



FI000090089B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT****90089**C (15) Patentti myönnetty
Patent beviljat 27.10.1988

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 9/00, B 01D 15/00

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	871831
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	27.04.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	27.04.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	29.10.87
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.09.93
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
28.04.86 US 854983 P	10.04.87 US 034656 P

(71) Hakija - Sökande

1. Rohm and Haas Company, Independence Mall West, Philadelphia, Pa. 19105, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Byers, Michael Joe, P.O. Box 274, Gwynedd, Pa. 19436, USA, (US)
2. Isacoff, Eric Gilbert, 9 Juniper Drive, Richboro, Pa. 19436, USA, (US)
3. Naples, John Otto, 1570 Dreshertown Road, Dresher, Pa. 19025, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä bio-vaikuteisten aineiden erottamiseksi ja/tai puhdistamiseksi
partikkelimaisten polymeeristen adsorbenttien avulla
Förfarande för separering och/eller rening av bio-verkande substanser med hjälp av
polymera adsorbenter**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 9394 (B 01J 47/04), EP A 9395 (B 01J 39/04), EP A 127737 (C 07G 7/00),
US A 3275548 (210-24)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Käsitellään menetelmä (i) nesteväli-
aineessa olevan ensimmäisen veteen
liukenevan tai veteen dispersoituvan
bio-vaikuteisen aineen erottamiseksi
yhdessä tai useammasta muusta nesteväli-
aineen komponentista, jossa kyseiset
muut komponentit ovat epäpuhtauksia ja
muuta veteen liukenevia ja/tai veteen
dispersoituvia bio-vaikuteisia ainei-
tä, ja/tai (ii) nesteväliaineessa ole-
van ensimmäisen biovaikuteisen aineen
puhdistaminen yhdessä yhden tai useam-
man muun komponentin kanssa, joka mene-
telmä käsittää seoksen muodostamisen,
joka sisältää nesteväliaineen ja partik-
kelimaisten polymeerisen adsorbentin,
joka adsorbentti muodostaa kompleksin
ensimmäisen bio-vaikuteisen aineen tai
muun komponentin/muiden komponenttien
kanssa; ja nesteväliaineessa olevan kom-
pleksin suodattamisen kalvosuodatuksen
avulla.

Keksinnön menetelmä mahdollistaa tunnet-
tujen erotus- ja puhdistusmenetelmien
haittojen ja rajoitusten poistamisen
tai vähentämisen.

90089

Här presenteras en metod för att (i) separera ett första vattenlösligt eller vattendispersibelt bio-verkande ämne, som befinner sig i ett vätskemedium, från en eller flera andra komponenter i vätskemediet, vilka andra komponenterna består av orenheter och andra vattenlösliga och/eller vattendispersibla bio-verkande substanser, och/eller (ii) rena det första bio-verkande ämnet, som befinner sig i vätskemediet, tillsammans med en eller flera komponenter med hjälp av en metod som innebär att man formar en blandning som består av vätskemediet och en partikulär polymer adsorbent, av vilka adsorbenten bildar ett komplex med det första bio-verkande ämnet eller med de nämnda andra komponenterna, och filtrerar vätskemediet innehållande komplexet med hjälp av membranfiltrering.

Uppfinningens metod ger en möjlighet att avhjälpa eller minimera nackdelarna och begränsningarna i kända separations- och reningsprocesser.

Menetelmä bio-vaikutteisten aineiden erottamiseksi ja/tai puhdistamiseksi partikkelimaisten polymeeristen adsorbenttien avulla

Tämä keksintö käsittelee menetelmää biomateriaalin erottamiseksi ja/tai puhdistamiseksi kalvosuodatuksen avulla.

Ultrasuodatusmenetelmää käytetään yleisesti biomateriaalien erottamiseen (sisältäen väkevöimisen) ja/tai puhdistamiseen. Geahel ja Kula kuvaavat erästä tällaista menetelmää julkaisussa Biotechnology Letters, Vol. 6(8), 481-6, 1984. Menetelmässä puhdistetaan nesteväliaineessa oleva dehydrogenaasiliuos sitomalla se ensin suurimolekyylliseen, vesiliukoiseen dekstraaniin, jonka jälkeen liuos ultrasuodatetaan. Dehydrogenaasi-dekstraanikompleksi on liian suuri läpäistääkseen ultrasuodatuskalvon, mutta liuoksessa olevat epäpuhtaudet eivät ole liian suuria, joten kompleksi jää suodattimelle ja epäpuhtaudet poistuvat permeaattiin. Kun epäpuhtaudet on tällä tavoin poistettu, vapautetaan (desorboidaan) dekstraaniin sidottu dehydrogenaasi lisäämällä liuoksen ionivoimakkuutta ja dehydrogenaasi otetaan talteen.

Tällä menetelmällä on kaksi pääasiallista heikkoutta. Ensinnäkin, dekstraani liukenee väliaineeseen ja se voisi vuoksi päästä ultrasuodatuskalvon huokosten läpi pidentyneen molekyyilirakenteensa vuoksi. Vaikka pienihuokoisempi kalvo voisi poistaa tämän heikkouden vähentämällä huokosten läpäisevien dekstraanimolekyylien mää-

rää, rajoittaisi se myös dekstraanituotekompleksista erotettavien epäpuhtaiden molekyylien kokoa, heikentäen täten erotuksen tehokkuutta. Toiseksi, suurimolekyyllisellä dekstraanikompleksilla on taipumus akkumuloitua suodatuskalvolle muodostaen toisen kalvon tai konsentroidun polarisoidun kerroksen, joka heikentää suodattimen läpäisevän virtauksen.

