



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 426**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 30/58 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **00104868 .5**

⑧6 Fecha de presentación : **07.03.2000**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1134581**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2001**

⑤4 Título: **Cromatógrafo anular que se puede tratar en autoclave.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑦3 Titular/es: **A.L.P. Technology AG.**
Bahnhofstrasse 37
8001 Zürich, CH

⑦2 Inventor/es: **Prior, Adalbert;**
Prior, Joachim y
Wolfgang, Jürgen

⑦4 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cromatógrafo anular que se puede tratar en autoclave.

5 La invención se refiere a un dispositivo para la cromatografía anular continua que se puede esterilizar en un autoclave, así como de un procedimiento para la aplicación del dispositivo.

10 Por el documento WO 99/12625 se conoce un cromatógrafo anular que presenta un anillo colector de producto de elución estacionario, configurado en forma de anillo deslizante, sobre el cual se desliza de forma obturante un cuerpo rotativo con un lecho de partículas formado por un gel de cromatografía en forma de camisa cilíndrica y con una placa base integrada. Su finalidad es la de proteger la cromatografía anular realizada de forma continua (abreviada a nivel internacional CAC, continuous annular chromatography) con este dispositivo frente a una contaminación por el entorno y permitir el trabajo en condiciones estériles. En el anillo colector de producto de elución están dispuestas zonas colectoras en forma de cámaras con tubos de evacuación de líquido. En la placa base existen canales para recoger las fracciones que salen del lecho de partículas de la columna de CAC y conducirlas posteriormente a las cámaras del anillo colector de producto de elución.

15 La conducción del proceso cromatográfico en ausencia de contaminación debe cumplir muchos requisitos, especialmente para las separaciones de material biológico o biomédico o en aplicaciones para el procesamiento de principios activos farmacéuticos. Para ello se exigen sistemas cerrados hacia el exterior que sean fáciles de esterilizar y, además, se puedan adaptar fácilmente a diferentes tareas de separación, debiéndose tener en cuenta que el dispositivo que se ha de conducir en ausencia de contaminación consta de piezas rotativas y estacionarias. Durante la recogida del producto de elución es necesario asimismo tomar medidas que permitan que el producto de elución o las fracciones abandonen lo más uniformemente posible el lecho de partículas y las cámaras del anillo colector, manteniendo al mismo tiempo una precisión de separación lo más alta posible. Además, debe impedirse, mediante medidas adecuadas, que las fracciones ya separadas sean “arrastradas” posteriormente hacia cámaras adyacentes.

20 Según el documento WO 99/12625, el deseo de mejorar la precisión de separación por vía constructiva se logró aumentando el número de canales en la placa base y de las cámaras en el anillo colector a un máximo técnicamente factible y razonable desde el punto de vista de la rentabilidad del procedimiento. Los problemas generados por efectos de adhesión y capilaridad debidos a las secciones transversales reducidas de los canales de la placa base y, en particular, de los tubos de evacuación de líquido de las cámaras del anillo colector se resolvieron aumentando en forma de cuña los diámetros de los canales de la placa base en dirección radial hacia arriba, hacia el lecho de partículas. Para evitar una posible generación de vacío parcial y una aspiración siguiente de aire exterior no estéril a través del anillo deslizante de obturación hacia las cámaras, éstas fueron provistas adicionalmente de aberturas para la compensación de presión que, para el funcionamiento estéril, se pueden cubrir con membranas de esterilización por filtración adecuadas.

25 Según el documento WO 99/12625, el arrastre no deseado de parte de las fracciones hacia cámaras adyacentes del anillo colector se redujo sobre todo eligiendo para los canales de la placa base un diámetro bastante superior al grosor de las paredes radiales situadas entre las cámaras del anillo colector. De este modo, el chorro de líquido que llega de un canal es cortado como por una cuchilla al deslizarse el canal sobre una pared radial, interrumpiéndose sólo parcialmente, pero nunca a lo largo de toda su sección transversal, la columna de líquido existente entre el canal y la cámara, que es importante para la evacuación uniforme del líquido y es bastante más gruesa que la pared radial situada entre dos cámaras adyacentes.

30 La presente invención, que constituye fundamentalmente un perfeccionamiento del dispositivo de CAC del documento WO 99/12625 pero no está limitada a sus características, se refiere a un dispositivo para la cromatografía anular que presenta una cabeza de columna estacionaria, un anillo colector de producto de elución estacionario, un cuerpo rotativo situado entre ambos que puede girar alrededor de un eje vertical y presenta la forma de un cilindro doble que forma una camisa hueca con un medio de separación cromatográfico contenido en él, así como un accionamiento mecánico. Por su extremo inferior, el cuerpo rotativo está unido con un plato giratorio que dispone de canales verticales pasantes y se desliza de forma obturante sobre un anillo colector de producto de elución estacionario con cámaras, presentando el plato giratorio en su cara inferior una prolongación que se puede acoplar a un árbol motor del accionamiento a través de una conexión que se puede separar rápidamente. Por el documento US 3257781 se conoce un dispositivo de CAC de este tipo. En la presente invención, la cabeza de columna estacionaria, el cuerpo rotativo con el plato giratorio y el anillo colector de producto de elución conectado a continuación están unidos además en un módulo de CAC que se puede desmontar del eje motor como una unidad.

35 Las piezas giratorias y estacionarias del dispositivo según la invención forman una unidad independiente del accionamiento que se mantiene unida por medios adecuados. Para garantizar una unión permanente, especialmente de la obturación que roza entre el cuerpo rotativo y el anillo colector de producto de elución, incluso durante manipulaciones tales como la retirada del accionamiento o durante el transporte, el cuerpo rotativo y las piezas estacionarias del dispositivo, a excepción de la unidad de accionamiento, pueden estar fijados en una especie de jaula, por ejemplo entre dos placas.

