物理的に移動させるのではなく、バルブを使って液体路を変更することにより行われる。シーケンスIC Bを繰り返し、かつカラムが位置を切り替えた後に、カラムは元の位置に戻る、即ち最初に上流にあったカラムは上流の位置に戻り、最初下流にあったカラムは下流のカラム位置に戻る。一つの相互接続(IC)と一つの非接続(B)の状態のシーケンスは「切替え」と呼ぶ。一方、2度の連続した切り替えは「サイクル」を形成する。

30

【0020】

1切替え時間 t^* 後又は内に、カラムは溶媒の流れの一般的方向と逆の方向に位置を変える。従って、切替え時間は、1つの相互接続(IC)と1つの非接続(B)の状態の1シーケンスが要する時間である。

40

【0021】

もう少し具体的に表現すると、前記反復的方法は、好ましくは少なくとも一連の以下の工程から成る。

(i) 前記少なくとも2本のクロマトグラフカラムが

a. 上流のカラムから下流のカラム又はカラム群に目的化合物(X)の少なくとも一部を移送するために、第1の上流カラム又はカラム群の出口が第2の下流のカラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相(IC)とそれに続いて

50

b. 第1の上流カラム又はカラム群と第2の下流のカラム又はカラム群は流体接続されておらず、少なくとも1種のカラム又はカラム群がその入り口を經由して前記混合物(F)を供給され、かつ前記第1また及び/又は第2のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記少なくとも1種の、目的物ではないその他の化合物(W、C、S)が系から排出される非接続相(B)で交互に稼働させることを特徴とする前記循環蓄積相であって、これらの2相(IC、B)の後に、第1と第2のカラム又はカラム群が位置を交換して次の相互接続相(IC)と非接続相(B)を実行して濃縮の全サイクルを形成し、循環蓄積相の前記2相が連続的にM回行われ、 $M > 1$ であることを特徴とする循環蓄積相(ここで、この循環的濃縮相において、前記相(IC、B)の少なくとも一方の状態にある前記第1及び/又は第2のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記少なくとも1種の、目的物ではないその他の化合物(W、C、S)が系から排出されることは可能でありかつ好ましいことを注記する)、

10

(ii) 前記少なくとも2本のクロマトグラフィー用カラムが

a. 上流のカラムから下流のカラム又はカラム群に目的化合物(X)の少なくとも一部を移送するために、第1の上流カラム又はカラム群の出口が第2の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相(IC)とそれに続いて

b. 第1の上流カラム又はカラム群と第2の下流のカラム又はカラム群は流体接続されておらず、カラム又はカラム群はいずれもその入り口を經由して前記混合物(F)を供給されず、しかし前記第1及び/又は第2のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記少なくとも1つの、目的物ではないその他の化合物(W、C、S)が系から排出される非接続相(B)で交互に稼働させる前記分離相であって、これらの2相(IC、B)の後に、第1と第2のカラム又はカラム群が位置を交換して次の相互接続相(IC)と非接続相(B)を実行して分離の全サイクルを形成し、循環分離相の前記2相が連続的にN回行われ、 $N > 0$ であることを特徴とする循環分離相、及び

20

(iii) 相(i)の終了時又は相(ii)の終了時に $N > 0$ の場合において、前記少なくとも1つの目的化合物(X)を含有する前記カラム又はカラム群から前記少なくとも1つの目的化合物(X)を出口を經由して抽出することを特徴とする前記溶出相。

【0022】

従って本発明は、好ましくは目的物Xと少なくとも他の1つ又は、しばしば目的物ではない他の種類の混合物であるその他の化合物を含む混合物からXを単離するためのクロマトグラフィープロセスであって、少なくとも2つのカラムと少なくとも2種の連続する相、即ち

30

(i) 目的化合物の濃縮のための循環相であって、少なくとも2つのクロマトグラフィー用カラムが周期的に相互接続(IC)されたり、非接続(B)にされたりすることにより、相互接続の間に目的物を一方のカラムから他方へ移送するとともに、非接続の間に新しい供給混合物を一方のカラムに適用すると共に他方のカラムから目的物でない化合物を除去する循環相、及び

(iii) カラムから目的化合物を回収する最終の溶出相から成る。

【0023】

濃縮のための循環相(i)の後に、任意で循環分離相(ii)があってもよく、分離相では少なくとも2つのクロマトグラフィー用カラムが周期的に相互接続されたり、非接続にされたりすることにより、相互接続の間に目的化合物を一方のカラムから他方へ移送し、非接続の間、原料混合物はいずれのカラムにも適用されず、前記循環分離相に続いてカラムから目的化合物を回収する最終の溶出相(iii)が行われる。

40

【0024】

好ましい実施形態によれば、濃縮相(i)の非接続相(B)において、その前の相互接続相(IC)においては下流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群にその入り口を經由して混合物(F)が供給される。さらに別の好ましい実施形態によれば、濃縮相(i)の非接続相(B)において、その前の相互接続相(IC)において下流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群にその入り口を經由して混合物(F)が供給され

50

る、又は初めに洗浄されかつ平衡化された後、このカラムに混合物（F）が供給される。

【0025】

濃縮相（i）の相互接続相（IC）において、上流のカラム又はカラム群を出る液流の性質は、好ましくはバッファ、溶媒及び/又は変性剤を上流のカラム又はカラム群と下流のカラム又はカラム群の間で導入することにより変えることができる。

【0026】

濃縮相（i）の非接続相（B）において、その入り口を経由して混合物（F）を供給されるカラム又はカラム群は、非接続相（B）の第1の相においてその入り口経由で混合物（F）を供給され、非接続相（B）の第2の相において、混合物（F）は無しにバッファ及び/又は溶媒及び/又は変性剤を供給することが好ましい。

10

【0027】

溶出相（iii）において、溶出される目的化合物（X）は、出口分画に付すことができる。

【0028】

溶出相（iii）において、目的化合物（X）は、第1の上流カラム又はカラム群の出口が第2の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続されている配置で、好ましくはその前の相互接続された相（IC）、又はその前の非接続相（B）に続く相互接続相（IC）のカラム配置を使って溶出することができる。

【0029】

目的化合物（X）がクロマトグラフィー溶出プロファイル中の吸着性の弱い画分（W）である場合、循環蓄積相（i）の非接続相（B）において、また循環分離相（ii）の $N > 0$ の場合、混合物（F）が供給されないカラム又はカラム群は、前記少なくとも1つの、より強く吸着するその他の目的物ではない化合物（C、S）を溶出するように運転されることが好ましく、また平衡化されることが好ましい。

20

【0030】

目的化合物（X）がクロマトグラフ溶出プロファイル中の吸着性の強い画分（S）である場合、循環蓄積相（i）の非接続相（B）において、また循環分離相（ii）の $N > 0$ の場合、混合物（F）が供給されないカラム又はカラム群は、平衡化するように運転することが好ましく、混合物（F）が供給されるカラム又はカラム群は、前記少なくとも1つの、より弱く吸着するその他の目的物ではない化合物（W、C）を溶出するように運転することが好ましい。それに加えて又はその代わりに、W、Cは次の相互接続相（IC）の間に除去されても良い。

30

【0031】

目的化合物（X）が中間的な吸着性の画分（C）である場合、循環蓄積相（i）の非接続相（B）において、また循環分離相（ii）の $N > 0$ の場合、混合物（F）が供給されないカラム又はカラム群は、少なくとも1種のその他の目的物ではない化合物（S）を溶出するように運転され、またさらに平衡化されることが好ましい。また混合物（F）が供給されるカラム又はカラム群は、少なくとも1つのその他の化合物（W）を溶出するように、又は前記少なくとも1つのその他の目的物ではない弱く吸着する化合物（W、C）が、続く相互接続相（IC）の間に洗い出されるように運転される。

40

【0032】

尚、この最後のシナリオにおいて、その方法は、目的化合物が不要な化合物の幅広いプロファイルで完全にカバーされる時の濃縮にも使用できる。この場合、原料を継続供給しながらこの広いプロファイルの左右のテールを繰り返しカットオフすることによって、不要な化合物は連続的に除去されるため、目的とする化合物の同時的な濃縮と単離が達成される。

【0033】

これらのいずれのケースにおいても、前記少なくとも1つの目的物ではない其他化合物（W、C、S）に隣り合って、一部の目的化合物（X）も溶出する程度は、溶出相（iii）の最終的な溶出液中での目的化合物（X）の望ましい濃縮また及び/又は単離の関数

50

として適応させることが好ましい。目的化合物(X)と不要な化合物とのオーバーラップが系内に残らないようなカットオフを選択することも可能であるが、これは系からの目的化合物(X)の継続的な部分的流出の原因となる。カットオフは、目的化合物(X)と不要化合物のオーバーラップ全体が系内に残るように選択できるが、これは低純度又はMまた及び/又はNの必要サイクル数が増える原因となる。また、例えば循環蓄積相では目的化合物(X)と不要化合物とのオーバーラップ全体を残すが、一方分離相では目的化合物(X)と不要化合物とのオーバーラップが系に残らないようにカットオフを選択することにより、可変カットオフ戦略も可能である。

【0034】

液体、気体又は超臨界流体が移動相として使用できる。

10

【0035】

1つの相、特に溶出相(iii)は、経時的な移動相の組成変化を伴う可能性がある。

【0036】

提案された方法の好ましい実施例によれば、 $M > 2$ であり、好ましくは $M > 6$ であり、最も好ましくは $M > 10$ である。溶出相(iii)で得られる溶出液中における目的化合物(X)の絶対濃度は、供給混合物中のそれよりも高いことが好ましい。

【0037】

さらに他の好ましい実施例によれば、 $N > 0$ であり、好ましくは $N > 2$ であり、最も好ましくは $N > 4$ である。

【0038】

20

さらに、本発明は、上記で概説したようなクロマトグラフィープロセスの利用に関するものであり、最後の溶出相で回収される目的化合物の画分が、手動又は自動で行われるさらなる処理及び/又はオンライン分析に付されることを特徴とする。さらなる処理としては各画分の分析が挙げられ、及び/又はクロマトグラフ法が挙げられ、及び/又は質量分析が挙げられ、及び/又はデータベースとの付け合わせが挙げられ、及び/又は結合アッセイが挙げられ、及び/又は細胞アッセイの使用が挙げられる。

