

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490155** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.05.16

(51) Int. Cl. **B01D 15/18** (2006.01)
B01D 15/24 (2006.01)
G01N 30/44 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.08.11

(54) **ПРОМЫШЛЕННЫЙ СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ АНАЛИТА ИЗ ЖИДКОСТНОЙ СМЕСИ**

(31) **РА202100804; РА202200063;
РА202200544**

(72) Изобретатель:
**Полссон Микаэль, Харлоу Кеннет
(DK)**

(32) **2021.08.13; 2022.01.24; 2022.06.09**

(33) **DK**

(74) Представитель:

(86) **РСТ/ЕР2022/072577**

(87) **WO 2023/017126 2023.02.16**

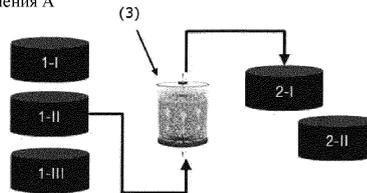
(71) Заявитель:

БЛЮТЕК АПС (DK)

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает следующие этапы: (i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси; (ii) загрузку первой части жидкостной смеси по меньшей мере на один хроматографический твердый носитель; (iii) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и (iv) добавление первого буфера элюирования по меньшей мере к одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит, где по меньшей мере часть фракции элюата, включающей аналит, полученной в этапе (iv), направляют рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

Вариант осуществления А



A1

202490155

202490155

A1

ПРОМЫШЛЕННЫЙ СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ АНАЛИТА ИЗ ЖИДКОСТНОЙ СМЕСИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способу предоставления системы для хроматографического разделения, подходящей для крупномасштабного извлечения аналита, присутствующего в жидкостной смеси. В частности, настоящее изобретение относится к выполняемому в промышленном масштабе способу и системе для извлечения аналита, например, белка или олигосахарида, из жидкостной смеси, полученной из молока или растений.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Если хроматографические способы отделения аналитов от жидкостной смеси стали коммерчески доступны, то это означает, что эта методика вызывает большой интерес, поскольку она может быть более специфичной в отношении некоторых аналитов, чем методики мембранного фильтрования. Однако недостатками хроматографических способов по сравнению с мембранным фильтрованием является стоимость разработки адсорбирующих материалов и лигандов, учитывая, что определенные лиганды требуются для определенных целей, а также низкие скорости потока и низкие емкости связывания. Таким образом, хроматографические способы в основном применяют для подготовительной работы или для очень ценных продуктов, которые должны иметь очень высокую чистоту.

В течение нескольких лет интерес был сконцентрирован на повышении производительности хроматографических способов, и одной из разработанных методик является хроматография с движущимся слоем и хроматография с псевдодвижущимся слоем (ПДС), которые имеют более высокую производительность и обеспечивают более гладкое протекание процесса.

Хроматография с движущимся слоем сорбента представляет собой систему непрерывного действия для разделения белков и включает конструкцию в виде карусели, включающую несколько колонок (по меньшей мере две), где переключение потоков через колонки осуществляется регулируемым по времени образом, в частности, изменением времени переключения между колонками при постоянном потоке. Такая система для непрерывного проведения хроматографии в виде карусели имеет ряд технических недостатков из-за того, что все колонки перемещаются одновременно из одного положения в другое, поскольку в системах для хроматографии с движущимся слоем

колонки не имеют индивидуального регулирования, хотя продолжительность пребывания колонки в фиксированном положении, будь то загрузка, промывка, элюирование или регенерация, при должной оптимизации может очень сильно различаться.

Эти недостатки привели к разработке систем ПДС (SMB, псевдодвижущийся слой), которые также включают по меньшей мере два (часто более) идентичных хроматографических твердых носителя, которые соединены друг с другом и с насосом для подвижной фазы (например, насосом для подачи исходного материала, насосом для подачи промывного буфера или насосом для подачи буфера элюирования). Эти соединения может обеспечивать многопоточный клапан. Назначение системы ПДС состоит в том, чтобы по мере необходимости использования в цикле разделения определенные потоки (подаваемый поток, поток воды, поток буфера, поток для безразборной очистки (сокращенно “БО”)) могли быть направлены в определенный хроматографический твердый носитель.

Соединения в системе ПДС сконструированы таким образом, что:

- a) все колонки соединены последовательно, образуя единый непрерывный контур;
- b) обычно между всеми колонками предусмотрено наличие четырех технологических потоков: входящего потока подаваемой смеси, исходящего потока очищенного быстрого компонента, исходящего потока очищенного медленного компонента и входящего потока растворителя или элюента; и
- c) спустя установленный промежуток времени, каждый технологический поток (два входящих и два исходящих) направляют в том же направлении.

Преимуществом ПДС может быть возможность создания хроматографической системы промышленного масштаба, которая может работать в непрерывном режиме, требуя меньшее количество смолы (адсорбирующего материала) и меньшее количество растворителя, чем для хроматографии, проводимой в периодическом режиме. Непрерывное функционирование облегчает рабочий контроль и интегрирование в производственные предприятия.

Однако недостатком ПДС является необходимость предоставления огромной площади под резервуары и хроматографические твердые носители, большое потребление буферных растворов, большое потребление воды и большое потребление сред для БО.

Таким образом, было бы желательно создать улучшенную хроматографическую систему и улучшенный хроматографический способ извлечения ананта из жидкостной смеси, имеющий повышенную производительность, и, в частности, более эффективную хроматографическую систему и эффективный хроматографический способ извлечения ананта из жидкостной смеси, которые обеспечивали бы повышение производительности

по сравнению с доступными в настоящее время системами и способами, в частности, в отношении хроматографии с адсорбцией на разрыхленном слое (АРС), а также преимуществом было бы снижение занимаемого пространства, снижение потребления буферных растворов, потребления воды и потребления химических реагентов для БО и/или времени пребывания у мембраны.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, задача настоящего изобретения состоит в предоставлении улучшенной хроматографической системы и улучшенного хроматографического способа извлечения аналита из жидкостной смеси, которые имеют повышенную производительность.

В частности, задача настоящего изобретения состоит в предоставлении хроматографической системы, в частности, системы для хроматографии с адсорбцией на разрыхленном слое (системы АРС), и улучшенного хроматографического способа, в частности, способа хроматографии с адсорбцией на разрыхленном слое (способа АРС), для извлечения аналита из жидкостной смеси, с помощью которых могут быть устранены указанные выше проблемы предшествующего уровня техники, связанные с производительностью, потребностью в площадях для резервуаров и хроматографических твердых носителей, большим потреблением буферных растворов, потреблением воды и потреблением сред для БО.

Таким образом, один аспект изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает следующие этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит;

где по меньшей мере часть фракции элюата, включающей аналит, полученной в этапе (iv), направляют рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает следующие этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно этап промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит;

(v) загрузку второй (или следующей) части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(vi) необязательно этап промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(vii) добавление второго (или следующего) буфера элюирования на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель с получением второй (или следующей) фракции элюата, включающей аналит;

(viii) необязательное повторение этапов (v) – (vii),

где второй (и следующий) буфер элюирования, добавляемый в этапе (vii), включает по меньшей мере часть предыдущей фракции элюата, включающей аналит.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает хроматографическое извлечение аналита из жидкостной смеси посредством элюирования аналита, связанного с лигандом, находящимся в одном или более хроматографических твердых носителях, буфером элюирования с получением фракции элюата, включающей аналит, где по меньшей мере часть фракции элюата используют в качестве буфера элюирования.

Другой аспект настоящего изобретения относится к хроматографической системе, включающей один или более хроматографический твердый носитель, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, где по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата, и по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную

систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

Другой аспект настоящего изобретения относится к хроматографической системе, включающей один или более хроматографический твердый носитель, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, где по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата и по меньшей мере одним сборным резервуаром для поступления собираемой фракции, и по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя, и сборный резервуар может быть соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одной системой мембран для извлечения по меньшей мере части буфера элюирования из анализа, и указанная по меньшей мере одна система мембран соединена гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен способ и хроматографическая система согласно настоящему изобретению для извлечения анализа из жидкостной смеси, описанная ниже. Система, показанная на Фиг. 1, соответствует 5 различным вариантам осуществления настоящего изобретения:

Вариант осуществления А: показано элюирование фракции анализа из хроматографического твердого носителя после начальной загрузки жидкостной смеси на хроматографический твердый носитель, подобное традиционному варианту применения хроматографического твердого носителя;

Вариант осуществления В: показана идея настоящего изобретения, согласно которой фракцию элюата подвергают рециркуляции для элюирования других иммобилизованных анализов из хроматографического твердого носителя;

Вариант осуществления С: показано другое воплощение идеи настоящего изобретения, согласно которому фракцию элюата непосредственно направляют рециклом из выпускного конца хроматографического твердого носителя во впускной конец хроматографического твердого носителя, повторно направляя ее на хроматографический твердый носитель, что способствует элюированию из хроматографического твердого носителя дополнительного количества иммобилизованного анализа;

Вариант осуществления D: показана процедура элюирования, в которой фракция элюата насыщена аналитом; и

Вариант осуществления E: показано дополнительное концентрирование и рециркуляция буфера элюирования из фракции элюата, например, насыщенной фракции элюата, в резервуар для буфера элюирования.