La finalidad de esta medida es poder retirar el dispositivo de cromatografía, incluido el cuerpo rotativo, la cabeza de columna estacionaria con las conexiones para los tubos de alimentación de líquido, el anillo colector de producto

de elución, los tubos de evacuación de líquido de las cámaras del anillo colector de producto de elución y, dado el caso, incluido el recipiente colector de producto de elución, en forma de bloque del bloque de accionamiento para poder esterilizarlo en, por ejemplo, un autoclave. El dispositivo de CAC según la invención también contiene preferentemente todos los elementos constructivos necesarios para poder realizar una esterilización *in situ* del bloque de accionamiento con vapor recalentado, haciendo pasar vapor de agua saturado de manera conocida especialmente en la técnica de fermentación. Para la conducción estéril del proceso, preferentemente se han de proveer de conexiones estériles tanto los tubos que alimentan el líquido en la cabeza de columna como los tubos que salen de las cámaras del anillo colector de producto de elución. Para los tubos de alimentación se pueden usar, por ejemplo, conexiones estériles convencionales, como los que se conocen en la técnica de fermentación. Asimismo se pueden prever obturaciones adicionales, especialmente en las juntas y/o los puntos de contacto entre los elementos constructivos del cuerpo rotativo.

Como accionamiento son adecuados árboles, correas trapezoidales, cadenas motrices y engranajes o engranajes de fricción. Las poleas de las correas trapezoidales o las coronas dentadas se pueden montar directamente en el contorno exterior del cuerpo rotativo, pudiendo engranar las ruedas dentadas o las ruedas de fricción también en la cara interior del cuerpo rotativo en forma de camisa cilíndrica.

Preferentemente se usan árboles motores sobre los cuales se pueda colocar y acoplar el cuerpo rotativo. Se prefiere acoplar el cuerpo rotativo al árbol motor directamente a través de una placa base configurada en forma de plato giratorio y que se conecta directamente al lecho de partículas. Para este fin, el plato giratorio presenta en su cara inferior una pequeña prolongación que posee esencialmente la forma del árbol motor y que en su extremo está conformada en forma de manguito que puede colocarse de manera que cubra alineadamente el árbol motor para recibir el par del árbol motor. Para el acoplamiento se pueden usar las conexiones de torsión conocidas y las medidas de seguridad contra la torsión para árboles. Por ejemplo, se pueden usar conexiones de acoplamiento rígidas para árboles alineados entre sí o caras frontales dentadas. Es crucial que el cuerpo rotativo se pueda desmontar de forma reversible y sencilla (sin costosos trabajos de montaje) del eje de accionamiento y que el par se transmita de forma fiable. Otros tipos de acoplamiento adecuados entre el cuerpo rotativo y el árbol motor son conocidos para el experto y comprenden, por ejemplo, conexiones de enchufe, rápidas, a bayoneta, de enclavamiento y por tornillos.

En su extremo de acoplamiento, el árbol motor puede estar configurado de manera conocida en sí, por ejemplo de forma cilíndrica, cónica o poliédrica; la prolongación del plato giratorio que se ha de conectar con él debe disponer entonces de un manguito alineado configurado de forma complementaria. No obstante, también puede ser el árbol motor el que, a la inversa, termina en un manguito en el que engrana con precisión un extremo de la prolongación del plato giratorio conformado de forma complementaria.

Para poder desplazar el cuerpo rotativo de forma obturante sobre el anillo colector de producto de elución, el anillo deslizante de obturación, situado entre el plato giratorio en rotación y el anillo colector de producto de elución estacionario, debe encontrarse siempre a la presión de apriete deseada. Como medio de presión puede servir el peso propio del cuerpo rotativo. Sin embargo, según la invención se prefiere usar uno o varios resortes de compresión y/o de tracción previamente tensados. Mientras que en el caso de los resortes de tracción previamente tensados el anillo colector de producto de elución se suspende en ellos, los resortes de compresión ejercen la presión de apriete desde abajo sobre el anillo colector de producto de elución. Para distribuir la fuerza del resorte uniformemente por la sección transversal del anillo colector de producto de elución, resulta ventajoso prever, entre los resortes y el anillo colector de producto de elución, piezas de transmisión de presión con una superficie de presión incrementada respecto a la de los resortes.

El anillo deslizante de obturación, el anillo colector de producto de elución con las cámaras incorporadas en él para recoger los productos de elución que abandonan el lecho de partículas, así como los canales en la placa base y/o en el plato giratorio, pueden estar realizados de la manera descrita al principio, conocida por el documento WO 99/12635. En el marco de la presente invención, sin embargo, se prefiere solucionar el problema de las oscilaciones de presión o del vacío parcial, descrito al principio para el dispositivo de CAC del documento WO 99/12625, de otra manera en lugar de con la ayuda de aberturas para la compensación de presión en las cámaras del anillo colector.

Sorprendentemente se ha observado que, usando de tubos flexibles como tubos de evacuación del producto de elución para las cámaras del anillo colector de producto de elución que pueden colocarse de manera que cubren las tubuladuras de escape dado el caso presentes en las cámaras, el problema del vacío parcial también se puede resolver sin aberturas para la compensación de presión en las cámaras si los tubos flexibles se guían, por ejemplo, partiendo de las cámaras o de las tubuladuras de escape en forma de ondulaciones similares a una "S" horizontal de manera que formen un sifón. Da lo mismo que los tubos flexibles y/o las tubuladuras de escape dado el caso presentes estén dispuestos en el fondo de las cámaras orientados hacia abajo, en sentido esencialmente vertical, o que estén dispuestos lateralmente en la cara exterior de las cámaras orientados hacia fuera y, preferentemente, en sentido oblicuo hacia abajo.

