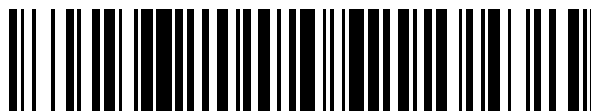


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 876**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/16** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010 E 10751950 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2475678**

54 Título: **Método y sistema para purificación de polipéptidos**

30 Prioridad:

**10.09.2009 EP 09169911**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.01.2015**

73 Titular/es:

**LONZA BIOLOGICS PLC. (100.0%)  
228-230 Bath Road  
Slough SL1 4DX, GB**

72 Inventor/es:

**WHICKMAN, MARK R. y  
MANSOOR, SAM**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 526 876 T3**

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**

Método y sistema para purificación de polipéptidos

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método y sistema automatizado para la purificación de polipéptidos. En particular, la presente invención se refiere a un método basado en cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y a un sistema automatizado respectivo útil para la purificación de polipéptidos a partir de mezclas complejas.

10

**Antecedentes de la invención**

La cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) es una forma de cromatografía líquida que se usa ampliamente, tanto a nivel académico como industrial, para separar y/o purificar grandes cantidades de diversas biomoléculas tales como proteínas y ADN de mezclas complejas. En la FPLC una mezcla que contiene componentes solubles, incluyendo la biomolécula de interés, se separa haciéndola pasar a través de una fase estacionaria con ayuda de un flujo líquido, separándose así los componentes individuales de la mezcla. Dependiendo del método de elución usado, los componentes contenidos en la mezcla migran con diferentes velocidades a través de la fase estacionaria o quedan retenidos por interacción con un ligando específico con la fase estacionaria, separándose de esta manera unos de otros.

15

20

Debido a su diseño simple, se desarrollaron sistemas de FPLC automatizada. Los sistemas basados en FPLC automatizada los fabrican, entre otros, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido, y se comercializan con el nombre comercial ÄKTA™.

25

Kanini et al. (es decir, Journal of Membrane Science 315 (2008) 1 - 10) se refiere al ensuciamiento reversible e irreversible de la membrana durante la microfiltración en línea de soluciones de proteínas concentradas. Este documento no se pronuncia sobre la esterilización de un flujo por filtración a vacío, en particular filtración a vacío estéril en línea realizada directamente después del módulo de cromatografía FPLC.

30

Aunque esto simplifica la purificación de las biomoléculas, los ciclos de purificación solo se pueden configurar para ejecutarlos en los sistemas basados en FPLC actuales, donde el flujo pasante o eluato producido que contiene la biomolécula de interés puede recogerse en un corto tiempo una vez que ha salido del sistema. Cuando el flujo pasante o eluato producido no se recoge rápidamente y, por tanto, se deja expuesto durante un periodo más largo, el riesgo de deterioro aumenta. Una vez deteriorado el flujo pasante o eluato la biomolécula contenida ya no es de utilidad y debe desecharse o, como alternativa, descontaminarse extensivamente, lo que consume tiempo y es costoso. De esta manera, debe evitarse el deterioro del flujo pasante o eluato. Evitar el deterioro del flujo pasante o eluato actualmente requiere la asistencia del personal operativo en el momento en el que el flujo pasante o eluato sale del sistema lo que aumenta, en particular para ciclos de larga duración, la cantidad de horas-hombre adicionales sin aumento de la productividad. En consecuencia, la ejecución de los ciclos de purificación se ajusta de manera que el tiempo durante el cual el flujo pasante o eluato sale del sistema esté dentro de las horas de trabajo normales del personal operativo, lo que a su vez restringe el tiempo y el número de ciclos de purificación que se pueden ejecutar.

35

40

**45 Breve descripción de la invención**

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio para superar ciertas desventajas de los sistemas basados en FPLC actuales. En particular, es un objetivo proporcionar un método y sistema con flexibilidad y/o productividad mejoradas.

