

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390600** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.29**

(51) Int. Cl. **B01D 15/20** (2006.01)  
**G01N 30/56** (2006.01)  
**G01N 30/44** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.10.15**

---

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СУСПЕНЗИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СМОЛЫ**

---

(31) **62/573,393**

(32) **2017.10.17**

(33) **US**

(62) **202090777; 2018.10.15**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Мао Натан, Ширли Эрик, Гэлли  
Джозеф, Фэн Рэймонд, Диссанайаке  
Тикири, Шиллинг Бернхард, Карвер  
Скотт (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к способам определения концентрации суспензии для суспензии хроматографической смолы во время заполнения колонки. Настоящее изобретение обеспечивает более точный и последовательный способ определения концентрации суспензии для заполнения хроматографической колонки. Способ по настоящему изобретению использует автоматический насос для обеспечения контролируемой скорости потока для уплотнения образца смолы. На основе уплотненной смолы можно определить концентрацию суспензии. Определенную концентрацию суспензии можно использовать для заполнения смолой хроматографической колонки с высокой точностью высоты слоя.

**A1**

**202390600**

**202390600**

**A1**

## **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СУСПЕНЗИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СМОЛЫ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к способам определения содержания суспензии смолы для суспензии хроматографической смолы для использования во время заполнения колонки. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает более точный и последовательный способ определения концентрации суспензии для заполнения хроматографической колонки, например, по способу осевого сжатия.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Определение содержания суспензии смолы представляет собой способ, обычно используемый для определения количества хроматографической среды, присутствующей в суспензиях на водной основе. Процентное содержание суспензии смолы или концентрация суспензии используется в расчетах во время операций по заполнению хроматографической колонки, чтобы определить, сколько водной суспензии следует поместить в колонку для обеспечения надлежащей работы и высоты целевого слоя. Концентрация суспензии является основной переменной, которую необходимо определить и ввести в автоматически заполняемые колонки, например, в колонки AxıChrom®, для последовательного заполнения в соответствии с правильной высотой и коэффициентом заполнения. Действительно, автоматически заполняемые колонки, такие как колонки AxıChrom®, обеспечивают операции заполнения, которые являются высокоавтоматизированными, но полагаются на точную концентрацию суспензии для воспроизводимых операций.

Современные способы определения содержания суспензии смолы включают гравитационное осаждение, центрифугирование и уплотнение потока. Современные способы позволяют получить репрезентативный образец из массы суспензии смолы и подвергнуть образец действию силы, которая вызывает осаждение смолы, что, в свою очередь, позволяет проанализировать отношение осажденной смолы к супернатанту (концентрация суспензии). Однако у этих способов имеется несколько недостатков. Например, в существующих способах часто наблюдаются расхождения между результатами измерения концентрации суспензии и достигнутым коэффициентом заполнения (определяемым как отношение высоты уплотненного слоя к конечной высоте уплотненного слоя) и высотой колонки. Кроме того, было показано, что результаты центрифугирования имеют высокую вариабельность между различными типами смолы и разными соотношениями одного и того же стандарта, если после центрифугирования используется различное время ожидания. Гравитационное осаждение считается более постоянным, но для его завершения может потребоваться значительное время, и может потребоваться эмпирическое определение и применение поправочного коэффициента, что увеличивает неопределенность способа.

Недавно GE Healthcare предложила рекомендованный способ уплотнения

специально для автоматически заполненной колонки AxiChrom®. Этот способ включает получение репрезентативного образца из массы смолы, загрузку его в колонку Tricorn диаметром 10 мм и 100 мм и ручное управление шприцем для создания силы уплотнения на образце. После достижения окончательного уплотнения определяют содержание суспензии смолы из соотношения смолы и супернатанта. Однако этот способ несовместим в значительной степени из-за различий в том, насколько сильно нажимается поршень в шприце.

Соответственно, остается потребность в более точном и стабильном способе определения концентрации суспензии для заполнения хроматографической колонки, например, автоматически запаковываемых хроматографических колонок.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены способы определения процентного содержания или концентрации суспензии смолы для суспензии хроматографической колонки. Способы настоящего изобретения обеспечивают высокоточные концентрации суспензии, которые, в свою очередь, обеспечивают точную высоту целевого слоя при упаковке смолы в хроматографической колонке, например, в автоматически заполненной колонке.

В одном из вариантов реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ определения концентрации суспензии, включающий добавление суспензии, содержащей смолу, в первую хроматографическую колонку; перекачивание объема жидкости, например, деионизированной воды, дистиллированной воды, очищенной воды, раствора соли или органического растворителя, через хроматографическую колонку с постоянной скоростью потока с образованием уплотненной смолы, где через хроматографическую колонку посредством автоматической насосной системы прокачивается заданный объем жидкости; измерение высоты слоя уплотненной смолы по завершении стадии закачки; и определение концентрации суспензии по измеренной высоте слоя. В некоторых вариантах реализации способ может дополнительно включать стадию добавления воды в хроматографическую колонку и обеспечения осаждения суспензии в течение от около пяти минут до около одного часа до перекачивания. В других вариантах реализации способ может дополнительно включать использование заданной концентрации суспензии для наполнения второй хроматографической колонки. В этом аспекте вторая хроматографическая колонка имеет скорость уплотнения, и скорость потока эквивалентна скорости уплотнения. В еще одном другом варианте реализации автоматизированная насосная система может включать шприц, функционально связанный с насосом. В некоторых вариантах реализации насосная система запрограммирована на циклическое включение и выключение в течение предварительно заданного периода времени или в течение нескольких периодов времени.

В другом варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ определения концентрации суспензии для суспензии хроматографической смолы во время заполнения/при заполнении колонки, включающий добавление суспензии, содержащей смолу, в хроматографическую колонку; установку автоматического насоса на работу с

постоянной скоростью потока в течение периода времени, например, начиная с начала закачки и заканчивая, когда смола осадится; перекачивание объема жидкости через хроматографическую колонку с постоянной скоростью потока с образованием уплотненной смолы, где объем жидкости перекачивается через хроматографическую колонку посредством автоматического насоса; измерение высоты слоя уплотненной смолы по завершении стадии закачки; и определение концентрации суспензии по измеренной высоте слоя. В некоторых вариантах реализации способ может включать стадию, обеспечивающую скорость потока на основе типа смолы, используемой в суспензии. Скорость потока может варьироваться от около 20 см/час до около 1500 см/час. В других вариантах реализации способ может включать стадию перемешивания суспензии перед добавлением суспензии в хроматографическую колонку. В других вариантах реализации способ может включать стадию использования определенной концентрации суспензии для заполнения смолой второй хроматографической колонки, где вторая хроматографическая колонка имеет скорость уплотнения, и скорость потока эквивалентна скорости уплотнения. В еще одном варианте реализации жидкость может представлять собой деионизированную воду, дистиллированную воду, очищенную воду, раствор соли или органический растворитель.

В еще одном другом варианте реализации настоящее изобретение предлагает способ определения концентрации суспензии для суспензии хроматографической смолы во время заполнения/при заполнении колонки, включающий обеспечение суспензии, включающей смолу; перемешивание суспензии для равномерного распределения смолы; добавление суспензии в хроматографическую колонку; обеспечение автоматизированной системы шприцевого насоса, содержащей насос, имеющий контроллер и шприц, функционально связанный с насосом, при этом система автоматического шприцевого насоса выполнена с возможностью перекачки объема воды через хроматографическую колонку, и контроллер выполнен с возможностью управления скоростью потока указанного объема воды так, что скорость потока постоянна в течение периода времени; перекачивание объема воды через хроматографическую колонку при постоянной скорости потока с образованием уплотненной смолы; измерение высоты слоя уплотненной смолы по завершении стадии прокачки; определение концентрации суспензии по измеренной высоте слоя; введение суспензии определенной концентрации во вторую хроматографическую колонку; и заполнение смолой второй хроматографической колонки используя суспензию определенной концентрации. В некоторых вариантах реализации скорость потока составляет от около 30 см/час до около 60 см/час. В другом варианте реализации вторая хроматографическая колонка имеет скорость уплотнения, и скорость потока эквивалентна скорости уплотнения. В других вариантах реализации вторая хроматографическая колонка включает скорость уплотнения, и скорость потока отличается от скорости уплотнения. В еще других вариантах реализации заполненная вторая хроматографическая колонка имеет высоту слоя в пределах 1 см от целевой высоты слоя.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Дополнительные признаки и преимущества изобретения могут быть установлены из следующего подробного описания, которое предоставлено в связке с чертежами, описанными ниже:

На Фиг. 1 показана блок-схема способа определения содержания суспензии смолы в соответствии с настоящим изобретением.

На Фиг. 2А и 2В показаны схематические диаграммы систем для определения содержания суспензии смолы, связанных с Фиг. 1 в соответствии с настоящим изобретением; и

На Фиг. 3 показана гистограмма, показывающая средний процент осаждения смолы после центрифугирования.

На Фиг. 4 показана гистограмма, показывающая процентную погрешность определения содержания суспензии смолы для центрифугирования (заштрихованный столбец) и заявленного в настоящей заявке способа (столбец в полосу) для различных типов смол.