Para el funcionamiento óptimo del dispositivo de CAC según la invención es crucial en este contexto que entre el lecho de partículas y los sifones de los tubos flexibles de evacuación se genere una conexión continua de líquido en el sentido de vasos comunicantes que, a pesar de la rotación del lecho de partículas, se conserve durante todo el tiempo que duran las fases de elución y, dado el caso, de lavado y regeneración. Por esta razón, tampoco es necesario fijar los extremos o las partes de los tubos flexibles de evacuación situadas más arriba en un nivel inferior al de las cámaras

del anillo colector, sino que pueden, y preferentemente deben, elevarse y mantenerse a un nivel superior al del anillo colector.

Además de la adecuación de la invención para una esterilización en el autoclave, la estructura modular del dispositivo presenta la ventaja de que puede reemplazarse fácilmente la unidad cromatográfica completa. De este modo, y dependiendo del tipo del problema de separación, se pueden colocar sobre el accionamiento sucesivamente y sin demora cuerpos rotativos preparados en forma de unidades cromatográficas completas (módulos), de manera que durante un proceso de CAC preparativo se puede preparar, por ejemplo rellenar y acondicionar, otro módulo en paralelo.

No sólo se puede accionar el mismo bloque de accionamiento con diferentes módulos cromatográficos sino que también se pueden adaptar a las tareas cromatográficas correspondientes las camisas huecas cilíndricas para el alojamiento del medio de separación y las salidas para el producto de elución. Por ejemplo, las camisas huecas cilíndricas y/o los cuerpos rotativos se pueden variar en cuanto a su longitud, usando simultáneamente distanciadores correspondientes de diferentes longitudes. La invención es adecuada asimismo para cuerpos compuestos en los que para la separación se usan simultáneamente varios lechos de partículas superpuestos y/o yuxtapuestos, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/47913. La idea básica y el principio de la presente invención se pueden aplicar en general de forma análoga a todas las variantes de lechos de partículas y dispositivos de CAC, como las que se dan a conocer en las solicitudes de patente internacionales WO 98/45699, WO 99/12625, WO 99/29388, WO 99/28740 y WO 99/47913. Por la expresión "lecho de partículas" no sólo debe entenderse un gel o resina de cromatografía en forma de partículas dispuesto en la camisa hueca cilíndrica del cuerpo rotativo sino también un medio de separación monolítico adecuado para la cromatografía líquida, por ejemplo de cerámica, plástico (por ejemplo, un polímero de bloques), material fibroso y similares. La expresión también se refiere a una combinación de dos o más medios de separación cromatográficos dispuestos dado el caso en forma de capas superpuestas y separados entre sí preferentemente por capas de separación, como los que se conocen, por ejemplo, por las publicaciones antes mencionadas.

A continuación, la invención se explica con más detalle mediante un ejemplo de realización y con referencia a los dibujos. Muestran:

La Fig.1 un corte transversal lateral a través del eje de rotación de un dispositivo de CAC según la invención;

la Fig.2 una vista en detalle de la zona del fondo del dispositivo de la Fig. 1, con un tubo de evacuación de producto de elución dispuesto en forma de ondulaciones y representado adicionalmente; y

la Fig. 3 una representación gráfica del resultado de un proceso de enriquecimiento en el que se ha usado el dispositivo de CAC según la invención.

En la Fig. 1 se aprecia un bloque de accionamiento con el árbol motor 2 que está unido con un rotor 10 del motor 9. Sobre el árbol motor 2 está colocado un cuerpo rotativo 1.

El cuerpo rotativo 1 está cerrado hacia el exterior y sirve para la cromatografía anular. Para el alojamiento del lecho de partículas está prevista en el cuerpo rotativo 1 una camisa hueca cilíndrica como espacio 3 para el lecho de partículas que es soportada por el plato giratorio 4. En la realización representada, la camisa hueca cilíndrica está colocada desde arriba sobre el plato giratorio 4. Como se muestra en este ejemplo, el cilindro interior de la camisa hueca cilíndrica puede estar unido por abajo a un zócalo inferior 11 y estar sujeto a través de éste al plato giratorio 4 mediante una conexión por tornillos 12, así como estar cerrado por arriba con un tejado cónico 13. Para el centrado y la estabilización del cilindro interior, el plato giratorio 4 puede presentar, en su cara superior, una protuberancia central que encaja de forma alineada en una entalladura configurada de forma complementaria en la cara inferior del zócalo inferior 11. Para la conducción del proceso en ausencia de contaminación resulta ventajoso prever obturaciones adicionales 34a, 34b, 34c, 34d en las juntas entre los puntos de contacto de los elementos constructivos que limitan el espacio 3 para el lecho de partículas.

Para la transmisión del par del árbol motor 2 se puede acoplar el cuerpo rotativo 1 al árbol motor 2. Para ello, el plato giratorio 4 contiene, en su cara inferior, una prolongación que presenta esencialmente la forma de una sección central del árbol 2 y que en su extremo está conformada en forma de un manguito 32 que puede colocarse de forma alineada cubriendo el extremo del árbol motor 2 libre conformado de forma complementaria al manguito según el principio de cierre y llave. Este acoplamiento se puede asegurar contra la torsión mediante una espiga 33 dispuesta lateralmente en el árbol motor 2 y que encaja en una entalladura correspondiente del manguito 32. Se sobreentiende que también es adecuada y cumple la misma finalidad la variante inversa, en la que el árbol motor termina en un manguito en el que encaja una prolongación del plato giratorio 4 conformado de forma complementaria.

Una banda o rejilla de retención 14, colocada en el plato giratorio 4 debajo del espacio 3 para el lecho de partículas, soporta el lecho de partículas y lo separa de los canales 15 conectados a continuación que, preferentemente, se ensanchan hacia arriba en forma de cuña, se extienden a través del plato giratorio 4 y conducen los líquidos que salen del lecho de partículas a las cámaras 16 (Fig. 2) del anillo colector de producto de elución 5. Desde los fondos de las cámaras 16 del anillo colector de producto de elución 5 achaflanados hacia fuera o que dado el caso se estrechan en forma de embudo conducen canales de salida 17 (Fig. 2) hacia el exterior del anillo colector de producto de elución, a

los cuales están conectados tubos de evacuación de producto de elución 18 (Fig. 2), en general tubos flexibles de plástico, para generar conexiones, dado el caso estériles, entre el anillo colector de producto de elución 5 y los recipientes colectores de producto de elución 19.

