

**VERFAHREN ZUM REINIGEN UND ANREICHERN VON PROTEINEN,
NUKLEINSÄUREN ODER VIREN UNTER VERWENDUNG EINES WÄSSRIGEN ZWEI-PHASEN-
SYSTEMS**

5

HINTERGRUND DER ERFINDUNG**TECHNISCHES GEBIET**

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Reinigen und Anreichern von Immunglobulinen oder anderen Proteinen; oder Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA oder anderen Nukleinsäuren; oder Viren unter Verwendung eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems.

STAND DER TECHNIK

15

Biomoleküle, wie Proteine, haben wachsende Bedeutung in einer Vielzahl von Anwendungen, beispielsweise als Medikamente, Diagnostika, Zusatzstoffe in Nahrungsmitteln, Waschmitteln, als Forschungsreagenzien und dergleichen. Die Gewinnung aus natürlichen Quellen reicht nicht aus, so dass biotechnologische Produktionsmethoden eingesetzt werden. Hierbei ist regelmäßig die Aufarbeitung
20 und Reinigung des erhaltenen Proteins erforderlich.

- Für Proteine, die in Biopharmazeutika zum Einsatz kommen, wie z.B. therapeutische Antikörper, ist nicht nur die Produktausbeute, sondern auch die Abtrennung von Verunreinigungen wichtig. Es gibt hierbei prozessabhängige Verunreinigungen, wie Wirtszellen, Komponenten der Wirtszellen, z.B. Proteine (Wirtszellproteine, „Host cell proteins“, HCP) und Nukleinsäuren, die aus der Zellkultur selbst
25 oder aus der Aufarbeitung resultieren, wie etwa Salze oder abgelöste Chromatographie-Liganden. Zudem können produktabhängige Verunreinigungen vorliegen, wie beispielsweise molekulare Varianten des Produkts mit abweichenden Eigenschaften, z.B. verkürzte Formen, Vorläufer, hydrolytische Abbauprodukte, oder modifizierte Formen, wie Polymere und Aggregate. Weitere Verunreinigungen
30 sind Kontaminanten, d.h. Materialien chemischer, biochemischer oder mikrobiologischer Natur, die in unerwünschter Weise in der Zellkultur vorliegen.

- Verunreinigungen in Biopharmazeutika sind nicht akzeptabel, da diese unerwünschte Nebenwirkungen bewirken können, wie allergische Reaktionen oder unerwünschte Immunreaktionen, die sogar bis
35 zu einem lebensbedrohenden anaphylaktischen Schock führen könnten. Daher besteht ein Bedarf an geeigneten Reinigungsverfahren, mit denen die unerwünschten Verunreinigungen auf ein unbedenkliches Mindestmaß reduziert werden können.

- Die monoklonale Antikörperherstellung, wie diese aktuell im Stand der Technik beschrieben wird, basiert auf einem sogenannten Batch-Plattform-Verfahren [1,2]. Dieses Verfahren gliedert sich in die vor- und nachgelagerte Verarbeitung (engl. up- and downstream processing). Die Herstellung des rekomb-

binanten Zielproteins basiert auf der Zellkultivierung in Bioreaktoren während der Upstream-Verarbeitung. Ziel der anschließenden Weiterverarbeitung ist es, die Zielproteine von den Nebenkomponten, wie Wirtszellproteinen (HCPs), Wirtszell-DNA, Medienkomponenten, Viren und Endotoxinen, unter Verwendung verschiedener Unit-Operationen, wie Zentrifugation, Filtration und Chromatographie, zu isolieren.

Dieser Plattformprozess umfasst die Fed-Batch-Suspensionskultivierung von Säugetierzellen in Bioreaktoren bis zu einem Volumen von 20.000 L, Zentrifugation und Tiefenfiltration als Zellernte, Protein-A-Affinitätschromatographie als Capture (Auftrennungsschritt), Kationenaustauschchromatographie (CIEX) als Zwischenreinigung und hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) als Feinstreinigungsschritt. Zusätzlich werden orthogonale Virusinaktivierungsschritte mit niedrigem pH-Wert und Virusfiltration zur Minimierung der Immunogenität durchgeführt. Im Anschluss an die Protein-A-Affinitäts-Chromatographie und aufgrund des niedrigen pH-Werts zur Virusinaktivierung muss eine Diafiltration durchgeführt werden, um die folgende CIEX zu laden.

Mit Blick auf die etablierten Plattformprozesse stoßen die chromatographischen Schritte jedoch aufgrund steigender Produktkonzentrationen durch vorgeschaltete Prozessoptimierung (d.h. Cell Engineering, Medien- und Prozessparameteroptimierung) an ihre Kapazitätsgrenze. Diese Einschränkung ist allgemein als Downstream-Engpass (engl. bottleneck) bekannt. Mit zunehmender Produktkonzentration sinken die spezifischen Kosten (€/kg) der vor- und nachgelagerten Verarbeitung. Mit höheren Produktkonzentrationen erreicht der plattformabgewandte Prozess jedoch sein Effizienzoptimum. Eine noch stärkere Erhöhung der Produktkonzentration führt zu einer deutlichen Verlagerung der Herstellungskosten (COGs, Cost of goods) von der vorgelagerten zur nachgelagerten Verarbeitung.

Es besteht daher ein Bedarf für ein geeignetes Reinigungsverfahren, das in einfacher Weise und möglichst wirtschaftlich durchführbar ist.

Der aktuelle Stand der Plasmid-DNA (pDNA)-Herstellung basiert ebenfalls auf einem Batchplattformprozess. Während der Fermentation wird die pDNA intrazellulär im E.coli-System produziert. In der Regel erfolgt zur Ernte eine Zentrifugation der Fermentationslösung. Die so gewonnene nasse Zellmasse (engl. Wet cell paste, WCP) wird im Lyseverfahren zunächst resuspendiert, anschließend mit einer alkalischen Lösung aufgeschlossen und durch Zugabe eines Kaliumacetat-Puffersystems neutralisiert. Im Neutralisationsschritt kommt es zur Ausflockung von Proteinen und anderer Nebenkomponten, unterstützt durch das verwendete Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Das Neutralisat wird in einem Auffangbehälter gesammelt. Dort werden die entstandenen Flocken teils durch Flotation abgetrennt und am Apparateboden die Lösung durch mehrere Festbettschichten abgezogen und grob geklärt. Weitere Schritte in der Aufarbeitung umfassen eine Diafiltration, Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration, eine Fällung durch Ammoniumsulfat oder andere Salze und zwei oder mehr Chromatographie-Schritte [3]. Im derzeitigen Verfahren ist der Downstream-Engpass das Auffanggefäß des Neutralisats. Bei einer Durchsatzerhöhung und/oder Maßstabsvergrößerung sind die Trennung

und Klärung des Neutralisats durch die hohe Biomassebelastung und gleichzeitige Flockenbildung bei den anfallenden hohen Volumina schwierig.

Es besteht daher auch in diesem Fall ein Bedarf für ein geeignetes Reinigungsverfahren. Da die Stabilität der pDNA während dieser ersten Prozessschritte, wie oben beschrieben, noch gering ist, wäre eine robuste, zeitnahe und einfache Isolierung der pDNA erwünscht sowie eine verbesserte Abtrennung von Verunreinigungen, was die pDNA stabilisiert.

Es entstehen auch bei der pDNA -Herstellung prozessabhängige Verunreinigungen, wie Wirtszellen, Komponenten der Wirtszellen, z.B. Proteine (Wirtszellproteine, „Host cell proteins“, HCP), Nukleinsäuren, wie RNA und genomische DNA, Endotoxine, Membranbruchstücke und dergleichen, die von der Wirtszelle selbst stammen und in der Fermentation oder beim alkalischen Aufschluss freigesetzt werden. Aus der Aufarbeitung resultieren etwa Salze oder abgelöste Chromatographie-Liganden oder für die Aufarbeitung nötige zugesetzte Substanzen, wie Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Zudem können produktabhängige Verunreinigungen, wie Isoformen, Topoisomere und Oligomere der pDNA mit abweichenden Eigenschaften vorliegen. Weitere Verunreinigungen sind Kontaminanten, d.h. Materialien chemischer, biochemischer oder mikrobiologischer Natur, die in unerwünschter Weise in der Fermentationsbrühe vorliegen. Auch die Produktion von Viren für die Gen- und Zelltherapie wird, wie die vorherigen Prozesse, in ein Upstream- und ein Downstream-Verfahren unterteilt. Das Upstream-Verfahren umfasst die Kultivierung der für die Produktion verantwortlichen Zellen sowie die hierfür notwendige Transfektion. Der Großteil der heutzutage produzierten Viren lassen sich der Gruppe der Adenoviren (durchschnittlich 90 nm groß, nicht umhüllt), der Adeno-assoziierten Viren (durchschnittlich 20 nm groß, nicht umhüllt) und der Retro- und Lentiviren (durchschnittlich 90-120 nm groß, umhüllt) zuordnen. Das Vorhandensein einer zusätzlichen Lipidhülle bei den Retro- und Lentiviren bedingt eine geringere Stabilität, wodurch die Gesamtausbeute nach Aufreinigung um bis zu 70% sinken kann. Das Downstream-Verfahren umfasst die Schritte der Zellernte und Zellyse im Falle eines nicht-sekretierten Produkts. Auch bei Sekretion wird häufig eine Zellyse durchgeführt, um nicht sekretiertes Produkt freizulegen und die Gesamtausbeute so zu maximieren. Im Anschluss dieser Schritte liegt der Virus neben einer Vielzahl von Verunreinigungen vor. Neben Medienkomponenten aus der Zellkultur, liegen meist signifikante Mengen des für die Transfektion genutzten Vektors (meist pDNA) vor. Im Falle einer Zellyse werden ebenso intrazelluläre Bestandteile freigesetzt, wie genomische DNA und Wirtszellproteine. Um das Produkt möglichst schnell zu stabilisieren und von einem Großteil der NebenkompONENTEN zu isolieren, bietet sich analog den Ausführungen zum pDNA-Prozess eine Kombination aus Zellernte-/lyse und wässriger Zweiphasenextraktion an. Hierdurch kann auch der ansonsten meist notwendige Schritt einer zeitaufwendigen und schwer skalierbaren Dichtegradientenzentrifugation ersetzt werden. Die weiteren Schritte der Aufreinigung bis zum finalen Produkt, umfassen beispielweise Dia- und Ultrafiltrationen zum Puffertausch und zur Konzentrationserhöhung, sowie Chromatographien (Größenausschluss, Affinität, Ionenaustausch, Hydrophobizität) [4]. Es besteht daher auch in diesem Fall ein Bedarf für ein geeignetes Reinigungsverfahren.

Eine bekannte Alternative zu den erwähnten adsorptions- und filtrationsbasierten Techniken ist die schonende Extraktion von Biomolekülen, wie Proteinen, Nukleinsäuren, Zellen, etc., mittels wässriger Zwei-Phasen-Extraktion (engl. Aqueous Two Phase Extraction, ATPE) [3].

- 5 Unter einem wässrigen Zwei-Phasen-System (ATPS, Aqueous Two Phase System), hier auch kurz als Zwei-Phasen-System bezeichnet, versteht man eine wässrige Lösung mit zum Beispiel zwei unmischbaren Polymeren oder einem Polymer und einem anorganischen oder organischen Salz. Nach der Mischung der genannten Komponenten kommt es zur Ausbildung von zwei Phasen im System. Aufgrund unterschiedlicher biophysikalischer Eigenschaften der Phasen, kann man erreichen, dass eine
- 10 Verteilung der Biomoleküle in eine der beiden Phasen erfolgt. Das Aufkonzentrieren und Aufreinigen des Zielmoleküls kann so in einem Prozessschritt erreicht werden. Für eine höhere Reinheit des Zielmoleküls können auch mehrstufige ATPS-Extraktionen durchgeführt werden.

Die Bildung eines ATPS (wässriges Zwei-Phasen-System) wird daher durch die Kombination bestimmter phasenbildender Komponenten in geeigneten Konzentrationen erreicht. Bekannte Systeme werden auf Basis folgender Kombinationen erhalten:

- Polymer/Polymer
- Polymer/Salz
- Alkohol/Salz
- 20 - Ionische Flüssigkeiten.

Für biotechnologische Verwendungen sind insbesondere die Zwei-Phasen-Systeme (ATPS) von Polymer/Salz von Interesse. Als Polymer werden häufig Polyethylenglykole (PEG) mit Molmassen zwischen 200 und 4000 g/mol verwendet. Häufig verwendete Salze sind beispielweise Natrium- und Kaliumphosphate und -citrate. Das Anion ist gegenüber dem Kation dominierend verantwortlich für die Phasenbildung und die Stoffeigenschaften. Ein Polymer, wie PEG, reichert sich in der oberen leichten Phase an und das oder die Salze reichern sich in der unteren schweren Phase an. Die Mischungslücke wird mit zunehmendem Molgewicht des Polymers größer. Ein Teil der Prozessentwicklung ist, das optimale System für die vorgegebene Prozessaufgabe zu identifizieren.

30 Im Prinzip dient das wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS) daher dazu, ein Biomolekül dadurch zu reinigen oder anzureichern, dass nach dem Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) das Biomolekül sich in einer der beiden wässrigen Phasen anreichert, insbesondere sich dort im Wesentlichen befindet, und die unerwünschten Verunreinigungen sich in der anderen Phase, der

35 Gegenphase, anreichern, insbesondere sich dort im Wesentlichen befinden, so dass durch Abtrennen der die Verunreinigungen enthaltenden Gegenphase das Biomolekül mit einem deutlich reduzierten Anteil oder auf ein Minimum herabgesetzten Anteil an Verunreinigungen in einer Phase erhalten wird.

Beim wässrigen Zwei-Phasen-System (ATPS) ist zu beachten, dass sich die Phasen langsamer trennen als übliche wässrig/organische Systeme und durch die niedrigen Grenzflächenspannungen und Dichtedifferenzen leicht Emulsionen erzeugt werden [5]. Auch die teilweise hohen Viskositäten (bis 40

mPas) von Polyethylenglykol-(PEG)-reichen Phasen, die langsameren Stofftransfer und schlechtes Absetzverhalten bewirken, erschweren eine Prozessvorhersage.

In allen Vorrichtungen zur Flüssig-Flüssig-Extraktion tritt ein Phasenkontakt auf, wenn eine Phase in der anderen dispergiert vorliegt. Hierbei kann jede der beiden Phasen in der anderen dispergiert sein. Dieser Phasenkontakt ermöglicht den Stoffaustausch, der in einer oder mehreren Stufen durchgeführt werden kann. Die Trennung der Phasen erfolgt üblicherweise in einem Abscheider oder einem Mischer-Abscheider. Einstufige Mischer-Abscheider werden in der Regel im einstufigen Betrieb eingesetzt, während mehrere in Reihe geschaltete Mischer-Abscheider auch in sogenannten Batterien im Gegenstrom- oder Kreuzstrombetrieb arbeiten können. Die gebräuchlichsten Extraktionsgeräte, die im Gegenstrommodus arbeiten, sind Kolonnen. Bei flüssigen Phasen mit extrem geringem Dichteunterschied reicht das Erdschwerefeld allein nicht aus, um die Phasen in einer angemessenen Zeit zu trennen. Dann werden Zentrifugen eingesetzt, die die Flüssig-Flüssig-Trennung durch die Anwendung von Zentrifugalkraft durch Drehung der Zentrifugentrommel beschleunigen. Diese ermöglichen auch die Trennung von Gemischen mit extrem geringer Dichtedifferenz ($\Delta\rho$ kleiner als 30 g/m³) in akzeptabler Zeit [6].

Ein bekanntes Verfahren zur selektiven Reinigung und Anreicherung von Immunglobulinen oder anderen Proteinen mittels eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Anwendung von Zentrifugalkraft ist beispielweise aus der WO 2014/135420 A1 [7] bekannt. Das Verfahren umfasst gemäß einer Ausführungsform folgende Schritte:

- a. Bereitstellen einer Zellkultur oder eines Zellkulturüberstandes, die das Zielprotein enthält;
- b. Überführung der Zellkultur oder des Zellkulturüberstandes in ein wässriges Zwei-Phasen-System durch Zugabe eines Polymers und mindestens eines Salzes, oder zweier Polymere in geeigneter Konzentration;
- c. Durchmischung des Zweiphasensystems zur Erzeugung einer Dispersion;
- d. Abtrennung von schwerer und leichter Phase in einem Zentrifugalextraktor;
- e. Gewinnung des Zielproteins aus der leichten Phase.

Die Trennung unter Verwendung einer Zentrifuge ist nachteilig, da große Behälter verwendet werden müssen und viel Lösungsmittel eingesetzt werden muss, was hinsichtlich der schlechteren Handhabbarkeit als auch wirtschaftlicher Gesichtspunkte nachteilig ist. Im Gegensatz zur Offenbarung der WO 2014/135420 A1 [7] ist es für das Verfahren der vorliegenden Erfindung nicht erforderlich, einen Zentrifugalextraktor einzusetzen.

Ein Verfahren zur selektiven Reinigung und Anreicherung von Plasmid-DNA mittels eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems ist beispielweise aus Frerix, A. et al. [8] bekannt geworden. Das Verfahren ist folgendermaßen charakterisiert:

- Die alkalische Zellyse, die Ausfällung nach Neutralisation sowie die Extraktion mittels Zwei-Phasen-System (ATPS) mit gleichzeitiger Klärung des Lysates findet in einem Tank statt (one pot approach);
- Zwei-Phasen-System (ATPS), bestehend aus: PEG/Salz (Kaliumphosphat und Kalium-Citrat);
- 5 • Starke Anreicherung der Plasmid-DNA in der schweren Phase (bottom phase);
- Genomische DNA, RNA in der leichten Phase (top phase) und/oder der Zwischenphase (interphase).

Um eine wässrige Zwei-Phasen-Extraktion, wie in der vorliegenden Erfindung, als Zellernteverfahren einsetzen zu können, ist es erforderlich, dass die Messtechnik die Anforderungen an eine Detektion einer Phasengrenzfläche oder eine zusätzlich gebildete Zwischenphase erfüllt. Bereits eine Detektion der beiden Phasen stellt ein Problem dar, da diese ähnliche Eigenschaften besitzen. Ein zusätzliches Problem ergibt sich bei Bildung einer Zwischenphase, die eine Emulsionsschicht aus Zellen, Agglomeraten und Biopartikeln darstellt, die die Messtechnik verschmutzen oder die Messungen beeinflussen können.

Bei einer Phasengrenzfläche handelt es sich um die Grenze zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten. Die Flüssigkeiten lagern sich dabei aufgrund von Dichteunterschieden übereinander ab. Aus den beiden nicht mischbaren Phasen kann sich auch eine zusätzliche Zwischenphase, d.h. eine dritte Phase, bilden, so dass dann zwei Phasengrenzflächen vorliegen. Eine Erfassung der Phasengrenzfläche(n) oder Zwischenphase ist dann sinnvoll, wenn man nur eine der beiden Hauptphasen abziehen möchte, wenn beispielsweise das Zielmolekül nur in einer Phase vorliegt. Typischerweise sind die Phasengrenzfläche(n) oder die Zwischenphase in den zur Abtrennung eingesetzten transparenten Abscheidern erkennbar. Das genaue Erfassen dieser Phasengrenzfläche(n) oder Zwischenphase ist dabei essentiell für einen reibungslosen Ablauf der Trennung. Zum einen wird gewährleistet, dass sich die Qualität des Produkts nicht ändert und zum anderen wird die Prozesseffizienz gesteigert, indem Abschaltungen weniger häufig stattfinden müssen und die Kapazität der Anlagen voll genutzt werden kann. Optimal für eine exakte Trennung wäre es, ein genaues Profil der Phasen über die Höhe (Position der leichten Phase, der schweren Phase, der Zwischenphase und der Phasengrenzfläche(n)) insbesondere an kritischen Stellen, bereitzustellen, um dem Anwender genaue Informationen für die Trennung zu geben.

Für die Phasengrenzflächen-Detektion sind zahlreiche Messgeräte auf dem Markt erhältlich. Diese lassen sich nach ihren allgemeinen Messprinzipien und nach dem Modus der Messung einteilen: Dies sind mechanisch/optische Messgeräte (bspw. Schwimmschalter, Sichtgläser, Verdränger), elektromechanische Messgeräte (bspw. magnetorestriktive oder kapazitive Detektoren), elektronische Messgeräte mit Phasenkontakt (bspw. Radar, Differenzdruck, Ultraschall) oder elektronische Messgeräte ohne Phasenkontakt (bspw. nukleare Messung). Einige dieser sollen nachfolgend kurz erläutert und deren Nachteile beschrieben werden:

40

- Bei einem Schwimmschalter handelt es sich um eine mechanisch/optische Messmethode, die mithilfe der Auftriebskraft Füllstände messen kann, die aber auch verwendet werden kann, um Zwischenschichten zwischen zwei Phasen zu erkennen. Das Gewicht des Schalters muss hierbei an die schwerere Flüssigkeit angepasst werden. Da es sich bei dem Schalter um ein passives Teil handelt, besitzt dieser keinen Mechanismus zur Selbstkontrolle, wodurch regelmäßige Kontrollen notwendig sind. Der Schalter wird zudem durch Feststoffe oder zu viskose Flüssigkeiten in seiner Funktionsweise beeinträchtigt.
- Ein Sichtglas als mechanisch/optisches Messgerät kann verwendet werden, um den Flüssigkeitsstand kontinuierlich zu messen, wobei auch eine Erfassung der Phasengrenzfläche zwischen zwei Flüssigkeiten möglich ist. Das Sichtglas ist mit dem Tank verbunden, so dass bei einer zu weiten Verschiebung der Zwischenschicht, diese vom Sichtglas nicht mehr erfasst wird. Feststoffe können das Glas verschmutzen, wodurch eine visuelle Erkennung nicht mehr möglich ist.
- Ein weiteres mechanisch/optisches Messgerät ist ein Verdränger-Füllstandsmessgerät, das in die Flüssigkeit gegeben wird und je nach Flüssigkeitsstand eine Auftriebskraft erfährt. In einer einfachen Ausführung wird ein Verdränger (Displacer) beispielsweise mit einer Feder verbunden. Jedoch hängt das Messergebnis stark von der Kalibrierung bei Prozessbedingungen ab und eine Ansammlung von Feststoffen kann zur Verfälschung der Messung führen.
- Bei einem magnetorestriktiven Messgerät, das ein elektromechanisches Messverfahren einsetzt, wird die Interaktion zwischen zwei Magneten gemessen. Ein Magnet ist im Schwimmer, der andere in einem Führungsrohr. Der Schwimmer kann sich in seiner Kammer frei nach oben und unten bewegen, sobald der Füllstand sich ändert. Ein kleiner Stromimpuls erreicht das Magnetfeld des Schwimmers, wodurch der Schwimmer sich dreht und eine Schallwelle emittiert wird, die gemessen werden kann. Meistens ist außen an die Kammer ein Indikator montiert, damit man sehen kann, wo der Schwimmer ist. Da die Position des Schwimmers detektiert wird, führen Dichteänderungen zu Fehlern. Weiterhin können Feststoffe dazu führen, dass der Schwimmer stecken bleibt.
- Ein anderes Messgerät verwendet ein elektromechanisches Verfahren zur kapazitiven Messung, bei dem eine Elektrode im Tank montiert wird. Als zweite Elektrode wird eine Tankwand verwendet oder eine Referenzelektrode. Erhöht sich der Flüssigkeitsstand so ändert sich das Material zwischen den beiden Elektroden, so dass sich die Kapazität des Kondensators verändert. Nachteile dieses Messsystems sind, dass Veränderungen der Dielektrizitätszahl des Mediums zu Fehlern führen. Bei Tanks mit nicht leitenden Materialien muss zusätzlich eine Referenzelektrode installiert werden, wodurch die Kalibrierung schwierig ist. Weiterhin muss die Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeiten bei einer Zwischenschicht-Messung groß genug sein, um diese zu erfassen und das obere Medium darf bei einigen Messeinrichtungen nicht leitfähig sein.
- Bei elektronischen Messgeräten mit Phasenkontakt, die auf geführtem Radar basieren, wird ein hochfrequenter Radarimpuls einer Sonde entlang geführt. Wenn der Impuls auf eine Medienoberfläche

trifft, wird ein Teil der Impulse zurückgesendet und vom Gerät erfasst und ausgewertet. Die Zeit die zwischen Senden und Empfangen vergeht, ist ein direktes Maß für die Höhe der Flüssigkeit. Problematisch an diesem Messverfahren ist, dass das Medium mit der geringeren Dielektrizitätskonstante, die sich nicht verändern darf und einen Wert unter 10 haben soll, oben sein muss; die Dielektrizitätskonstanten beider Phasen müssen einen erfassbaren Unterschied haben, die obere Schicht muss

5 dick genug sein, um erfasst werden zu können und eine vorhandene Emulsionsschicht kann zu Messfehlern führen.

Als elektronische Messgeräte mit Phasenkontakt sind auch Differenzdrucksensoren bekannt, die eine

10 Zwischenschicht zwischen zwei Phasen mit unterschiedlicher Dichte messen können. Der Druckunterschied ist ein direktes Maß für den Füllstand. Um eine Zwischenschicht zu erfassen, muss der Füllstand eine bestimmte Höhe aufweisen. Der Druckunterschied muss zudem groß genug sein, was entweder durch einen hohen Dichteunterschied oder einen großen apparativen Aufbau erreicht wird. Dichteänderungen und eine Temperaturabhängigkeit der Dichte der Flüssigkeiten führen zu Fehlern.

15 Weitere elektronische Messgeräte mit Phasenkontakt arbeiten mit Ultraschall, wobei Ultraschallwellen in den Tank emittiert werden. Dieses Signal wird von Flüssigkeiten zurückgesendet, wodurch aufgrund des Zeitunterschieds eine Ermittlung der Füllstandhöhe und auch eine Zwischenschicht-Erfassung möglich ist. Feststoffe in der Flüssigkeit führen jedoch dazu, dass die Ultraschallwellen gestreut werden, wodurch das detektierte Signal abnimmt. Die Detektierbarkeit hängt dabei stark von den Eigenschaften der Feststoffe ab, da bei zu hohen Anteilen, das Signal vollständig verschwinden kann. Weiterhin sind Gase, die in der Flüssigkeit eingefangen sind, ein Problem, da diese das Signal ebenfalls abschwächen.

20

25 Bekannte elektronische Messgeräte ohne Phasenkontakt basieren auf einer nuklearen Messung, bei der die Schwächung von Gammastrahlung erfasst wird. Dabei ist die Schwächung abhängig von der Dichte des Mediums. Mithilfe dieser Methode lassen sich auch Zwischenschichten erfassen. Allerdings sind die Messeinheiten relativ teuer und erfordern regelmäßige Kontrollen, um die Sicherheit zu garantieren. Weiterhin können zu große Dichteänderungen und Verunreinigungen an der Tankwand

30 zu Fehlern führen.

Die zahlreichen Nachteile der oben geschilderten bekannten Messgeräte zeigen, dass diese eigentlich nicht für die Erfassung von einer oder auch zwei Phasengrenzflächen bei Vorliegen einer Zwischenphase in einem wässrigen Zwei-Phasen-System geeignet sind. Zum Teil sind die üblichen Messtechniken auch gar nicht anwendbar, wie beispielweise eine Detektion durch einen starken Abfall der Kapazität (meistens die organische Phase), die in den wässrigen Zwei-Phasen-Systemen aufgrund des Fehlens einer organischen Phase nicht möglich ist. Auch stoßen diese Messgeräte bei großtechnischer Produktion zum Teil an ihre Grenzen, wobei zum Beispiel bei einem Sichtglas in einem Abscheider aufgrund der großen erforderlichen Durchmesser (DN600 – 1000) trotz der Verwendung

35 eines transparenten Abscheiders aus Glas aufgrund der zunehmenden Trübung kein zuverlässiges Erkennen durch Sichten mehr möglich ist.

40

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass ein geeigneter Parameter zum Unterscheiden der Phasen bei wässrigen Zwei-Phasen-Systemen die elektrische Leitfähigkeit darstellt. Hierzu muss jedoch eine Technik entwickelt und eingesetzt werden, die es ermöglicht, die elektrischen Leitfähigkeiten beider
5 Phasen zuverlässig zu unterscheiden.

Aus dem Stand der Technik gemäß der DE 44 00 397 A1 [9] ist ein Verfahren zum Nachweisen der Anwesenheit einer oder mehrerer Phasen, die neben einer Hauptphase vorliegen, bekannt geworden, wobei das Einleiten der Hauptphase in ein Trenngefäß und dann das Messen der Leitfähigkeit am
10 Boden und/oder an der Spitze des Trenngefäßes erfolgt. Die Messung der Leitfähigkeit wird hierbei erst nach Trennung in die einzelnen Phasen durchgeführt, wobei nur ganz oben und ganz unten im Trenngefäß gemessen wird. Die Messung der Leitfähigkeit dient dabei ausschließlich zum Zwecke des Nachweises, dass mehrere Phasen vorliegen; die Leitfähigkeit wird nicht zur Trennung der Phasen und deren getrennter Entnahme aus einer Trennvorrichtung herangezogen.

15 Die DE 199 23 901 A1 [10] bezieht sich auf ein Verfahren zur kontrollierten Zugabe von Emulsionsbrechern in einen Prozesstank, insbesondere in einen mit Gas, Öl, Wasser und Sand gefüllten Separationstank, wobei mittels eines Sensors mit vertikaler Ortsauflösung eine Emulsionsschicht detektiert und ein Sensorsignal an eine Zufuhrsteuerung geleitet wird, um die Menge an zuzuführendem Emulsionsbrecher in Abhängigkeit des Sensorsignals dosiert zuzugeben. Als Sensoren sind insbesondere
20 kapazitive Füllstandsensoren oder Gammastrahlen-Dichteprofilsensoren geeignet.

Die KR 101 143 889 B1 [11] offenbart einen automatisch verriegelnden fraktionierten Trichter, um die Verarbeitbarkeit zu verbessern, indem ein elektrischer Leitfähigkeitssensor installiert und der Trichter automatisch auf der Grundlage von elektrischen Signalen verriegelt wird. Der Trichter weist ein Aufnahmeteil, einen elektrischen Leitfähigkeitssensor, eine Steuerung und ein Magnetventil auf.
25

Weiterhin wird in der US 3 220 930 A [12] eine Vorrichtung offenbart, in der eine Emulsion von Rohölen durch Zugabe eines chemischen Additivs (sog. Demulgator) gebrochen wird. Diese dient zum
30 Abtrennen des im Rohöl enthaltenen Wassers. Hierzu wird in einem Tank eine wasserhaltige Rohöl-Emulsion mit einem Demulgator versetzt, so dass eine Öl-Phase, eine Öl/Wasser-Zwischenphase und eine Wasser-Phase resultieren, die jeweils verschiedene Dichten und verschiedene elektrische Eigenschaften haben. Der Demulgator ist beispielsweise Tretolite, Nalco 538, Natriumhydroxid, Natriumsilikat oder Mischungen dieser. Eine elektrische Sonde 16 wird an der Grenzfläche zwischen oberer
35 Phase und Zwischenphase eingesetzt und eine Sonde zur Bestimmung der Dichte wird an der Grenzfläche zwischen der Zwischenphase und der unteren Phase platziert. Die elektrische Sonde 16 dient dazu das Ventil 22 zu steuern, mit dem die Zugabemenge des Demulgators kontrolliert wird. Hierbei wird nur zwischen 2 Zuständen unterschieden: Wenn die elektrische Sonde 16 Kontakt mit der Öl/Wasser-Phase hat, fließt Strom, wenn diese Kontakt mit der Öl-Phase hat, dann fließt kein Strom.
40 Die Zugabe eines festen Zusatzstoffs in Form des Demulgators in die Trennapparatur erschwert die Steuerung des Zwei-Phasen-Systems, da die Phasen erst erzeugt und in unterschiedlichem Maße –

je nach Demulgator-Menge – nachgebildet werden. Die Steuerung und Kontrolle gleichzeitig mit einer elektrischen Sonde und einer Dichte-Sonde ist sehr komplex und unübersichtlich. Es liegt kein wässriges Zwei-Phasen-System vor, in dem alle Phasen Wasser als Lösungsmittel aufweisen.

- 5 Die EP 1 059 105 A2 [13] bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren insbesondere zur Abtrennung von Wasser aus einem Lösemittelgemisch aus der Textilreinigung. Es wird eine Kombination aus mindestens einem Schwerkraftabscheider und, stromaufwärts zu diesem, mindestens einem Koaleszenzabscheider vorgesehen, wobei eine Zuleitung des Schwerkraftabscheiders mit dem Auslass des Koaleszenzabscheiders verbunden ist. Im Koaleszenzabscheider, der mit einem offenporigen lösemittelbeständigen Schaum gefüllt ist, wird das Volumen der Wassertröpfchen vergrößert. Im Schwerkraftabscheider ist ein Sensor 10 vorgesehen, der bei Übersteigen eines Höhenmaximums für die mittlere Phase B ein Signal an ein Ventil 12 und eine Pumpe 13 abgibt, um die Lösung wieder zum Koaleszenzabscheider zurückzuführen. Im unteren Teil des Schwerkraftabscheiders ist ein weiterer Sensor 21 vorgesehen. Übersteigt der Flüssigkeitsspiegel der Phase C den Sensor 21, so wird das Ablassventil 20 entsprechend angesteuert. Beide Sensoren dienen zur Leitfähigkeitsmessung oder Trübungsmessung. Es handelt sich um ein klassisches Recyclingverfahren, bei dem ein Abfallprodukt gereinigt wird, das ansonsten entsorgt werden müsste. Das Wasser wird abgetrennt, um das Lösungsmittelgemisch wieder einsetzen zu können. Es handelt sich um ein sehr komplexes Trennverfahren. Es liegt kein wässriges Zwei-Phasen-System vor, in dem alle Phasen Wasser als Lösungsmittel aufweisen.

In der EP 1 762 616 A1 [14] wird ein Verfahren zum Entfernen einzelsträngiger Nukleinsäuren von doppelsträngigen Nukleinsäuren durch die folgenden Schritte beschrieben:

- (a) Zurverfügungstellen eines Gemischs enthaltend vollständig und/oder teilweise doppelsträngige Nukleinsäuren sowie gegebenenfalls einzelsträngige Nukleinsäuren;
- (b) Resuspendieren des unter Punkt (a) genannten Gemischs in einem wässrigen, niedermolaren Puffersystem mit niedriger Ionenstärke und geringer Pufferwirkung;
- (c) Einstellen von Bedingungen in dem Gemisch gemäß Schritt (b), die zu einer reversiblen Denaturierung von einer bestimmten doppelsträngigen Nukleinsäure oder mehrerer bestimmter doppelsträngiger Nukleinsäuren führen, wobei eine andere Nukleinsäure oder mehrere andere Nukleinsäuren irreversibel denaturiert werden;
- (d) weitere Zugabe von Puffer und einer Polymerkomponente zu dem Gemisch gemäß Schritt (c);
- (e) Inkubation des Gemischs gemäß Schritt (d) für einen Zeitraum, der ausreicht, ein wässriges Zwei-Phasensystem mit einer Ober- und einer Unterphase auszubilden; und
- 35 (f) Entfernen der Einzelstrang-Nukleinsäure enthaltenden Ober- sowie Interphase und Auffangen der Doppelstrang-Nukleinsäure aus der Unterphase. Gemäß den Beispielen 1 bis 3 wird stets eine Zentrifugation zur Trennung von Ober- und Unterphase eingesetzt. Für das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird keine Zentrifugation, insbesondere Zentrifugalextraktion, eingesetzt, da diese in nachteiliger Weise das Verfahren unterbricht. Die Trennung unter Verwendung einer Zentrifuge setzt zudem die Verwendung großer Behälter voraus, wobei eine große Menge an Lösungsmittel eingesetzt werden muss. Dies bedeutet eine schlechtere Handhabbarkeit sowie wirtschaftliche Nachteile.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Nachteile aus dem Stand der Technik zu vermeiden und ein Verfahren zum Reinigen und Anreichern von Proteinen, Nukleinsäuren oder Viren unter Verwendung eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems bereitzustellen, das zuverlässig die

5 Detektion der beiden Phasen und deren Übergang in Form der Phasengrenzfläche oder einer optional vorhandenen Zwischenphase (hier auch Zwischenschicht genannt) mit zwei Phasengrenzflächen erlaubt. Das Verfahren soll auch die Trennung der Phasen voneinander ermöglichen, wobei das Zielmolekül in Form eines Proteins, einer Nukleinsäure oder eines Virus in einer Phase angereichert wird. Das Verfahren soll auch kontinuierlich anwendbar sein. Ein großindustrieller Einsatz des Verfahrens

10 soll ebenfalls möglich sein.

Es wurde nun in überraschender Weise festgestellt, dass in einem wässrigen Zwei-Phasen-System die gemessene elektrische Leitfähigkeit in einer Trennvorrichtung dazu dienen kann, die vorhandenen Phasen voneinander zu unterscheiden, so dass die Trennung der Phasen erleichtert wird. Dies ist

15 überraschend, weil im gesamten Stand der Technik stets nur organische Lösungsmittel/Wasser-Systeme in Verbindung mit der Messung der elektrischen Leitfähigkeit zum Einsatz kommen. Dies liegt daran, dass organische Lösungsmittel den elektrischen Strom nicht leiten, so dass nur zwischen 2 Zuständen unterschieden werden muss, um die Phasen zu identifizieren: kein Strom fließt bedeutet ein organisches Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch liegt vor; Strom fließt bedeutet Wasser

20 oder ein Wasser/Lösungsmittel wird gemessen. Erfindungsgemäß liegt demgegenüber jedoch in allen Phasen Wasser als Lösungsmittel vor, so dass es völlig unerwartet ist, dass die Messung der elektrischen Leitfähigkeit als Parameter dienen kann, um auch bei wässrigen Zwei-Phasen-Systemen zwischen den einzelnen Wasserphasen zu unterscheiden. Ein organisches Lösungsmittel liegt in den wässrigen Zwei-Phasen-Systemen der Erfindung regelmäßig nicht vor.

25 Gemäß einer Ausführungsform ermöglicht das Verfahren nicht nur das Bestimmen des Vorhandenseins der beiden Phasen und die Unterscheidung dieser, sondern auch die Ermittlung und Erfassung der genauen Position der Phasengrenzfläche oder einer eventuell vorhandenen Zwischenphase zwischen den zu trennenden Phasen, wodurch die getrennte Entnahme der einzelnen Phasen voneinander deutlich erleichtert und vereinfacht wird. Die vorliegende Erfindung stellt daher ein Verfahren zur leitfähigkeitsbasierten Regelung und Kontrolle der Lage der Phasengrenzfläche(n) zur Verfügung, das zur Phasentrennung und der getrennten Entnahme der Phasen aus einer Trennvorrichtung eingesetzt wird.

35 ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die zuvor geschilderte Aufgabe wird daher erfindungsgemäß gelöst durch Bereitstellen eines Verfahrens zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes, ausgewählt aus

- Immunglobulinen oder anderen Proteinen; oder
- 40 - Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA oder anderen Nukleinsäuren; oder
- Viren,

umfassend die folgenden Schritte:

- a. Bereitstellen einer Ausgangslösung, die das Zielprodukt enthält;
- b. Überführen der Ausgangslösung in ein wässriges Zwei-Phasen-System durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes in geeigneter Konzentration, oder durch
5 Zugabe mindestens zweier Polymere in geeigneter Konzentration;
- c. Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines Stoffaustauschs, so dass sich das Zielprodukt in der leichten oder schweren Phase anreichert;
- d. Entmischen lassen der Phasen in einer Trennvorrichtung in eine leichte Phase, eine schwere Phase und sofern eine Zwischenphase vorhanden ist eine Zwischenphase;
- 10 e. kontinuierliches Messen der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer der Phasen, insbesondere in der leichten und/oder schweren Phase, in der Trennvorrichtung zum Bestimmen der Position der beiden Phasen und der Phasengrenzfläche oder bei Vorliegen einer Zwischenphase der Position der Zwischenphase und der zwei Phasengrenzflächen;
- f. Entnehmen der Phasen aus der Trennvorrichtung anhand der kontinuierlich gemessenen
15 elektrischen Leitfähigkeit mindestens einer der Phasen in Schritt e., insbesondere der leichten und/oder schweren Phase; und
- g. Gewinnen der Phase mit dem Zielprodukt.

20 Die vorliegende Erfindung stellt daher eine Zielprodukthanreicherung und -abtrennung und gleichzeitig eine Abreicherung von Verunreinigungen mit Hilfe eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems zur Verfügung. Bei den Schritten a. bis g. der Erfindung wird vollständig auf den herkömmlichen Einsatz von Separatoren, insbesondere Zentrifugatoren, Filtration und Chromatographie verzichtet.

25 Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes verwendet, wobei als Ausgangslösung eine Zellkultur, ein Zellüberstand oder ein Zellysat verwendet wird, worin das Zielprodukt enthalten ist. In diesem Fall dient das Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Zellernte und/oder der Isolation des Zielproduktes aus den Zellen, der Zellkultur und/oder dem Zellysat. Das erfindungsgemäße Verfahren kann daher sowohl zum Abtrennen der Zellen eingesetzt werden als auch dafür, das von den Zellen erzeugte Produkt aufzuarbeiten, wobei
30 die Zellen bereits abgetrennt wurden. D.h. die Zellen können entweder bereits vorher entfernt werden, oder erst während des vorliegenden Verfahrens.

Anstelle oder zusätzlich zur elektrischen Leitfähigkeit kann auch die Trübung gemessen werden.

35 Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens der Erfindung, umfassend
eine Trennvorrichtung zum Trennen der Phasen;
mindestens einen Auslass in der Trennvorrichtung;
mindestens eine Sonde zum Messen der elektrischen Leitfähigkeit und/oder mindestens eine Sonde
40 zum Messen der Trübung in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung;

eine oder mehrere Entnahme-Vorrichtung(en) und/oder Mittel zur Regelung und/oder Steuerung der Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit(en) und/oder der Entnahmedauer der leichten Phase, der schweren Phase und, sofern vorhanden, der Zwischenphase, basierend auf den Messwerten der elektrischen Leitfähigkeit (für die Sonde(n) zum Messen der elektrischen Leitfähigkeit) oder basierend auf den Messwerten der Trübung (für die Sonde(n) zum Messen der Trübung) in mindestens einer Phase.

Eine Entnahme-Vorrichtung ist beispielsweise ein Tauchrohr, dessen Aufbau und Funktion noch im Einzelnen erläutert wird.

Die Erfindung bezieht sich ebenfalls auf die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens oder der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Einstellen der Lage der Phasen in einer Trennvorrichtung und getrennten Entnahme der Phasen aus einer Trennvorrichtung anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte der Phasen (für die Sonde(n) zum Messen der elektrischen Leitfähigkeit) und/oder anhand der gemessenen Trübungswerte der Phasen (für die Sonde(n) zum Messen der Trübung).