На Фиг. 5 показана гистограмма, показывающая достигнутую высоту слоя в зависимости от идеальной высоты слоя, полученную с использованием центрифугирования, набор GE Slurry Kit или способа в соответствии с настоящим изобретением. В каждом наборе из трех столбцов первый столбец представляет центрифугирование, средний столбец представляет набор GE Slurry Kit, а последний из трех столбцов представляет результаты с использованием раскрытого способа для различных типов смол. Сплошная горизонтальная линия представляет целевую высоту слоя отдельных упаковок смол. Пунктирные горизонтальные линии представляют предел высоты слоя ( $\pm 1$  см) до того, как упаковка выходит за пределы допустимого диапазона высоты слоя. Ось X представляет тип суспензии смолы, а ось Y представляет высоту слоя (см).

На Фиг. 6 показана гистограмма, показывающая теоретическую высоту слоя, достигнутую различными операторами, использующими набор GE kit для различных типов смол. В каждом наборе из трех столбцов первый столбец представляет центрифугирование, средний столбец представляет набор GE Slurry Kit, а последний из трех столбцов представляет результаты с использованием раскрытого способа для различных типов смол. В каждом наборе из трех столбцов первый столбец представляет начальную теоретическую конечную высоту слоя, средний столбец представляет теоретическую конечную высоту слоя, включая паузу, и последний столбец представляет теоретическую конечную высоту слоя с переменной силой. Сплошная горизонтальная линия представляет целевую высоту слоя отдельных упаковок смол. Пунктирные горизонтальные линии представляют предел высоты слоя ( $\pm 1$  см) до того, как упаковка выходит за пределы допустимого диапазона высоты слоя. Ось X представляет тип суспензии смолы, а ось Y представляет высоту слоя (см).

На Фиг. 7 показана гистограмма, показывающую теоретическую высоту слоя

смолы MabSelect SuRe с различными скоростями потока, которые могут быть получены с использованием набора GE Kit для неконтролируемого потока. В каждом наборе из двух столбцов заштрихованный столбец представляет теоретическую высоту слоя после начального потока, а белый столбец представляет теоретическую высоту слоя после второго потока. Ось X представляет скорость потока (мл/мин), а ось Y представляет теоретическую высоту слоя (см). Сплошная горизонтальная линия представляет целевую высоту слоя отдельных упаковок смол. Пунктирные горизонтальные линии представляют предел высоты слоя ( $\pm 1$  см) до того, как упаковка выходит за пределы допустимого диапазона высоты слоя.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам определения процентного содержания или концентрации суспензии смолы для суспензии хроматографической колонки. Более заданно, настоящее изобретение использует автоматизированную насосную систему для обеспечения контролируемой скорости потока для уплотнения образца смолы. На основе образца уплотненной смолы можно определить концентрацию суспензии и использовать ее для наполнения той же смолой второй хроматографической колонки. Было обнаружено, что контролируя скорость потока подачи, чтобы соответствовать скорости уплотнения, используемой хроматографической колонкой, с которой будет заполняться смола, достигается высоковоспроизводимая концентрация суспензии, которая соответствует концентрации суспензии, необходимой для точного заполнения второй хроматографической колонки без необходимости поправочных коэффициентов.

Настоящее изобретение обеспечивает многочисленные преимущества по сравнению с традиционными способами определения содержания суспензии, включая центрифугирование, гравитационное осаждение и ручные способы с использованием шприца. Способы и системы настоящего изобретения могут быть собраны, выполнены и разобраны в течение более короткого периода времени, чем любой из традиционных способов определения суспензии. Кроме того, было показано, что способы настоящего изобретения генерируют более согласованные и воспроизводимые результаты концентрации суспензии с более низкими стандартными отклонениями между реплицированными измерениями, чем результаты традиционных способов определения суспензии.

На Фиг. 1 показана блок-схема последовательности операций способа определения содержания суспензии смолы в соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения. На стадии 101 собирают установку колонки и насоса. На Фиг. 2А и 2В показаны различные установки систем для определения процентного содержания суспензии смолы в соответствии с настоящим изобретением. Как показано на Фиг. 2А, система 200 включает колонку 201, автоматизированную насосную систему 204, включающую в себя насос 203, имеющий контроллер 206, и контейнер 205 для сбора фильтрата. Насос 203 обеспечивает поток жидкости в колонку 201. В этом аспекте

колонка 201 ориентирована вертикально, и насос 203 функционально соединен с верхней частью колонки 201 так, что жидкость течет из насоса 203 в колонку 201. Поток жидкости обеспечивается за счет использования автоматического насоса 203. Насос 203 включает контроллер 206, который может запускать и останавливать насос 203 и определять расход жидкости, выходящей из насоса 203. Система настоящего изобретения также включает контейнер 205 для сбора фильтрата, функционально соединенный с нижней частью колонки 201. Контейнер 205 для сбора фильтрата предназначен для сбора жидкости, которая протекает через колонку 201.

В другом варианте реализации, как показано на Фиг. 2В, автоматическая насосная система 204 может дополнительно включать шприц 202, функционально связанный с насосом 203. Шприц 202 может обеспечивать поток жидкости в колонку 201 посредством использования автоматического насоса 203. В одном варианте реализации контроллер 206 насоса 203 выполнен с возможностью определения скорости потока жидкости, выходящей из шприца 202. В этом аспекте колонка 201 ориентирована вертикально и насос 202 функционально соединен с верхней частью колонки 201 так, что жидкость течет из насоса 202 в колонку 201.

Колонка 201 может быть функционально соединена с насосом 203 или шприцем 202 и протекать в контейнер 205 для сбора фильтрата любым соединительным средством, которое позволяет жидкости течь из насоса 203 или шприца 202 в колонку 201 и наружу из колонки 201 в поток в контейнер 205 для сбора фильтрата. Например, колонка 201 может быть оперативно соединена с насосом 203 или шприцем 202 и протекать в контейнер 205 для сбора фильтрата по трубопроводу. В этом аспекте участок трубки может соединять насос 203 или шприц 202 с верхней частью колонки 201, а отдельный участок трубки может соединять нижнюю часть колонки 201 с контейнером 205 для сбора потока.

Тип и размер колонки 201 могут различаться. В одном варианте реализации колонка 201 представляет собой хроматографическую колонку. В другом варианте реализации колонка 201 представляет собой колонку для аналитической хроматографии. Например, колонка 201 может быть хроматографической колонкой 1 см × 25 см. Хроматографические колонки с аналитической шкалой выгодны для использования с настоящим изобретением, потому что такие колонки являются небольшими, легко транспортируемыми и обеспечивают достаточное вертикальное разрешение для точного считывания отношения суспензии.

Тип и размер насосной системы 204 также могут изменяться при условии, что насос 203 способен обеспечивать постоянную скорость потока жидкости в колонке 201. В одном варианте реализации насос 203 может включать любой автоматический или механический насос, который обеспечивает точный расход от 0,2 мл/мин. Например, насос 203 может включать любой тип автоинжектора, имеющий полностью автоматизированную систему. В другом варианте, как описано выше, насос 203 может включать шприц 202, который обеспечивает поток жидкости в колонку 201. В этом

аспекте шприц 202 должен иметь объем, по меньшей мере, 20 мл. В другом варианте реализации шприц 202 может иметь объем, по меньшей мере, 30 мл. В еще одном варианте реализации шприц 202 может иметь объем от 20 до 60 мл. Контейнер 205 для сбора фильтрата может быть любым контейнером, работающим для сбора фильтрата из колонки 201. Подходящие контейнеры 205 для сбора потока включают, но не ограничиваются ими, мензурки, колбы, градуированные цилиндры, пробирки, бутылки и банки.

После сборки системы 200 суспензия, включающая смолу, добавляется в колонку 201 (стадия 102). Любая смола, подходящая для использования в хроматографической колонке, предусмотрена к использованию в настоящем изобретении. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение предусматривает использование смол, подходящих для очистки белка. Примеры смол, рассматриваемых в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, rProtein A Sepharose® Fast Flow, MabSelect™ Xtra, MabSelect SuRe™, Capto™ Phenyl, Q Sepharose® Fast Flow, Phenyl Sepharose® HP, POROS® 50 HS, Fractogel® EMD Hicap SE, Capto™ Q и Superdex® 200 HR.

Смолу следует тщательно перемешать в суспензии, чтобы смола была равномерно распределена перед добавлением в колонку 201. Суспензия перемешанной смолы может быть добавлена в колонку 201 с использованием любого способа, известного в данной области. В одном варианте реализации суспензия смолы может быть пипетирована в колонку 201, например, с использованием контроллера пипетки. Количество добавляемой суспензии смолы будет зависеть от желаемого объема слоя осажденной смолы. В одном варианте реализации суспензия может добавляться в колонку 201 до тех пор, пока мениск не окажется на высоте от около 23 см до около 25 см. Например, суспензия может добавляться в колонку 201 до тех пор, пока мениск не окажется на высоте около 25 см. В этом аспекте повышенная точность достигается, когда используется больший объем доступного пространства в колонке. После добавления суспензии в колонку, окончательная высота суспензии должна быть определена и записана для последующего использования. После добавления суспензии смолы в колонку 201 и определения высоты суспензии смолы в колонку 201 может добавляться очищенная вода до тех пор, пока вода не окажется вблизи верхней части колонки 201. Это позволяет установить верхний переходник или поршень на колонке 201 и выпустить воздух, что важно для ламинарного потока. Затем суспензии смолы можно дать отстояться в течение некоторого времени. В одном варианте реализации суспензии можно дать отстояться в течение от около пяти минут до около одного часа. В другом варианте реализации суспензии можно дать отстояться в течение от около 20 минут до около 45 минут. Например, суспензии можно дать отстояться в течение около 30 минут.