В каждом из вариантов осуществления, показанных на Фиг. 1, представлены 3 различных резервуара для буферных растворов, где первый резервуар (1-I) для буфера может содержать промывной буфер, второй резервуар (1-II) для буфера может содержать буфер элюирования, и третий резервуар (1-III) для буфера может содержать регенерационный буфер. Система и способ могут включать несколько вторых резервуаров (1-II) для буфера, содержащих различные буферы элюирования, например, применяемые для последовательного элюирования различных аналитов.

В первом варианте осуществления, варианте осуществления A, жидкостная смесь, включающая интересующий аналит (аналиты), может быть загружена на хроматографический твердый носитель (3), где фракция, содержащая аналит, или фракции, содержащие аналиты, связываются с хроматографическим твердым носителем (3). Хроматографический твердый носитель (3) и иммобилизованный аналит (аналиты) могут быть промыты в этапе промывки посредством загрузки промывного буфера из первого резервуара (1-I) для буфера/резервуара для промывного буфера в хроматографическую колонку (3), и при этом из хроматографического твердого носителя (3) могут быть удалены загрязнения. После необязательного этапа промывки хроматографический твердый носитель (3) может быть обработан буфером элюирования, который загружают из второго резервуара (1-II) для буфера/резервуара для буфера элюирования на хроматографический твердый носитель (3), в результате получая фракцию элюата, включающую аналит. Предпочтительно фракция элюата может быть собрана в первом резервуаре (2-I) для элюата. Если на одном хроматографическом твердом носителе (3) получают разные фракции элюата, например, при последовательном элюировании, то вторая фракция, содержащая аналит, может быть собрана во второй резервуар (2-II) для элюата. Перед загрузкой новой части жидкостной смеси на хроматографический твердый носитель, хроматографический твердый носитель (3) может быть регенерирован в этапе регенерации загрузкой на хроматографический твердый носитель (3) буфера регенерации из третьего резервуара (1-III) для буфера/резервуара для буфера регенерации, после чего хроматографический твердый носитель готов для проведения нового цикла.

Во втором варианте осуществления, варианте осуществления В, вторую загрузку жидкостной смеси загружают на хроматографический твердый носитель (3), и иммобилизованный анализ/аналиты подвергают этапу промывки, как описано выше, после чего выполняют этап элюирования, в котором фракцию элюата, собранную в резервуар (2-I) для элюата, загружают на колонку, что приводит к высвобождению иммобилизованной фракции, содержащей анализ, из хроматографического твердого носителя (3) и ее сбору в резервуарах (2-I и/или 2-II) для элюата. В одном из воплощений настоящего изобретения способ, описанный в этом варианте осуществления В, может быть повторен 2 раза, например, 3 раза, например, 4 раза, например, 5 раз, например, 6 раз. Предпочтительно, вариант осуществления В повторяют до насыщения или существенного насыщения фракции элюата. В одном из воплощений настоящего изобретения концентрация анализа во фракции элюата (соотнесенная со стандартным объемом) составляет по меньшей мере на 25% больше, например, по меньшей мере на 50% больше, например, по меньшей мере на 75% больше, например, по меньшей мере на 90% больше, например, по меньшей мере на 100% больше, например, по меньшей мере на 110% больше, например, по меньшей мере на 150% больше, например, по меньшей мере на 175% больше.

В третьем варианте осуществления, варианте осуществления С, жидкостная смесь, включающая интересующий анализ (аналиты), может быть загружена на хроматографический твердый носитель (3), где фракция, содержащая анализ, или фракции, содержащие анализы, связываются с хроматографическим твердым носителем (3), как описано в первом варианте осуществления, варианте осуществления А. После необязательного этапа промывки хроматографический твердый носитель (3) может быть обработан буфером элюирования, который загружают из второго резервуара (1-II) для буфера/резервуара для буфера элюирования на хроматографический твердый носитель (3), в результате получая фракцию элюата, включающую анализ. Фракция элюата, включающая анализ, может быть направлена рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель, предпочтительно непосредственно направлена рециклом из выпускного конца хроматографического твердого носителя во впускной конец хроматографического твердого носителя, то есть повторно направлена на хроматографический твердый носитель, что способствует элюированию дополнительного иммобилизованного анализа из хроматографического твердого носителя. В одном из воплощений настоящего изобретения способ, описанный в этом варианте осуществления С, может быть повторен по меньшей мере 2 раза, как например, по меньшей мере 3 раза, например, по меньшей мере 4 раза, как например, по меньшей мере 5 раз, например, по

меньшей мере 6 раз. Предпочтительно, вариант осуществления С повторяют до насыщения или существенного насыщения фракции элюата. В одном из воплощений настоящего изобретения концентрация аналита во фракции элюата (соотнесенная со стандартным объемом) составляет по меньшей мере на 25% больше, как например, по меньшей мере на 50% больше, например, по меньшей мере на 75% больше, как например, по меньшей мере на 90% больше, как например, по меньшей мере на 100% больше, например, по меньшей мере на 110% больше, как например, по меньшей мере на 150% больше, например, по меньшей мере на 175% больше.

В четвертом варианте осуществления, варианте осуществления D, фракция (2-I) элюата, используемая для элюирования аналита, может быть насыщенной или по существу насыщенной, и оставшаяся иммобилизованная фракция, содержащая аналит, может быть промыта новым буфером (1-II) или ненасыщенным элюатом (не показано на Фиг.) для сбора всей фракции элюата с хроматографического твердого носителя (3).

В пятом варианте осуществления, варианте осуществления E, фракция элюата, насыщенная/по существу насыщенная фракция элюата может быть подвергнута дополнительной обработке, состоящей в загрузке фракции элюата из резервуара (2-I) для элюата, например, в установку для мембранного фильтрования, как например, установку микрофильтрации (МФ) и/или установку ультрафильтрации (УФ), что приводит к повышению концентрации фракции аналита в ретентате и получению очищенной или по существу очищенной жидкой фракции (пермеата буфер элюирования), которая может быть подана рециклом в резервуар для буфера и использована в качестве буфера элюирования, предпочтительно в качестве нового буфера элюирования и/или ненасыщенного буфер элюирования. Перед добавлением во второй резервуар (1-II) для буфера/резервуар для буфера элюирования пермеат буфера элюирования может быть простерилизован.

На Фиг. 2 представлен другой способ и хроматографическая система согласно настоящему изобретению для извлечения аналита из жидкостной смеси. На Фиг. 2 представлен хроматографический твердый носитель (3), на который загружают жидкостную смесь, и иммобилизованный аналит/аналиты могут быть промыты в этапе промывки, как описано выше. После этапа промывки хроматографический твердый носитель может быть подвергнут элюированию в этапе элюирования, в котором буфер элюирования может быть подан из резервуара (1) для буфера, и может быть получена фракция (6) элюата. Определение концентрации аналита во фракции (6) элюата может производиться непрерывно, и пока фракция (6) элюата не достигнет определенной предельной концентрации (которая может быть установлена оператором), фракция (6)

элюата может быть собрана в виде рециркулируемой фракции (8) в резервуар (2) для элюата и подана рециклом через хроматографический твердый носитель (3) один или более раз. Когда концентрация аналита во фракции (6) элюата достигает (и превышает) определенный предел, фракцию элюирования с помощью клапана перенаправляют в собираемую фракцию (9) в сборный резервуар (4). Когда концентрация аналита во фракции (6) элюата вновь опускается ниже определенного предела, фракцию (6) элюата с помощью клапана перенаправляют обратно в виде рециркулируемой фракции (8) в резервуар (2) для элюата. Чем большее количество раз фракцию элюата рециркулируют (в виде рециркулируемой фракции (8)) в резервуар (2) для элюата и через хроматографический твердый носитель (3), тем выше концентрация аналита в рециркулируемой фракции (8) – это показано на вставке (А) и на Фиг. 3.

Предпочтительно, собираемая фракция (9) может быть собрана в сборном резервуаре (4), и через гидравлическое соединение (10) собираемая фракция может быть направлена из сборного резервуара (4) на обработку (5) с помощью мембран. Однако в одном из воплощений настоящего изобретения сборный резервуар (4) может отсутствовать, и собираемую фракцию (9) непосредственно отправляют на обработку (5) с помощью мембран. Чем большее количество раз фракцию элюата рециркулируют (в виде рециркулируемой фракции (8)) в резервуар (2) для элюата и через хроматографический твердый носитель (3), тем выше концентрация аналита в собираемой фракции (9) – это показано на вставке (В) и на Фиг. 5.