Zusätzliche Merkmale und Vorteile der Offenbarung werden in der nachfolgenden detaillierten Beschreibung angegeben und teilweise dem Fachmann im Stand der Technik ohne Weiteres aus der Beschreibung offensichtlich oder durch Umsetzung der Offenbarung, wie hier beschrieben, in die Praxis erkannt werden, einschließlich der detaillierten Beschreibung, die folgt, der Ansprüche, genauso wie der beigefügten Zeichnungen. Die Ansprüche, die nachfolgend angegeben sind, bilden einen Teil dieser Beschreibung und sind direkt und durch Bezugnahme hier einbezogen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Die Figuren 1 bis 22 sind schematische Darstellungen von beispielhaften Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung. Im Einzelnen zeigt:

Figur 1 eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung, die den Verlauf einer Extraktion einer Charge zu 3 Zeitpunkten der Trennung mit einer Sonde zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen, aufgetragen über die Zeit, darstellt;

Figur 2 eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen darstellt;

Figur 3 eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen zu einem anderen Zeitpunkt als Figur 2 darstellt;

Figur 4 eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer weiteren beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen darstellt;

5 Figur 5 einen Querschnitt einer weiteren beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung mit 4 Sonden in einer radialen Anordnung (links) und eine Seitenansicht hiervon (rechts);

10 Figur 6 einen Querschnitt einer weiteren beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung mit 4 Sonden in einer radialen Anordnung mit horizontaler Verteilung (links) und eine Seitenansicht hiervon (rechts);

15 Figur 7a Darstellung des Anfahrens einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit in [mS/cm] für die schwere Phase mit einer ersten Sonde, aufgetragen über die Zeit in [s];

20 Figur 7b Darstellung des Anfahrens einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in dem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem von Figur 7a anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit in [mS/cm] für die leichte Phase mit einer zweiten Sonde, aufgetragen über die Zeit in [s];

25 Figur 8 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofile in [mS/cm], jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

30 Figur 9a Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem, dargestellt anhand des mit einer ersten Sonde gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofils in [mS/cm] für die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

35 Figur 9b Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in dem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem von Figur 9a, dargestellt anhand des mit einer zweiten Sonde gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofils in [mS/cm] für die leichte Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

40 Figur 10 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften Ausführungsform des Verfahrens, wobei anstelle eines Zwei-Phasen-Systems ein einphasiges System in den Abscheider gegeben wird;

Figur 11 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften Ausführungsform des Verfahrens, wobei der Wassergehalt des Zwei-Phasen-Systems variiert wird und das Störsystem von Beginn an in der Trennvorrichtung vorliegt;

5 Figur 12 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften Ausführungsform des Verfahrens, wobei der Polymergehalt des Zwei-Phasen-Systems variiert wird und das Störsystem von Beginn an in der Trennvorrichtung vorliegt;

Figur 13 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften Ausführungsform des
10 Verfahrens, wobei der Puffersalzgehalt des Zwei-Phasen-Systems variiert wird und das Störsystem von Beginn an in der Trennvorrichtung vorliegt;

Figur 14 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Aus-
führungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem mit
15 Zellkultur, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofile in [mS/cm], jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

Figur 15 ein Balkendiagramm, das die Zellzahl in [10^5 Zellen/mL] der in Beispiel 5.1 eingesetz-
ten Zellkultur sowie die Zellzahlen der leichten Phase zu verschiedenen Zeitpunkten während des
20 Verfahrens, darstellt;

Figur 16 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften nicht erfindungsgemäßen
Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-
Phosphatsystem mit Zellkultur, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen
25 Leitfähigkeitsprofile in [mS/cm] jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die
Zeit in [s];

Figur 17 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Aus-
führungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem
30 mit Zellkultur, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofile in [mS/cm], jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

Figur 18 ein Balkendiagramm, das die Zellzahl in [10^5 Zellen/mL] der in den Beispielen 5.2 und
5.3 eingesetzten Zellkultur sowie die Zellzahlen der leichten und schweren Phase zu verschiedenen
35 Zeitpunkten während des Verfahrens, darstellt;

Figur 19A Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Aus-
führungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem
mit Zellkultur, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofile in
40 [mS/cm], jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

Figur 19B Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem mit Zellkultur, dargestellt anhand der Höheneinstellung des Tauchrohrs in [cm] im Abscheider, die mit den Leitfähigkeitswerten von Figur 19A korreliert;

5

Figur 20 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem mit Zelllysate, dargestellt anhand der mit zwei Sonden gemessenen elektrischen Leitfähigkeitsprofile in [mS/cm], jeweils für die leichte und die schwere Phase, aufgetragen über die Zeit in [s];

10

Figur 21 ein Balkendiagramm, das die Ausbeute und Konzentration für Plasmid-DNA des in Beispiel 6 beschriebenen Verfahrens darstellt;

Figur 22 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem unter Verwendung von zwei Pumpen, dargestellt anhand der Pumpenströme während des Verfahrens; und

15

Figur 23 Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-System unter Verwendung einer Sonde zur Messung der Trübungswerte.

20

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

25 DEFINITION VON ALLGEMEINEN BEGRIFFEN

Begriffen, die hier nicht speziell definiert sind, sollte die Bedeutung gegeben werden, die ein Fachmann im Stand der Technik im Licht der Offenbarung und des Kontexts diesen geben würde.

30 Unter „Reinigen und Anreichern“ wird hier verstanden, dass unerwünschte Komponenten, wie Kontaminationen oder Verunreinigungen, insbesondere Wirtszellproteine (HCPs), Wirtszell-DNA (DNA), Medienkomponenten, Viren und Endotoxine und dergleichen, abgereichert werden können und die Reinheit des Zielproduktes durch das Verfahren zunimmt.

35 Der Begriff „Anreichern“ umfasst auch ein Aufkonzentrieren, wobei unter „Aufkonzentrieren“ in diesem Zusammenhang zu verstehen ist, dass das Zielprodukt in Schritt g. in einer höheren Konzentration (Masse/Volumen) im Vergleich zu Schritt a. erhalten wird.

40 Unter „Leitfähigkeit“ soll hier die elektrische Leitfähigkeit verstanden werden. Wenn die „Messung der elektrischen Leitfähigkeit einer Phase“ oder eine ähnliche Formulierung angegeben wird, so bedeutet

dies, dass die elektrische Leitfähigkeit an bestimmten Positionen in dieser Phase unter Verwendung eines oder mehrerer Leitfähigkeitsmessgeräte, wie Sonden, gemessen wird.

5 Unter dem Begriff „Leitfähigkeitssonde“, wie hier verwendet, soll eine Sonde verstanden werden, die die elektrische Leitfähigkeit misst.

Der Ausdruck „elektrische Leitfähigkeit der leichten/schweren Phase“ oder ähnliche Ausdrücke sollen so verstanden werden, dass eigentlich nicht die elektrische Leitfähigkeit der leichten, schweren oder Zwischenphase gemessen wird, sondern die elektrische Leitfähigkeit an bestimmten vordefinierten
10 Stellen oder geeigneten Positionen in der Trennvorrichtung gemessen wird. Die vordefinierten Stellen oder geeigneten Positionen sind die Orte in der Trennvorrichtung, an denen ein oder mehrere Leitfähigkeitsmessgeräte, insbesondere ein oder mehrere Sonden, die elektrische Leitfähigkeit messen.

Die „Trübung“, auch Turbidität, einer transparenten Flüssigkeit ist ein optischer Eindruck, der durch
15 kleine Partikel entsteht, die einen vom Trägermedium abweichenden Brechungsindex aufweisen oder eine Absorption zeigen. Die Trübung einer Flüssigkeit wird optisch ermittelt und mit Hilfe einer elektronischen Auswertung gemessen. Die Wellenlänge der Messstrahlung liegt beispielsweise im Infrarotbereich bei 860 nm (gemäß ISO 7027). Alternativ kann man die Trübung auch mit einer Weißlichtlampe (z.B. Wolframlampe) zwischen 400 und 600 nm messen (EPA 180.1). Dem Fachmann ist die Mes-
20 sung der Trübung aus dem Stand der Technik bekannt, so dass dieser ohne Weiteres eine geeignete Messstrahlung auswählen und einsetzen kann. Man unterscheidet zwei Messverfahren: Die Schwächung der durchgehenden Lichtstrahlung (sogenanntes Durchlicht) und die Seitwärtsstreuung der Lichtstrahlung (sogenanntes Streulicht). Um gemessene Trübungswerte vergleichen zu können, wurde die Trübungsstandardflüssigkeit Formazin geschaffen, so dass sich alle Trübungseinheiten prak-
25 tisch auf deren Verdünnung beziehen. Eine gebräuchliche Trübungseinheit ist FAU (Formazine Attenuation Units; Durchlichtmessung; Winkel 0°; gemäß den Vorschriften der Norm ISO 7027). Die Trübung kann durch verschiedene Messgeräte gemessen werden; dies sind Trübungsmessgeräte, insbesondere Trübungssonden. Trübungssonden messen dann beispielsweise die Lichtstreuung (Seitwärtsstreuung) oder sind Durchlichtsonden, die die Schwächung der durchgehenden Lichtstrahlung
30 messen. Das Messsignal bzw. die Messeinheit ist hier die Absorption. Die Wellenlänge der Messstrahlung kann dabei variieren. Beispielsweise können im Handel erhältliche Trübungssonden zum Einsatz kommen.

Der Begriff „Sonde für die leichte Phase“ oder ähnliche Begriffe, bezeichnet die Sonde, die in die
35 leichte Phase eintaucht und dort die elektrische Leitfähigkeit misst. Diese Sonde wird damit der leichten Phase zugeordnet. Die „Messung der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase“ bedeutet damit die Messung der elektrischen Leitfähigkeit mit der Sonde, die der leichten Phase zugeordnet wird.

Der Begriff „Sonde für die schwere Phase“ oder ähnliche Begriffe, bezeichnen die Sonde, die in die
40 schwere Phase eintaucht und dort die elektrische Leitfähigkeit misst. Diese Sonde wird damit der schweren Phase zugeordnet. Die „Messung der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase“ be-

deutet damit die Messung der elektrischen Leitfähigkeit mit der Sonde, die der schweren Phase zugeordnet wird.

Der Ausdruck, dass eine Sonde „an einer geeigneten Position“ in der Trennvorrichtung eingesetzt wird, bedeutet, dass die Sonde für die schwere Phase auch in diese eintaucht und die Sonde für die leichte Phase in diese eintaucht, so dass die jeweilige Sonde die elektrische Leitfähigkeit der zugeordneten Phase messen kann. Die Sonde misst die elektrische Leitfähigkeit an der vordefinierten Stelle, wo diese in der Phase platziert wurde.

Unter „Regelung und/oder Steuerung“ eines Parameters wird die Kontrolle und Korrektur und/oder Regulierung des Parameters verstanden.

Das „Entmischen lassen“ bedeutet, dass sich die wässrigen Phasen des Zwei-Phasen-Systems von selbst trennen. Hierzu ist die Schwerkraft ausreichend.

Der Ausdruck „Phasengrenzfläche(n)“ bedeutet, dass entweder keine Zwischenphase vorhanden ist, dann liegen nur die leichte und die schwere Phase in der Trennvorrichtung vor und zwischen diesen befindet sich eine Phasengrenzfläche. Oder aber es ist eine Zwischenphase vorhanden, dann gibt es eine Phasengrenzfläche zwischen der Zwischenphase und der leichten Phase und eine Phasengrenzfläche zwischen der Zwischenphase und der schweren Phase. Der Ausdruck „Phasengrenzfläche(n)“ umfasst daher beide Varianten.

Der Begriff „kontinuierlich“ bedeutet, dass ein oder mehrere Materialflüsse in die Trennvorrichtung hinein und ein oder mehrere Materialflüsse aus der Trennvorrichtung herausströmen. Dabei ist in der Regel die Summe der einströmenden Materialflüsse gleich der Summe der ausströmenden Materialflüsse. Wenn ein Verfahren oder ein Verfahrensschritt kontinuierlich durchgeführt wird, so erfolgt dieses/dieser ohne Unterbrechung.

Der Begriff „diskontinuierlich“ bedeutet, dass nicht kontinuierlich gearbeitet wird. Es kann beispielsweise eine durch das Fassungsvermögen der Trennvorrichtung begrenzte Menge (eine Charge oder ein Ansatz) zugeführt und das Produkt nach Abschluss des Verfahrens auf einmal entnommen werden. Beispielsweise können auch einzelne Produkte zunächst hergestellt (Batch), dann gelagert und später weiterverarbeitet werden.

Der Begriff „semi-kontinuierlich“ bedeutet, dass kontinuierliche und diskontinuierliche Vorgänge vorliegen. Wenn ein Verfahren semi-kontinuierlich ist, so wird das Verfahren nur teilweise kontinuierlich durchgeführt. Dies bedeutet, dass das kontinuierliche Verfahren unterbrochen wird. Diese Verfahrensweise kann dann auch als diskontinuierlich aufgefasst werden. Wenn ein Verfahrensschritt semi-kontinuierlich erfolgt, so umfasst dieser Schritt kontinuierliche und nichtkontinuierliche Teilschritte.

40

Unter "Polymer(e)" werden hier derartige polymere Verbindungen verstanden, die ein wässriges Zwei-Phasen-System ausbilden können und/oder in einem wässrigen Zwei-Phasen-System zum Einsatz kommen können, aber das Zielprodukt möglichst nicht nachteilig beeinflussen.

- 5 Unter dem Begriff "Salz(e)" versteht man solche Salze, die ein wässriges Zwei-Phasen-System zusammen mit einem Polymer(Polymeren) ausbilden können und/oder in einem wässrigen Zwei-Phasen-System zum Einsatz kommen können, aber das Zielprodukt möglichst nicht nachteilig beeinflussen. Dies sind beispielweise anorganische oder organische Salze, insbesondere Puffersalze.

10 AUSFÜHRUNGSFORMEN DER ERFINDUNG

Das Verfahren der Erfindung mit seinen unterschiedlichen Ausführungsformen soll nachfolgend im Einzelnen erläutert werden.

- 15 Generell kann das Verfahren der Erfindung kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt werden. Wenn das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird, wird jeder Schritt kontinuierlich durchgeführt und schließt sich unmittelbar (kontinuierlich) an den nächsten Schritt an.

Es können auch nur einzelne Verfahrensschritte kontinuierlich durchgeführt werden.

20

Das Verfahren kann auch diskontinuierlich durchgeführt werden. Das Verfahren kann insgesamt diskontinuierlich sein, beispielweise bei einer chargenweisen Durchführung oder ein oder mehrere Schritte des Verfahrens können diskontinuierlich erfolgen.

- 25 Im Verfahren der Erfindung können auch kontinuierlich und diskontinuierlich (nicht kontinuierlich) durchgeführte Schritte kombiniert werden.

Ein Verfahrensschritt kann kontinuierliche und diskontinuierliche Teilschritte umfassen.

- 30 Gemäß einer Ausführungsform werden die Schritte a) bis g) oder die Schritte b) bis g) oder die Schritte c) bis g) oder die Schritte d) bis g) kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden die Schritte a) bis f) oder die Schritte b) bis f) oder die Schritte c) bis f) oder die Schritte d) bis f) kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt.

35

Der Begriff „im kontinuierlichen Betrieb“ wie dieser hier verwendet wird, bedeutet, dass zumindest die Schritte d., e. und f., die in der Trennvorrichtung durchgeführt werden, jeweils kontinuierlich erfolgen und auch zwischen diesen Schritten keine Unterbrechung erfolgt, d.h. das Teilverfahren d. bis f. insgesamt kontinuierlich durchgeführt wird.

40

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes ist für jede Art von Protein, insbesondere Immunglobuline, oder für jede Art von Nukleinsäure, wie beispielsweise Plasmid-DNA, genomische DNA, RNA, oder jede Art von Viren, wie beispielsweise Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Retro- und Lentiviren, oder auch andere hier nicht genannte Viren geeignet.

In Schritt a. des Verfahrens der Erfindung wird zunächst eine Ausgangslösung, die das Zielprodukt enthält, bereitgestellt. Dies kann jede Art von Ausgangslösung darstellen, sofern diese in ein wässriges Zwei-Phasen-System überführt werden kann.

Der Begriff „Ausgangslösung“ ist in diesem Zusammenhang möglichst breit zu verstehen und umfasst nicht nur echte Lösungen, sondern jede Art eines homogenen oder auch heterogenen Gemischs, mit dem eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung durchgeführt werden kann. Dispersionen sollen hierbei mitumfasst sein. Die Ausgangslösung stellt daher eine Flüssigkeits-haltige Mischung der zu trennenden Komponenten dar, die im wässrigen Zwei-Phasen-System in Wasser gelöst oder dispergiert vorliegen. Die Ausgangslösung kann daher eine echte Lösung oder auch eine Dispersion sein und kann auch feste Bestandteile, wie z.B. Zellen, Zellfragmente oder Präzipitate im Lösungsmittel dispergiert, aufweisen.

Die Ausgangslösung kann eine Zellkultur, ein Zellüberstand oder auch ein Zelllysate darstellen, worin das Zielprodukt (beispielsweise Antikörper, Viren, mRNA) enthalten ist. In einer Ausführungsform ist die Ausgangslösung ein Zelllysate, welches durch alkalische Lyse der Zellen hergestellt wird und Plasmid-DNA enthält. Dabei können die Zellen prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein, insbesondere Pilze, Hefen, Bakterien, wie E. coli.

Die Ausgangslösung wird in Schritt b. in ein wässriges Zwei-Phasen-System (ATPS) überführt, d.h. es wird mit der Ausgangslösung ein wässriges Zwei-Phasen-System hergestellt.

Die Herstellung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems kann kontinuierlich, diskontinuierlich oder semikontinuierlich durchgeführt werden. Beispielsweise kann das Zwei-Phasen-System kontinuierlich hergestellt werden. Es kann auch eine Charge des Zwei-Phasen-Systems hergestellt und diese dann weiterverarbeitet werden.

Zur Herstellung eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems werden mindestens ein Polymer und mindestens ein Salz in geeigneter Konzentration zur Ausgangslösung zugegeben oder es werden mindestens zwei Polymere in geeigneter Konzentration zur Ausgangslösung zugegeben. Der Begriff „in geeigneter Konzentration“ bedeutet, dass eine derartige Konzentration eingesetzt wird, dass ein wässriges Zwei-Phasen-System gebildet wird. Diese Konzentration hängt von den verwendeten Ausgangsmaterialien ab und ist dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt oder ist durch wenige orientierende Versuche feststellbar.

Das wässrige Zwei-Phasen-System ist erfindungsgemäß nicht besonders beschränkt, sofern eine Kombination aus Polymer(en)/Polymer(en) oder Polymer(en)/Salz(en) eingesetzt wird. Selbstverständlich wird als Lösungsmittel Wasser verwendet. D.h. das Lösungsmittel in allen Phasen ist Wasser; ein organisches Lösungsmittel liegt nicht vor.

5

Als Kombination Polymer(e)/Polymer(e) kommen beispielweise Polyethylenglykole (PEG) mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Dextran zum Einsatz. Dextrane können mit unterschiedlichen Molekulargewichten in wässriger Lösung gelöst eingesetzt werden.

- 10 Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung ist die Kombination Polymer(e)/Polymer(e) beispielsweise ausgewählt aus Polyethylenglykol (PEG)/Polyethylenglykol (PEG), wie PEG 400/PEG 8000, PEG400/PEG2000, Polyethylenglykol (PEG)/Dextran. Weitere phasenbildende Polymere, wie Polyethylenglykole (PEG) sind Polypropylenglykole (PPG), Dextrane, PEG-PPG-PEG-Copolymer (EO-PO) und dergleichen. Die phasenbildenden Polymere können mit verschiedenen Molekulargewichten
- 15 eingesetzt werden.

- Als Kombination Polymer(e)/Salz(e) werden beispielweise Polyethylenglykole (PEG) mit unterschiedlichem Molekulargewicht und verschiedene Salze, wie Phosphatsalze, Ammoniumsalze, Kaliumsalze, Acetatsalze, Natriumsalze oder Citratsalze verwendet, beispielsweise Ammoniumsulfat, Kaliumcitrat,
- 20 Natriumcitrat, Kaliumacetat, Natriumacetat, Ammoniumacetat, Kaliumphosphat. Dabei können auch mehrere Salze (Kombinationen) gleichzeitig verwendet werden. Es können auch andere im Stand der Technik bekannten Salze verwendet werden, die ein wässriges Zwei-Phasen-System zusammen mit einem Polymer(Polymeren) ausbilden können.

- 25 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Kombination Polymer(e)/Salz(e) ausgewählt aus Polyethylenglykol(en) (PEG)/Phosphatsalz(en) und gegebenenfalls weiteren Salzen. In der vorliegenden Erfindung wird ein wässriges Zwei-Phasen-System, umfassend mindestens ein Polymer und mindestens ein Phosphatsalz, auch als „Zwei-Phasen-Phosphatsystem“ bezeichnet.

- 30 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Kombination Polymer(e)/Salz(e) ausgewählt aus Polyethylenglykol(en) (PEG)/Citratsalz(en) und gegebenenfalls weiteren Salzen. In der vorliegenden Erfindung wird ein wässriges Zwei-Phasen-System, umfassend mindestens ein Polymer und mindestens ein Citratsalz, auch als „Zwei-Phasen-Citratsystem“ bezeichnet.

- 35 Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Kombination Polymer(e)/Salz(e) ausgewählt aus Polyethylenglykol(en) (PEG)/Ammoniumsalz(en) und gegebenenfalls weiteren Salzen. In der vorliegenden Erfindung wird ein wässriges Zwei-Phasen-System, umfassend mindestens ein Polymer und mindestens ein Ammoniumsalz, auch als „Zwei-Phasen-Ammoniumsystem“ bezeichnet.

- 40 Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung können für die Kombination Polymer(e)/Salz(e) auch andere phasenbildende Polymere verwendet werden, beispielsweise ausgewählt aus Polyethylengly-

kole (PEG), Polypropylenglykole (PPG), PEG-PPG-PEG-Copolymer (EOPO) und dergleichen. Die phasenbildenden Polymere können mit verschiedenen Molekulargewichten eingesetzt werden.

5 Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird für das wässrige Zwei-Phasen-System als Polymer Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht zwischen 200 und 8000 g/Mol eingesetzt. In einer Ausführungsform wird als Polymer Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht zwischen 200 und 6000 g/Mol oder zwischen 200 und 4000 g/Mol eingesetzt. Andere als die spezifisch offenbarten Molekulargewichte für Polyethylenglykol können ebenfalls zum Einsatz kommen.

10 Das oder die Polymere, wie Polyethylenglykol, können beispielsweise in einer Konzentration von 5 bis 35 Gewichts-%, bezogen auf die Gesamtmenge an wässrigem Zwei-Phasen-System, verwendet werden.

15 Die eingesetzten Phosphatsalze sind beispielweise Natrium- und Kaliumphosphate und Alkalihydrogenphosphate, wie Natriummono- oder -dihydrogenphosphat oder Kaliummono- oder -dihydrogenphosphat, und viele andere mehr. Andere verwendbare Salze sind dem Fachmann bekannt. Es können gleichzeitig ein oder mehrere Phosphatsalze vorhanden sein.

20 Die verwendeten Citratsalze sind beispielweise Natrium- und Kaliumcitrate und viele andere. Es kann auch Zitronensäure zum Einsatz kommen. Es können gleichzeitig ein oder mehrere Citratsalze vorliegen.

Die verwendeten Ammoniumsalze sind beispielweise Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid und viele andere. Es können gleichzeitig ein oder mehrere Ammoniumsalze vorliegen.

25 Zusätzlich kann es vorteilhaft sein, wenn in der Polymer/Salz-Kombination weitere Salze vorhanden sind, wie beispielsweise Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Acetate, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris). Es kann auch Essigsäure zum Einsatz kommen.

30 In das Zwei-Phasen-System können auch Biomolekül-stabilisierende Komponenten, wie Aminosäuren (z.B. L-Arginin), oder Zucker (z.B. Sorbitol) oder Additive, wie Polysorbate zugegeben werden, um das Zielmolekül bei hohen Polymer- oder Salzkonzentrationen vor Ausfällung bzw. Produktverlust zu schützen.

35 Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, wenn mit der Ausgangslösung ein Zwei-Phasen-System hergestellt wird, bei dem ein Phasenverhältnis von der Phase, enthaltend das Zielprodukt, zur Gegenphase von $> 1,1$ eingesetzt wird. Beispielsweise ist ein Verhältnis (Volumen/Volumen) von Phase zu Gegenphase = 1,11 oder größer (für die Phase) zu 1,0 (für die Gegenphase) vorteilhaft. Das Phasenverhältnis kann ein Volumenverhältnis (Volumen/Volumen) oder Massenverhältnis (Gew./Gew.) sein.

40 Die Abtrennung des Proteins, der Nukleinsäure oder des Virus kann dadurch verbessert werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform beträgt das Dichteverhältnis von leichter und schwerer Phase im eingesetzten Zwei-Phasen-System mindestens 1,06. Demnach liegt das Verhältnis der Dichte der schweren Phasen zur Dichte der leichten Phase bei 1,06 oder größer (für die schwere Phase) zu 1 (für die leichte Phase). Dies bedeutet einen Dichteunterschied von mindestens 6% zwischen beiden

5 Phasen, d.h. es kann auch ein sehr geringer Dichteunterschied beider Phasen vorliegen und dennoch kann eine Trennung der Phasen ohne Probleme durchgeführt werden. Ein derartiges Dichteverhältnis ist im Hinblick auf eine kurze Verfahrenszeit vorteilhaft.

Da die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) zur Trennung von Zielprodukt und Verunreinigungen

10 zwei nicht mischbare Phasen erfordert, wobei eine der Phasen das Zielprodukt anreichert, insbesondere dieses im Wesentlichen enthält, und die Gegenphase die Verunreinigungen anreichert, insbesondere diese im Wesentlichen enthält, ist es zweckmäßig je nach Zielprodukt und enthaltenen Verunreinigungen ein entsprechendes wässriges Zwei-Phasen-System auszuwählen. Dies kann der Fachmann entsprechend dem Stand der Technik und seines Fachwissens anhand weniger orientie-

15 render Versuche tun.

Nach dem Überführen der Ausgangslösung in ein wässriges Zwei-Phasen-System (ATPS) in Schritt b. erfolgt in Schritt c. das Durchmischen des erhaltenen wässrigen Zwei-Phasen-Systems. Das Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems wird unter Erhalt eines Stoffaustauschs durchgeführt, bei

20 dem sich das Zielprodukt in der leichten oder der schweren Phase anreichert, sich insbesondere im Wesentlichen nur noch in einer der Phasen befindet. Der Ausdruck, dass sich das Zielprodukt „in der leichten oder schweren Phase anreichert“, bedeutet, dass etwa 50 % oder mehr oder etwa 60% oder mehr oder etwa 70% oder mehr oder etwa 80% oder mehr oder etwa 85% oder mehr oder etwa 90%

25 oder mehr oder etwa 95% oder mehr oder etwa 98% oder mehr an Zielprodukt in einer Phase vorliegen. Bei instabilen oder leicht ausfallenden Produkten können aber auch bereits etwa 40 % oder mehr oder etwa 45% oder mehr an Zielprodukt ausreichend sein, wenn sich dieses in einer Phase anreichert. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn es sich um teure oder sehr wertvolle Zielprodukte handelt.

Das Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems in Schritt c. wird unter Erhalt eines Stoffaustauschs, insbesondere eines ausreichenden Stoffaustauschs, durchgeführt. Ein Stoffaustausch ist dann nicht ausreichend, wenn sich das Zielprodukt nicht, wie bereits definiert, in der leichten oder schweren Phase anreichert. Ein geeigneter bzw. ausreichender Stoffaustausch kann beispielsweise durch Vorversuche oder anhand von Analysen der Konzentration des Zielproduktes in den einzelnen

30 Phasen nach dem Durchmischen bestimmt werden.

Der Stoffaustausch ergibt sich daher durch die unterschiedliche Verteilung in den Phasen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten für den Fachmann, um festzustellen, dass ein Stoffaustausch stattgefunden hat, d.h. dass sich das Zielprodukt in einer der Phasen konzentriert hat. Dies kann der Fachmann

40 beispielsweise durch einfache Vorversuche feststellen. Dies sind beispielsweise Absetzversuche bei definierten Energieeinträgen in einem Reaktionsgefäß (Batch-Modus). Der Stoffaustausch kann daher

insbesondere durch den Energieeintrag beim Durchmischen beeinflusst werden. Dabei werden auch das Phasentrennverhalten des verwendeten wässrigen Zwei-Phasen-Systems und der Gehalt des Zielprodukts in den Phasen bestimmt.

- 5 Zur Untersuchung des Phasentrennverhaltens wird z.B. der Energieeintrag beim Durchmischen variiert und die Trennzeit zur Ausbildung der Phasen ermittelt. Das Ende der Phasenausbildung ist dabei in der Regel dann, wenn sich die Höhe der Grenzfläche von leichter Phase/schwerer Phase im Reaktionsgefäß nicht mehr verändert. Um festzustellen, ob die Zielkomponente in die Zielphase teilweise, hauptsächlich oder vollständig übergegangen ist und der verwendete Energieeintrag zu einem Stoff-
- 10 austausch führt, kann in den ausgebildeten Phasen der Gehalt sowie die Prozessausbeute der Zielkomponente ermittelt werden.

- Der Energieeintrag kann beispielweise über eine bestimmte Rührerdrehzahl in dem gewählten Experimentaufbau (definierter Typ Rührer und definiertes Reaktionsgefäß (Höhe/Durchmesser)) ermittelt
- 15 werden. Ein ermittelter Energieeintrag für den Stoffaustausch der Zielkomponente in einem bestimmten wässrigen Zwei-Phasen-Systemen kann dann beispielweise für unterschiedliche Extraktionsbehälter, Prozessformate (Batch und kontinuierliche Phasentrennung) sowie Rührer-Typen und Aufbauten (aktiver oder stationärer Energieeintrag) entsprechend angepasst werden.

- 20 Weitere Einflussfaktoren, wie z.B. Temperatur, Konzentration an Zielprodukt und Nebenprodukten (wie z.B. Wirtszellproteine, Zellzahl), können bei den Vorversuchen bzw. Absetzversuchen zur Optimierung des Energieeintrags für jedes Zwei-Phasen-System herangezogen werden.

- Auch besteht die Möglichkeit, dass der Stoffaustausch in Schritt c. unter unterschiedlichen Bedingungen (unter anderen: Temperatur, Verweilzeit, Rührerdrehzahl, Energieeintrag, Aufbau des Mischers beim aktiven Durchmischen, Aufbau eines statischen Mischers, Durchflussrate etc. im statischen Mischer beim statischen Durchmischen) direkt in der Vorrichtung in der das Verfahren der Erfindung durchgeführt wird, festgestellt und die besten Bedingungen für einen Stoffaustausch gemäß der Erfindung bestimmt werden. Dazu wird das Verfahren beispielsweise unter verschiedenen Bedingungen in
- 25 Schritt c. durchgeführt und in den abgesetzten und getrennten Phasen der Gehalt der verschiedenen Inhaltsstoffe bestimmt: z.B.: Gehalt des Zielproduktes in der Zielphase und optional in den anderen Phasen.
- 30

- Dies kann durch unterschiedliche Methoden des Standes der Technik bestimmt werden. Beispielsweise seien unter anderem genannt: Chromatographische Methoden, wie Reversed Phase-HPLC und andere HPLC Methoden (Anionentauscher, Kationentauscher, HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography), Affinitätschromatographie (Protein A und andere Liganden, die das Zielprodukt spezifisch binden können)), nano-HPLC, UHPLC, elektrophoretische Methoden, wie unter anderem SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese), auf Antikörper-Bindung beruhende Methoden, wie ELISA, Western-Blot etc., fluorometrische oder spektroskopische Methoden für Proteine, die entsprechende spektroskopische und fluorometrische Signale liefern, und alle anderen Methoden des Standes der Technik
- 35
- 40

für die Analyse von Zielprodukten, wie Proteine und Nukleinsäuren, insbesondere die quantitative Analyse.

5 Der Gehalt an Nukleinsäuren, insbesondere Plasmid-DNA (pDNA) in der Zielphase kann unter anderem durch Kationentauscher-HPLC, -nano-HPLC und -UHPLC-Methoden, spektroskopisch mittels chromogenen Assays, Agarosegelelektrophorese, Kapillarelektrophorese und dergleichen bestimmt werden.

10 Auch besteht die Möglichkeit, den Gehalt an nicht in der Zielphase erwünschten Verunreinigungen sowohl in der Zielphase als auch der bzw. den anderen Phasen durch Methoden des Standes der Technik zu bestimmen. Zum Beispiel können Host Cell-Proteine durch SDS-Page oder ELISA und DNA und RNA durch die in der Pharmaindustrie üblichen und anerkannten Methoden bestimmt werden. Ebenso gibt es für die Bestimmung des Gehaltes weiterer Verunreinigungen in den verschiedenen Phasen, die man teilweise mittels ATPE abtrennen will diverse Methoden des Standes der Technik: Chromogene Tests und LAL (Limulus Amebocyten Lysat – Test) für Endotoxine, Kationentauscher-HPLC für die Bestimmung der unterschiedlichen pDNA Isoformen in den einzelnen Phasen, quantitative Bestimmungsmethoden für host-DNA, RNA, Host Cell Proteine, Lipide, Endotoxine, Viren- und Virenbestandteile etc.

20 Um einen Stoffaustausch feststellen zu können, vergleicht man den Gehalt des Zielproduktes und / oder der unerwünschten Verunreinigungen in der Ausgangslösung von Schritt a. des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem Gehalt des Zielproduktes und / oder der unerwünschten Verunreinigungen in den einzelnen entmischten Phasen in Schritt d. Dabei wird dann eine Anreicherung oder Abreicherung des Zielprodukts bzw. der unerwünschten Verunreinigungen in den jeweiligen Phasen festgestellt. Der Gehalt ist der Anteil, die Menge oder Konzentration des Zielprodukts oder der Verunreinigungen in den jeweiligen Phasen. Eine Veränderung des Gehalts des Zielprodukts und/oder der Verunreinigungen durch Vergleich der Ausgangslösung von Schritt a. mit einer, zwei oder allen entmischten Phasen in Schritt d. zeigt daher einen Stoffaustausch an.

30 Ein Stoffaustausch kann durch aktives und/oder statisches Durchmischen erfolgen. Beim aktiven Durchmischen wird das wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS) mittels beweglicher Teile, beispielsweise eines aktiven Rührwerks, durchmischt. Aktive Rührwerke sind beispielsweise rotierende Rührer oder Rührer mit anderer Wirkungsbewegung. Das statische Durchmischen erfolgt ohne Zuhilfenahme von beweglichen Teilen, beispielsweise in einem statischen Mischer. Bekannte statische Mischertypen sind beispielweise Kenics-Mischer, die aus um 180° verdrehten Blechen mit jeder Wendel um 90° versetzt, bestehen; oder Sulzer SMV-Mischer, aufgebaut aus geriffelten Lamellen, die die Ströme so leiten, dass sie sich kreuzen. Ein Stoffaustausch, insbesondere ein ausreichender Stoffaustausch beim Durchmischen kann beispielweise durch den Energieeintrag bzw. Leistungseintrag beim Durchmischen und/oder auch die Dauer bzw. Verweilzeit, über die gemischt wird, erreicht werden. Dies hängt vom jeweiligen Einzelfall ab.

In Versuchen mit Zellkulturen wurde festgestellt, dass die Enttrübung der leichten Phase vermieden werden konnte, wenn beim Durchmischen ein Leistungseintrag von mehr als 30 kW/m³ und eine Verweilzeit von mehr als 5 Minuten eingesetzt wurden. Diese beispielhaft angeführten Werte könnten für den Fachmann als Orientierungshilfe dienen. Der Fachmann kann ein geeignetes Vorgehen anhand
5 weniger orientierender Versuche bestimmen, wobei jedes Stoffsystem zu anderen Werten führt.

Ein Durchmischen der Phasen ist in jedem Fall erforderlich, um die Umverteilung des Zielprodukts in die gewünschte Phase zu erreichen. Ein Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems, wodurch ein Stoffaustausch erfolgt, ist sinnvoll, um eine möglichst hohe Ausbeute des Zielprodukts zu
10 erhalten. Eine Durchmischung kann man beispielweise daran erkennen, dass die produktenthaltende Phase kontinuierlich ist, d.h. keine Tropfen bildet, und die Gegenphase dispers ist, d.h. Tropfen ausbildet. Eine unzureichende Durchmischung kann zu einer falschen Phasenzusammensetzung oder einer Verunreinigung der Zielphase mit der Gegenphase führen, wodurch eine verminderte Produktreinheit resultiert oder eine Abtrennung des Zielprodukts nicht mehr möglich ist. Ein Beispiel für eine
15 unzureichende Durchmischung mit falscher Phasenzusammensetzung wird bei den Ausführungsbeispielen erläutert.

In Schritt d. folgt das Entmischen lassen der Phasen in einer Trennvorrichtung in eine leichte Phase, eine schwere Phase und gegebenenfalls eine Zwischenphase. Dies kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen.
20

Die Trennvorrichtung kann dabei jede dem Fachmann bekannte Art von Trennvorrichtung darstellen, die zur Flüssig-Flüssig-Phasentrennung geeignet ist, wie beispielweise ein Abscheider oder Mischer-Abscheider.
25

Beim kontinuierlichen Verfahren wird dies so durchgeführt, dass das Zu- und Abführen der Flüssigkeit so erfolgt, dass eine Trennung in die einzelnen Phasen und deren getrennte Entnahme kontinuierlich stattfindet. Bei einem diskontinuierlichen Verfahren wird eine Charge in die Trennvorrichtung gegeben, das Entmischen lassen der Phasen abgewartet und dann eine Abtrennung der Phasen mittels getrennter Entnahme aus der Trennvorrichtung durchgeführt. Das Entmischen lassen der Phasen kann
30 bei einem diskontinuierlichen Verfahren auch direkt in der Vorrichtung, in der die Durchmischung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) erfolgt, durchgeführt werden. Dabei wird nach Beendigung des Durchmischens das Entmischen der Phasen abgewartet. Die Vorrichtung, in der die Durchmischung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) erfolgt, kann somit auch anschließend als
35 Trennvorrichtung verwendet werden. Es kann auch zwischen diskontinuierlicher und kontinuierlicher Arbeitsweise gewechselt werden.

Die obere Phase im wässrigen Zwei-Phasen-System ist die leichte Phase und die untere Phase ist die schwere Phase. Das Zielprodukt kann sich in der leichteren oder schweren Phase befinden; dies hängt von den Eigenschaften des jeweiligen Zielprodukts und dem gewählten wässrigen Zwei-Phasen-System ab.
40

Gemäß einer Ausführungsform kann das Entmischen lassen auch semi-kontinuierlich durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass das kontinuierliche Verfahren kurzzeitig unterbrochen und das Entmischen lassen in Schritt d. nicht kontinuierlich durchgeführt wird, sondern zunächst abgewartet wird.

- 5 Dies kann zu einer besseren Ausbildung der Phasengrenzfläche(n) führen und daher die spätere Trennung der Phasen erleichtern.

- Bei Bereitstellung der Ausgangslösung in Schritt a. kann es ebenfalls vorteilhaft sein, wenn hier semi-kontinuierlich gearbeitet wird, d.h. eine Unterbrechung des ansonsten kontinuierlichen Verfahrens erfolgt. Wenn beispielsweise Plasmid-DNA als Zielprodukt gereinigt und angereichert werden soll, wird das Zelllysate als Ausgangslösung über eine alkalische Lyse und anschließende Neutralisation, beispielsweise mit Citratsalz, hergestellt. Der für die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) notwendige Salzpuffer (wie Citrat) ist damit bereits vorhanden und das Zwei-Phasen-System kann unmittelbar hergestellt und eingesetzt werden. Um jedoch eine genaue Steuerung der Lyse vorzunehmen, kann es zweckmäßig sein, wenn dies nicht kontinuierlich durchgeführt wird, sondern vielmehr eine geeignete Dauer der Lyse eingehalten und erst anschließend die kontinuierliche Verfahrensweise wieder aufgenommen wird. Die im Anschluss notwendige Neutralisation erfolgt mit dem für die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) ebenfalls notwendigen Salzpuffer (in diesem Beispiel: Citrat). Vorteilhaft ist, dass damit die für die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) notwendige Salzmenge bereits im Lyse-schritt vollständig zugegeben werden kann.
- 10
15
20

- Es kann jedoch auch vorteilhaft sein, wenn für das Reinigen und Anreichern, insbesondere Aufkonzentrieren von Plasmid-DNA die alkalische Lyse, die Neutralisation, das Überführen in ein wässriges Zwei-Phasen-System, das Entmischen lassen und die getrennte Entnahme der Phasen kontinuierlich durchgeführt werden.
- 25

- Beispielsweise kann auch wie folgt vorgegangen werden: Die alkalische Lyse erfolgt kontinuierlich oder diskontinuierlich und das Überführen in ein wässriges Zwei-Phasen-System erfolgt kontinuierlich oder diskontinuierlich bzw. chargenweise, beispielsweise auch jeweils mit wechselnden Zyklen. So könnten beispielsweise 2 Trennvorrichtungen wechselweise mit kontinuierlichem und diskontinuierlichem Betrieb zum Einsatz kommen oder 2 Trennvorrichtungen könnten hintereinander geschaltet zum Einsatz kommen.
- 30

- In Schritt e. wird ein kontinuierliches Messen der elektrischen Leitfähigkeit in der Trennvorrichtung durchgeführt. Dies kann zur Kontrolle des Verlaufs des Entmischen lassens der Phasen dienen. Die elektrische Leitfähigkeit wird jedoch insbesondere zum Bestimmen der Position der beiden Phasen und der Phasengrenzfläche oder, bei Vorliegen einer Zwischenphase, der Position der Zwischenphase und der zwei Phasengrenzflächen herangezogen.
- 35

- Wenn als Ausgangslösung eine Zellsuspension oder ein Zelllysate eingesetzt wird, d.h. eine Dispersion aus Biopartikeln, umfassend das Zielprodukt, sowie Zellen, Zellenbruchstücke und Medium, ist es
- 40

häufig der Fall, dass eine Mischphase gebildet wird, die aus Biopartikeln aufgebaut ist, die jedoch üblicherweise das Zielprodukt nicht mehr enthält. Diese Mischphase wird hier auch als „Zwischenphase“ bezeichnet, d.h. eine Phase die zwischen den beiden zu trennenden Phasen vorliegt. Die Zwischenphase kann beispielsweise eine Mischung aus einem Anteil der schweren Phase in Form nicht-koaleszierter Tropfen und dazwischen gebundenen Zellen darstellen. Die Bildung und Größe der Zwischenphase ist im Wesentlichen von den Zellen abhängig. Die Zwischenphase kann auch aus Präzipitat bestehen, welches beispielsweise bei der Gewinnung von Plasmid-DNA durch die alkalischen Lyse von Zellen bei der Neutralisation entsteht. Dieses Präzipitat enthält beispielsweise ausgefälltes Kaliumdodecylsulfat (K-SDS), Proteine, Zellbestandteile, genomische DNA, RNA und dergleichen.

Es liegt auf der Hand, dass die Phasentrennung durch die Bildung einer Zwischenphase erschwert wird. Die Zwischenphase könnte sich während einer kontinuierlichen Phasentrennung in der Trennvorrichtung ohne eine Füllstandsregelung völlig unkontrolliert bis zu einem vorhandenen unteren und/oder oberen Vorrichtungsauslass ausbreiten. Ohne Überwachung oder Detektionsmöglichkeit kann die Entnahme der Phasen daher nicht kontrolliert und gesteuert werden.

Als zu messender Stoffparameter für eine zuverlässige Phasendetektion wurde für die vorliegende Erfindung die elektrische Leitfähigkeit gewählt, da festgestellt wurde, dass die Unterschiede dieser in den beiden Phasen eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) groß genug sind, um erfasst werden zu können. Beispielsweise hat im Polymer/Salz-System das Polymer bzw. die Polymer-Phase eine geringe elektrische Leitfähigkeit und das Salz bzw. die salzreiche Phase hat eine hohe elektrische Leitfähigkeit. Da in einem Polymer/Salz-ATPS nur zwei Phasen bei ausreichend hoher Konzentrationen an Polymer oder Salz entstehen (> Binodale), liegt immer ein ausreichender Unterschied der elektrischen Leitfähigkeiten von leichter und schwerer Phase vor. In ähnlicher Weise können auch entsprechend geeignete Polymer/Polymer-Systeme zum Einsatz kommen.

Da bislang keine Messtechnik existiert, die die Anforderungen an die Detektion einer Phasengrenzfläche oder Zwischenphase eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) erfüllt, musste zunächst ein Konzept entwickelt werden, um die elektrische Leitfähigkeit in geeigneter Weise zu bestimmen.

Daher wurde basierend auf Stoffeigenschaftsmessungen ein Leitfähigkeit-basiertes Messprinzip entwickelt, das experimentell an idealen und realen Gemischen erprobt wurde, wobei das Zielprodukt entweder in der oberen oder der unteren Phase vorliegen kann. Wie sich herausgestellt hat, ist das Messprinzip geeignet, auf Basis der Messung der elektrischen Leitfähigkeit die Lage der einzelnen Phasen bzw. Phasengrenzfläche(n) zu bestimmen, und unabhängig von der Verteilung des Zielprodukts und den Verunreinigungen, da die Leitfähigkeitsdifferenz der zu trennenden Phasen größtenteils nicht vom Zielprodukt und den Verunreinigungen beeinflusst werden.

Eine erfindungsgemäße kontrollierte Phasentrennung, egal ob mit oder ohne Zwischenphase, unter Verwendung der kontinuierlich gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte, erhöht die Ausbeute des Verfahrens sowie die schließlich erhaltene Produkt-Reinheit und -Qualität.

- Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen in der Trennvorrichtung mit einem oder mehreren Leitfähigkeitsmessgeräten in Form von einer, zwei, drei oder mehr Sonden durchgeführt. D.h. je nach Ausführungsform können ein, zwei oder auch mehrere Sonden gleichzeitig in der Trennvorrichtung zum Einsatz kommen. Leitfähigkeitssonden sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt. Eine Sonde misst am unteren Ende in üblicher Weise mittels Messkontakten die elektrische Leitfähigkeit. Beispielhafte Leitfähigkeitssonden sind 4-polige Leitfähigkeitssonden mit 4 Metallkontakten. Andere Leitfähigkeitssonden sind ebenfalls möglich.
- Die Sonde(n) wird (werden) beispielsweise mithilfe von Einbauten in die Trennvorrichtung eingebaut oder eingelassen und an eine zentrale Messwerterfassungs- und Steuerungselektronik angeschlossen.
- Bereits eine Sonde kann ausreichen, um die elektrische Leitfähigkeit in der Trennvorrichtung zu messen. Wenn eine chargenweise Extraktion (Batch-Extraktion) durchgeführt wird, kann beispielsweise nur eine Leitfähigkeitssonde eingesetzt werden. Diese ist zum Beispiel im Auslass der Trennvorrichtung angeordnet. Der Auslass ist eine Öffnung im unteren Teil der Trennvorrichtung und kann mit einer Entnahme-Vorrichtung zum kontrollierten Auslassen verbunden sein oder diese aufweisen, beispielsweise ausgewählt aus einem Ventil, einem Durchflussregler, einer Schlauchquetschklemme, einem Schlauch, einem Rohr oder einem Stutzen und dergleichen oder kann auch eine beliebige andere Ausgestaltung haben. Die Leitfähigkeitssonde, die beispielsweise im unteren Bereich der Trennvorrichtung, wie in Bodennähe, im Auslass, insbesondere in einem mit dem Auslass verbundenen Schlauch, Rohr, Stutzen oder dergleichen, aber vor einem Ventil oder einer Schlauchquetschklemme oder ähnlichem der Trennvorrichtung montiert ist, detektiert dann die austretende Phase anhand ihrer jeweiligen elektrischen Leitfähigkeit während der Entleerung der Trennvorrichtung, so dass die Phasen in einfacher Weise voneinander getrennt werden und in getrennten Auffangbehältern gesammelt werden können.
- Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden zur kontinuierlichen Messung der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase eine oder mehrere Sonden und zur kontinuierlichen Messung der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase eine oder mehrere Sonden an verschiedenen Positionen in der Trennvorrichtung eingesetzt. Es kann vorteilhaft sein, wenn mehr als eine Sonde zum Einsatz kommt, da hierdurch die Detektion der Lage der Phasen und Grenzflächen und deren Regelung exakter erfolgen kann und damit verbessert wird. Beispielsweise kann eine Sonde kontinuierlich die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase und eine Sonde kontinuierlich die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase messen.
- Wenn zwei Sonden zum Einsatz kommen und eine kontinuierliche Extraktion durchgeführt wird, ist es vorteilhaft, die Position der beiden Sonden in geeigneter Weise zu wählen. In der Trennvorrichtung kann jeweils ein Auslass für die schwere Phase im unteren Teil der Trennvorrichtung (unterer Auslass)

und ein Auslass für die leichte Phase im oberen Teil der Trennvorrichtung (oberer Auslass) vorgesehen sein. Jede der beiden Sonden kann dann beispielweise jeweils einem Auslass zugeordnet werden. Mit der der jeweiligen Phase zugeordneten Sonde kann dann detektiert werden, ob sich an der Sonde und damit in der Nähe des jeweiligen Auslasses noch die entsprechende Phase befindet, oder
5 ob die Phasengrenzfläche schon soweit aufgestiegen bzw. abgesunken ist, so dass sich die Gegenphase an der Sonde und damit in der Nähe des Auslasses befindet, durch den diese nicht abfließen soll.

Die Sondenpositionen werden dann beispielweise derart gewählt, dass - unabhängig von der Verteilung des Zielproduktes in der oberen oder unteren Phase - die Sonde für die leichte Phase (obere Phase) tiefer als der obere Auslass positioniert wird. Damit kann man ein zu hohes Ansteigen der schweren Phase (untere Phase) mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese über den oberen Auslass abgezogen wird. Die Sonde für die schwere Phase (untere Phase) wird zweckmäßigerweise höher als der untere Auslass angeordnet. Damit kann man ein zu starkes Absinken der
10 leichten Phase (oberen Phase) mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese über den unteren Ablauf abgelassen wird.

Gemäß einer Ausführungsform ist es daher vorteilhaft, wenn die Sonde für die leichte Phase in der Trennvorrichtung tiefer als der obere Auslass positioniert wird und die Sonde für die schwere Phase in
15 der Trennvorrichtung höher als der untere Auslass angeordnet wird.

Es ist hierbei nicht erforderlich, dass die Sonden in der Nähe des jeweiligen Auslasses positioniert werden, also beispielweise unmittelbar über oder unmittelbar unter dem jeweiligen Auslass, vielmehr spielt die jeweilige Höhe der Sonden in der Trennvorrichtung relativ zu den Auslässen eine Rolle. Da
25 die Flüssigkeitshöhe in der Trennvorrichtung überall gleich hoch ist, bedeutet „unter einem Auslass“, dass die Sonde sich nicht auf demselben Höhenniveau wie der Auslass befindet, sondern unterhalb der Höhe der Ausfließöffnung des Auslasses angeordnet wird. In gleicher Weise bedeutet „über einem Auslass“, dass die Sonde sich nicht auf demselben Höhenniveau wie der Auslass befindet, sondern oberhalb der Höhe der Ausfließöffnung des Auslasses angeordnet wird. Von Bedeutung ist daher
30 beispielweise das Höhenniveau der Flüssigkeit und des betrachteten Auslasses.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden die Sonde(n) für die leichte Phase höher als die Sonde(n) für die schwere Phase angeordnet, was regelmäßig der Fall ist, da sich die leichte Phase stets oberhalb der schweren Phase befindet. Mit anderen Worten ist es vorteilhaft, wenn die Sonde(n) für
35 die leichte Phase unter dem oberen Auslass aber höher als die Sonde(n) für die schwere Phase angeordnet werden.

Vorteilhaft an einer derartigen Positionierung von zwei Sonden in der Trennvorrichtung ist, dass jede der beiden Leitfähigkeitssonden, die die elektrische Leitfähigkeit kontinuierlich messen, durch Veränderung des Leitfähigkeitswerts unmittelbar das Herannahen der anderen Phase bzw. der Zwischenphase anzeigt und daher ein Austreten der anderen oder Zwischenphase am falschen Auslass ver-
40

hindert werden kann. Unabhängig davon, ob sich das Zielprodukt in der leichten oder schweren Phase befindet, kann durch Verhindern des Entnehmens einer Phase und/oder der Zwischenphase am falschen Auslass ein Produktverlust vermieden werden.

- 5 Wie bereits erwähnt, können auch mehr als 2 Leitfähigkeitssonden in der Trennvorrichtung vorgesehen werden. Beispielsweise können 3, 4, 5, 6, oder mehr Sonden gleichzeitig in der Trennvorrichtung vorhanden sein. Eine höhere Anzahl an Sonden kann für eine genauere Erfassung der Lage der einzelnen Phasen und der Phasengrenzflächen vorteilhaft sein.
- 10 Es hat sich herausgestellt, dass bei Verwendung von zwei, drei oder mehr Sonden unterschiedliche Positionen von Vorteil sein können.

Gemäß einer Ausführungsform werden zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen in der Trennvorrichtung zwei, drei, vier oder mehr Sonden jeweils in eine Einführöffnung in der

- 15 Wand der Trennvorrichtung eingeführt und eingesetzt, wobei die Einführöffnungen eine Anordnung aufweisen, die ausgewählt wird aus:
- einer axialen Anordnung der Einführöffnungen, wobei die Einführöffnungen auf einer geraden Verbindungslinie angeordnet werden;
 - einer radialen Anordnung der Einführöffnungen, wobei die Einführöffnungen in einem Kreisbogen, angeordnet werden; oder
 - 20 - einer radial versetzten Anordnung der Einführöffnungen, wobei die Einführöffnungen in einem Kreisbogen und zusätzlich in eine Vorzugsrichtung verschoben, angeordnet werden.

- Die beschriebenen Anordnungen sind von besonderem Vorteil. Insbesondere wenn eine größere
- 25 Menge an Biomasse vorhanden ist und auch unklar ist, wie groß die Zwischenphase sich ausbildet, sind die beschriebenen Ausführungsformen von Vorteil. Hierdurch gelingt es insbesondere Zwischenräume zwischen den einzelnen Sonden besser abzudecken, beispielsweise auch dann, wenn sich die Phasengrenzen während des Verfahrens verschieben. Auch kann man bei mehreren Sonden, insbesondere bei den beschriebenen Anordnungen flexibler agieren. Zudem ermöglicht eine Vielzahl von
- 30 Sonden, dass das Tauchrohr besser positioniert werden kann, so dass hierdurch die Phasentrennung optimiert werden kann.

- Gemäß einer Ausführungsform können daher die Einführöffnungen für die Sonden in der Wand der Trennvorrichtung in einer axialen Anordnung vorliegen, d.h. eine Verbindungslinie zwischen den einzelnen Einführöffnungen würde eine gerade Linie oder Achse ergeben und eine lineare Anordnung
- 35 würde resultieren.

- Gemäß einer weiteren Ausführungsform können die Einführöffnungen für die Sonden in der Wand der Trennvorrichtung auch in einer radialen Anordnung vorliegen. Bei einer radialen Anordnung der Einführöffnungen für die Sonden wären diese in gleichem oder unterschiedlichem Abstand zueinander auf einem gedachten Kreisbogen beispielsweise auf dem runden Umfang der Trennvorrichtung verteilt.
- 40

Eine radiale Anordnung der Einführöffnungen und damit auch der in den Einführöffnungen vorliegenden Sonden ist vorteilhaft, da eine derartige Verteilung eine besonders vorteilhafte Erfassung und Kontrolle der einzelnen Phasen ermöglicht und damit eine schnellere und robustere Detektion, Regelung und Kontrolle des Verfahrens erfolgen kann.

5

Gemäß einer weiteren Ausführungsform können die Einführöffnungen für die Sonden und damit natürlich auch die in den Einführöffnungen vorliegenden Sonden in der Wand der Trennvorrichtung auch in einer radial versetzten Anordnung vorliegen. Dies bedeutet, dass sich die Einführöffnungen und die Sonden in gleichem oder unterschiedlichem Abstand zueinander auf einem Kreisbogen verteilt befinden und zudem in eine Vorzugsrichtung, beispielweise der Längsachse der Trennvorrichtung in gleichem oder unterschiedlichem Maße verschoben sind. Eine radial versetzte Anordnung der Sonden führt ebenfalls zu einer verbesserten Detektion der Phasen und schnelleren und robusteren Verfahrensregelung und -kontrolle.

10

Es können auch gemischte Anordnungen eingesetzt werden, wobei eine oder mehrere Einführöffnungen für die Sonden und damit auch die Sonden teilweise radial und teilweise axial angeordnet werden. Andere Anordnungen für die Einführöffnungen der Sonden als die oben beschriebenen sind ebenfalls möglich.

20

Die Zahl und Anordnung oder Position der Sonden in der Trennvorrichtung ist in jedem Einzelfall auszuwählen und hängt insbesondere vom Zielprodukt und den vorhandenen Verunreinigungen sowie dem verwendeten wässrigen Zwei-Phasen-System ab, und kann zudem davon abhängen, ob sich eine Zwischenphase bildet oder nicht.

25

Basierend auf der kontinuierlich gemessenen elektrischen Leitfähigkeit kann erfindungsgemäß die Position der beiden Phasen und deren Phasengrenzfläche oder alternativ die Position der beiden Phasen und einer Zwischenphase und deren zwei Phasengrenzflächen bestimmt werden. Um genau zu bestimmen, wo die Phasen in der Trennvorrichtung vorliegen, orientiert man sich beispielweise an sogenannten Sollwerten. Diese sind entweder bereits bekannt oder man kann diese ohne weiteres in Vorversuchen bestimmen.

30

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind beispielhafte elektrische Leitfähigkeiten von leichter Phase, schwerer Phase und Zwischenphase bei einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem und einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem mit und ohne Zellen angegeben:

35

Tabelle 1: Beispielhafte elektrische Leitfähigkeiten bei einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem und einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem mit und ohne Zellen

Phase	Elektrische Leitfähigkeit ohne Zellen	Elektrische Leitfähigkeit mit Zellen
Leichte Phase (Phosphat)	10-25 mS/cm	10-25 mS/cm
Leichte Phase (Citrat)	5-15 mS/cm	5-15 mS/cm

Schwere Phase (Phosphat)	60-80 mS/cm	60-80 mS/cm
Schwere Phase (Citrat)	30-50 mS/cm	30-50 mS/cm
Zwischenphase (Phosphat)	n.a.	40-50 mS/cm
Zwischenphase (Citrat)	n.a.	30-40 mS/cm

- n.a..... nicht verfügbar, eine Zwischenphase tritt nicht auf, beispielweise wenn die Zielkomponente oder Verunreinigungen (z.B. HCP, Wirtszell-DNA) in großen Mengen ausfallen. Das Ausfallen der Komponenten aus der Lösung, kann beispielweise bei hohen Salzgehalten, hohen Polymergehalten, entsprechenden pH-Werten im gewählten wässrigen Zwei-Phasen-System für sensible Komponenten auftreten.

- Wie aus obiger Tabelle 1 ersehen werden kann, hat jede Phase ihren eigenen Bereich für die elektrische Leitfähigkeit. Die in Tabelle 1 angegebenen beispielhaften Werte für die elektrische Leitfähigkeit können als Sollwert-Bereiche für die verwendeten wässrigen Zwei-Phasen-Systeme (ATPSs) dienen.
- Beispielweise kann bei einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem der Bereich für die elektrische Leitfähigkeit bei der leichten Phase in einem Sollwert-Bereich von 10-25 mS/cm liegen und für die schwere Phase in einem Sollwert-Bereich von 60-80 mS/cm. Der Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit für die leichte Phase eines wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystems kann beispielweise bei 5-15 mS/cm liegen und der schweren Phase bei 30-50 mS/cm.

- Die Wertebereiche für die elektrische Leitfähigkeit in den einzelnen Phasen sollten durch das Vorhandensein von Zellen in den einzelnen Phasen eigentlich nicht verändert werden. Bei Vorliegen von Zellen kann jedoch eine Zwischenphase auftreten, deren elektrische Leitfähigkeit in einem Zwei-Phasen-Phosphatsystem im Bereich von 40-50 mS/cm und im Zwei-Phasen-Citratsystem im Bereich von 30-40 mS/cm liegt.

- Die in Tabelle 1 angegebenen Leitfähigkeitsbereiche belegen, dass zwischen den einzelnen Phasen in einem wässrigen Zwei-Phasen-System ein ausreichend großer Unterschied vorliegt, um die jeweiligen Phasen anhand ihrer elektrischen Leitfähigkeitswerte eindeutig bestimmen zu können, so dass eine Phasentrennung aufgrund der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit möglich ist.

- Die in Tabelle 1 angegebenen Sollwerte hängen vom jeweiligen Polymer (den jeweiligen Polymeren), dem verwendeten Salz (den verwendeten Salzen) und der jeweiligen Konzentration ab, so dass diese Sollwert-Bereiche in erster Linie nur zur Orientierung dienen und sich im Einzelfall auch deutlich von den angegebenen Bereichen unterscheiden können. Insbesondere das Vorliegen von leitfähigkeits-senkenden Biopartikeln (wie z.B. Zellen) kann dazu führen, dass eine deutlich reduzierte elektrische Leitfähigkeit, als zu erwarten wäre, vorliegt.

- Für den Fachmann ist es ohne weiteres möglich, ein Zwei-Phasen-System auszuwählen, dass für die Reinigung und Anreicherung eines gewünschten Zielprodukts geeignet ist. Vorteilhafterweise liegt zwischen der abzutrennenden Phase mit dem Zielprodukt und der Gegenphase oder zwischen der

abzutrennenden Phase mit dem Zielprodukt und der Zwischenphase ein feststellbarer Unterschied hinsichtlich der Leitfähigkeitswerte vor.

5 Gemäß einer Ausführungsform sind die Unterschiede der elektrischen Leitfähigkeiten von den zu trennenden Phasen beispielsweise größer als das 10fache, größer als das 9fache, größer als das 8fache, größer als das 7fache, größer als das 6fache, größer als das 5fache, größer als das 4fache oder größer als das 3fache der Messgenauigkeit der Leitfähigkeit des Leitfähigkeits-Messgerätes. Wenn beispielweise die elektrische Leitfähigkeit der oberen Phase 10 mS/cm beträgt und hierfür ein Fehler für die Messgenauigkeit von 0,15 mS/cm resultiert, so bedeutet das 10fache der Messgenauigkeit 10 x 0,15 mS/cm = 1,5 mS/cm. Der Unterschied der elektrischen Leitfähigkeiten zwischen leichter Phase und schwerer Phase wäre daher in diesem Fall größer als 1,5 mS/cm.

Ein derartig geringer Unterschied bei der elektrischen Leitfähigkeit zwischen leichter und schwerer Phase kann bei Polymer/Polymer-Phasensystemen (ATPS) vorliegen.

15 Bei Polymer/Salz-Systemen (ATPS) kann man als Faustregel einen Unterschied für die elektrischen Leitfähigkeiten zwischen leichter und schwerer Phase von mehr als 2 mS/cm angeben. Ein derartiger Unterschied liegt aber in sämtlichen bekannten Polymer/Salz-ATPS-Systemen regelmäßig vor, da die Polymer-Phase mit einer geringen Leitfähigkeit und die salzreiche Phase mit einer hohen Leitfähigkeit der zwei Phasen durch die hohen Konzentrationen von Polymer bzw. Salz entstehen, so dass stets ein ausreichender Unterschied der elektrischen Leitfähigkeiten beider Phasen erhalten wird.

Um zu bestimmen, wo die jeweiligen Phasen in der Trennvorrichtung vorliegen, kann wie folgt vorgegangen werden:

25 Gemäß einer Ausführungsform kann in einem kontinuierlichen System der Sollwert-Bereich für die leichte Phase wie folgt überwacht und angesteuert werden:

30 Das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase in der Trennvorrichtung ergibt einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit. Dieser Wert wird mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit verglichen. Der Sollwert-Bereich ist derjenige Bereich, der für die leichte Phase zu erwarten ist. Der Sollwert-Bereich bei einer leichten Phase in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem beträgt beispielweise 10-25 mS/cm, wie in Tabelle 1 angegeben. D.h. die Sonde in der leichten Phase misst an der Position, an der sich diese befindet, eine elektrische Leitfähigkeit im Bereich von 10 bis 25 mS/cm. Wenn die Messung der elektrischen Leitfähigkeit nun ergibt, dass dieser Bereich überschritten wird, d.h. die elektrische Leitfähigkeit über 25 mS/cm oder sogar deutlich darüber liegt, bedeutet dies, dass die Sonde in der leichten Phase beginnt die höhere elektrische Leitfähigkeit einer Zwischenphase von 40-50 mS/cm oder sogar der schweren Phase von 60-80 mS/cm zu messen. Die Zwischenphase und möglicherweise auch schwere Phase beginnen sich daher in der Trennvorrichtung aufzustauen. Damit die Sonde wieder in der leichten Phase vorliegt, wird daher schwere Phase und/oder Zwischenphase aus der Trennvorrichtung entnommen, d.h. es wird im konti-

- nuierlichen Betrieb beispielsweise die Entnahmegeschwindigkeit der schweren Phase erhöht. Dies geschieht so lange, bis sich die Phasengrenzfläche nach unten bewegt und damit die gemessene Leitfähigkeit der leichten Phase wieder im Sollwert-Bereich liegt. Ebenso kann auch die Entnahmegeschwindigkeit der leichten Phase aus der Trennvorrichtung vermindert werden oder ganz gestoppt werden, wobei beispielsweise der obere Auslass gedrosselt oder geschlossen werden kann.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann in einem kontinuierlichen System der Sollwert-Bereich für die schwere Phase wie folgt überwacht und angesteuert werden:

- Das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase in der Trennvorrichtung ergibt einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit. Dieser Wert wird mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit verglichen. Der Sollwert-Bereich ist derjenige Bereich, der für die schwere Phase zu erwarten ist. Der Sollwert-Bereich bei einer schweren Phase in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem beträgt beispielsweise 60-80 mS/cm. D.h. die Sonde in der schweren Phase misst eine elektrische Leitfähigkeit im Bereich von 60 bis 80 mS/cm. Wenn die Messung der elektrischen Leitfähigkeit nun ergibt, dass dieser Bereich unterschritten wird, d.h. unter 60 mS/cm oder sogar deutlich darunter liegt, bedeutet dies, dass die Sonde in der schweren Phase beginnt, die niedrigere elektrische Leitfähigkeit einer Zwischenphase von 40-50 mS/cm oder sogar der leichten Phase von 10-25 mS/cm zu messen. Die leichte Phase oder Zwischenphase nähert sich daher der Position der Sonde für die schwere Phase. Damit die Phasengrenzfläche steigt und die Sonde wieder in der schweren Phase vorliegt, kann beispielsweise die Entnahmegeschwindigkeit der schweren Phase aus der Trennvorrichtung verringert werden. Alternativ kann die Entnahme der schweren Phase gänzlich gestoppt werden.
- Es besteht auch die Möglichkeit, zusätzliches Zwei-Phasen-System zuzugeben, d.h. die Durchflussmenge an zugeführtem Zwei-Phasen-System zu erhöhen, wodurch der Flüssigkeitsspiegel in der Trennvorrichtung wieder ansteigt. Dies geschieht so lange, bis die gemessene Leitfähigkeit der schweren Phase wieder im Sollwert-Bereich liegt.
- Die Steuerung und Kontrolle der Entnahme der Phasen aus der Trennvorrichtung kann durch die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer erfolgen, wobei die Entnahme einer Phase auch ganz unterbrochen werden kann. Dem Fachmann im Stand der Technik sind Maßnahmen und Vorrichtungen hierfür geläufig. Beispielsweise kann die Steuerung und Kontrolle der Entnahme der Phasen durch Schwerkraft oder unter Verwendung von Über- oder Unterdruck, beispielsweise Vakuum, erfolgen. Über- oder Unterdruck bzw. Vakuum können in beliebiger Weise erzeugt werden. Es können auch eine oder mehrere Pumpen zum Einsatz kommen. Entnahme-Vorrichtungen zur Änderung der Entnahmemenge sind beispielsweise Ventile, Durchflussbegrenzer, Schlauchquetschklemmen und dergleichen, die auch zum vollständigen Beenden oder Unterbrechen der Entnahme einer Phase eingesetzt werden können. Entnahme-Vorrichtungen zur Änderung der Entnahmegeschwindigkeit sind beispielsweise Pumpen. Andere als die beschriebenen Maßnahmen und Vorrichtungen sind ebenfalls möglich.

Zusätzlich kann auch ein Tauchrohr als zusätzlicher Auslass für eine Phase eingesetzt werden. Diese Ausführungsform der Erfindung wird noch im Einzelnen erläutert werden.

5 Durch Messung der elektrischen Leitfähigkeiten der Phasen kann daher sowohl das Absinken als auch Ansteigen der einzelnen Phasen und der Phasengrenzflächen in der Trennvorrichtung überwacht und gesteuert werden. Das Ansteigen der Phasen kann durch ein Aufstauen von ein oder mehreren Phasen oder durch die kontinuierliche Zufuhr von weiterem zu trennendem wässrigen Zwei-Phasen-System herrühren. Das Absinken der Phasen kann auf die Entnahme der Phasen zurückge-
10 hen. Im kontinuierlichen Verfahren wird daher ein Gleichgewicht zwischen zugeführten und abgeführten Phasen eingestellt, wobei hierzu die Überwachung der elektrischen Leitfähigkeit eingesetzt wird. Es wird daher ein sehr flexibles Kontroll- und Steuersystem bereitgestellt, das bei Phasen(volumen)änderungen in der Trennvorrichtung unmittelbar eingreifen kann und auch bei einer kontinuierlichen Extraktion zuverlässig arbeitet.

15 In Schritt f. erfolgt dann das Trennen der Phasen anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit durch Entnehmen der Phasen aus der Trennvorrichtung. Das Abtrennen der Phasen kann kontinuierlich oder diskontinuierlich durch Entnehmen der jeweiligen Phasen aus der Trennvorrichtung anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit erfolgen. Der Ausdruck "Entnehmen der jeweiligen Phase
20 anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit" bedeutet, dass die jeweilige abzutrennende Phase basierend auf oder durch ihre gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte an einer oder mehreren Positionen in der betreffenden Phase identifiziert und daher aus der Trennvorrichtung gezielt entnommen werden kann. Die Entnahme der Phase wird daher durch die Messung der elektrischen Leitfähigkeit überwacht. Die vorliegende Erfindung verknüpft daher die bekannte Höhe der Messposition
25 sowie die Leitfähigkeitsinformationen einer oder mehrerer Sonden zum aktiven Steuern der Phasengrenze in der Trennvorrichtung.

Gemäß einer Ausführungsform wird in der Trennvorrichtung ein Auslass vorgesehen und das Entnehmen zumindest einer der Phasen aus der Trennvorrichtung durch den Auslass gemäß Schritt f.
30 durch Schwerkraft oder unter Verwendung von Über- oder Unterdruck durchgeführt, wobei eine Pumpe zum Einsatz kommen kann. Dies kann beispielsweise bei einem diskontinuierlich betriebenen System der Fall sein. Wenn nur eine Charge an Material über eine wässrige Zwei-Phasen-Extraktion aufgetrennt werden soll, kann beispielsweise nur ein Auslass vorliegen, der im unteren Teil der Trennvorrichtung vorgesehen sein kann.

35 Es können auch mindestens 2 Auslässe in der Trennvorrichtung vorliegen; dies kann beispielweise bei einem kontinuierlich betriebenen System der Fall sein. Es können auch drei oder mehr Auslässe in der Trennvorrichtung vorliegen.

40 In einem kontinuierlichen Verfahren können gemäß einer Ausführungsform 2 Auslässe vorgesehen werden, ein oberer Auslass, der im oberen Teil der Trennvorrichtung angeordnet ist, und ein unterer

Auslass der im unteren Teil der Trennvorrichtung angeordnet ist. Ein Auslass ist eine Öffnung, durch welche die Flüssigkeit austritt. Dieser kann beliebig ausgestaltet sein. Der Auslass kann stufenlos oder in Stufen verschliessbar sein, beispielsweise durch ein Ventil, einen Durchflussbegrenzer oder eine Schlauchquetschklemme und dergleichen.

5

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird in der Trennvorrichtung ein oberer Auslass zum Entnehmen der leichten Phase aus der Trennvorrichtung unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck vorgesehen, wobei auch eine Pumpe zur Erzeugung von Über- oder Unterdruck zum Einsatz kommen kann; und in der Trennvorrichtung wird ein unterer Auslass zum Entnehmen der schweren Phase aus der Trennvorrichtung unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck vorgesehen, wobei auch eine Pumpe zur Erzeugung von Über- oder Unterdruck zum Einsatz kommen kann. Dies wird noch im Einzelnen erläutert.

10

Gemäß einer Ausführungsform erfolgt das Entfernen einer Phase gemäß Schritt f. im kontinuierlichen Betrieb durch ein höhenverstellbares Tauchrohr, das eine Öffnung aufweist, die in die zu entnehmende Phase eingetaucht wird, wobei

15

- das Tauchrohr mit einem unteren Auslass derart verbunden wird, dass durch die Öffnung im Tauchrohr die Phase unter Schwerkraft zum Auslass abfließen kann; oder
- das Tauchrohr eine Öffnung (192) aufweist, durch die das Entnehmen der Phase unter Verwendung von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer Pumpe durchgeführt wird.

20

Gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung kann ein Auslass derart ausgestaltet sein, dass dieser ein höhenverstellbares Tauchrohr darstellt, wobei im Tauchrohr eine Öffnung zum Entnehmen einer Phase vorgesehen wird. Unter einem „Tauchrohr“ wird ein Rohr verstanden, das in die Trennvorrichtung von oben eingeführt wird und durch eine im Tauchrohr vorliegende Öffnung Flüssigkeit einer Phase abfließen oder abgezogen werden kann. Das Rohr taucht derart in die betreffende Phase ein, dass die Phase mit der Öffnung im Tauchrohr aus der Trennvorrichtung entnommen werden kann. Dies kann entweder passiv geschehen, indem die Phase durch Schwerkraft austritt, oder dies kann aktiv erfolgen, indem Druck, insbesondere Unterdruck, an das Tauchrohr angelegt wird oder die entsprechende Phase durch eine Pumpe, die am Tauchrohr angeschlossen ist, abgepumpt wird. Das Tauchrohr dient zur Einstellung der Phasenposition(en) und Position(en) der Phasengrenzfläche(n).

25

30

Das Tauchrohr stellt daher einen in der Trennvorrichtung vorliegenden Auslass dar. Das kontinuierliche oder auch diskontinuierliche Entnehmen der Phasen in der Trennvorrichtung gemäß Schritt f. kann hierbei über ein höhenverstellbares Tauchrohr und damit einer höhenverstellbaren Öffnung im Tauchrohr durchgeführt werden.

35

Das Tauchrohr kann zum Entnehmen der leichten Phase, der schweren Phase oder der Zwischenphase eingesetzt werden. Das Tauchrohr kann kontinuierlich oder diskontinuierlich eingesetzt werden.

40

Auch eine semi-kontinuierliche Arbeitsweise ist möglich, wobei kontinuierliche Abschnitte und diskontinuierliche Abschnitte sich abwechseln können.

- Das Tauchrohr kann beispielsweise zur Beibehaltung eines kontinuierlichen Verfahrens eingesetzt werden, wobei das eingestellte Gleichgewicht von zugeführter und abgeführter Phase(n) in der Trennvorrichtung auch durch Einsatz des Tauchrohrs aufrechterhalten wird. Das Tauchrohr kann auch zur Beseitigung von vorübergehenden Störungen, beispielsweise das Anstauen einer der Phasen in der Trennvorrichtung, eingesetzt werden und sorgt dann für ein Abfließen lassen der angestauten Phase.
- 10 Das Tauchrohr taucht in der Trennvorrichtung in eine der zwei oder drei Phasen ein, wodurch die im Tauchrohr vorhandene Öffnung es ermöglicht, dass diese Phase durch die Öffnung entnommen werden kann. Das Abfließen kann einfach durch Schwerkraft erfolgen; dann ist das Tauchrohr mit Öffnung eine Art Überlaufventil. Die Phase kann durch die Öffnung im Tauchrohr aber auch aktiv entnommen werden, zum Beispiel unter Einsatz von Über- oder Unterdruck bzw. Vakuum. Es kann auch
- 15 eine Pumpe eingesetzt werden. Wenn das Tauchrohr unter Verwendung von Schwerkraft als Überlaufventil im kontinuierlichen Betrieb arbeitet, ist es bei Entnahme der leichten Phase durch das Tauchrohr zweckmäßig, wenn ein unterer Auslass in der Trennvorrichtung geöffnet wird. Bei Entnahme der schweren Phase durch das Tauchrohr ist es zweckmäßig, wenn ein oberer Auslass in der Trennvorrichtung geöffnet wird.
- 20 Die Öffnung im Tauchrohr kann permanent offen sein; es könnte auch ein Verschluss für die Öffnung, wie ein Deckel oder Ventil, vorgesehen werden.
- Die Höhenverstellbarkeit des Tauchrohrs bedeutet, dass das Tauchrohr in der Trennvorrichtung nach oben und unten bewegt werden kann und so in eine der zwei oder drei Phasen eingetaucht werden kann, so dass gezielt eine der Phasen mit dem Tauchrohr entnommen wird. Zusätzlich kann das Tauchrohr während der Extraktion herauf und herunter bewegt werden, um auf Veränderungen der Phasen zu reagieren, damit beispielsweise die Öffnung im Tauchrohr die Phase nicht verlässt und durch die vorhandene Öffnung nur die gewünschte Phase entnommen wird.
- 30 Das „Hochfahren“ oder „Hochbewegen“ des Tauchrohrs wird synonym verwendet und bedeutet, dass das Tauchrohr, während es in Betrieb ist, nach oben nachpositioniert oder nachjustiert wird, damit das Tauchrohr in der Phase bleibt, aus der es Phasenflüssigkeit entnehmen soll, und so die Phasenflüssigkeit nach wie vor entnommen werden kann. Das Tauchrohr kann auch vollständig hochgefahren oder hochbewegt werden. Dann befindet sich dessen Öffnung beispielsweise oberhalb des Flüssigkeitsspiegels oder dessen Öffnung ist so weit hochgefahren bis keine Flüssigkeit mehr aus dieser ausströmen kann. Das vollkommene Hochfahren des Tauchrohrs kann beispielsweise zu Beginn des Extraktionsverfahrens der Fall sein und zum Ende des Extraktionsverfahrens durchgeführt werden.
- 35 Das „Herunterfahren“ oder „Herunterbewegen“ des Tauchrohrs wird synonym verwendet und bedeutet, dass das Tauchrohr, während es in Betrieb ist, nach unten positioniert oder nachjustiert wird, da-
- 40

mit das Tauchrohr in der Phase bleibt, aus der es Phasenflüssigkeit entnehmen soll, und die Phasenflüssigkeit nach wie vor entnommen werden kann.

- Der Ausdruck, dass „das Tauchrohr nach oben oder unten nachpositioniert oder nachjustiert wird“, bedeutet, dass das Tauchrohr aufgrund einer Änderung der Phasengrenzfläche(n) in der Trennvorrichtung dabei ist die betreffende Phase zu verlassen, so dass die Höhe bzw. Eintauchtiefe des Tauchrohrs entsprechend angepasst werden muss, um nach wie vor oder wieder in die betreffende Phase einzutauchen, damit diese abfließen oder abgezogen werden kann.
- 10 Die Steuerung der Höhenverstellung des Tauchrohrs, zum Beispiel mit Hilfe eines Schrittmotors, kann dabei unmittelbar über die gemessenen Werte der elektrischen Leitfähigkeit erfolgen. Im kontinuierlichen Betrieb ist das Tauchrohr in der Regel ständig im Einsatz. Wenn Störungen im kontinuierlichen Betrieb auftreten, kann der Betrieb des Tauchrohrs unterbrochen werden oder das Tauchrohr kann auch erst zum Einsatz kommen, um die Phasengrenzfläche(n) oder den Füllstand ansteigen oder
- 15 absinken zu lassen. Insbesondere zu Beginn des Extraktionsverfahrens (Anfahren) und zum Ende des Extraktionsverfahrens (Abfahren) ist das Tauchrohr in der Regel nicht in Betrieb, d.h. es wird keine Flüssigkeit mit der Öffnung im Tauchrohr entnommen.

- Es kann somit durch Entnahme einer oder mehrerer Phasen ein gezieltes Absenken der Phasengrenzflächenposition und damit natürlich auch der Phasenpositionen durchgeführt werden.
- 20

- Das Zielprodukt kann sich in der leichten oder schweren Phase befinden. Je nach Ausführungsform kann das Tauchrohr dafür eingesetzt werden, die Phase mit oder ohne Zielprodukt aus der Trennvorrichtung zu entnehmen.
- 25

- Es kann mit dem Tauchrohr auch eine eventuell vorhandene Zwischenphase aus der Trennvorrichtung entnommen werden. Wenn gleichzeitig eine der Phasen und die Zwischenphase entnommen werden sollen, beispielsweise weil sich das Zielprodukt in der anderen Phase befindet, könnten auch zwei Phasen gleichzeitig mit dem Tauchrohr aus der Trennvorrichtung entnommen werden. Die Öffnung des Tauchrohrs könnte hierzu an der Phasengrenzfläche positioniert werden.
- 30

- Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, wenn das Tauchrohr aus einem Innenrohr aufgebaut ist, das eine Öffnung umfasst, und das Innenrohr von einem Außenrohr in Form eines Hüllrohrs oder Überrohrs umgeben wird. Das Überrohr ist beispielsweise fest installiert und nicht beweglich, wohingegen
- 35 das Innenrohr nach oben und unten beweglich ist. Das Überrohr kann aber auch beweglich ausgebildet sein. Das Überrohr wie auch das Innenrohr kann aus einem beliebigen Material gefertigt sein, solange es die Flüssigkeiten, die entnommen werden sollen, nicht nachteilig beeinflusst. Beispielsweise sind rostfreier Stahl, Kunststoff oder Glas möglich.

- 40 Das Überrohr weist ein oberes Ende und ein unteres Ende auf, welche die Länge des Überrohrs definieren. Die Länge des Überrohrs ist generell beliebig wählbar. Je nachdem welche Phase entnommen

werden soll, kann die Länge des Überrohrs gewählt werden. Zudem kann ein sich von oben nach unten erstreckendes Überrohr oder auch ein sich von unten nach oben erstreckendes Überrohr zum Einsatz kommen.

- 5 Bei einem Tauchrohr mit einem sich von oben nach unten erstreckenden Überrohr ist es zweckmäßig, wenn mit diesem die schwere oder, sofern vorhanden, die Zwischenphase entnommen wird. In diesem Fall befindet sich das obere Ende des Überrohrs zweckmäßigerweise oberhalb der leichten Phase, insbesondere oberhalb des Flüssigkeitsspiegels (= der Flüssigkeitsspiegel der leichten Phase) in der Trennvorrichtung, d.h. das Überrohr ist oberhalb der Trennvorrichtung, insbesondere über oder an
- 10 der oberen Wand der Trennvorrichtung, beispielweise der Außen- oder Innenseite der Wand, angebracht und reicht ins Innere der Trennvorrichtung. Das untere Ende des Überrohrs reicht (von oben gesehen) in die schwere Phase oder sofern vorhanden in die Zwischenphase, je nachdem welche der Phasen entnommen werden soll.
- 15 Gemäß einer Ausführungsform umfasst das Tauchrohr daher ein sich von oben nach unten erstreckendes Überrohr, dessen oberes Ende sich oberhalb der leichten Phase befindet und deren unteres Ende sich in der schweren Phase befindet.

- Bei einem Tauchrohr mit einem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr ist es zweckmäßig,
- 20 wenn mit diesem die leichte oder, sofern vorhanden, die Zwischenphase entnommen wird. In diesem Fall befindet sich das untere Ende des Überrohrs zweckmäßigerweise unterhalb der schweren Phase in der Trennvorrichtung, d.h. das Überrohr ist unterhalb der Trennvorrichtung, insbesondere unter oder an der unteren Wand der Trennvorrichtung, beispielweise der Außen- oder Innenseite des Bodens der Trennvorrichtung, angebracht und reicht ins Innere der Trennvorrichtung hinein. Das obere
- 25 Ende des Überrohrs reicht (von unten gesehen) in die leichte Phase oder, sofern vorhanden, in die Zwischenphase, je nachdem welche der Phasen entnommen werden soll.

- Gemäß einer Ausführungsform umfasst das Tauchrohr daher ein sich von unten nach oben erstreckendes Überrohr, dessen oberes Ende sich unterhalb der schweren Phase befindet und deren obere
- 30 Ende sich in der leichten Phase befindet.

- In einer Ausführungsform ist das höhenverstellbare Tauchrohr daher aus einem höhenverstellbaren Innenrohr und einem Überrohr ausgebildet, wobei das Überrohr sich von oben nach unten oder von unten nach oben erstrecken kann. Das Innenrohr weist eine Öffnung zur Entnahme der entsprechenden Phase auf. Der Durchmesser des Überrohrs ist größer als der Durchmesser des Innenrohrs, so
- 35 dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr und Überrohr gebildet wird. Das Innenrohr wird daher vom Überrohr umgeben, so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr und Überrohr ausgebildet wird.

- 40 Das Tauchrohr kann in einer Ausführungsform mit dem unteren Auslass derart verbunden werden, dass durch die Öffnung im Tauchrohr die Phase unter Schwerkraft zum Auslass abfließen kann. Wenn

das Tauchrohr nun mit Innenrohr und Überrohr als Überlaufventil eingesetzt wird und sich das Innenrohr von oberhalb des Flüssigkeitsspiegels der leichten Phase bis in den unteren Auslass erstreckt, ist das Überrohr in der Trennvorrichtung kürzer als das Innenrohr, da sich das Innenrohr über die gesamte Höhe der Trennvorrichtung erstreckt. Das Innenrohr befindet sich dann nur teilweise innerhalb des Überrohrs und kann dort herauf- und herunterbewegt werden. Vorteilhafterweise wird die Öffnung des Innenrohrs nur innerhalb des Überrohrs bewegt.

Wenn das Tauchrohr mit Innenrohr und Überrohr so eingesetzt wird, dass aktiv die Phase entnommen wird, beispielsweise durch Anlegen von Unterdruck an das Innenrohr, dann ist das Überrohr ein Saugrohr und es ist in der Trennvorrichtung länger als das Innenrohr. Das Innenrohr befindet sich gänzlich innerhalb des Überrohrs und kann dort herauf- und herunterbewegt werden. Vorteilhafterweise wird die Öffnung des Innenrohrs nur innerhalb des Überrohrs bewegt.

Sämtlichen Ausführungsformen des Tauchrohrs mit Überrohr ist gemeinsam, dass in jedem Fall das Überrohr so gebildet wird, dass es über die Öffnung des Innenrohrs hinausragt. Die Öffnung des Innenrohrs befindet sich somit innerhalb des Überrohrs. Die Länge des Überrohrs kann hierbei je nachdem, welche Phase entnommen werden soll, variiert werden. Wie weit das Überrohr über die Öffnung des Innenrohrs hinausragt, hängt vom Einzelfall ab und kann vom Fachmann in wenigen Versuchen ermittelt und eingestellt werden.

Der Durchmesser des Überrohrs wird größer eingestellt als der Durchmesser des Innenrohrs, so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr und Überrohr gebildet wird. In diesen Zwischenraum strömt die Phase, in die das Überrohr reicht, hinein und kann vom Zwischenraum zur Öffnung im Innenrohr gelangen, wo die Phasenflüssigkeit dann austreten kann. Die Phasenflüssigkeit gelangt daher nicht direkt zur Öffnung im Innenrohr, sondern nur über den Zwischenraum, so dass das Überrohr einen Zulaufschutz darstellt.

Beim dem sich von oben nach unten erstreckenden Überrohr, das beispielsweise in die schwere Phase reicht, steigt die schwere Phase im Zwischenraum hoch und gelangt erst dann zur Öffnung im Innenrohr. Da sich das Überrohr über die Öffnung des Innenrohrs hinaus erstreckt, wird damit sichergestellt, dass sich eine oberhalb des unteren Endes des Überrohrs vorliegende Phase, hier: die Zwischenphase und die leichte Phase, nicht ohne weiteres zur Öffnung gelangen können.

Beim dem sich von oben nach unten erstreckenden Überrohr, das beispielsweise in die Zwischenphase reicht, steigt die Zwischenphase im Zwischenraum hoch und gelangt erst dann zur Öffnung im Innenrohr. Da sich das Überrohr über die Öffnung des Innenrohrs hinaus erstreckt, wird damit sichergestellt, dass sich eine oberhalb des unteren Endes des Überrohrs vorliegende Phase, hier: die leichte Phase, nicht ohne weiteres zur Öffnung gelangen kann.

Beim dem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr, das beispielsweise in die leichte Phase reicht, fließt die leichte Phase durch Schwerkraft in den Zwischenraum zwischen Innen- und Überrohr

hinein und gelangt erst dann zur Öffnung im Innenrohr. Da sich das Überrohr über die Öffnung des Innenrohrs hinaus erstreckt, wird damit sichergestellt, dass sich eine unterhalb des oberen Endes des Überrohrs vorliegende Phase, hier: die Zwischenphase und die schwere Phase, nicht ohne weiteres zur Öffnung gelangen können. Das Überrohr verlängert daher den Weg der unerwünschten Phase(n) zu Öffnung.

Beim dem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr, das beispielweise in die Zwischenphase reicht, fließt die Zwischenphase durch Schwerkraft in den Zwischenraum hinein, der sich füllt, und gelangt erst dann zur Öffnung im Innenrohr. Da sich das Überrohr über die Öffnung des Innenrohrs hinaus erstreckt, wird damit sichergestellt, dass sich eine unterhalb des oberen Endes des Überrohrs vorliegende Phase, hier: die schwere Phase, nicht ohne weiteres zur Öffnung gelangen kann.

Die verschiedenen Varianten des Überrohrs können jeweils mit den Ausführungsformen des Innenrohrs kombiniert werden, wobei je nachdem welche Phase entnommen werden soll und je nachdem wo sich das Zielprodukt befindet, eine geeignete Ausführung gewählt werden kann.

Der Durchmesser des Überrohrs ist nur insofern von Bedeutung, als der Durchmesser des Überrohrs größer ist als der Durchmesser des Innenrohrs. Die Durchmesser von Überrohr und Innenrohr werden daher je nach Ausführungsform ausgewählt. Die jeweiligen Durchmesser von Innenrohr und Überrohr und damit die Größe des gebildeten Zwischenraums spielen keine große Rolle, da die Phasenflüssigkeit bei Eintauchen des Überrohrs in die Phase in jedem Fall im Zwischenraum hochsteigen wird bzw. in diesen hineinfließen wird. Die gewünschte Geschwindigkeit des Einströmens der Phasenflüssigkeit in den Zwischenraum, indem der Abstand zwischen Innen- und Überrohr variiert wird, um eine geeignete Größe für den Zwischenraum zu jedem Anwendungsfall einzustellen, kann beispielweise durch wenige orientierende Versuche optimiert werden.

Der Durchmesser des Überrohres und damit der Abstand zum Innenrohr kann daher beliebig gewählt werden und vom Fachmann im Stand der Technik für den jeweiligen Anwendungsfall ausgewählt werden. Dieser beträgt beispielsweise: (für DN50) 10 mm für das Innenrohr und 20 mm für das Überrohr oder (für DN150): 35 mm für das Innenrohr und 60 mm für das Überrohr.

Wenn das Überrohr nicht beweglich, sondern starr ausgebildet wird, ist es zweckmäßig vor Beginn der Extraktion festzulegen, welche Phase mit dem Tauchrohr entnommen werden soll, da die Länge des Überrohrs bestimmt, in welche Phase dieses eintaucht und das Überrohr während des Betriebs nicht ohne weiters ausgetauscht werden kann.

Wenn das Überrohr beweglich ausgebildet wird, kann diese auch während der Extraktion in der Länge verändert werden, wenn dies erforderlich wird.

Das Überrohr überragt daher die Öffnung im Innenrohr, so dass das Überrohr als zusätzlicher Zulaufschutz dient, damit nur die Phase, in die das Überrohr reicht, in den Zwischenraum zwischen Innen-

und Überrohr einströmen kann und nur diese Phase auch aus der Öffnung im Innenrohr austreten kann.

5 Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die Länge des Überrohrs und dessen Durchmesser derart gewählt, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen oder halbfesten Bestandteilen aus der Phase, in die das Überrohr eintaucht, zur Öffnung im Innenrohr des Tauchrohrs verhindert wird. Das Überrohr ermöglicht damit den Zutritt von Flüssigkeit zur Öffnung des Innenrohrs, schirmt die Öffnung aber gegen Schwebstoffe und größere Bestandteil ab. Dies hat den Vorteil, dass hierdurch unerwünschte Komponenten, wie beispielsweise Schwebstoffe, Flocken und dergleichen
10 durch das Überrohr zurückgehalten werden, und so nicht in die Öffnung gelangen, um diese zu verstopfen.

15 Gemäß einer Ausführungsform fungiert das Tauchrohr sowohl mit als auch ohne Überrohr als Überlaufventil, d.h. die Phasenflüssigkeit kann aus der Öffnung unter Schwerkraft ausfließen. Das Tauchrohr ist in dieser Ausführungsform mit oder ohne Überrohr mit dem unteren Auslass derart verbunden, dass nur durch die Öffnung im Tauchrohr Flüssigkeit durch den unteren Auslass ausfließen kann, aber nicht direkt aus der Trennvorrichtung Flüssigkeit in den unteren Auslass strömen kann. Das Tauchrohr ist derart mit dem unteren Auslass verbunden, dass eine flüssigkeitsdichte Verbindung vorliegt, bei der das Tauchrohr aber noch hoch- und herunterbewegt werden kann, ohne die Verbindung mit dem
20 Auslass zu beeinträchtigen. Derartige Verbindungen sind dem Fachmann bekannt und müssen nicht im Einzelnen erläutert werden.

Das Tauchrohr befindet sich dann in Betrieb, wenn Flüssigkeit aus der Trennvorrichtung durch die Öffnung des Tauchrohrs entnommen oder abgezogen wird. Das Tauchrohr befindet sich dann nicht in
25 Betrieb, wenn keine Flüssigkeit aus der Trennvorrichtung durch die Öffnung im Tauchrohr entnommen oder abgezogen wird.

Aufgrund der Beweglichkeit des Innenrohrs, könnte dieses auch aus dem Überrohr hinausbewegt werden; hierdurch würden die Vorteile des Überrohrs jedoch nicht mehr vorliegen, so dass dies vermieden wird. Einzelheiten zum Überrohr werden bei den Figuren 2 bis 4 nochmals erläutert.
30

Gemäß einer weiteren Ausführungsform werden die in Schritt e. gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte dazu eingesetzt, die Eintauchtiefe des höhenverstellbaren Tauchrohrs durch das Tauchrohr zu steuern.
35

In einem kontinuierlichen Extraktionsverfahren kann das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeiten in der Trennvorrichtung, wie in Schritt e. beschrieben, daher dazu verwendet werden, das höhenverstellbare Tauchrohr anzusteuern und dessen Höhe bzw. Eintauchtiefe in Abhängigkeit von der Lage der Phasengrenzfläche und/oder der Phasen zu regulieren, so dass durch die im Tauchrohr vorhandene Öffnung die gewünschte Phase entnommen werden kann. Dies kann in Echtzeit erfolgen, so dass die Höhenverstellung des Tauchrohrs automatisch in Abhängigkeit von den gemessenen
40

Werten für die elektrische Leitfähigkeit und damit der Position der jeweiligen Phase und der Position der Phasengrenzfläche(n) erfolgt. Zudem kann die Auslaufgeschwindigkeit im Tauchrohr auch durch die Höheneinstellung variiert werden, da je tiefer die Öffnung des Tauchrohres in der jeweiligen Phase steht, desto schneller die Phase durch Schwerkraft abläuft, da der hydrostatische Druck höher ist.

5

Das Tauchrohr kann daher im kontinuierlichen Verfahren zum Einsatz kommen und dort kontinuierlich eingesetzt werden. Es kann aber auch nur jeweils vorübergehend zum Einsatz kommen und dann während des kontinuierlichen Betriebs die auftretenden Störungen durch sich anstauende Phase über eine begrenzte Einsatzdauer beseitigen. Das Tauchrohr wird dann immer wieder eingesetzt, wenn sich die Störung ausbildet und dies wird so lange wiederholt, bis das Verfahren beendet wird. Das Tauchrohr würde dann diskontinuierlich eingesetzt werden. Dabei fließen die jeweiligen Phasen aus dem oberen und gegebenenfalls unteren Auslass der Trennvorrichtung, beispielsweise angetrieben durch das und gemäß dem Einfließen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) in die Trennvorrichtung, aus der Trennvorrichtung heraus. Das Tauchrohr kann dann als Flüssigkeitsausgleich dienen.

15

Beispielweise können auch 2 untere Auslässe in der Trennvorrichtung vorhanden sein: einer ist mit dem Tauchrohr verbunden, über den anderen kann die schwere Phase aus der Trennvorrichtung gewonnen werden.

20

Die Entnahme der Phasen und damit auch die generelle Verschiebung der Phasengrenzfläche(n) in der Trennvorrichtung nach oben oder unten, wird in der vorliegenden Erfindung anhand der kontinuierlich gemessenen Werte für die elektrische Leitfähigkeit durch ein oder mehrere Sonden überwacht. Die vorliegende Erfindung verknüpft daher die bekannte Höhe der Messposition der ein oder mehreren Sonden und die Leitfähigkeitsinformationen der ein oder mehreren Sonden, um die Phasengrenzflächen(n) in der Trennvorrichtung im kontinuierlichen Betrieb zu bestimmen, aktiv anzusteuern und regeln zu können. Somit kann (können) die Phasengrenzfläche(n) nach oben oder unten nachgeregelt werden. Dies kann ganz allgemein erfolgen durch Kontrolle und Steuerung des zur Trennvorrichtung zulaufenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) und/oder der aus der Trennvorrichtung ablaufenden Phasen (das sind Flüssigkeiten, Suspensionen, Präzipitate und dergleichen, in Form der leichten, schweren und Zwischenphase). Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass die Zuführmenge und/oder Zuführgeschwindigkeit des zulaufenden Zwei-Phasen-Systems (ATPS) (das mit der Ausgangslösung hergestellt wurde) zur Trennvorrichtung variiert werden und/oder die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer von leichter Phase/schwerer Phase/Zwischenphase aus der Trennvorrichtung variiert werden, wobei die Entnahme einer Phase auch ganz unterbrochen werden kann. Dies kann im Einzelnen durchgeführt werden, indem

25

30

35

- die Entnahmegeschwindigkeit für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmegeschwindigkeit für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmemenge für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- 40 - die Entnahmemenge für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmedauer für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;

- die Entnahmedauer für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahme der leichten oder schweren Phase unterbrochen wird;
- die Zuführmenge des in die Trennvorrichtung einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems, mit oder ohne das Zielprodukt, erhöht oder verringert wird;
- 5 - die Zuführgeschwindigkeit des in die Trennvorrichtung einströmendem wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS), mit oder ohne Zielprodukt, erhöht oder verringert wird und/oder
- das Tauchrohr zum Abfließen lassen oder Absaugen einer Phase eingesetzt wird und gegebenenfalls nach oben oder unten nachpositioniert wird.

- 10 Die Zuführmenge und Zuführgeschwindigkeit bzw. Entnahmemenge und Entnahmegeschwindigkeit hängen miteinander zusammen, so dass beispielsweise auch die Durchflussmenge (Volumen pro Zeitspanne oder Menge pro Zeit) erhöht oder verringert werden kann.

- Das Variieren der Zuführmenge/Zuführgeschwindigkeit des zulaufenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems ohne das Zielprodukt stellt beispielsweise eine Spüllösung dar, die insbesondere am Ende der Extraktion zum Einsatz kommen kann, um die leichte Phase oder die schwere Phase aus der Trennvorrichtung zu verdrängen.

- Die oben geschilderten einzelnen Maßnahmen können auch miteinander kombiniert werden. Dies gehört – bis auf das hier beschriebene Tauchrohr - zum Wissen des Fachmanns.

- Bei der Trennvorrichtung können eine oder mehrere Entnahmevorrichtungen und/oder Mittel zur Regelung und/oder Steuerung der Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer von leichter Phase/schwerer Phase/Zwischenphase aus der Trennvorrichtung anhand der Messwerte der elektrischen Leitfähigkeitswerte eingesetzt werden. Diese sind dem Fachmann im Stand der Technik, bis auf die Verwendung eines Tauchrohrs, bekannt und umfassen beispielsweise

- die Verwendung von Schwerkraft in Zusammenhang mit einem oder mehreren Auslässen sowie dem Tauchrohr: beispielsweise Abfließen lassen der schweren Phase am unteren Auslass der Trennvorrichtung oder Verwendung des Tauchrohrs als zusätzlichem Auslass, das dann als Überlaufventil fungiert;
- 30 - Anlegen von Überdruck in Zusammenhang mit einem Einlass, wobei die Stärke des Überdruckes geregelt werden kann (treibende Kraft für das Ausfließen der Phase(n) ist hier Überdruck): beispielsweise Zufuhr des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Druck in die Trennvorrichtung;
- 35 - Anlegen eines Unterdruckes in Zusammenhang mit einem oder mehreren Auslässen sowie dem Tauchrohr, wobei die Stärke des Unterdruckes geregelt werden kann (treibende Kraft für das Ausfließen der Phase(n) ist hier Unterdruck): beispielsweise an einem oder mehreren Auslässen zum Abziehen der leichten und/oder schweren Phase; oder mit dem Tauchrohr als zusätzlichem Auslass, dass dann als Saugrohr fungiert und eine der Phasen absaugt;
- 40 - die Verwendung von ein oder mehreren Pumpen in Zusammenhang mit einem oder mehreren Auslässen sowie dem Tauchrohr, wobei deren Pumpgeschwindigkeit geregelt werden kann

(treibende Kraft für das Ausfließen der Phase(n) ist hier Unterdruck): beispielsweise für die Zufuhr des Zwei-Phasen-Systems zur Trennvorrichtung und/oder die Entnahme an einem oder mehreren Auslässen und/oder durch das Tauchrohr;

und/oder

- 5 - die Verwendung von Entnahme-Vorrichtungen in Zusammenhang mit einem oder mehreren Auslässen, die den Querschnitt eines oder mehrerer Auslässe der Trennvorrichtung regeln und/oder steuern kann, wie regelbare Ventile, regelbare Durchflussbegrenzer, regelbare Schlauchquetschklemmen, regelbare Absperrhähne und dergleichen (dabei kann die treibende Kraft für den Ausfluss aus der Trennvorrichtung die Schwerkraft sein), jeweils an einem
- 10 oder mehreren Auslässen der Trennvorrichtung, beispielsweise zum kontrollierten Ablassen oder Unterbrechen der Entnahme der Phasen an einem oder mehreren Auslässen.

Unter „Regelung und/oder Steuerung der Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer“ der Phasen wird die Beeinflussung der Variation der Menge, Dauer und/oder der Geschwindigkeit der aus dem mindestens einen Auslass oder dem Tauchrohr austretenden Flüssigkeit verstanden. Es umfasst die Kontrolle und Korrektur und/oder Regulierung der Menge, Geschwindigkeit bzw. Dauer der austretenden Flüssigkeit.

15

In einer Ausführungsform kann beispielsweise anhand der Messwerte der elektrischen Leitfähigkeitswerte ein höhenverstellbares Tauchrohr mit Öffnung zum Entnehmen einer Phase unter Verwendung von Schwerkraft (treibende Kraft für das Ausfließen der Phase(n)) eingesetzt werden. Dabei kann die Höhe der Öffnung in der Trennvorrichtung variiert werden, wie bereits im Einzelnen geschildert.

20

Die Höhe der Öffnung des Tauchrohres in der Trennvorrichtung kann stufenlos oder in Schritten verstellt werden. Ebenso kann die Entnahme aus der Trennvorrichtung auch komplett gestoppt werden, wenn die Öffnung des Tauchrohres über die Höhe der leichten Phase oder die Höhe der im Zwischenraum vorliegenden Phasenflüssigkeit eingestellt wird. Die Entnahmegeschwindigkeit aus der Trennvorrichtung ist hierbei aufgrund der Schwerkraft und des hydrostatischen Druckes umso höher je tiefer sich die Öffnung des Tauchrohres in der Trennvorrichtung befindet.

25

Die gemäß der Erfindung verwendeten ein oder mehreren Pumpen können die Entnahmegeschwindigkeit stufenlos oder schrittweise regeln. Ebenso kann eine Regelung und/oder Steuerung der Entnahmegeschwindigkeit durch Ein- und Ausschalten der Pumpe erfolgen (On-/Off-Regelung). Als Pumpen können Förderpumpen zum Fördern von Flüssigkeiten sein oder Vakuumpumpen, die einen Druckunterschied erzeugen.

30

35

Unterdruck kann beispielsweise durch Komprimierung von Luft erzeugt werden. Die Stärke des Unterdruckes, welcher an einem oder mehreren Auslässen der Trennvorrichtung angelegt wird, kann ebenso stufenlos oder schrittweise eingestellt werden oder es erfolgt eine On-/Off-Regelung. Ein Unterdruck kann auch mit einer Pumpe erzeugt werden.

40

Die Ventile, Durchflussregler, Schlauchquetschklemmen, Absperrhähne und dergleichen sind ebenfalls stufenlos oder schrittweise einstellbar, so dass die Entnahme aus der Trennvorrichtung stufenlos oder schrittweise geregelt werden kann. Die Ventile, Durchflussregler, Schlauchquetschklemmen, Absperrhähne können aber auch den Ausfluss aus der Trennvorrichtung durch vollständiges Öffnen oder Schließen regeln und/oder steuern.

Diese hier genannten Entnahme-Vorrichtungen und Mittel, einschließlich des oben beschriebenen Tauchrohrs, durch die die Entnahmemenge, Entnahmedauer und/oder die Entnahmegeschwindigkeit der Phasen aus der Trennvorrichtung gesteuert und/oder geregelt werden können, können auch kombiniert werden, wie der Fachmann ohne weiteres verstehen wird.

So kann beispielsweise die schwere Phase über das Tauchrohr aus der Trennvorrichtung entnommen oder abgezogen werden und die Entnahmemenge und/oder die Entnahmegeschwindigkeit der leichten Phase an einem Auslass kann durch eine Pumpe geregelt und/oder gesteuert werden.

Ganz allgemein kann das Entnehmen der Phasen aus der Trennvorrichtung kontinuierlich als auch diskontinuierlich erfolgen, wobei die Triebkraft für das Ausströmen der Phasenflüssigkeit aus der Trennvorrichtung sind:

- die Schwerkraft;
- ein oder mehrere Pumpen;
- Ansaugen.

Beim kontinuierlichen Verfahren ist darüber hinaus die treibende Kraft für das Ausströmen der einzelnen Phasen aus der Trennvorrichtung auch das Einfließen lassen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) in die Trennvorrichtung. Diese hat einen Einfluss auf die Entnahmegeschwindigkeiten der leichten und schweren Phase und gegebenenfalls der Zwischenphase aus der Trennvorrichtung. Im Gleichgewicht ist die Menge des einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) = der Summe der Mengen der ausströmenden leichten, schweren und gegebenenfalls Zwischenphase aus der Trennvorrichtung. Im Gleichgewicht sollte(n) dadurch auch die Phasengrenzfläche(n) eigentlich konstant in der Mitte der Trennvorrichtung sein. Durch Schwankungen, Störungen und dergleichen kann es nun dazu kommen dass sich die Phasengrenzfläche(n) verschiebt(en). In diesem Fall wird dann eine Regelung vorgenommen.

Gemäß einer Ausführungsform wird die Entnahmemenge einer oder beider Phasen und gegebenenfalls der Zwischenphase aus der Trennvorrichtung geregelt durch:

- die Höhe der Öffnung eines Tauchrohres;
- eine Pumpe, deren Pumpgeschwindigkeit geregelt werden kann;
- Anlegen eines Unterdruckes, wobei die Stärke des Unterdruckes geregelt werden kann;
- ein oder mehrere Entnahme-Vorrichtungen, die den Querschnitt eines oder beider Auslässe der Trennvorrichtung regeln und/oder steuern kann, wie regelbare Ventile, regelbare Durchflussbegrenzer, regelbare Schlauchquetschklemmen, regelbare Absperrhähne und dergleichen.

- Neben den bereits geschilderten Maßnahmen und Vorrichtungen zur Steuerung und Kontrolle der Entnahmegeschwindigkeit bzw. -menge, wird in einer Ausführungsform durch die eingestellte Pumpengeschwindigkeit die Abzugsgeschwindigkeit der Flüssigkeit, beispielsweise der leichten und/oder schweren Phase, geregelt bzw. gesteuert. Für bestimmte besonders empfindliche Zielprodukte kann es vorteilhaft sein, wenn Pumpen zum Einsatz kommen, die eine geringe mechanische Beanspruchung ermöglichen. Dies hat den Vorteil, dass unerwünschte Scherkräfte in den Phasen vermieden werden und so das Verfahren auch für derartige Zielprodukte geeignet ist.
- 5
- 10 Die in Schritt e. gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte können somit dazu eingesetzt werden, die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer einer oder mehrerer Phasen zu regeln und/oder zu steuern, wobei die Entnahme einer Phase auch ganz unterbrochen werden kann, beispielsweise durch die hier beschriebenen Entnahme-Vorrichtungen und/oder Mittel. Hierdurch kann gezielt auf die Position der Phasen und damit der Phasengrenzfläche(n) in der Trennvorrichtung Einfluss genommen werden.
- 15

Für die Position der Leitfähigkeitssonden im Hinblick auf die Position der Öffnung im höhenverstellbaren Tauchrohr können obige Ausführungen zur Position von Sonde/Auslass hier ebenfalls relevant sein: D.h. die Öffnung im Tauchrohr ist nichts anderes als ein Auslass in der Trennvorrichtung.

20

- Wenn das Tauchrohr in der Ausführungsform ohne Überrohr in die schwere Phase eintaucht, um diese zu entnehmen, so kann es zweckmäßig sein, wenn die Öffnung des Tauchrohrs zum Entnehmen der schweren Phase tiefer als die Sonde(n) in der schweren Phase angeordnet werden, d.h. die Position, bei der die Sonde die elektrische Leitfähigkeit misst, befindet sich dann oberhalb der Position, wo sich die Öffnung des Tauchrohrs in der Trennvorrichtung befindet. Damit kann man ein zu starkes Absinken der leichten Phase (oberen Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese über die Öffnung des Tauchrohrs abfließt.
- 25

- Wenn das Tauchrohr in der Ausführungsform ohne Überrohr in die leichte Phase eintaucht, um diese zu entnehmen, so ist es zweckmäßig, wenn die Öffnung des Tauchrohrs zum Entnehmen der leichten Phase höher als die Sonde(n) in der leichten Phase angeordnet werden, d.h. die Position, bei der die Sonde die elektrische Leitfähigkeit misst, befindet sich unterhalb der Position, wo sich die Öffnung des Tauchrohrs in der Trennvorrichtung befindet. Damit kann man ein zu hohes Ansteigen der schweren Phase (untere Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese über die Öffnung des Tauchrohrs abgezogen wird.
- 30
- 35

- Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann bei Verwendung eines Tauchrohrs mit sich von oben nach unten erstreckendem Überrohr bei der Entnahme der schweren Phase durch die Öffnung des Innenrohrs das untere Ende des Überrohrs zum Entnehmen der schweren Phase tiefer als die Sonde(n) in der schweren Phase befindet (befinden), d.h. die Position, bei der die Sonde die elektrische Leitfähigkeit misst, befindet sich oberhalb der Position, wo sich das untere Ende des Überrohrs in der
- 40

Trennvorrichtung befindet. Damit kann man ein zu starkes Absinken der leichten Phase (oberen Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese in den Zwischenraum zwischen Innenrohr und Überrohr eindringen und über die Öffnung des Tauchrohrs abfließen.

5

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann bei Verwendung eines Tauchrohrs mit sich von unten nach oben erstreckendem Überrohr bei der Entnahme der leichten Phase durch die Öffnung des Tauchrohres das obere Ende des Überrohrs zum Entnehmen der leichten Phase höher als die Sonde(n) in der leichten Phase befindet (befinden), d.h. die Position, bei der die Sonde die elektrische Leitfähigkeit misst, befindet sich unterhalb der Position, wo sich das obere Ende des Überrohrs in der Trennvorrichtung befindet. Damit kann man ein zu hohes Ansteigen der schweren Phase (untere Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese in den Zwischenraum zwischen Innenrohr und Überrohr eindringen und über die Öffnung des Tauchrohrs abfließen.

10

15

Die vorliegende Erfindung verknüpft daher die bekannte Höhe der Messposition und die Leitfähigkeitsinformationen einer oder mehrerer Sonden zum aktiven Steuern der Phasengrenze in der Trennvorrichtung. In einer möglichen Ausführung würde(n) im Falle einer liegenden Trennvorrichtung, wie einem Abscheider, mit Tauchrohr, beispielsweise in Form eines Abzugsrohrs oder Überlaufventils, die Phasengrenzfläche(n) nach oben oder unten nachgeregelt werden, indem das Tauchrohr zum Entnehmen einer der Phase automatisch nach oben oder unten nachpositioniert wird.

20

25

Das geschilderte Regulierungs- und Kontrollverfahren, basierend auf den gemessenen Leitfähigkeitswerten, kann daher dazu dienen, sicherzustellen, dass jeweils eine Phase nur über jeweils einen Auslass gezielt entnommen wird, z.B. die leichte Phase nur über den oberen Auslass und die schwere Phase nur über den unteren Auslass der Trennvorrichtung bzw. über die Öffnung des Tauchrohres mit oder ohne Überrohr. Weiterhin kann das Regulierungs- und Kontrollverfahren eingesetzt werden, um ein gezieltes Anheben oder Absenken der Phasengrenzfläche(n) vorzunehmen. Dies ist während einer kontinuierlichen Extraktion besonders vorteilhaft, da hierdurch ein Aufstauen oder Abfallen einzelner Phasen vermieden wird.

30

Zusätzlich oder alternativ zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit kann auch die Trübung gemessen und wie für die elektrische Leitfähigkeit beschrieben eingesetzt werden.

35

Das Regulierungs- und Kontrollverfahren kann manuell, automatisch oder unter Verwendung von Software durchgeführt werden.

40

Zudem kann das gezielte Erhöhen der Phasengrenzflächenposition(en) in der Trennvorrichtung vorteilhaft sein. Dies kann beispielsweise für die vollständige Entleerung der Trennvorrichtung am Ende einer kontinuierlichen Extraktion erfolgen, da ansonsten ein Großteil einer Phase möglicherweise in der Trennvorrichtung verbleiben würde und nicht gewonnen werden könnte. Beispielsweise bei beson-

ders wertvollen Zielprodukten kann es zweckmäßig sein, wenn eine vollständige Restentleerung der Trennvorrichtung durchgeführt wird.

- 5 Um eine möglichst vollständige Rückgewinnung der Phase und daher Restentleerung der Trennvorrichtung zu ermöglichen, wird eine Spüllösung, beispielsweise zusammengesetzt aus der schweren Phase oder leichten Phase oder einer anderen geeigneten Lösung, zugesetzt.

- 10 Beispielsweise kann durch Zugabe von entsprechender Spüllösung dann der Anteil der schweren Phase in der Trennvorrichtung dann so erhöht werden, dass die leichte Phase nach oben verdrängt wird und so durch den oben angeordneten Auslass in einfacher Weise entnommen werden kann. Alternativ kann durch Zugabe von entsprechender Spüllösung der Anteil der leichten Phase in der Trennvorrichtung so erhöht werden, dass die schwere Phase nach unten verdrängt wird und so durch den unten angeordneten Auslass in einfacher Weise entnommen werden kann.

- 15 In einer anderen Ausführungsform kann die leichte Phase in der Trennvorrichtung nach oben verdrängt werden, indem das Tauchrohr, das schwere Phase entnommen hatte, hochgefahren wird und daher keine schwere Phase mehr entnommen wird. Dadurch staut sich die schwere Phase auf und drückt die leichte Phase damit nach oben, die dann in einfacher Weise aus dem Auslass entnommen werden kann.

20

- In noch einer anderen Ausführungsform kann die schwere Phase in der Trennvorrichtung nach unten verdrängt werden, indem das Tauchrohr, das leichte Phase entnommen hatte, hochgefahren wird und daher keine leichte Phase mehr entnommen wird. Dadurch staut sich die leichte Phase auf und drückt die schwere Phase damit nach unten, die dann in einfacher Weise aus dem Auslass entnommen werden kann.

25

Ein „gezieltes Absenken oder Erhöhen“ bedeutet, dass dies mit den kontinuierlich gemessenen Leitfähigkeitswerten in Echtzeit überwacht und durch die bereits im Einzelnen erläuterten Maßnahmen von außen entsprechend gesteuert werden kann.

30

Die gewünschte Phase mit dem Zielprodukt wird dann in Schritt g. erhalten.

Das Verfahren der Erfindung kann ohne Zwischenschritte durchgeführt werden, so dass sich die einzelnen Schritte a. bis g. jeweils aneinander anschließen.

35

- Es versteht sich von selbst, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch Teil eines großtechnischen Verfahrens sein kann. Beispielsweise kann das erfindungsgemäße Verfahren als automatisierte Zellernte und Aufreinigung (Capture-Schritt) in der Aufarbeitung, beispielsweise eines monoklonalen Antikörpers als Zielprodukt, in großtechnischem Maßstab integriert werden. In einem ersten Verfahrensabschnitt, einem Up-Stream-Verfahren, wird dann eine Zellkultur in einem Bioreaktor kultiviert, die das Zielprodukt erzeugt. In einem zweiten Verfahrensabschnitt wird die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion

40

gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt, um das Zielprodukt entsprechend zu reinigen und anzureichern. In einem dritten Verfahrensabschnitt könnten sich weitere Reinigungsschritte für das Zielprodukt anschließen.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von Plasmid-DNA, wobei
- eine Plasmid-DNA bereitgestellt wird;
 - diese in einem Mikroorganismus, ausgewählt aus Eukaryonten und Prokaryonten, transformiert, dort vermehrt und anschließend durch alkalische Lyse gewonnen wird;
 - das Verfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wird;
- 10 - anschließend die gewonnene Plasmid-DNA weiter aufgereinigt, gegebenenfalls modifiziert und gegebenenfalls formuliert wird.

In einer Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren daher auch in der Herstellung von Plasmid-DNA in großtechnischem Maßstab angewendet werden. Dabei wird die Plasmid-DNA intra-

15 zellulär in einem Mikroorganismus, wie in einem eukaryotischen oder einem prokaryotischen Organismus, beispielsweise in Hefe, insbesondere in einem Bakterium, beispielsweise in *E. coli* hergestellt. Dabei wird der Mikroorganismus mit der herzustellenden Plasmid-DNA transformiert und der transformierte Mikroorganismus unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Vermehrung der Plasmid-DNA-Menge in der Kulturbrühe führen. Nach Abtrennung der Biomasse (Mikroorganismen die Plasmid-DNA

20 enthaltend) und deren alkalischer Lyse mit anschließender Neutralisation wird das Lysat in ein wässriges Zwei-Phasen-System (ATPS) überführt. Dabei bilden sich eine leichte und eine schwere Phase aus und eine Zwischenphase, die Präzipitat aus Zellbestandteilen, Proteinen, genomischer DNA, RNA präzipitiertem Kaliumdodecylsulfat (und weitere Verunreinigungen enthält. Durch die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) gemäß der vorliegenden Erfindung wird die Plasmid-DNA aufgereinigt und

25 in der schweren Phase angereichert. Die alkalische Lyse und die sich sofort anschließende wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) können kontinuierlich und automatisiert erfolgen. Weitere sich an die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) anschließende Schritte in der Aufarbeitung der schweren Phase umfassen beispielsweise Diafiltration, Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration, eine Fällung durch Ammoniumsulfat oder andere Salze und/oder zwei oder mehr Chromatographie-Schritte [3],

30 beispielsweise Anionenaustauschchromatographie und Hydrophobic Interaction Chromatographie. In weiteren Schritten kann die Plasmid-DNA zu einer bestimmten Konzentration aufkonzentriert werden und gegen einen Formulierungspuffer ultradiafiltriert werden. Danach kann die Plasmid-DNA noch weiter formuliert werden.

35 Erfindungsgemäß gelingt es daher, auch eine automatisierte Phasentrennung durchzuführen, wobei eine zuverlässige Detektion der beiden wässrigen Phasen, ohne oder mit Zwischenphase, durch kontinuierliche Messung(en) der elektrischen Leitfähigkeit an geeigneter Position oder geeigneten Positionen in der Trennvorrichtung durchgeführt wird. Eine zuverlässige Detektion des Phasengrenzflächenstands, wie dies erfindungsgemäß erreicht wird, ist notwendig, um ein robustes Automatisierungsverfahren bereitzustellen. Durch Automatisierung der Phasentrennung, basierend auf den konti-

40

nuierlich gemessenen Leitfähigkeitswerten, kann somit ein zuverlässig arbeitendes System geschaffen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch für einen großtechnischen Maßstab. Eine groß-
5 technische Produktion mit Trennvorrichtungsvolumina von mehr als 1 m³ ist möglich.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann anstelle oder zusätzlich zur elektrischen Leitfähigkeit auch die unterschiedliche Trübung der verschiedenen Phasen gemessen werden. Beispielweise kann kontinuierlich die elektrische Leitfähigkeit und/oder Trübung in mindestens einer der Phasen in der
10 Trennvorrichtung gemessen werden.

Die Erfindung richtet sich dann auf ein Verfahren zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes, ausgewählt aus

- Immunglobulinen oder anderen Proteinen; oder
- 15 - Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA oder anderen Nukleinsäuren; oder
- Viren,

umfassend die folgenden Schritte:

- a. Bereitstellen einer Ausgangslösung, die das Zielprodukt enthält;
- b. Überführen der Ausgangslösung in ein wässriges Zwei-Phasen-System durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes in geeigneter Konzentration, oder durch
20 Zugabe mindestens zweier Polymere in geeigneter Konzentration;
- c. Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines Stoffaustauschs, so dass sich das Zielprodukt in der leichten Phase oder in der schweren Phase anreichert;
- d. Entmischen lassen der Phasen in einer Trennvorrichtung in eine leichte Phase, eine schwere
25 Phase und, sofern eine Zwischenphase vorhanden ist, eine Zwischenphase;
- e. kontinuierliches Messen der elektrischen Leitfähigkeit und/oder Trübung in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung zum Bestimmen der Position der beiden Phasen und der Phasengrenzfläche oder bei Vorliegen einer Zwischenphase der Position der Zwischenphase und der zwei Phasengrenzflächen;
- 30 f. Entnehmen jeweils der leichten Phase, der schweren Phase und bei Vorliegen einer Zwischenphase der Zwischenphase aus der Trennvorrichtung anhand der kontinuierlich gemessenen Leitfähigkeit und/oder Trübung mindestens einer der Phasen in Schritt e.; und
- g. Gewinnen der Phase mit dem Zielprodukt.

35 Die Trübung kann mit einem oder mehreren Trübungsmessgeräten, die in die Trennvorrichtung hineinragen in Form von einer, zwei, drei oder mehr Trübungssonden gemessen werden.

Beispielweise kann das kontinuierliche Messen der Trübung in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung mit einem oder mehreren Trübungsmessgeräten in Form von einer, zwei, drei oder
40 mehr Sonden durchgeführt wird, insbesondere zum kontinuierlichen Messen der Trübung der schwe-

ren Phase mindestens eine Sonde und zum kontinuierlichen Messen der Trübung der leichten Phase mindestens eine Sonde an geeigneter Position in der Trennvorrichtung eingesetzt wird.

Die Trübung wird auf optischem Wege gemessen und kann mit Durchlichtmessung oder Streulichtmessung durchgeführt werden. Erfindungsgemäß erfolgt bevorzugt eine Durchlichtmessung.

Die Messung der Trübung erfolgt vorliegend in der Einheit FAU (Formazin Attenuation Units). Es sind aber auch andere Einheiten für die Trübung bekannt geworden (NTU, FTU), die verwendet werden könnten. Als Faustregel kann man angeben, dass der Unterschied der gemessenen Trübungswerte bevorzugt etwa 100 FAU zwischen den verschiedenen Phasen beträgt, um die verschiedenen Phasen voneinander unterscheiden zu können. In Einzelfällen sind jedoch auch niedrigere Werte möglich.

In der vorliegenden Offenbarung sollen sämtliche Ausführungen auch für die alternative oder zusätzliche Messung der Trübung gelten. Mit anderen Worten kann der Begriff ‚elektrische Leitfähigkeit‘ oder vergleichbare Begriffe in der Gesamtoffenbarung jeweils durch den Begriff ‚Trübung‘ ersetzt werden oder mit dem Begriff ‚Trübung‘ ergänzt werden. „Alternativ oder zusätzlich“ bedeutet, dass die elektrische Leitfähigkeit und/oder die Trübung gemessen werden.

Erfindungsgemäß kann in einer Trennvorrichtung nur die elektrische Leitfähigkeit oder auch nur die Trübung gemessen werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass eine Kombination aus Messung der elektrischen Leitfähigkeit und Messung der Trübung in einer Trennvorrichtung erfindungsgemäß eingesetzt wird.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen im Einzelnen erläutert und veranschaulicht, ohne die Erfindung hierauf zu beschränken. Hierbei wird detailliert auf verschiedene Ausführungsformen der Offenbarung Bezug genommen, die in den beigefügten Zeichnungen veranschaulicht sind. Wo immer möglich, werden die gleichen oder ähnliche Bezugszeichen und Symbole durchweg in den Zeichnungen verwendet, um auf gleiche oder ähnliche Teile zu verweisen. Die verschiedenen in der Zeichnung dargestellten Elemente sind nur repräsentativ und nicht notwendigerweise im Maßstab gezeichnet. Die Zeichnungen sollen nur beispielhaft Ausführungsformen der Offenbarung der Erfindung veranschaulichen, und ein Fachmann im Stand der Technik wird ohne weiteres erkennen, wo die Zeichnungen vereinfacht wurden, um die Schlüsselaspekte der Offenbarung zu veranschaulichen.

In Figur 1 ist eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 10, die den Verlauf einer Extraktion einer Charge (Batch-Extraktion) zu 3 Zeitpunkten der Trennung mit einer Sonde 60 zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen, aufgetragen über die Zeit, darstellt. Im gezeigten Beispiel ist die Trennvorrichtung 10 ein Rührkessel. Dieser kann jede geeignete Form und Größe aufweisen und aus einem geeigneten Material aufgebaut sein. Beispielweise kann auch ein Single-Use-Bag-Gefäß eingesetzt werden. Die Trennvorrichtung 10 umfasst einen Rührer, hier eine Rührwelle mit einem Propeller-Rührer 15, der

- durch einen Motor 25 angetrieben wird. Andere Rührvorrichtungen sind möglich oder können auch je nach Anwendungsfall weggelassen werden. Die Herstellung und Durchmischung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) kann in dieser Trennvorrichtung 10 oder auch außerhalb der Trennvorrichtung 10 erfolgen und das erhaltene wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS) kann dann in die Trennvorrichtung 10 überführt werden. Ein Auslass 50 befindet sich am Boden der Trennvorrichtung 10. Im Auslass 50 ist eine Sonde 60 angebracht, die die elektrische Leitfähigkeit der vorbeiströmenden Flüssigkeit misst. Im Schaubild unter den 3 Trennvorrichtungen ist die von der Sonde 60 kontinuierlich gemessene elektrische Leitfähigkeit in [mS/cm] der jeweiligen Phasen über die Zeit in [s] aufgetragen.
- 10 Die Trennvorrichtung 10 in der linken Abbildung von Figur 1 ist bereits mit allen 3 Phasen befüllt. Es wurde demnach bereits eine Ausgangslösung bereitgestellt (Schritt a.), diese in der Trennvorrichtung 10 durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes, oder mindestens zweier Polymere, jeweils in geeigneter Konzentration, in ein wässriges Zwei-Phasen-System überführt (Schritt b.) und mit Hilfe des Rührers 15 entsprechend durchmischt (Schritt c.). Im gezeigten Beispielfall ist das Zielprodukt ein Protein, das sich in der leichten Phase anreichert, insbesondere im Wesentlichen in dieser vorliegt. Die nach dem anschließenden Entmischen lassen der Phasen erhaltenen Phasen (Schritt d.) sind in der linken Abbildung von Figur 1 veranschaulicht. Die oberste Phase 20 ist die leichte Phase, die das Protein enthält, die Zwischenphase 30 und die untere schwere Phase 40 enthalten unerwünschte Komponenten in Form von Verunreinigungen und dergleichen.
- 20 Die drei gezeigten Abbildungen von Figur 1 veranschaulichen den Verlauf der wässrigen Zwei-Phasen-Extraktion eines beispielhaften Proteins (Schritte e., f. und g.) in einem exemplarischen wässrigen Zwei-Phasen-System für eine diskontinuierliche bzw. chargenweise Extraktion in drei Stufen:
- 25 Die linke Abbildung zeigt alle drei Phasen 20, 30, 40 in der Trennvorrichtung 10 nach erfolgter Entmischung der Phasen, wobei die schwere Phase 40 aus dem Auslass 50 ausgelassen wird. Das Schaubild unterhalb der 3 Trennvorrichtungen 10 zeigt die elektrischen Leitfähigkeitswerte, gemessen durch die Sonde 60 im Verlauf der Extraktion. Für die Trennvorrichtung 10 in der linken Abbildung zeigt das Schaubild eine mit der Sonde 60 gemessene hohe elektrische Leitfähigkeit für die schwere Phase 40 an, die praktisch über die gesamte Zeit, in der die schwere Phase 40 aus der Trennvorrichtung abgelassen wird, konstant bleibt. Die schwere Phase 40 kann daher eindeutig über ihre elektrische Leitfähigkeit zugeordnet werden und so von den anderen Phasen 30, 20 unterschieden und so exakt abgetrennt werden.
- 30 In der mittleren Abbildung von Figur 1 wurde die schwere Phase 40 bereits abgetrennt und es wird nun die Zwischenphase 30 aus dem Auslass 50 abgelassen. Das untere Schaubild zeigt nun eine mittlere elektrische Leitfähigkeit für die Zwischenphase 30. Auch bei Ablassen der Zwischenphase 30 aus der Trennvorrichtung 10 ist die mit der Sonde 60 gemessene elektrische Leitfähigkeit über die Zeit nahezu konstant. Die Zwischenphase 30 zeigt andere elektrische Leitfähigkeiten als die leichte Phase 20 oder die schwere Phase 40, so dass anhand der kontinuierlich gemessenen Leitfähigkeit eine genaue Trennung der Phasen 20, 30, 40 voneinander erfolgen kann.
- 35
- 40

In der rechten Abbildung von Figur 1 wurde die Zwischenphase 30 bereits abgetrennt und es bleibt nun noch die leichte Phase 20 in der Trennvorrichtung 10, die das Zielprotein enthält. Ein Ablassen der leichten Phase 20 aus dem Auslass 50 zeigt im unteren Schaubild auf der rechten Seite eine mit
5 der Sonde 60 gemessene niedrige elektrische Leitfähigkeit für die leichte Phase 20 an, die während des gesamten Auslaufen lassens der leichten Phase 20 aus dem Auslass 50 nahezu konstant bleibt. Man gewinnt dadurch das Zielprotein in der leichten Phase 20 ohne die Verunreinigungen.

Das getrennte Ablassen der Phasen kann daher anhand der Messung der elektrischen Leitfähigkeit
10 gesteuert werden: In diesem Beispielfall, bei dem sich das Zielprodukt in der leichten Phase 20 befindet, werden zuerst die schwere Phase 40 und die Zwischenphase 30 abgelassen und gegebenenfalls verworfen. Sobald die Leitfähigkeit nach Ablassen der Zwischenphase 30 unter einen bestimmten Schwellenwert (Sollwert-Bereich) fällt, wird beispielsweise automatisch ein Ventil, das unterhalb bzw.
15 nach der Sonde 60 vorgesehen wird (nicht gezeigt), sofort geschlossen. Am unteren Auslass 50 kann nach bzw. unterhalb des Ventils eine Leitung zu einem Auffanggefäß oder dergleichen für die leichte Phase 20 angeschlossen, das Ventil wieder geöffnet und die leichte Phase 20 so gewonnen werden. Alternativ kann mittels eines Ventils der Fluss aus der Trennvorrichtung 10 von einer Leitung, durch die die schwere Phase 40 und die Zwischenphase 30 abgeleitet werden, zu einer anderen Leitung umgeschaltet werden, die zu einem Auffanggefäß oder dergleichen für die leichte Phase 20 führt.
20 Diese Leitung kann die leichte Phase 20 auch unmittelbar zur weiteren Aufarbeitung führen, die dann kontinuierlich, chargenweise bzw. diskontinuierlich erfolgen kann.

Für eine diskontinuierliche bzw. chargenweise Extraktion in einer Trennvorrichtung 10 gemäß Figur 1 ist daher eine Phasendetektion mit nur einer einzelnen Sonde 60 möglich, wobei hierdurch eine Pha-
25 sentrennung während der Entleerung der Trennvorrichtung 10, basierend auf der kontinuierlich gemessenen elektrischen Leitfähigkeit, durchgeführt werden kann.

Figur 2 zeigt eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 100, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden
30 (160.1, 160.2) zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen darstellt.

Es wurde bereits eine Ausgangslösung bereitgestellt (Schritt a.). Im gezeigten Beispielfall handelt es sich bei der Ausgangslösung um eine Zellkultur. Diese wurde bereits durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes, oder durch Zugabe mindestens zweier Polymere, je-
35 weils in geeigneter Konzentration, in ein wässriges Zwei-Phasen-System überführt (Schritt b.) und entsprechend durchmischt (Schritt c.). Das zu reinigende und anzureichernde Zielprodukt kann ein Protein, eine Nukleinsäure oder ein Virus sein. Im gezeigten Beispielfall ist das Zielprodukt ein Protein, das sich zum Großteil in der leichten Phase befindet. Es kann aber auch ein Protein oder eine Nukleinsäure gereinigt und angereichert werden, das/die sich nach dem Durchmischen und Entmi-
40 schen der Phasen beispielsweise in der schweren Phase anreichert, insbesondere im Wesentlichen in der schweren Phase vorliegt.

- In der gezeigten beispielhaften Ausführungsform der Erfindung wird das durchmischte, wässrige Zwei-Phasen-System, enthaltend das Zielprotein, in die Trennvorrichtung 100 überführt. In der Trennvorrichtung werden die Phasen dann entmischt (Schritt d.). Es resultiert eine obere leichte Phase 120, in der sich das Zielprodukt angereichert hat, insbesondere im Wesentlichen in dieser vorliegt, beispielweise in Form eines Proteins, eine Zwischenphase 130 und eine untere schwere Phase 140, in der sich die unerwünschten Komponenten angereichert haben, insbesondere diese im Wesentlichen aufweisen.
- Die Trennvorrichtung 100 kann eine beliebige Form und Größe haben, um die Phasentrennung durchzuführen. In der in Figur 2 gezeigten Ausführungsform ist die Trennvorrichtung 100 eine Art auf der Seite liegender Abscheider, der drei Auslässe 150.1, 150.2 und 150.3 aufweist. Andere Formen für die Trennvorrichtung 100 sind möglich.
- In der Trennvorrichtung 100 sind zwei Sonden 160.1 und 160.2 vorgesehen, um die elektrische Leitfähigkeit jeweils einer Phase zu messen. Die Sonde 160.1 taucht in die schwere Phase 140 ein und misst daher die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase 140 in dieser Position. Die Sonde 160.2 taucht in die leichte Phase 120 ein und misst daher die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase 120 in dieser Position. Die Sonden 160.1 und 160.2 befinden sich jeweils in Einführöffnungen 157.1 und 157.2, die derart axial in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100 angeordnet sind, so dass eine axiale Anordnung resultiert. Die Einführöffnungen 157.1 und 157.2 und damit auch die darin vorliegenden Sonden 160.1 und 160.2 sind in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100 so angeordnet, dass diese auf einer geraden Verbindungslinie liegen. In Figur 2 verläuft die gerade Verbindungslinie in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100. Andere Ausführungsformen sind ebenfalls möglich.
- Die mit den Sonden 160.1 und 160.2 gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten werden in einem Schaubild 200 oberhalb von Figur 2 schematisch dargestellt. So misst die Sonde 160.1 kontinuierlich die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase 140, die in der Kurve 140a angegeben wird. Die Sonde 160.2 misst kontinuierlich die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase 120, die in der Kurve 120a angegeben wird.
- Die Kurven 120a und 140a in Schaubild 200 zeigen nahezu konstante Werte für die elektrische Leitfähigkeit im Verlauf der Zeit, d.h. die beiden Sonden 160.1 und 160.2 befinden sich jeweils in den Phasen, die eindeutig über ihre elektrischen Leitfähigkeiten zugeordnet werden können.
- Neben den gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten im linken Diagramm des Schaubilds 200 wird im rechten Diagramm die gemessene Trübung der Phasen, aufgetragen gegen die Zeit, dargestellt. Die Trübung wird mit einem Trübungssensor in Formazin Attenuation Units (FAU) gemessen. Die Kurve 140b zeigt eine hohe Trübung der schweren Phase 140, da die schwere Phase 140 aus einer Zellkultur stammt und daher Komponenten enthält, die die starke Trübung bewirken. Die leichte Phase 120b

weist eine geringe Trübung auf. Eine Phasentrennung ist aufgrund der hohen Trübung daher durch die im Stand der Technik geschilderten Messgeräte praktisch nicht möglich.

Die Trennvorrichtung 100 ist für eine kontinuierliche Betriebsweise ausgelegt. Es kann daher in stetem
5 Fluss (kontinuierlich) die zu trennende Lösung 110 (= das wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS))
zugeführt und die voneinander getrennten Phasen 120, 130 und 140 können jeweils kontinuierlich
abgeführt werden. Der obere Auslass 150.2 dient zum Entnehmen der leichten Phase 120, der untere
Auslass 150.1 bzw. 150.3 zum Entnehmen der schweren Phase 140 und auch der Zwischenphase
130. Das Zielprodukt befindet sich hier in der leichten Phase 120.

10

Gemäß dieser beispielhaften Ausführungsform der Erfindung ist das Tauchrohr 180 als zusätzlicher
Auslass vorgesehen. Es ist im gezeigten Ausführungsbeispiel aus einem Außenrohr in Form eines
Hüllrohrs oder Überrohrs 183 und einem Innenrohr 181 aufgebaut. Im Innenrohr 181 befindet sich
eine Öffnung 182.

15

Das Überrohr 183 weist ein oberes Ende oberhalb der Trennvorrichtung 100 auf und reicht mit seinem
unteren Ende 183a in die Phase hinein, die entnommen werden soll, hier: die schwere Phase 140.
Das Überrohr 183 ist in der gezeigten Ausführungsform beispielsweise nicht beweglich, das Innenrohr
181 aber schon. Das Überrohr 183 könnte aber auch beweglich ausgestaltet sein.

20

In der gezeigten Ausführungsform von Figur 2 ist gezeigt, dass der Durchmesser des Überrohrs 183
größer ist als der Durchmesser des Innenrohrs 181, so dass das Überrohr 183 das Innenrohr 181
umgibt und zwar nur in einem oberen Abschnitt des Innenrohrs 181. In diesem oberen Abschnitt des
Innenrohrs 181 befindet sich die Öffnung 182, so dass sich das Überrohr über die Öffnung 182 hinaus
25 erstreckt. Das Überrohr 183 umgibt das höhenverstellbare Innenrohr 181 daher nur in einem oberen
Abschnitt, wobei die Länge des Überrohrs 183 derart ausgewählt wird, dass das Überrohr 183 über
die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 hinausragt.

Hierdurch wird die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 vor einem direkten Flüssigkeitszutritt, hier die
30 schwere Phase 140, aus der Trennvorrichtung 100 abgeschirmt. Das Innenrohr 181 ist nur im oberen
Abschnitt vom Überrohr 183 umgeben, dort wo sich die Öffnung 182 befindet, aber nicht im unteren
Abschnitt des Innenrohrs 181, so dass das Innenrohr 181 teilweise in der schweren Phase 140 frei-
liegt.

Das Überrohr 183 und das Innenrohr 181 bilden einen Zwischenraum aus, in den die Flüssigkeit der
Phase, in die das untere Ende 183a des Überrohrs 183 eintaucht, hochsteigt (nicht gezeigt) und dann
durch die Öffnung 182 im Innenrohr 181 austreten kann. Hierdurch wird das Herauf- und Herunterbe-
35 wegen der Öffnung 182 im Innenrohr 181 kann wie folgt verdeutlicht werden: Die Öffnung 182 kann
durch Herauf- und Herunterbewegen so positioniert werden, dass die im Zwischenraum hochsteigen-
40 de Phasenflüssigkeit abfließen kann. Wird die Öffnung 182 höher positioniert, kann die Phasenflüssig-
keit nicht mehr durch die Öffnung 182 abfließen und das Tauchrohr 180 ist außer Funktion. Zudem

entscheidet die Position der Öffnung 182 aufgrund des hydrostatischen Drucks wie schnell die Phasenflüssigkeit ausströmt.

Die Phasenflüssigkeit (hier: schwere Phase 140) muss daher zunächst in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183 strömen, bevor diese zur Öffnung 182 im Innenrohr 181 gelangt (durchgezogene Pfeile in Figur 2, die zur Öffnung 182 zeigen) und durch diese dann ausströmen kann (gepunkteter Pfeil im Innenrohr 181 in Figur 2).

Das Vorliegen eines Überrohrs 183, dessen Ende 183a sich in der zu entnehmenden Phase 140 befindet, ist vorteilhaft. Die Öffnung 182 im Innenrohr 181 wird vom Überrohr 183 abgeschirmt und geschützt. Die zu entnehmende Phase 140 steigt in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183 auf und gelangt erst dann zur Öffnung 182. Ein direkter Zutritt der Flüssigkeit zur Öffnung 182 wird dadurch verhindert. Das Überrohr 183 erhöht damit die Sicherheit, dass wirklich nur die gewünschte Phase 140 ausströmen kann.

Beispielweise kann auch die Länge des Überrohrs 183 und dessen Durchmesser, d.h. insbesondere die Größe des Zwischenraums zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183, derart gewählt werden, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen und halbfesten Bestandteilen zur Öffnung 182 verhindert werden kann, damit kein Verstopfen der Öffnung 182 oder des Innenrohrs 181 auftritt.

Der Fachmann kann die Dimensionen des Überrohrs 183 in einfacher Weise entsprechend auswählen und einstellen.

Andere Ausführungen des Tauchrohrs 180 sind ebenfalls möglich.

Das Innenrohr 181 des Tauchrohrs 180 ist mit dem Auslass 150.1 in flüssigkeitsdichter Weise verbunden, wobei das Innenrohr 181 jedoch bewegbar bleibt. Das Tauchrohr 180 ist damit nach wie vor höhenverstellbar. Die Höhenverstellbarkeit oder Höhenveränderung wird durch den Pfeil 189 in Figur 2 dargestellt und durch den Motor 125, beispielweise einen Schrittmotor, erreicht, der die Höhenverstellung des Tauchrohrs 180 in der Trennvorrichtung 100 vornimmt. Die Höhenverstellbarkeit bezieht sich im gezeigten Beispielfall nur auf das Innenrohr 181, genauer gesagt die Öffnung 182 im Innenrohr 181, die je nach Bedarf, herauf- und heruntergefahren werden kann. Die schwere Phase 140 dringt in den Zwischenraum zwischen Überrohr 183 und Innenrohr 181 ein, steigt in diesem hoch und zwar bis zur Öffnung 182 im Innenrohr 181, wo die Flüssigkeit dann aus der Trennvorrichtung 100 in den Auslass 150.1 abfließen kann. Die Pfeile bei der Öffnung 182 symbolisieren das Fließen der schweren Phase 140 in diesen Zwischenraum hinein bis hin zur Öffnung 182 und der gepunktete Pfeil im Innenrohr 181 symbolisiert das Abfließen dieser schweren Phase 140 durch das Innenrohr 181 nach unten und zum Auslass 150.1 hinaus. Das Innenrohr 181 ist daher mit dem Auslass 150.1 direkt verbunden. Andere Ausführungsformen sind ebenfalls möglich.

40

Das Abfließen der schweren Phase 140 erfolgt in der gezeigten Ausführungsform nur mit Hilfe der Schwerkraft.

5 In der dargestellten Ausführungsform befindet sich das Ende 183a des Überrohrs 183 in der schweren Phase 140, so dass nur die schwere Phase 140 in den Zwischenraum eintritt und aus der Öffnung 182 abfließen kann.

10 In Figur 2 ist die Sonde 160.2 für die leichte Phase 120 in der Trennvorrichtung 100 tiefer angeordnet als der obere Auslass 150.2. Dies ist zweckmäßig, damit zuerst die elektrische Leitfähigkeit gemessen und bestätigt wird, dass nur leichte Phase 120 vorliegt und dann erst die leichte Phase 120 aus dem oberen Auslass 150.2 austritt.

15 Die Sonde 160.1 für die schwere Phase 140 ist in Figur 2 tiefer angeordnet als das untere Ende 183a des Überrohrs 183. Es kann jedoch auch vorteilhaft sein, wenn die Sonde 160.1 in der schweren Phase 140 höher liegt als das untere Ende 183a des Überrohrs 183. Damit kann man ein zu starkes Absinken der leichten Phase 120 und/oder Zwischenphase 130 mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183 hochsteigen und über die Öffnung 182 des Tauchrohrs 180 abfließen.

20 In dem beschriebenen kontinuierlichen Extraktionsverfahren gemäß Figur 2 dient das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeiten der Phasen 120 und 140 gemäß Schritt e. des erfindungsgemäßen Verfahrens dazu, das höhenverstellbare Tauchrohr 180 derart anzusteuern und dessen Höhe bzw. Eintauchtiefe und gegebenenfalls auch die Dauer der Entnahme in Abhängigkeit von der Lage der Phasen bzw. deren Phasengrenzflächen so zu regulieren, dass durch die im Tauchrohr 180 vor-

25 handene Öffnung 182 die schwere Phase 140 abfließen kann. Ein Regler 135 dient dazu die Höhenverstellung des Tauchrohrs 180 automatisch in Abhängigkeit von den gemessenen Werten für die elektrische Leitfähigkeit zu steuern.

30 Die Regelung des höhenverstellbaren Tauchrohrs 180 funktioniert wie folgt: Den jeweiligen Sonden 160.1 und 160.2 werden jeweils Sollwert-Bereiche für die elektrischen Leitfähigkeiten der Phasen zugeordnet, die sich aus dem verwendeten wässrigen Zwei-Phasen-System ergeben. Wie aus obiger Tabelle 1 ersichtlich, weist beispielweise ein wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem für die leichte Phase elektrische Leitfähigkeiten im Bereich von 10-25 mS/cm, für die Zwischenphase: 40-50 mS/cm und für die schwere Phase: 60-80 mS/cm auf. Diese Sollwert-Bereiche dienen zur Bestimmung und

35 Kontrolle, wo sich die einzelnen Phasen in der Trennvorrichtung 100 im Hinblick auf das Ende 183a des Überrohrs 183 befinden.

Das Innenrohr 181 des Tauchrohrs 183 ist mit dem unteren Auslass 150.1 in der Trennvorrichtung 100 verbunden, um schwere Phase 140 abfließen zu lassen. Im kontinuierlichen Betrieb kann nun in

40 Figur 2 die schwere Phase 140 mit dem Tauchrohr 180 kontinuierlich entnommen werden. Da sich das Ende 183a des Überrohrs 183 in der schweren Phase 140 befindet, steigt die schwere Phase 140

in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183 auf. In der gezeigten Ausführungsform von Figur 2 befindet sich im Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr 183 im kontinuierlichen Betrieb daher immer nur schwere Phase 140. Dadurch fließt über die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 im kontinuierlichen Betrieb kontinuierlich schwere Phase 140 ab und verlässt die
5 Trennvorrichtung 100 durch den Auslass 150.1. Gleichzeitig strömt die wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS) 110 kontinuierlich in die Trennvorrichtung 100 und die leichte Phase 120 kontinuierlich über den oberen Auslass 150.2 aus der Trennvorrichtung 100 hinaus.

Im Idealfall liegt ein Gleichgewicht zwischen der Menge an einfließender Flüssigkeit (wässrigem Zwei-
10 Phasen-System) und der Menge an ausströmenden Flüssigkeiten (schwere Phase 140 fließt über das Tauchrohr 180 ab und leichte Phase fließt über den Auslass 150.2 ab) vor. Das System läuft kontinuierlich.

Wenn sich während des kontinuierlichen Betriebs die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 nach
15 oben oder nach unten verschiebt, was regelmäßig der Fall ist, kann das Innenrohr 181 des Tauchrohrs 180 und damit die Öffnung 182 verstellt werden, wodurch die Entnahmegeschwindigkeit der schweren Phase 140 aus der Trennvorrichtung 100 gesteuert werden kann:

Wenn die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 absinkt, nimmt der Wert für die elektrische Leitfähigkeit der Sonde 160.1 der schweren Phase 140 ab. Die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 wird
20 nach oben bewegt. Es liegt dann ein niedrigerer hydrostatischer Druck vor und die Entnahmegeschwindigkeit der schweren Phase 140 nimmt ab.

Alternativ könnte auch das Entnehmen der schweren Phase 140 mit dem Tauchrohr 180 ganz gestoppt werden, beispielsweise indem die Öffnung 182 über den Flüssigkeitsspiegel in der Trennvorrichtung 100 gestellt wird. Dann würde sich die schwere Phase 140 wieder ansammeln und die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 steigt wieder an. Dann könnte die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 wieder auf seine ursprüngliche Position gesetzt werden, wenn der Wert der elektrischen Leitfähigkeit an der Sonde 160.1 für die schwere Phase 140 wieder im Sollwert-Bereich liegt und den zu
30 erwartenden Leitfähigkeitswert für die schwere Phase 140 anzeigt.

Wenn die Sonde 160.2 für die leichte Phase 120 einen erhöhten Wert für die elektrische Leitfähigkeit detektiert, kann die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 nach unten verschoben werden. Es resultiert ein höherer hydrostatischer Druck. Die Entnahmegeschwindigkeit der schweren Phase 140 wird größer.
35 Dadurch sinkt die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 wieder ab. Danach kann die Öffnung 182 wieder auf die ursprüngliche Position gesetzt werden.

Zum Beibehalten des Gleichgewichts erfolgt daher ein ständiges Herauf- und Herunterbewegen des Tauchrohrs 180 (genauer gesagt des Innenrohrs 181) während des kontinuierlichen Betriebs, was
40 einer typischen Zick-Zack-Bewegung entspricht. Das Tauchrohr 180 wird kontinuierlich eingesetzt.

Vorteilhafterweise wird die Öffnung 182 des Innenrohrs 181 nur innerhalb des Überrohrs 183 herauf- und herunterbewegt, um den Zulaufschutz des Überrohrs 183 auszunutzen.

5 In einer alternativen Ausführungsform kann das Tauchrohr 180 auch diskontinuierlich eingesetzt werden. Beispielsweise kann im kontinuierlichen Betrieb ein Gleichgewicht dadurch hergestellt werden, dass leichte Phase 120 aus dem oberen Auslass 150.2 und schwere Phase 140 aus dem Auslass 150.3 kontinuierlich ausfließen.

10 Wenn hier jetzt eine Störung des Gleichgewichts auftritt, kann das Tauchrohr 180 zum Einsatz kommen, um die Störungen auszugleichen. Das Tauchrohr 180 kann hierbei mit oder ohne Überrohr 183 vorliegen.

15 In diesem Beispielfall wird durch das Tauchrohr 180 nicht kontinuierlich eine Phase entnommen, sondern nur im Störfall. Das Tauchrohr 180 ist wieder mit dem Auslass 150.1 am Boden der Trennvorrichtung 100 verbunden.

20 Wenn die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 steigt, wird das Tauchrohr 180 von der Ausgangstellung, beispielsweise über dem Flüssigkeitsspiegel der leichten Phase 120 oder oberhalb des Flüssigkeitsspiegels im Zwischenraum, beispielsweise in die schwere Phase 140 bewegt, so dass diese zusätzlich zum Auslaufen aus dem Auslass 150.3 auch aus der Öffnung 182 im Tauchrohr 180 auslaufen kann. Damit steigt insgesamt die Ausflussmenge und -geschwindigkeit der schweren Phase 140 aus der Trennvorrichtung 100 und die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 sinkt wieder ab. Dann kann die Öffnung 182 des Tauchrohrs 180 wieder in die Ausgangsposition, beispielsweise oberhalb des Spiegels der leichten Phase 120 oder einfach oberhalb des Flüssigkeitsspiegels im Zwischenraum hinaufgefahren werden.

25 Damit die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 sinkt, kann das Tauchrohr 180 auch nur in der schweren Phase 140 nach oben bewegt werden und es fließt dann weniger schwere Phase 130 aus und die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 steigt wieder an.

30 Wenn für das Tauchrohr 180 ein Überrohr 183 verwendet wird, kann das Überrohr 183 hinsichtlich seiner Länge variabel sein oder nicht. Wenn die Länge des Überrohrs 183 im Betrieb nicht variabel ist, so ist es zweckmäßig die geeignete Länge des Überrohrs 183 vor Beginn der Extraktion auszuwählen. Je nach der gewünschten Ausführungsform, kann das Überrohr 183 dann in der passenden Größe ausgewählt und so dimensioniert werden, dass dieses in die betreffende Phase hineinreicht. Wenn ein
35 in der Länge variables Überrohr 183 zum Einsatz kommt, kann dessen Länge während des Betriebs in geeigneter Weise geändert werden. Der Fachmann kann dies ohne weiteres umsetzen.

40 Das Überrohr 183 verhindert insbesondere den Zutritt von unerwünschter Phase(n) (hier: Zwischenphase 130 und/oder leichte Phase 120), sofern die Phasengrenzfläche(n) nicht zu weit absinkt(absinken).

Das Tauchrohr 180 dient daher im kontinuierlichen Betrieb der Trennvorrichtung 100 entweder auf kontinuierliche oder diskontinuierliche Weise zur Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen zugeführten und abgeführten Phasen.

5

Im gezeigten Beispielfall von Figur 2 dient das höhenverstellbare Tauchrohr 180 mit sich von oben nach unten erstreckendem Überrohr 183 daher als Auslass für die schwere Phase 140.

Das Zielprodukt, hier: ein Protein, wird in der gezeigten Ausführungsform von Figur 2 in der leichten Phase 120 erhalten, die durch den Auslass 150.2 entnommen wird (Schritt g. des Verfahrens).

10

In einer alternativen Ausführungsform zu Figur 2 könnte das Überrohr 183 anstatt von oben nach unten auch von unten nach oben reichen (nicht gezeigt) und dann bis in der leichten Phase 120 reichen, wobei alle anderen Bauteile in Figur 2 identisch übernommen werden könnten.

15

In dieser Ausführungsform würde das Tauchrohr als Auslass für die leichte Phase 120 dienen. Die leichte Phase 120 fließt dabei zunächst in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr und die Zwischenphase füllt sich von unten nach oben nur mit leichter Phase 120 bis diese bei der Öffnung 182 im Innenrohr 181 ankommt und dort dann in den Auslass 150.1 abfließen kann.

20

In dieser Ausführungsform (nicht gezeigt) wäre es zweckmäßig, wenn die Sonde 160.2 in der leichten Phase 120 tiefer als das obere Ende des sich von unten nach oben erstreckenden Überrohrs angeordnet würde. Damit könnte man ein zu hohes Ansteigen der schweren Phase 140 (untere Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase 130 mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 181 und Überrohr hineinfließen und bis zur Öffnung 182 des Tauchrohrs gelangen könnten.

25

Ein sich von unten nach oben erstreckendes Überrohr (nicht gezeigt) würde den Zutritt von unerwünschter Phase (hier: Zwischenphase und/oder schwere Phase), sofern die Phasengrenzfläche(n) nicht zu weit ansteigt(ansteigen) verhindern.

30

Die obigen Ausführungen zu Figur 2 gelten in dieser Ausführungsform mit sich von unten nach oben erstreckendem Überrohr daher analog.

In Figur 3 ist eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer weiteren beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 100, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden (160.1, 160.2) zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen zu einem anderen Zeitpunkt als Figur 2 darstellt.

35

In Figur 3 ist dargestellt, wie durch gezieltes Erhöhen bzw. Anheben der Phasengrenzflächenposition in der Trennvorrichtung 100 ein Großteil der leichten Phase 120, welche ansonsten in der Trennvor-

40

richtung 100 stehen bleiben würde, zurückgewonnen werden kann. Um eine möglichst vollständige Rückgewinnung der leichten Phase 120 zu ermöglichen, wird die verbliebene leichte Phase 120 durch Spülen (engl. Flush) mit einer Spüllösung 115, beispielsweise durch einen Anteil des verwendeten wässrigen Zwei-Phasen-Systems, nach oben verdrängt.

5

Das gezielte Erhöhen bzw. Anheben des Flüssigkeitsspiegels in der Trennvorrichtung 100 wird beispielsweise dadurch erreicht, dass zur Trennvorrichtung 100 mehr schwere Phase 140 zugegeben wird, so dass die leichte Phase 120 nach oben gedrückt und so durch den Auslass 150.2 in einfacher Weise entnommen werden kann. Das Verdrängen der leichten Phase 120 kann in einer kontinuierlichen Extraktion auch dadurch erreicht werden, dass das Tauchrohr 180 hochgefahren wird, dadurch keine schwere Phase 140 mehr entnommen wird und sich diese in der Trennvorrichtung 100 aufstaut und dadurch die leichte Phase 120 nach oben verdrängt.

10

Analog zu obigen Vorgehensweisen könnte auch schwere Phase 140 nach unten verdrängt werden.

15

Die Verschiebung der Phasengrenzfläche, sofern keine Zwischenphase vorliegt oder – wie im gezeigten Beispielfall – wenn eine Zwischenphase vorliegt, die Verschiebung der gesamten Zwischenphase 130 und schweren Phase 140 in der Trennvorrichtung 100 nach oben, wird wieder anhand der kontinuierlich gemessenen Werte für die elektrische Leitfähigkeit durch die 2 Sonden 160.1 und 160.2 überwacht.

20

Alternativ kann es auch zweckmäßig sein, gezielt die Phasengrenzfläche zwischen oberer und unterer Phase oder auch eine etwaig vorliegende Zwischenphase (und damit auch die beiden Phasen) nach unten zu verschieben. Dies gelingt beispielsweise, wie bereits erläutert, durch gezieltes Ablassen bzw. Entnehmen der entsprechenden Phase(n).

25

In Figur 3 sind Einführöffnungen 157.1 und 157.2 in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100 vorgesehen, wobei die Sonde 160.1 in der Einführöffnung 157.1 und die Sonde 160.2 in der Einführöffnung 157.2 vorliegen. Dabei sind die Einführöffnungen 157.1 und 157.2 und damit auch die Sonden 160.1 und 160.2 in der Wand 155 der Trennvorrichtung axial angeordnet, d.h. die Einführöffnungen 157.1 und 157.2 sind in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100 so angeordnet, dass diese auf einer geraden Verbindungslinie liegen. In Figur 3 verläuft die gerade Verbindungslinie in der Wand 155 der Trennvorrichtung 100.

30

Die gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten werden im Schaubild 202 oberhalb von Figur 3 schematisch gezeigt. Man ersieht hieraus den Verlauf der kontinuierlichen Extraktion, wobei die Kurve für die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase 120c zunächst konstant bleibt bis die Sonde 160.2 auf die Zwischenphase 130, gezeigt mit der Kurve 130c, trifft. Die Sonde 160.1 erfasst mit der Kurve 140c die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase 140, die konstant bleibt. Kurve 140d und 120d zeigen wieder die Trübung von schwerer Phase 140 und leichter Phase 120.

35

40

Figur 4 zeigt eine schematische Seitenansicht im Schnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 100, die eine kontinuierliche Extraktion mit zwei Sonden (160.1 160.2) zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen darstellt.

- 5 In der gezeigten weiteren beispielhaften Ausführungsform der Erfindung von Figur 4 ist das Tauchrohr 190 in einer anderen Variante als in den Figuren 2 und 3 abgebildet. Das Tauchrohr 190 weist in dieser Ausführungsform eine Öffnung 192 am Ende des Innenrohrs 191 auf sowie ein Überrohr 193. Das Tauchrohr 190 ist anders als in den Figuren 2 und 3 nicht mit dem unteren Auslass 150.1 verbunden.
- 10 Das Überrohr 193 hat Vorteile, da es im gezeigten Beispielfall nur den Zutritt der schweren Phase 140 zur Öffnung 192 zulässt. Gemäß einer Ausführungsform kann das Überrohr 193 möglichst weit nach unten, nahezu bis zum Boden der Trennvorrichtung 100 reichen, damit auch bei kurzzeitigem Absinken der Phasengrenzfläche(n) verhindert wird, dass in den Zwischenraum zwischen dem Überrohr 193 und dem Innenrohr 191 leichte Phase 120 und/oder Zwischenphase 130 gelangt. Das Ende 193a
- 15 des Überrohres 193 befindet sich in der schweren Phase 140. Die Position der Öffnung 192 spielt dann nur noch für die Entnahmegeschwindigkeit eine Rolle.

Die Pfeile in Figur 4 symbolisieren wie die schwere Phase 140 erst in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 191 und Überrohr 193 strömt und dann in die Öffnung 192 gesaugt wird. Der gepunktete

20 Pfeil im Innenrohr 191 des Tauchrohrs 190 zeigt die Fließrichtung der Flüssigkeit im Innenrohr 191 an, die zu einem oberen Auslass (nicht gezeigt) führt.

Im kontinuierlichen Betrieb läuft beispielsweise leichte Phase 120 am oberen Auslass 150.2 aus und die schwere Phase 140 wird durch das Tauchrohr 190 abgezogen, beispielsweise durch eine Pumpe

25 (nicht gezeigt) oder Anlegen von Unterdruck. Für ein Gleichgewicht wird die Pumpe bzw. der Unterdruck so eingestellt, dass die Summe der Ausflussmenge der leichten Phase 120 und der schweren Phase 140 und gegebenenfalls der Zwischenphase 130 genauso groß eingestellt wird wie die Menge des einströmenden Zwei-Phasen-Systems (ATPS) 110.

- 30 Kommt es nun zu Schwankungen und die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 sinkt beispielsweise ab, dann kann die Pumpgeschwindigkeit leicht vermindert werden und weniger schwere Phase 140 wird abgezogen, bis die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 steigt, was durch einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit der Sonde 160.1 der schweren Phase 140 (= untere Sonde in Figur 4), der dann wieder im Sollwert-Bereich liegt, festgestellt werden kann. Dann wird beispielsweise wieder
- 35 die ursprüngliche Pumpgeschwindigkeit/der ursprüngliche Unterdruck am Tauchrohr 190 angelegt.

- Steigt die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 an, so kann die Pumpgeschwindigkeit bzw. der Unterdruck erhöht werden und mehr schwere Phase 140 wird abgezogen. Es sinkt die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 wieder ab, bis die Sonde 160.2 für die leichte Phase 120 wieder die
- 40 elektrische Leitfähigkeit im Sollwert-Bereich anzeigt. Die Pumpgeschwindigkeit bzw. der Unterdruck am Tauchrohr 190 kann dann beispielsweise wieder auf Ausgangsgeschwindigkeit eingestellt werden.

Die Pfeile in Figur 4 symbolisieren wie die schwere Phase 140 erst in den Zwischenraum strömt und dann zur Öffnung 192 hinausgesaugt wird. Der gepunktete Pfeil im Innenrohr 191 des Tauchrohrs 190 zeigt die Fließrichtung der Flüssigkeit im Innenrohr 191 an, die zu einem oberen Auslass (nicht ge-
5 zeigt) führt.

Das Tauchrohr 190 arbeitet in diesem Fall kontinuierlich.

10 Gemäß einer alternativen Ausführungsform kann das Tauchrohr 190 auch diskontinuierlich verwendet werden, um je nach Stand der Phasengrenzfläche(n) leichte Phase 120, Zwischenphase 130 oder schwere Phase 140 zeitweise abzuziehen. Dazu muss im Tauchrohr 190 kein Überrohr 193 vorliegen; dies ist aber möglich.

Beispielsweise fließt die leichte Phase 120 aus dem oberen Auslass 150.2 und die schwere Phase
15 140 über den unteren Auslass 150.1 kontinuierlich aus der Trennvorrichtung 100 aus. Das kontinuierliche Einströmen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (ATPS) 110 in die Trennvorrichtung 100 hinein, kann auch eine Rolle für das Ausströmverhalten an den Auslässen 150.1 und 150.2 spielen. Die Öffnung 192 des Tauchrohres 190 taucht dann beispielsweise in keine der Phasen ein.

20 Steigt die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 an (die Leitfähigkeitssonde 160.2 für die leichte Phase 120 zeigt eine höhere elektrische Leitfähigkeit an), so wird die Öffnung 192 des Tauchrohres 190 in die schwere Phase 140 verstellt (das Tauchrohr 190 wird heruntergefahren) und schwere Phase 140 kann zusätzlich abgepumpt/abgesaugt werden (beispielsweise unter Verwendung einer Pumpe, die einen Unterdruck erzeugt), bis der Wert, den die Leitfähigkeitssonde 160.2 in der leichten Phase
25 120 misst, wieder im Sollwert-Bereich liegt. Dann kann das Tauchrohr 190 wieder in die Ausgangsposition gestellt und die Pumpe abgeschaltet werden.

Sinkt die Phasengrenzfläche(n)/Zwischenphase 130 ab (die Leitfähigkeitssonde 160.1 für die schwere Phase 140 zeigt eine geringere elektrische Leitfähigkeit an als für die schwere Phase 140) kann das
30 Tauchrohr 190 in die leichte Phase 120 verstellt werden (das Tauchrohr wird hochgefahren und nachpositioniert) und leichte Phase 120 wird abgepumpt (beispielsweise abgesaugt mit Unterdruck, der durch eine Pumpe erzeugt wird) bis der Wert, den die Leitfähigkeitssonde 160.1 in der schweren Phase 140 misst, wieder im Sollwert-Bereich liegt. Das Tauchrohr 190 kann dann wieder in die Ausgangsstellung zurückkehren und die Pumpe kann abgeschaltet werden. Alternativ muss das Tauchrohr 190
35 nach Beseitigung der Störung nicht immer in die Ausgangsstellung. Es reicht hier auch aus, wenn die Pumpe abgeschaltet / der Unterdruck entfernt wird.

In der in Figur 4 gezeigten Ausführungsform wird daher ein Überrohr 193 eingesetzt, das von oben nach unten reicht. In einer zu Figur 4 analogen Ausführungsform könnte sich das Überrohr auch von
40 unten nach oben erstrecken, wobei das Tauchrohr dann als Auslass für die leichte Phase 120 dienen könnte. Bis auf das Überrohr wäre Figur 4 dann identisch.

Ein sich von unten nach oben erstreckendes Überrohr ist vorteilhaft, da nur leichte Phase 120 in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 191 und Überrohr hineinfließen würde und so ein Zutritt von Zwischenphase 130 oder schwerer Phase 140 zur Öffnung 192 im Innenrohr 191 erschwert würde.

5

Wenn gemäß dieser weiteren Ausführungsform (nicht gezeigt) das Überrohr sich von unten nach oben erstrecken würde und in die leichte Phase 120 reichen würde, um die leichte Phase 120 mit der Öffnung 192 im Innenrohr 191 zu entnehmen, so wäre es zweckmäßig, wenn die Sonde 160.2 in der leichten Phase 120 tiefer als das obere Ende des Überrohrs angeordnet würde. Damit könnte man ein zu hohes Ansteigen der schweren Phase 140 (untere Phase) und/oder gegebenenfalls der Zwischenphase mit den elektrischen Leitfähigkeitswerten erfassen, bevor diese in den Zwischenraum zwischen Innenrohr 191 und Überrohr hineinfließen und bis zur Öffnung 192 des Tauchrohrs gelangen könnten.

10

Ein sich von unten nach oben erstreckendes Überrohr (nicht gezeigt) würde daher den Zutritt von unerwünschter Phase (hier: Zwischenphase 130 und/oder schwere Phase 140), sofern die Phasengrenzfläche(n) nicht zu weit ansteigt(ansteigen) verhindern.

15

Die obigen Ausführungen zu Figur 4 gelten in dieser Ausführungsform mit sich von unten nach oben erstreckendem Überrohr daher analog.

20

Figur 5 zeigt einen Querschnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 100 mit 4 Einführöffnungen 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, denen jeweils 4 Sonden 162.1, 162.2, 162.3, 162.4 zugeordnet sind, in einer radialen Anordnung (links) und eine Seitenansicht hiervon (rechts);

25

In der Ausführungsform gemäß Figur 5 sind 4 Sonden 162.1, 162.2, 162.3 und 162.4 in 4 Einführöffnungen 158.1, 158.2, 158.3, 158.4 gezeigt, die in der Trennvorrichtung 100 zum Einsatz kommen sollen. Auf der linken Seite der Figur 5 ist eine Seitenansicht im Schnitt einer Trennvorrichtung 100 mit einer leichten Phase 120, einer Zwischenphase 130 und einer schweren Phase 140 gezeigt, wobei die 4 Einführöffnungen 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, in denen sich jeweils eine der Sonden 162.1, 162.2, 162.3 und 162.4 befindet, in einer radialen Anordnung in der Außenwand 155 der Trennvorrichtung 100 angeordnet sind. Die Sonde 162.1 ist für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase 140, die Sonde 162.2 für die Zwischenphase 130 und die Sonden 162.3 und 162.4 für die leichte Phase vorgesehen. Wie man aus Figur 5 ersehen kann, sind die 4 Einführöffnungen 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, auf einem Kreisbogen angeordnet, der im gezeigten Beispiel der Form der Außenwand 155 oder dem Umfang der Trennvorrichtung 100 entspricht.

30

35

Auf der rechten Seite von Figur 5 ist eine Seitenansicht der 4 Einführöffnungen 158.1, 158.2, 158.3, 158.4 mit den 4 Sonden 162.1, 162.2, 162.3 und 162.4 der Trennvorrichtung 100 dargestellt. Diese Anordnung ist im Hinblick auf eine exaktere Feststellung und zuverlässigere Detektion der Position

40

der einzelnen Phasen anhand der gemessenen Leitfähigkeitswerte vorteilhaft und ermöglicht daher eine schnellere und robustere Erfassung, Regelung und Kontrolle des Verfahrens.

In Figur 6 ist ebenfalls ein Querschnitt einer beispielhaften erfindungsgemäßen Ausführungsform einer Trennvorrichtung 100 mit den 4 Sonden 163.1, 163.2, 163.3 und 163.4 in 4 Einführöffnungen 159.1, 159.2, 159.3, 159.4 dargestellt. Jedoch sind die 4 Einführöffnungen 159.1, 159.2, 159.3, 159.4 in einer radialen Anordnung mit horizontaler Verteilung (links) und eine Seitenansicht hiervon (rechts) gezeigt. Eine radial versetzte Anordnung jeweils der Einführöffnungen 159.1, 159.2, 159.3, 159.4 führt ebenfalls zu einer zuverlässigeren Erfassung der einzelnen Phasen und somit schnelleren und robusteren Verfahrensregelung und -kontrolle.

In den Figuren 1 bis 6 können die gezeigten ein oder mehreren Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit auch durch Sonden zur Messung der Trübung ersetzt werden.

Gemäß einer Ausführungsform können nur Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit in der Trennvorrichtung eingesetzt werden. Gemäß einer weiteren Ausführungsform können auch nur Sonden zur Messung der Trübung in der Trennvorrichtung zum Einsatz kommen. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann auch eine Kombination aus Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit und aus Sonden zur Messung der Trübung in der Trennvorrichtung vorgesehen sein.

Nachfolgend wird das Verfahren der Erfindung anhand von Beispielen weiter veranschaulicht, ohne die Erfindung hierauf zu beschränken.

25 Ausführungsbeispiele

Das Verfahren der Erfindung wird in den Beispielen im Einzelnen anhand verschiedener Ausführungsformen erläutert.

30 Vorbemerkungen

Als Trennvorrichtung wird in den Beispielen ein Abscheider mit einem wässrigen Zwei-Phasen-System gefüllt und jeweils die elektrischen Leitfähigkeiten oder Trübung der Phasen an den Positionen der Sonden über die Zeit aufgenommen. Die Versuche werden mit einem Abscheider-Füllvolumen von 920 ml und 470 ml durchgeführt. Untersucht werden wässrige Zwei-Phasen-Phosphat-, Zwei-Phasen-Citrat- und Zwei-Phasen-Ammonium-Systeme aus den Ausgangsmaterialien Polymer/Salz/ Wasser. Es bilden sich eine polymerreiche, leichte Phase und eine salzreiche, schwere Phase. Die phasenbildenden Komponenten oder getrennten Phasen werden in Behältern vorgegeben, aus denen entsprechende Pumpen die Komponenten fördern.

40

Bevor die Flüssigkeiten in den Abscheider gegeben werden, durchlaufen die Flüssigkeiten einen Massenflussmesser und erreichen einen statischen Mischer. Nachdem der Mischer passiert wurde, läuft das Flüssigkeitsgemisch in den Abscheider, in dem sich die spezifischen Phasen absetzen. Die leichte Phase kann oben an einem Auslass entnommen werden. Wenn ein Tauchrohr eingesetzt wird, kann dieses beispielsweise die schwere Phase durch eine Öffnung in Form eines Überlaufventils entnehmen. In den Abscheider ragen zwei Leitfähigkeitssonden, um die jeweiligen Phasenstände zu überwachen. Die elektrischen Leitfähigkeiten werden mithilfe eines Gerätemanagers zur Messwerterfassung und Steuerung aufgenommen und aufgezeichnet. Bei den Versuchen, bei denen als trennendes Ausgangsmaterial eine Zellkultur eingesetzt wurde, fand zudem eine Trübungssonde Verwendung, die innerhalb des Zuführstroms platziert wurde.

Wenn in den Beispielen ein Tauchrohr zum Einsatz kommt, so wird dieses Tauchrohr mit einem Überrohr eingesetzt.

15 Kontinuierliche Extraktionsversuche

Das erfindungsgemäße Verfahren wurde mit drei unterschiedlichen Maßstäben durchgeführt: zwei verschiedene Labormaßstäbe mit einem Abscheider DN35 und einem Abscheider DN50 und ein Pilotmaßstab mit einem Abscheider DN150. „DN“ ist die Nennweite und gibt den Innendurchmesser eines Rohrs an und legt damit die Größe im Gerätebau fest. DN35 und DN50 stellen daher Labormaßstab dar und DN150 (80L-Maßstab) ist bereits Pilotmaßstab, d.h. ein größerer Maßstab, der die Herstellung größerer Produktmengen ermöglicht.

Für die drei untersuchten Maßstäbe kommen jeweils geometrisch-ähnliche Abscheider zum Einsatz. Sofern nicht explizit anders angegeben, werden zur Phasendurchmischung statische Mischelemente (Typ Kenics) verwendet. Für die unterschiedlichen Maßstäbe kommen entsprechend geometrisch ähnliche, aber den Durchsätzen angepasste Mischstrecken zum Einsatz. Die Überwachung der Durchflüsse erfolgt mittels Massendurchflussmesser. Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit an geeigneten Höhenpositionen erfolgt durch die Verwendung zweier Leitfähigkeitsmesssonden. Die wichtigsten Komponenten und Spezifikationen des Versuchsaufbaus zur Durchführung der kontinuierlichen Extraktionsversuche in den Versuchsanlagen sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2:

Nummer	Bezeichnung	Kommentar
1	Zahnradpumpe (Ismatec)	- im 80L-Maßstab durch Peristaltikpumpe ersetzt
2	Massendurchflussmesser (Bronckhorst)	- Ausführung M14, Labormaßstab
3	Massendurchflussmesser (Endress+Hauser)	- 80L-Maßstab
4	Mischstrecke Labor	- Kenics-Helices

	(Eigenanfertigung)		
5	Mischstrecke (Eigenanfertigung)	Pilot	- Kenics-Helices
6	Abscheider (DN35)		- Kleinster Maßstab, kein Sondenanschluss
7	Abscheider (DN50)		- Typischer Labormaßstab, mit Sondenanschluss
8	Abscheider (DN150)		- Pilomaßstab, mit Sondenanschluss und automatisierter Füllstandsregelung
9	Leitfähigkeitsmesssonde (Hamilton)		- Teil des Detektionssystems
10	Trübungsmesssonde (Exxner)		- Transmission, $\alpha=880\text{nm}$
11	Labbox (Hitec Zang)		- Zur Messwerterfassung und Steuerung

Alle zu regelnden und/oder zu messenden Prozessgrößen werden durch den Gerätemanager (Labbox) erfasst und ggf. angesteuert. Die Umsetzung der grafischen Benutzeroberfläche und die Bedienung erfolgen durch die Software Labvision (HiTec Zang GmbH, Herzogenrath, Deutschland).

5

Labormaßstab DN35 und DN50

Hierzu werden in den Beispielen 5.1 bis 5.3 die phasenbildenden Komponenten und eine Zellkultur zunächst in eine statische Mischstrecke gefördert. Aufgrund der Durchmischung und den gleichzeitig vorliegenden beiden wässrigen Phasen findet ein Stoffübergang von Zielprodukt und Nebenkomp-

10

ponenten statt. Ebenso wird durch die ständige Durchmischung eine Dispergierung von Biopartikeln in einer der Phasen erreicht, wodurch eine Zwischenphase entsteht, die zwischen ihren beiden Phasengrenzflächen Biopartikel bindet, die jedoch das Zielprodukt nicht mehr enthält.

Nach Durchlaufen der Mischstrecke schließt sich unmittelbar der Abscheider an, der wie in Figur 2 dargestellt, aufgebaut ist. Das eintretende Gemisch trennt sich dort entlang der Strömungsrichtung in eine leichte und eine schwere Phase auf. Gleichzeitig kommt es zur Ausbildung einer charakteristischen Zwischenphase, die eine durch die Biopartikel stabilisierte Dispersion der schweren Phase darstellt. Durch gezielte Höheneinstellung des Tauchrohrs, das eine Öffnung aufweist und daher wie ein Überlaufventil fungiert, wird kontinuierlich die schwere Phase als auch die Zwischenphase aus dem Abscheider entfernt. Die leichte Phase strömt ab einer kritischen Füllhöhe aus dem oberen Aus-

20

lass für die leichte Phase aus. Alle Phasen werden in Gefäßen aufgefangen.

Nur der Vollständigkeit halber wird nochmals darauf hingewiesen, dass der „hochgefahren“ Zustand des Tauchrohrs bedeutet, dass ein Nachjustieren der Höhe des Tauchrohrs, und zwar nach oben, erfolgt. Im Falle, dass das Tauchrohr vollständig hochgefahren wird, befindet sich die Öffnung beispielweise oberhalb des Flüssigkeitsspiegels in der Trennvorrichtung oder die Öffnung ist so weit

25

hochgefahren, dass keine Flüssigkeit mehr aus dieser ausströmen kann. Das Tauchrohr ist dann außer Funktion. Dies wird in den Beispielen jeweils im Einzelnen erläutert.

- 5 Der „heruntergefahrene“ Zustand des Tauchrohrs bedeutet, dass ein Nachjustieren der Höhe des Tauchrohrs, und zwar nach unten, erfolgt. Das Tauchrohr befindet sich während des Hoch- als auch Herunterfahrens in Funktion, sofern nicht anders angegeben.

Es sind in den Figuren nicht immer alle Vorgänge des Herauf- und Herunterfahrens des Tauchrohrs dargestellt, da dies zu unübersichtlich wird und sich diese aus den Erläuterungen ergeben.

10

Pilotmaßstab DN150

- 15 Der Versuchsaufbau im Pilotmaßstab, wie in Beispiel 5.4 beschrieben, entspricht grundlegend den oben aufgeführten Angaben für den Labormaßstab. Der Versuchsaufbau im Pilotmaßstab unterscheidet sich von demjenigen im Labormaßstab hinsichtlich der in Tabelle 2 aufgeführten Pumpen, Mas-
- sendurchflussmesser, statischen Mischstrecken und der Größe des eigentlichen Abscheiders.

Störanfälligkeit des Verfahrens

- 20 Es werden auch Versuche zur Störanfälligkeit des Verfahrens (s. Beispiel 4) durchgeführt. Die Störversuche werden durchgeführt, um zu bestimmen, inwiefern die Detektion der Phasengrenzfläche(n) mithilfe der Leitfähigkeitssonden dazu geeignet ist, Rückschlüsse auf das eingestellte System zu ziehen. Hierfür wurden variierende Systeme beim Anfahren und im kontinuierlichen Betrieb nach dem Anfahren mit einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem in den Abscheidern untersucht. Das
- 25 Anfahren ist in den Versuchen die Zeitspanne, während der sich die Phasen im Abscheider absetzen und bevor und während sich die Phasen entmischen und aus dem Abscheider entnommen werden.

- In Beispiel 4.1, wo der Störfall im kontinuierlichen Betrieb erfolgt, wurde der Abscheider zuerst gefüllt und dann mithilfe eines Tauchrohrs ein kontinuierlicher Betrieb eingestellt. Dann wurde auf ein Stör-
- 30 system gewechselt und die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit aufgenommen.

- Bei den Anfahrstörversuchen der Beispiele 4.2, 4.3 und 4.4 wurde das Störsystem von Anfang an in den Abscheider gegeben und der kontinuierliche Betrieb eingestellt. Sobald dieser erreicht war, wurde auf die korrekte Systemzusammensetzung gewechselt und die elektrischen Leitfähigkeiten auf-
- 35 genommen.

- Ein Störsystem ist hier ein System, das entweder einphasig anstelle des Zwei-Phasen Systems ist oder eine Zusammensetzung aufweist, die von der üblichen Zusammensetzung dadurch abweicht, dass eine Komponente des wässrigen Zwei-Phasen-Systems mit 10% mehr oder 10% weniger einge-
- 40 setzt wird.

In den Störversuchen wird die Zellkultur durch VE-Wasser ersetzt.

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen sind nachfolgend zusammengefasst:

5 Liste der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ATPE	Wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (Aqueous two-phase extraction)
ATPS	Wässriges Zwei-Phasen-System (Aqueous two-phase system)
COG	Materialaufwand (Cost of goods)
DK	Dielektrizitätskonstante
DN	Nominaler Durchmesser (diameter nominal)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HCP	Wirtszellprotein (Host cell protein)
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
LF	Leitfähigkeit
LP	Leichte Phase
PEG	Polyethylenglykol
SP	Schwere Phase
VE	Vollentsalztes Wasser
WCP	nasse Zellmasse (Wet cell paste)

Beispiel 1:

Veranschaulichung des Beginns einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem

10

In Beispiel 1 wird der Beginn einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider unter Verwendung eines wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystems beschrieben. Man bezeichnet den Beginn der Extraktion auch als Anfahren, d.h. die Phasen setzen sich ab, werden aber noch nicht entnommen.

15 Das wässrige Zwei-Phasen-Phosphat-System ist wie folgt aufgebaut:

Tabelle 1: Massenanteile wässriges Zwei-Phasen-Phosphat-System

Substanz	Anteil [Gew.-%]
Wasser	44,5
Puffer (40 Gew.-% Phosphat, pH 6.0)	40,0
PEG400-Lösung	15,5

Bei diesem Versuch werden die fertig hergestellten und vorbereiteten spezifischen Phasen des Zwei-Phasen-Phosphatsystems in den Abscheider gefördert. Hierbei wurde ein Gesamtmassenstrom von 100 g/min eingestellt, wobei die leichte Phase mit 60 g/min und die schwere Phase mit 40 g/min gefördert wird, um dem Phasenverhältnis des verwendeten Systems zu entsprechen. Es wurden daher

5 die getrennt vorliegenden Phasen zusammengegeben, damit das Zwei-Phasen-System genau charakterisiert werden kann. Der Versuch dient daher der Veranschaulichung der Messung der elektrischen Leitfähigkeit. Zudem kann in dieser Art und Weise ein Vorversuch ausgestaltet sein, um vorab die zu erwartenden elektrischen Leitfähigkeiten zu bestimmen.

10 Mithilfe der Leitfähigkeitssonden werden die elektrischen Leitfähigkeiten über die Zeit aufgenommen. Die erste Sonde (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) ist für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase und die zweite Sonde (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2) für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase vorgesehen. Damit die Leitfähigkeitsverläufe möglichst vergleichbar sind, werden sie so dargestellt, dass die erste Sonde bei $t = 0$ die leichte Phase erfasst. So lassen

15 sich die Verläufe bei verschiedenen Versuchen besser vergleichen. Der verwendete Abscheider hat hier ein Volumen von 920 ml. Das Anfahrverhalten wird solange aufgenommen, bis zum ersten Mal leichte Phase aus dem oberen Ablauf tropft.

In Figur 7a sind die elektrischen Leitfähigkeits-Messwerte der ersten Sonde während des Anfahrens dargestellt, wobei die erste Sonde (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) die schwere Phase erfassen soll. In

20 Figur 7a ist eine Hüllkurve dargestellt, umfassend die oberen und unteren Grenzen der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren mindestens Duplikate.

25 In der Kurve von Figur 7a wird das Anfahren des Verfahrens anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit bei der ersten Sonde über die Zeit aufgetragen und in die Abschnitte I, II und III unterteilt. Im Abschnitt I von etwa 0 bis 200 s wird zu Beginn des Anfahrens von der ersten Sonde zunächst die leichte Phase detektiert. Mit zunehmender Flüssigkeit des in den Abscheider strömenden Zwei-Phasen-Systems taucht die Sonde dann in Abschnitt II in der Kurve bei etwa 200 bis etwa 400 s zu-

30 nehmend in die schwere Phase ein, d.h. die Werte für die elektrische Leitfähigkeit nehmen stetig zu. In Abschnitt III der Kurve wird von der ersten Sonde dann nur noch die schwere Phase detektiert.

In Figur 7b sind die elektrischen Leitfähigkeits-Messwerte der zweiten Sonde (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2) während des Anfahrens über die Zeit in [s] aufgetragen, wobei die zweite Sonde die leichte

35 Phase erfasst. In Figur 7b ist wieder eine Hüllkurve dargestellt, umfassend die oberen und unteren Grenzen der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren mindestens Duplikate. Aus der Kurve von Figur 7b ist die elektrische Leitfähigkeit der zweiten Sonde im Laufe der Zeit zu ersehen. Sobald die obere leichte Phase die Sonde erreicht, wird eine nahezu konstante elektrische Leitfähigkeit gemessen, welche zeigt, dass die leichte

40 Phase am Ort der Sondenmessung nahezu konstant vorliegt.

Beispiel 2:

Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystem

- 5 In Beispiel 2 wird ein Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider unter Verwendung eines wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystems beschrieben und die gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten von zwei Sonden, wie beispielweise in Figur 2 dargestellt, erläutert. In Figur 8 sind die Messwerte der beiden Sonden in zwei Kurven K1 und K2 dargestellt. Die erste Sonde (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) misst die elektrische Leitfähigkeit [mS/cm] der schweren Phase über die Zeit [s], dargestellt in Kurve K1. Die zweite Sonde (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2) misst die elektrische Leitfähigkeit [mS/cm] der leichten Phase über die Zeit [s], dargestellt in Kurve K2.

Die Zusammensetzung des wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystems ist wie in Beispiel 1 beschrieben.

15

Wie aus Figur 8 zu entnehmen, gliedert sich das Verfahren in drei Abschnitte, das Anfahren von 0 bis etwa 980 s, den kontinuierlichen Betrieb von etwa 980 s bis etwa 4580 s und das Abfahren ab etwa 4580 s.

- 20 Der kontinuierliche Betrieb ist nur für eine beispielhafte Zeitspanne dargestellt und selbstverständlich auch deutlich länger möglich; beispielweise kann ein kontinuierlicher Betrieb über mehrere Stunden oder auch länger durchgeführt werden.

- 25 In Figur 8 sind der Soll-Leitfähigkeitsbereich für die schwere Phase (in Figur 8 als „Soll-Leitfähigkeit“ angegeben), oben in Figur 8, und der Soll-Leitfähigkeitsbereich für die leichte Phase (in Figur 8 als „Soll-Leitfähigkeit“ angegeben), unten in Figur 8, jeweils als Bereich mit gestrichelter Ober- und Untergrenze angegeben. In den Sollwert-Bereichen für die jeweiligen elektrischen Leitfähigkeiten liegt die entsprechende Phase vor. Ein Verlassen der Sollwert-Bereiche bedeutet, dass die Sonde nicht mehr in die entsprechende Phase eintaucht. Wenn der Leitfähigkeits-Sollwert-Bereich verlassen wird, muss daher nachjustiert werden. Dies erfolgt durch das in Figur 2 gezeigte Tauchrohr 180 mit einer Öffnung 182 und mit Überrohr 183. In Beispiel 2 dient das Tauchrohr dazu, schwere Phase abzuführen.

- 30 Nachdem die passenden Massenströme eingestellt sind, wird die Zuleitung an den Abscheider angeschlossen und das Anfahren des Verfahrens beginnt (0 bis etwa 980 s). Nach 4 Minuten detektiert die erste Leitfähigkeitssonde zum ersten Mal leichte Phase (in Kurve K1 der erste Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit), welche nach ungefähr 6 Minuten die zweite Sonde erreicht (in Kurve K2 der erste Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit). Ab 7,5 Minuten beginnt der Leitfähigkeitsmesswert der ersten Sonde auf das Maximum von etwa 62 mS/cm bei 15 Minuten zu steigen (Kurve K1). Nach 9 Minuten wird zum ersten Mal leichte Phase oben am Auslauf abgelassen. Nach 13,5 Minuten kommt das Tauchrohr zum ersten Mal zum Einsatz und wird heruntergefahren, um die sich aufstauende schwere

40

Phase abzuziehen. Das Tauchrohr fungiert in Beispiel 2 daher als eine Art Überlaufventil, das dazu dient, die schwere Phase gezielt abzulassen.

Das Herunterfahren des Tauchrohrs wird in Figur 8 durch ein Sternchen repräsentiert und das Hochfahren des Tauchrohrs durch ein Sternchen im Kreis symbolisiert. Genauer gesagt wird hier die Öffnung des Innenrohrs herauf- und herunterbewegt. Das Hoch- und Herunterfahren des Tauchrohrs wird in beiden Kurven K1 und K2 jeweils gleichzeitig angegeben, da sich dies in unterschiedlichem Maße auf beide Kurven auswirken kann. Das Tauchrohr wird daher in den beiden Kurven K1 und K2 nicht unterschiedlich bewegt, sondern eine Auf- oder Ab-Bewegung des Tauchrohrs wird gleichzeitig in beiden Kurven K1 und K2 angegeben.

Das Tauchrohr wurde nach 18 Minuten hochgefahren, um die Veränderung der Leitfähigkeit in den beiden Kurven K1 und K2 festzustellen. D.h. das Tauchrohr wird so weit hochgefahren, bis es keine Flüssigkeit mehr entnehmen kann. Dabei wurde gefunden, dass sich der Leitfähigkeitsmesswert der zweiten Sonde (Kurve K2) deutlich erhöht, während die erste Sonde (Kurve K1) kaum eine Veränderung misst. Dies bestätigt, dass die erste Sonde im kontinuierlichen Betrieb direkt in der schweren Phase hängt und die Leitfähigkeit dieser wiedergibt.

Beispiel 3:

Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem

In Beispiel 3 wird ein Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem beschrieben und die gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten von zwei Sonden in Figur 9a und Figur 9b dargestellt.

Das wässrige Zwei-Phasen-Citrat-System ist wie folgt aufgebaut:

Tabelle 2: Massenanteile wässriges Zwei-Phasen-Citrat-System

Substanz	Anteil [Gew.-%]
Wasser	28,06
Puffer (35 Gew.-% Citrat, pH 6.0)	50,67
PEG400-Lösung	21,27

In Figur 9a sind die elektrischen Leitfähigkeiten in [mS/cm] der schweren Phase über die Zeit [s] aufgetragen, die die erste Sonde (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) misst. In Figur 9b sind die elektrischen Leitfähigkeiten in [mS/cm] der leichten Phase über die Zeit [s] aufgetragen, die die zweite Sonde (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2) misst.

In Figur 9a sind die elektrischen Leitfähigkeits-Messwerte der ersten Sonde, die in der schweren Phase gemessen werden, während des Anfahrens und auch während des kontinuierlichen Betriebs danach dargestellt. In Figur 9a ist wieder eine Hüllkurve dargestellt, umfassend die oberen und unteren Grenzen der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren mindestens Duplikate.

Die Messkurve in Figur 9a, die den Verlauf der aufgenommenen Leitfähigkeitsmesswerte der ersten Sonde dargestellt, die die schwere Phase detektieren soll, kann wieder in die Abschnitte I, II und III unterteilt werden. Im Abschnitt I von etwa 0 bis etwa 110 s wird von der ersten Sonde zunächst die leichte Phase detektiert. Mit zunehmendem Volumen des im Abscheider befüllten Zwei-Phasen-Systems taucht die Sonde dann in Abschnitt II in der Kurve zwischen etwa 110s und etwa 300 s zunehmend in die schwere Phase ein, d.h. die Werte für die elektrische Leitfähigkeit nehmen stetig zu. In Abschnitt III der Kurve ab etwa 300 s wird von der ersten Sonde dann die schwere Phase detektiert.

Sobald in Figur 9a der Flüssigkeitsspiegel die Sonde erreicht, steigt der Wert der elektrischen Leitfähigkeit daher plötzlich auf 8 mS/cm an. Zu diesem Zeitpunkt wird zum ersten Mal die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase detektiert (Abschnitt I in Figur 9a). Im weiteren Verlauf steigt der Wert erst schwächer und dann nahezu linear auf knapp unter 35 mS/cm und dann bis auf 45 mS/cm an. Zu diesem Zeitpunkt wird zum ersten Mal reine schwere Phase detektiert (Abschnitt II in Figur 9a). Dieser Wert für die elektrische Leitfähigkeit bleibt über die weitere Versuchsdauer nahezu konstant, da die erste Sonde immer die schwere Phase detektiert und diese in den Versuchen auch nicht absinkt (Abschnitt III in Figur 9a). Um zu gewährleisten, dass die schwere Phase nicht zu weit ansteigt oder absinkt, wird ein verwendetes Tauchrohr mit einer Öffnung in Abhängigkeit von den aufgenommenen elektrischen Leitfähigkeiten gegebenenfalls eingesetzt und nachjustiert.

Wenn sich das Zielprodukt in der leichten Phase befindet, ist es zweckmäßig, wenn am Ende des kontinuierlichen Betriebes, beim sogenannten Abfahren, das Tauchrohr wieder hochgefahren wird (das Tauchrohr aufhört, schwere Phase zu entnehmen), damit sich schwere Phase ansammelt und dadurch möglichst viel leichte Phase und damit Produkt aus dem Abscheider verdrängt. Dies ist beispielsweise auch in Figur 8 bei etwa 4580 s dargestellt, wo das Tauchrohr hochgefahren wird. Dieses Vorgehen, anhand von Verdrängung der leichten Phase durch zusätzliche schwere Phase die Ausbeute an leichter Phase zu erhöhen, wird oben bei Figur 3 detailliert geschildert.

Das Hoch- und Herunterfahren des Tauchrohrs ersieht man besonders deutlich aus Figur 9b. In Figur 9b ist der Verlauf die elektrischen Leitfähigkeits-Messwerte der zweiten Sonde (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2), die die leichte Phase detektieren soll, während des Anfahrens und dem nachfolgenden kontinuierlichen Betrieb über die Zeit in [s] aufgetragen. In Figur 9b ist wieder eine Hüllkurve dargestellt, umfassend die oberen und unteren Grenzen der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen repräsentieren mindestens Duplikate.

40

Aus der Kurve von Figur 9b sind somit die gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte der zweiten Sonde im Laufe der Zeit zu ersehen. Sobald die zweite Leitfähigkeitssonde in die Flüssigkeit eintaucht, springt der Leitfähigkeitsmesswert auf etwa 8 mS/cm. Zuerst steigt der Messwert langsam an, sobald eine Leitfähigkeit von 10 mS/cm erreicht ist, steigt der Messwert nahezu linear auf einen Maximalwert an. Der deutliche Anstieg lässt sich damit erklären, dass sobald am oberen Auslass leichte Phase ausgetreten ist, das Tauchrohr nicht direkt heruntergefahren wurde. Dadurch staut sich die schwere Phase auf, was die zweite Sonde durch eine Erhöhung des Leitfähigkeitsmesswerts anzeigt.

Zu diesem Zeitpunkt, d.h. bei etwa 300 s wird das Tauchrohr dann heruntergefahren (angegeben durch das Sternchen in der Kurve). Die elektrische Leitfähigkeit ist zu diesem Zeitpunkt auf etwas über 20 mS/cm angestiegen und hat daher den Sollwert-Bereich für die elektrischen Leitfähigkeitswerte der leichten Phase von wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystemen im Bereich von 5-15 mS/cm verlassen. Mit anderen Worten, die schwere Phase nähert sich der zweiten Sonde an.

Das Tauchrohr wird daher heruntergefahren (Sternchen in der Kurve in Figur 9b) und ab diesem Zeitpunkt fließt durch das Tauchrohr schwere Phase ab, wodurch die schwere Phase im Abscheider abnimmt. Gleichzeitig sinkt auch die leichte Phase ab, so dass sich die zweite Sonde wieder in reiner leichter Phase befindet. Dies zeigt sich in Figur 9b durch das Absinken der elektrischen Leitfähigkeitswerte auf etwa 10 mS/cm. Sobald die obere leichte Phase die zweite Sonde wieder erreicht hat, wird eine nahezu konstante elektrische Leitfähigkeit gemessen, welche zeigt, dass die leichte Phase am Ort der Sondenmessung nahezu konstant vorliegt. Bei einem Messwert von etwa 10 mS/cm detektiert die zweite Sonde hier daher reine, leichte Phase.

Das Tauchrohr in der Ausführungsform mit Überrohr, dessen Öffnung im Innenrohr vorliegt, kann dabei wie ein Überlaufventil betrieben werden, wie dies beispielweise in den Figuren 2 und 3 beschrieben wird. Die Flüssigkeit lässt man hierbei durch Schwerkraft abfließen. Alternativ kann das Tauchrohr mit seiner Öffnung aber auch die schwere Phase absaugen, wie in Figur 4 erläutert. Die eigentliche Verfahrensweise wird hierdurch nicht verändert.

Nachdem, wie in Figur 9b gezeigt, der stationäre Zustand eine relativ kurze Zeit bei etwa 10 mS/cm gehalten wurde, nur um den kontinuierlichen Betrieb darzustellen, beginnt das Abfahren. Selbstverständlich könnte der kontinuierliche Betrieb sehr viel länger aufrechterhalten werden, beispielweise mehrere Stunden oder noch länger. Dies würde jedoch an den zur Verfügung stehenden Informationen und deren Aussagekraft nichts ändern.

Zum Abfahren wird das Tauchrohr nach etwa 1000 s hochgefahren (angegeben durch das Sternchen im Kreis in Figur 9b). Dies bedeutet, dass das Tauchrohr nicht länger in Betrieb ist, so dass sich die schwere Phase wieder aufstaut. Dadurch steigt der Leitfähigkeitsmesswert wieder an, bis er den Wert der schweren Phase erreicht hat. Dies zeigt auch die großen Unterschiede der elektrischen Leitfähigkeiten der schweren Phase (Citratsystem, schwere Phase: 30-50 mS/cm, s. Tabelle 1) gegenüber der leichten Phase (Citratsystem, leichte Phase: 5-15 mS/cm, s. Tabelle 1). Sobald die zweite Messsonde

den Leitfähigkeitsmesswert der schweren Phase anzeigt, wird der Versuch beendet, da ein weiteres Ansteigen der schweren Phase nicht mehr detektiert werden kann.

Beispiel 4:

5 Untersuchung der Störanfälligkeit des Verfahrens

Bei der Untersuchung der Störanfälligkeit des Verfahrens soll festgestellt werden, wie zuverlässig das Verfahren arbeitet und inwiefern durch die Phasendetektion Rückschlüsse auf das im Abscheider eingestellte System im kontinuierlichen Betrieb gezogen werden können.

10

Beispiel 4.1:

In Beispiel 4.1 wird anstelle eines Zwei-Phasen-Systems ein einphasiges System in den Abscheider gegeben. Dieses einphasige System wird auch als Störsystem bezeichnet.

15 Als Ausgangssystem wird ein wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem verwendet. Das Störsystem wird dadurch hergestellt, dass 50 % weniger Phosphatpuffer eingebracht wird. Dadurch wird das Störsystem einphasig. In Figur 10 sind die Leitfähigkeitsmesswerte von Beispiel 4.1 dargestellt. Kurve K1 gibt die elektrischen Leitfähigkeitswerte der ersten Sonde an, welche die schwere Phase misst. Kurve K2 gibt die elektrischen Leitfähigkeitswerte der zweiten Sonde an, welche die leichte Phase misst.

20

Zunächst erfolgt in üblicher Weise das Anfahren mit einem Zwei-Phasen-Phosphatsystem, wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben. Nachdem das Anfahren mit dem Phosphatsystem abgeschlossen ist, wird das Störsystem bei (S1.1) in den Abscheider eingebracht. Sobald das einphasige Störsystem in den Abscheider gefördert wird, fällt die Leitfähigkeit der Sonde für die schwere Phase (Kurve K1) ab. Das
25 Abfallen der Leitfähigkeit bis auf einen Wert von 60 mS/cm lässt sich durch die Einstellung des Tauchrohrs (nicht gezeigt) erklären, das hier wieder als Überlaufventil fungiert. Das Tauchrohr wurde in diesem Versuch anschließend nicht mehr verstellt und auf einer konstanten Einstellung gehalten, die bei normalem Zwei-Phasen-Phosphatsystem angewendet wird. Der Leitfähigkeitswert fällt anschließend nahezu linear auf 40 mS/cm ab und senkt sich dann mit geringerer Geschwindigkeit auf 25 mS/cm ab.
30 Das erneute Einbringen von Störsystem bei (S1.2) in den Abscheider führt zu keinen großen Veränderungen mehr. Die Leitfähigkeit der zweiten Sonde, dargestellt in Kurve K2, steigt langsam von 20 mS/cm auf 30 mS/cm an.

Beispiel 4.2:

35 In Beispiel 4.2 wird der Wassergehalt von schwerer und leichter Phase jeweils variiert. Es wird ein wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem im kontinuierlichen Betrieb verwendet.

Die aufgenommenen Werte für die Leitfähigkeiten sind in Figur 11 über die Zeit in [s] aufgetragen. Es werden die elektrischen Leitfähigkeiten der schweren Phase mit der ersten Sonde und der leichten

40 Phase mit der zweiten Sonde gemessen. Es wurden zwei Versuche durchgeführt: Im ersten Versuch mit einem Zwei-Phasen-Phosphatsystem, das einen Wassergehalt von -10 Gew.-% gegenüber einem

Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Wassermenge enthält, und im zweiten Versuch mit einem Zwei-Phasen-Phosphat-System, das einen Wassergehalt von +10 Gew.-% gegenüber einem Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Wassermenge enthält. In der folgenden Tabelle 3 sind die verwendeten Mengen angegeben.

5

Tabelle 3: wässriges Zwei-Phasen-Phosphat-System mit variierender Wassereinwaage

Substanz	-10% Wasser [Gew.-%]	+10% Wasser [Gew.-%]	Zwei-Phasen- Phosphatsystem mit korrekter Wassermenge [Gew.-%]
Wasser	41,9	46,9	44,5
Puffer (40 Gew.-% Phosphat, pH 6.0)	41,9	38,3	40,0
PEG400-Lösung	16,2	14,8	15,5

Beide Versuche sind in Figur 11 wiedergegeben. Die Beschriftung von Figur 11 ist wie folgt:

Kurve 2.1.....schwere Phase mit –10 Gew.-% Wasser;

10 Kurve 2.2.....schwere Phase mit +10 Gew.-% Wasser;

Kurve 2.3..... leichte Phase mit –10 Gew.-% Wasser;

Kurve 2.4..... leichte Phase mit +10 Gew.-% Wasser.

Der Pfeil in Figur 11 zeigt Luftblasen im System an, die zu Messfehlern führen.

15

Die Formulierung "schwere Phase mit –10 Gew.-% Wasser" bedeutet, dass die elektrische Leitfähigkeit für die schwere Phase in der Kurve in Figur 11 gezeigt wird, wobei das verwendete Zwei-Phasen-Phosphatsystem einen um 10 Gew.-% geringeren Wassergehalt aufweist als ein übliches Zwei-Phasen-Phosphatsystem mit korrektem Wassergehalt.

20

Die Formulierung "schwere Phase mit +10 Gew.-% Wasser" bedeutet, dass die elektrische Leitfähigkeit für die schwere Phase in der Kurve in Figur 11 gezeigt wird, wobei das verwendete Zwei-Phasen-Phosphatsystem einen um 10 Gew.-% höheren Wassergehalt aufweist als ein übliches Zwei-Phasen-Phosphatsystem mit korrektem Wassergehalt.

25

Beispiel 4.3:

In Beispiel 4.3 wird der Polymergehalt des Polyethylenglykols (PEG) von schwerer und leichter Phase jeweils variiert. Es wird ein wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem verwendet. Es wird im kontinuierlichen Betrieb gearbeitet.

30

Die aufgenommenen Werte für die Leitfähigkeiten sind in Figur 12 über die Zeit in [s] aufgetragen. Es werden die elektrischen Leitfähigkeiten der schweren Phase mit der ersten Sonde und der leichten

- Phase mit der zweiten Sonde gemessen. Es wurden zwei Versuche durchgeführt: Im ersten Versuch mit einem Zwei-Phasen-Phosphat-System, das einen Polymergehalt von -10 Gew.-% gegenüber einem Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Polymermenge enthält, und im zweiten Versuch mit einem Zwei-Phasen-Phosphat-System, das einen Polymergehalt von +10 Gew.-% gegenüber einem
- 5 Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Polymermenge enthält.

In der folgenden Tabelle 4 sind die verwendeten Mengen angegeben.

Tabelle 4: wässriges Zwei-Phasen-Phosphat-Systems mit variierender Polymereinwaage

Substanz	-10% PEG [Gew.-%]	+10% PEG [Gew.-%]	Zwei-Phasen- Phosphatsystem mit korrekter Polymer- menge [Gew.-%]
Wasser	45,0	43,8	44,5
Puffer (40 Gew.-% Phosphat, pH 6.0)	40,9	39,4	40,0
PEG400-Lösung	14,1	16,8	15,5

10

Beide Versuche sind in Figur 12 wiedergegeben. Die Beschriftung von Figur 12 ist wie folgt:

Kurve 3.1.....schwere Phase mit + 10 Gew.-% PEG;

Kurve 3.2.....schwere Phase mit - 10 Gew.-% PEG;

Kurve 3.3.....leichte Phase mit + 10 Gew.-% PEG;

- 15 Kurve 3.4.....leichte Phase mit - 10 Gew.-% PEG;

Beispiel 4.4:

- In Beispiel 4.4 wird das Puffersalz in Form des Phosphatsalzes eines wässrigen Zwei-Phasen-Phosphatsystems in der schweren und leichten Phase jeweils variiert. Es wird im kontinuierlichen
- 20 Betrieb gearbeitet.

- Die aufgenommenen Werte für die Leitfähigkeiten sind in Figur 13 über die Zeit in [s] aufgetragen. Es werden die elektrischen Leitfähigkeiten der schweren Phase mit der ersten Sonde und der leichten Phase mit der zweiten Sonde gemessen. Es wurden zwei Versuche durchgeführt: Im ersten Versuch
- 25 mit einem Zwei-Phasen-Phosphat-System, das einen Puffersalzgehalt von -10 Gew.-% gegenüber einem Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Puffersalzmenge enthält, und im zweiten Versuch mit einem Zwei-Phasen-Phosphat-System, das einen Puffersalzgehalt von +10 Gew.-% gegenüber einem Zwei-Phasen-Phosphat-System mit korrekter Puffermenge enthält.

- 30 In Beispiel 4.4. wird die Trennvorrichtung direkt mit der Störzusammensetzung befüllt. In der folgenden Tabelle 5 sind die verwendeten Mengen angegeben.

Tabelle 5: wässriges Zwei-Phasen-Phosphat-Systems mit variierender Puffersalzeinwaage

Substanz	-10% Puffer [Gew.-%]	+10% Puffer [Gew.-%]	Zwei-Phasen- Phosphatsystem mit korrekter Puffersalz- menge [Gew.-%]
Wasser	46,3	42,8	44,5
Puffer (40 Gew.-% Phosphat, pH 6.0)	37,5	42,3	40
PEG400-Lösung	16,2	14,9	15,5

Beide Versuche sind in Figur 13 wiedergegeben. Die Beschriftung von Figur 13 ist wie folgt:

Kurve 4.1.....schwere Phase mit + 10 Gew.-% Phosphatpuffer;

5 Kurve 4.2.....schwere Phase mit - 10 Gew.-% Phosphatpuffer;

Kurve 4.3.....leichte Phase mit + 10 Gew.-% Phosphatpuffer;

Kurve 4.4.....leichte Phase mit - 10 Gew.-% Phosphatpuffer.

Anhand sämtlicher Versuche in den Beispielen 4.1 bis 4.4 und den vier unterschiedlichen wässrigen Systemen (Variation der Phasenzahl sowie des Gehalts von Wasser, von Puffer und von Polymer), dargestellt in den Figures 10, 11, 12 und 13, lassen sich mit dem Messprinzip anhand des Leitfähigkeitsprofils selbst geringe Abweichungen vom Soll-Zustand erkennen. Auch über längere Prozesszeiten (>3 Stunden) ist die Messung zuverlässig (wie nachfolgend auch noch belegt werden wird) und ermöglicht somit eine optimale Effizienz bei der Abtrennung von leichter und schwerer Phase, wodurch die Ausbeute des Prozesses maximiert wird.

Beispiel 5

Kontinuierliche Extraktion im Abscheider mit Zellkultur zur Reinigung und Anreicherung von Antikörpern

20

Im Nachfolgenden wird anhand von mehreren Beispielen gezeigt, dass sich die elektrischen Leitfähigkeiten der schweren und leichten Phase bei Anwesenheit von Biopartikeln verändern und dass die dabei gebildete Zwischenphase und schwere Phase ebenfalls elektrische Leitfähigkeitswerte aufweisen können, die sich von den zu erwartenden Leitfähigkeiten unterscheiden. Die Zwischenphase stellt dabei eine Mischung aus schwerer Phase in dispergierter Form zusammen mit Zellen dar. Sowohl die Zwischenphase als auch die schwere Phase können zum Teil eine deutlich reduzierte elektrische Leitfähigkeit aufweisen, als zu erwarten wäre, was auf die Anwesenheit von Zellen und anderen leitfähigkeitssenkenden Biopartikeln zurückgeführt wird.

30 In Beispiel 5 wird gezeigt, wie die Detektion der elektrischen Leitfähigkeit verwendet wird, um das Zielprodukt in der Zielphase (in diesem Beispiel die leichte Phase) von der Gegenphase (in diesem Beispiel die schwere Phase) und der Zwischenphase mit Zellen getrennt werden können.

Beispiel 5.1

DN50-Maßstab - Citratsystem

In Beispiel 5.1 wird eine kontinuierliche Extraktion gemäß dem Messprinzip des erfindungsgemäßen Verfahrens in einem Abscheider mit Zellkultur beschrieben. Der Versuch dient zur Orientierung und Veranschaulichung des Messprinzips und wurde im Labormaßstab durchgeführt. Es wurde ein Zwei-Phasen-Citratsystem verwendet, um aus einer Zellkultur das Zielprodukt, hier ein Antikörper, zu reinigen und anzureichern. Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6: Einwaage und Massenanteile für Beispiel 5.1

Substanz	Einwaage [g]	Massenanteil Ist [Gew.-%]	Massenanteil Soll [Gew.-%]
Zellkultur	949,78	28,0	28,2
Citrat-Puffer (35 Gew.-%, pH 6.0)	1696,71	50,2	50,5
PEG 400	736,51	21,8	21,3

Das wässrige Zwei-Phasen-Citratsystem, das wie in Tabelle 6 angegeben aufgebaut ist, wurde bereits in geeigneter Weise durchmischt, so dass sich die Komponenten der Zellkultur zwischen den Phasen aufgeteilt haben. Das Zielprodukt sammelt sich in Beispiel 5.1 in der leichten Phase an. Die Mischung wird dann über eine Pumpe mit einem Massenstrom von 28 g/min in einen Abscheider gefördert. Bei dieser Förderrate dauert es ungefähr 17 Minuten bis die leichte Phase, umfassend das Zielprodukt in Form von Antikörpern, oben am Auslauf austritt. Die Versuchsübersicht zu Beispiel 5.1 ist in der folgenden Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Versuchsübersicht zu Beispiel 5.1

Massenstrom	28 g/min
Gesamtdauer	120 min
Fülldauer	17 min
LP _{Ges}	1420 ml ± 71 ml
SP _{Ges}	820 ml ± 41 ml
Antikörpergehalt	4,6 g/l ± 0,1 g/l (Zellkultur)

Die aufgenommenen elektrischen Leitfähigkeiten des Beispiels 5.1 unter Verwendung von zwei Sonden, eine Sonde für die schwere Phase (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) und eine Sonde für die leichte Phase (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2), sind in Figur 14 gegen die Zeit in [s] aufgetragen. Das Verfahren lässt sich wieder in drei Abschnitte gliedern: dem Anfahren von 0 bis etwa 810 s, dem kontinuierlichen Betrieb von etwa 810 s bis 4680 s und dem Abfahren ab etwa 4680 s.

Beim Anfahren ist der typische Verlauf erkennbar. Die erste tiefer liegende Sonde, die die schwere Phase detektieren soll, zeigt als erstes leichte Phase mit einem Wert für die elektrische Leitfähigkeit von etwa 8 mS/cm an und steigt dann bis 15 mS/cm nahezu konstant an (Kurve K1). Bei 15 mS/cm ist ein Knick der Steigung erkennbar. Hier wird die Zwischenphase mit den Zellen detektiert. Die Zwischenphase wird in Figur 14 mit Z bezeichnet und die Pfeile zeigen deren Detektion an. Die zweite Sonde zeigt einen ähnlichen Verlauf beim Anfahren (Kurve K2). Die elektrische Leitfähigkeit springt plötzlich auf 8 mS/cm. Hier wird zum ersten Mal leichte Phase detektiert. Anfänglich steigt die elektrische Leitfähigkeit nicht so stark an, bis sie in einen nahezu linearen Anstieg übergeht. Bei 15 mS/cm ist erkennbar, dass die Werte für die elektrische Leitfähigkeit weniger stark steigen, hier wird die Zwischenphase Z mit den Zellen detektiert. Sobald die zweite Sonde einen Leitfähigkeitswert von 17 mS/cm erreicht, wird das Tauchrohr heruntergefahren (Sternchen in Figur 14) und ein kontinuierlicher Prozess eingestellt. Dabei ist ein Unterschied der elektrischen Leitfähigkeiten zwischen den Phasen von 5 mS/cm erkennbar.

15 Anders als erwartet hat die schwere Phase eine deutlich geringere Leitfähigkeit als erwartet. Dies liegt wahrscheinlich an den vorhandenen Zellen und anderen leitfähigkeitssenkenden Biopartikeln.

Am Ende des kontinuierlichen Betriebs ist ein Absacken der elektrischen Leitfähigkeiten erkennbar. Dies hängt damit zusammen, dass hier das Tauchrohr tiefer eingestellt wird (Nachjustieren des Tauchrohrs), wodurch mehr schwere Phase aufgrund des höheren hydrostatischen Drucks abgezogen wird. Dadurch sollte die Reaktion des Systems getestet und die elektrischen Leitfähigkeiten erfasst werden. Die Werte für die elektrische Leitfähigkeit sinken mit Herunterfahren des Tauchrohrs (Sternchen in Figur 14) direkt ab: Dabei fällt der Messwert der zweiten Sonde (Kurve K2) bis auf den der kontinuierlichen leichten Phase, in Figur 14 als LP bezeichnet, ab. Die detektierte elektrische Leitfähigkeit der ersten Sonde sinkt im gleichen Maße ab; allerdings ist der Unterschied nicht so groß wie bei der zweiten Sonde. Der niedrigste Wert für die elektrische Leitfähigkeit liegt bei 15 mS/cm, hier wird gerade noch die Zwischenphase Z mit den Zellen erfasst. Das Tauchrohr wird dann vollständig hochgefahren (Sternchen im Kreis in Figur 14), um zu verhindern, dass die Zwischenphase durch ein weiteres Absinken der schweren Phase nicht mehr detektiert werden kann. Das Abfahren beginnt daher mit dem vollständigen Hochfahren des Tauchrohrs bei etwa 4680s (Sternchen im Kreis in Figur 14), wodurch die Messwerte für die elektrische Leitfähigkeit schnell ansteigen. Bei etwa 15 mS/cm ist bei der zweiten Sonde (Kurve K2) wieder ein Knick erkennbar. Hier wird wieder die Zwischenphase Z mit Zellen detektiert; dies wird in Figur 14 mit Pfeilen zu Z (Z bedeutet Zwischenphase) angegeben. Anders als erwartet liegen die Werte für die elektrische Leitfähigkeit der Zwischenphase mit Zellen nicht im Bereich von 30-40 mS/cm. Dies wird auf die Anwesenheit von Zellen und anderen leitfähigkeitssenkenden Biopartikeln zurückgeführt. Die Werte für die elektrische Leitfähigkeit steigen dann bis auf über 20 mS/cm. Die elektrischen Leitfähigkeiten der beiden Sonden nähern sich schließlich schnell demselben Wert an.

40 Sobald das Tauchrohr bei etwa 4200 s heruntergefahren wurde (siehe Sternchen in Figur 14), sinkt der Leitfähigkeitsmesswert der zweiten Sonde (Kurve K2) sofort auf die elektrische Leitfähigkeit der

reinen leichten Phase (5 bis 15 mS/cm) ab. Die elektrische Leitfähigkeit kann somit dazu dienen, die Zwischenphase in diesem System zu lokalisieren. Die erste Sonde hat im kontinuierlichen Betrieb zwar keine reine schwere Phase detektiert, deren elektrische Leitfähigkeit im Bereich von 30 bis 50 mS/cm liegen sollte, dennoch lässt sich mithilfe der elektrischen Leitfähigkeitswerte des Anfahrens bestimmen, welcher Messwert für die elektrische Leitfähigkeit zur Zwischenphase gehört. Der Leitfähigkeitsmesswert der Zwischenphase Z kann im ersten Plateau nach Detektion der leichten Phase LP erfasst werden. In der Zwischenphase, die hier in die schwere Phase übergeht, liegt ein Leitfähigkeitsgradient vor, wodurch der Beginn der Zwischenphase mithilfe des erfassten elektrischen Leitfähigkeitswertes gut abgeschätzt werden kann.

10

In Figur 15 ist die Zellzahl in [10^5 Zellen/mL] der in Beispiel 5.1 eingesetzten Zellkultur sowie die Zellzahl der während des Verfahrens gewonnenen leichten Phase (Kurve K2), die das Zielprodukt enthält, dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in der erhaltenen leichten Phase jederzeit konstant weniger Zellen enthalten sind als in der Zellkultur. Die reduzierte Zellzahl kann auch in der nach der Extraktion gewonnen leichten Phase beobachtet werden (Leichte Phase Pool in Figur 15).

15

Somit kann anhand von Beispiel 5.1 gezeigt werden, dass die Produktphase (leichte Phase) mithilfe der Messung der elektrischen Leitfähigkeiten eindeutig identifiziert und konstant über die kontinuierliche Extraktion von den anderen Phasen getrennt werden kann.

20

Die Antikörper liegen in der in Beispiel 5.1. abgetrennten leichten Phase angereichert und in gereinigter Form vor. Es konnten dabei die Zellen mit 1.4 log-Stufen abgereichert werden.

Beispiel 5.2

25 DN50-Maßstab – wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem
- Referenzbeispiel -

In Beispiel 5.2 wird eine kontinuierliche Extraktion gemäß dem Messprinzip des vorliegenden Verfahrens in einem Abscheider unter Verwendung einer Zellkultur beschrieben. Der Versuch dient nur zur Orientierung und Veranschaulichung des Messprinzips und wurde im Labormaßstab durchgeführt. Es wurde ein Zwei-Phasen-Phosphatsystem verwendet, um aus einer Zellkultur das Zielprodukt, hier Antikörper, zu reinigen und anzureichern. Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 8 zusammengefasst:

35 **Tabelle 8: Einwaage und Massenanteile**

Substanz	Einwaage [g]	Massenanteil [Gew.-%]
Zellkultur	970	45,5
Phosphat-Puffer (40 Gew. %, pH 6.0)	833,03	39,0
PEG 400	330,29	15,5

Das wässrige Zwei-Phasen-Phosphatsystem, das wie in Tabelle 8 angegeben aufgebaut ist, wurde bereits in geeigneter Weise in einem statischen Mischer durchmischt, so dass sich die Komponenten der Zellkultur zwischen den Phasen aufteilen. Das Zielprodukt, hier: Antikörper, sammelt sich in Beispiel 5.2 in der leichten Phase an. Die Mischung wird dann über eine Pumpe mit einem Gesamtmas-

5 senstrom von 50,7 g/min in einen Abscheider gefördert. Die Edukte werden in Bechergläsern vorgelegt und mit Zahnradpumpen in die statischen Mischer und dann in den Abscheider gefördert. Die leichte und die schwere Phase werden aufgefangen.

Eine Versuchsübersicht zu Beispiel 5.2 ist in der folgenden Tabelle 9 angegeben.

10

Tabelle 9: Versuchsübersicht zu Beispiel 5.2

Massenstrom	50,7 g/min
Gesamtdauer	58 min
Fülldauer	10 min
LP _{Ges}	1010 ml ± 50,5 ml
SP _{Ges}	700 ml ± 35 ml
Antikörpergehalt	3,1 g/l ± 0,4 g/l (Zellkultur)

Die aufgenommenen elektrischen Leitfähigkeiten des Beispiels 5.2 unter Verwendung von zwei Sonden, eine Sonde für die schwere Phase (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) und eine Sonde für die leichte Phase (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2), sind in Figur 16 gegen die Zeit in [s] aufgetragen.

15

In Figur 16 zeigt Kurve K1 die Messwerte für die elektrische Leitfähigkeit der ersten Sonde, die die schwere Phase detektieren soll und Kurve K2 die Messwerte für die elektrische Leitfähigkeit der zweiten Sonde, die die leichte Phase detektieren soll. Die Messwerte der elektrischen Leitfähigkeit der ersten Sonde in Kurve K1 steigt während des Anfahrens von 0 mS/cm auf 16 mS/cm schnell an. Die Leitfähigkeitskurven der beiden Sonden schneiden sich bei 19 mS/cm. Danach steigt der Messwert für die elektrische Leitfähigkeit der ersten Sonde in Kurve K1 nahezu linear auf einen Wert von 65 mS/cm an. Hier flacht die Kurve ab. Das Tauchrohr wird heruntergefahren (Sternchen in der Kurve K1 in Figur 16), entnimmt dann kontinuierlich schwere Phase und ein kontinuierliches Verfahren wird hierdurch eingestellt. Der Leitfähigkeitsmesswert der ersten Sonde schwankt für die schwere Phase zwischen 63,2 mS/cm und 69,3 mS/cm. Dies stellt den kontinuierlichen Betrieb des Verfahrens dar.

20

25

Zum Abfahren der kontinuierlichen Extraktion wird das Tauchrohr hochgefahren (Sternchen im Kreis in Kurve K1 in Figur 16) und hört damit auf, schwere Phase zu entnehmen. Die elektrischen Leitfähigkeitswerte der ersten Sonde nähern sich hiernach asymptotisch einem Wert von 77 mS/cm.

30

In der Kurve K2, den von der zweiten Sonde für die leichte Phase gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten, detektiert die Sonde zu Anfang einen Wert von 17 mS/cm. Dieser steigt dann auf 20 mS/cm. Dieser Wert wird eine kurze Zeit konstant detektiert und steigt im weiteren Verlauf auf 25 mS/cm an.

Zu diesem Zeitpunkt wird das Tauchrohr heruntergefahren (Sternchen in der Kurve K2 in Figur 16) und das Tauchrohr beginnt die schwere Phase zu entnehmen. Dies kann durch Schwerkraft erfolgen, wobei die im Tauchrohr, d.h. im Innenrohr vorhandene Öffnung in eine Position gebracht wird, so dass die schwere Phase abfließt. Das Tauchrohr arbeitet dann wie ein Überlaufventil. Gemäß einer anderen Ausführungsform des Tauchrohrs kann die schwere Phase auch durch das Tauchrohr abgesaugt werden. Beide Alternativen sind gleichermaßen geeignet und einsetzbar, um die schwere Phase zu entfernen.

Der Einsatz des Tauchrohrs ist am Absinken der elektrischen Leitfähigkeiten in Kurve K2 erkennbar. Die gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten durch die zweite Sonde sinken im gesamten kontinuierlichen Betrieb nahezu stetig ab, bis am Ende ein Wert von 22 mS/cm erreicht wird. Die elektrische Leitfähigkeit steigt dann auf knapp 25 mS/cm an.

Im Anschluss wird das Tauchrohr hochgefahren (Sternchen im Kreis in Kurve K2 in Figur 16) und hört daher auf, schwere Phase zu entnehmen; die gemessenen Leitfähigkeiten der zweiten Sonde steigen daraufhin nahezu linear an (Kurve K2), bis der Messwert der ersten Sonde erreicht wird (Kurve K1).

Eine Analyse der schweren und leichten Phase zeigt, dass die Aufteilung von Zielprodukt in die leichte Phase und Verunreinigungen, insbesondere Zellen, in die schwere Phase und/oder Zwischenphase nicht stattgefunden hat. Auch an der deutlichen Trübung der leichten Phase lässt sich erkennen, dass in diesem System die Zellernte nicht funktioniert hat und die Zellen in der leichten Phase verharren. Die leichte Phase ist eine disperse Phase und sollte eigentlich klarer sein. Demgegenüber setzt sich die schwere Phase schneller ab als zu erwarten wäre und ist zudem sehr klar. Zwischen den beiden Phasen ist eine Zwischenphase mit Zellen erkennbar. Die Zellen verharren in der leichten Phase und können vom Tauchrohr nicht abgezogen werden, da dieses ausgelegt ist, um die schwere Phase zu entnehmen. Es sind zudem deutliche Schlieren an Zellen im Einlauf des Abscheiders erkennbar. Somit ist es zu einer Phaseninversion im System gekommen. Dies wird auf eine unzureichende Durchmischung zurückgeführt. Daher wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines Stoffaustauschs durchgeführt, so dass sich das Zielprodukt angereichert hat und im Wesentlichen nur noch in einer der Phasen befindet und zwar in der zu erwartenden Phase und die Verunreinigungen sich angereichert haben und im Wesentlichen in der Gegenphase vorliegen.

Die elektrischen Leitfähigkeiten der schweren Phase in Beispiel 5.1. liegen im Bereich der reinen schweren Phase (ohne Zellen), wie diese in Beispiel 4.2 (Figur 11) in einem der Versuche bei der Untersuchung der Störanfälligkeit des Verfahrens und Variation des Wassergehalts erhalten wurde. Diese Leitfähigkeit ist vergleichbar mit der Leitfähigkeit einer zellfreien Phase mit Produkt. Somit ist es hier nicht zur Ausbildung einer Zwischenphase aus nicht koaleszierter schwerer Phase und Zellen gekommen. Dieser unerwünschte Effekt dient hier als Negativbeispiel.

Es ist in diesem Zusammenhang explizit darauf hinzuweisen, dass Beispiel 5.2. kein erfindungsgemäßes Beispiel darstellt, da hier keine Durchmischung unter Stoffaustausch, wie in der Lehre des erfindungsgemäßen Verfahrens angegeben, durchgeführt wurde.

- 5 Bemerkenswert ist, dass das Messprinzip gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren dennoch funktioniert, d.h. die schwere Phase und die leichte Phase konnten durch ihre elektrischen Leitfähigkeiten identifiziert und voneinander getrennt werden. Der Fehler liegt hierbei in der mangelnden Durchmischung die ohne weiteres vermieden werden kann.

10 **Beispiel 5.3**

DN50-Maßstab – wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem

- Um zu belegen, dass eine ausreichende Durchmischung in Beispiel 5.2. die dort auftretenden Probleme ausräumt, wurde Beispiel 5.2 wiederholt und die beiden Phasen erneut in den Abscheider überführt. Der Volumenstrom wird jedoch von 50,7 g/min auf 25 g/min verringert. Dadurch soll die Verweilzeit in den statischen Mixern verlängert werden, um eine höhere Durchmischung zu erzeugen. Es werden 810 ml leichte Phase und 310 ml schwere Phase in den Abscheider gefördert. Für die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile wird auf Tabelle 8 verwiesen. Eine Versuchsübersicht zu Beispiel 5.3 ist in der folgenden Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Versuchsübersicht zu Beispiel 5.3

Massenstrom	25 g/min
Gesamtdauer	52 min
Fülldauer	20 min
Leichte Phase	715 ml
Schwere Phase	210 ml
Antikörpergehalt	4,8 g/l (Zellkultur)

- Die aufgenommenen elektrischen Leitfähigkeiten des Beispiels 5.3 unter Verwendung von zwei Sonden, eine Sonde für die schwere Phase (z.B. Sonde 160.1 in Figur 2) und eine Sonde für die leichte Phase (z.B. Sonde 160.2 in Figur 2), sind in Figur 17 gegen die Zeit in [s] aufgetragen.

- Wie in Figur 17 und den gemessenen Kurven K1 und K2 zu ersehen, sind durch den niedriger eingestellten Massenstrom die Verläufe der Leitfähigkeitsmesswerte flacher, jedoch lassen sich alle charakteristischen Merkmale erkennen.

- Aus Figur 17 erkennt man, dass die Werte für die elektrische Leitfähigkeit der ersten Sonde in Kurve K1 unvermittelt von 0 mS/cm auf 13 mS/cm ansteigt. Die elektrische Leitfähigkeit steigt dann auf 16-17 mS/cm und wird sodann konstant detektiert. Die zweite Sonde (Kurve K2) zeigt den gleichen Messwert wie die erste Sonde an, allerdings etwas zeitverzögert. Nachdem beide Sonden die leichte

- Phase detektiert haben, steigt der Messwert für die elektrische Leitfähigkeit der ersten Sonde an (Kurve K1) und erreicht sein Maximum bei 50 mS/cm, wobei ab einem Messwert von 43 mS/cm ein erster asymptotischer Verlauf erkennbar ist. Die erste Sonde detektiert daher ab etwa 40 mS/cm eigentlich die Zwischenphase (im vorliegenden Fall schwere Phase mit Zellen) mit einer elektrischen Leitfähigkeit im Bereich von 40-50 mS/cm. Da keine schwere Phase bei 60-80 mS/cm gemessen wurde, wird angenommen, dass die gesamte schwere Phase quasi in die Zwischenphase übergegangen ist bzw. dass die Leitfähigkeits-Sonde nur noch Zwischenphase misst. Die Zwischenphase entspricht in diesem Beispiel daher der schweren Phase.
- 10 Der Messwert für die elektrische Leitfähigkeit der zweiten Sonde (Kurve K2) bleibt länger auf dem konstanten Wert von 15 bis 16 mS/cm und steigt dann sehr langsam auf ungefähr 24,5 mS/cm an. Zu diesem Zeitpunkt wird das Tauchrohr kurz heruntergefahren (Sternchen in Kurve K1 und K2 in Figur 17) und wieder hochgefahren (Sternchen im Kreis in Kurve K1 und K2 in Figur 17). Aus diesem Grund verlaufen in diesem Fall die Anfahr- und die Abfahrkurve deutlich unterschiedlicher.
- 15 Schließlich steigen beide Messwerte auf 50 mS/cm an. Sobald die zweite Messsonde den gleichen Wert wie die erste anzeigt, wird der Versuch beendet und die Pumpen werden abgestellt.

- In der folgenden Tabelle 11 sind die elektrischen Leitfähigkeitsmesswerte für die Beispiele 5.2 und 5.3 angegeben:

Tabelle 11: Elektrische Leitfähigkeiten für Beispiel 5.2 und 5.3

Probe	Leitfähigkeit [mS/cm]
Referenzbeispiel 5.2 (unzureichende Durchmischung)	
Leichte Phase Start	20-30
Leichte Phase Minute 15	20-30
Leichte Phase Minute 30	20-30
Leichte Phase Pool*	20-30
Schwere Phase Pool*	60-70
Beispiel 5.3 (ausreichende Durchmischung)	
Schwere Phase	40-50
Leichte Phase Start	20-25
Leichte Phase Minute 30	20-25

*Pool bedeutet die nach der Extraktion erhaltene Phase

Der kontinuierliche Betrieb wurde hier nur sehr kurz durchgeführt, um das Messprinzip aufzuzeigen. Dieser kann selbstverständlich auch deutlich länger, z.B. mehrere Stunden oder auch noch länger durchgeführt werden.

- 5 In Figur 18 ist die Zellzahl in [10^6 Zellen/mL] der in Referenzbeispiel 5.2 und Beispiel 5.3 eingesetzten Zellkultur ($11,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) sowie die Zellzahl der während des Verfahrens gewonnenen leichten Phase, die das Zielprodukt enthalten soll, in einem Balkendiagramm dargestellt.

- 10 Die leichte Phase von Referenzbeispiel 5.2. zeigt in Figur 18 keine Abreicherung von Zellen (linke Seite von Figur 18). Die elektrische Leitfähigkeit der in Referenzbeispiel 5.2 gewonnenen schweren Phase lässt diese unzureichende Abtrennung durch den Leitfähigkeitswert von 60-70 mS/cm erkennen, da dieser der reinen schweren Phase ohne Zellen entspricht. „Pool“ in Figur 18 bezeichnet die nach der Extraktion erhaltene Phase.

- 15 Bei Beispiel 5.3 auf der rechten Seite von Figur 18 ist zu erkennen, dass in der leichten Phase, in der das Produkt vorliegt, zu jedem Zeitpunkt während des Extraktionsverfahrens konstant weniger Zellen enthalten sind als in der Zellkultur. Die reduzierte Zellzahl kann auch in der gesamten leichten Phase nach erfolgter Extraktion beobachtet werden. Die erfolgreiche Abtrennung der Zellen kann wieder aus der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase ersehen werden. Diese weist mit einem Leitfähigkeitsbereich von 40-50 mS/cm eine deutlich reduzierte elektrische Leitfähigkeit auf, was auf die Anwesenheit von Zellen und anderer Leitfähigkeitssenkender Biopartikel schließen lässt.

- 20 Eine Analyse zeigt, dass die Antikörper in der abgetrennten leichten Phase von Beispiel 5.3 angereichert und in gereinigter Form vorliegen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher, die Produktphase (leichte Phase) mithilfe der Leitfähigkeitsmessung/Phasengrenzstandssteuerung konstant über die kontinuierliche Extraktion von der schweren Phase zu trennen.

- 30 Durch die Verringerung des Volumenstroms konnte die Zellernte mit dem Phosphatsystem erfolgreich durchgeführt werden. Somit wurde bestätigt, dass es durch die geringe Durchmischung des Systems im Anfahrbereich zu einer Phaseninversion des Systems in Beispiel 5.2 (Referenzbeispiel) kam, die in Beispiel 5.3. (erfindungsgemäßes Beispiel) mit einer Durchmischung mit ausreichendem Stoffaustausch vermieden werden konnte.

Beispiel 5.4

- 35 DN150-Maßstab – wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem

Beispiel 5.4 zeigt wie die automatisierte Einstellung der Höhe bzw. Eintauchtiefe des Tauchrohrs in Abhängigkeit von den ermittelten Leitfähigkeitswerten für 2 Sonden durchgeführt wird. Es wird ein wässriges Zwei-Phasen-Phosphatsystem im kontinuierlichen Betrieb eingesetzt.

Im gezeigten Beispiel befindet sich das Zielprodukt in der leichten Phase und das Tauchrohr in der Ausführungsform mit Überrohr, das bis in die schwere Phase reicht, soll schwere Phase und Zwischenphase aus dem Abscheider entnehmen.

- 5 In Figur 19 sind für einen Extraktionsprozess die beiden elektrischen Leitfähigkeitsprofile der beiden Sonden (Figur 19A) und die automatisierte Höheneinstellung für ein Tauchrohr (Figur 19B) dargestellt. Kurve K1 in Figur 19A gibt die elektrischen Leitfähigkeiten, die von der ersten Sonde in der schweren Phase gemessen werden, und Kurve K2 in Figur 19A gibt die elektrischen Leitfähigkeiten, die von der zweiten Sonde in der leichten Phase gemessen werden, an. Figur 19A und 19B sind jeweils gegen die
10 Verfahrenszeit in [min] aufgetragen.

Figur 19B zeigt das Herunterfahren und Herauffahren des Tauchrohrs anhand der Position der Öffnung im Tauchrohr, das als Überlaufventil fungiert. Die Höhenangaben in Figur 19B repräsentieren daher die Position des Überlaufventils, bei der Höhe der Öffnung, wo die Flüssigkeit abfließt. Zu Beginn befindet sich das Tauchrohr bei der Höhe 0 cm in seiner Ausgangsstellung (entlang der x-Achse in Figur 19B). Das Tauchrohr befindet sich daher im hochgefahrenen Zustand und entnimmt keine Phase aus der Trennvorrichtung. Nach etwa 27 min wird das Tauchrohr dann auf etwa 1,5 cm heruntergefahren und dann bei etwa 32 min wieder in die Ausgangsstellung (Höhe 0 cm) hochgefahren. Wie zu erkennen ist, gleicht die gezeigte automatisierte Regelung die Abweichung des Messwerts der elektrischen Leitfähigkeit vom Sollwert durch ein Verstellen der Tauchrohrposition, d.h. der Position der Öffnung im Tauchrohr, aus.
15
20

Die leichte Phase, repräsentiert durch die elektrischen Leitfähigkeitswerte von Kurve K2, weist über den gesamten Versuch die in diesem System typische Leitfähigkeit von 20-30 mS/cm auf. Zu Beginn des Versuchs misst die erste Sonde in Kurve K1 zunächst die elektrischen Leitfähigkeitswerte für die leichte Phase, da der Abscheider befüllt wird (bis etwa 25 min). Sobald der Abscheider vollständig mit System gefüllt ist, misst die erste Sonde (Kurve K1) die elektrischen Leitfähigkeitswerte der reinen schweren Phase (60-80 mS/cm). Das Tauchrohr wird heruntergefahren, um schwere Phase solange abzulassen, bis die Zwischenphase (im vorliegenden Fall hauptsächlich schwere Phase mit Zellen) mit einer niedrigeren elektrischen Leitfähigkeit im Bereich von 40-50 mS/cm detektiert wird. Die automatische Einstellung der Höhe bzw. Eintauchtiefe des Tauchrohrs regelt daher gezielt die Position der Zwischenphase im Abscheider herunter. Wenn keine Zwischenphase vorliegen sollte, wird hierdurch die Phasengrenzfläche zwischen schwerer und leichter Phase entsprechend im Abscheider abgesenkt.
25
30

35 Etwa ab 50 min kommt es bei der Extraktion in Kurve K1 zur charakteristischen Abwechslung von detektierter schwerer Phase (Ausschlag von Kurve K1 in Figur 19A nach oben) und Detektion der Zwischenphase (Ausschlag von Kurve K1 in Figur 19A nach unten). Dies hängt damit zusammen, dass kontinuierlich gearbeitet wird, und daher ständig zu trennendes wässriges Zwei-Phasen-System in den Abscheider geleitet wird. Gleichzeitig wird das Tauchrohr zwischen schwerer Phase und Zwischenphase hin- und herbewegt (Figur 19B), um die schwere Phase und Zwischenphase aus dem
40

Abscheider abfließen zu lassen und zu gewährleisten, dass die erste Sonde zwischen schwerer Phase und Zwischenphase bleibt. Hierdurch wird sichergestellt, dass die leichte Phase nicht mit der schweren Phase verloren geht und dass in regelmäßigen Abständen, die sich im Abscheider aufstauende Zwischenphase, durch das Tauchrohr abgelassen wird.

5

Eine Analyse zeigt, dass die Antikörper in der abgetrennten leichten Phase angereichert und in gereinigter Form vorliegen.

Beispiel 6

- 10 Kontinuierliche Extraktion im Abscheider mit Zellkultur zur Reinigung und Anreicherung von Plasmid-DNA in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem

In Beispiel 6 werden kontinuierliche Abscheiderversuche mit Zelllysate aus einer E. coli-Fermentation beschrieben. Das Zelllysate wird über eine alkalische Lyse erhalten, die im Anschluss notwendige Neutralisation erfolgt mit dem für die wässrige Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) ebenfalls notwendigen Salzpuffer (in diesem Beispiel: Citrat). Vorteilhaft ist, dass damit die für die ATPE notwendige Salzmenge bereits im Lyseschritt vollständig zugegeben werden kann.

- 15 Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Beispielen 5.1 bis 5.4, ist die Zielkomponente in Beispiel 6 Plasmid-DNA (pDNA) anstatt eines monoklonalen Antikörpers. Zudem weist dieses System eine Verteilung der Zielkomponente in die schwere Phase auf, d.h. die Plasmid-DNA ist nach dem Durchmischen mit ausreichendem Stoffaustausch in der schweren Phase angereichert, die vom Rest abgetrennt werden soll. Die Zwischenphase stellt dabei eine Mischung aus nicht koaleszierten Tropfen, dazwischen gebundenen Ausfällungen und aufgeschlossener E. coli-Zellen dar. Das eingesetzte
- 25 Zwei-Phasen-System verwendet zur Zweiphasenbildung anstelle von Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekularmasse von 400 g/mol (PEG400) ein Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekularmasse von 1450 g/mol (PEG1450). Ähnlich wie in den vorhergehenden Beispielen bilden sich eine polymerreiche, leichte Phase und eine salzreiche, schwere Phase. Ziel- und Nebenkomponten verteilen sich in diesem Mehrphasensystem so, dass sich das Zielprodukt in der schweren Phase angereichert hat und im Wesentlichen in dieser vorliegt und die unerwünschten Komponenten sich in der
- 30 Zwischen- und leichten Phase angereichert haben und im Wesentlichen in diesen vorliegen.

- Somit kann wieder die Detektion der elektrischen Leitfähigkeit verwendet werden, um das Zielprodukt in der Zielphase (in diesem Beispiel die schwere Phase) von der Gegenphase (in diesem Beispiel die
- 35 leichte Phase) und der Zwischenphase mit Zelllysate zu trennen.

- Zu der in Beispiel 6 durchgeführten kontinuierlichen Extraktion gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Zwei-Phasen-Citratsystem verwendet, um aus einer Zellkultur das Zielprodukt, hier Plasmid-DNA, zu reinigen und anzureichern. Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 12 zusammengefasst:
- 40

Tabelle 12: Einwaage und Massenanteile für Beispiel 6

	Einwaage [g]	Massenanteil Ist [Gew.-%]
Zelllysats	4406,4	40,8
Citrat-Puffer (35 Gew.-%, pH 6.0)	2721,6	25,2
PEG 1450 (60 Gew.-%)	3672	34,0

Das wässrige Zwei-Phasen-Citratsystem wurde bereits in geeigneter Weise in einem statischen Mischer durchmischt, so dass sich die Komponenten zwischen den Phasen aufteilen. Das Zielprodukt sammelt sich in Beispiel 6 in der schweren Phase an. Das wässrige Zwei-Phasen-Citratsystem wird über eine Pumpe mit einem Massenstrom von 60 g/min in den Abscheider gefördert. Bei dieser Förder-
 5 derrate dauert es ungefähr 10 Minuten bis die leichte Phase oben am Auslauf austritt.

Der Versuchsübersicht zu Beispiel 6 ist in der folgenden Tabelle 13 angegeben.

10

Tabelle 13: Versuchsübersicht zu Beispiel 6

Massenstrom	60 g/min
Gesamtdauer	180 min
Fülldauer	10 min
Schwere Phase	2300 ml
Leichte Phase	7100 ml
pDNA-Gehalt	2,43 mg/g WCP

Die gemessenen elektrischen Leitfähigkeiten von Beispiel 6 sind in Figur 20 gegen die Verfahrenszeit in [min] aufgetragen. Beim Anfahren der kontinuierlichen Extraktion ist wieder der typische Verlauf erkennbar. Die erste Sonde (Kurve K1) zeigt als erstes die elektrischen Leitfähigkeitswerte für die leichte Phase mit etwa 5-10 mS/cm an. Die Kurve K1 steigt dann bis etwa 40 mS/cm nahezu konstant an. Bei etwa 40 mS/cm ist ein Abflachen der Steigung erkennbar. Hier wird die Zwischenphase mit Biomasse/Zelllysats detektiert. Die zweite Sonde (Kurve K2) zeigt einen ähnlichen Verlauf beim Anfahren. Die elektrische Leitfähigkeit springt plötzlich auf 10 mS/cm. Hier wird zum ersten Mal leichte Phase
 15 detektiert. Ab Minute 35 ist erkennbar, dass die Messwerte für die elektrische Leitfähigkeit sich von denen in den Beispielen 5.1 bis 5.4 unterscheiden. Etwa ab 35 Minuten wird in Kurve K2 die Zwischenphase mit den Zellen detektiert. Sobald die Kurve K2 einen Leitfähigkeitswert von über 25 mS/cm erreicht, wird das Tauchrohr heruntergefahren (nicht dargestellt), das wieder als Überlaufventil eingesetzt wird. Mit dem Tauchrohr wird leichte Phase und Zwischenphase entnommen.

20

Die elektrische Leitfähigkeit, die an der zweiten Sonde gemessen wird (Kurve K2) beginnt zu sinken, da durch die Veränderung der Tauchrohr-Position die Position der Zwischenphase im Abscheider sinkt und so die leichte Phase (ohne Biomasse und schwere Phase-Tropfen) detektiert wird. Im Laufe des Verfahrens wird diese Regelung der Lage der Zwischenphase (und damit auch die Lage der bei-

den Phasengrenzflächen zur schweren und leichten Phase) im Abscheider noch zweimal notwendig (bei Minute 70 und bei Minute 110) (in Figur 20 nicht explizit gezeigt).

Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass die in Tabelle 1 angegebenen Bereiche für die elektrischen Leitfähigkeiten nur zur Orientierung dienen und auch in hiervon abweichenden Bereichen, wie im vorliegenden Beispiel, liegen können. So liegt der Sollwert-Bereich für die elektrischen Leitfähigkeiten für die schwere Phase hier ab etwa 40 mS/cm, für die leichte Phase ab etwa 10 mS/cm und die Zwischenphase ab etwa 25 mS/cm. Dies ist jedoch unproblematisch, da durch eine Analyse der einzelnen Phase deren Zusammensetzung feststellbar ist. Zudem ist im vorliegenden Beispiel die Trennung der Phasen in einfacher Weise möglich, da der Unterschied der elektrischen Leitfähigkeiten zwischen schwerer Phase einerseits und Zwischenphase und leichter Phase andererseits relativ groß ist und das Zielprodukt in der schweren Phase vorliegt.

Die Ausbeute des in Beispiel 6 beschriebenen Verfahrens ist in Figur 21 dargestellt und beträgt 2,43 mg pDNA/ g_{WCP} (nasse Zellmasse; Wet cell paste) und liegt damit in dem für pDNA-Prozesse typischen Bereich von 2-3 mg/g. Durch das verwendete wässrige Zwei-Phasen-System (ATPS) kommt es zu einer erwarteten Erhöhung der Konzentration um den Faktor 3 (Batch-Experiment). Diese durch die Zwei-Phasen-Extraktion (ATPE) beeinflusste Konzentrationsänderung konnte im kontinuierlichen Verfahren mit dem verwendeten System ebenfalls erreicht werden. Somit konnte in Beispiel 6 auch gezeigt werden, dass es nicht zu Verlusten von schwerer Zielphase durch die gesteuerte Position der Zwischenphase im Abscheider kommt.

Beispiel 7

Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-Citratsystem unter Verwendung von zwei Pumpen

Es wird analog zu Beispiel 6 vorgegangen, jedoch wird die Position der Zwischenphase über zwei Pumpen gesteuert. Zur Einstellung der Position der Zwischenphase im Abscheider werden wieder die Leitfähigkeitsprofile eingesetzt.

Es wird daher eine kontinuierliche Extraktion gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung eines Zwei-Phasen-Citratsystems durchgeführt, um aus einer Zellkultur das Zielprodukt, hier Plasmid-DNA, zu reinigen und anzureichern. Das Zielprodukt befindet sich im Wesentlichen in der schweren Phase. Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 14 zusammengefasst:

Tabelle 14: Einwaage und Massenanteile für Beispiel 7

	Einwaage [g]	Massenanteil Ist [Gew.-%]
Zelllysate (neutralisiert)	2764,69	70
PEG 1450 (60 Gew.-%)	1122	30

Die in Beispiel 7 eingesetzte Zelllysats-Lösung ist bereits mit Citrat-Puffer (35 Gew.-%, pH 6.0) neutralisiert. Das Verhältnis von nicht-neutralisiertem Zelllysats und Puffer ist ca. 1,6 (Zelllysats:Citrat-Puffer).

- 5 Der Versuchsübersicht zu Beispiel 7 ist in der folgenden Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Versuchsübersicht zu Beispiel 7

Massenstrom	60 g/min
Gesamtdauer	60 min
Fülldauer	10 min
Schwere Phase	1232 ml
Leichte Phase	2300 ml

- 10 Im Unterschied zu Beispiel 6, wo die Entnahme an schwerer Phase über die Höheneinstellung eines Tauchrohrs mit einer Öffnung, das als Überlaufventil fungiert, gesteuert wird, wird in Beispiel 7 die schwere Phase aktiv mit einer Pumpe aus dem Abscheider gefördert. Ebenso wird die leichte Phase über eine zweite Pumpe aus dem Abscheider gefördert.

- 15 Um sicherzustellen, dass jeweils nur reine schwere bzw. leichte Phase aus dem Abscheider entnommen wird, werden – wie bereits in den vorangehenden Beispielen erläutert - wieder die Leitfähigkeitsprofile herangezogen.

- 20 Sinkt die elektrische Leitfähigkeit an der ersten Sonde zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase unterhalb eines vordefinierten Grenzwertes ab (Kurve M1), wird die Fördergeschwindigkeit der "Schwere Phase"-Pumpe gedrosselt. Steigt wiederum die elektrische Leitfähigkeit der zweiten Sonde zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase (Kurve M2) oberhalb eines vordefinierten Grenzwertes wird die Fördergeschwindigkeit der "Schwere Phase"-Pumpe erhöht.

- 25 In Figur 22 sind die Pumpenströme während des Verfahrens zusammengestellt.

Die Beschriftung von Figur 22 ist wie folgt:

Kurve M1.....Massenfluss schwere Phase;

Kurve M2.....Massenfluss leichte Phase (PEG1450) und

Kurve M3.....Massenfluss Zelllysats.

30

Beispiel 8

Extraktion einer Charge mit einer Ausgangslösung zur Reinigung und Anreicherung von Virus-Capsiden in wässrigen Zwei-Phasen-System im Abscheider. Die Extraktion wird wie in Figur 1 beschrieben durchgeführt.

35

Dabei werden beispielhaft zwei Abscheideversuche mit Virus-Capsiden der Adeno-assoziierten Viren (AAV) aus einer Zellkultur durchgeführt. In den beschriebenen Beispielen mit Virus-Capsiden wird einmal die Zielkomponente in der oberen leichten Phase (Beispiel 8.1) und einmal in der unteren schweren Phase angereichert (Beispiel 8.2).

5

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Beispielen 5.1 bis 7, wird für die Zielkomponente ein Virus-Capsid eines Adeno-assoziierten Virus anstatt eines monoklonalen Antikörpers oder Plasmid-DNA verwendet. Weiterhin wird ein Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekülmasse von 8000 g/mol sowie ein Ammoniumsulfat-Puffer (siehe Beispiel 8.2) eingesetzt.

10

Beispiel 8.1

Das im Beispiel 8.1 verwendete System erzeugt eine Verteilung der Zielkomponente in die leichte Phase, d.h. die Virus-Capside befinden sich nach dem Durchmischen mit ausreichendem Stoffaustausch in der leichten Phase angereichert, insbesondere im Wesentlichen in dieser, die vom Rest abgetrennt werden soll.

15

Im eingesetzten Zwei-Phasen-System wird zur Zweiphasenbildung Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekülmasse von 400 g/mol (PEG400) und ein Phosphatpuffer eingesetzt. Ähnlich wie in den vorhergehenden Beispielen bilden sich eine polymerreiche, leichte Phase und eine salzreiche, schwere Phase. Die Komponenten verteilen sich in diesem Mehrphasensystem so, dass das Zielprodukt, hier: Adeno-assoziierte Viren, in der leichten Phase angereichert ist, insbesondere im Wesentlichen in dieser vorliegt, und unerwünschte Komponenten in der schweren Phase angereichert sind, insbesondere im Wesentlichen in dieser vorliegen.

20

Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Virus-Ausgangslösung sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 16 zusammengefasst:

25

Tabelle 16: Einwaage und Massenanteile für Beispiel 8.1

	Einwaage	Massenanteil Ist
	[g]	[Gew.%]
Viruslösung	4,405	44,05
Phosphatpuffer (40 Gew.%, pH 8.0)	3,875	38,75
PEG 400	1,720	17,20

Das wässrige Zwei-Phasen-Phosphatsystem wird dabei in geeigneter Weise in dem Trenngefäß gemischt, so dass sich die Komponenten zwischen den Phasen aufteilen können. Das Zielprodukt sammelt sich in Beispiel 8.1 in der leichten Phase bei einer Leitfähigkeit von 6,24 mS/cm an. Die Leitfähigkeit der schweren Phase beträgt 78,7 mS/cm.

35

Beispiel 8.2

Das im Beispiel 8.2 verwendete System erzeugt eine Verteilung der Zielkomponente in der schweren Phase, d.h. die Virus-Capside befinden sich nach dem Durchmischen mit ausreichendem Stoffaustausch in der schweren Phase angereichert, insbesondere im Wesentlichen in dieser, die vom Rest abgetrennt werden soll.

Das eingesetzte Zwei-Phasen-System verwendet zur Zweiphasenbildung Polyethylenglykol mit einer mittleren Molekularmasse von 8000 g/mol (PEG8000) und Ammoniumsulfat-Puffer. Ähnlich wie in den vorhergehenden Beispielen bilden sich eine polymerreiche, leichte Phase und eine salzreiche, schwere Phase. Die Komponenten verteilen sich in diesem Mehrphasensystem so, dass das Zielprodukt, hier: Adeno-assoziierte Viren, in der schweren Phase angereichert ist, insbesondere im Wesentlichen in dieser Phase vorliegt, und unerwünschte Komponenten in der leichten Phase angereichert sind, insbesondere im Wesentlichen in dieser Phase vorliegen.

Die Einwaage an phasenbildenden Komponenten und Zellkultur sowie die eingestellten Massenanteile sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Viruslösung hatte eine Ausgangskonzentration von $2,17 \times 10^9$ Capside/ml.

Tabelle 17: Einwaage und Massenanteile für Beispiel 8.2

	Einwaage [g]	Massenanteil Ist [Gew.%]
Viruslösung	1,40	14
Ammoniumsulfat-Puffer (20 Gew.%, pH 8.0)	6,60	66
PEG8000 (50 Gew.-%)	2,0	20

Das wässrige Zwei-Phasen-Ammoniumsystem wird dabei in geeigneter Weise in dem Abscheider gemischt, so dass sich die Komponenten zwischen den Phasen aufteilen. Das Zielprodukt sammelt sich in Beispiel 8.2 in der unteren schweren Phase an. Die Leitfähigkeit der unteren schweren Phase beträgt 175,2 mS/cm. Die Leitfähigkeit der oberen leichten Phase beträgt 10,4 mS/cm.

Die Viruslösung hatte bei den Extraktionsversuchen der Beispiele 8.1 und 8.2, durchgeführt in jeweils einer Charge, eine Ausgangskonzentration von $2,17 \times 10^9$ Capside/ml. Die Capside konnten sich komplett in den Zielphasen anreichern. Es konnte in der Gegenphase kein Virus-Capsid bestimmt werden.

Auf Grund der Leitfähigkeitsunterschiede der leichten und schweren Phase, könnten die virenhaltigen Lösungen auch mittels Leitfähigkeitsdetektion und Überführung in Trenngefäße im kontinuierlichen Betrieb getrennt werden (siehe Tabelle 18)

Tabelle 18:

System	Phase	AAV ELISA	Leifähigkeit
Beispiel		Capsids/mL	[mS/cm]
8.1	leichte Phase	$3,86 \times 10^9$	6,24
	schwere Phase	< LLD*	78,7
8.2	leichte Phase	< LLD*	10,4
	schwere Phase	$2,36 \times 10^9$	175,2

*...“< LLD“ bedeutet das der Capsid-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze (engl. Lower Limit of Detection, LLD) liegt.

5 Beispiel 9

Verlauf einer kontinuierlichen Extraktion in einem Abscheider in einem wässrigen Zwei-Phasen-System unter Verwendung einer Trübungssonde

Zur Darstellung der Umsetzung des Verfahrens mit einer alternativen Messsonde, wird das im Beispiel 6 beschriebene System mit einer Trübungssonde eingesetzt. In diesem Ausführungsbeispiel kommt lediglich eine Sonde, anstelle von zwei Sonden, zum Einsatz. In zeitlichen Abständen wird die Position der Sonde verändert, so dass auch die Trübung der anderen Phasen gemessen werden kann. Mit anderen Worten kann die Sonde hoch- und heruntergefahren werden, um die einzelnen Phasen messen zu können. In Figur 23 ist die zeitliche Aufnahme der Messung gezeigt, um das Messprinzip im Einzelnen zu veranschaulichen. In Figur 23 bedeutet LP leichte Phase, SP schwere Phase und IP Zwischenphase. Die durch senkrechte Striche in Figur 23 markierten, freien Bereiche zwischen der Messung der leichten Phase, schweren Phase und Zwischenphase stellen die Übergänge dar, in denen die Einzelsonde umgestellt, d.h. hoch- oder heruntergefahren wird.

In Figur 23 wird mit der Messung der Trübung in der leichten Phase (LP) gestartet. Nach 9 Minuten wird die Position der Sonde nach unten verlagert, sodass die Trübung der schweren Phase (SP) gemessen werden kann. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden, sodass auch mit nur einer Sonde die Eigenschaften zweier bzw. dreier Phasen in kurzen Abständen erfasst werden können. Im oberen Bereich von Figur 23 liegt eine hohe (starke) Trübung vor, im unteren Bereich eine geringe Trübung. Die leichte Phase LP weist daher eine hohe Trübung auf, wohingegen die schwere Phase SP eine geringe Trübung zeigt. Bei der Zwischenphase IP zeigen sich überlappende Trübungseigenschaften.

Figur 23 dient daher zur Orientierung und Veranschaulichung des Messprinzips. Für das in diesem Beispiel eingesetzte System kann daher gezeigt werden, dass auch die Trübung ein geeigneter Indikator ist, um zwischen zwei bzw. drei Phasen zu unterscheiden. Eine Trennung der Phasen, basierend auf der Trübungsmessung mit einer oder auch mehr Sonden, kann daher über einen geeigneten Zeitraum ohne weiteres durchgeführt werden.

Die Erfindung umfasst Aspekte, die in den nachfolgenden Sätzen offenbart sind, die Teil der Beschreibung darstellen, aber keine Ansprüche sind:

SÄTZE

5

1. Verfahren zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes, ausgewählt aus
 - Immunglobulinen oder anderen Proteinen; oder
 - Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA oder anderen Nukleinsäuren; oder
 - Viren,

10 umfassend die folgenden Schritte:

- a. Bereitstellen einer Ausgangslösung, die das Zielprodukt enthält;
- b. Überführen der Ausgangslösung in ein wässriges Zwei-Phasen-System durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes in geeigneter Konzentration, oder durch Zugabe mindestens zweier Polymere in geeigneter Konzentration;
- 15 c. Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines ausreichenden Stoffaustauschs, so dass sich das Zielprodukt in der leichten Phase (20, 120) oder in der schweren Phase (40, 140) anreichert;
- d. Entmischen lassen der Phasen in einer Trennvorrichtung (10, 100) in eine leichte Phase (20, 120), eine schwere Phase (40, 140) und, sofern eine Zwischenphase vorhanden ist, eine Zwischenphase (30, 130);
- 20 e. kontinuierliches Messen in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) zum Bestimmen der Position der beiden Phasen (20, 120, 40, 140) und der Phasengrenzfläche oder bei Vorliegen einer Zwischenphase (30, 130) der Position der Zwischenphase (30, 130) und der zwei Phasengrenzflächen;
- 25 f. Entnehmen jeweils der leichten Phase (20, 120), der schweren Phase (40, 140) und bei Vorliegen einer Zwischenphase (30, 130) der Zwischenphase aus der Trennvorrichtung (10, 100) anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit mindestens einer der Phasen; und
- g. Gewinnen der Phase mit dem Zielprodukt.

30

2. Verfahren nach Satz 1, dadurch gekennzeichnet, dass

das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) mit einem oder mehreren Leitfähigkeitsmessgeräten in Form von einer, zwei, drei oder mehr Sonden (60, 160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3,

35

163.4) durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Satz 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass

zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase (140) mindestens eine Sonde (160.1, 162.1, 163.1) und zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der

40

leichten Phase (20, 120) mindestens eine Sonde (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) an geeigneter Position in der Trennvorrichtung (100) eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 3,
5 dadurch gekennzeichnet, dass
in der Trennvorrichtung (10) ein Auslass (50) vorgesehen wird und das Entnehmen der Phasen (10, 20, 30) aus der Trennvorrichtung (10) durch den Auslass (50) gemäß Schritt f. durch Schwerkraft oder unter Verwendung von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer Pumpe durchgeführt wird;

10 oder

in der Trennvorrichtung (100) ein oberer Auslass (150.2) vorgesehen wird und das Entnehmen der leichten Phase (120) aus dem oberen Auslass (150.2) der Trennvorrichtung (100) unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer
15 Pumpe durchgeführt wird,
und

in der Trennvorrichtung (100) ein unterer Auslass (150.1) vorgesehen wird und das Entnehmen der schweren Phase (140) aus einem unteren Auslass (150.1) der Trennvorrichtung (100) unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder
20 einer Pumpe aus der Trennvorrichtung (100) durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Entnehmen einer Phase gemäß Schritt f. im kontinuierlichen Betrieb durch ein höhenverstellbares
25 Tauchrohr (180, 182) durchgeführt wird, das eine Öffnung (190, 192) aufweist, die in die zu entnehmende Phase eingetaucht wird, wobei

- das Tauchrohr (180) mit dem unteren Auslass (150.2) derart verbunden wird, dass durch die Öffnung (182) im Tauchrohr (180) die Phase unter Schwerkraft zum Auslass (150.1) abfließen kann oder
- 30 - das Tauchrohr (190) eine Öffnung (192) aufweist, durch die das Entnehmen der Phase unter Verwendung von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer Pumpe durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 5,
35 dadurch gekennzeichnet, dass
das höhenverstellbare Tauchrohr (180, 190) mit einem sich von oben nach unten erstreckenden Überrohr (183, 193) eingesetzt wird,
wobei das Tauchrohr (180, 190) aus einem höhenverstellbaren Innenrohr (181, 191), welches eine Öffnung (182, 192) zur Entnahme einer der Phasen aufweist, und einem sich von oben nach unten
40 erstreckenden Überrohr (183, 193) ausgebildet wird, und die Länge des Überrohrs (183) durch ein oberes Ende, das oberhalb der leichten Phase (120) angeordnet ist und ein unteres Ende (183a,

- 193a) festgelegt wird, wobei der Durchmesser des Überrohrs (183, 193) größer eingestellt wird als der Durchmesser des Innenrohrs (181, 191), so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr (183, 193) gebildet wird, und die Länge des Überrohrs (183) so gewählt wird, dass das Überrohr (183, 193) über die Öffnung (182, 192) des Innenrohrs (181, 191) hinausragt und das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) in die schwere Phase (140) oder, sofern vorhanden, in die Zwischenphase (130) eingetaucht wird, so dass die Flüssigkeit der Phase, in die das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) eintaucht, im Zwischenraum hochsteigt und durch die Öffnung (182, 192) im Innenrohr (181, 191) austreten kann.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das höhenverstellbare Tauchrohr (180, 190) mit einem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr eingesetzt wird, wobei das höhenverstellbare Tauchrohr aus einem höhenverstellbaren Innenrohr (181, 191), welches
15 eine Öffnung (182, 192) zur Entnahme einer der Phasen aufweist, und einem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr ausgebildet wird, und die Länge des Überrohrs durch ein unteres Ende, das unterhalb der schweren Phase (140) angeordnet ist und ein oberes Ende festgelegt wird, wobei der Durchmesser des Überrohrs größer eingestellt wird als der Durchmesser des Innenrohrs, so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr gebildet wird, und die Länge des
20 Überrohrs so gewählt wird, dass das Überrohr über die Öffnung (182, 192) des Innenrohrs (181, 191) hinausragt und das obere Ende des Überrohrs in die leichte Phase (120) oder, sofern vorhanden, in die Zwischenphase (130) eingetaucht wird, so dass die Flüssigkeit der Phase, in die das obere Ende des Überrohrs eintaucht, in den Zwischenraum hineinfließt und durch die Öffnung (182, 192) im Innenrohr (181, 191) austreten kann.
- 25 8. Verfahren nach Satz 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Länge des sich von oben nach unten erstreckenden Überrohrs (183, 193) und dessen Durchmesser derart gewählt werden, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen oder halb-
30 festen Bestandteilen, in den Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr (183, 193) durch das Überrohr (183, 193) verhindert wird; oder die Länge des sich von unten nach oben erstreckenden Überrohrs und dessen Durchmesser derart gewählt werden, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen oder halbfesten
35 Bestandteilen, in den Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr durch das Überrohr verhindert wird.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass
40 die Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) für die leichte Phase (120) in der Trennvorrichtung (100) tiefer als der obere Auslass (150.2) positioniert wird (werden) und die Sonde(n) (160.1, 162.1,

163.1) für die schwere Phase (140) in der Trennvorrichtung (100) höher als der untere Auslass (150.1) angeordnet wird (werden);

und/oder

ein Tauchrohr (180, 190) mit oder ohne Überrohr (183, 193) eingesetzt wird,

5

wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs (180, 190) ohne Überrohr (183, 193) sich die Öffnung (182, 192) des Tauchrohrs (180, 190) zum Entnehmen der schweren Phase (140) tiefer als die Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) in der schweren Phase (140) befindet (befinden) und wobei sich die Öffnung (182, 192) eines Tauchrohrs (180, 190) zum Entnehmen der leichten Phase (120) höher als die Son-

10

de(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) in der leichten Phase (120) befindet (befinden); und wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs (180, 190) mit sich von oben nach unten erstreckendem Überrohr (183, 193) bei der Entnahme der schweren Phase (140) durch die Öffnung (182, 192) des Tauchrohres (180, 190) sich das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) zum Entnehmen der schweren Phase (140) tiefer als die Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) in der schweren Phase (140)

15

befindet (befinden); und

wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs mit sich von unten nach oben erstreckendem Überrohr bei der Entnahme der leichten Phase (120) durch die Öffnung (182, 192) des Tauchrohres das obere Ende des Überrohrs zum Entnehmen der leichten Phase (120) höher als die Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) in der leichten Phase (120) befindet (befinden).

20

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 9,

dadurch gekennzeichnet, dass

das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase (120) in der Trennvorrichtung (100) in Schritt e. für eine oder mehrere Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) jeweils einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit ergibt, der mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase (120) verglichen wird und bei Überschreiten des Sollwert-Bereichs schwere Phase (140) entnommen wird, wobei die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer für die schwere Phase (140) so geregelt werden, dass die gemessene Leitfähigkeit der leichten Phase (120) wieder im Sollwert-Bereich liegt;

25

30

oder

das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase (140) in der Trennvorrichtung (100) in Schritt e. für eine oder mehrere Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) jeweils einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit ergibt, der mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase verglichen wird und bei Unterschreiten des Sollwert-Bereichs weniger schwere Phase (140) entnommen wird, wobei die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer für die schwere Phase (140) so geregelt werden, dass die gemessene Leitfähigkeit der leichten Phase (120) wieder im Sollwert-Bereich liegt.

35

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 10,

40

dadurch gekennzeichnet, dass

die elektrischen Leitfähigkeitswerte dazu eingesetzt werden im kontinuierlichen Betrieb die Position der Phasen und Phasengrenzfläche(n) zu variieren, indem eine oder mehrere der folgenden Maßnahmen kontrolliert und gesteuert werden:

- die Entnahmegeschwindigkeit für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- 5 - die Entnahmegeschwindigkeit für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmemenge für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmemenge für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmedauer für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmedauer für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- 10 - die Entnahme der leichten oder schweren Phase unterbrochen wird;
- die Zufuhrmenge des in die Trennvorrichtung (100) einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-System, mit oder ohne das Zielprodukt, erhöht oder verringert wird, wobei das wässrige Zwei-Phasen-System ohne Zielprodukt eine Spüllösung darstellt;
- die Zuführgeschwindigkeit des in die Trennvorrichtung einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems, mit oder ohne Zielprodukt, erhöht oder verringert wird, wobei das wässrige Zwei-Phasen-System ohne Zielprodukt eine Spüllösung darstellt;
- 15 und/oder
- das Tauchrohr zum Abfließen lassen oder Absaugen einer oder zweier Phasen hoch- oder heruntergefahren wird und gegebenenfalls nach oben oder unten nachpositioniert wird;

20

wobei die ein oder mehreren Entnahme-Vorrichtungen und/oder Mittel zur Durchführung der obigen Maßnahmen eingesetzt werden können:

- Schwerkraft;
- Überdruck;
- 25 - Unterdruck;
- eine oder mehrere Pumpen;

und/oder

- Entnahme-Vorrichtungen zum kontrollierten Ablassen oder Unterbrechen der Entnahme der Phasen am Auslass, ausgewählt aus stufenlos regelbaren Ventilen mit unterschiedlichem Öffnungsgrad, regelbaren Schlauchquetschklemmen, regelbaren Absperrhähnen oder regelbaren Durchflussbegrenzern.

30

12. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass

- 35 zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) zwei, drei, vier oder mehr Sonden (160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3, 163.4) jeweils in eine Einführöffnung (157.1, 157.2, 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, 159.1, 159.2, 159.3, 159.4) in der Wand (155) der Trennvorrichtung (100) eingeführt und eingesetzt werden, wobei die Einführöffnungen (157.1, 157.2, 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, 159.1, 159.2, 159.3, 159.4) eine Anordnung aufweisen, die ausgewählt wird aus:

40

- einer axialen Anordnung der Einführöffnungen (157.1, 157.2), wobei die Einführöffnungen (157.1, 157.2) auf einer geraden Verbindungslinie angeordnet werden;
 - einer radialen Anordnung der Einführöffnungen (158.1, 158.2, 158.3, 158.4), wobei die Einführöffnungen (158.1, 158.2, 158.3, 158.4) in einem Kreisbogen, angeordnet werden; oder
 - 5 - einer radial versetzten Anordnung der Einführöffnungen (159.1, 159.2, 159.3, 159.4), wobei die Einführöffnungen (159.1, 159.2, 159.3, 159.4) in einem Kreisbogen und zusätzlich in eine Vorzugsrichtung verschoben, angeordnet werden.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 12,
- 10 dadurch gekennzeichnet, dass
- das Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines ausreichenden Stoffaustauschs durchgeführt wird, indem ein aktives Durchmischen und/oder ein statisches Durchmischen eingesetzt wird.
- 15 14. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 13,
- dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der folgenden Bedingungen erfüllt wird:
- das Verfahren wird kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt;
 - als Ausgangslösung wird eine Zellkultur, ein Zellkulturüberstand oder ein Zelllysate verwendet, worin das Zielprodukt enthalten ist;
 - 20 - mit der Ausgangslösung wird ein wässriges Zwei-Phasen-System hergestellt, bei dem ein Phasenverhältnis von der Phase, enthaltend das Zielprodukt, zur Gegenphase von $> 1,1$ vorliegt;
 - ein Dichteverhältnis von leichter Phase (20, 120) zu schwerer Phase (40, 140) von mindestens 1,06 wird eingesetzt;
 - 25 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird als Polymer oder als eines der Polymere Polyethylenglykol (PEG), Polypropylenglykol (PPG), Dextran, PEG-PPG-PEG-Copolymer (EPO) oder Mischungen dieser eingesetzt;
 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird als Polymer Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht zwischen 200 und 8000 g/mol eingesetzt;
 - 30 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird mindestens ein Polymer in einer Konzentration von 5 bis 35 Gewichts-%, bezogen auf die Gesamtmenge an wässrigem Zwei-Phasen-System, eingesetzt;
 - als Salz oder als eines der Salze im wässrigen Zwei-Phasen-System wird ein Phosphatsalz, Ammoniumsalz, Kaliumsalze, Acetatsalze, Natriumsalze oder Citratsalz oder Mischungen dieser eingesetzt;
 - 35 - anstelle eines Salzes wird eine Säure, ausgewählt aus Zitronensäure oder Essigsäure eingesetzt;
 - dem wässrigen Zwei-Phasen-System werden stabilisierende Komponenten, ausgewählt aus Aminosäuren, Zucker oder anderen stabilisierenden Additiven, zugegeben;
 - 40 - das Verfahren wird kontinuierlich durchgeführt, aber die Schritte a. und/oder d. werden semi-kontinuierlich durchgeführt.

15. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden leichten
5 Phase (120) der Trennvorrichtung (100) eine Spüllösung (115) zugegeben wird, die die Zielprodukt
enthaltende leichte Phase (120) aus der Trennvorrichtung (100) verdrängt und diese somit durch den
oben angeordneten Auslass (150.2) entnommen werden kann
und/oder
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden leichten
10 Phase (120) keine schwere Phase (140) mehr entnommen wird, diese sich dadurch aufstaut und die
leichte Phase (120) nach oben verdrängt, so dass die leichte Phase (120) durch den oben angeordne-
ten Auslass (150.2) entnommen werden kann.
16. Verfahren nach einem der vorangehenden Sätze 1 bis 14,
15 dadurch gekennzeichnet, dass
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden schwere
Phase (140) der Trennvorrichtung (100) eine Spüllösung (115) zugegeben wird, die die Zielprodukt
enthaltende schwere Phase (140) aus der Trennvorrichtung (100) verdrängt und diese somit durch
den unten angeordneten Auslass (150.1, 150.3) entnommen werden kann
20 und/oder
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden schweren
Phase (140) keine leichte Phase (120) mehr entnommen wird, diese sich dadurch aufstaut und die
schwere Phase (140) nach unten verdrängt, so dass die schwere Phase (140) durch den unten ange-
ordneten Auslass (150.1, 150.3) entnommen werden kann.
25
17. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Sätze 1 bis 16, umfassend
eine Trennvorrichtung (10, 100) zum Trennen der Phasen;
mindestens einen Auslass (50, 150.1, 150.2) in der Trennvorrichtung (10, 100);
mindestens eine Sonde (60, 160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3, 163.4) zum
30 Messen der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10,
100);
eine oder mehrere Entnahme-Vorrichtung(en) und/oder Mittel zur Regelung und/oder Steuerung der
Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer der leichten Phase (20, 120),
der schweren Phase (40, 140) und, sofern vorhanden, der Zwischenphase (30, 130), basierend auf
35 den Messwerten der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer Phase.
18. Verwendung des Verfahrens nach einem der Sätze 1 bis 16 oder der Vorrichtung nach Satz
17 zum Einstellen der Lage der Phasen in einer Trennvorrichtung (10, 100) und Abtrennen der Pha-
sen anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte mindestens einer der Phasen.
40

BEZUGSZEICHENLISTE:

	10, 100	Trennvorrichtung
	15	Rührwelle
5	20, 120	leichte Phase
	25, 125	Motor
	30, 130	Zwischenphase
	40, 140	schwere Phase
	50, 150.1, 150.2	Auslass
10	60	Sonde zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit
	110	zu trennende ATPS-Lösung
	115	Spüllösung
	120a, 120c	Kurve für die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase
	120b, 120d	Kurve für die Trübung der leichten Phase
15	130c	Kurve für die elektrische Leitfähigkeit der Zwischenphase
	135	Regler
	140a, 140c	Kurve für die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase
	140b, 140d	Kurve für die Trübung der schweren Phase
	150.1, 150.2, 150.3	Auslass
20	155	Wand der Trennvorrichtung
	157.1, 157.2, 158.1, 158.2,	Einführöffnungen für die Sonden
	158.3, 158.4, 159.1, 159.2	Einführöffnungen für die Sonden
	159.3, 159.4	Einführöffnungen für die Sonden
	160.1	Sonde für die schwere Phase
25	160.2	Sonde für die leichte Phase
	162.1, 162.2, 162.3, 162.4	Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit
	163.1, 163.2, 163.3, 163.4	Sonden zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit
	180, 190	Tauchrohr
	181, 191	Innenrohr
30	182, 192	Öffnung
	183, 193	Überrohr oder Hüllrohr
	183a, 193a	Ende des Überrohrs
	189, 199	Höhenverstellbarkeit des Tauchrohrs
	200, 202	Schaubild
35	I	Anfahren
	II	kontinuierlicher Betrieb
	III	Abfahren

LITERATURVERZEICHNIS:

1. Sommerfeld, S.; Strube, J. Challenges in biotechnology production - Generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2005, 44, 1123–1137, doi:10.1016/j.cep.2005.03.006;
2. Gronemeyer, P.; Ditz, R.; Strube, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* 2014, 1, 188–212, doi:10.3390/bioengineering1040188;
3. Urthaler, J.; Buchinger, W.; Necina, R. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy, *Acta Biochim Pol* 2019, 52, 703–711, doi:10.18388/abp.2005_3434;
4. Merten, Otto-Wilhelm, et al., 26: Production and purification of viral vectors and safety considerations related to their use, *Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology: Principles, Delivery and Pharmacological and Biomedical Applications of Nucleotide-Based Therapies*, 2014, 493-515;
5. Luechau, F.; Ling, T.C.; Lyddiatt, A. A descriptive model and methods for up-scaled process routes for interfacial partition of bioparticles in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal* 2010, 50, 122–130, doi:10.1016/j.bej.2010.04.006;
6. Leonard, R.A. Recent Advances in Centrifugal Contactor Design. *Separation Science and Technology* 1988, 23, 1473–1487, doi:10.1080/01496398808075643;
7. WO 2014/135420 A1;
8. Frerix, A., et al., Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2005, 42(1): S. 57-66;
9. DE 44 00 397 A1;
10. DE 199 23 901 A1;
11. KR 101 143 889 B1;
12. US 3 220 930 A;
13. EP 1 059 105 A2 und
14. EP 1 762 616 A1.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Reinigen und Anreichern eines Zielproduktes, ausgewählt aus
 - Immunglobulinen oder anderen Proteinen; oder
 - 5 - Plasmid-DNA, genomischer DNA, RNA oder anderen Nukleinsäuren; oder
 - Viren,umfassend die folgenden Schritte:
 - a. Bereitstellen einer Ausgangslösung, die das Zielprodukt enthält;
 - b. Überführen der Ausgangslösung in ein wässriges Zwei-Phasen-System durch Zugabe mindestens eines Polymers und mindestens eines Salzes in geeigneter Konzentration, oder durch
10 Zugabe mindestens zweier Polymere in geeigneter Konzentration;
 - c. Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems unter Erhalt eines Stoffaustauschs, so dass sich das Zielprodukt in der leichten Phase (20, 120) oder in der schweren Phase (40, 140) anreichert;
 - 15 d. Entmischen lassen der Phasen in einer Trennvorrichtung (10, 100) in eine leichte Phase (20, 120), eine schwere Phase (40, 140) und, sofern eine Zwischenphase vorhanden ist, eine Zwischenphase (30, 130);
 - e. kontinuierliches Messen der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) zum Bestimmen der Position der beiden Phasen (20, 120, 40, 140)
20 und der Phasengrenzfläche oder bei Vorliegen einer Zwischenphase (30, 130) der Position der Zwischenphase (30, 130) und der zwei Phasengrenzflächen;
 - f. Entnehmen jeweils der leichten Phase (20, 120), der schweren Phase (40, 140) und bei Vorliegen einer Zwischenphase (30, 130) der Zwischenphase aus der Trennvorrichtung (10, 100) anhand der kontinuierlich gemessenen elektrischen Leitfähigkeit mindestens einer der Phasen
25 in Schritt e.; und
 - g. Gewinnen der Phase mit dem Zielprodukt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
30 das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit in mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) mit einem oder mehreren Leitfähigkeitsmessgeräten in Form von einer, zwei, drei oder mehr Sonden (60, 160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3, 163.4) durchgeführt wird, insbesondere zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase (140)
35 mindestens eine Sonde (160.1, 162.1, 163.1) und zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase (20, 120) mindestens eine Sonde (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) an geeigneter Position in der Trennvorrichtung (100) eingesetzt wird.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 oder 2,
40 dadurch gekennzeichnet, dass

in der Trennvorrichtung (10) ein Auslass (50) vorgesehen wird und das Entnehmen der Phasen (10, 20, 30) aus der Trennvorrichtung (10) durch den Auslass (50) gemäß Schritt f. durch Schwerkraft oder unter Verwendung von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer Pumpe durchgeführt wird;

5 oder

in der Trennvorrichtung (100) ein oberer Auslass (150.2) vorgesehen wird und das Entnehmen der leichten Phase (120) aus dem oberen Auslass (150.2) der Trennvorrichtung (100) unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer

10 Pumpe durchgeführt wird,

und

in der Trennvorrichtung (100) ein unterer Auslass (150.1) vorgesehen wird und das Entnehmen der schweren Phase (140) aus einem unteren Auslass (150.1) der Trennvorrichtung (100) unter Verwendung von Schwerkraft oder von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder

15 einer Pumpe aus der Trennvorrichtung (100) durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass

das Entnehmen einer Phase gemäß Schritt f. im kontinuierlichen Betrieb durch ein höhenverstellbares Tauchrohr (180, 182) durchgeführt wird, das eine Öffnung (190, 192) aufweist, die in die zu entnehmende Phase eingetaucht wird, wobei

- das Tauchrohr (180) mit dem unteren Auslass (150.2) derart verbunden wird, dass durch die Öffnung (182) im Tauchrohr (180) die Phase unter Schwerkraft zum Auslass (150.1) abfließen kann oder
- 25 - das Tauchrohr (190) eine Öffnung (192) aufweist, durch die das Entnehmen der Phase unter Verwendung von Überdruck oder Unterdruck, erzeugt mit oder ohne eine Pumpe, oder einer Pumpe durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 4,

30 dadurch gekennzeichnet, dass

das höhenverstellbare Tauchrohr (180, 190) mit einem sich von oben nach unten erstreckenden Überrohr (183, 193) eingesetzt wird,

wobei das Tauchrohr (180, 190) aus einem höhenverstellbaren Innenrohr (181, 191), welches eine Öffnung (182, 192) zur Entnahme einer der Phasen aufweist, und einem sich von oben nach unten

35 erstreckenden Überrohr (183, 193) ausgebildet wird, und die Länge des Überrohrs (183) durch ein oberes Ende, das oberhalb der leichten Phase (120) angeordnet ist und ein unteres Ende (183a, 193a) festgelegt wird, wobei der Durchmesser des Überrohrs (183, 193) größer eingestellt wird als der

Durchmesser des Innenrohrs (181, 191), so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr (183, 193) gebildet wird, und die Länge des Überrohrs (183) so gewählt wird, dass das

40 Überrohr (183, 193) über die Öffnung (182, 192) des Innenrohrs (181, 191) hinausragt und das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) in die schwere Phase (140) oder, sofern vorhanden, in

die Zwischenphase (130) eingetaucht wird, so dass die Flüssigkeit der Phase, in die das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) eintaucht, im Zwischenraum hochsteigt und durch die Öffnung (182, 192) im Innenrohr (181, 191) austreten kann;

5 oder

das höhenverstellbare Tauchrohr (180, 190) mit einem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr eingesetzt wird,

wobei das höhenverstellbare Tauchrohr aus einem höhenverstellbaren Innenrohr (181, 191), welches
10 eine Öffnung (182, 192) zur Entnahme einer der Phasen aufweist, und einem sich von unten nach oben erstreckenden Überrohr ausgebildet wird, und die Länge des Überrohrs durch ein unteres Ende, das unterhalb der schweren Phase (140) angeordnet ist und ein oberes Ende festgelegt wird, wobei der Durchmesser des Überrohrs größer eingestellt wird als der Durchmesser des Innenrohrs, so dass ein Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr gebildet wird, und die Länge des
15 Überrohrs so gewählt wird, dass das Überrohr über die Öffnung (182, 192) des Innenrohrs (181, 191) hinausragt und das obere Ende des Überrohrs in die leichte Phase (120) oder, sofern vorhanden, in die Zwischenphase (130) eingetaucht wird, so dass die Flüssigkeit der Phase, in die das obere Ende des Überrohrs eintaucht, in den Zwischenraum hineinfließt und durch die Öffnung (182, 192) im Innenrohr (181, 191) austreten kann.

20

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Länge des sich von oben nach unten erstreckenden Überrohrs (183, 193) und dessen Durchmesser derart gewählt werden, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen oder halb-
25 festen Bestandteilen, in den Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr (183, 193) durch das Überrohr (183, 193) verhindert wird;

oder

die Länge des sich von unten nach oben erstreckenden Überrohrs und dessen Durchmesser derart gewählt werden, dass der Zutritt von Schwebstoffen, Flocken und anderen festen oder halbfesten
30 Bestandteilen, in den Zwischenraum zwischen Innenrohr (181, 191) und Überrohr durch das Überrohr verhindert wird.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet, dass

35 die Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) für die leichte Phase (120) in der Trennvorrichtung (100) tiefer als der obere Auslass (150.2) positioniert wird (werden) und die Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) für die schwere Phase (140) in der Trennvorrichtung (100) höher als der untere Auslass (150.1) angeordnet wird (werden);

und/oder

40 ein Tauchrohr (180, 190) mit oder ohne Überrohr (183, 193) eingesetzt wird,

wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs (180, 190) ohne Überrohr (183, 193) sich die Öffnung (182, 192) des Tauchrohrs (180, 190) zum Entnehmen der schweren Phase (140) tiefer als die Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) in der schweren Phase (140) befindet (befinden) und wobei sich die Öffnung (182, 192) eines Tauchrohrs (180, 190) zum Entnehmen der leichten Phase (120) höher als die Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) in der leichten Phase (120) befindet (befinden); und

5 wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs (180, 190) mit sich von oben nach unten erstreckendem Überrohr (183, 193) bei der Entnahme der schweren Phase (140) durch die Öffnung (182, 192) des Tauchrohres (180, 190) sich das untere Ende (183a, 193a) des Überrohrs (183, 193) zum Entnehmen der schweren Phase (140) tiefer als die Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) in der schweren Phase (140) befindet (befinden); und

10 wobei bei Verwendung eines Tauchrohrs mit sich von unten nach oben erstreckendem Überrohr bei der Entnahme der leichten Phase (120) durch die Öffnung (182, 192) des Tauchrohres das obere Ende des Überrohrs zum Entnehmen der leichten Phase (120) höher als die Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) in der leichten Phase (120) befindet (befinden).

15

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass

das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der leichten Phase (120) in der Trennvorrichtung (100) in Schritt e. für eine oder mehrere Sonde(n) (160.2, 162.3, 162.4, 163.3, 163.4) jeweils

20 einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit ergibt, der mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit der leichten Phase (120) verglichen wird und bei Überschreiten des Sollwert-Bereichs schwere Phase (140) entnommen wird, wobei die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer für die schwere Phase (140) so geregelt werden, dass die gemessene Leitfähigkeit der leichten Phase (120) wieder im Sollwert-Bereich liegt;

25 oder

das kontinuierliche Messen der elektrischen Leitfähigkeit der schweren Phase (140) in der Trennvorrichtung (100) in Schritt e. für eine oder mehrere Sonde(n) (160.1, 162.1, 163.1) jeweils einen Wert für die elektrische Leitfähigkeit ergibt, der mit einem Sollwert-Bereich für die elektrische Leitfähigkeit der schweren Phase verglichen wird und bei Unterschreiten des Sollwert-Bereichs weniger schwere Phase (140) entnommen wird, wobei die Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer für die schwere Phase (140) so geregelt werden, dass die gemessene Leitfähigkeit der leichten Phase (120) wieder im Sollwert-Bereich liegt.

30

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass

35 die elektrischen Leitfähigkeitswerte dazu eingesetzt werden im kontinuierlichen Betrieb die Position der Phasen und Phasengrenzfläche(n) zu variieren, indem eine oder mehrere der folgenden Maßnahmen kontrolliert und gesteuert werden:

- die Entnahmegeschwindigkeit für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
- 40 - die Entnahmegeschwindigkeit für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
- die Entnahmemenge für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;

- die Entnahmemenge für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
 - die Entnahmedauer für die schwere Phase erhöht oder verringert wird;
 - die Entnahmedauer für die leichte Phase erhöht oder verringert wird;
 - die Entnahme der leichten oder schweren Phase unterbrochen wird;
 - 5 - die Zufuhrmenge des in die Trennvorrichtung (100) einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-System, mit oder ohne das Zielprodukt, erhöht oder verringert wird, wobei das wässrigen Zwei-Phasen-System ohne Zielprodukt eine Spüllösung darstellt;
 - die Zufuhrgeschwindigkeit des in die Trennvorrichtung einströmenden wässrigen Zwei-Phasen-Systems, mit oder ohne Zielprodukt, erhöht oder verringert wird, wobei das wässrigen
 - 10 Zwei-Phasen-System ohne Zielprodukt eine Spüllösung darstellt;
- und/oder
- das Tauchrohr zum Abfließen lassen oder Absaugen einer oder zweier Phasen hoch- oder heruntergefahren wird und gegebenenfalls nach oben oder unten nachpositioniert wird;
- 15 wobei die ein oder mehreren Entnahme-Vorrichtungen und/oder Mittel zur Durchführung der obigen Maßnahmen eingesetzt werden können:
- Schwerkraft;
 - Überdruck;
 - Unterdruck;
 - 20 - eine oder mehrere Pumpen;
- und/oder
- Entnahme-Vorrichtungen zum kontrollierten Ablassen oder Unterbrechen der Entnahme der Phasen am Auslass, ausgewählt aus stufenlos regelbaren Ventilen mit unterschiedlichem Öffnungsgrad, regelbaren Schlauchquetschklemmen, regelbaren Absperrhähnen oder regelbaren Durchflussbegrenzern.
- 25
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass
- zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit der Phasen in der Trennvorrichtung (10,
- 30 100) zwei, drei, vier oder mehr Sonden (160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3, 163.4) jeweils in eine Einführöffnung (157.1, 157.2, 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, 159.1, 159.2, 159.3, 159.4) in der Wand (155) der Trennvorrichtung (100) eingeführt und eingesetzt werden, wobei die Einführöffnungen (157.1, 157.2, 158.1, 158.2, 158.3, 158.4, 159.1, 159.2, 159.3, 159.4) eine Anordnung aufweisen, die ausgewählt wird aus:
- 35 - einer axialen Anordnung der Einführöffnungen (157.1, 157.2), wobei die Einführöffnungen (157.1, 157.2) auf einer geraden Verbindungslinie angeordnet werden;
 - einer radialen Anordnung der Einführöffnungen (158.1, 158.2, 158.3, 158.4), wobei die Einführöffnungen (158.1, 158.2, 158.3, 158.4) in einem Kreisbogen, angeordnet werden; oder
 - einer radial versetzten Anordnung der Einführöffnungen (159.1, 159.2, 159.3, 159.4), wobei
 - 40 die Einführöffnungen (159.1, 159.2, 159.3, 159.4) in einem Kreisbogen und zusätzlich in eine Vorzugsrichtung verschoben, angeordnet werden.

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass
- das Durchmischen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems durchgeführt wird, indem ein aktives
5 Durchmischen und/oder ein statisches Durchmischen eingesetzt wird.
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine der folgenden Bedingungen erfüllt wird:
- das Verfahren wird kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt;
 - 10 - als Ausgangslösung wird eine Zellkultur, ein Zellkulturüberstand oder ein Zelllysate verwendet,
worin das Zielprodukt enthalten ist;
 - mit der Ausgangslösung wird ein wässriges Zwei-Phasen-System hergestellt, bei dem ein
Phasenverhältnis von der Phase, enthaltend das Zielprodukt, zur Gegenphase von $> 1,1$ vor-
liegt;
 - 15 - ein Dichteverhältnis von leichter Phase (20, 120) zu schwerer Phase (40, 140) von mindes-
tens 1,06 wird eingesetzt;
 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird als Polymer oder als eines der Polymere Polyethyl-
englykol (PEG), Polypropylenglykol (PPG), Dextran, PEG-PPG-PEG-Copolymer (EOPO) oder
Mischungen dieser eingesetzt;
 - 20 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird als Polymer Polyethylenglykol mit einem Molekular-
gewicht zwischen 200 und 8000 g/mol eingesetzt;
 - im wässrigen Zwei-Phasen-System wird mindestens ein Polymer in einer Konzentration von 5
bis 35 Gewichts-%, bezogen auf die Gesamtmenge an wässrigem Zwei-Phasen-System, ein-
gesetzt;
 - 25 - als Salz oder als eines der Salze im wässrigen Zwei-Phasen-System wird ein Phosphatsalz,
Ammoniumsalz, Kaliumsalze, Acetatsalze, Natriumsalze oder Citratsalz oder Mischungen die-
ser eingesetzt;
 - anstelle eines Salzes wird eine Säure, ausgewählt aus Zitronensäure oder Essigsäure einge-
setzt;
 - 30 - dem wässrigen Zwei-Phasen-System werden stabilisierende Komponenten, ausgewählt aus
Aminosäuren, Zucker oder anderen stabilisierenden Additiven, zugegeben;
 - das Verfahren wird kontinuierlich durchgeführt, aber die Schritte a. und/oder d. werden semi-
kontinuierlich durchgeführt.
- 35 13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, dass
anstelle oder zusätzlich zum kontinuierlichen Messen der elektrischen Leitfähigkeit die Trübung in
mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100) kontinuierlich gemessen wird, wobei
die Trübung mit einem oder mehreren Trübungsmessgeräten in Form von einer, zwei, drei oder mehr
40 Sonden durchgeführt werden kann.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden leichten Phase (120) der Trennvorrichtung (100) eine Spüllösung (115) zugegeben wird, die die Zielprodukt
5 enthaltende leichte Phase (120) aus der Trennvorrichtung (100) verdrängt und diese somit durch den oben angeordneten Auslass (150.2) entnommen werden kann
und/oder
am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden leichten Phase (120) keine schwere Phase (140) mehr entnommen wird, diese sich dadurch aufstaut und die
10 leichte Phase (120) nach oben verdrängt, so dass die leichte Phase (120) durch den oben angeordneten Auslass (150.2) entnommen werden kann;
- oder
- 15 am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden schwere Phase (140) der Trennvorrichtung (100) eine Spüllösung (115) zugegeben wird, die die Zielprodukt enthaltende schwere Phase (140) aus der Trennvorrichtung (100) verdrängt und diese somit durch den unten angeordneten Auslass (150.1, 150.3) entnommen werden kann
und/oder
- 20 am Ende des Extraktionsverfahrens zur Restentleerung einer das Zielprodukt enthaltenden schweren Phase (140) keine leichte Phase (120) mehr entnommen wird, diese sich dadurch aufstaut und die schwere Phase (140) nach unten verdrängt, so dass die schwere Phase (140) durch den unten angeordneten Auslass (150.1, 150.3) entnommen werden kann.
- 25 15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend eine Trennvorrichtung (10, 100) zum Trennen der Phasen;
mindestens einen Auslass (50, 150.1, 150.2) in der Trennvorrichtung (10, 100);
mindestens eine Sonde (60, 160.1, 160.2, 162.1, 162.2, 162.3, 162.4, 163.1, 163.2, 163.3, 163.4) zum Messen der elektrischen Leitfähigkeit und/oder mindestens eine Sonde zum Messen der Trübung in
30 mindestens einer der Phasen in der Trennvorrichtung (10, 100);
eine oder mehrere Entnahme-Vorrichtung(en) und/oder Mittel zur Regelung und/oder Steuerung der Entnahmemenge, Entnahmegeschwindigkeit und/oder Entnahmedauer der leichten Phase (20, 120), der schweren Phase (40, 140) und, sofern vorhanden, der Zwischenphase (30, 130), basierend auf den Messwerten der elektrischen Leitfähigkeit und/oder basierend auf den Messwerten der Trübung in
35 mindestens einer Phase.
16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder der Vorrichtung nach Anspruch 15 zum Einstellen der Lage der Phasen in einer Trennvorrichtung (10, 100) und Abtrennen der Phasen anhand der gemessenen elektrischen Leitfähigkeitswerte mindestens einer der Phasen
40 und/oder anhand der gemessenen Trübungswerte mindestens einer der Phasen.