50

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se consigue mediante la materia objeto de los siguientes puntos 1 a 14:

55

1. Un método basado en cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) para purificar un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

60

- a) aplicar una solución líquida que contiene el polipéptido a un medio cromatográfico que contiene una fase estacionaria;
- b) separar el polipéptido de otras moléculas contenidas en la solución líquida haciendo pasar la solución líquida a través de la fase estacionaria del medio cromatográfico;
- c) recuperar el polipéptido del medio cromatográfico en un flujo pasante y/o eluato;
- d) esterilizar el flujo pasante o eluato que contiene el polipéptido recuperado por filtración al vacío;

65

en el que dicha filtración estéril es una filtración estéril en línea que se realiza directamente después de la cromatografía.

2. El método de acuerdo con el punto 1, en el que en la etapa b) el polipéptido interactúa con y queda retenido por la fase estacionaria; y en la etapa c) el polipéptido se recupera por elución.
3. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 2, en el que una o más de las etapas a) a d) se controlan automáticamente.
4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que la fase estacionaria es un biopolímero, polímero inorgánico o polímero sintético, cada uno de los cuales puede tener opcionalmente grupos funcionales acoplados al mismo, o es una membrana o un monolito.
5. Un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) configurado para purificar un polipéptido de acuerdo con el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, que comprende i) un módulo de cromatografía; y ii) un módulo de filtración dispuesto después del módulo de cromatografía, en el que el módulo de filtración comprende al menos un medio de filtración para filtración estéril de un flujo pasante o un eluato que contiene el polipéptido recuperado del módulo de cromatografía, y un medio de control para controlar la filtración estéril mediante al menos un medio de filtración, y en que la filtración estéril se realiza aplicando un vacío y en el que dicha filtración estéril es filtración estéril en línea que se realiza directamente después de la cromatografía.
6. El sistema de acuerdo con el punto 5, en el que el módulo de filtración comprende más de un medio de filtración para filtración estéril de un flujo pasante o un eluato que contiene el polipéptido recuperado del módulo de cromatografía y, para cada medio de filtración, un medio de control conectado funcionalmente para controlar la filtración estéril por el medio de filtración.
7. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5-6, en el que el medio de control comprende al menos un relé accionado eléctricamente, que comprende opcionalmente un terminal de entrada y un terminal de salida para controlar mediante un medio de cálculo y al menos una válvula electromecánica, ambos conectados funcionalmente.
8. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5-7, en el que cada medio de control comprende un relé accionado eléctricamente y una válvula electromecánica, ambos conectados funcionalmente.
9. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5-8, en el que el medio de control comprende un terminal de entrada y un terminal de salida para controlar mediante un medio de cálculo.
10. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8-9, en el que la válvula electromecánica se usa para controlar la distribución de suministro de vacío al medio de filtración.
11. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8-10, en el que la válvula electromecánica se controla mediante el relé accionado eléctricamente.
12. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8-11, en el que la válvula electromecánica es una válvula de solenoide.
13. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5-12, en el que el medio de filtración es una copa filtrante.
14. El sistema de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5-13, en el que la filtración comprende cuatro filtraciones y cuatro medios de control.
- 50 Esterilizar directamente el flujo pasante o eluato una vez que ha salido del medio cromatográfico, tal como una columna de purificación, permite que este y la biomolécula contenida en su interior se almacenen de forma segura durante un periodo más largo sin riesgo de deterioro (es decir, usando filtración estéril en línea realizada directamente después de la cromatografía). De esta manera, la solicitud se dirige preferentemente a un dispositivo que comprende un módulo de cromatografía y, posteriormente, un número de medios de filtración paralelos (es decir, "más de 1"). La ventaja de tal dispositivo es que el eluato formado después de pasar el módulo de cromatografía pasará a través de un número de medios de filtración paralelos, lo que permite filtrar un volumen mucho mayor de líquido en un tiempo dado (en comparación con los dispositivos donde un medio de cromatografía se conecta a un único medio de filtración). Debido a la filtración mucho más rápida obtenida de esta manera el riesgo de deterioro de las proteínas a purificar se reduce en gran medida.
- 60 De esta manera, el presente método y sistema permite aumentar la flexibilidad en el tiempo de ejecución de los ciclos. Puede reducirse tanto el tiempo transcurrido como las horas-hombre, permitiendo un ciclo durante la noche no atendido, aumentando de esa manera la productividad del sistema. Además, usar filtración al vacío no altera la dinámica del sistema como lo haría añadir un filtro en línea accionado por presión. Esto permite una capacidad de producción más rápida cuando el límite de presión del sistema es un aspecto a tener en cuenta.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una presentación esquemática de un medio de control de la presente invención que comprende un relé EUL accionado eléctricamente y una válvula de solenoide de gas.