На стадии 103 устанавливается насосная система 204 для обеспечения потока жидкости с постоянной скоростью потока. В этом аспекте контроллер 206 насоса 203 может быть установлен для определения скорости потока жидкости, вытекающей из



насоса 203. Скорость потока жидкости выбирается на основе заданной смолы, используемой в суспензии (например, ее физических характеристик, таких как размер шариков, базовая матрица шариков и плотность базовой матрицы) и скорости уплотнения, используемой во второй колонке, например, автоматически заполняемой колонки, которая будет заполняться использованной смолой для хроматографических операций. В одном из вариантов реализации скорость потока жидкости может быть выбрана так, чтобы скорость потока была эквивалентна скорости уплотнения второй колонки, например, автоматически заполняемой колонки. Действительно, контролируя скорость потока жидкости, чтобы она соответствовала скорости уплотнения используемой колонки, которая будет выполнять упаковку смолы, может быть достигнута очень воспроизводимая концентрация суспензии, которая соответствует концентрации суспензии, необходимой для точного заполнения второй колонки без необходимости поправочных коэффициентов. Однако очень воспроизводимые концентрации суспензии все же могут быть достигнуты, когда скорость потока жидкости не совпадает со скоростью уплотнения. Таким образом, в некоторых вариантах реализации скорость потока жидкости может быть не эквивалентна скорости уплотнения второй колонки.

Скорость потока жидкости может варьироваться в зависимости от колонки, смолы и используемой технологии заполнения. В одном варианте реализации скорость потока жидкости может составлять от около 20 см/час до около 1500 см/час. В другом варианте реализации скорость потока жидкости может составлять от около 30 см/час до около 1000 см/час. В еще одном варианте реализации скорость потока жидкости может составлять от около 50 см/час до около 600 см/час. В еще одном варианте реализации скорость потока жидкости может составлять от около 60 см/час до около 200 см/час. В некоторых вариантах реализации скорость потока жидкости может составлять около 30 см/час. В других вариантах реализации скорость потока жидкости может составлять около 60 см/час.

На стадии 104 насосная система 204 запускается так, что поток жидкости перекачивается из насоса 203 в колонку 201 и через нее. В одном варианте реализации жидкость, которая прокачивается через колонку 201, является водой. Например, вода может быть дистиллированной, деионизированной и/или очищенной. В другом варианте реализации жидкость, которая прокачивается через колонку 201, может быть раствором соли. В еще одном варианте реализации жидкость, которая прокачивается через колонку 201, может быть любым органическим растворителем. Например, жидкость может быть спиртом. Подходящие спирты включают, но не ограничиваются ими, этанол, пропанол, бутанол, пентанол, гексанол, гептанол и октанол. В этом аспекте, чтобы обеспечить более универсальные и последовательные результаты, жидкость, которая прокачивается через колонку 201, должна быть той же самой жидкостью, которая используется во время операций заполнения для выбранной смолы.

Контроллер 206 насоса 203 может использоваться для запуска автоматического потока жидкости из насоса 203 в колонку 201. Как обсуждалось выше, поток жидкости

перекачивается из насоса 203 в колонку 201 и через нее с выбранной скоростью потока, которая остается постоянной на всей стадии 104. Перекачка потока жидкости должна продолжаться до тех пор, пока смола не прекратит оседать. В одном варианте реализации жидкость может прокачиваться через колонку 201 в течение периода времени от около 10 минут до около 50 минут. В другом варианте реализации жидкость может прокачиваться через колонку 201 в течение периода времени от около 15 минут до около 40 минут. В еще одном варианте реализации жидкость может прокачиваться через колонку 201 в течение периода времени от около 15 минут до около 30 минут. Например, в некоторых вариантах реализации, когда скорость потока жидкости составляет около 30 см/час, жидкость может прокачиваться через колонку 201 в течение около 30 минут. В других вариантах реализации, когда скорость потока жидкости составляет около 60 см/час, жидкость может прокачиваться через колонку 201 в течение около 15 минут. В некоторых вариантах реализации скорость потока останавливается или приостанавливается на один или несколько периодов времени. Например, скорость потока может быть приостановлена на 1-5 минут, 5-10 минут, 10-20 минут, 20-30 минут, 40-50 минут или один или несколько часов. Скорость потока может быть перезапущена после каждой паузы. В некоторых вариантах реализации остановка потока жидкости не является необходимой для достижения точного считывания. Например, системы могут находиться в состоянии непрерывного потока уплотнения в течение более 1 часа. Это дополнительное преимущество автоматического потока, которое невозможно с набором GE Kit. Контроллер 206 может использоваться для остановки автоматического потока жидкости из насоса 203 в колонку 201.

В одном варианте реализации способ включает автоматизированный насос, запрограммированный на остановку потока жидкости через хроматографическую колонку и обеспечение осаждения смолы, а затем повторный запуск насоса для протекания жидкости через хроматографическую колонку до завершения стадии закачки. Закачка может быть приостановлена более чем на один период времени. В одном варианте реализации закачка приостанавливается на период времени от 1 до 60 минут. В некоторых вариантах реализации насос запрограммирован на прерывистую работу. В одном варианте реализации для всех смол со скоростью уплотнения 60 см/ч цикл составляет 15 минут потока > 5 минутная пауза > 5 мин дополнительного потока. Уплотнение 30 см/час потребуют удвоения продолжительности потока. В некоторых вариантах реализации результаты считывания будут сняты непосредственно до или после завершения последней операции потока

После прекращения потока жидкости слой смолы может стабилизироваться в течение некоторого времени без потока. В одном варианте реализации, после того как поток жидкости остановлен, слою смолы можно дать стабилизироваться в течение от около 10 минут до около 45 минут. Например, слою смолы можно дать стабилизироваться в течение около 30 минут. В другом варианте реализации после того, как поток жидкости приостановлен, слою смолы можно дать стабилизироваться в течение 5-10 минут перед

повторным запуском шприцевой насосной системы 204 с той же скоростью потока в течение дополнительных 5 минут. В этом аспекте выполнение последовательных уплотнений потока может минимизировать вариабельность. На стадии 105 может быть измерена высота слоя осажденной/уплотненной смолы. Стадия измерения может быть выполнена посредством любого измерительного устройства, которое позволяет точно считывать высоту слоя. В некоторых вариантах реализации колонка 201 может включать линейку, вертикально расположенную на внешней поверхности. При измерении высоты слоя уплотненной смолы концентрацию суспензии можно определить по измеренной высоте слоя (стадия 106). Измеренная концентрация суспензии в процентах определяется непосредственно высотой слоя в сантиметрах.

После определения концентрации суспензии для использованной смолы суспензию с данной концентрацией можно использовать для наполнения второй колонки. Вторая колонка может быть любой хроматографической колонкой, включая автоматически заполняемые колонки. Например, автоматически заполняемая колонка может быть колонкой AxıChrom®. В этом аспекте суспензия с определенной концентрацией может быть введена в автоматически заполняемую колонку. В некоторых вариантах реализации оператор может вручную ввести суспензию с определенной концентрацией в заполняемую колонку. В других вариантах реализации суспензия с определенной концентрацией может быть автоматически введена в заполняемую колонку посредством использования сетевой или аппаратной схемы, соединяющей систему 200 с автоматически заполняемой колонкой. Независимо от типа колонки, используемой для заполнения смолой, суспензия с определенной концентрацией обладает высокой воспроизводимостью и соответствует концентрации суспензии, необходимой для точного заполнения второй колонки.

Способы настоящего изобретения обеспечивают высокоточные концентрации суспензии, которые, в свою очередь, обеспечивают точную высоту целевого слоя при упаковке смолы в хроматографической колонке. В одном варианте реализации заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает высоты слоя в пределах 2 см от целевой высоты слоя. В другом варианте реализации заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает высоты слоя в пределах 1 см от целевой высоты слоя. В еще одном варианте реализации заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает высоты слоя в пределах 0,75 см от целевой высоты слоя. В еще одном варианте реализации заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает высоты слоя в пределах 0,50 см от целевой высоты слоя. Например, заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает высоты слоя в пределах 0,10 см от целевой высоты слоя.

Кроме того, заполнение колонки, в которой используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает очень точных коэффициентов заполнения при упаковке смолы в хроматографическую колонку. Например, заполнение колонки, в котором используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает коэффициента заполнения в пределах 5% от идеальных факторов заполнения. В еще одном варианте реализации заполнение колонки, в котором используются концентрации суспензии, определенные в соответствии с настоящим изобретением, достигает коэффициента заполнения в пределах 3% от идеальных факторов заполнения.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие неограничивающие примеры демонстрируют способы определения концентрации суспензии в соответствии с настоящим изобретением. Примеры являются просто иллюстрацией предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение, объем которого определяется прилагаемой формулой изобретения.

#### **Пример 1 изобретения**

Способ определения концентрации суспензии проводили в соответствии с настоящим изобретением. Способ осуществляли на хроматографической колонке SNAP размером 1 см × 25 см. Шприцевой насос KD Scientific использовался для обеспечения контролируемой скорости потока для уплотнения образца смолы. Были протестированы следующие смолы: MabSelect SuRe™, POROS® 50 HQ и Capto™ Phenyl.

В Таблице 1 приведены результаты способа, проведенного в соответствии с настоящим изобретением.