Обработка (5) с помощью мембран может включать ультрафильтрацию и/или диалфильтрацию, в результате которой получают чистый обессоленный продукт, включающий отделенный аналит. Мембранная обработка также позволяет регенерировать или по существу регенерировать буфер элюирования с образованием регенерированного буфера элюирования. Регенерированный буфер элюирования, полученный в результате мембранной обработки, может быть направлен рециклом в резервуар для буфера элюирования и/или в один или более хроматографических твердых носителей. Предпочтительно, регенерированный буфер элюирования может быть смешан с рециркулируемой фракцией, полученной из фракции элюата.

На Фиг. 3 представлена вставка (А), показанная на Фиг. 2, которая демонстрирует повышение концентрации аналита в рециркулируемой фракции. Кроме рециркулируемой фракции, из фракции элюата также получают собираемую фракцию, и концентрация рециркулируемой фракции стабильно увеличивается. На Фиг. 3 представлена динамика концентрации аналита в течение 20 циклов использования части фракции элюата (рециркулируемой фракции).

На Фиг. 4 представлен профиль элюирования аналита. Этот профиль может зависеть от различных факторов, таких как природа конкретного аналита, лиганда, буфера элюирования, температура и т.д. На Фиг. 4 представлен общий профиль элюирования аналита. Зная тип аналита и условия проведения способа, оператор может установить предельную концентрацию аналита и время отбора собираемой фракции из фракции элюата. Из профиля элюирования, показанного на Фиг. 4, оператор может установить предельную концентрацию, превышающую 35, и при этом направить фракции 2 и 3 в собираемую фракцию, и фракции 1 и 4-10 – в рециркулируемую фракцию.

На Фиг. 5 представлена вставка (B), показанная на Фиг. 2, которая демонстрирует повышение концентрации аналита в собираемой фракции. По мере рециркуляции части фракции в виде рециркулируемой фракции, концентрация аналита в рециркулируемой фракции повышается, и концентрация аналита в собираемой фракции также может постепенно повышаться по мере увеличения количества проводимых циклов.

Ниже настоящее изобретение описано более подробно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

При осуществлении способов хроматографического разделения жидкостных смесей, в частности, смесей, содержащих разнообразные компоненты, таких как потоки растительных материалов, отходящие потоки предприятий или потоки молочной продукции, производительность часто понижена из-за использования больших объемов буферов элюирования, и концентрация в получаемой фракции элюата оказывается очень низкой. Неожиданно авторами настоящего изобретения было обнаружено, что производительность хроматографического способа может быть повышена за счет значительного повышения емкости буфера элюирования по сравнению с его первоначально применяемой емкостью; это позволяет уменьшить количество резервуаров, что приводит к уменьшению используемого рабочего пространства, снижению потребления буфера, воды и химических средств для проведения БО.

Таким образом, предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает следующие этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит,

где по меньшей мере часть фракции элюата, включающей аналит, полученной в этапе (iv), направляют рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

В контексте настоящего изобретения термин “по меньшей мере часть” относится к по меньшей мере части элюируемой фракции, которую рециркулируют во время работы. Однако после проведения ряда циклов рециркуляции, необходимо произвести очистку хроматографического твердого носителя и/или всей системы для устранения вероятности загрязнения микроорганизмами, предпочтительно с помощью системы безразборной очистки (БО). Перед очисткой хроматографического твердого носителя и/или всей системы, вся элюируемая фракция может быть направлена в собираемую фракцию, и функционирование может быть возобновлено.

В одном из воплощений настоящего изобретения, до удаления по меньшей мере части фракции элюата, вся фракция элюата может быть направлена рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель на протяжении по меньшей мере одного цикла, например, по меньшей мере 2 циклов, например, по меньшей мере 3 циклов, например, по меньшей мере 4 циклов, например, по меньшей мере 5 циклов, например, по меньшей мере 6 циклов, например, по меньшей мере 7 циклов.

Предпочтительно, фракция элюата может быть разделена на рециркулируемую фракцию и собираемую фракцию.

Рециркулируемая фракция может быть направлена рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель, что приводит к получению дополнительной фракции элюата. Дополнительная фракция элюата может включать следующую рециркулируемую фракцию и следующую собираемую фракцию.

В одном из воплощений настоящего изобретения рециркуляция рециркулируемой фракции может быть произведена в течение по меньшей мере 2 раз/циклов, как, например, в течение по меньшей мере 4 раз/циклов, например, в течение по меньшей мере 8 раз/циклов, как, например, в течение по меньшей мере 12 раз/циклов, например, в течение по меньшей мере 16 раз/циклов, как, например, в течение по меньшей мере 20 раз/циклов, например, в течение по меньшей мере 24 раз/циклов, как, например, в течение по меньшей мере 28 раз/циклов, например, в течение по меньшей мере 32 раз/циклов, как,

например, в течение по меньшей мере 36 раз/циклов, например, в течение по меньшей мере 40 раз/циклов.

В другом воплощении настоящего изобретения рециркуляция рециркулируемой фракции может быть произведена в течение не более чем 45 раз/циклов, как, например, в течение не более чем 35 раз/циклов, например, в течение не более чем 30 раз/циклов, как, например, в течение не более чем 25 раз/циклов, например, в течение не более чем 20 раз/циклов, как, например, в течение не более чем 18 раз/циклов, например, в течение не более чем 16 раз/циклов.

Предпочтительно, рециркуляция рециркулируемой фракции может быть произведена в течение 2-45 раз/циклов, например, в течение 10-30 раз/циклов, например, в течение 15-25 раз/циклов, как например, в течение 18-23 раз/циклов.

В одном из воплощений настоящего изобретения концентрация аналита в рециркулируемой фракции может быть повышена в результате выполнения 15-25 циклов рециркуляции фракции до концентрации, составляющей от 5 до 20% (масс.), например, от 6 до 17% (масс.), например, от 7 до 15, как, например, от 8 до 12% (масс.), например, от 9 до 11% (масс.).

В одном из воплощений настоящего изобретения объем собираемой фракции может составлять от 2 до 40% (об./об.) от объема фракции элюата, как, например, от 5 до 30% (об./об.), например, от 7 до 25% (об./об.), как, например, от 8 до 20% (об./об.), например, от 9 до 15% (об./об.).

Предпочтительно, концентрация аналита во фракции элюата может определять величину части фракции элюата, которую направляют в собираемую фракцию, и части фракции элюата, которую направляют в рециркулируемую фракцию.

Разделение фракции элюата на собираемую фракцию или рециркулируемую фракцию может быть произведено автоматически в зависимости от концентрации аналита в разных частях фракции элюата.

Предпочтительно, предельная концентрация, при которой часть фракции элюата направляют в собираемую фракцию, а часть фракции элюата направляют в рециркулируемую фракцию, может быть установлена оператором. Предельная концентрация может быть изменена в соответствии с типом извлекаемого аналита.

В одном из воплощений настоящего изобретения концентрация аналита во фракции элюата может быть определена поточным датчиком.

Предпочтительно, поточный датчик для определения концентрация аналита во фракции элюата может автоматически и непрерывно определять концентрацию аналита во фракции элюата.

В одном из воплощений настоящего изобретения концентрация аналита во фракции элюата, определяемая поточным датчиком, может быть передана в управляющее устройство, такое как компьютер, которое сконструировано с возможностью регулирования работы одного или более клапанов таким образом, что при низких концентрациях аналита во фракции элюата клапан переключается, направляя фракцию элюата в рециркулируемую фракцию, а при высокой концентрации аналита во фракции элюата клапан перенаправляет фракцию элюата в собираемую фракцию.

В другом воплощении настоящего изобретения поточный датчик для определения концентрации аналита во фракции элюата может представлять собой УФ-датчик. Предпочтительно датчик белка представляет собой УФ-датчик белка.

В процессе функционирования для выделения аналита (этап (iv)) может быть добавлен буфер элюирования, и при этом поточный датчик непрерывно определяет концентрацию аналита во фракции элюата. Профиль элюирования для получения фракций элюата может иметь начальную рециркуляционную часть, часть сбора и конечную рециркуляционную часть.

Начальная рециркуляционная часть буфера элюирования (образующая часть рециркулируемой фракции) может иметь низкую концентрацию аналита; в некоторый момент времени концентрация аналита начинает повышаться, и начальная часть элюата может быть подвергнута рециркуляции или может быть сохранена и подвергнута рециркуляции в более позднем этапе элюирования.

По достижении определенной минимальной концентрации аналита, фракция элюата может образовывать собираемую фракцию, которая может быть направлена в резервуар для продукта.

С течением времени концентрация аналита в собираемой фракции снижается, и по достижении определенной минимальной концентрации аналита, фракция элюата может образовывать рециркулируемую фракцию.

В одном из воплощений настоящего изобретения рециркулируемая фракция, полученная до сбора собираемой фракции, и рециркулируемая фракция, полученная после сбора собираемой фракции, могут быть объединены и/или направлены рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

Если отделяют собираемую фракцию, то для восполнения снижения объема рециркулируемой фракции в рециркулируемую фракцию может быть добавлено равное количество или по существу равное количество буфера элюирования.

В одном из воплощений настоящего изобретения способ извлечения аналита может включать применение двух хроматографических твердых носителей.

Предпочтительно два хроматографических твердых носителя соединены последовательно, так что выпускной конец первого хроматографического твердого носителя может быть соединен гидравлическим соединением с выпускным концом второго хроматографического твердого носителя.

На основании концепции последовательно соединенных хроматографических твердых носителей может быть произведена избыточная загрузка первой колонки, что обеспечивает полное или по существу полное насыщение первого хроматографического твердого носителя аналитом, и при этом излишек загрузки из первого хроматографического твердого носителя может быть собран на второй хроматографический твердый носитель.

При загрузке второй части жидкостной смеси может быть произведена начальная загрузка второго хроматографического твердого носителя, которая обеспечивает полное или по существу полное насыщение второго хроматографического твердого носителя аналитом, и при этом излишек загрузки из второго хроматографического твердого носителя может быть собран на первый хроматографический твердый носитель.

В одном из воплощений настоящего изобретения загрузку и/или избыточную загрузку хроматографических твердых носителей можно регулировать с помощью одного или более поточных датчиков, предпочтительно поточных УФ-датчиков. С помощью поточных датчиков можно производить управление насосами и клапанами, отвечающими за загрузку по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает следующие этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно этап промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит;

(v) загрузку второй (или следующей) части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(vi) необязательно этап промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(vii) добавление второго (или следующего) буфера элюирования на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель с получением второй (или следующей) фракции элюата, включающей аналит;

(viii) необязательное повторение этапов (v) – (vii),

где второй (и следующий) буфер элюирования, добавляемый в этапе (vii), включает по меньшей мере часть предыдущей фракции элюата, включающей аналит.

Предпочтительно, предыдущая фракция элюата, включающая аналит, может представлять собой фракцию элюата или рециркулируемую фракцию, полученную из предыдущего цикла непосредственно перед рассматриваемой фракцией элюата.

В одном из воплощений настоящего изобретения этапы (v) – (vii) могут быть повторены до насыщения или существенного насыщения фракции элюата. Насыщение фракции элюата может быть достигнуто непрерывной рециркуляцией по меньшей мере части фракции элюата с проведением совокупности циклов, в которых часть фракции элюата может быть извлечена в виде собираемой фракции и часть фракции элюата может быть направлена рециклом на хроматографический твердый носитель в качестве рециркулируемой фракции. При непрерывной рециркуляции рециркулируемой фракции в качестве буфера элюирования через хроматографический твердый носитель происходит непрерывное увеличение концентрации аналита, и фракция элюирования постепенно насыщается аналитом.

В контексте настоящего изобретения термин “аналит” относится к профилю того компонента жидкостной смеси, концентрация которого во фракции, содержащей аналит, увеличивается по сравнению с концентрацией других компонентов фракции, содержащей аналит.

В одном из воплощений настоящего изобретения хроматографическая система может быть снабжена рециркуляционной системой, соединяющей выпускной конец хроматографической системы с впускным концом хроматографической системы.

Рециркулируемая фракция элюата, включающая аналит, полученная в этапе (iv), может быть непосредственно направлена рециклом из выпускного конца хроматографической системы во впускной конец хроматографической системы.

В контексте настоящего изобретения термин “непосредственно направлен рециклом” относится к рециркуляции фракции элюата, включающей аналит, полученной в этапе (iv), через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель без выполнения этапа промывки хроматографического твердого носителя, этапа регенерации

хроматографического твердого носителя и/или добавления дополнительных жидкостных смесей.

В одном из воплощений настоящего изобретения фракция элюата, включающая аналит, полученная в этапе (iv), может быть непосредственно направлена рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

Одним из преимуществ такой непосредственной рециркуляции может быть существенное снижение количества химических соединений, используемых в буфере элюирования, в результате увеличения времени, которое обеспечивает достаточный массоперенос аналита в буфер элюирования от лиганда, способного связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к способу извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает хроматографическое извлечение аналита из жидкостной смеси посредством элюирования аналита, связанного с лигандом, находящимся в одном или более хроматографических твердых носителях, буфером элюирования с получением фракции элюата, включающей аналит, где по меньшей мере часть фракции элюата используют в качестве буфера элюирования.

Обычно фракционирование жидкостных смесей может включать следующие этапы:

- a) загрузку жидкостной смеси на хроматографический твердый носитель;
- b) необязательную промывку хроматографического твердого носителя;
- c) элюирование хроматографического твердого носителя; и
- d) регенерацию/очистку хроматографического твердого носителя.

После регенерации/очистки хроматографического твердого носителя в этапе (d) этапы повторяют, производя новую загрузку жидкостной смеси; необязательную новую промывку; новое элюирование с новой загрузкой буфера элюирования; и новую регенерацию/очистку хроматографического твердого носителя с помощью новой загрузки буфера регенерации/буфера очистки.

В контексте настоящего изобретения термин “включающий”, который может быть синонимом к терминам "содержащий" или "отличающийся тем, что", относится к неограничиваемому или расширяемому перечислению признаков и не исключает наличия дополнительных, неуказанных признаков или этапов способа. Термин “включающий” оставляет возможность включения неуказанных ингредиентов даже в преобладающих количествах.

В одном из воплощений настоящего изобретения буфер элюирования может быть не новой загрузкой буфера элюирования, а рециркулируемой фракцией элюата, полученной из первого этапа элюирования.

Рециркуляция фракции элюата может быть начата после того, как вторая загрузка жидкостной смеси добавлена к хроматографическому твердому носителю и готова к элюированию.

Альтернативно, рециркуляция фракции элюата может быть начата до завершения элюирования первой загрузки жидкостной смеси, но после получения достаточного количества фракции элюата. В одном из воплощений настоящего изобретения рециркуляция фракции элюата может быть начата после того, как был получен объем фракции элюата, составляющий по меньшей мере 0,25 от объема слоя носителя, например, по меньшей мере 0,5 от объема слоя носителя, например, по меньшей мере 1 объем слоя носителя, например, по меньшей мере 1,5 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 2 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 2,5 объема слоя носителя.

В другом воплощении настоящего изобретения рециркуляция фракции элюата может быть начата после того, как на хроматографический твердый носитель был загружен объем буфера элюирования, составляющий по меньшей мере 1,25 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 1,5 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 2 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 2,5 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 3 объема слоя носителя, например, по меньшей мере 3,5 объема слоя носителя.

В одном из воплощений настоящего изобретения фракция элюата может быть направлена рециклом из резервуара для элюата на один или более хроматографический твердый носитель и обратно в резервуар для элюата.

Предпочтительно, буфер элюирования, включающий по меньшей мере часть фракции элюата, включает по меньшей мере 0,01 мг/мл аналита, как, например, по меньшей мере 0,05 мг/мл, например, по меньшей мере 0,1 мг/мл, как, например, по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 0,75 мг/мл, как, например, по меньшей мере 1,0 мг/мл, например, по меньшей мере 1,5 мг/мл, как, например, по меньшей мере 2,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 2,2 мг/мл, например, по меньшей мере 2,4 мг/мл, как, например, по меньшей мере 2,5 мг/мл, как, например, по меньшей мере 3,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 4,0 мг/мл, например, по меньшей мере 5,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 6,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 7,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 8,0 мг/мл, например, по меньшей мере 9,0 мг/мл, как, например, по меньшей мере 10,0 мг/мл.

Собираемая фракция или часть собираемой фракции может быть подвергнута фильтрованию. Способ фильтрования может включать применение одной или более фильтровальных систем для отделения аналита от буфера элюирования.

Предпочтительно, в способе фильтрования может быть произведена или по существу произведена регенерация первоначально добавленного буфера элюирования.

В одном из воплощений настоящего изобретения регенерированный буфер элюирования может не содержать или по существу не содержать аналит.

Предпочтительно, способ фильтрования может включать по меньшей мере один способ ультрафильтрации (УФ-способ), один или более способов микрофильтрации (МФ-способ), один или более способов нанофильтрации (НФ-способ), один или более способов диафильтрации (ДФ-способ) или их комбинацию.

Регенерированный буфер элюирования, полученный в результате фильтрования, может быть направлен рециклом в резервуар для буфера элюирования и/или на один или более хроматографических твердых носителя.

Предпочтительно, регенерированный буфер элюирования может быть смешан с рециркулируемой фракцией, полученной из фракции элюата.

В другом воплощении настоящего изобретения один или более хроматографических твердых носителя могут представлять собой единственный хроматографический твердый носитель.

Способ может применим как к уплотненным слоям хроматографического твердого носителя, так и к псевдооживленным слоям хроматографического твердого носителя или разрыхленным слоям хроматографического твердого носителя (APC) или к их комбинации. Предпочтительно, хроматографический твердый носитель может представлять собой псевдооживленный слой хроматографического твердого носителя или разрыхленный слой хроматографического твердого носителя (APC).

В одном из воплощений настоящего изобретения загрузка жидкостной смеси (и/или промывка хроматографического твердого носителя) может быть произведена на разрыхленный слой, и буфер элюирования может быть добавлен на уменьшенный разрыхленный слой (уменьшенный по сравнению с разрыхлением во время загрузки жидкостной смеси) или уплотненный слой носителя, в результате чего получают фракцию элюата, включающую аналит.

Кроме рециркуляции фракции элюата согласно настоящему изобретению способ (или система) согласно изобретению могут включать применение совокупности соединенных хроматографических твердых носителей, которые сконструированы с

возможностью выделения анализа способом хроматографии с движущимся слоем сорбента или хроматографии с псевдодвижущимся слоем сорбента.

Хроматография с псевдодвижущимся слоем сорбента может быть воплощена различными способами в зависимости от типа жидкостной смеси и получаемой фракции элюата. В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения может быть предпочтительным проведение хроматографии с псевдодвижущимся слоем сорбента так, как описано в документе EP 1994972 A1, поскольку он относится к контролю твердых носителей для проведения хроматографии в разрыхленном слое в способе хроматографии с псевдодвижущимся слоем сорбента. Таким образом, документ EP 1994972 A1 включен в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из воплощений настоящего изобретения этапы (v) – (vii) могут быть повторены до тех пор, пока фракция элюата не насыщается или по существу насыщается. Уровень насыщения может быть определен по способности фракции элюата “извлекать” анализ из хроматографического твердого носителя. В контексте настоящего изобретения фракция элюата может считаться насыщенной или по существу насыщенной, если более 10% связанного анализа остается присоединенным к хроматографическому твердому носителю, например, более 15%, например, более 20%, как, например, более 25%, например, более 30%, как, например, более 35%, например, более 40%, как, например, более 45%, например, более 50%.

В одном из воплощений настоящего изобретения оставшиеся анализы могут быть выделены элюированием с помощью новой загрузки буфера элюирования или буфера элюирования, полученного при дополнительной обработке фракции элюата.

Фракция элюата может быть подвергнута дополнительной обработке, в которой получают ретентат, содержащий анализ, и пермеат буфера элюирования, включающий элюат.

Предпочтительно, пермеат буфера элюирования включает менее 0,5 мг/мл анализа, например, менее 0,25 мг/мл, например, менее 0,01 мг/мл, как, например, менее 0,005 мг/мл, например, менее 0,001 мг/мл, как, например, менее 0,0005 мг/мл, например, менее 0,0001 мг/мл.

В одном из воплощений настоящего изобретения пермеат буфера элюирования может быть подан рециклом во второй резервуар для буфера элюирования и использован в качестве по меньшей мере части буфера элюирования, предпочтительно в качестве нового буфера элюирования и/или ненасыщенного буфера элюирования.

Предпочтительно, дополнительная обработка представляет собой обработку с помощью мембран и предпочтительно выбрана из одного или более следующих способов: ультрафильтрации (УФ), микрофильтрации (МФ) и/или нанофильтрации (НФ).

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения аналит может представлять собой белок, углевод, олигосахарид, фермент, гормон или фактор роста; предпочтительно аналит представляет собой белок или олигосахарид.

Для сохранения натуральности жидкостной смеси, жидкостная смесь может не подвергаться пастеризации.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения жидкостная смесь может представлять собой источник молочного продукта или растительный экстракт.

Источник молочного продукта может быть выбран из группы, состоящей из молока, цельного молока, снятого молока, молочных концентратов, восстановленного сухого молока, непастеризованного молока, микрофильтрованного молока, молока с измененным рН, предварительно обработанного источника молочного продукта и сыворотки.

Характерным отличием источника молочного продукта может быть то, что перед извлечением аналита из источника молочного продукта не был осажден казеин, не были удалены мицеллы казеина и/или не были удалены агрегаты казеина.

В другом воплощении настоящего изобретения источник молочного продукта может быть получен от жвачного животного, такого как, например, корова, коза, овца или бизон, или от другого одомашненного млекопитающего, не являющегося человеком.

Для ускорения обработки жидкостной смеси может быть предпочтительным увеличить скорость загрузки. Таким образом, в одном из воплощений настоящего изобретения жидкостная смесь может быть загружена на хроматографический твердый носитель со скоростью течения, составляющей от 1 до 50 см/мин., предпочтительно от 5 до 30 см/мин., более предпочтительно от 10 до 25 см/мин., предпочтительнее от 15 до 20 см/мин.

В контексте настоящего изобретения термин "хроматографический носитель" относится к контейнеру любого типа, содержащему адсорбент, который может иметь по меньшей мере один впускной конец для загрузки жидкостной смеси согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один выпускной конец для получения фракции элюата после пропускания буфера элюирования.

В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения хроматографический твердый носитель может включать адсорбент.

До контакта жидкостной смеси с адсорбентом способ согласно изобретению может включать начальный, но необязательный этап уравнивания адсорбента. Уравнивание может быть выполнено с помощью уравнивающей жидкости. Показатель pH уравнивающей жидкости может быть различным в зависимости от типа жидкостной смеси, применяемого лиганда и/или получаемой фракции элюата.

В контексте настоящего изобретения термин "адсорбент" относится ко всему заключенному в хроматографическом твердом носителе слою, в котором происходит удержание аналита. Аналит может удерживаться взаимодействием с подходящим лигандом, который способен специфично связываться с аналитом, содержащимся в жидкостной смеси.

В одном из воплощений настоящего изобретения, адсорбент предпочтительно может включать отдельные частицы. В контексте настоящего изобретения термин "частица адсорбента" используется взаимозаменяемо с термином "частица" и относится к отдельным частицам, составляющим адсорбент.

Если адсорбент в виде частиц применяют для адсорбции в разрыхленном слое, то на разрыхление псевдооживленного слоя носителя и разделение белков могут влиять различные факторы, такие как скорость течения, размер частиц и плотность частиц. Степень разрыхления необходимо регулировать таким образом, чтобы частицы адсорбента удерживались внутри колонки, но в то же время поддерживалась оптимальная скорость течения.

Степень разрыхления может быть определена как отношение H/H_0 , где " H_0 " – это высота слоя носителя в уплотненном слое носителя, и " H " – высота слоя носителя в разрыхленном слое носителя. В одном из воплощений настоящего изобретения степень разрыхления H/H_0 составляет от 1,1 до 10, например, от 1,0 до 6, например, от 1,2 до 5, например, от 1,3 до 5, например, от 1,5 до 4, например, от 4 до 6, например, от 3 до 5, например, от 3 до 4, например, от 4 до 6.

В другом воплощении настоящего изобретения степень разрыхления H/H_0 составляет по меньшей мере 1,1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3, например, по меньшей мере 3,5, например, по меньшей мере 4, например, по меньшей мере 4,5, например, по меньшей мере 5, например, по меньшей мере 5,5, например, по меньшей мере 6, например, по меньшей мере 10.

Кроме того, плотность частиц адсорбента для APC может сильно влиять на скорости течения, которые могут быть применены при ограничении, накладываемом максимально возможной степенью разрыхления слоя адсорбента в типичной колонке для

АРС (например, при Н/НО максимум 3-5), и для достижения высокой производительности способа плотность частиц адсорбента должна составлять по меньшей мере 1,3 г/мл, более предпочтительно по меньшей мере 1,5 г/мл, предпочтительнее по меньшей мере 1,8 г/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,0 г/мл, наиболее предпочтительно по меньшей мере 2,3 г/мл.

Под плотностью частицы адсорбента для АРС понимают плотность частицы адсорбента в полностью сольватированном (например, гидратированном) состоянии, которая отличается от плотности высушенной частицы адсорбента.

Высокая плотность частиц адсорбента может быть по большей части достигнута за счет включения во внутреннюю часть частицы определенной доли плотных непористых материалов, предпочтительно имеющих плотность, составляющую по меньшей мере 4,0 г/мл, такую как по меньшей мере 10 г/мл, например, по меньшей мере 16 г/мл, такую как по меньшей мере 25 г/мл. Обычно плотность непористого материала внутренней части составляет приблизительно от 4,0 до 25 г/мл, например, приблизительно от 4,0 до 20 г/мл, например, приблизительно от 4,0 до 16 г/мл, например, от 12 до 19 г/мл, например, от 14 до 18 г/мл, например, приблизительно от 6,0 до 15,0 г/мл, например, приблизительно от 6,0 до 16 г/мл.

Частицы адсорбента могут состоять из различных химически модифицированных пористых материалов, имеющих необходимую плотность и связывающую способность для функционирования при заданных скоростях течения, как указано выше. Частицы могут представлять собой конгломераты, как описано в документе WO 92/00799, включающие по меньшей мере две непористые внутренние части, окруженные пористой матрицей полимерной основы, или частицы чешуйчатого типа, включающие одну непористую внутреннюю часть, окруженную пористой матрицей полимерной основы.

Адсорбент может включать пористую матрицу полимерной основы, к которой ковалентно присоединен один или более лигандов смешанного типа. Предпочтительно, пористая матрица полимерной основы может представлять собой пористую органическую матрицу полимерной основы. В одном из воплощений настоящего изобретения адсорбент может включать плотный непористый материал внутренней части, окруженной пористой матрицей полимерной основы.

Специалистам в данной области техники известны различные непористые материалы внутренней части и различные пористые матрицы полимерной основы. Примеры непористых материалов внутренней части и пористых матриц полимерной основы имеются в документе WO 2010/037736. Специалистам также известны способы

получения адсорбента согласно настоящему изобретению, и такие способы получения адсорбента описаны в документах WO 2010/03776, EP 0538350 или WO 97/17132.

Для осуществления способа согласно настоящему изобретению может быть предложена подходящая для способа хроматографическая система.

Таким образом, одним из предпочтительных воплощений настоящего изобретения может быть предоставлена хроматографическая система, включающая один или более хроматографических твердых носителей, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, и по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата, где по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

Предпочтительно по меньшей мере один выпускной конец, кроме того, что он соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата, также может быть соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним сборным резервуаром, в который поступает собираемая фракция.

Сборный резервуар может быть соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одной системой фильтрации для извлечения по меньшей мере части буфера элюирования из анализа.

Предпочтительно, система фильтрации включает по меньшей мере одну систему ультрафильтрации (УФ-систему); одну или более систем микрофильтрации (МФ-систему), одну или более систем нанофильтрации (НФ-систему), одну или более систем диафильтрации (ДФ-систему) или их комбинацию.

В одном из воплощений настоящего изобретения по меньшей мере одна система фильтрации находится в гидравлическом контакте с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя, таким образом образуя рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к хроматографической системе, которая по существу состоит из одного или более хроматографических твердых носителей, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, и по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата и по меньшей мере одним

сборным резервуаром для поступления собираемой фракции, где по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя, и где сборный резервуар может быть соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одной системой фильтрации для извлечения по меньшей мере части буфера элюирования из анализа, и указанная по меньшей мере одна система фильтрации соединена гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к хроматографической системе, которая по существу состоит из одного или более хроматографических твердых носителей, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, и по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата, где по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

В контексте настоящего изобретения термин “по существу состоящий из” означает ограничение объема пункта формулы изобретения указанными признаками или этапами и теми признаками или этапами, которые не упомянуты и не оказывают существенного влияния на основную и новую характеристику (характеристики) заявляемого изобретения.

В контексте настоящего изобретения термин “гидравлическое соединение” относится к соединению, по которому может перемещаться жидкость.

Предпочтительно, рециркуляционная система снабжена клапаном, который может обеспечивать открытый доступ из резервуара для элюата в резервуар для буфера или в по меньшей мере один впускной конец хроматографического твердого носителя.

В одном из воплощений настоящего изобретения рециркуляционная система снабжена насосом, который может направлять фракцию элюата из резервуара для элюата в резервуар для буфера и/или в по меньшей мере один впускной конец хроматографического твердого носителя.

В одном из воплощений настоящего изобретения хроматографическая система включает резервуар для буфера элюирования, соединенный гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

В другом воплощении настоящего изобретения один или более хроматографический твердый носитель может представлять собой единственный хроматографический твердый носитель.

Рециркуляционная система, предоставляемая настоящим изобретением, подходит для применения в комбинации с уплотненным слоем хроматографического твердого носителя и с псевдооживленным слоем хроматографического твердого носителя или с разрыхленным слоем хроматографического твердого носителя (APC). Предпочтительно, хроматографический твердый носитель может представлять собой хроматографический твердый носитель в виде псевдооживленного слоя или хроматографический твердый носитель в виде разрыхленного слоя (APC). Предпочтительнее, хроматографический твердый носитель может представлять собой хроматографический твердый носитель в виде разрыхленного слоя (APC).

В целом, адсорбция в разрыхленном слое хорошо известна специалистам в данной области техники, и способ, описанный в настоящей работе, может быть адаптирован для осуществления способов, описанных в документах WO 92/00799, WO 92/18237, WO 97/17132, WO 00/57982 или WO 98/33572, содержания которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

Наряду со средствами рециркуляции фракции элюата согласно настоящему изобретению, система согласно изобретению может включать несколько хроматографических твердых носителей, которые соединены и сконструированы с возможностью извлечения анализа способом хроматографии с движущимся слоем сорбента или хроматографии с псевдодвижущимся слоем сорбента, как описано выше.

Следует отметить, что воплощения и признаки, описанные в контексте одного из аспектов настоящего изобретения, также относятся к другим аспектам изобретения.

Все патентные и непатентные документы, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Ниже изобретение описано более подробно с помощью приведенных неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Извлечение лактопероксидазы (ЛП) из снятого молока

Были проведены эксперименты по выделению лактопероксидазы непосредственно из снятого молока с помощью хроматографического твердого носителя способом хроматографии с адсорбцией в разрыхленном слое (APC) на адсорбенте XpressLine Pro A, UpFront Chromatography A/S.

Адсорбент включает лиганд на основе ароматической кислоты, который обычно связывает белки в диапазоне рН от 4 до 6, и связанные белки высвобождаются при повышении рН до 9-10 в буфере элюирования.

Эксперименты проводили на колонке с разрыхленным слоем адсорбента ($O=40$ см) при линейной скорости течения 15 см/мин и коэффициенте разрыхления слоя носителя 1,5.

Хроматографический твердый носитель работал в течение трех циклов; на хроматографический твердый носитель загружали: в первом цикле 2000 л снятого молока, во втором цикле – 2800 л снятого молока и в третьем цикле – 3600 л снятого молока.

После загрузки хроматографический твердый носитель промывали деминерализованной водой.

Интересующий аналит, лактопероксидазу, элюировали из смолы 10 мл 20 мН гидроксида натрия.

Содержание белка в каждой фракции определяли стандартным анализом белка, и были получены следующие результаты:

	Соотнесено со стандартным объемом 2000 л (мг/мл)	Величина, нормализованная по первому циклу
Испытание 1		
1 цикл	1,154	1
2 цикла	2,216	1,92
3 цикла	3,420	2,96
Испытание 2		
1 цикл	1,830	1
2 цикла	3,624	1,98

Таким образом, в этом эксперименте было показано существенное повышение концентрации аналита во фракции элюата, происходящее при рециркуляции фракции элюата в буфер элюирования; такое повышение приводит к значительному снижению потребности в площадях, к снижению потребления буферных растворов, потребления воды и потребления химических реагентов для БО и/или к уменьшению времени пребывания у мембраны, то есть это позволяет значительно снизить производственные затраты.

Цитируемые документы:

EP 1994972 A1

WO 92/00799 A1

WO 92/18237 A1

WO 97/17132 A1

WO 00/57982 A1

WO 98/33572 A1

WO 2010/03776

EP 0538350

WO 97/17132

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит,

где по меньшей мере часть фракции элюата, включающей аналит, полученной в этапе (iv), направляют рециклом через по меньшей мере один хроматографический твердый носитель.

2. Способ по п. 1, где фракцию элюата разделяют на рециркулируемую фракцию и собираемую фракцию.

3. Способ по п. 2, где концентрация аналита во фракции элюата определяет долю фракции элюата, которую направляют в собираемую фракцию, и долю фракции элюата, которую направляют в рециркулируемую фракцию.

4. Способ по п. 3, где концентрацию аналита во фракции элюата определяют с помощью поточного датчика.

5. Способ по любому из предшествующих пп., где способ извлечения аналита включает применение двух хроматографических твердых носителей.

6. Способ извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает этапы:

(i) предоставление по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя, где по меньшей мере один хроматографический твердый носитель включает лиганд, который способен связывать аналит, находящийся в жидкостной смеси;

(ii) загрузку первой части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(iii) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(iv) добавление первого буфера элюирования к по меньшей мере одному хроматографическому твердому носителю с получением фракции элюата, включающей аналит;

(v) загрузку второй (или следующей) части жидкостной смеси на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель;

(vi) необязательно осуществление этапа промывки по меньшей мере одного хроматографического твердого носителя; и

(vii) добавление второго (или следующего) буфера элюирования на по меньшей мере один хроматографический твердый носитель с получением в второй (или следующей) фракции элюата, включающей аналит;

(viii) необязательное повторение этапов (v) – (vii),

где второй (и следующий) буфер элюирования, добавляемый в этапе (vii), включает по меньшей мере часть предыдущей фракции элюата, включающей аналит.

7. Способ извлечения аналита из жидкостной смеси, где указанный способ включает хроматографическое извлечение аналита из жидкостной смеси посредством элюирования аналита, связанного с лигандом, находящимся в одном или более хроматографических твердых носителях, буфером элюирования с получением фракции элюата, включающей аналит, где по меньшей мере часть фракции элюата используют в качестве буфера элюирования.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где буфер элюирования, включающий по меньшей мере часть фракции элюата, включает по меньшей мере 0,01 мг/мл аналита, например, по меньшей мере 0,05 мг/мл, например, по меньшей мере 0,1 мг/мл, например, по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 0,75 мг/мл, например, по меньшей мере 1,0 мг/мл, например, по меньшей мере 1,5 мг/мл, например, по меньшей мере 2,0 мг/мл, например, по меньшей мере 2,2 мг/мл, например, по меньшей мере 2,4 мг/мл, например, по меньшей мере 2,5 мг/мл, например, по меньшей мере 3,0

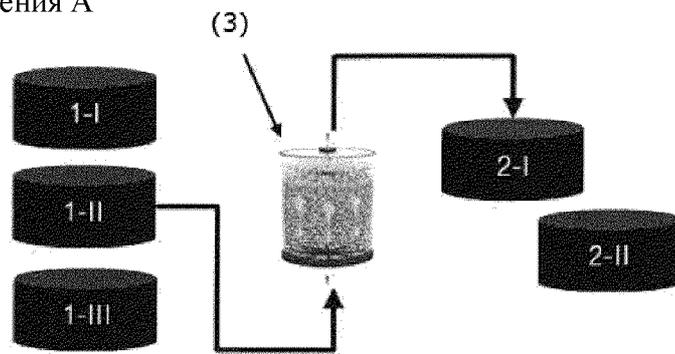
мг/мл, например, по меньшей мере 4,0 мг/мл, например, по меньшей мере 5,0 мг/мл, например, по меньшей мере 6,0 мг/мл, например, по меньшей мере 7,0 мг/мл, например, по меньшей мере 8,0 мг/мл, например, по меньшей мере 9,0 мг/мл, например, по меньшей мере 10,0 мг/мл.

9. Хроматографическая система, включающая один или более хроматографических твердых носителей, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата, и по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

10. Хроматографическая система, которая по существу состоит из одного или более хроматографических твердых носителей, где один или более хроматографический твердый носитель имеет по меньшей мере один впускной конец и по меньшей мере один выпускной конец, и по меньшей мере один выпускной конец соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одним резервуаром для элюата и по меньшей мере одним сборным резервуаром для поступления собираемой фракции, где по меньшей мере один резервуар для элюата включает рециркуляционную систему, соединенную гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя, и где сборный резервуар может быть соединен гидравлическим соединением с по меньшей мере одной системой мембран для извлечения по меньшей мере части буфера элюирования из анализа, и указанная по меньшей мере одна система мембран соединена гидравлическим соединением с по меньшей мере одним впускным концом одного или более хроматографического твердого носителя.