Patenteissa US-A-4 474 690 ja EP-A-0 127 737 kuvataan peptidiä sisältävien yhdisteiden talteenottoa yhdistämällä affiniteettikromatografinen puhdistus ja ultrasuodatus, jossa peptidi-spesifinen ligandi sidotaan makromolekyylliseen kiinteään kantajaan ja kompleksoidaan peptidin kanssa, minkä jälkeen liuoksessa oleva kompleksi ultrasuodatetaan siten, että epäpuhtaudet poistuvat permeaattiin. Peptidi vapautetaan tämän jälkeen ligandista ja kantajasta. Kantaja-aineita ovat akryylijohtannaistyyppiiset, synteettiset lateksipolymeerit. Menetelmä on monimutkainen peptidi-spesifisen ligandin löytämisen suhteen ja sillä on siksi rajoitetut sovellutukset.

Olemme havainneet, että edellä mainitut heikkoudet ja rajoitukset voidaan poistaa tai niitä voidaan vähentää käyttämällä tämän keksinnön menetelmää, jossa mikroninkokoista partikkelimaista polymeeristä adsorbenttiä käytetään pääasiallisena kompleksinmuodostajana.

Tässä keksinnössä esitetään menetelmä, jossa (i) ensimmäinen veteen liukeneva tai veteen dispergoituva bio-vaikutteinen aine, joka on ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä yhden tai useamman muun komponentin kanssa, jotka ovat epäpuhtauksia tai muita veteen liukenevia ja/tai veteen dispergoituvia bio-vaikutteisia aineita, erotetaan mainituista yhdestä tai useammasta muusta komponentista, ja/tai (ii) mainitussa ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä mainittujen yhden tai useamman muun komponentin kanssa oleva mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine

puhdistetaan, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että se käsittää:

(a) seoksen muodostamisen, joka seos sisältää ensimmäisen nesteväliaineen ja partikkelimaisen, polymeerisen adsorbentin, jolla on kyky adsorboida edullisesti ensimmäinen bio-vaikutteinen aine tai mainittu yksi tai useampi muu komponentti ensimmäisestä nesteväliaineesta ja jonka keskimääräinen partikkelikoko on 0,01-5 mikrometriä, sekä joka on valittu ioninvaihtohartsien ja ilman varausta olevien, ei-funktionalisoitujen polymeeripartikkeleiden joukosta, jolloin adsorbentti sitoo käänteisesti ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen tai mainitut yhden tai useamman muun komponentin muodostaen kompleksin;

(b) vaiheesta (a) saadun seoksen suodattamisen kalvo-suodatuksen avulla, joka kalvo ei läpäise mainittua kompleksia, jolloin mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine erottuu mainitusta yhdestä tai useammasta muusta komponentista ja/tai puhdistuu.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan ensimmäinen veteen liukeneva tai veteen dispergoituva bio-vaikutteinen aine (i) erotetaan ensimmäisestä nesteväliaineesta ja/tai (ii) puhdistetaan. Tämän suoritusmuodon mukaan partikkelimaisella polymeerisella adsorbentilla on kyky adsorboida edullisesti ensimmäinen bio-vaikutteinen aine ensimmäisestä nesteväliaineesta, jolloin adsorbentti sitoo käänteisesti ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen muodostaen kompleksin, ja kalvo läpäisee mainitun yhden tai useamman muun komponentin muttei läpäise kompleksia, jolloin kompleksi ja mainittu yksi tai useampi muu komponentti erottuu, ja/tai mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine puhdistuu. Tämän suoritusmuodon mukaan menetelmä voi lisäksi käsittää vaiheen, jossa

(c) ensimmäinen bio-vaikutteinen aine vapautetaan kompleksin polymeeripartikkeleista, esimerkiksi elektrolyytin avulla, toiseen nesteväliaineeseen.

Esillä olevaa keksintöä kuvataan seuraavassa viitaten erityisesti edellä esitettyyn edulliseen suoritusmuotoon.

Kun adsorbentti/biomateriaali-kompleksin sisältämä neste-väliaine kalvosuodatetaan, jää adsorbentti/biomateriaali-kompleksi suodattimen pinnalle, sillä partikkelit ovat kalvosuodatinhuokosia suuremmat, mutta epäpuhtaudet ja/-tai muut biomateriaalit menevät suodattimen läpi permeaattiin, josta ne kerätään ja poistetaan. Adsorboitu biomateriaali voidaan tämän jälkeen vapauttaa adsorbentista nesteväliaineeseen, suodattaa ja ottaa talteen. Regeneroitu adsorbentti jää suodattimeen ja sitä voidaan käyttää uudestaan.

Näin ollen keksinnöllä aikaansaadaan uusi tapa biomateriaalien kromatografista erottamista ja/tai puhdistamista varten, erityisesti proteiinipohjaisten materiaalien suhteen. Toisin kuin tavanomaisessa kromatografiassa, mikroninkokoiset polymeeriset adsorbentit virtaavat nesteiden tavoin eikä niitä pakata kolonneihin tavanomaisten adsorbenttien tavoin. Tämän vuoksi ei myöskään esiinny adsorbenttipartikkelien painosta johtuvaa ongelmaa, ts. ei ole kolonnia, joka voisi rikkoutua oman painonsa vuoksi. Pakkautumista ei myöskään esiinny, mikä voisi aiheuttaa heikentynyttä virtausta ja ei-toivottua paineen laskua kolonnissa. Tämän seurauksena adsorbentit voivat helposti kantaa biomateriaalia ultrasuodatinaukkojen hienojen, onttojen kuitujen soluonteloiden läpi (joiden kautta epäpuhtaudet tai ei-adsorboidut biomateriaalit kulkeutuvat permeaattiin) adsorptioastiaan kierrättämistä ja väkevöittämistä varten. Adsorbenttia voidaan siksi käyttää uudestaan useammassa kierrossa.