**ТАБЛИЦА 1: РЕЗУЛЬТАТЫ СПОСОБА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

	MabSelect SuRe	POROS 50	Capto Phenyl
% суспензии цикла уплотнения 1	55,1	60,6	57,0
% суспензии цикла уплотнения 2	55,4	59,9	56,8
% суспензии цикла уплотнения 3	54,9	59,5	56,9
Средний % суспензии всех циклов уплотнения	55,2	60,0	56,9
Высота целевого слоя (см)	20,0	20,0	20,0
Целевой фактор заполнения	1,15	1,06	1,10
<b>Достигнутые результаты колонки</b>			
Высота слоя (см)	19,86	19,67	19,58
Фактор заполнения цикла 1	1,15	1,06	1,10
Высота слоя (см)	19,75	19,89	19,64
Фактор заполнения цикла и 2	1,15	1,06	1,10

Высота слоя (см)	19,93	20,04	19,60
Фактор заполнения цикла 3	1,15	1,06	1,10
Высота слоя (см)	19,84	19,86	19,60
Средний коэффициент заполнения	1,15	1,06	1,10
Стандартное отклонение для заполнения циклов (см)	0,2	0,6	0,1

Как видно из данных в Таблице 1, способы настоящего изобретения демонстрируют согласованные и воспроизводимые результаты с низкими стандартными отклонениями между повторенными измерениями. Концентрации суспензии, полученные в соответствии с настоящим изобретением, приводили к средней высоте слоя, которая отличалась от целевой высоты слоя на 0,4 см или менее. Низкие стандартные отклонения показывают, что результаты в высокой степени воспроизводимы.

### **Сравнительный пример 2**

#### ***Центрифугирование***

Использовали центрифугу Allegra® 6KR с центрифужными пробирками объемом 13 мл. Суспензию доводили до 50%, удаляя супернатант перед центрифугированием. Центрифугирование 10 мл образца суспензии проводили при 1000 об/мин в течение 5 минут и 3500 об/мин в течение 15 минут. Таблица 2, изображенная ниже, показывает использованные смолы.

ТАБЛИЦА 2: ИСПЫТАННЫЕ СМОЛЫ

<b>Смола</b>	<b>Размер частиц d50 (мкм)</b>	<b>Базовая матрица</b>
γProtein A Sepharose® Fast Flow*	90	4% сшитая агароза
MabSelect™ Xtra	75	Агароза с высокой степенью сшивки
MabSelect SuRe™	85	Агароза с высокой степенью сшивки
Capto™ Phenyl	75	Агароза с высокой степенью сшивки
Q Sepharose® Fast Flow	90	6% сшитая агароза
Phenyl Sepharose® HP*	34	6% сшитая агароза
POROS® 50 HS	50	Сшитый поли(стиролдивинилбензол)
Fractogel® EMD Hicap SE	48-60	Однородные сферические частицы, без агломератов, без мелких частиц
Capto™ Q	90	Агароза с высокой степенью сшивки с декстрановым поверхностным наполнителем
Superdex® 200 HR	13	Композит из сшитой агарозы и декстрана

\* Смолы не удалось закрепить должным образом.

Фиг. 3 демонстрирует результаты способов центрифугирования. В частности, Фиг. 3 показывает средние установленные проценты для центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут и 3500 об/мин в течение 15 минут. Как видно из Фиг. 3, результаты центрифугирования варьировались между смолами и постоянно завышали объем смолы, который, как было известно, составлял 50%. Это показывает, что центрифугирование не является достаточным способом отстаивания.

#### ***Уплотнение потока***

Хроматографическая система АКТА Avant (использовали хроматографические колонки SNAP 2,5 см x 50 см) использовалась для имитации эффектов уплотнения технологии Axichrom®. Все смолы уплотняли при 60 см/час. Смолы, показанные в Таблице 2, также использовались в тестах уплотнения потока. Смолы оседали под действием силы тяжести ночью. Суспензию доводили до 50%, удаляя супернатант перед проведением уплотнения потока.

Таблица 3, изображенная ниже, показывает средние результаты уплотнения потока между циклом 1 и циклом 2.

ТАБЛИЦА 3: СРЕДНИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ УПЛОТНЕНИЯ ПОТОКА

	MabSelec t™ Xtra	MabSele ct SuRe™	Capto ™ Phenyl	Q Sepharos e® Fast Flow	POROS ® 50 HS	Fractog el® EMD HiCap SE	Capto ™ Q	Superdex ® 200 Prep Grade
Сред нее	51,71%	52,66%	55,07 %	45,85%	49,10%	51,60%	47,59 %	51,10%

Как видно из Таблицы 3, результаты уплотнения варьировались между смолами, и ни одна из них не была уплотнена обратно к исходному соотношению 50%. Это показывает, что сила тяжести не является достаточным способом осаждения.

#### ***Сравнение результатов способов центрифугирования и уплотнения***

Таблица 4, приведенная ниже, сравнивает результаты каждого из способов центрифугирования и уплотнения потока.

ТАБЛИЦА 4: СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ И УПЛОТНЕНИЯ

	Средн ее уплот нение	Начало центрифу гирования (T=0)	Разница между данными уплотнения и начала центрифугиро вания	Данные осаждения центрифугиро ванием (T=2 часа)	Разница между данными уплотнения и осаждения центрифугирова нием (T=2 часа)

MabSelect™ Xtra	51,71 %	58,27%	6,56%	57,02%	5,31%
MabSelect SuRe™	52,66 %	57,84%	5,18%	54,39%	1,73%
Capto™ Phenyl	55,07 %	59,12%	4,05%	54,72%	0,35%
Q Sepharose® Fast Flow	45,85 %	53,69%	7,84%	53,43%	7,58%
POROS® 50 HS	49,10 %	54,12%	5,02%	52,86%	3,76%
Fractogel® EMD Hicap SE	51,60 %	55,43%	3,83%	52,99%	1,39%
Capto™ Q	47,59 %	55,97%	8,38%	54,62%	7,03%
Superdex® 200 Prep Grade	51,10 %	56,27%	5,17%	55,65%	4,55%

Как видно из приведенной таблицы, результаты уплотнения и центрифугирования сильно различаются. Шесть из восьми смол имели разницу более 5% между показаниями уплотнения и начала центрифугирования. Эта разница не устраняется даже после продления выдерживания на 2 часа. Действительно, через 2 часа три из восьми смол все еще имели разницу более чем на 5% между данными уплотнения и осаждения центрифугированием. Это показывает, что уплотнение и центрифугирование не были достаточными для определения концентрации суспензии из-за вариабельности испытания, длительного времени отстаивания и изменения вида смолы.

Кроме того, некоторые показания не достигли целевых факторов заполнения. В целях расчета целевых коэффициентов заполнения 5% от 20 см (целевая высота слоя) составляет 1 см, что является максимально допустимым диапазоном высоты слоя. Разница больше 5% означает, что показание не достигло целевого коэффициента заполнения. Как видно из приведенных выше данных, некоторые показания не достигли целевых факторов заполнения.

### Сравнительный пример 3

Таблица 5, изображенная ниже, показывает сравнение процента суспензии центрифугирования и конечной высоты слоя между способом центрифугирования и набором GE Kit.

ТАБЛИЦА 5: СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ И НАБОРА GE KIT

	mAb1 Trap Packs		
	<b>CEX</b>	<b>AEX</b>	<b>ProA</b>

% суспензии полученный центрифугированием	72,7	52,6	51,9
Конечная высота полученного слоя (см)	29,1	17	14,8
% Суспензии GE Kit	73	49	52,7
Теоретическая конечная высота GE Kit (см)	28,7	18,1	14,6
правильный % суспензии смолы	69,91	49,25	51,21
Высота целевого слоя (см)	30	18	15
Разница между полученной и правильной суспензией, %	2,79	3,35	0,69
Разница между набором GE Kit и правильной суспензией, %	3,09	0,25	1,49
Разница между полученной и высотой целевого слоя (см)	0,9	1	0,2
Разница между GE Kit и высотой целевого слоя (см)	1,27	0,09	0,42

Как видно из Таблицы 5, и способ центрифугирования, и набор GE Kit не смогли достичь целевой высоты слоя в нескольких испытанных типов смол, что свидетельствует о несовместимости способов.

***Сравнение результатов центрифугирования, GE Kit и способов в соответствии с настоящим описанием***

Фиг. 4 сравнивает процентную ошибку в концентрации суспензии для способа центрифугирования и способов согласно настоящему описанию. Было протестировано несколько различных типов смол, включая MabSelect SuRe, POROS 50 HQ, Capto Phenyl, Q Sepharose FF и MabSelect SuRe PCC. Для всех типов смол способы, согласно настоящему описанию, показали значительное снижение погрешности по сравнению со способами центрифугирования. Кроме того, для нескольких из протестированных типов смол способ центрифугирования имеет процент ошибок, достигающий предела ошибки 5%, что указывает на не реализуемый идеальный коэффициент заполнения для достижения минимальной высоты, необходимой для использования. Сниженный коэффициент заполнения может привести к ухудшению качества колонки и уменьшению повторного использования колонки. В некоторых вариантах реализации, колонки должны соответствовать конечным желаемым показателям, включая желаемую высоту и коэффициент заполнения. По мере уплотнения колонки высота уменьшается, а коэффициент заполнения повышается. В одном варианте реализации колонки достигают высоты 19-21 см и нацеливаются на уплотнение.

Фиг. 5 показывает прямое сравнение высот слоев, достигнутых с использованием способа центрифугирования, набора GE Kit и способа в соответствии с настоящим описанием. Как показано на Фиг. 5, способ согласно настоящему описанию превосходил другие протестированные способы. Высота слоя, достигнутая посредством способа согласно настоящему описанию, была ближе к идеальной высоте слоя, чем другие протестированные способы. Кроме того, способ центрифугирования и GE Kit привели к высотам слоя, которые были на пределе или превышали предел ошибки, который



указывает, что упаковка слоя находится вне допустимого диапазона высоты слоя и требует перезаполнения.