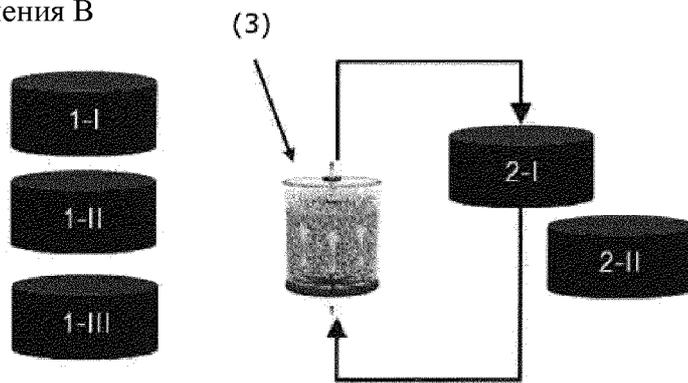
1/5

Вариант осуществления А



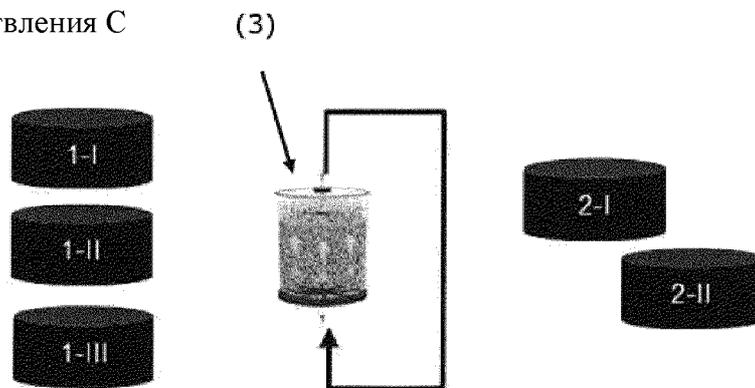
Фиг. 1А

Вариант осуществления В



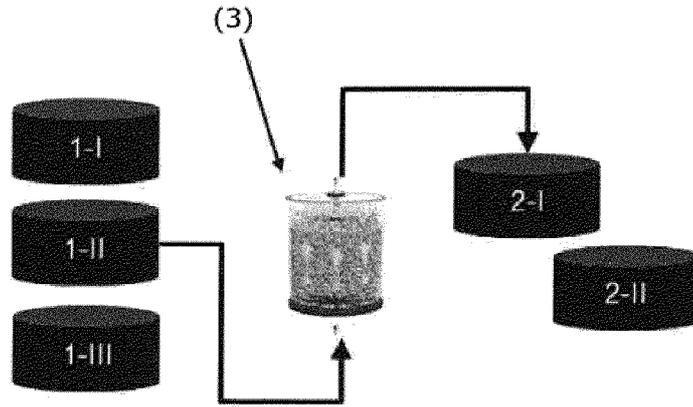
Фиг. 1В

Вариант осуществления С



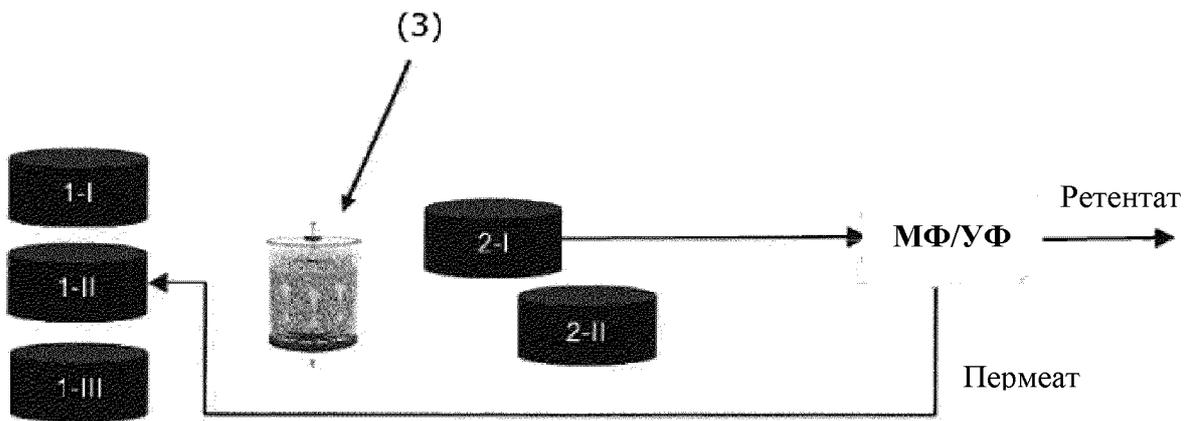
Фиг. 1С

Вариант осуществления D

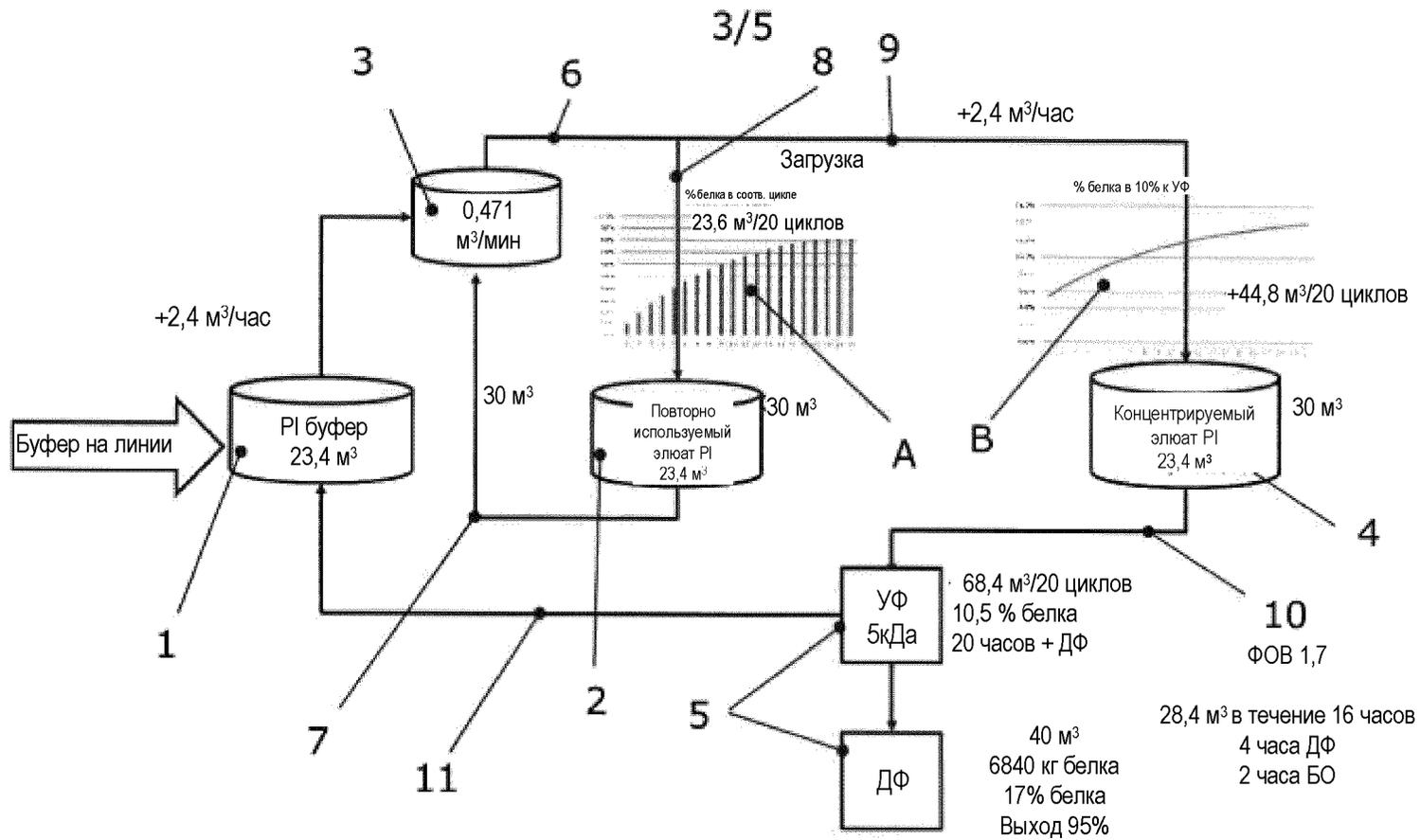


Фиг. 1D

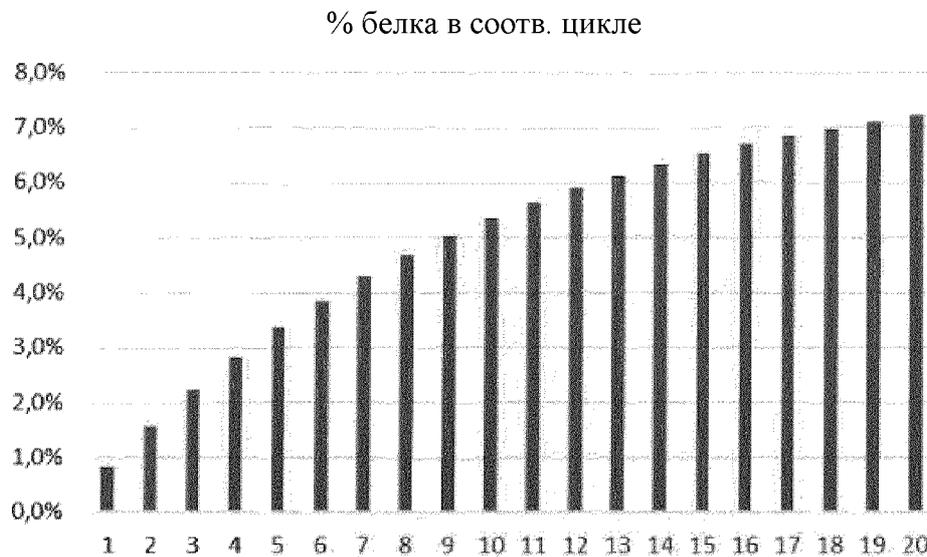
Вариант осуществления E



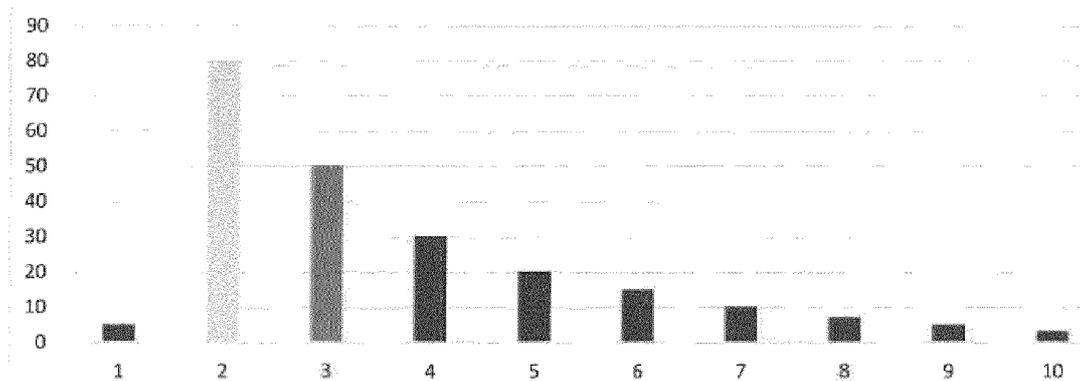
Фиг. 1E



Фиг. 2

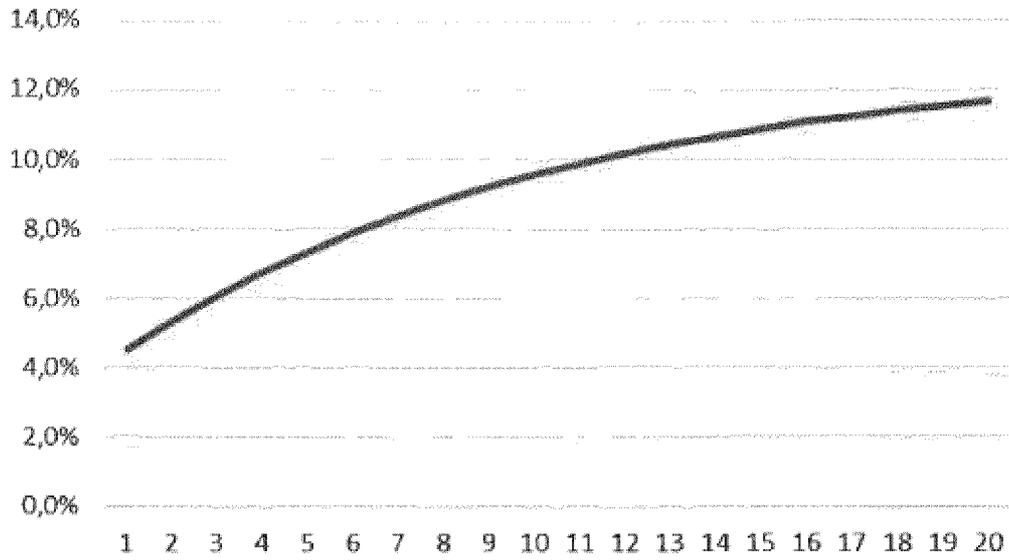


Фиг. 3



Фиг. 4

% белка в 10% к УФ



Фиг. 5