- 5 Los tubos de evacuación de producto de elución 18 se conducen preferentemente en forma de ondulaciones en el sentido de una "S" horizontal, como se representa en la Figura 2, en la que entre una parte 18a del tubo de evacuación de producto de elución 18, que primero desciende, y la parte 18b, curvada a continuación hacia arriba, se forma una especie de sifón, y la parte 18c siguiente, curvada de nuevo hacia abajo, desemboca en un recipiente colector de producto de elución 19. Esta disposición de los tubos flexibles de evacuación de producto de elución 18 se puede
10 realizar de manera sencilla, por ejemplo elevando los tubos flexibles mediante un soporte que rodea el cuerpo rotativo 1 en forma de anillo y que, dado el caso, es ajustable en altura (no representado en los dibujos).

- En el funcionamiento analítico del dispositivo de CAC se forma, entre el espacio 3 para el lecho de partículas y cada tubo de evacuación de producto de elución 18, una columna de líquido continua que nunca se corta por completo
15 debido a las geometrías de los canales 15 del plato giratorio 4 y de las paredes radiales situadas entre las cámaras 16 del anillo colector de producto de elución 5, adaptadas especialmente entre sí y discutidas al principio en el ejemplo del documento WO 99/12625. Mediante la formación de sifones en los tubos de evacuación de producto de elución 18 según la invención se asegura que la columna de líquido que abandona el lecho de partículas llega siempre por lo menos hasta el sifón, dado el caso hasta la curvatura superior que sigue al sifón, de los tubos de evacuación de producto de elución 18 dispuestos en forma de ondulaciones, y, por lo tanto, se mantiene un flujo continuo de producto de elución.
20 Al mismo tiempo se evita que las cámaras 16 se vacíen por completo y se pueda generar un vacío parcial por un eventual vaciado brusco de las cámaras. Las ligeras oscilaciones de presión que aún así pueden aparecer dado el caso se amortiguan mediante la columna de líquido presente en los tubos de evacuación de producto de elución 18, de manera que en ninguna fase del funcionamiento de la cromatografía puede producirse la aspiración de aire exterior
25 (no estéril) a través del anillo deslizante de obturación.

- Para permitir una evacuación del producto de elución sin contaminación, el plato giratorio 4 se desliza de forma obturante sobre dos superficies de deslizamiento concéntricas a lo largo del contorno del anillo colector de producto de elución 5, estando dispuestas entre las superficies de deslizamiento las cámaras 16 y presionándose el anillo colector
30 de producto de elución 5 contra el plato giratorio 4 mediante un resorte helicoidal 6. El resorte helicoidal 6 está alojado en el centro, de manera que las espiras del resorte rodean el eje del árbol motor 2. Transmite la presión del resorte a través de un bloque de presión 7 que está unido al anillo colector de producto de elución 5 por medio de una conexión por tornillos 12' y funciona como una pieza de transmisión de presión.

- 35 Entre la superficie de deslizamiento situada en el interior y el borde interior adyacente al árbol motor, el anillo colector de producto de elución 5 contiene una cavidad circunferencial achaflanada hacia el borde exterior que forma, junto con la cara inferior del plato giratorio 4, un espacio hueco 20 desde cuya zona más profunda salen uno o varios taladros 21 hacia el exterior del anillo colector de producto de elución 5. El espacio hueco sirve, por una parte, para limitar el tamaño de la superficie de deslizamiento y, por otra, para permitir una esterilización de las superficies de
40 deslizamiento con vapor recalentado. Los taladros 21 permiten evacuar de esta zona el agua de condensación que se haya acumulado durante la esterilización o el funcionamiento de la cromatografía (por ejemplo, durante el enfriamiento a por debajo de la temperatura ambiente).

- En este lugar cabe señalar también que el dispositivo de CAC según la invención está equipado preferentemente
45 con medios para el acondicionamiento térmico y/o la termostatación, en particular con un circuito de calefacción y/o de refrigeración dispuesto dentro y/o fuera del cuerpo rotativo 1, para poder crear por calefacción o refrigeración unas condiciones de servicio óptimas en función del problema cromatográfico y el material de partida usado. El acondicionamiento térmico se puede realizar, por ejemplo, con la ayuda de un medio de acondicionamiento térmico líquido presente dentro del cilindro interior del cuerpo rotativo 1 y/o mediante el aislamiento térmico del cuerpo
50 rotativo hacia el exterior. El cilindro interior también puede estar realizado en forma de camisa doble a través de la cual se conduce el medio de acondicionamiento térmico.

- El cuerpo rotativo 1 con el plato giratorio 4 está fijado, junto con la cabeza de columna estacionaria, el anillo colector de producto de elución 5 y el bloque de presión 7, mediante el resorte helicoidal 6 entre una placa base 22
55 resistente a la torsión y una placa de cabeza 23 resistente a la torsión que, a lo largo de su contorno, están atornilladas entre sí mediante distanciadores 24 que las mantienen a la distancia deseada. A lo largo de los distanciadores 24 está previsto, aproximadamente a la altura del plato giratorio 4, un escalonamiento que soporta un semicojinete 25 axial con un anillo tórico de obturación 26 sobre el cual descansa y se desliza un rotor de cojinete 25a anular unido con el plato giratorio 4 a través de una conexión por tornillos 12".
60

- En la placa de cabeza 23 está integrada o unida a ella en una sola pieza (como se representa en el ejemplo de la Fig. 1) la cabeza de columna, con los tubos de alimentación de material 27a, 27b, 27c dispuestos en ella para la alimentación, los eluyentes, para cargar el material del lecho de partículas etc., con conexiones estériles conocidas de la técnica de fermentación. La parte superior del cuerpo rotativo 1, que cierra por arriba el espacio 3 para el lecho de
65 partículas, se guía en la placa de cabeza 23 sobre otro cojinete de deslizamiento axial mediante un rotor de cojinete 25a' anular unido por pernos y mediante un anillo tórico de obturación 26', estando el semicojinete 25' axial unido de forma fija con la placa de cabeza 23 resistente a la torsión.

La placa base 22 contiene una abertura central cuyo diámetro interior equivale aproximadamente al diámetro del árbol motor. El borde de esta abertura central está configurado en forma de una camisa cilíndrica 22c orientada verticalmente hacia arriba, que con su superficie interior sirve de manguito guía para la prolongación 32 del plato giratorio 4. En la cara inferior de la placa base 22, la abertura se ensancha en forma de cono 22a, lo que facilita considerablemente la colocación del módulo de CAC sobre el árbol motor 2. La camisa cilíndrica 22c está rodeada a su vez por un manguito de obturación rozante 28 que facilita el ajuste vertical de la placa base 22 respecto al bloque de presión 7. En la cara superior de la camisa cilíndrica 22c está introducida una espiga 29 que asegura el bloque de presión 7 contra la torsión respecto a la placa base 22. El bloque de presión 7 presenta un taladro central pasante que en la zona superior adyacente al anillo colector de producto de elución 5 equivale al diámetro de la prolongación 32 y en la zona que se continúa con ella, al diámetro de la camisa cilíndrica 22c, incluido el manguito 28, de manera que puede colocarse de forma que cubra, por una parte, la prolongación 32 del plato giratorio 4 y, por otra, el manguito 28 y la camisa cilíndrica 22c de la placa base. En una zona periférica 7a del bloque de presión 7 está prevista una entalladura anular abierta hacia abajo que aloja el resorte helicoidal 6, en la que como contrasoprote para el resorte helicoidal 6 sirve la placa base 23. Puesto que el bloque de presión 7 está asegurado en la placa base 22 pero no está unido a ella de forma fija, la placa base 22 se puede desplazar y/o ajustar respecto a él en dirección vertical a lo largo del manguito 28 para variar dado el caso la presión del resorte y, con ello, la presión de apriete del anillo deslizante de obturación situado entre el anillo colector de producto de elución 5 y el plato giratorio 4. Para un aseguramiento adicional, la placa base 22 está provista de un saliente 22b circunferencial que penetra en la entalladura anular de la camisa cilíndrica 7a. El bloque de presión 7 está unido finalmente de forma fija al anillo colector de producto de elución mediante una conexión por tornillos 12'.

El módulo de CAC según la invención, con el dispositivo de CAC fijado entre la placa base 22 y la placa de cabeza 23 con el cuerpo rotativo 1, el anillo colector de producto de elución 5, el bloque de presión 7 y el resorte helicoidal 6, está colocado sobre una placa de soporte 30 del bloque de accionamiento 8. En la placa de soporte 30 está previsto un taladro central para pasar el árbol motor 2, cuyo borde está configurado en la cara superior en forma de protuberancia 30a circunferencial complementaria al cono 22a de la placa base 22. Tras soltar la conexión por tornillos 31 entre la placa base 22 y la placa de soporte 30 se puede separar fácilmente el módulo de CAC completo, dado el caso con la ayuda de una grúa, del bloque de accionamiento 8 y tratarlo como tal en un autoclave o reemplazarlo por otro módulo de CAC.

En este sentido, el dispositivo de CAC según la invención es adecuado en principio para todos los problemas de separación usuales que se puedan resolver mediante CAC o P-CAC, en particular para los que se describen en, por ejemplo, el documento WO 99/28740. Esto incluye también el uso de los más diversos geles y resinas de cromatografía, así como combinaciones de tales resinas y geles, como se describe igualmente en, por ejemplo, el documento WO 99/28740. También debe comprender el uso de materiales de separación monolíticos (por ejemplo, un polímero de bloques) o de otros medios de separación adecuados para la cromatografía líquida. El dispositivo de CAC según la invención se usa preferentemente para fines preparativos de separación, purificación y/o concentración de sustancias individuales o de mezclas de sustancias orgánicas, especialmente de proteínas o mezclas de proteínas de origen vegetal, animal (incluido humano) o biotecnológico (por ejemplo, proteínas recombinantes), como las que se exponen en parte en el documento WO 99/28740.

El material de muestra que se ha de tratar se introduce en el medio de separación (por ejemplo, un lecho de partículas formado por gel para cromatografía) como alimentación a través de un solo punto en la ranura anular de la camisa hueca cilíndrica y se desplaza mediante eluyentes (por ejemplo, el eluyente principal y el eluyente para el gradiente escalonado) por la fase estacionaria, en la que pueden tener lugar procesos de adsorción y desorción. El eluyente principal se aplica habitualmente distribuido uniformemente por toda la ranura anular, por ejemplo a través del tejado cónico que cubre por arriba el cilindro interior del cuerpo rotativo, mientras que el o los eluyente(s) para el gradiente escalonado se aplican igualmente en un solo punto a continuación de la alimentación de la muestra, a determinadas distancias angulares y distribuidos uniformemente por la ranura anular. Además de las entradas para la alimentación y los eluyentes, pueden estar presentes además entradas para líquidos de acondicionamiento, en especial para agentes de lavado, regeneración y/o higienización ("sanitizing agents"), que, dependiendo del tipo de tarea de tratamiento y del material de muestra, pueden estar dispuestas delante, entre y/o detrás de las entradas para los eluyentes. Esto puede constituir una importante ventaja, o ser incluso indispensable, especialmente para el tratamiento de material de muestra biológico y en el caso de la presencia, relacionada a menudo con él, de numerosas sustancias acompañantes no deseadas, por una parte, y lo perecederos y propensos que son los componentes orgánicos (por ejemplo, proteínas) a infecciones, por otra, y tanto más cuando se trata de material que se ha de usar a continuación para fines médicos en seres humanos o animales.

Ahora se ha comprobado que para algunas tareas de separación, purificación y, especialmente, de concentración resulta ventajoso un procedimiento en el que las entradas para la alimentación de la muestra y para el eluyente principal se intercambian respecto al procedimiento convencional, es decir que, al contrario que en el modo de proceder habitual, no es el eluyente principal el que se aplica distribuido por toda la ranura anular sino el material de muestra que se ha de tratar. Un modo de proceder de este tipo resulta útil sobre todo cuando deben pasarse grandes volúmenes de material de muestra, por ejemplo cuando se ha de concentrar y/o purificar de sustancias acompañantes un principio activo farmacéutico que está presente en una solución a una concentración muy baja.

Con este procedimiento de CAC "inverso" (denominado también procedimiento BIP), este tipo de problemas se pueden solucionar de manera bastante más económica que con la variante de procedimiento convencional, puesto que,

por ejemplo, la elución se puede efectuar por una desorción fácil y rápida en un pequeño segmento angular y/o en una pequeña zona. Para la desorción selectiva del material de muestra adsorbido al medio de separación se disponen en la cabeza de columna una o varias entradas para los eluyentes para el gradiente escalonado, así como dado el caso, a distancias angulares predeterminadas delante, entre y/o después de las entradas para los eluyentes, otras entradas adicionales para los agentes de lavado, regeneración y/o higienización. Dado el caso se ha de prestar atención a que, en el caso de que haya que realizar rápida y sucesivamente pasos de elución y/o de acondicionamiento (por ejemplo, pasos de lavado, regeneración y/o higienización), las entradas correspondientes para los eluyentes y/o los agentes de acondicionamiento se dispongan tan próximas entre sí, que entre ellas no pueda entrar material de muestra en el medio de separación. De forma complementaria o alternativa se pueden ajustar las velocidades de flujo de las corrientes de alimentación de la muestra y de agente de purificación de manera que se logre el mismo efecto.

Para este propósito se prefiere equipar la cabeza de columna con numerosos túbulos alargadores para los tubos de alimentación de líquido, montados de forma fija a pequeñas distancias angulares y de los cuales, dependiendo de la tarea de separación, sólo se usa una parte mientras que los demás se cierran.

De forma alternativa, en otra forma de realización se monta de forma móvil, encima de la ranura anular de la camisa cilíndrica, un número más pequeño de túbulos alargadores en un anillo guía (no representado en las figuras) o en un carril guía anular de manera que se puedan desplazar por el contorno del anillo o del carril guía y fijar sobre el lecho de partículas en las posiciones angulares deseadas. Para este fin, los túbulos alargadores también pueden ser rectos. Preferentemente se guían verticalmente a través del anillo guía o del carril guía y son sostenidos por el anillo guía o por el carril guía con la ayuda de, por ejemplo, elementos deslizantes o rodantes sujetos a los túbulos.

Para la estabilización vertical y la fijación firme en el anillo guía o en el carril guía, los túbulos se pueden inmovilizar mediante conexiones por tornillos o pinzas encima o debajo del anillo guía o del carril guía, o en ambos puntos. De forma análoga también se pueden usar otros sistemas de suspensión adecuados para los túbulos, siempre que permitan su desplazamiento a lo largo del contorno de la ranura anular sobre el lecho de partículas. Por ejemplo, los túbulos también pueden suspenderse de forma móvil con la ayuda de anillos u ojales en un único anillo guía o en dos anillos guía superpuestos y fijarse con conexiones de pinza adecuadas. Los anillos o carriles guía también pueden presentar posiciones de enclavamiento en las que se pueden fijar los túbulos de forma estacionaria. La conexión entre los túbulos y las aberturas de entrada en la cabeza de columna se realiza mediante tubos flexibles, dado el caso armados, de material inerte (por ejemplo, plástico) que se pueden conectar a los túbulos y/o a las aberturas de entrada en la cabeza de columna mediante boquillas portatubos, conexiones de clavija, rápidas o por tornillos, o mediante medios de conexión separables similares.

Las condiciones óptimas para la selección y/o el ajuste de las posiciones angulares/ distancias angulares de los túbulos alargadores y/o de las velocidades de flujo de las corrientes de líquido alimentadas se pueden hallar mediante ensayos previos para cada problema de tratamiento preparativo. El siguiente ejemplo lo ilustra.

Ejemplo

Enriquecimiento de una solución de proteínas mediante P-CAC inversa

Una solución esencialmente exenta de partículas, obtenida a partir de una fermentación para la síntesis microbiana del factor VIII humano recombinante (abreviado: FVIIIr) se somete a una cromatografía anular continua preparativa (P-CAC) para la concentración del FVIIIr contenido en ella, usando el dispositivo de CAC según la invención.

Se usa un dispositivo de CAC que presenta una cabeza de columna con 7 entradas: Una entrada principal que, mediante el tejado cónico del cilindro interior, distribuye el material de muestra por toda la ranura anular del lecho de partículas (a excepción de aquellas zonas en las que se introducen los eluyentes o los agentes de acondicionamiento) y que dado el caso llena todo el espacio superior ("head-space") del cuerpo rotativo con material de muestra, así como una entrada correspondiente para la solución de lavado y equilibrado (NaCl 150 mM), el eluyente (NaCl 0,7 M), el agente de regeneración (NaCl 2M), el agente de purificación (laurilsulfato sódico) y el agente de higienización (NaOH 1M); una entrada no se usa en este ejemplo.

Como lecho de partículas contenido en la camisa hueca cilíndrica del cuerpo rotativo se usa un gel de intercambio aniónico Poros DEAD (fabricante: Perseptive Biosystems) y se cubre con una capa de perlas de vidrio con un grosor de aproximadamente 2 a 3 cm. Todas las entradas, excepto la entrada principal, están equipadas con túbulos alargadores correspondientemente curvados que penetran en la capa de perlas de vidrio y terminan unos 0,5 a 1,5 cm por encima del lecho de gel del intercambiador aniónico. De este modo se evita que las corrientes de líquido que salen de los túbulos alargadores se proyecten directamente sobre el lecho de gel y arremolinen su zona superior. Aún así, aunque se usen perlas de vidrio como capa protectora y ayuda de aplicación, las velocidades de flujo de los líquidos que entran directamente en la ranura anular por medio de los túbulos alargadores están relativamente limitadas, de modo que la aplicación de la alimentación de muestra mediante uno de estos túbulos constituiría un paso determinante de la velocidad. El problema se pudo solucionar con éxito anegando según la invención el espacio superior con alimentación de muestra.

Para la esterilización, el módulo de CAC cargado y relleno de agua desionizada o, dado el caso, de líquido de lavado se estrangula por los tubos de alimentación de líquido de la cabeza de columna o, preferentemente, se cierra

herméticamente con membranas que se pueden tratar en autoclave, en particular en forma de conexiones por tornillos o de enchufe correspondientes, como las que se conocen en la técnica de fermentación. Igualmente se estrangulan herméticamente por sus extremos los tubos flexibles de evacuación de producto de elución del anillo colector, preferentemente un número de 90 a 180. También pueden estar equipados con cánulas metálicas que facilitan la conexión

aséptica de los tubos flexibles a los recipientes colectores de producto de elución esterilizados que, dado el caso, contienen una membrana de cierre, por ejemplo pinchando las membranas de cierre bajo protección de una llama. Para el tratamiento en autoclave, las cánulas pueden estar protegidas además mediante manguitos protectores reutilizables, de manera que se reduce aún más el posible riesgo de contaminación.

La placa de cabeza estacionaria, que cierra el cuerpo rotativo por arriba, contiene al menos otra abertura que sirve para permitir la compensación de presión en el cuerpo rotativo durante el tratamiento en autoclave y durante la fase de enfriamiento posterior. Con este fin, la abertura se cubre con una membrana de esterilización por filtración permeable por ambas caras a aire y humedad y que se puede tratar en autoclave, por ejemplo con una abertura de poro de como máximo 0,45 μm , o, de forma alternativa, con un sistema de filtros de lecho profundo (por ejemplo, lana de vidrio). Este tipo de sistemas de compensación de presión también son suficientemente conocidos en la técnica de fermentación. Para el tratamiento en autoclave, el módulo de CAC completo se separa, dado el caso con la ayuda de una grúa móvil, del árbol motor del accionamiento por motor tras aflojar el (los) tornillo(s) entre la placa base y el plato giratorio, y se coloca en un autoclave de tamaño adecuado. El proceso siguiente de tratamiento en autoclave se lleva a cabo de manera conocida. Para la mayoría de las finalidades de uso en la práctica es suficiente un tiempo de permanencia de 15 a 20 minutos a 120°C (a una presión de aproximadamente 0,15 mPa (aproximadamente 1,5 atm)).

Proceso de P-CAC: Después del tratamiento en autoclave, el enfriamiento y la conexión aséptica de los tubos de alimentación a las bombas y de los tubos de evacuación de producto de elución a los recipientes colectores de producto de elución, se inició la cromatografía anular continua preparativa mediante la alimentación de la muestra a una velocidad de flujo de 80 ml/min. Los cinco túbulos alargadores de entrada para el lavado/equilibrado, la elución, la regeneración, la purificación y la higienización se dispusieron de tal manera, que desembocaran en la capa de perlas de vidrio de la ranura anular en un único segmento angular de 45 grados, de manera que en la zona de estas posiciones angulares obstaculizaron o evitaron por completo la penetración del material de muestra en el medio de separación. De este modo se pudo asegurar que ningún material de muestra contaminaba el medio de separación detrás de la zona de elución y entre las zonas de acondicionamiento.

La velocidad de flujo para el lavado/equilibrado se ajustó a 4 ml/min, las demás a 2 ml/min cada una. Como velocidad de rotación para el cuerpo rotativo se eligió una velocidad angular de 120 grados por hora. La toma de muestras se efectuó al cabo de aproximadamente 1,25 horas. Pese a unas condiciones de procedimiento todavía no óptimas se pudo lograr una concentración del FVIIIr de 13 veces (Fig. 3).

En otro ensayo, las velocidades de flujo se modificaron de manera que la alimentación de muestra se realizó a 100 ml/min, el lavado/equilibrado y la elución a 3 ml/min, así como la regeneración, la purificación y la higienización a 2 ml/min. A una velocidad angular de 120 grados por hora y una velocidad de flujo lineal de 157 cm/h se comenzó a recoger las fracciones al cabo de 3 horas. Se pudo lograr concentrar la proteína 74 veces respecto a la solución inicial (Tabla 1).

TABLA 1

Concentración de FVIIIr mediante P-CAC

Posición de salida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Título [U/ml]	0	74	24	9	0,3	2,3	0,3	0	0

Los valores están normalizados respecto a la solución inicial = 0 U/ml

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la cromatografía anular continua (CAC), con una cabeza de columna estacionaria, un anillo colector de producto de elución estacionario, un cuerpo rotativo situado entre ambos y que puede girar alrededor de un eje vertical en forma de un cilindro doble que forma una camisa hueca con medio de separación cromatográfico contenido en él, así como con un accionamiento, en el que el cuerpo rotativo (1) está unido, por su extremo inferior, con un plato giratorio (4) que dispone de canales (15) verticales pasantes y se desliza de forma obturante sobre el anillo colector de producto de elución (5) estacionario con cámaras (16), en el que el plato giratorio (4) presenta, en su cara inferior, una prolongación que se puede acoplar a un árbol motor (2) del accionamiento (8) mediante una conexión que se puede separar rápidamente, y **caracterizado** porque la cabeza de columna estacionaria, el cuerpo rotativo (1) con el plato giratorio (4) y el anillo colector de producto de elución (5) conectado a continuación están unidos en un módulo de CAC y se pueden retirar del árbol motor (2) como una unidad.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la prolongación del plato giratorio (4) está conformada en su extremo en forma de un manguito (32) en el que encaja un extremo del árbol motor (2) formado de forma complementaria o, a la inversa, el árbol motor (2) presenta en su extremo un manguito en el que encaja una prolongación del plato giratorio (4) formada de forma complementaria.
3. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la cabeza de columna, el cuerpo rotativo (1) con el plato giratorio (4) y el anillo colector de producto de elución (5) están fijados entre una placa base (22) y una placa de cabeza (23), en el que la placa base (22) y la placa de cabeza (23) dado el caso se mantienen unidas mediante distanciadores (24) dispuestos de forma concéntrica alrededor del cuerpo rotativo (1).
4. Dispositivo según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la cabeza de columna presenta al menos un tubo de alimentación de líquido (27) y preferentemente está integrada en la placa de cabeza (23) o unida a ella en forma de una sola pieza.
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el plato giratorio (4) descansa sobre un cojinete (25) axial circunferencial soportado por los distanciadores (24) y se desliza sobre él preferentemente mediante un anillo en O horizontal.
6. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en la cara inferior del anillo colector de producto de elución está dispuesto de forma adyacente un bloque de presión (7) que presiona el anillo colector de producto de elución (5) contra el plato giratorio (4).
7. Dispositivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el bloque de presión (7) presenta, en una zona periférica (7a), en una entalladura circunferencial abierta hacia abajo, un resorte helicoidal (6) que funciona como resorte de compresión y que se eleva concéntricamente alrededor del eje del árbol motor (2) y está contrasoportado por la placa base (22) dispuesta inmediatamente debajo.
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el plato giratorio (4) descansa sobre dos superficies de deslizamiento concéntricas en el anillo colector de producto de elución (5) y porque el anillo colector de producto de elución (5) presenta, entre la superficie de deslizamiento situada en el interior y su borde interior adyacente al árbol motor (2), una cavidad biselada hacia el exterior que, junto con el plato giratorio (4), forma un espacio hueco (20) desde cuyo punto más profundo sale al menos un taladro (21) que conduce hacia el exterior del anillo colector de producto de elución (5).
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el anillo colector de producto de elución (5) presenta una pluralidad de cámaras (16) separadas por paredes radiales, en el que el grosor de cada pared radial es inferior al diámetro de un canal (15) del plato giratorio (4).
10. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque a las cámaras (16) del anillo colector de producto de elución (5) están conectados unos tubos de evacuación de producto de elución (18), preferentemente en forma de tubos flexibles, que primero descienden y después se curvan hacia arriba en forma de ondulaciones en el sentido de una "S" horizontal, y a continuación se vuelven a curvar hacia abajo y desembocan dado el caso en recipientes colectores de producto de elución, en el que la parte más elevada del tubo de evacuación de producto de elución (18) se encuentra preferentemente por encima del nivel del anillo colector de producto de elución (5).
11. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el cilindro situado en el interior del cilindro doble del cuerpo rotativo (1) está unido, por su extremo inferior, de forma fija a un zócalo inferior (11) que a su vez descansa sobre el plato giratorio (4) y está unido a éste de forma no desplazable mediante al menos un elemento de conexión, por ejemplo un perno, una espiga o un tornillo (12).
12. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque dispone de una pluralidad de túbulo alargadores dispuestos en el espacio superior del medio de separación, que penetran en la ranura anular de la camisa hueca cilíndrica del cuerpo rotativo (1) y están unidos con entradas para tubos de alimentación de líquido (27a, 27c) y están dispuestos dado el caso a lo largo del contorno de la ranura anular, por encima del medio de separación, de forma que se puedan desplazar en sentido anular y fijar en las posiciones angulares deseadas.

ES 2 267 426 T3

13. Dispositivo según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque presenta medios para el acondicionamiento térmico y/o la termostatación, en particular un circuito de calefacción y/o de refrigeración dispuesto dentro y/o fuera del cuerpo rotativo (1).

5 14. Procedimiento para la purificación, separación y/o concentración de sustancias por cromatografía líquida usando un dispositivo para la cromatografía anular continua (CAC) según una de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque como material de muestra se aplica una solución que contiene las sustancias distribuida uniformemente por todo el contorno de un medio de separación cromatográfico que se encuentra en una camisa hueca cilíndrica de un cuerpo rotativo, con la condición de que los líquidos para eluir las sustancias y acondicionar el medio de separación
10 se apliquen sobre el medio de separación de forma puntual en posiciones angulares predeterminadas y se obstaculice o evite en la zona de estas posiciones la entrada de material de muestra en el medio de separación.

15 15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el material de muestra se alimenta a través de una entrada central situada en una zona superior del dispositivo de CAC que se encuentra por encima del medio de separación y porque preferentemente se anega toda la zona superior con el material de muestra.

20 16. Procedimiento según la reivindicación 14 ó 15, **caracterizado** porque los líquidos de elución y/o de acondicionamiento se aplican desde posiciones angulares dispuestas por encima del medio de separación y que se eligen de tal manera, que entre ellas no pueda entrar ningún material de muestra en el medio de separación.

25 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque el material de muestra contiene sustancias orgánicas, en particular proteínas o mezclas de proteínas naturales o recombinantes, y porque preferentemente se emplea al menos un líquido de acondicionamiento para la higienización del medio de separación.

30 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 17, **caracterizado** porque el material de muestra contiene el factor VIII humano recombinante y porque con el procedimiento se efectúa un enriquecimiento del FVIIIr varias veces respecto a la concentración inicial.

30

35

40

45

50

55

60

65