### ***Тест вариабельности оператора набора GE Kit и оценка пределов***

Чтобы оценить вариабельность, обусловленную оператором, предлагаемых в настоящее время на рынке наборов GE Kit, операторы получили дополнительные инструкции и практические знания о том, как использовать систему и выполняли измерения, начиная с нерасфасованных растворов после каждого варианта. На Фиг. 6 показаны результаты теста вариабельности оператора. Данные показывают, что набор GE Kit испытывает вариабельность от оператора к оператору, вариабельность в зависимости от уровня квалификации и опыта, а также вариабельность измеряемого материала. Это также показывает, что набор GE Kit не имеет достаточных элементов управления для получения согласованных результатов в динамичных производственных условиях.

Чтобы оценить влияние неконтролируемого потока, используемого в продаваемом в настоящее время наборе GE Kit, был проведен эксперимент, который изменял поток во время обработки образца на основе потенциальной производительности оператора. На Фиг. 7 показан результат эксперимента, в котором вода проходила через колонку в начальный момент времени, и было зафиксировано измерение высоты слоя. Затем воду пропускали через колонку второй раз и фиксировали высоту второго слоя. Фиг. 7 показывает, что поток вне рекомендуемого диапазона привел к потенциально недопустимому изменению высоты слоя.

Несмотря на то, что численные диапазоны и параметры, представляющие широкий объем некоторых вариантов реализации настоящего изобретения, являются приблизительными, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, сообщаются настолько точно, насколько это практически возможно. Любые числовые значения, однако, по своей природе содержат определенные ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения, обнаруженного в их соответствующих тестовых измерениях. Кроме того, когда числовые диапазоны различного объема изложены здесь, предполагается, что может использоваться любая комбинация этих значений, включая приведенные значения. Действительно, все раскрытые здесь диапазоны являются включающими и комбинируемыми. Например, все диапазоны включают конечные точки и все промежуточные значения диапазонов.

Изобретение, описанное и заявленное в данном документе, не должно ограничиваться рамками конкретных вариантов реализации, раскрытыми в данном документе, поскольку эти варианты реализации предназначены для иллюстрации нескольких аспектов изобретения. Предполагается, что любые эквивалентные варианты реализации находятся в пределах объема данного изобретения. Действительно, с учетом вышеизложенного описания, для специалиста в данной области техники будет очевидным существование ряда модификаций изобретения дополнительно к тем, что описаны в данном тексте. Предполагается, что такие модификации также находятся в рамках прилагаемой формулы изобретения. Все патенты и патентные заявки, процитированные в

предшествующем тексте, прямо включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для определения концентрации хроматографической среды для заполнения хроматографической колонки, содержащее:

первую хроматографическую колонку и вторую хроматографическую колонку, причем каждая колонка имеет верхний конец и нижний конец, и каждая колонка выполнена с возможностью удержания хроматографической среды;

автоматическую насосную систему, которая функционально соединена с верхней частью первой вертикально ориентированной хроматографической колонки для подачи потока жидкости к первой хроматографической колонке;

контроллер, выполненный с возможностью запуска и остановки автоматической насосной системы для управления скоростью потока, интервалом и периодом времени прохождения жидкости через первую хроматографическую колонку;

средство для добавления суспензии, содержащей смолу, в первую хроматографическую колонку;

средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку со скоростью потока через любые соединительные средства с образованием уплотненной смолы в первой хроматографической колонке;

средство для управления скоростью потока жидкости через первую хроматографическую колонку, чтобы соответствовать скорости уплотнения, используемой второй хроматографической колонкой, с образованием уплотненной смолы в первой хроматографической колонке;

средство для заполнения второй хроматографической колонки с заданной концентрацией суспензии;

причем устройство выполнено с возможностью определения концентрации хроматографической среды для заполнения хроматографической колонки.

2. Устройство по п.1, в котором средство для добавления суспензии, содержащей смолу, в первую хроматографическую колонку, содержит контроллер пипетки для добавления воды в первую хроматографическую колонку и обеспечения возможности суспензии отстояться в течение от около пяти минут до около одного часа.

3. Устройство по п.1, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит автоматический или механический насос, который обеспечивает точный расход, причем автоматическая насосная система запрограммирована на циклическое включение и выключение в течение предварительно заданного периода времени или в течение нескольких периодов времени.

4. Устройство по п.1, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит шприц и участок трубы, который соединяет шприц и автоматический насос с верхней частью первой хроматографической колонки для перекачивания объема деионизированной воды, дистиллированной воды, очищенной воды, раствора соли или органического растворителя

с управляемой скоростью потока с образованием уплотненной смолы в первой хроматографической колонке.

5. Устройство по п.1 или 3, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит автоматизированную систему шприцевого насоса, которая настроена для работы с постоянной скоростью потока в течение определенного периода времени.

6. Устройство по п.1, 3, 4 и 5, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит автоматический насос, имеющий контроллер и шприц, функционально связанный с насосом для приостановки автоматического насоса для остановки потока жидкости через первую хроматографическую колонку и обеспечения осаждения смолы, и повторный запуск насоса для перекачивания жидкости через первую хроматографическую колонку до завершения стадии перекачки.

7. Устройство по любому из пп.1, 3, 4, 5 и 6, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит автоматический насос, имеющий контроллер и шприц, функционально связанный с насосом для приостановки автоматического насоса на более чем один период времени.

8. Устройство по любому из пп. 1, 3, 4, 5, 6 и 7, в котором средство для перекачивания объема жидкости через первую хроматографическую колонку дополнительно содержит насос, имеющий контроллер и шприц, функционально связанный с насосом для приостановки автоматического насоса на период времени от 1 до 60 мин.

9. Устройство по п.1, в котором средство для управления скоростью потока жидкости через первую хроматографическую колонку, чтобы соответствовать скорости уплотнения, используемой второй хроматографической колонкой, дополнительно содержит контроллер, функционально включенный в автоматический насос для управления скоростью потока, используемой первой хроматографической колонкой, которая эквивалента скорости уплотнения второй хроматографической колонки.

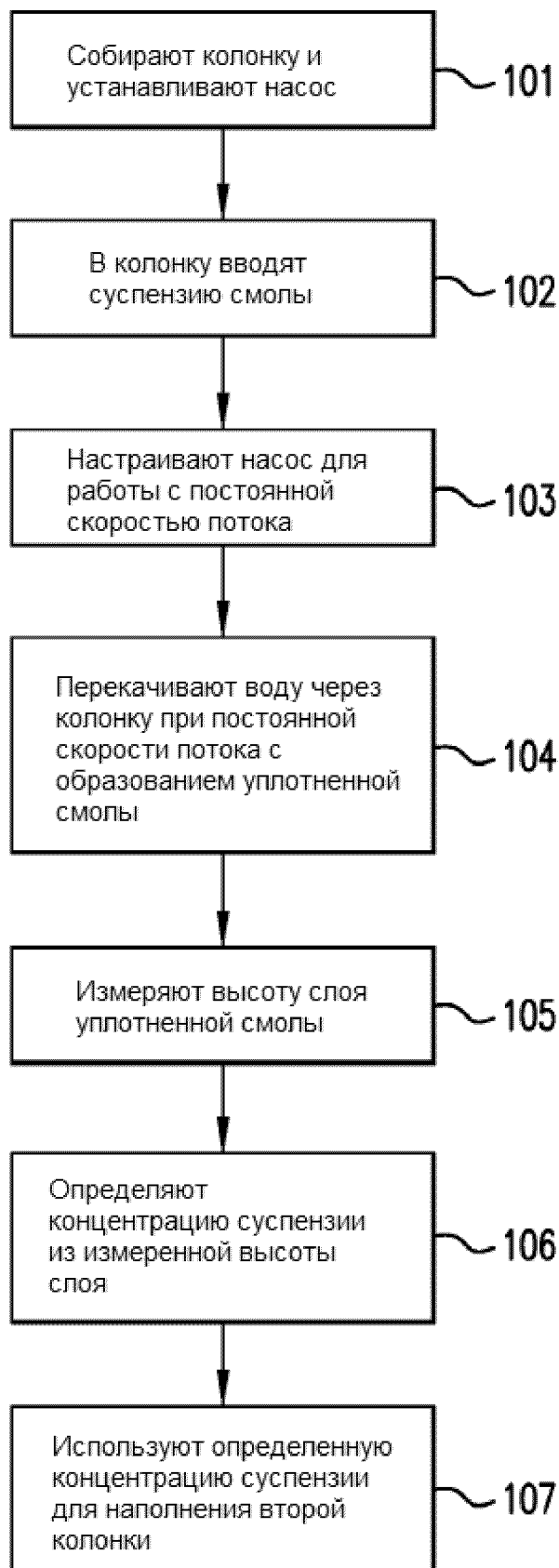
10. Устройство по п.1, в котором средство для управления скоростью потока жидкости через первую хроматографическую колонку, чтобы соответствовать скорости уплотнения, используемой второй хроматографической колонкой, дополнительно содержит контроллер, функционально включенный в автоматический насос для обеспечения скорости потока, в зависимости от того, какой тип смолы используется в суспензии и скорости уплотнения, используемой второй хроматографической колонкой.