La Figura 2 es una presentación esquemática de otro medio de control de la presente invención que comprende una serie de cuatro relés EUL accionados eléctricamente y cuatro válvulas de solenoide de gas.

**Definiciones**

A menos que se especifique de otra manera en este documento, los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a compuestos formados a partir de al menos dos aminoácidos. El "polipéptido" o "proteína" puede tener actividad catalítica o de unión. El "polipéptido" o "proteína" puede ser, por ejemplo, una enzima o un anticuerpo tal como un dominio o un anticuerpo de dominio único. Para el fin de la presente invención, ambos términos pueden usarse de forma indistinta.

A menos que se especifique de otra manera en este documento, el término "aminoácido" abarca cualquier compuesto orgánico que comprenda al menos un grupo amino y al menos un grupo ácido. El aminoácido puede ser un compuesto de origen natural o puede ser de origen sintético. Preferentemente, el aminoácido contiene al menos un grupo amino primario y/o un grupo ácido carboxílico. El término "aminoácido" se refiere también a residuos contenidos en moléculas más grandes, tales como péptidos y proteínas, que se derivan de tales compuestos de aminoácido, y que están unidos a los residuos adyacentes mediante enlaces peptídicos o enlaces péptidomiméticos.

A menos que se especifique de otra manera, la expresión "fase estacionaria" se refiere a un material sólido que interactúa con las sustancias en una solución líquida.

A menos que se especifique de otra manera en este documento, el término "eluato" se refiere a un líquido que sale de un medio cromatográfico y que ha retirado o disuelto de la fase estacionaria las sustancias retenidas por una fase estacionaria.

A menos que se especifique de otra manera en este documento, el término "flujo pasante" se refiere a un líquido que pasa a través de y sale de un medio cromatográfico sin retirar o disolver de la fase estacionaria las sustancias retenidas por una fase estacionaria.

A menos que se especifique de otra manera en este documento, las expresiones "filtrar de forma estéril" y "filtración estéril" se refiere a la eliminación de contaminantes tales como microorganismos (por ejemplo bacterias, hongos, etc.) del flujo pasante o eluato. Durante el proceso de filtración, los contaminantes quedan retenidos por el filtro, separando de esa manera los contaminantes de los otros componentes contenidos en el flujo pasante o eluato.

**Descripción detallada de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona un método basado en FPLC para purificar un polipéptido. El método comprende las siguientes etapas:

- a) aplicar una solución líquida que contiene el polipéptido a un medio cromatográfico que contiene una fase estacionaria;
- b) separar el polipéptido de otras moléculas contenidas en la solución líquida haciendo pasar la solución líquida a través de la fase estacionaria del medio cromatográfico;
- c) recuperar el polipéptido del medio cromatográfico en un flujo pasante o un eluato; y
- d) esterilizar el flujo pasante o eluato que contiene el polipéptido recuperado por filtración.

El medio cromatográfico, como se usa en la presente invención, es un medio empleado normalmente en cromatografía en columna, cromatografía de membrana o cromatografía de monolito para purificar polipéptidos y proteínas. Tales medios se conocen bien en la técnica.

En algunas realizaciones, el medio cromatográfico es una columna de purificación. La columna de purificación, como se usa en esta realización, es un tubo de tamaño y diámetro interno variables que contiene una fase estacionaria. Generalmente, el tamaño y el diámetro interno del tubo varía de 1 cm a 30 cm y de 0,1 a 5 cm, respectivamente. Sin embargo, el tamaño del tubo puede ser de hasta 2 m. El tubo puede estar fabricado de vidrio o metal, tal como acero inoxidable. La columna de purificación puede seleccionarse a partir de columnas de purificación disponibles en el mercado tales como, aunque sin limitación, columnas Tricorn™, columnas MiniBeads™, columnas RESOURCE™, columnas HiTrap™, columnas HiLoad™, columnas HiPrep™, columnas Superdex™ y columnas Superose™. Como alternativa, la columna de purificación puede prepararse en un laboratorio cargando una fase estacionaria de elección en un cuerpo de columna vacío. Los ejemplos de cuerpos de columna disponibles en el mercado son la serie GE Healthcare XK y la serie Millipore Vantage.

La fase estacionaria es un material de relleno sólido y puede ser un biopolímero o un polímero sintético o un polímero inorgánico. El biopolímero puede seleccionarse entre celulosa, dextrano o agarosa. El polímero sintético puede seleccionarse entre poliacrilamida, metacrilato o polibenzeno/poliestireno. El polímero inorgánico puede ser sílice, hidroxiapatita o perlas de vidrio poroso. Cuando sea apropiado el material de relleno puede tener adicionalmente acoplado al mismo grupos funcionales que permiten la interacción específica con el polipéptido. Tales grupos funcionales pueden ser, hidroxipropil dietil aminoetilo cuaternario (QAE), trimetil aminoetilo cuaternario (Q), dietil aminoetilo (DEAE), carboximetilo (CM), sulfometilo (S), sulfopropilo (SP). El grupo funcional puede ser también un grupo específico o ligando mono-específico, tal como una pareja de unión específica para el polipéptido de interés, por ejemplo un antígeno en el caso de un anticuerpo, o viceversa.

En otras realizaciones, el medio cromatográfico es una carcasa o columna que contiene una membrana como la fase estacionaria. La columna puede ser un tubo como se ha descrito anteriormente.

Las membranas para su uso en cromatografía se conocen bien en la técnica. La membrana puede estar compuesta de una o más capas, por ejemplo dos, tres o cuatro capas. El material de matriz de la membrana puede ser celulosa, celulosa modificada, celulosa reticulada, nitrocelulosa, poliamida tal como nylon, cloruro de polivinilo (PVC) o fluoruro de polivinilideno (PVDF).

En otras realizaciones, el medio cromatográfico es una carcasa o columna que contiene un monolito como la fase estacionaria. La columna puede ser un tubo como se ha descrito anteriormente.

Los monolitos para su uso en cromatografía se conocen bien en la técnica.

En ciertas realizaciones, la filtración en la etapa d) es filtración al vacío.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema automatizado para métodos basados en FPLC. En particular la invención proporciona un sistema de FPLC automatizado configurado para purificar un polipéptido de acuerdo el método detallado anteriormente. El sistema de la invención comprende un módulo de cromatografía y un módulo de filtración. El módulo de filtración está dispuesto después del módulo de cromatografía.

El módulo de cromatografía del sistema inventivo comprende un medio cromatográfico, una bomba, un sistema de detección y una unidad de control. Además, el módulo de cromatografía de la invención puede comprender un tomamuestras automático y/o un colector de fracciones. Como un módulo de cromatografía en la presente invención puede usarse un dispositivo de FPLC ÄKTA™ fabricado y proporcionado por GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido.

El medio cromatográfico es como se ha descrito anteriormente.

La bomba permite un flujo constante de líquido a través del sistema. La columna del módulo de cromatografía puede comprender más de una bomba, por ejemplo dos, tres o cuatro bombas. La bomba puede ser una bomba peristáltica. La bomba puede ser también un diafragma, un pistón controlado o bomba lobular. El caudal de la bomba puede variar de 0,001 a 100 ml/min.

El sistema de detección permite la detección de la molécula o moléculas que salen del medio cromatográfico. El sistema de detección puede ser un espectrofotómetro de UV. Como alternativa, el sistema de detección puede ser también una célula de flujo de conductividad o un electrodo de pH.

La unidad de control permite un control automatizado de cada componente del sistema. La unidad de control puede ser un medio de cálculo que ejecuta un programa informático que controla cada componente del sistema. El medio de cálculo puede ser un ordenador personal que tiene cargado en su interior el programa informático que se ejecuta por el procesador del ordenador. El medio de cálculo puede ser también una red de cliente ligero. El programa informático puede ser el software de control UNICORN™ disponible en GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido. El software de control UNICORN™ es el preferido para la presente invención.

El módulo de filtración del sistema inventivo comprende al menos un medio de filtración para la filtración estéril de un flujo pasante o un eluato recuperado del módulo de cromatografía y un medio de control para controlar la filtración estéril mediante al menos un medio de filtración. El módulo de filtración puede comprender más de un medio de filtración y/o más de un medio de control, por ejemplo, aunque sin limitación, dos, tres o cuatro medios de filtración y/o dos, tres o cuatro medios de control.

El medio de filtración permite que el flujo pasante o eluato se filtre de forma estéril, es decir, los contaminantes tales como microorganismos se eliminan del flujo pasante o eluato. El medio de filtración es un dispositivo que contiene un filtro. En una realización de la invención, el medio de filtración es una copa filtrante, denominada también filtro superior de frasco accionado por vacío. Las copas filtrantes se conocen bien en la técnica. Usar una copa filtrante permite que el flujo pasante o eluato se recoja directamente y posteriormente se filtre de forma estéril sin necesidad de transferencia. El tamaño de poro del filtro puede estar en el intervalo de 0,45 a 0,1 µm, por ejemplo, aunque sin

limitación, 0,45 µm, 0,22 µm o 0,1 µm. En general, se espera que un tamaño de poro en el intervalo de 0,45 a 0,1 µm retenga microorganismos tales como bacterias. En una realización particular, el tamaño de poro del filtro es 0,22 µm.

5 Como se ha detallado anteriormente, la filtración estéril puede accionarse mediante vacío. En este caso, se suministra un vacío al medio de filtración forzando el líquido y el aire a través del filtro mediante la aplicación de presión negativa. Esto se consigue suministrando vacío a través de una entrada de vacío en el medio de filtración localizada en el lado del filtro opuesto al lado que contiene el líquido a filtrar. El vacío se genera mediante una fuente de vacío que puede ser una bomba de vacío bajo demanda o una bomba de vacío por tubería. El medio de filtración y la fuente de vacío se conectan mediante una tubería de gas y/o una tubería de laboratorio de silicona.

10 El medio de control de la invención permite controlar la filtración estéril por el medio de filtración. El medio de control comprende al menos un relé accionado eléctricamente o un estado sólido equivalente, y al menos una válvula electromecánica, ambos de los cuales están conectados funcionalmente. El relé accionado eléctricamente y la válvula electromecánica están conectados funcionalmente mediante un circuito eléctrico. El circuito eléctrico puede estar compuesto de un relé detector de tensión de alta impedancia de entrada, con ajustes de histéresis.

15 El medio de control puede comprender más de un relé accionado eléctricamente y/o más de una válvula electromecánica, por ejemplo dos, tres o cuatro relés accionados eléctricamente y/o tres o cuatro válvulas electromecánicas. En ciertas realizaciones, el medio de control de la invención comprende una serie de cuatro relés.

20 El relé accionado eléctricamente puede ser un relé de bajo potencia. Este puede accionarse mediante una unidad de suministro de potencia CC de 24 V que puede estar instalada en el mismo recinto que el relé. En ciertas realizaciones, el relé se acciona mediante un suministro de potencia de 24 V CC.

25 El relé accionado eléctricamente se controla mediante una unidad de control. La unidad de control puede ser un medio de cálculo que ejecuta un programa informático que controla la interrupción del relé. Para control mediante un medio de cálculo, el relé accionado eléctricamente comprende un terminal de entrada y un terminal de salida que permite la conexión del relé al medio de cálculo. En ciertas realizaciones, el relé accionado eléctricamente se controla mediante la unidad de control del módulo de cromatografía descrito anteriormente.

30 En ciertas realizaciones, una o más válvulas electromecánicas son válvulas de solenoide. Las válvulas de solenoide son válvulas electromecánicas para su uso con un líquido o gas accionado haciendo pasar o deteniendo una corriente eléctrica a través de un solenoide, abriendo o cerrando de esta manera la válvula. El solenoide puede ser una bobina o alambre. En realizaciones particulares, la válvula de solenoide es una válvula de solenoide de gas.

35 En realizaciones particulares donde se realiza filtración a vacío, se usa una válvula de solenoide de gas para controlar la distribución de un suministro de vacío a un medio de filtración. En estas realizaciones, el solenoide de gas está dispuesto entre el medio de filtración y la fuente de vacío.

#### 40 Ejemplos

45 En la Figura 1 se da un ejemplo para la configuración del medio de control. El medio de control mostrado en la Figura 1 está constituido por un suministro de potencia CC de 24 V, un relé EUL y una válvula de solenoide de gas dentro de un único recinto. Los componentes están conectados mediante cableado eléctrico. Mediante los terminales E2 y M, el relé está conectado a la clavija 6 y la clavija 5 de un dispositivo purificador ÄKTA™, respectivamente. La válvula de solenoide de gas está conectada a los terminales 11 y 12 del relé EUL.

50 En la Figura 2 se da un ejemplo adicional para la configuración del medio de control. El medio de control mostrado en la Figura 2 está constituido por un suministro de potencia de CC de 24 V, cuatro relés EUL y cuatro válvulas de solenoide de gas dentro de un único recinto. Los componentes están conectados mediante cableado eléctrico. Cada uno de los relés está conectado a través de su terminal E2 a cualquiera de la clavija 6, la clavija 7, la clavija 8 o la clavija 9 de un dispositivo purificador ÄKTA™, mientras que está conectado a la clavija 5 del dispositivo purificador ÄKTA™ a través del terminal M. Cada una de las válvulas de solenoide de gas está conectada a los terminales 11 y 12 de uno de los relés EUL y, por lo tanto, está controlada independientemente por el dispositivo purificador ÄKTA™.

55 Las configuraciones anteriores permiten que el software de control UNICORN™ controle las válvulas de solenoide y, de esta manera, la distribución de un suministro de vacío.

60 Tanto el módulo de filtración descrito anteriormente como el medio de control abarcado en este documento representan aspectos adicionales de la presente invención. De acuerdo con estos aspectos, se proporciona un módulo de filtración y un medio de control mediante la presente invención que están configurados para y, de esta manera, se usan en un sistema basado en FPLC.

65

Aparato de control de vacío ÄKTA

5 El fin del aparato de control de vacío ÄKTA es proporcionar un método mediante el cual el eluato de la columna de un sistema ÄKTA puede esterilizarse sin afectar a las características de flujo del sistema de una manera que mantenga la calidad e integridad del producto. Esto permite que el sistema ÄKTA se utilice durante una mayor proporción del día puesto que se reducen los requisitos de intervención manual. Para demostrar este efecto, se proporciona una comparación del ensayo con y sin el aparato.

Ensayo sin el aparato

10 El científico ajusta el sistema al comienzo del día de trabajo. En este caso, un ciclo es de aproximadamente 8 horas. Después de aproximadamente 7 horas el científico retira la muestra eluida para su análisis o procesamiento adicional y se permite que el sistema complete su ciclo. Desde este momento en adelante hasta la siguiente mañana el sistema ÄKTA permanece parado.

15 Si se permitiera que el ÄKTA funcionara sin supervisión durante la noche podrían completarse tres ciclos. Sin embargo, la salida del primer ciclo se mantendría a temperatura ambiente (la temperatura de la sala) durante 16 horas y la salida del segundo ciclo se mantendría a temperatura ambiente durante 8 horas. El ÄKTA no es un sistema estéril y, por lo tanto, se introduciría la carga biológica del sistema o del aire del laboratorio. Las soluciones de alto contenido proteico fomentan el crecimiento microbacteriano que afectaría al deterioro de la muestra recogida, dando como resultado un impacto negativo sobre el análisis aguas abajo o el procesamiento adicional.

Ensayo con el aparato

25 El siguiente ejemplo se realizó usando el sistema purificador ÄKTA. El científico ajusta el sistema al comienzo del día de trabajo. Se proporcionan suficientes materiales para permitir que la máquina realice tres ciclos de aproximadamente 8 horas cada uno. Después de 7 horas el sistema ha recogido la salida del ciclo uno y lo esteriliza bajo el control del aparato. Después de quince horas el eluato del segundo ciclo se ha esterilizado análogamente, seguido del tercer ciclo después de 23 horas. El eluato del primer ciclo se mantiene durante 16 horas a temperatura ambiente pero no hay crecimiento microbiano puesto que cualquier microbio introducido es eliminado por el filtro de esterilización, análogamente para el segundo ciclo.

**Sumario**

35 Trabajar sin el aparato restringe el ÄKTA para producir material únicamente dentro del día de trabajo. Intentar hacer funcionar la máquina fuera del día de trabajo pone las muestras de producto generadas en riesgo de contaminación y daño por crecimiento microbiano.

40 El ensayo con el aparato permite alcanzar la utilización máxima del sistema de cromatografía automatizado sin riesgo de crecimiento microbiano.

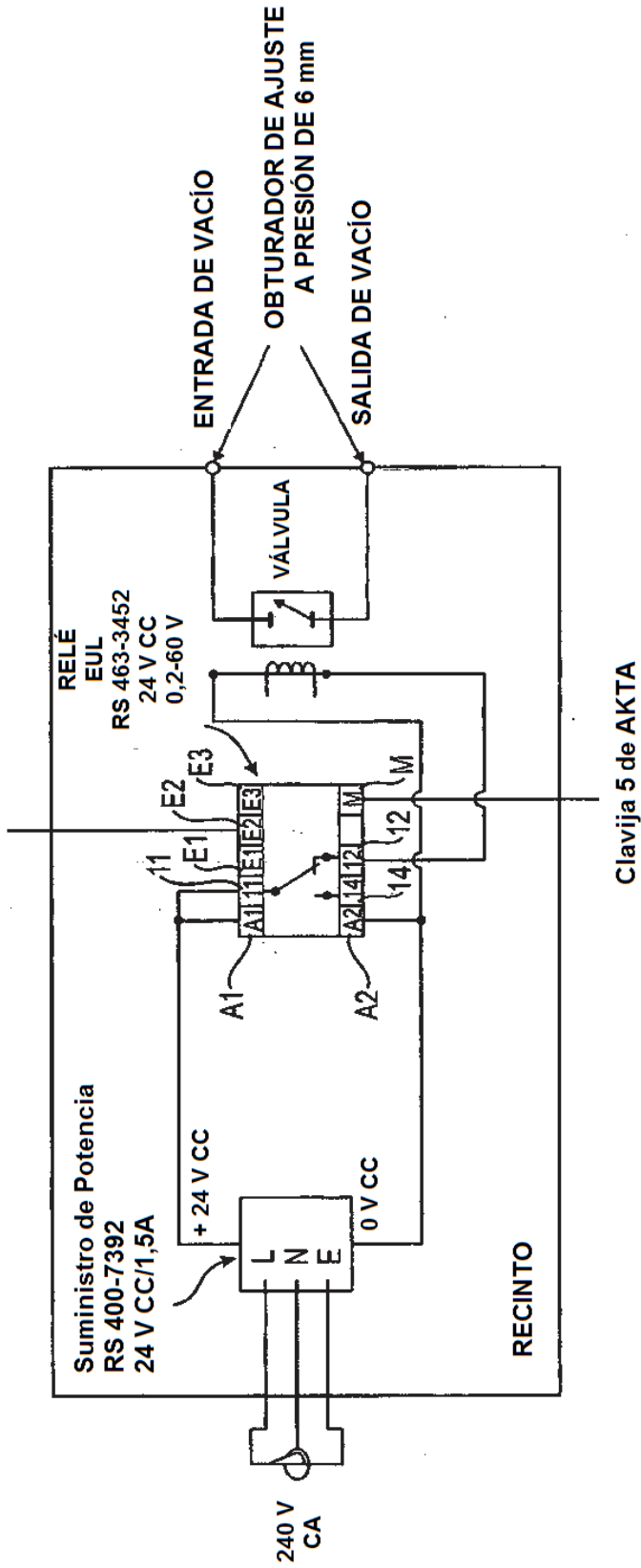
**REIVINDICACIONES**

1. Un método basado en cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) para purificar un polipéptido que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) aplicar una solución líquida que contiene el polipéptido a un medio cromatográfico que contiene una fase estacionaria;
- b) separar el polipéptido de otras moléculas contenidas en la solución líquida haciendo pasar la solución líquida a través de la fase estacionaria del medio cromatográfico;
- 10 c) recuperar el polipéptido del medio cromatográfico en un flujo pasante o un eluato; y
- d) esterilizar el flujo pasante o el eluato que contienen el polipéptido recuperado por filtración al vacío;
- en el que dicha filtración estéril es filtración estéril en línea que se realiza directamente después de la cromatografía.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa b) el polipéptido interactúa con y queda retenido por la fase estacionaria; y en la etapa c) el polipéptido se recupera por elución.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que una o más de las etapas a) a d) se controlan automáticamente.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la fase estacionaria es un biopolímero, un polímero inorgánico o un polímero sintético, cada uno de los cuales puede tener opcionalmente grupos funcionales acoplados al mismo, o es una membrana o monolito.
- 25 5. Un sistema automatizado de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) configurado para purificar un polipéptido de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende i) un módulo de cromatografía; y ii) un módulo de filtración dispuesto después del módulo de cromatografía, en donde el módulo de filtración comprende al menos un medio de filtración para filtración estéril de un flujo pasante o de un eluato que contiene el polipéptido recuperado del módulo de cromatografía y un medio de control para controlar la filtración estéril mediante al menos un medio de filtración, y en donde el medio de filtración se acciona aplicando un vacío, y en donde dicha filtración estéril es filtración estéril en línea que se realiza directamente después de la cromatografía.
- 30 6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el módulo de filtración comprende más de un medio de filtración para filtración estéril de un flujo pasante o de un eluato que contienen el polipéptido recuperado del módulo de cromatografía y, para cada medio de filtración, un medio de control conectado funcionalmente para controlar la filtración estéril mediante el medio de filtración.
- 35 7. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el medio de control comprende al menos un relé accionado eléctricamente, que opcionalmente comprende un terminal de entrada y un terminal de salida para control mediante un medio de cálculo, y al menos una válvula electromecánica, ambos conectados funcionalmente.
- 40 8. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que cada medio de control comprende un relé accionado eléctricamente y una válvula electromecánica, ambos conectados funcionalmente.
- 45 9. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que el medio de control comprende un terminal de entrada y un terminal de salida para control mediante un medio de cálculo.
- 50 10. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que la válvula electromecánica se usa para controlar la distribución del suministro de vacío al medio de filtración.
11. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que la válvula electromecánica se controla mediante el relé accionado eléctricamente.
- 55 12. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que la válvula electromecánica es una válvula de solenoide.
13. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en el que el medio de filtración es una copa filtrante.
- 60 14. El sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-13, en el que la filtración comprende cuatro filtraciones y cuatro medios de control.



Fig. 1

Clavija 6 de AKTA



**Fig. 2**