【0039】

さらに、本発明は、上記で概説したように目的化合物を濃縮し、単離し、又は発見するためのクロマトグラフィープロセスの利用に関するものであり、前記方法は目的化合物を含有する混合物の処理から得られる全クロマトグラフプロファイルの標的領域について系統的に行うことが好ましい。

30

【0040】

さらに、本発明は、上記で概説したようなクロマトグラフィープロセスの利用に関するものであり、該方法は、目的化合物(X)を含むクロマトグラム中のいくつかの標的画分を該方法に付す又は同じ標的画分を2回以上該方法に付すことにより反復的に実施されることを特徴とする。

【0041】

従って、本方法は、一般的には、循環蓄積相、任意の循環分離相及び最終の溶出相から成り、そしてそれらの工程は、本方法のツインカラムの実施形態を示す図1に模式的に示したように連続的に実施される。

40

【0042】

本方法の循環相の間、2本のカラムは連続的に4種の異なる位置(1-4)を占め、これらは異なる工程作業に対応する。

【0043】

1回の切り替えの間に、一方のカラムは位置1、2の作業を実行し、他のカラムは位置3、4の作業を実行する。1サイクルは、一本のカラムが4つの異なる位置(1-4)を順番に占めたことに相当する。2本のカラムは、位置を・・ 1 2 3 4 1 2
・・の順に切り替える。従って、1サイクルの間に、各カラムは工程系統図中の可能な各位置を通過し、元の位置に戻る。

【0044】

50

循環蓄積相 (i) は、目的化合物を濃縮し、かつ同時に不純物を除去する役割を果たす。本相では、原液供給下、非接続相 (B) と相互接続相 (IC) の順序が下記のように交互に入れ替わる。

【0045】

循環蓄積相における非接続相 B において、供給混合物をクロマトグラフカラムの1つ又は両方のカラムに適用すると、目的化合物はカラムに吸着され、一方、目的物でない化合物は洗い出される。典型的には、原液供給工程の後に不純物を除去するための別の洗浄工程がある。さらに、不純物除去のために、変性剤のグラジエントを流してもよい。同時に、他のカラムから、目的物でない化合物を洗い出し (洗浄) かつカラムを平衡化する (主に、最も弱く吸着する化合物が目的物である場合、又は中間的な吸着特性を持つ化合物が目的物である場合) か又は、単にカラムを適当な溶媒又はバッファーを使用して平衡化する (主に、最も強く吸着する化合物が目的物である場合)。その後、前記洗浄し平衡化したカラムに新しい原液を負荷してもよい。カラムが非接続配置である間、両方のカラムについて追加の洗浄、グラジエント、洗浄、待機及び / 又は平衡化の工程を実施してもよい。それに関し、場合によっては、次の相互接続相において下流のカラムとなるカラムは、相互接続相に入る前に、確実に少なくとも洗浄し平衡化され、また任意に負荷されることが重要であろう。バッチモードの位置におけるカラムの1つ1つの作業は、従って、カラムの利用が最適化されかつ潜在的な待ち時間が最小化されるように分配することができる。一例として、下位作業の所要時間が次のようである場合：(カラム1) 原液供給：3分、洗浄：5分；(カラム2) 洗浄：2分、平衡化6分とすると、3分 + 5分 = 2分 + 6分 = 8分となる。従って、カラム1と2は同じ時間占有されており、時間の利用は最適である。

10

20

【0046】

対照的に、より徹底的な洗浄が必要とされ、洗浄時間が2分でなく6分であるとする、カラム2は6分 + 6分 = 12分占有されるが、一方、カラム1は8分占有される。2つのカラムの占有時間を一致させるために4分間という待ち時間を導入する代わりに、例えば不純物を除去するため、カラム1で4分間のグラジエントを開始することができる。他のケースでは、負荷工程に続く洗浄工程が時間を決定すると仮定して、洗浄と平衡化を行ったカラム位置で原液供給を行ってもよい。任意の待機工程 (最小化されるべきである) の間、カラムの1つでは溶媒は流れない。

30

【0047】

循環蓄積相の相互接続相 IC において、目的化合物は上流のカラムから下流のカラムへ洗い出され、そこに吸着される。目的化合物の上流カラムからの脱着は適切な移動相 (バッファー / 溶媒) を用いて実現される。下流のカラムにおける吸着は、上流のカラムを出る液流の物理化学的性質を、例えば他の液流でライン内希釈して変えることによって可能になる。

【0048】

循環分離相 (ii) は、不純物の除去と目的化合物の単離に役立つ。この任意の相では、原液の供給は無しに、非接続相 (B) と相互接続相 (IC) の順序が交互に入れ替わる。

【0049】

循環分離相においては、循環蓄積相と同じカラム配置と相が用いられる。しかし、原液の供給は止められる。非接続状態での不純物除去は残るので、系内に残る目的化合物はさらに精製される。さらに、相互接続状態では、目的化合物は、よりよく類別され、化合物間の分離も良い。

40

【0050】

不純物の除去と目的化合物間の分離を最適化するために、流量、移動相組成物及び IC 相と B 相の持続時間の選択は、循環蓄積相とは異なってもよい。

【0051】

最終溶出相 (iii) の目的は、目的化合物の単離である。最終溶出相において、カラムは1つの配置のみで存在する。目的化合物は、それぞれのクロマトグラフィー用カラムか

50

ら適切な移動相（バッファー／溶媒）を使用して洗い出される。分離をさらに向上させるため、目的の化合物を含有しないカラムは、洗浄され、平衡化されそして目的化合物を含有するカラムと相互接続されてもよいが、この時平衡化されたカラムは下流位置に置かれる。次いで、目的化合物は、上流カラムから下流カラムを通して洗い出されるが、これによって分離は他のカラムを使わないで直接洗い出すのに比べてさらに改良される。

【0052】

典型的には、異なる目的化合物を異なる画分に分離するため、カラムから出る液流は分画される。同時に、クロマトグラフィープロファイルが、典型的には適切なオンライン分析を使ってモニターされる。オンライン分析からの情報は、また分画の間隔を調節するために使ってもよい。濃縮され、かつ単離された目的化合物は、今やさらなる分析と処理のために利用できる。任意であるが、溶出相において、オンライン測定器を、プロセスを実行する装置に連結してもよい。プロセスの他の相に比べて、最終溶出相は1度実施されるのみである。移動相の流量、組成、及び最終溶出相の持続時間は、目的化合物の分離を最適化するため前記IC相及びB相で用いる条件とかなり違っていてもよい。循環蓄積相でプロセスに供給された目的化合物は、最終溶出相において高純度で回収される。

10

【0053】

循環濃縮、分離及び最終溶出相を含む全体のプロセスフローシートを図1に模式的に示す。濃縮相で行われる切り替えの回数、 M (M は2以上の正の整数である)は、目的化合物の要求濃縮度に依存し、原液中のそれらの濃度とその供給量から試算できる。濃縮相の間、原液供給はアクティブである。分離相で行われる切り替えの回数、 N (N は負ではない整数である)は、目的化合物の要求純度に依存する。目的化合物の要求純度が低い場合は、循環分離相は省略してもよい ($N = 0$)。

20

【0054】

濃縮相と分離相をそれぞれ完全なサイクルの後（偶数回数の切替えに相当する）に停止する代わりに、両相はまた半サイクル（切替え）で停止してもよい。後者の場合、正しいカラムから目的化合物を溶出するために、循環蓄積相及び循環分離相の後の相は調整する必要がある。

【0055】

最終溶出相において、目的化合物を含有するカラムは溶出され、濃縮と単離のプロセスは完了する。

30

【0056】

本発明においては、MCSGPやSMBのような他の循環クロマトグラフィープロセスとは対照的に、目的化合物は最終の溶出相でのみ、循環的でない方法で単離される。これはWO-A-2006/116886に記載された方法から部分を除いたものに相当する。定常的な循環状態には至らないため、この特徴は、MCSGPによって得られるよりもはるかに大きな濃縮を可能にする。MCSGPは、一旦定常的な循環状態に到達すると、生成物は一定の純度プロファイルを持つ工程から取り出されるため、分離及び最終溶出相を特徴とはしない。SMBと対照的に、本新規方法は、生成物のオーバーラップがある三元混合物からも化合物を単離することが可能であり、またステップグラジエント以外の溶媒グラジエントを実施でき、これは前記記載された応用分野において非常に重要である。

40

【0057】

濃縮及び同時に行われる妨害化合物の繰り返し除去を通して、本提示プロセスは、以前は先行技術のクロマトグラフィープロセスを使用しても検出可能ではなかった化合物の発見と単離を可能にする。本方法は、非常に敏感な分析方法と結合させることによって現存の発見プロセスと一体化することができる。

【0058】

このように、MCSGP/SMBと本新規方法はかなり異なった環境で応用することができる：MCSGPは、主としてクロマトグラフィープロセスの間中一定の製品品質を持つ化合物の連続生産の場で（例えば、医薬品製造）；そして本新規クロマトグラフィー

50

ロセスは、発見と研究の環境の中、化合物の濃縮と単離の場で（例えば、医薬品のスクリーニング、医薬品開発、そして医薬品の特性評価）。

【0059】

以下、応用事例を説明するが、そこでは目的化合物は、a) 溶出が遅い不純物のみに伴伴されている、b) 溶出の速い不純物にのみ伴伴されている、c) 溶出の早い不純物と溶出の遅い不純物の両方に伴伴されている。例を分かりやすくするために、Wで示される弱吸着性の（溶出の速い）画分、中間の画分C、及びSで示される強吸着性（溶出が遅い）の画分を持つプロファイルを仮定した。次に、目的の画分は、目的の画分又は目的化合物の吸着性が前記の弱い、中間、又は強い画分であるか否かによって、これらをXで置き換えることによって示される。

10

【0060】

目的化合物が溶出の遅い不純物のみに伴伴されている場合（a）、本質的に二元分離を必要とするが、その濃縮相の詳細なプロセス概略図を図2に示す。カラム（1、2）は同時に位置1、3の作業（相互接続「IC」状態での作業）と位置2、4での作業（非接続の、バッチ「B」状態での作業）を実行する。プロセスの作業は、1 2 3 4 1 ···（カラム1）及び3 4 1 2 3 ···（カラム2）の順に実施され、両カラムはその順に位置を切り替える。図2における縦の破線は、各セクションの境界を示し、かつそのセクションで流す溶媒の条件（例えば、グラジエントの一部）を示す。相互接続状態において、目的化合物、Xは上流から下流のカラム（位置1、3）へ内部で再循環される。目的物ではない化合物Cは、部分的に内部で再循環されるかもしれないが（Xとの

20

【0061】

作業2は、X、C、Sを含有する原液の下流カラムへの供給を包含する。さらに作業2は、Xを下流のカラム内に保持する洗浄工程も包含してもよい。作業2と並行して、上流のカラムでは作業4が実施される。作業4は、CとSの除去及びカラムの再平衡化を包含する。XとCのオーバーラップ次第で、Xの一部も除去される可能性がある。

30

【0062】

作業2と4が完了した時点で、両カラムは位置を切り替え、上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。

【0063】

両カラムは、次に再び接続され、カラムの順序逆にしてICとBのプロセス作業を繰り返す。ICとBが完了した時点で、両カラムは再び位置を切り替えて、上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。両カラムは、今や元の位置に戻り、1サイクルが完了したことになる。

【0064】

目的化合物が溶出の速い不純物のみに伴伴されている場合（b）、本質的に二元分離を必要とするが、その濃縮相の詳細なプロセス概略図を図3に示す。2つのカラム（1、2）は同時に位置1、3での作業（相互接続「IC」状態での作業）と位置2、4での作業（非接続の、バッチ「B」状態での作業）を実行する。プロセスの作業は、1 2 3 4 1 ···（カラム1）及び3 4 1 2 3 ···（カラム2）の順に実施され、両カラムはその順に位置を切り替える。相互接続状態において、目的化合物、Xは上流から下流のカラム（位置1、3）へ内部で再循環される。目的物ではない化合物Cは部分的に内部で再循環されるかもしれないが（Xとのオーバーラップ次第で）、大部分は、負荷（作業2）後の洗浄又はグラジエント工程で除去されている筈である。Xを下流のカラムに結合させるために、上流のカラムを出る液流の性質を変えて（例えば、液流QCによるライン内希釈により）混合液流の性質がXの吸着を有利にするようにする。相互接続状

40

50

態の作業 1, 3 を完了したのち、両カラムは接続をはずされ、それぞれプロセス作業 2、4 を実施する。

【0065】

作業 2 は、W、C、X を含有する原液の下流カラムへの供給を包含する。原液の負荷の後には洗浄工程があり、W と C を除去するために実施される。図に示すように、W と C を除去するために作業 2 において変性剤のグラジエントを使用してもよい。作業 2 と並行して、上流のカラムでは作業 4 が実施される。作業 4 は、必要な場合、より完全な洗浄を包含するが、少なくともカラムの再平衡化を包含する。

【0066】

作業 2 と 4 が完了した時点で、両カラムは位置を切り替えて上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。

10

【0067】

両カラムは、次に再び接続され、カラムの順序を逆にして I C と B のプロセス作業を繰り返す。I C と B が完了した時点で、両カラムは再び位置を切り替えて上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。両カラムは、今や元の位置に戻り、1 サイクルが完了したことになる。

【0068】

目的化合物が溶出の速い不純物と遅い不純物の両方に同伴されている場合 (c)、本質的に三元分離を必要とし、その濃縮相の詳細なプロセス概略図を図 4 に示す。2 つのカラム (1、2) は同時に位置 1、3 での作業 (相互接続「I C」状態での作業) と位置 2、4 での作業 (非接続の、バッチ「B」状態での作業) を実行する。プロセスの作業は、1 2 3 4 1・・・(カラム 1) 及び 3 4 1 2 3・・・(カラム 2) の順に実施され、両カラムはその順に位置を切り替える。相互接続状態において、目的化合物、X は上流から下流のカラム (位置 1、3) へ内部で再循環される。目的物ではない化合物 W は、部分的に内部で再循環されるかもしれないが (X とのオーバーラップ次第で)、大部分は、負荷 (作業 2) 後の洗浄又はグラジエント工程で除去されている筈である。さらに、目的物ではない化合物 S は、部分的に内部で再循環されるかもしれないが (X とのオーバーラップ次第で)、大部分は上流のカラムに残る。

20

【0069】

X を下流のカラムに結合させるために、上流のカラムを出る液流の性質を変えて (例えば、液流 Q C によるライン内希釈により) 混合液流の性質が X の吸着を有利にするようにする。相互接続状態の作業 1, 3 を完了したのち、両カラムは接続をはずされ、それぞれプロセス作業 2、4 を実施する。作業 2 は、W、X、S を含有する原液の下流カラムへの供給を包含する。さらに、作業 2 は洗浄工程を包含してもよい。図に示すように、W を除去するために、作業 2 で変性剤のグラジエントを使用することもできる。W と X のオーバーラップ次第で、X の一部も除去される可能性がある。作業 2 と並行して、上流のカラムでは作業 4 が実施される。作業 4 は、S の除去とカラムの再平衡化を包含する。X と S のオーバーラップ次第で、X の一部も除去される可能性がある。

30

【0070】

作業 2 と 4 が完了した時点で、両カラムは位置を切り替え、上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。

40

【0071】

両カラムは、次に再び接続され、カラムの順序を逆にして、I C と B のプロセス作業を繰り返す。I C と B が完了した時点で、両カラムは位置を切り替え、上流のカラムが下流のカラムになり、下流のカラムが上流のカラムになる。両カラムは、今や元の位置に戻り、1 サイクルが完了したことになる。

【0072】

目的化合物は、また多数の化合物を含む可能性がある。一例として、4 種の目的化合物 X 1、X 2、X 3、X 4 の混合物について、本プロセスの濃縮相を、図 5 に模式的に示す。相互接続状態 I C において、X 1 と X 4 は部分的に、X 2 と X 3 は完全に上流から下流

50

のカラムへ再循環される。次の非接続状態 B において、溶出の速い不純物 W 及び溶出の遅い不純物 S とオーバーラップしている X 1 と X 4 の残存部分が、それぞれ W と S とともに除去される。オーバーラップ部分を完全又は部分的に除去することにより、目的物ではない化合物は濃縮されないことが保証される。多数の化合物を含む X のためのプロセス作業は、上述 (c) のように実施され、その説明は図 2 及び図 3 で説明したケースにも有効である。

【0073】

カラムの切り替え (上流のカラムと下流のカラムが位置を切り替える) は、カラムが相互接続状態の作業 (1、3) を完了した後にも実施してもよいことは特筆に値する。カラムがバッチモードの位置にいる時は、上流及び下流の位置概念は当てはまらない。従って、図 1 - 5 及び 12 において、カラム 1 をバッチ状態の下流位置に示した表現は偶然である。しかしながら、相互接続状態で上流の位置にあったカラムが、続くバッチ状態で少なくとも洗い出し作業 (作業 4) を果たし、また相互接続状態で下流の位置にあったカラムが、そのバッチ状態で少なくとも原液供給又は洗い出し作業 (作業 2) を果たすことが重要である。その後、バッチ状態で少なくとも洗浄の役割を果たしたカラムが、次の相互接続状態で下流のカラムになり (作業 1)、また原料供給又は洗い出し作業を果たしたカラムが、その相互接続状態で上流のカラムになる (作業 3) になることが重要である。

10

【0074】

目的化合物 X 1、X 2 は、また、溶出が早いものと遅いものの中央に溶出する目的化合物ではない化合物 C を取り巻いているかもしれない。これには、1 つだけの目的化合物 X が不純物 C とオーバーラップするが、C を超えて広がり、そのため図 12 に模式的に示すようにプロファイルの前と後ろで比較的 X の純度が高いケースが含まれる。この場合、循環蓄積相と分離相は、速い溶出と遅い溶出の目的化合物をそれぞれ内部循環するための 2 つの相互接続状態と、1 つの非接続状態は 1 つのカラムに原液を供給し、他のカラムから成分 C を除去するためのものであり、他のバッチ状態は 1 つのカラムを洗浄し、他のカラムを洗浄 / 平衡化するためのものである 2 つの非接続状態を含む。

20

【0075】

この断続的な原液給は、一般的に言えば、循環蓄積相 (i) において、2 回眼ごとの非接続相 (B) でのみカラムに入り口から混合物 (F) が供給され、また 4 相 (IC、B) の後にのみ第 1 と第 2 のカラム又はカラム群が位置を取り換えて、濃縮相の次の相互接続 (IC) と非接続 (B) 相が実行されることにより実現される。

30

【0076】

この断続的な抽出は、一般的に言えば、循環分離相 (ii) において 2 回目ごとの非接続相 (B) でのみ少なくとも 1 種の目的物ではないその他の化合物 (C) が系から排出され、また 4 相 (IC、B) の後にのみ第 1 と第 2 のカラム又はカラム群が位置を取り換え濃縮相の次の相互接続 (IC) と非接続 (B) 相が実行されることにより実現される。

【0077】

本新規プロセスの運転パラメーター (溶出体積、変性剤濃度) は、シングルカラムクロマトグラフィーの実施から得られるクロマトグラムから導くことができる。一度各セクションの境界が割り振られれば、異なった位置のカラムを通して運ばれる溶出体積が定義される。従って、シングルカラムのクロマトグラフィー実施の時と同じ流量を選択した場合は、時間間隔が決定できる。さらに、本新規プロセスにおいて適用される変性剤の濃度は、シングルカラム方法のセクション境界での変性剤濃度と同じである。

40

【0078】

さらなる好ましい実施形態については、以下のようなものがある：

【0079】

本提案プロセスは、2 つのクロマトグラフィー用カラム、又は 2 つの直列結合したカラム群に分かれて相互接続された多数のカラムを包含する。以下においては、「カラム」という用語は、シングルカラム又は直列に接続された多数のカラムをいう。本プロセスは、少なくとも 1 つの、好ましくは 2 つの循環的相と 1 つの最終相から成る。全相は、逐次的

50

に行われ、循環相がある場合は、少なくとも1切替え（半サイクル）から成る。循環相においては、クロマトグラフィー用カラム（又はカラム群）は少なくとも2つの個別の配置にグループ化され、また最後の相ではカラムは少なくとも1つの個別の配置にグループ化される。

【0080】

好ましい実施形態では、相互接続配置において移動相の液流が上流カラムから目的化合物を洗い出すが、これは、下流カラムへ入るまでに、上流カラムを出る液流の特性を目的化合物が下流カラム内で再吸着されるように追加的な条件を加えて変えるという条件付きである。好ましい実施形態では、下流カラム内での目的化合物の再吸着は、上流カラムを出る移動相の液流を異なる移動相組成を持つ第2の移動相の液流と混合することによって達成される（「ライン内希釈」、QC）。他の好ましい実施形態では、上流のカラムを出る移動相液流は新しい原液と混合される。

10

【0081】

好ましい実施形態では、非接続配置において供給混合物がカラムの1つに適用され、また他の好ましい実施形態では、供給混合物を負荷されたカラムは、目的化合物でない化合物を除去するために負荷後洗い出される。他の好ましい実施形態において、第2のカラムは、目的物ではない化合物を除去するために洗い出される。さらにより好ましい実施形態では、最初に洗い出されたカラムが、目的化合物が固定相に吸着できるように平衡化される。

【0082】

好ましい実施形態では、濃縮相の非接続配置において、供給混合物が位置2で下流カラムに供給され、並行して位置4の上流カラムは洗浄される。さらにより好ましくは、位置2のカラムは原液を負荷された後、目的化合物をカラム中に保持したまま洗い出される。他の好ましい実施形態では、位置2のカラムに、洗浄工程の後、変性剤のグラジエントが適用される。

20

【0083】

さらにより好ましくは、位置4のカラムは、洗浄された後平衡化される。他の好ましい実施形態では、位置4のカラムに、カラムが平衡化された後、原液が適用される。

【0084】

位置2と4で作業を完了した後、カラムは切り替えられて上流カラムが下流カラムになり、下流カラムが上流カラムになる。即ち、位置4のカラムは位置1に切り替わり、位置2のカラムは位置3に切り替わって、そして両カラムは上流カラムの出口が下流カラムの入り口に接続されるように相互接続される。相互接続相の間、移動相の液流が位置3の上流カラムに供給され、前記カラムから目的化合物を洗い出す。上流カラムを出る液流は、目的化合物が位置1の下流カラムに洗い込まれた時に吸着できるように組成が変更される。

30

【0085】

目的化合物が位置1の下流カラムに洗い込まれた後、両カラムは接続をはずされ、下流カラムは位置2に切り替えられ、上流カラムは位置4に切り替えられて、非接続状態の作業が繰り返される。

40

【0086】

本プロセスのさらにより好ましい実施形態では、本プロセスの濃縮相は、カラム内に目的化合物が十分濃縮されるまで、多数回のM切替えが実施される。

【0087】

本プロセスの好ましい実施形態では、濃縮相に続いて分離相がある、即ち $N > 0$ であり、本相は少なくとも1切替え繰り返され、原液が負荷されないことを除けば、上述の濃縮用の工程を含む。原液の代わりに、洗浄液が供給されるか又は移動相は全く供給されない。

【0088】

さらにもう一つの好ましい実施形態では、分離相における流量、移動相組成物及び流量

50

の持続時間は、目的物ではない化合物の最適な除去を可能にするために、異なっている。

【0089】

好ましい実施形態では、目的化合物は、最後の溶出相において目的化合物を含むカラムから単離される。他の好ましい実施形態では、最後の溶出相は、バッファー又は溶媒のグラジエント、より好ましくは少なくとも2種の異なる溶出強度の溶媒を混合して得た直線濃度勾配の溶媒グラジエントを含む。他の好ましい実施形態では、本方法は一定の変性剤条件（定組成条件）を使用する。他の好ましい実施形態では、最後の溶出相には1つ以上のカラム洗い出し工程が含まれる。

【0090】

他の好ましい実施形態では、単離に先立って、目的化合物はそれぞれのカラムから、あらかじめ洗浄され、平衡化され、そして目的化合物を含有するカラムと相互接続された第2のカラムを通して洗い出される。

10

【0091】

好ましくは、カラムの切り替えは、カラムを物理的に動かすことはしないで、バルブで流路を変えることによって実現される。

【0092】

好ましい実施形態では、本プロセスはオンラインで完全に又は部分的に次の測定方法の内の少なくとも1つによってモニターされる：UV吸収、可視光吸収、光散乱、導電率、pH、蛍光、質量分析（MS）、赤外分光法（IR）。他の好ましい実施形態では、最後の溶出相の間、流出物は分画され、より好ましくは、さらなる分析及び/又は処理のために、最後の溶出相の間、工程は完全に又は部分的にオンラインでモニターされまた分画される。

20

【0093】

他の好ましい実施形態では、超臨界流体又は超臨界流体を含む混合物が移動相として使用される。

【0094】

さらに好ましい実施形態では、本プロセスは以下の目的の1つに役立つ方法の一部として使用される：医薬開発におけるリード化合物の発見を含むがそれに限定されない、多種化合物の混合物中の目的化合物の発見；医薬製品の特性評価と不純物プロファイリングにおける製品関連不純物やアイソフォームの濃縮と単離を含むがそれに限定されない、多種化合物の混合物中の微量化合物のような目的化合物の濃縮と単離。

30

【0095】

本方法の好ましい実施形態では、本プロセスは上記の目的の1つに役立つ方法の一部として使用され、またクロマトグラフィー用のサンプルの調整や画分分析のようなさらなる処理工程を含む。ここで画分分析は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、測光学、質量分析法（MS）、赤外線分光法（IR）、蛍光光度法、ラマン分光法、核磁気共鳴（NMR）、示差走査熱量測定（DSC）、示差走査蛍光光度法、円偏光二色性（CD）、キャピラリー電気泳動法（CE）、ゲル電気泳動法（SDS-PAGE）、等電点電気泳動（IEF）、免疫吸着法（ELISA）、ウェスタンブロット法、及び関連技術及びこれらの組み合わせ、及びペプチド・マッピングや遺伝子地図作成及び一般に目的化合物を同定するためのデータベースとの付き合い合わせ等の分析方法のような分析技術を含むが、これらに限定されない。

40

【0096】

さらなる本発明の実施形態は、従属クレームに記載する。

本発明の好ましい実施形態を図面を参照して以下に説明する。但し、これらは本発明の好ましい実施形態を説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】本提案プロセスの模式的な系統図を示し、以下を含む：(i)循環蓄積相、(ii)任意の分離相、(iii)最後の溶出相；灰色の長方形は、それぞれカラムもしくはカラ

50

ム群を示し、丸で囲まれた数字はカラム位置を示す；破線の長方形は、相互接続された及び非接続のカラム配置を示す；太い破線の曲線矢印は、循環蓄積相／循環分離相間のカラム切り替えの方向を示す；実線の矢印は、液流を示す；点線の矢印は、カラムが次の相へ入ることを示す（循環蓄積相から循環分離相へ、また循環分離相から最終溶出相へ）；実線の縦の線と太い灰色の矢印は、上流のカラムが下流カラムになる、あるいはその逆となるカラム位置の変化を示す；（F）は、潜在的な原液の供給位置を示す。

【図2】最も吸着性の弱い化合物を含む目的化合物、即ち溶出の速い目的化合物（ $X = W$ ）を濃縮するための循環蓄積相を示す一般的なプロセス系統図；図の上部は、2つのカラム（1、2）を使った、4つの作業に対応する本方法の4つのセクションを示し、ここでセクション／作業の番号はx軸（溶出体積軸）の下に示されている；実線矢印は、移動相の流れを示す；ICは、上流カラムの出口が直接下流カラムの入り口に接続された相互接続状態を示す；Bは、それぞれのカラムがバッチモードで運転され、かつそれらが互いに接続されていないバッチ状態を示す；カラムの切り替え（下流のカラムが上流のカラムになる、そしてその逆）は図の上部に水平の破線で示されている；大文字のX、C、Sは分離すべき化合物を示し、ここでXは目的化合物を示す；図の下部は、各セクションにおけるカラム出口でのクロマトグラムを模式的に示し、溶出体積は左から右へ進む；縦の破線は、セクションの境界を示し、これらは運転パラメーターの決定（流量、グラジエント濃度）のために重要である。

10

【図3】最も吸着性の強い化合物を含む目的化合物、即ち溶出の遅い目的化合物（ $X = S$ ）を濃縮するための循環蓄積相を示す一般的な工程系統図；W、Cは目的化合物ではない化合物を示す。さらなる説明は、図1参照。

20

【図4】中間的な吸着性の化合物Xを含む目的化合物の循環蓄積相と濃縮を示す一般的なプロセス系統図であって、前記化合物は溶出の速い不純物（W）と後初期に溶出する不純物（S）に同伴されている、即ち目的化合物は中央溶出性（ $X = C$ ）である。さらなる説明は、図1参照。

【図5】中間的な吸着性の化合物X1 - X4を含む目的化合物の循環蓄積相と濃縮を示す一般的なプロセス系統図であって、前記化合物は溶出の速い不純物（W）と後初期に溶出する不純物（S）に同伴されている、即ち目的化合物は中央溶出性（ $X = C$ ）であり、かつ中心に多数の化合物がある。さらなる説明については、図1参照。

【図6】図6は、新規な方法を使った、フィブリノペプチドAのW製品関連不純物の単離を示す。分析クロマトグラムと最終のグラジエント溶出から得た最も純度の高い画分のクロマトグラムの重ね合わせ図である。

30

【図7】本新規方法を使用した、W製品関連の不純物の単離を示す。図6の拡大表示である。

【図8】シングルカラムのバッチクロマトグラフィーによるW製品関連不純物の単離を示す（比較例1）。

【図9】本新規方法の相互接続状態の間、2つのカラムの間に置いた紫外線検出器によって記録されたクロマトグラム（「内部プロファイル」）の重ね合わせ図を示す。1切替えの持続時間は77.5分であった。

【図10】本新規方法を使った、S製品関連の不純物の単離を示す。分析クロマトグラムと、Contichrom（登録商標）装置からの最終グラジエント溶出から得られた最も純度の高い画分のクロマトグラムとの重ね合わせ図である。注入量：原液：50 μ L、副生化合物の画分：100 μ L。

40

【図11】中間的な溶出性の脂肪酸エチルエステルを含有する画分の分析GCクロマトグラムの重ね合わせ図を示す；ピークは最高ピークで正規化した；上の曲線は新規方法により、下の曲線はバッチ方法による。新しく発見されたピークを矢印で示す。

【図12】目的化合物X1、X2が溶出の速いものと遅いもので、中心に溶出する目的物ではない化合物Cを囲んでいる状況について循環蓄積相と濃縮を示す一般的な工程系統図である。さらなる説明は、図1参照。

【発明を実施するための形態】

50

【実施例】

【0098】

実施例 1

フィブリノペプチド A の製品関連不純物の単離、早く溶出する X 化合物

本記載方法を用いてさらなる特性評価のためフィブリノペプチド A の弱吸着性の製品関連副生化合物を単離した。フィブリノペプチド A を、一般に製品関連副生化合物の形成をもたらす化学合成によって製造した。副生化合物は、潜在的な健康上のリスクを意味し、薬剤のクロマトグラフィー精製において除去されなければならない。副生化合物の特性評価は、健康上のリスクの評価と副生化合物の形成を減少させるための化学合成の改良を可能にする。

10

【0099】

原液は重量で調製した。約 110 mL の原液を得るため、0.45 g の粗製フィブリノペプチド A を 92.6 g の脱イオン水、22.5 g のアセトニトリル、及び 3.0 g の酢酸の混合物に溶解した。粗製物の濃度は、3.6 g/L であった。原液は、約 1.1 g/L のフィブリノペプチド A を含有していた（原液純度 30%）。Kromasil C18-100-10 を分取及び分析用の固定相として使用した。カラムサイズは、いずれの場合も内径 4.6 mm × 長さ 100 mm であった。分析は、Agilent HP 1100 シリーズ（アジレント社、アメリカ合衆国、カルフォルニア州、サンタクララ）を使って実施した。分析には、0.5 mL/分の流量を使用し、また溶媒 B の 0 - 100% のグラジエントを 45 分間で行った。注入量は、それぞれ 50 µL（原液）と 100 µL（画分）であった。溶媒は分析及び分取実験とも同じであり、重量で調製した。1 L の溶媒 A は、903.6 g の脱イオン水、48.2 g のアセトニトリル、及び 0.9 g の TFA を含有した。1 L の溶媒 B は、486.7 g の脱イオン水、400.0 g のアセトニトリル、及び 0.5 g の TFA を含有した。

20

【0100】

本報告方法をクロマコン社（スイス、チューリッヒ）の Contichrom（登録商標）Lab-10 装置を使って行った。紫外線吸収は 280 nm でモニターし、分析と分取実験両方とも温度は 25 °C であった。紫外線検出器を、各カラムの出口に取り付けた。

【0101】

本方法の運転パラメーターを表 1 に記す。

30

【0102】

サイクル持続時間は 98.2 分であり、新規方法の循環蓄積相は 8 サイクルであった。分離相は省略した。蓄積した W 化合物の溶出と 1 画分 1 分の分画による単離のための最終溶出相は 80.3 分の持続時間であった。従って、全運転時間は、 $8 \times 98.2 \text{ 分} + 80.3 \text{ 分} = 866 \text{ 分} = 14.4 \text{ 時間}$ であった。

【0103】

負荷量は、1 サイクル 4 mL 当たりのサンプルであり、これは 1 サイクル当たり 14.4 mg の粗製物に相当する（原液濃度：粗製物で 3.6 mg/L）。従って、全実験の間に、カラム体積 1 mL 当たり $8 \times 14.4 \text{ mg} / (2 \times 1.66 \text{ mL}) = 34.7 \text{ mg}$ の粗製物が負荷された。時間と全カラム体積当たりの負荷量は 2.4 g/L/h であった。

40

【0104】

最終溶出相から得られた画分は、クロマトグラフィー分析論を使って分析した。フィブリノペプチド A の原液サンプルと濃縮し単離した吸着性の弱い副生化合物を含む画分の分析クロマトグラムを重ね書きを図 6 に示す。クロマトグラムの拡大表示を図 7 に示す。クロマトグラムは、副生物の大幅な濃縮と高い純度を示す。特に興味がある化合物を図 7 中、矢印で示す。この化合物は、最終溶出相の画分の 1 つの中に 80% の純度で得られた。この画分における前記化合物の濃度は、供給混合物中の該化合物の濃度の約 8 倍高かった。

【0105】

【表 1】

フィブリノペプチドAの弱吸着性、早期溶出性副生化合物を単離するための新規方法の
 運転パラメーター

循環蓄積相		グラジエント[% B]		
相互接続状態 (IC)、作業 1, 3		開始時	終了時	
持続時間	[min]	23.00		
上流カラム中の流量 (POS 3)	[ml/min]	0.49	20	42.5
流量 QC	[ml/min]	0.50	0	0
		グラジエント[% B]		
非接続状態 (B)、作業 4 (洗浄)		開始時	終了時	
持続時間	[min]	8.00		
流量	[ml/min]	0.49	100	100
		グラジエント[% B]		
非接続状態 (B)、作業 4 (平衡化)		開始時	終了時	
持続時間	[min]	10.50		
流量	[ml/min]	0.49	0	0
		グラジエント[% B]		
非接続状態 (B)、作業 2 (原液供給)		開始時	終了時	
持続時間	[min]	8.00		
流量 (原液)	[ml/min]	0.50	原液供給	原液供給
		グラジエント[% B]		
非接続状態 (B)、作業 2 (洗い出し)		開始時	終了時	
持続時間	[min]	10.50		
流量	[ml/min]	0.43	20	20
		グラジエント[% B]		
最終グラジエント溶出相		開始時	終了時	
グラジエント持続時間	[min]	60		
グラジエント流量	[ml/min]	0.50	20	80

10

20

30

【0106】

比較例 1

シングルカラムバッチクロマトグラフィーによるフィブリノペプチドAの製品関連不純物(早く溶出するX化合物)の単離

シングルカラムによるバッチ参照実験を表2に記したパラメーターで行った。この実験の持続時間は129分=2.2hであった。

【0107】

バッチ参照試験において、1.375mLのサンプルを負荷したが、これはカラム体積1mL当たり3mgの粗製物負荷に対応する。時間当たり及び全カラム体積当たりの負荷量は1.4g/L/hであった。従って、実施例1及び本実験で説明する方法において、時間当たり及び全カラム体積当たりの負荷量の桁は同程度である。このシングルカラムのバッチ参照実験で行ったグラジエントは実施例1で報告した方法における最終溶出相のグ

40

50

ラジエントと同じスロープを有していた、また流量はほとんど同じであった。参照実験は 1 分 / 画分の速度で分画した。

【 0 1 0 8 】

【 表 2 】

シングルカラムのバッチ参照実験の運転パラメーター

作業の内容	ポンプパラメータ		グラジエント [% B]	
			開始時	終了時
平衡化	[min]	15		
	[ml/min]	0.5	0	0
原液供給	[min]	2.75		
	[ml/min]	0.5	原液供給	原液供給
洗い出し	[min]	10		
	[ml/min]	0.5	0	0
グラジエント溶出	[min]	60		
	[ml/min]	0.5	20	80
待機	[min]	10		
	[ml/min]	0.5	80	80
CIP	[min]	15		
	[ml/min]	0.5	100	100
再平衡化	[min]	15		
	[ml/min]	0.5	0	0

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

シングルカラムのバッチ参照実験から得られた、W 不純物を含有する最も純度の高い画分を示す種々の画分の分析クロマトグラムの重ね合わせ図を図 8 に示す。これから以下が分かる。

1. シングルカラムのバッチ式方法では、単一の W 製品関連化合物を高純度で得ることはできなかった。

2. 製品関連化合物は本新規方法を使って得た化合物よりもはるかに低濃度であった。

バッチ法と本新規プロセスとの差は、図 7 (実施例 1) と図 8 (比較例) に矢印で示す化合物の場合に特に著しい。本提示プロセス (実施例 1) ではこの製品関連化合物の 80 % より高い純度の画分が得られるが、従来のバッチクロマトグラフィーで単離された最も純度の高い画分は 20 % 未満の純度である。シングルカラムクロマトグラフィーで得られる低い純度は、主化合物 (フィブリノペプチド A) がサンプル中に大量に存在するためである。シングルカラムクロマトグラフィーで得られる目的化合物の濃度は、本新規プロセスを使って得られる濃度より比率にして 6 ~ 7 倍低い。従って、6 ~ 7 回のバッチ実験からの、目的化合物を含む W 画分を貯めて濃縮すれば、本新規方法によるのと同じ目的化合物の濃度を得られるであろうが、同じ純度は得られない。ここで留意すべきは、実施例 1 で説明した本方法をもっと長時間運転したら、濃縮はさらにもっと進んだであろうということである。

【 0 1 1 0 】

実施例 2

フィブリノペプチド A の製品関連不純物の単離、溶出の遅い X 化合物

本記載プロセスを用いて実施例 1 に記載したのと同じ材料を使って、フィブリノペプチド A の強吸着性の製品関連副生化合物を濃縮と単離した。運転パラメーターのみが異なっ

ており、これらを表 3 に記す。本プロセスの循環蓄積相を 5 サイクル行った。分離相は 1 サイクル運転した。最終溶出相の間、1 分 / 画分で画分を集めた。

【 0 1 1 1 】

【 表 3 】

フィブリノペプチド A の強吸着性、後期溶出性副生化合物を単離するための新規プロセスの運転パラメータ

循環蓄積相、循環分離相		グラジエント [% B]		
相互接続状態 (IC)、作業 1, 3			開始時	終了時
持続時間	[min]	51.50	なし	なし
上流カラム中の流量 (POS 3)	[ml/min]	0.38	40.8	79.8
流量 QC	[ml/min]	0.62	0	0
		グラジエント [% B]		
非接続状態 (B)、作業 4 (洗浄)			開始時	終了時
持続時間	[min]	10.50		
流量	[ml/min]	0.49	100	100
		グラジエント [% B]		
非接続状態 (B)、作業 4 (平衡化)			開始時	終了時
持続時間	[min]	10.50		
流量	[ml/min]	0.49	0	0
		グラジエント [% B]		
非接続状態 (B)、作業 2 (原液供給)			開始時	終了時
持続時間	[min]	5.00		
流量 (原液)	[ml/min]	0.42	原液供給	原液供給
		グラジエント [% B]		
非接続状態 (B)、作業 2 (洗い出し)			開始時	終了時
持続時間	[min]	16.00		
流量	[ml/min]	0.43	40.8	40.8
		グラジエント [% B]		
最終グラジエント溶出相			開始時	終了時
グラジエント持続時間	[min]	90		
グラジエント流量	[ml/min]	0.50	40.8	80

* 循環分離相においては原液の流量はゼロである。

【 0 1 1 2 】

接続状態 IC の間、カラム出口の 1 つに設置した紫外線検出器で記録されたクロマトグラムは、内部循環による強吸着性の X 化合物の蓄積を示す (図 9)。

【 0 1 1 3 】

最終溶出相において得られたサンプルは、HPLC を使ってオフラインで分析した。原液のクロマトグラムと単一製品関連不純物の最高純度をもつ画分のクロマトグラムの重ね書きを図に示す (純度は、主ピーク面積と全ピーク面積の比率として定義される)。分析クロマトグラムにおいて、製品関連の不純物画分のピークを原液クロマトグラムのピーク

に帰属させるのは困難である、また特定の化合物を明確に同定するには質量分析のような追加の分析が必要であろう。しかしながら、強吸着性の化合物が高い濃度と純度で得られたことは明らかに分かる。

【0114】

実施例3

本記載プロセスを用いて脂肪酸エチルエステル類を濃縮し単離した。その結果、これまで検出限界に近かったいくつかの脂肪酸エチルエステル類の濃度が上がり、分析ではっきりしたシグナルが得られた。

【0115】

比較として、本プロセスと同様に時間限定の負荷を使用し、3 mL / 分の流量及び0.25分の分画間隔でシングルカラムのバッチグラジエント実験を行った。バッチ実験において、主要な化合物であるエイコサペンタエン酸エチルエステル(EPA-EE)が最初に溶出し、2次的な化合物であるドコダヘキサエン酸エチルエステル(DHA-EE)が後に溶出する。多数の他の脂肪酸エチルエステルがその間に溶出する。バッチグラジエント実験のクロマトグラムではピークは区別できないが、分画とガスクロマトグラフィーを使った画分のオフライン分析から、メインの脂肪酸エチルエステル類の位置、濃度、及び純度は確認できた。この場合、EPA-EEとDHA-EEの間に溶出する脂肪酸エチルエステル類Xの濃度と純度が特に興味深かった。

10

【0116】

シングルカラムのバッチ実験から得られたピーク位置と濃度に関する情報を使って、EPA-EEとDHA-EEの間に溶出する脂肪酸エチルエステル類の濃縮と単離のために本新規プロセスをデザインし運転した。本新規プロセスは、15 μmの粒子と120 Åの細孔径を持った2本の内径6 mm × 長さ150 mmのC18シリカ逆相カラム、及び溶媒としてエタノールの水溶液を使って定成分の条件下で運転した。循環蓄積相は10サイクルで行い、循環分離相は省略し、最終溶出相は、目的化合物を含まないカラムを洗浄し、平衡化した後に両カラムを通して行った。分画は2 mL / 分の流量で1画分0.5分で行った。

20

【0117】

両方法から得られた画分をガスクロマトグラフィー(GC)を使って分析した。中間に溶出する脂肪酸エチルエステル類Xの画分について最も純度が高い画分を示す2つのGCクロマトグラムを図11に比較して示す(上部：新規プロセスの結果、下部：バッチ方法の結果)。新規方法で得られた画分の1つのクロマトグラムにおいて、原液のクロマトグラム(非図示)において明確には検出されなかった化合物(図11中、矢印で示す)が発見された。前記化合物は、15.2%の純度かつ検出限界よりはるかに高い濃度で存在した。原液のクロマトグラムを再解析して、この化合物は、原液中に0.05% ± 0.02%の純度、かつ該方法の検出限界に近い濃度で存在することが分かった。またシングルカラムの実験では、前記化合物の濃度は検出限界に近く、かつ純度はわずかに0.04% ± 0.02%であった。

30

【0118】

上述の化合物のいずれの画分においても、得られた最大の濃度は供給混合物中では3.1相対質量単位、シングルカラムのバッチ方法の最高濃度の画分においては0.5相対質量単位、そして本新規方法の高純度画分においては26.8相対質量単位である。本新規プロセスにおける前記化合物の物質収率は7.8%である。

40

【0119】

要約すると、本新規プロセスでは目的化合物の濃度を約9倍、そして純度を300倍以上、それぞれ原液中の濃度と純度に対して増加させることができた。シングルカラムのバッチ方法では、濃度と純度について、原液の改善は何ら得られなかった。本新規プロセスの優れた濃縮及び単離性能は、以前はその存在が明確でなかった化合物の同定を容易にした。

【符号の説明】

50

【 図 3 】

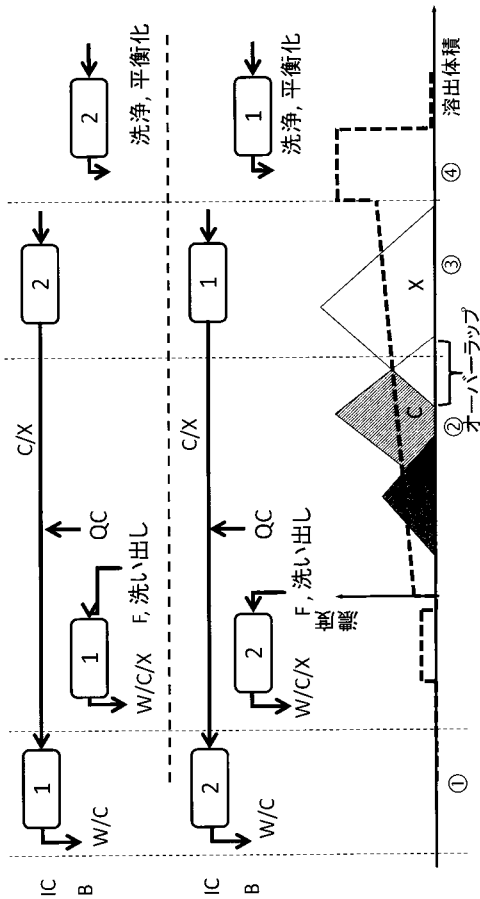


FIG. 3

【 図 4 】

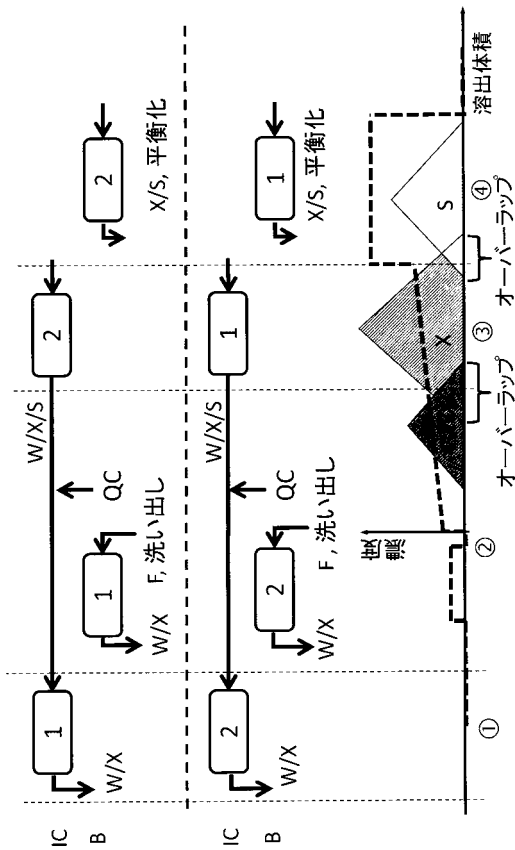


FIG. 4

【 図 5 】

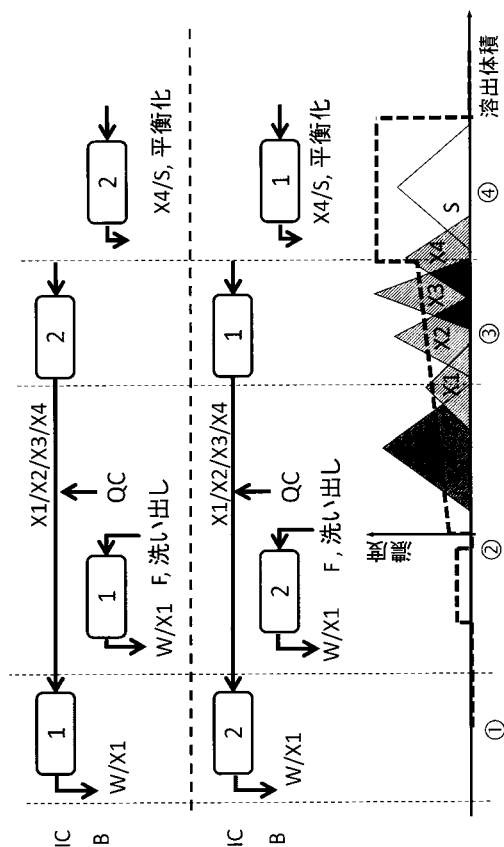


FIG. 5

【 図 6 】

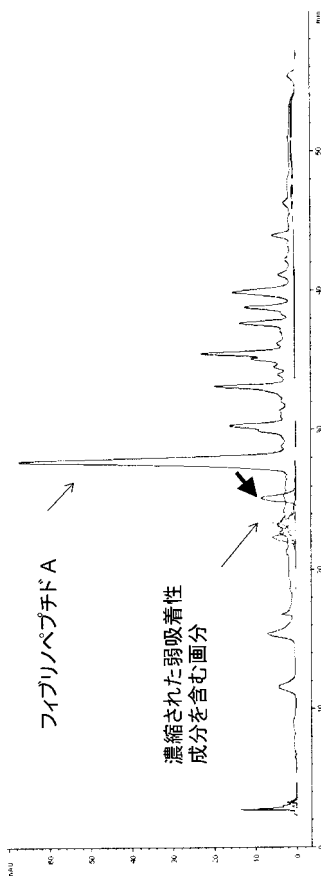


FIG. 6

【 図 7 】

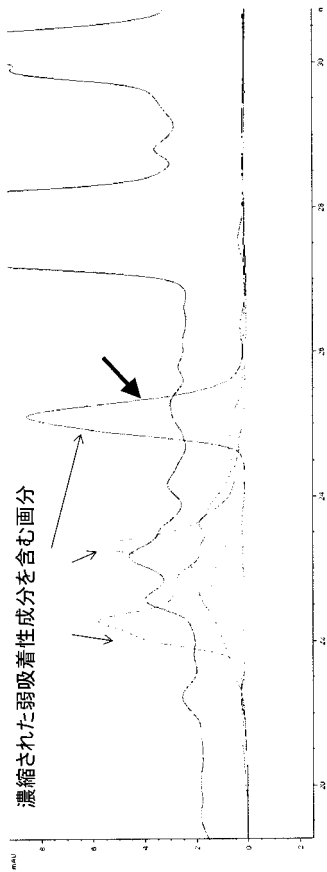


FIG. 7

【 図 8 】

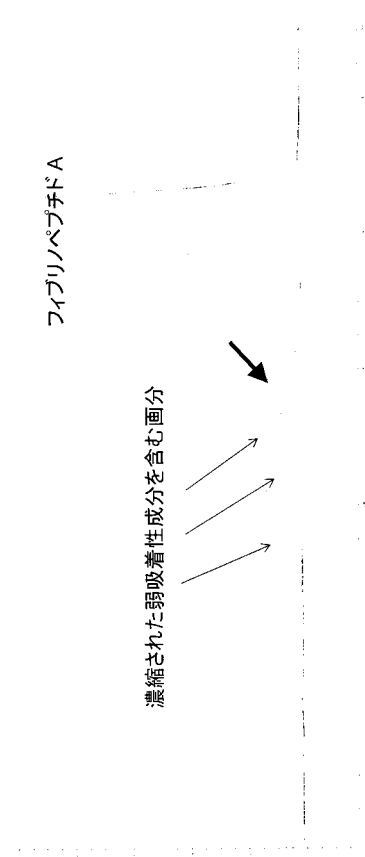


FIG. 8

【 図 9 】

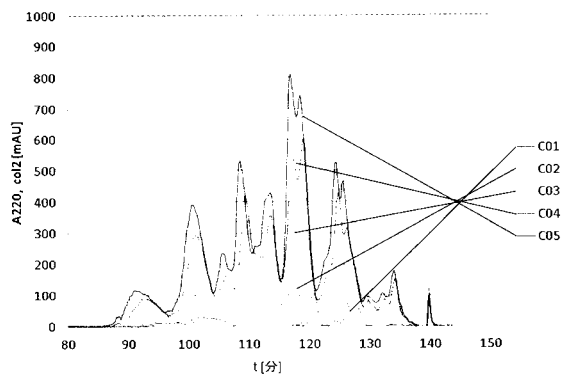


FIG. 9

【 図 11 】

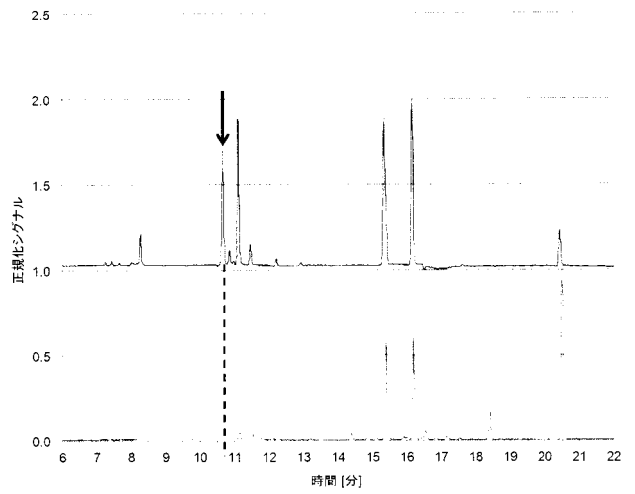


FIG. 11

【 図 10 】

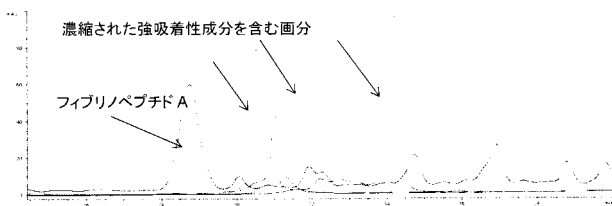
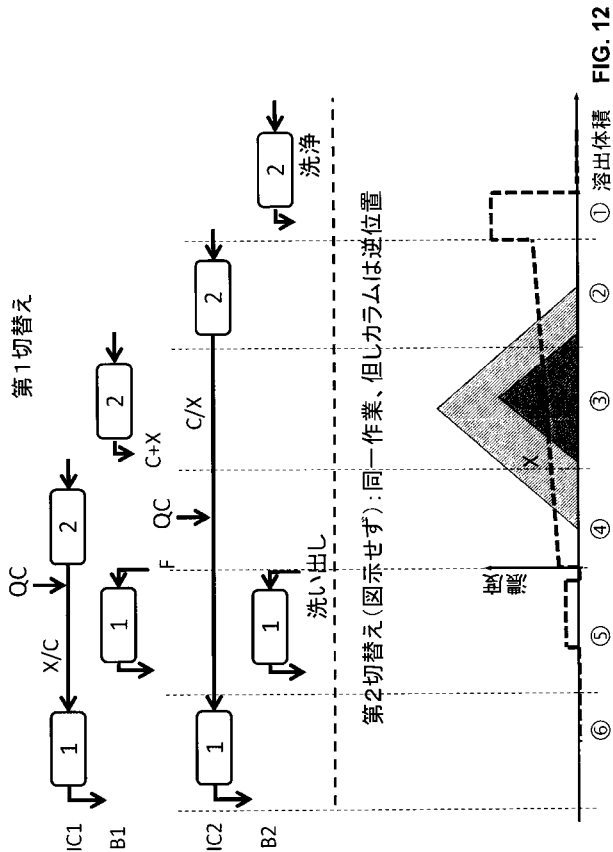


FIG. 10

【 図 1 2 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】平成26年3月20日(2014.3.20)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

少なくとも1つの目的化合物(X)を、前記少なくとも1つの目的化合物(X)及び目的物ではない少なくとも1つのその他の化合物(W, C, S)を含む混合物(F)から、少なくとも2本のクロマトグラフィー用カラムを使って濃縮するクロマトグラフィープロセスであって、以下の一連の工程を少なくとも含むクロマトグラフィープロセス:

(i) 前記少なくとも2本のクロマトグラフィー用カラムが、相互接続相(IC)とそれに続く非接続相(B)において交互に又は同調して運転され、これら2つの相の後に、第1のカラム又はカラム群と第2のカラム又はカラム群とが位置を交換して、当該循環蓄積相の次の相互接続相(IC)及び非接続相(B)となる循環蓄積相であって、

前記相互接続相(IC)又は前記非接続相(B)の少なくともひとつにおける前記カラム又はカラム群の少なくともひとつに、その入り口を経由して混合物(F)が供給され、前記循環蓄積相の前記2つの相が連続的にM回行われ、 $M > 1$ である、循環蓄積相;

(ii) 前記少なくとも2本のクロマトグラフィー用カラムが、相互接続相(IC)とそれに続く非接続相(B)において交互に又は同調して運転され、分離サイクルを形成するこれらの2相の後に、前記第1及び第2のカラム又はカラム群が位置を交換して、循環分離相の次の相互接続相(IC)及び非接続相(B)となる循環分離相であって、

前記カラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を経由して、前記目的物ではない少な

くとも1つの他の物質 (W , C , S) が系から排出され、

前記循環分離相の前記 2 相が連続的に N 回行われ、 N = 0 である循環分離相；及び

(iii) 相 (i) の終了時又は N > 0 の場合において相 (ii) の終了時に前記少なくとも 1 種の目的化合物 (X) を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を、出口を経由して抽出する溶出相。

【請求項 2】

以下の一連の工程を少なくとも含む請求項 1 に記載のクロマトグラフィープロセス：

(i) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィープ用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流のカラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群の少なくとも一方にその入り口を経由して前記混合物 (F) が供給され、かつ前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を経由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W , C , S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環蓄積相であって、これらの 2 相 (IC , B) の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となり、蓄積の全サイクルを形成し、

前記循環蓄積相の前記 2 相が連続的に M 回行われ、 M > 1 である前記循環蓄積相；

(ii) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィープ用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群はいずれもその入り口を経由して混合物 (F) が供給されず、しかし前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を経由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W , C , S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環分離相であって、これらの 2 相 (IC , B) の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となり、分離の全サイクルを形成し、

前記循環分離相の前記 2 相が連続的に N 回行われ、 N = 0 である前記循環分離相；及び (iii) 相 (i) の終了時又は N > 0 の場合において相 (ii) の終了時に前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を出口を経由して抽出する前記溶出相。

【請求項 3】

前記蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、その前の相互接続相 (IC) において下流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群にその入り口を経由して混合物 (F) が供給されるか、又は、前記蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、その前の相互接続相 (IC) において上流のカラム又はカラム群であったカラム又はカラム群に、その入り口を経由するか、又は、洗浄しかつ平衡化した後のカラムを経由して、混合物 (F) が供給される、請求項 1 又は 2 に記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 4】

前記蓄積相 (i) の相互接続相 (IC) において、上流のカラム又はカラム群を出る液流の性質を変える、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 5】

前記蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、その入り口を経由して混合物 (F) が供給されるカラム又はカラム群は、前記非接続相 (B) の第 1 の相においてその入り口を経由して混合物 (F) が供給され、前記非接続相 (B) の第 2 の相において、混合物 (F)

無しに、バッファー、及び/又は溶媒及び/又は変性剤が供給される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 6】

前記溶出相 (iii) において、溶出される目的化合物 (X) を出口分画に供する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 7】

前記溶出相 (iii) において、前記目的化合物 (X) が、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続されている構成において溶出される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 8】

前記目的化合物 (X) がクロマトグラフィー溶出プロファイル中の吸着性の弱い画分 (W) である場合には、前記循環蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、前記循環分離相 (ii) の $N > 0$ の場合、混合物 (F) が供給されないカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (C, S) を溶出するように運転され、及び/又は、前記目的化合物 (X) がクロマトグラフィー溶出プロファイル中の吸着性の強い画分 (S) である場合には、前記循環蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、前記循環分離相 (ii) の $N > 0$ の場合、混合物 (F) が供給されないカラム又はカラム群は、平衡化するように運転され、混合物 (F) が供給されるカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他のより弱く吸着する化合物 (W, C) を溶出するように運転されるか、又は、少なくとも 1 つのその他のより弱く吸着する化合物 (W, C) を続く相互接続相 (IC) において洗い出すように運転され、

前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W, C, S) に隣接して、前記目的化合物 (X) の一部も溶出する程度は、溶出相 (iii) の最終的な溶出液中での前記目的化合物 (X) の望ましい濃縮及び/又は絶対濃度の関数として適合される、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 9】

気体又は超臨界流体が溶媒として使用され、及び/又は、1 つの相が、経時的な移動相の組成変化を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 10】

$M > 2$ である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 11】

$N > 0$ である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 12】

前記循環蓄積相 (i) において、2 回の非接続相 (B) で 1 回のみ、カラムにその入り口を經由して混合物 (F) が供給され、4 相 (IC, B) の後にのみ、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、前記循環蓄積相の次の相互接続相 (IC) と非接続相 (B) となる、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 13】

目的化合物を濃縮、単離、又は発見するための、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスを使用する方法。

【請求項 14】

目的化合物 (X) を含有するクロマトグラム中の異なる標的画分を前記クロマトグラフィープロセスに供することにより、又は、同じ標的画分を 1 回より多い回数前記クロマトグラフィープロセスに供することにより、前記方法を反復して実施する、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスを使用する方法。

【請求項 15】

前記最終溶出相で回収される前記目的化合物の画分を手動又は自動で行われるさらなる処理及び/又はオンライン分析に供する、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスを使用する方法。

【請求項 16】

以下の一連の工程を少なくとも含む請求項 1 に記載のクロマトグラフィープロセス：

(i) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィープロセス用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流のカラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群の少なくとも一方にその入り口を經由して前記混合物 (F) が供給され、かつ前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W, C, S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環蓄積相であって、これらの 2 相 (IC, B) の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となり、蓄積の全サイクルを形成し、

そして、前記相 (IC, B) の少なくとも一方における前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W, C, S) が系から排出され、

前記循環蓄積相の前記 2 相が連続的に M 回行われ、 $M > 1$ である前記循環蓄積相；

(ii) 前記少なくとも 2 本のクロマトグラフィープロセス用カラムが、

前記目的化合物 (X) の少なくとも一部を上流から下流のカラム又はカラム群に移送するように、第 1 の上流カラム又はカラム群の出口が第 2 の下流カラム又はカラム群の入り口に流体接続された相互接続相 (IC) と、それに続いて

前記第 1 の上流カラム又はカラム群と前記第 2 の下流のカラム又はカラム群が流体接続されておらず、前記カラム又はカラム群はいずれもその入り口を經由して混合物 (F) が供給されず、しかし前記第 1 及び / 又は第 2 のカラム又はカラム群の少なくとも一方の出口を經由して、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W, C, S) が系から排出される非接続相 (B) と

において交互に運転される前記循環分離相であって、これらの 2 相 (IC, B) の後に、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、次の相互接続相 (IC) 及び非接続相 (B) となり、分離の全サイクルを形成し、

前記循環分離相の前記 2 相が連続的に N 回行われ、 $N \geq 0$ である前記循環分離相；及び

(iii) 相 (i) の終了時又は $N > 0$ の場合において相 (ii) の終了時に前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を含有する前記カラム又はカラム群から、前記少なくとも 1 つの目的化合物 (X) を出口を經由して抽出する前記溶出相。

【請求項 17】

前記蓄積相 (i) の相互接続相 (IC) において、上流のカラム又はカラム群を出る液流の性質を、バッファ、溶媒及び / 又は変性剤を上流のカラム又はカラム群と下流のカラム又はカラム群との間に導入することにより変える、請求項 1 ~ 12 及び 16 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 18】

前記目的化合物 (X) がクロマトグラフィープロセス溶出プロファイル中の吸着性の弱い画分 (W) である場合には、前記循環蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、前記循環分離相 (ii) の $N > 0$ の場合、混合物 (F) が供給されないカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (C, S) を溶出するように運転され、そしてまた平衡化され、及び / 又は、前記目的化合物 (X) がクロマトグラフィープロセス溶出プロファイル中の吸着性の強い画分 (S) である場合には、前記循環蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、前記循環分離相 (ii) の $N > 0$ の場合、混合物 (F) が供給されないカラム又はカラム群は、平衡化するように運転され、混合物 (F) が供給されるカラム又はカラム群は、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他のより弱く吸着する化合物 (W, C) を溶出するように運転されるか、又は、少なくとも 1 つのその他のより弱く吸着する化合物 (W, C) を続く相互接続相 (IC) において洗い出すように運転される、請求項 1

~ 12 及び 16 ~ 17 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 19】

前記目的化合物 (X) が中間的な吸着性の画分 (C) である場合には、前記循環蓄積相 (i) の非接続相 (B) において、前記循環分離相 (ii) の $N > 0$ の場合、混合物 (F) が供給されないカラム又はカラム群は、目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (S) を溶出するように運転され、そしてまた平衡化され、混合物 (F) が供給されるカラム又はカラム群は、目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W) を溶出するように運転されるか、又は、目的物ではない少なくとも 1 つのその他のより弱く吸着する化合物 (W, C) を続く相互接続相 (IC) において洗い出すように運転され、

これらのいずれの場合においても、前記目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (W, C, S) に隣接して、前記目的化合物 (X) の一部も溶出する程度は、溶出相 (iii) の最終的な溶出液中での前記目的化合物 (X) の望ましい濃縮及び / 又は絶対濃度の関数として適合される、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 18 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 20】

前記溶出相 (iii) が、経時的な移動相の組成変化を含む、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 19 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 21】

$M > 6$ である、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 20 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 22】

$M > 10$ であり、前記溶出相 (iii) で得られる溶出液中における前記目的化合物 (X) の絶対濃度が、供給混合物 (F) 中のそれよりも高い、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 21 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 23】

$N > 2$ である、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 22 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 24】

$N > 4$ である、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 23 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 25】

前記循環分離相 (ii) において、2 回の非接続相 (B) で 1 回のみ、目的物ではない少なくとも 1 つのその他の化合物 (C) が系から排出され、4 相 (IC, B) の後にのみ、前記第 1 及び第 2 のカラム又はカラム群が位置を交換して、前記循環蓄積相の次の相互接続相 (IC) と非接続相 (B) となる、請求項 1 ~ 12 及び 16 ~ 24 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセス。

【請求項 26】

目的化合物を濃縮、単離、又は発見するための、請求項 13 又は 14 に記載のクロマトグラフィープロセスを使用する方法であって、前記プロセスが前記目的化合物を含有する混合物の処理から得られる全クロマトグラフィープロファイルの標的領域について系統的に行われる、使用方法。

【請求項 27】

前記最終溶出相で回収される前記目的化合物の画分を手動又は自動で行われるさらなる処理及び / 又はオンライン分析に供し、前記さらなる処理が各画分の分析を含み、及び / 又は、クロマトグラフィープロセスを含み、及び / 又は、質量分析を含み、及び / 又は、データベースとの付き合わせを含み、及び / 又は、結合アッセイの使用を含み、及び / 又は、細胞に基づいたアッセイの使用を含む、請求項 13、14 及び 26 のいずれかに記載のクロマトグラフィープロセスを使用する方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
B 0 1 D 15/08

(74)代理人 100152803
弁理士 今井 哲也

(74)代理人 100154184
弁理士 生富 成一

(74)代理人 100123548
弁理士 平山 晃二

(74)代理人 100169535
弁理士 山崎 信一郎

(72)発明者 トーマス ミューラー スペース
スイス国 8 0 5 0 チューリヒ ヴィクトリアシュトラッセ 5 2

(72)発明者 グイド シュトレライン
スイス国 8 0 5 7 チューリヒ シャッフハウザーシュトラッセ 2 6 4

(72)発明者 ラース アオマン
スイス国 8 0 5 7 チューリヒ ブークマットヴェーク 9

(72)発明者 ミカエル バヴァント
スイス国 5 6 0 0 レンツブルク ツォイクハウスシュトラッセ 1 3

(72)発明者 ニコル ウルマー
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン シュールシュトラッセ 1 0 2

Fターム(参考) 4D017 AA01 BA07 DA02 DA03 DB10 EA05 EB01

【外国語明細書】

2014169997000001.pdf