11. Устройство по п.1, в котором средство для управления скоростью потока жидкости через первую хроматографическую колонку, чтобы соответствовать скорости уплотнения, используемой второй хроматографической колонкой, дополнительно содержит контроллер, функционально включенный в автоматический насос для управления скоростью потока в диапазоне от около 20 см/час до около 1500 см/час.

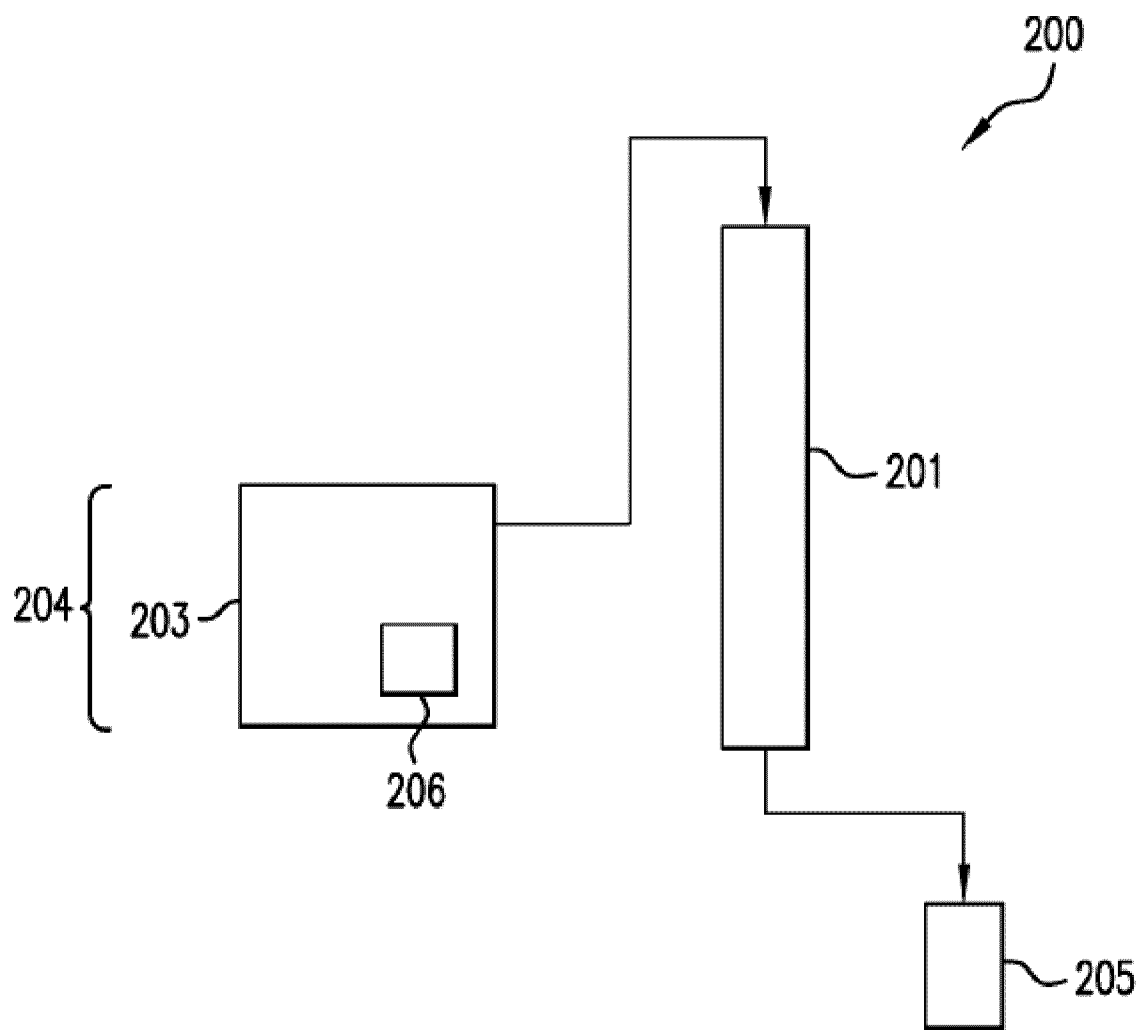
12. Устройство по п.1, в котором средство для заполнения смолы во вторую

хроматографическую колонку с заданной концентрацией суспензии содержит сетевую или аппаратную схему, соединяющую систему 200, включающую первую хроматографическую колонку, со второй хроматографической колонкой для заполнения второй колонки, которая имеет коэффициент заполнения в пределах 5% от идеального фактора заполнения.