Tässä yhteydessä tarkoitetaan "biomateriaali"-käsitteellä vesiliukoista tai veteen dispergoituvaan, bio-vaikutteista ainetta, joka on joko biologista tai ei-biologista alkuperää. Biomateriaaleihin kuuluu yhdisteitä, molekyy-

lejä, polymeerejä, partikkeleita ja sekä yksinkertaisia että monimutkaisia luonnosta saatavia tai biologisten tai ei-biologisten prosessien avulla syntetisoituja aineita. Käsitteeseen sisältyy myös proteiinipohjaiset aineet (kuten albumiinit ja entsyymit), aminohapot, nukleiinihapot, peptidit ja polypeptidit, vasta-aineet, antigeenit, steroidit, hormonit, antibiootit, vitamiinit ja polymeeriset hiilihydraatit, jotka käänteisesti muodostavat komplekseja tai muulla tavoin sitoutuvat, adsorboituvat tai kiinnittyvät partikkelimaisiin polymeerisiin adsorbentteihin. Sitoutuminen voi perustua sähköstaattiseen attraktioon, van der Waalsin voimien aikaansaamiin hydrofiilisiin/hydrofobisiin vuorovaikutuksiin, ominaisaffiniteettiin tai johonkin edellä mainittujen yhdistelmään.

Biomateriaaleja valmistetaan useimmiten nesteväliaineessa joko kemiallisen synteessin tai fermentaation avulla, tai näiden kahden menetelmän yhdistelmän avulla, ja erotetaan liuoksina tai hienoina dispersioina solusta, solujätteestä tai muusta fermentaatioliemessä tai solukulttuuriväliaineessa olevasta kiinteästä aineesta. Saatu biomateriaalia sisältävä väliaine sisältää tavallisesti joka tapauksessa epäpuhtauksia ja/tai muita biomateriaaleja, jotka on ehdottomasti poistettava, mikäli biomateriaalin tulee täyttää kaupalliset tai lääketieteelliset puhtausvaatimukset.

Käsitettä "biotuote" käytetään joskus mukavuuden ja selkeyden vuoksi tässä yhteydessä kuvaamaan biomateriaalia, joka on puhdistettu ja/tai erotettu keksinnön menetelmän mukaan.

Keksinnön menetelmässä käytetyt polymeeriset adsorbentit ovat partikkelimaisia, niiden koon ollessa sellainen, etteivät ne läpäise suodatinkalvoa, vaan sallivat vapaan virtauksen onttojen kuitujen läpi. Adsorbenttipartikkelien keskimääräinen halkaisija on 0,01-5 mikrometriä, edul-

lisesti 0,1-1,5 mikrometriä. Adsorbenttipartikkelit ovat yleensä veteen liukenemattomia tai pääosin veteen liukenemattomia, minkä vuoksi adsorbentit ja adsorbentti-biomateriaali-kompleksi ei läpäise kalvosuodattimen huokosia tai muodosta polarisoitua kerrosta kalvon pinnalle.

Edellä mainitut vaatimukset täyttävää partikkelimaista polymeeristä adsorbenttia voidaan käyttää, mikäli se myös kykenee selektiivisesti adsorboimaan nesteväliaineessa olevan biotuotteen, mutta ei epäpuhtauksia tai muita biomateriaaleja, eikä denaturoi biotuotetta, tai mikäli se vaihtoehtoisesti kykenee adsorboimaan epäpuhtaudet tai muut biomateriaalit, mutta ei adsorboi tai denaturoi biotuotetta. Adsorbenttipartikkelit voivat olla varattuja tai ne voivat olla ilman varausta. Varattu tila voidaan saavuttaa funktionaalisten ryhmien avulla, jotka modifioivat adsorbentin hydrofobista/hydrofiilistä ominaisuutta suhteessa biomateriaalin sisältämään vesijärjestelmään. Sopivia varattuja adsorbentteja ovat partikkelimaiset ioninvaihtohartsit, joissa ioninvaihtofunktionaalisuus antaa polymeerille pintavarauksen. Tyypillisiä ilman varausta olevia polymeerejä ovat ioninvaihtohartsiprekursorit, ts. silloitettu tai silloittamaton kiinteä polymeeri, jota ei vielä ole funktionalisoitu.

Jos partikkelimainen polymeerinen adsorbentti on varattu materiaali, on biomateriaalin sitoutumismekanismi kopleksiin nähden pääosin sähköstaattinen. Jos adsorbentti on ilman varausta, ja myös jossain määrin silloin kun adsorbentti on varattu, kuvataan sitoutumismekanismia yhtenä tai useampana hydrofobisena/hydrofiilisenä vuorovaikutuksena, ominaisaffini-

teettivuorovaikutuksena tai muuna vaikutuksena.

Partikkelimainen polymeerinen adsorbentti sisältää edullisesti ionogeenisiä ryhmiä ja ioninvaihtohartsin, jonka partikkelikoko on mikrometri- tai submikrometri-luokkaa, ja joka on varattu biotuotteen varauksen vastaisella varauksella. Ioninvaihtohartsia adsorbentit voivat sisältää yhden hartsin, jolla on anioninvaihtofunktionaalisuus, yhden hartsin, jolla on sekä anionin- ja kationinen funktionaalisuus (amfoteeriset hartsit), tai olla näiden seos, hybridi, kelaatti- tai komposiittihartseja, joilla on anionin- tai sekä anionin- että kationinvaihto-ominaisuudet. Geelimäiset ja makroretikulaariset hartsit ovat lisäksi myös käyttökelpoisia.

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia hartseja ovat makroretikulaariset vinyyliaromaatti- tai akryylihartsi-adsorbentit ja patenteissa US-A-3,037,052; 3,637,535; 3,843,566; 3,791,866; 3,275,548 ja 3,357,158 kuvatut vaihtajat; patentissa US-A-3,991,017 kuvatut hybridi-hartsit; patentissa US-A-3,645,922 kuvatut komposiittihartsit; patentissa US-A-4,202,737 kuvatut amfoteeriset hartsit; ja muut julkaisussa Ion Exchange, J. Marinsky, ed., Vol. II, luku 6 (New York, 1969) kuvatut hartsit.

Esimerkkejä keksinnön menetelmässä käyttökelpoisista erityisistä polymeeriadsorbenteista ovat vinylideeni-monomeereistä koostuvat homopolymeerit ja kopolymeerit, kuten akryyli- ja metakryylihapot ja -esterit, ja muut monoetyleenisesti tyydyttymättömät monomeerit tai niiden seokset, kuten monosykliset ja polysykliset

aromaattiset monomeerit, kuten styreeni ja substituoidut styreenit. Monoetyleenisesti tyydyttymättömät monomeerit voivat olla polymerisoitu ilman silloitusta tai ne on voitu silloittaa in situ polyetyleenisesti tyydyttymättömällä monomeerilla, kuten polyvinyyliaromaattisella hiilivedyllä (esim. divinyylibentseenillä tai divinyylitolueenilla), glykolidimetakrylaatilla, kuten etyleeniglykolidimetakrylaatti, tai polyhydrisen alkoholin polyvinyylieetterillä, kuten divinoksietaanilla ja trivinoksipropanilla.

Polymeeriset adsorbentit voidaan valmistaa tavanomaisella tavalla, esimerkiksi massa-, liuos-, suspensio- tai emulsiopolymerisoinnilla. Jos polymerisointiprosessi on emulsiopolymerointi, saavutetaan haluttu pieni partikkelikoko heti, mikä käy ilmi Chongin patenteissa US-A-4,359,537 ja 4,380, 590, Chongin, Isacoffin ja Neelyn patentissa US-A-4,200,695 ja Isacoffin ja Neelyn patentissa US-A-4,537,683, joihin kaikkiin tässä viitataan. Jos polymerointitapa on suspensiopolymerointi tai muu polymerointimuoto, voidaan partikkelimaiset tuotepolymeerit jauhaa pienemmiksi alalla hyvin tunnettujen jauhatusmenetelmien mukaan. Mikäli partikkelit ovat epäsännöllisen muotoisia (esim. jauhettu hartsi), oletetaan yllämainittujen partikkelikokojen tämän keksinnön suhteen viittavaan pisimpään partikkelin mittaan.

Veteen liukenemattomia, silloittamattomia tai osittain funktionalisoituja materiaaleja voidaan myös käyttää tässä keksinnössä. Esimerkiksi ioninvaihtopolymeerit, jotka partikkelipinnan läheisyydessä on funktionali-

soitu ionogeenisellä ryhmällä, esimerkiksi yksinkertainen kerros ioninvaihtoryhmiä noin helmen ulkokehän kohdalla, ovat käyttökelpoisia. Kevyesti silloitetut tai pinta-silloitetut helmet, joiden vesiliukoisuus on alhainen, ovat myös tehokkaita.

Edellä mainittujen, Chongin , Chongin et al ja Isacoffin et al patenttien adsorbentit ovat, yleisesti kuvattuina, ioninvaihtohartseja, jotka koostuvat pyöreistä, helmimäisistä, silloitetuista polymeereistä, joissa on noin 1,5, esimerkiksi 0,1-1,5 funktionaalista ryhmää monomeeriyksikköä kohden. Nämä ryhmät voivat olla erittäin happamia (esim. -HSO_3 -ryhmät), lievästi happamia (esim. -COOH -ryhmät), erittäin emäksisiä (esim. kvaternääriset ammoniumiryhmät) tai lievästi emäksisiä (esim. tertiääriset amiiniryhmät).

Edulliset polymeeriset adsorbentit ovat, kuten on todettu, ioninvaihtohartseja, joiden valinta tilanteesta riippuen perustuu ensisijaisesti puhdistettavan ja/tai erotettavan biomateriaalin sähkövaraukseen. Mikäli biomateriaalin varaus on negatiivinen, käytetään positiivisesti varattua (emäksistä) hartsia; mikäli varaus on positiivinen, käytetään negatiivisesti varattua (hapanta) hartsia. Valinnan voi kummassakin tapauksessa suorittaa alan hallitseva henkilö ioninvaihtokemian periaatteita hyväksikäyttäen.

Käytetyn polymeerisen adsorbentin määrän tulee edullisesti olla tarpeeksi suuri, jotta suurin osa nesteväliaineessa olevasta biomateriaalista adsorboituisi, mutta ei niin suuri, että väliaineesta tulee viskoottinen ja

vaikkeasti käsiteltävä ja suodatettava.

Adsorbenttiä käytetään edullisesti väliaineessa olevan biotuotteen painoa vastaava määrä, esimerkiksi noin 0,01-10 paino-% väliaineessa, joka sisältää yhtä paljon biotuotetta.

Keksinnön menetelmä voidaan toteuttaa poistamalla ensin biotuotetta sisältävässä nesteväliaineessa oleva partikkelimainen aines sentrifugoimalla, suodattamalla tavanomaisella tavalla ja muilla kiinteän aineen poistamiseksi tarkoitetuilla erotusmenetelmillä, mikäli väliaine sisältää sellaisia kiinteitä aineita. Sopiva määrä valittua adsorbenttia lisätään suodokseen tai nesteväliaineeseen, joka sisältää biotuotteen ja ja toisen(-t) biotuotteesta erotettavan(-t) komponentin(-t). Saatua seosta voidaan sen jälkeen sekoittaa jonkin aikaa, yleensä usean minuutin ajan, jotta adsorbenttipartikkelit adsorboituisivat biotuotteeseen. Tämän jälkeen seos suodatetaan suodatuskalvon läpi, edullisesti kierrättäen sitä onttoa kuitutyyppejä olevan modulin läpi. Kalvo valitaan siten, että se läpäisee mitkä tahansa epäpuhtaudet ja muut biomateriaalit biotuotetta ja ei-adsorboitua biotuotetta lukuunottamatta, mutta ei biotuotetta kantavia adsorbenttipartikkeleita. Käytetyt kalvosuodattimet ovatkin puolittain läpäiseviä kalvoja, jotka ovat tunnettuja kyvystään poistaa liuenneita tai dispersoituja aineita ultrasuodatuksen tai mikrosuodatuksen avulla, mutta jotka eivät erota liuenneita suoloja käänteisosmoosina tunnetun menetelmän mukaan.

Adsorbentti-biotuotekompleksi jää suodattimeen, ja

permeaatti, joka sisältää epäpuhtauksia ja/tai muuta biomateriaalia, kerätään ja poistetaan yksiköstä. Biotuote vapautetaan tämän jälkeen adsorbentista, esimerkiksi tunnettujen desorptiomenetelmien mukaan. Biotuotteen luonteesta riippuen tämä voidaan saavuttaa muuttamalla väliaineen pH-arvoa, muuttamalla elektrolyyttitasapainoa tai muun sopivan affiniteettikromatografian tai vastaavan menetelmän mukaan.

Desorboidun biotuotteen sisältävä väliaine suodatetaan saman kalvosuodattimen lävitse ja otetaan talteen. Regeneroitu adsorbentti jää suodattimeen ja se voidaan käyttää uudestaan.

Keksintöä tullaan kuvaamaan tarkemmin seuraavien esimerkkien avulla, joiden tarkoitus on ainoastaan kuvata keksintöä eikä asettaa rajoituksia keksinnön käytön suhteen. Esimerkeissä mainitut osa- ja prosenttiluvut on laskettu painon suhteen, mikäli muuta ei mainita.

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä esitetään negatiivisesti varatun adsorbentin tehokkuus erottaa positiivisesti varattu biomateriaali (Cytochrome C) negatiivisesti varatusta biomateriaalista (naudan seerumialbumiinista).

(A) Adsorbenttilataus:

Naudan seerumialbumiinia ("BSA"), 200 mg, liuotettiin 20 ml:aan 0,01 M kaliumfosfaattipuskuria suodatetussa, deionisoidussa vedessä ("PPB-liuos"). Saatu liuos

suodatettiin 0,22 mikrometrin Millipore-suodattimen läpi. Järjestelmän kokonaistilavuus tässä vaiheessa oli 175 ml. Puoli grammaa väkevää happoa, emulsiopolymeroituja, styreeni/divinyylibentseenigeelimäisiä kopolymerisiä (7,3% divinyylibentseeniä silloittajana) hartsihelmiä, joiden keskimääräinen partikkelikoko on $0,26 \pm 0,02$ mikrometriä ja kationinvaihtokapasiteetti on 5,1 meq/g kuiva-ainetta, lisättiin 195 ml:aan BSA/-PPB-liuokseen. Saatuun suspensioon lisättiin 146,2 mg Cytochrome C:tä, tyyppi III.

(B) Ultrasuodatus:

BSA- ja Cytochrome C-valmisteet sekoitettiin ja seosta kierrätettiin 15 minuuttia Amicon HIMP01-43 onttokuitu-ultrasuodatusjärjestelmän kalvon läpi, yksikön korkeus 20,32 cm (8 in), jonka kuitujen sisähalkaisija (I.D.) on 0,11 cm (43 mils), huokosten halkaisija on 0,1 mikrometriä ja tehokas pinta-ala on $0,028 \text{ m}^2$ ($0,3 \text{ ft}^2$). Permeaatti kerättiin ja poistettiin. Suodattimeen jäänyt hartsisuspensio diasuodatettiin viidellä PPB-liuoksen tilavuuskorvauksella ja palautettiin tilavuuteen 200 ml. Analyysi osoitti, että 97,4 mg Cytochrome C:tä jäi hartsiin ja 48,8 mg Cytochrome C:tä ja 88% BSA:ta läpäisi suodattimen.

(C) Adsorbentin poisto (eluointi):

Nestemäistä 1,0 M:sta KCl-liuosta, 200 ml, lisättiin suspensioon, jota kierrätettiin ultrasuodatuskalvon läpi 15 minuutin ajan. Permeaatti kerättiin, diasuodatettiin seitsemällä 1,0 M KCl:n tilavuuskorvauksella,

ja palautettiin tilavuuteen 200 ml:a. Analyysi osoitti, että 102,0 mg Cytochrome C:tä oli eluoitunut. Eluointiteho laskettiin seuraavan kaavan mukaan

$$\frac{102,0 \text{ mg eluoitunut}}{97,4 \text{ mg ladattu}} \times 100 = 105\%$$

Esimerkki 2

Tässä esimerkissä esitetään tehokas tapa erottaa Cytochrome C (positiivisesti varattu biomateriaali) ja Penicillin G (positiivisesti varattu biomateriaali) toisistaan negatiivisesti varatun adsorbentin avulla.

(A) Adsorbenttilataus:

Penicillin G:tä ("PG"), 200 mg, liuotettiin 200 ml:an PPB-liuosta (kuvattu esimerkissä 1). Kokonaistilavuus oli tässä vaiheessa 200 ml. Puoli grammaa esimerkissä 1 käytettyä väkevää happoioninvaihtohartsia lisättiin 195 ml:aan PPB-liuosta, joka sisälsi PG:tä. Saatuun suspensioon lisättiin 146,2 mg:a Cytochrome C:tä, tyyppi III.

(B) Ultrasuodatus:

PG- ja Cytochrome C-valmisteet sekoitettiin keskenään ja kierrätettiin 15 minuuttia esimerkissä 1 kuvatun ultrasuodatusjärjestelmän kalvon läpi. Permeaatti kerättiin ja poistettiin. Suodattimeen jäänyt hartsisuspensio diasuodatettiin viidellä PPB-liuoksen tilavuuskorvauksella, jonka jälkeen tilavuus palau-

tettiin 200 ml:an. Analyysi osoitti, että 105,6 mg:a Cytochrome C:tä jäi hartsiin ja 40,6 mg:a Cytochrome C:tä ja 92% PG:tä läpäisi suodattimen.

(C) Adsorbentin poisto (eluointi):

Nestemäistä 1,0 M:sta KCL-liuosta, 200 ml, lisättiin hartsisuspensioon, jonka jälkeen seosta kierrätettiin ultrasuodatuskalvon läpi 15 minuutin ajan. Permeaatti kerättiin, diasuodatettiin seitsemällä 1,0 M KCL:n tilavuuskorvauksella, jonka jälkeen tilavuus palautettiin 200 ml:an. Analyysi osoitti, että 109,8 mg Cytochrome C:tä oli eluoitunut, jolloin eluointitehoksi saatiin seuraavaa:

109,8 mg eluoitunut

$$\frac{\quad}{105,6 \text{ mg ladattu}} \times 100 = 104\%$$

105,6 mg ladattu

Esimerkki 3

Tässä esimerkissä kuvataan ilman varausta olevan adsorbentin käyttöä biomateriaalin erottamiseksi ja esitetään lisäksi, miten puhdistettavan ja/tai erotettavan biomateriaalin sisältävän väliaineen kohonnut elektrolyyttitaso heikentää adsorbentin latauskapasiteettia, ts. sen kykyä sitoutua biomateriaaliin.

a) 195 ml:an 0,1 M:sta PPB-liuosta (kuvattu esimerkissä 1) lisättiin kaliumkloridia, jotta kaliumkloridin pitoisuudeksi saataisiin 0,1 M, ja 2,0 g (kuiva-aineesta)

50% hydroksietyyliakrylaattia ja 50% trimetylolipropanitrimetyyliakrylaattia sisältävää emulsiokopolymeriä. Tähän lisättiin 150 mg Cytochrome C:tä (kuvattu esimerkissä 1) 200 ml:ssa 0,1 M PPB/0,1 M KCL-puskuriliuosta, ja kopolymerin latauskapasiteetti määritettiin kuten esimerkissä 1 käyttämällä 1 M KCL/0,01 M PPB-liuosta eluenttina. 1,6 mg Cytochrome C:tä kopolymerigrammaa kohden sitoutui näissä olosuhteissa ja 96,9% siitä eluoitui.

b) 195 ml:an tislattua vettä lisättiin 2,0 g (kuiva-aineesta) yllä (a) kuvattua emulsiokopolymeriä. Tähän lisättiin 150 mg Cytochrome C:tä ja 200 ml tislattua vettä ja latauskapasiteetti määritettiin ultrasuodatuksen avulla, kuten esimerkissä 1. 67,2 mg Cytochrome C:tä kopolymerigrammaa kohden sitoutui ja 99,5% siitä eluoitui 1 M KCl/0,01 M PPB-liuoksella.

Esimerkki 4

Tässä esimerkissä kuvataan hiivasolu heksokinaasin ultrasuodatuskromatografiaa tämän keksinnön prosessia käyttäen.

Kuivatut hiivasolut (Sigma Chemical Co., Cat. No. Ysc-1) liuotettiin suspendoimalla ne 0,12 M:een ammoniumihydroksidiin. Kun solut olivat liuonneet, laskettiin suspension pH-arvo 4,5:een lisäämällä etikkahappoa. Lopullinen tilavuus oli 1,6 litraa ja kuiva-ainepitoisuus oli 9%. Suspensio laimennettiin 2,6 litraan deionisoidulla vedellä ja mikrosuodatettiin Romicon HP1-47MP01 yksiköllä varustetussa suodatusyksikössä, jotta

solujätteet erottuisivat liukenevista entsyymeistä, heksokinaasi (HK) mukaan lukien. Suspensio väkevöitiin 500 ml:aan ja diasuodatettiin kymmenellä 0,14 M natriumasetaatin tilavuuskorvauksella pH:ssa 5. Heksokinaasin talteenotto permeaatista oli 73% liuotetun suspension alkuperäisestä entsyymimäärästä.

Kahdessa litrassa mikrosuodatussuodosta, joka sisälsi yhden yksikön heksokinaasia ja 0,96 mg proteiinia/ml, oleva heksokinaasi väkevöitiin adsorboimalla se väkevään happoon, emulsiopolymeroituun, styreeni-7,3% divinyylibentseenigeelimäiseen hartsiin, jonka keskimääräinen partikkelin halkaisija oli 0,26 mikrometriä ja kationinvaihtokapasiteetti 5,1 meq/g kuivaa hartsia. Hartsi lisättiin tämän jälkeen suspensioon jolloin sen pitoisuus oli 2100 ppm. Entsyymi- ja hartsisuspensiota sekoitettiin hitaasti 15 minuuttia, jonka aikana pienen suodatetun osan analyysi osoitti, ettei supernatantissa ollut entsyymiaktiivisuutta. Hartsi laskeutui nopeasti astian pohjalle, kun sekoittaminen lopetettiin ja se voitiin ottaa talteen monella tavalla. Tässä tapauksessa koko hartsisuspensio sijoitettiin suodatusyksikön kiertosäiliöön, joka oli varustettu yllä kuvatulla mikrosuodatusyksiköllä. 15 minuutin kierrättämisen jälkeen tehty suodoksen analyysi osoitti, että 505 alkuperäisesti hartsiin sidotusta entsyymistä oli suodoksessa. Suspensio väkevöitiin 500 ml:aan ja diasuodatettiin kahdella litralla adsorptiopuskuria. Lopullisessa diasuodoksessa ei havaittu entsyymiaktiivisuutta. 500 ml:a 4 M:sta natriumkloridia lisättiin retenaattiin ja kierrätettiin 15 minuuttia. Suspensio väkevöitiin tämän jälkeen 500 ml:aan. Tämä vaihe toistettiin vielä kaksi

kertaa. 2 M NaCL-suodoksen analyysi osoitti, että 60% adsorboidusta entsyymistä saatiin talteen tässä vaiheessa.

1
2
3
4
5
6

7
8
9
10
11
12

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä, jossa (i) ensimmäinen veteen liukeneva tai veteen dispergoituva bio-vaikutteinen aine, joka on ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä yhden tai useamman muun komponentin kanssa, jotka ovat epäpuhtauksia tai muita veteen liukenevia ja/tai veteen dispergoituvia bio-vaikutteisia aineita, erotetaan mainituista yhdestä tai useammasta muusta komponentista, ja/tai (ii) mainitussa ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä mainittujen yhden tai useamman muun komponentin kanssa oleva mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine puhdistetaan, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää:

(a) seoksen muodostamisen, joka seos sisältää ensimmäisen nesteväliaineen ja partikkelimaisen, polymeerisen adsorbentin, jolla on kyky adsorboida edullisesti ensimmäinen bio-vaikutteinen aine tai mainittu yksi tai useampi muu komponentti ensimmäisestä nesteväliaineesta ja jonka keskimääräinen partikkelikoko on 0,01-5 mikrometriä, sekä joka on valittu ioninvaihtohartsien ja ilman varausta olevien, ei-funktionalisoitujen polymeeripartikkeleiden joukosta, jolloin adsorbentti sitoo käänteisesti ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen tai mainitun yhden tai useamman muun komponentin muodostaen kompleksin;

(b) vaiheesta (a) saadun seoksen suodattamisen kalvosuodatuksen avulla, joka kalvo ei läpäise mainittua kompleksia, jolloin mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine erottuu mainitusta yhdestä tai useammasta muusta komponentista ja/tai puhdistuu.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa (i) ensimmäinen veteen liukeneva tai veteen dispergoituva bio-vaikutteinen aine erotetaan ensimmäisestä nesteväliaineesta, joka sisältää mainitun ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen ja mainitun yhden tai useamman muun komponentin, ja/tai (ii) mainitussa ensimmäisessä nesteväliaineessa oleva mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine puhdistetaan, **tunnettu** siitä, että partikkelimaisella polymeerisellä adsorbentilla on kyky adsorboida edullisesti ensimmäinen bio-vaikutteinen aine ensimmäisestä nesteväliaineesta, jolloin adsorbentti sitoo käänteisesti ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen muodostaen kompleksin,

ja että kalvo läpäisee mainitun yhden tai useamman muun komponentin muttei läpäise kompleksia, jolloin kompleksi ja mainittu yksi tai useampi muu komponentti erottuu, ja/tai mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine puhdistuu.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää lisäksi vaiheen, jossa
(c) ensimmäinen bio-vaikutteinen aine vapautetaan kompleksin polymeeripartikkeleista, esimerkiksi elektrolyytin avulla, toiseen nesteväliaineeseen.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää lisäksi vaiheen, jossa
(d) vapautuneen ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen ja adsorbenttipolymeeripartikkelit sisältävä toinen nesteväliaine suodatetaan kalvosuodatuksen avulla kuten vaiheessa (b), jolloin ensimmäinen bio-vaikutteinen aine, mutta eivät adsorbenttipolymeeripartikkelit, akkumuloituu permeaattiin.

5. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että adsorbentti käsittää ioninvaihtohartsin, jossa on korkeintaan noin 1,5 funktionaalista ryhmää monomeeriyksikköä kohden.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ioninvaihtohartsin partikkelit käsittävät pääosin pyöreitä helmiä tai jauhettuja partikkeleita.

7. Patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ioninvaihtohartsin käsittää happaman tai emäksisen ioninvaihtohartsin, ensimmäinen bio-vaikutteinen aine voi esimerkiksi olla positiivisesti varattu ja ioninvaihtohartsin on hapan, tai ensimmäinen bio-vaikutteinen aine voi olla negatiivisesti varattu ja ioninvaihtohartsin on emäksinen.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että partikkelimainen, polymeerinen adsorbentti on ilman varausta olevien, ei-funktionalisoitujen polymeeripartikkelien muodossa, ja että partikkelimainen, polymeeri-

nen adsorbentti ja ensimmäinen bio-vaikutteinen aine ovat hydrofobisia.

9. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen bio-vaikutteinen aine käsittää proteiinimaisen materiaalin, aminohapon, antibiootin, vitamiinin tai nukleiinihapon.

10. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen bio-vaikutteinen aine ja mainittu yksi tai useampi muu komponentti on suspendoitu tai liuotettu ensimmäiseen nesteväliaineeseen, ja/tai ensimmäinen nesteväliaine on vesipitoinen ja partikkelimainen, polymeerinen adsorbentti on veteen liukenematon tai olennaisesti veteen liukenematon.

11. Minkä tahansa edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että muut veteen liukenevat ja/tai veteen dispergoituvat bio-vaikutteiset aineet käsittävät yhden tai useamman proteiinin, aminohapon, nukleiinihapon, antibiootin tai vitamiinin.

12. Partikkelimaisen, polymeerisen adsorbentin käyttö (i) erotettaessa ensimmäinen veteen liukeneva tai veteen dispergoituva bio-vaikutteinen aine, joka on ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä yhden tai useamman muun komponentin kanssa, jotka ovat epäpuhtauksia tai muita veteen liukenevia ja/tai veteen dispergoituvia bio-vaikutteisia aineita, mainitusta yhdestä tai useammasta muusta komponentista, ja/tai (ii) puhdistettaessa mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine, joka on mainituksa ensimmäisessä nesteväliaineessa yhdessä mainittujen yhden tai useamman muun komponentin kanssa, **tunnettu** siitä, että

(a) muodostetaan seos, joka sisältää ensimmäisen nesteväliaineen ja partikkelimaisen, polymeerisen adsorbentin, jolla on kyky adsorboida edullisesti ensimmäinen bio-vaikutteinen aine tai mainittu yksi tai useampi muu komponentti ensimmäisestä nesteväliaineesta ja jonka keskimääräinen partikkelikoko on 0,01-5 mikrometriä, sekä joka on valittu ioninvaihtohartsien

ja ilman varausta olevien, ei-funktionalisoitujen polymeeri-partikkeleiden joukosta, jolloin adsorbentti sitoo käänteisesti ensimmäisen bio-vaikutteisen aineen tai mainitun yhden tai useamman muun komponentin muodostaen kompleksin; ja

(b) vaiheesta (a) saatu seos suodatetaan kalvosuodatuksen avulla, joka kalvo ei läpäise mainittua kompleksia, jolloin mainittu ensimmäinen bio-vaikutteinen aine erottuu mainitusta yhdestä tai useammasta muusta komponentista ja/tai puhdistuu.

Patentkrav

1. Förfarande för (i) separering av en första vattenlöslig eller vattendispergerbar bio-verkande substans som befinner sig i ett första vätskemedium tillsammans med en eller flera andra komponenter, vilka utgöres av föroreningar eller andra vattenlösliga och/eller vattendispergerbara bio-verkande substanser, från nämnda ena eller flera andra komponenter, och/eller (ii) rening av nämnda första bio-verkande substans som befinner sig i nämnda första vätskemedium tillsammans med nämnda ena eller flera andra komponenter, **kännetecknat** av att förfarandet omfattar:

(a) bildande av en blandning som innehåller det första vätskemediet och en partikelformig, polymer adsorbent som är i stånd att adsorbera företrädesvis den första bio-verkande substansen eller nämnda ena eller flera andra komponenter från det första vätskemediet och som har en genomsnittlig partikelstorlek på 0,01-5 mikrometer, samt som är vald bland jonbytarhartser och oladdade, icke-funktionaliserade polymerpartiklar, varvid adsorbenten binder reversibelt den första bio-verkande substansen eller nämnda ena eller flera andra komponenter för bildande av ett komplex;

(b) filtrering av blandningen från steg (a) med hjälp av membranfiltrering, vilket membran är opermeabelt för nämnda komplex, varvid nämnda första bio-verkande substans separeras från nämnda ena eller flera andra komponenter och/eller renas.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för (i) separering av den första vattenlösliga eller vattendispergerbara bio-ver-

kande substansen från det första vätskemediet som innehåller nämnda första bio-verkande substans och nämnda ena eller flera andra komponenter, och/eller (ii) rening av nämnda första bio-verkande substans som befinner sig i nämnda första vätskemedium, **kännetecknat** av att den partikelformiga polymera adsorbenten är i stånd att adsorbera företrädesvis den första bio-verkande substansen från det första vätskemediet, varvid adsorbenten binder reversibelt den första bio-verkande substansen för bildande av ett komplex, och att membranet är permeabelt för nämnda ena eller flera andra komponenter men ej för komplexet, varvid komplexet och nämnda ena eller flera andra komponenter separeras, och/eller nämnda första bio-verkande substans renas.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** av att det ytterligare omfattar ett steg där
(c) den första bio-verkande substansen frigörs från polymerpartiklarna i komplexet, t.ex. med elektrolyt, i ett andra vätskemedium.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** av att det ytterligare omfattar ett steg där
(d) det andra vätskemediet som innehåller den frigjorda första bio-verkande substansen och adsorbentpolymerpartiklarna filtreras med hjälp av membranfiltrering såsom i steg (b), varvid den första bio-verkande substansen, men ej adsorbentpolymerpartiklarna, ackumuleras i permeatet.

5. Förfarande enligt vilket som helst av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att adsorbenten omfattar ett jonbytarharts som innehåller högst cirka 1,5 funktionella grupper per monomerenhet.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, **kännetecknat** av att jonbytarhartsets partiklar omfattar i stort sätt sfäriska pärlor eller malda partiklar.

7. Förfarande enligt patentkravet 5 eller 6, **kännetecknat** av att jonbytarhartset omfattar ett surt eller basiskt jonbytarharts, den första bio-verkande substansen kan t.ex. vara positivt laddad och jonbytarhartset är surt, eller den första bio-verkanden substansen kan vara negativt laddad och jonbytarhartset är basiskt.

8. Förfarande enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att den partikelformiga, polymera adsorbenten är i form av oladdade, icke-funktionaliserade polymerpartiklar, och att den partikelformiga, polymera adsorbenten och den första bio-verkande substansen är hydrofoba.

9. Förfarande enligt vilket som helst av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att den första bio-verkande substansen omfattar ett proteinaktigt material, en aminosyra, ett antibiotikum, ett vitamin eller en nukleinsyra.

10. Förfarande enligt vilket som helst av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att den första bio-verkande substansen och nämnda ena eller flera andra komponenter är suspenderade eller upplösta i det första vätskemediet, och/eller det första vätskemediet är vattenhaltigt och den partikelformiga, polymera adsorbenten är vattenolöslig eller väsentligen vattenolöslig.

11. Förfarande enligt vilket som helst av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att de övriga vattenlösliga och/eller vattendispergerbara bio-verkande substanserna omfattar en eller flera av ett protein, en aminosyra, en nukleinsyra, ett antibiotikum eller ett vitamin.

12. Användning av en partikelformig, polymer adsorbent vid (i) separering av en första vattenlöslig eller vattendispergerbar bio-verkande substans som befinner sig i ett första vätskemedium tillsammans med en eller flera andra komponenter, vilka utgöres av föroreningar eller andra vattenlösliga och/eller vattendispergerbara bio-verkande substanser, från

nämnda ena eller flera andra komponenter, och/eller (ii) rening av nämnda första bio-verkande substans som befinner sig i nämnda första vätskemedium tillsammans med nämnda ena eller flera andra komponenter, **kännetecknad** av att man

(a) bildar en blandning som innehåller det första vätskemediet och den partikelformiga, polymera adsorbent som är i stånd att adsorbera företrädesvis den första bio-verkande substansen eller nämnda ena eller flera andra komponenter från det första vätskemediet och som har en genomsnittlig partikelstorlek på 0,01-5 mikrometer, samt som är vald bland jonbytarhartser och oladdade, icke-funktionaliserade polymerpartiklar, varvid adsorbenten binder reversibelt den första bio-verkande substansen eller nämnda ena eller flera andra komponenter för bildande av ett komplex; och

(b) filtrerar blandningen från steg (a) med hjälp av membranfiltrering, vilket membran är opermeabelt för nämnda komplex, varvid nämnda första bio-verkande substans separeras från nämnda ena eller flera andra komponenter och/eller renas.