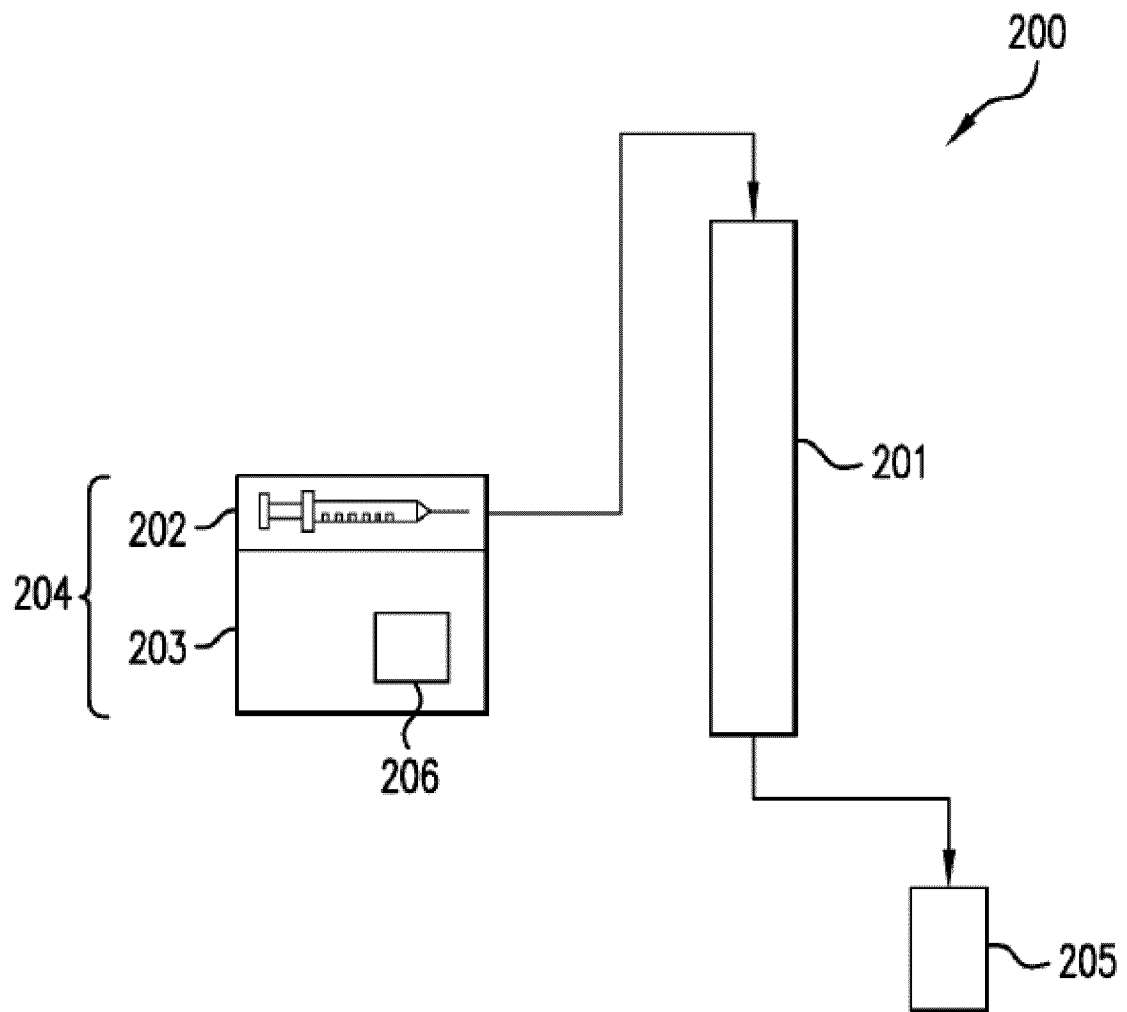
По доверенности



ФИГ. 1

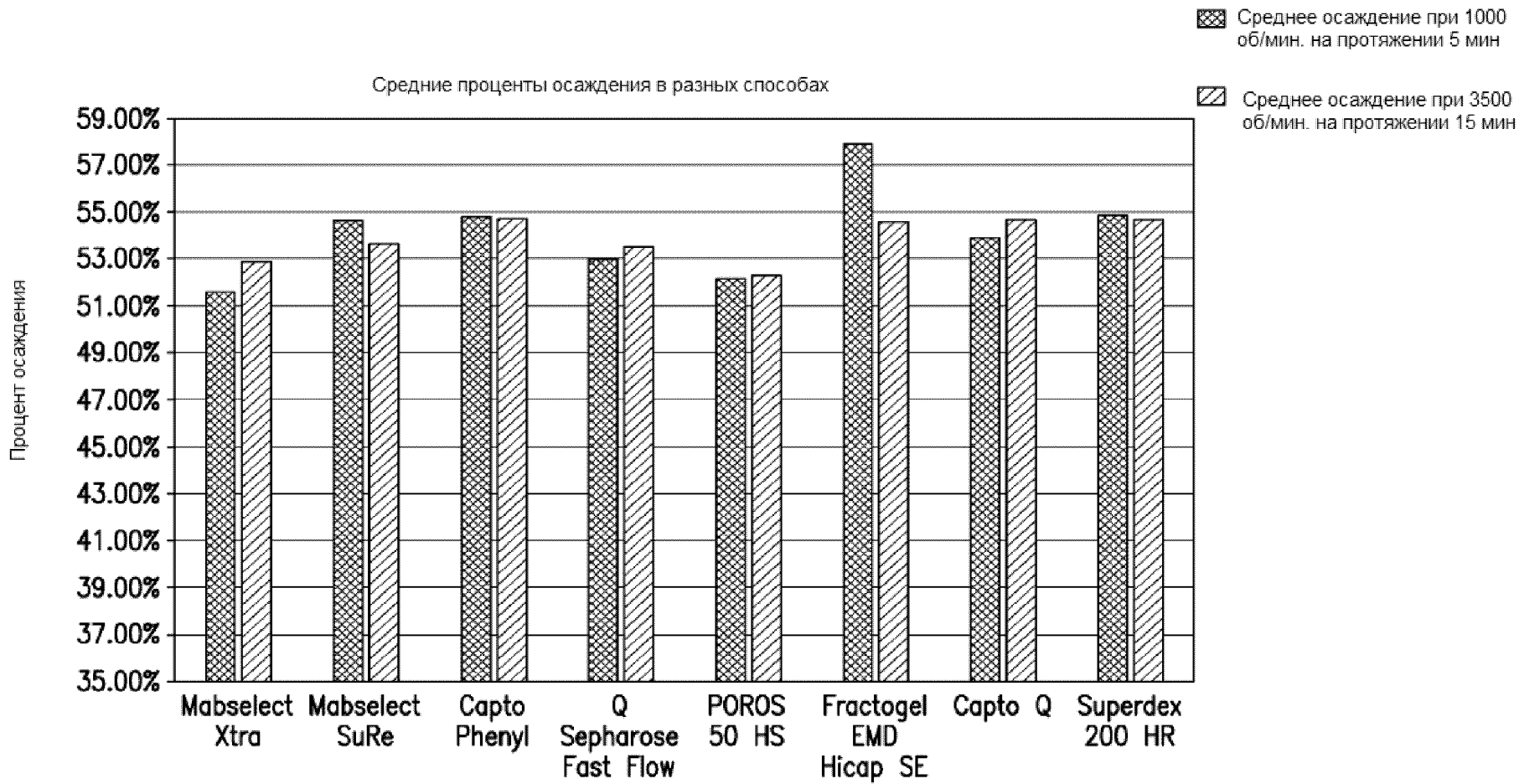


ФИГ. 2А

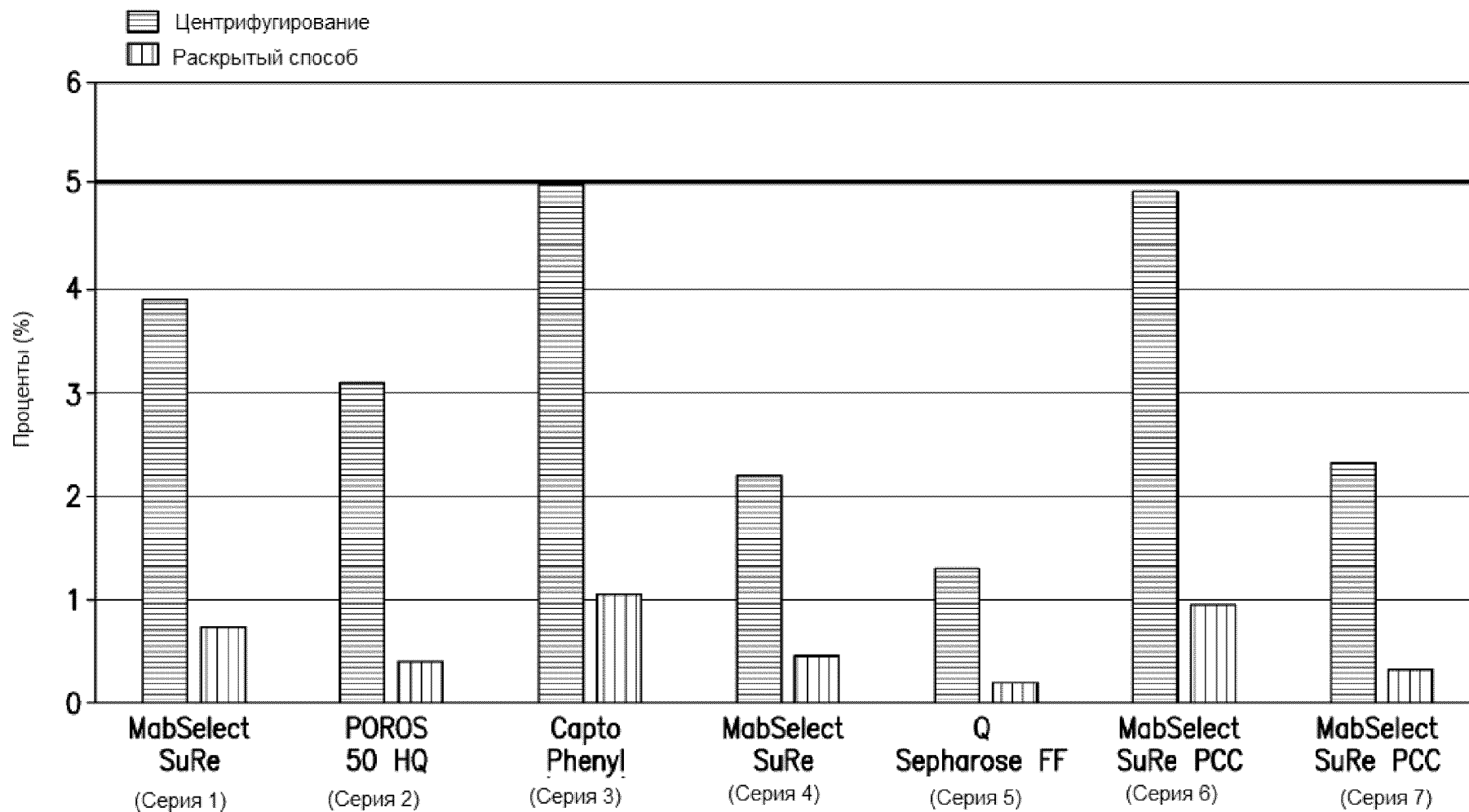


ФИГ. 2В

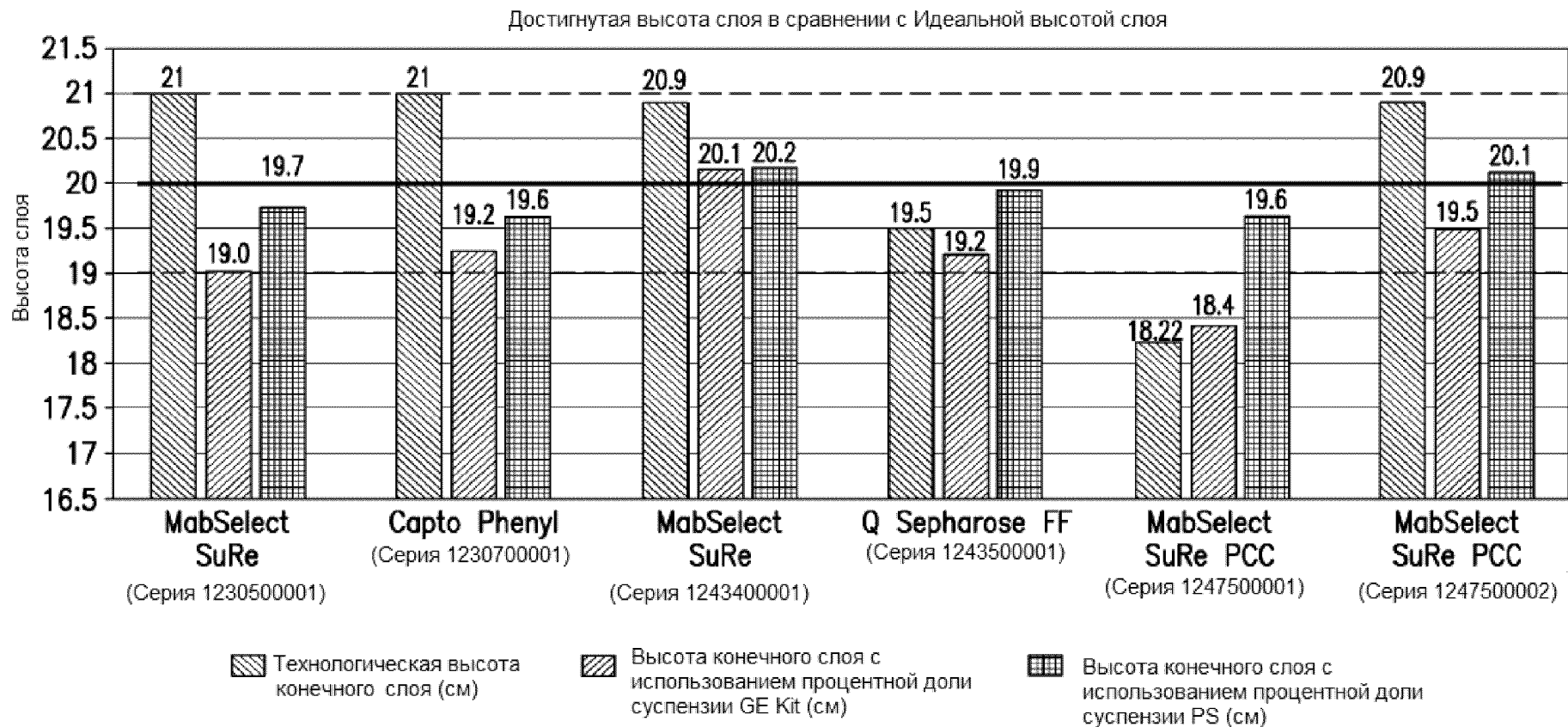




ФИГ. 3

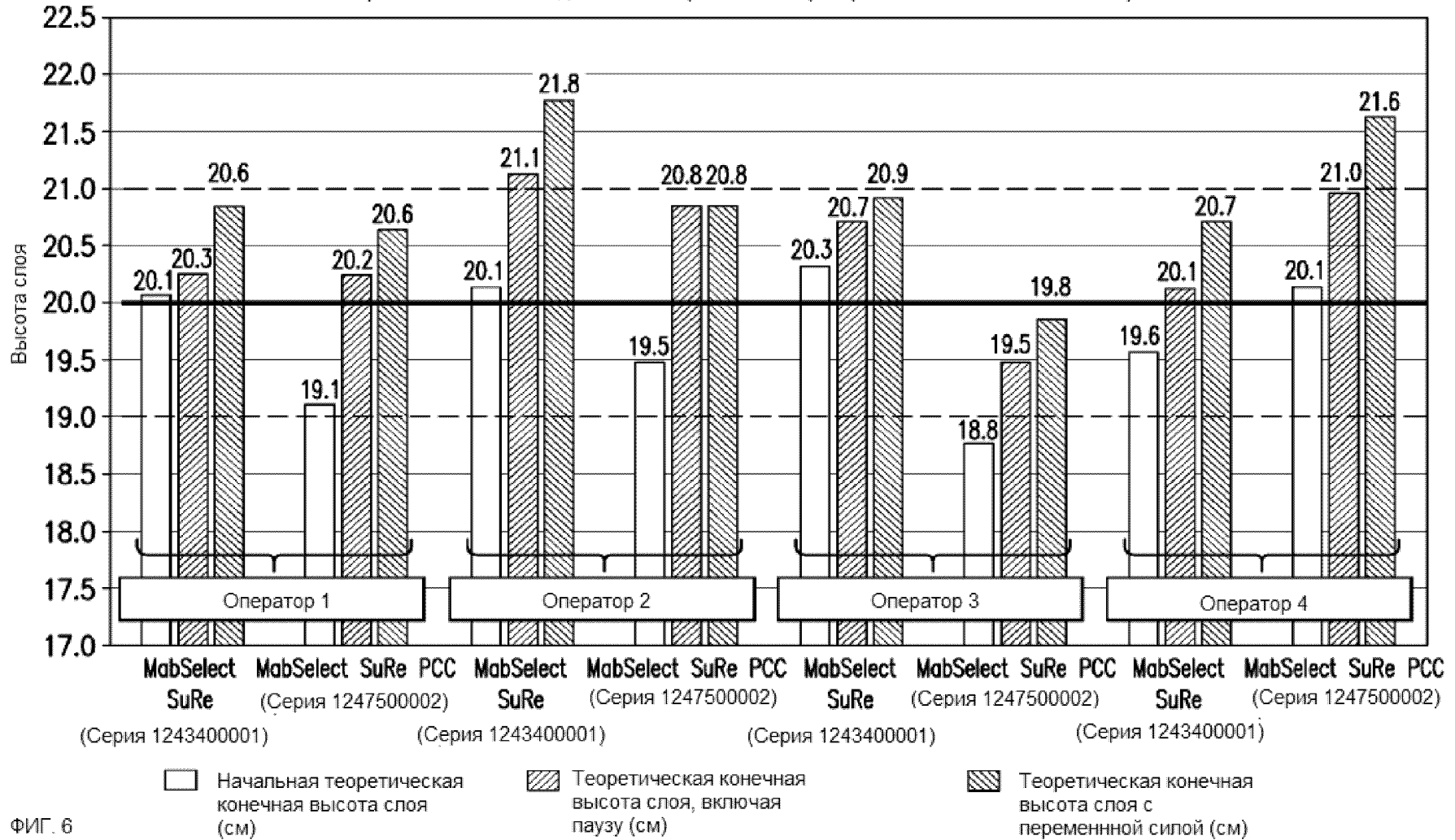


ФИГ. 4



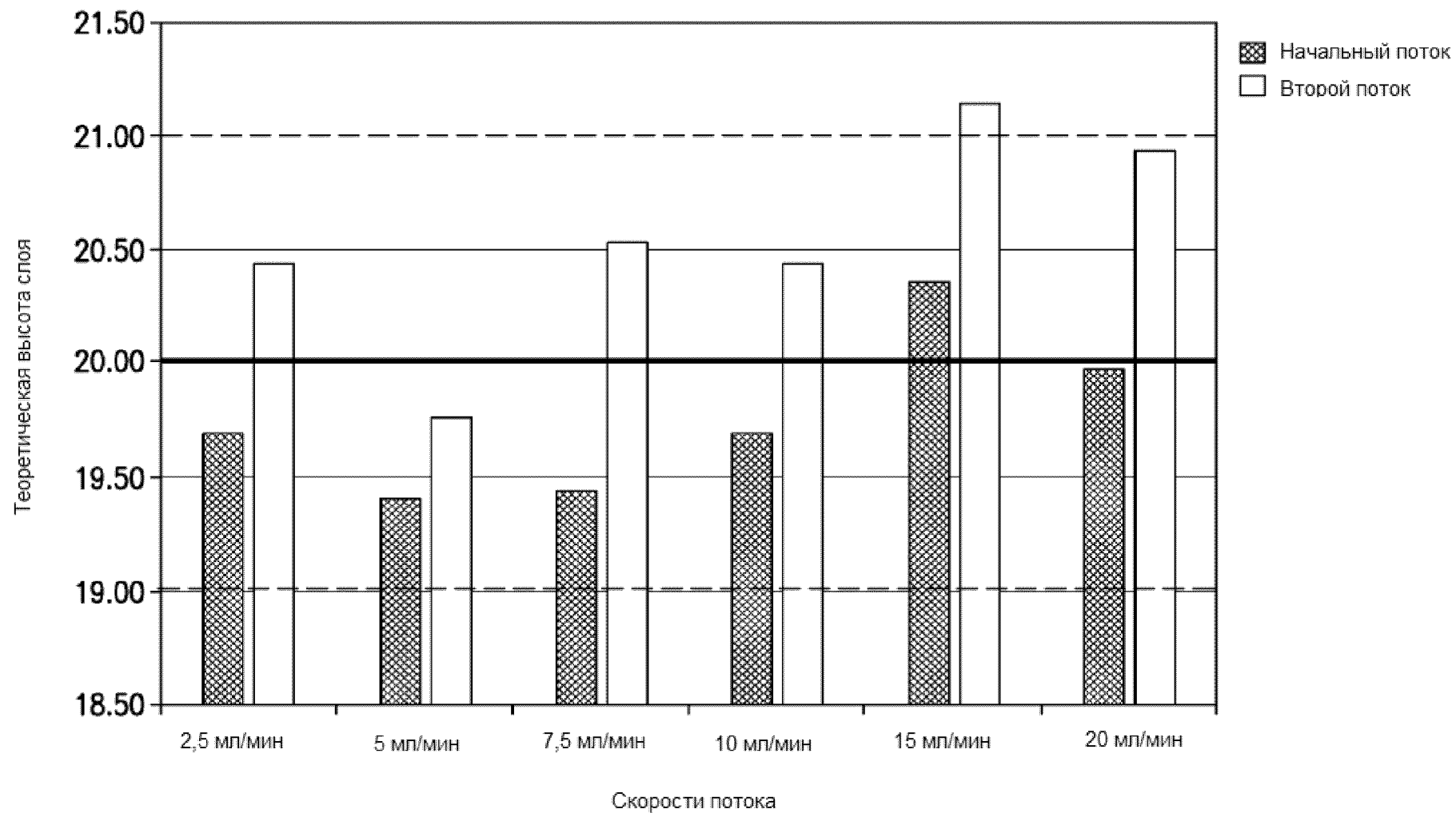
ФИГ. 5

Теоретические высоты достигаемые разными операторами с использованием набора GE Kit



ФИГ. 6

Исследование постоянного потока на MabSelect SuRe



ФИГ. 7

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202390600****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***B01D 15/20 (2006.01)**G01N 30/56 (2006.01)**G01N 30/44 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

B01D 15/20, G01N 30/56, G01N 30/44

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2458724 C2 (ДЖИ-И ХЕЛТКЕР БИО-САЙЕНСИЗ КОРП.) 20.08.2012, формула, страницы 7-13, фигуры 3-4	1-12
Y	US 2009/0007643 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 08.01.2009, формула, реферат, параграфы [0007], [0022]-[0027], [0032], [0035]	1-12
A	US 2005/0167364 A1 (MARTIN JOHN HOFMANN) 04.08.2005	1-12
A	US 2007/0090035 A1 (PETER C. RAHN et al.) 26.04.2007	1-12
A	US 2008/0217248 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 11.09.2008	1-12

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

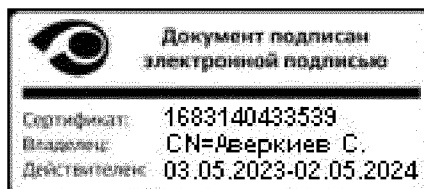
«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 19 июля 2023 (19.07.2023)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев