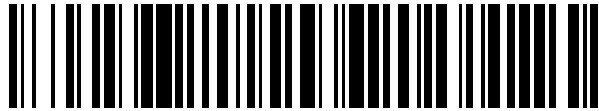


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 982**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/18** (2006.01)

**G01N 30/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2008 PCT/EP2008/053732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2008 WO08116935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08735566 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2139573**

54 Título: **Columna de lecho expandido y cromatografía desechable**

30 Prioridad:

**28.03.2007 US 908564 P**

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

**15.06.2017**

73 Titular/es:

**PATHEON HOLDINGS I B.V. (100.0%)  
Herengracht 540  
1017CG Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**LIHME, ALLAN;  
HOLTE, RENÉ, OEHLENSCHLÄGER;  
JENSEN, KURT, HAUGE y  
CHRISTENSEN, TONY**

74 Agente/Representante:

**CAMPello ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 616 982 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

Columna de lecho expandido y cromatografía desechable.

- 5 La presente invención se refiere a sistemas de adsorción y lecho expandido (EBA). Tiene relevancia particular, pero no exclusiva con respecto a columnas de cromatografía de lecho expandido desechables.

La purificación de los caldos de fermentación con el fin de extraer productos biofarmacéuticos de los mismos es un campo en desarrollo. En particular, la purificación de anticuerpos monoclonales es de importancia creciente debido a  
10 su investigación como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Los anticuerpos monoclonales se producen normalmente, por lo general en forma murina, humana o humanizada, de un caldo de fermentación de hibridoma o un caldo de fermentación microbiano. Tradicionalmente, el caldo se purificará por un proceso de precipitación reversible selectivo que tenía como objetivo precipitar las  
15 inmunoglobulinas deseadas, dejando otras proteínas en solución. Sin embargo, este proceso lleva tiempo, produce anticuerpos de baja pureza, y crea un problema sobre la eliminación del sobrenadante que contiene las proteínas y agentes de precipitación no deseados. Como resultado, se ha desarrollado el uso de la cromatografía para purificar el caldo de fermentación.

20 La cromatografía requiere el uso de una fase móvil y una fase estacionaria mutuamente inmiscibles, cada una con diferentes afinidades para los componentes de la mezcla a separar. La afinidad relativa de cada componente de la mezcla a purificar para las dos fases determina la tasa de migración de ese componente a través de la fase estacionaria en la dirección de flujo de la fase móvil. La selección cuidadosa de las fases móvil y estacionaria puede permitir la separación de los componentes en la mezcla, asegurando que las tasas de migración de los componentes  
25 son suficientemente diferentes para permitir que cada componente de interés se eluya por separado de la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser una matriz de soporte a la que puede unirse un ligando que lleva grupos funcionales capaces de unirse al componente o componentes de interés. Hay dos métodos generales amplios de realización de la cromatografía: usando un lecho relleno de la fase estacionaria a través del cual la fase móvil se fuerza por el uso de la presión aplicada; o adsorción en lecho expandido, en el que la presión aplicada a la  
30 fase móvil es al menos mucho más reducida y la densidad de la fase estacionaria se selecciona para crear un lecho fluidizado estable en un cierto rango de caudal de la fase móvil.

Para el aislamiento de anticuerpos monoclonales, el método más ampliamente utilizado de cromatografía es la cromatografía de afinidad de Proteína A. Esto puede usarse junto con la cromatografía de interacción hidrófoba  
35 (HIC) que requiere la adición de una sal liotrópica al caldo de fermentación con el fin de que la matriz hidrófoba (fase estacionaria) se una el anticuerpo de manera eficiente, seguido del uso de una concentración decreciente de una solución de sal liotrópica con el fin de eluir el anticuerpo de la fase sólida. El uso de la sal liotrópica causa problemas sobre la eliminación de los productos de desecho, especialmente dado que la presencia de la sal puede impedir el uso de la materia prima agotada de anticuerpos. Como alternativa, o adicionalmente, puede usarse cromatografía de  
40 intercambio iónico como una etapa de purificación adicional.

La cromatografía de Proteína A puede realizarse en las columnas de Sepharosa de Proteína A de lecho relleno. La fase estacionaria de estas columnas es reutilizable hasta veinte o más veces, y debe limpiarse con una solución de hidróxido de sodio seguido de la verificación de la limpieza de la columna antes de volver a usarla. Esto consume  
45 tiempo y requiere un tiempo de inactividad significativo del aparato de purificación. Además, la proteína A es inestable a valores de pH por encima de pH 12 y cada ciclo de limpieza utilizando hidróxido de sodio, por lo tanto, reduce el tiempo de vida útil del adsorbente. El método de lecho relleno de elución requiere que el aparato que contiene la columna sea capaz de resistir la presión de retorno aplicada para crear el flujo requerido de la fase móvil a través de la columna. Esto generalmente requiere una instalación permanente para contener la fase estacionaria.  
50 Las columnas son típicamente de acero inoxidable o de vidrio de alta resistencia, elegido para la fuerza y la resistencia a las condiciones requeridas para la limpieza repetida de la fase estacionaria y la columna. Estas columnas no se desechan, pero se reutilizan muchas veces. Las partículas, tales como las células y los restos de células, en la mezcla a purificar deben eliminarse de la mezcla antes de la introducción a la columna para evitar la obstrucción de la fase estacionaria. Los procedimientos de aclaración, tales como la filtración y la centrifugación son  
55 caros, consumen mucho tiempo y conducen a una pérdida significativa de producto. Además, el propio ligando de la Proteína A es costoso.

Por lo tanto, se han hecho esfuerzos para proporcionar un método más barato y más eficiente de purificación de anticuerpos y de caldos de fermentación en general.  
60

Se han propuesto fases estacionarias alternativas a la fase estacionaria de la Proteína A. MBI Hypercel® es un adsorbente disponible en el mercado que comprende ligandos de ácido mercapto-bencimidazol-sulfónico indicados para proporcionar tanto interacciones hidrófobas como interacciones iónicas con los anticuerpos. El documento

US6.498.236 describe un método de purificación de anticuerpos utilizando ligandos de la fórmula M-SP1-X-A-SP2-ácido, en la que: M = estructura de la matriz; SP1 = espaciador; X = O, S, o NH; A = un resto mono o bicíclico opcionalmente sustituido aromático o heteroaromático; SP2 = espaciador opcional; Ácido = un grupo ácido. El documento WO97/10887 desvela ligandos hidrófobos de mayor selectividad para materiales proteínicos, en los que la estructura del ligando comprende una entidad heteroaromática siendo al menos un átomo de formación de anillo nitrógeno. El documento WO03/024588 desvela un ligando multimodal capaz tanto de una interacción hidrófoba como iónica.

Se ha desvelado el uso de la adsorción en lecho expandido en el lugar de las columnas de lecho relleno usadas comúnmente. La adsorción en lecho expandido se puede realizar usando un flujo ascendente de la fase móvil a través de la fase estacionaria, en cuyo caso se requiere que la fase estacionaria sea más densa que la fase móvil con el fin de formar un lecho fluidizado estable, o un flujo descendente de la fase móvil, en cuyo caso la fase estacionaria debe ser menos densa que la fase móvil para la formación de un lecho fluidizado estable. La fase estacionaria debe adsorber el compuesto o compuestos de interés de la mezcla, permitiendo que los compuestos no deseados se enjuaguen usando una fase móvil que tiene una baja afinidad para el compuesto o compuestos de interés, y después el compuesto o compuestos de interés pueden eluirse en la columna usando un eluyente que tiene una alta afinidad por aquel o aquellos compuestos. La elución puede tener lugar usando un lecho fluidizado o puede tener lugar en el modo de lecho relleno mediante la aplicación de presión al eluyente. El flujo máximo de la fase móvil a través de una fase estacionaria de lecho expandido se determina por la densidad y el diámetro de las partículas usadas a fin de que la fase estacionaria forme un lecho expandido estable. Las partículas del medio de fase estacionaria que tienen una densidad controlada y un diámetro para su uso en sistemas de adsorción en lecho expandido se pueden hacer utilizando un material compuesto poroso cuyo tamaño de poro, tamaño de partícula y densidad pueden seleccionarse, y que se pueden revestir si se desea con un revestimiento que tiene afinidad para el compuesto que se va a purificar usando la fase estacionaria. Los ejemplos de dichos medios son la matriz Streamline de Pharmacia Biotech, Suecia, y la matriz UpFront de UpFront Chromatography A/S, Dinamarca, ambas de los cuales consisten en una o más partículas en el interior de una esfera de agarosa. El documento WO00/57982 desvela una fase estacionaria para su uso en la adsorción en lecho expandido en la que la densidad de las partículas es de al menos  $2,5 \text{ gml}^{-1}$ , y el diámetro de partícula medio es 5-75  $\mu\text{m}$ , y el núcleo de las partículas es un material no poroso que tiene una densidad de al menos  $3,0 \text{ gml}^{-1}$ . Los materiales de núcleo adecuados incluyen perlas de acero. El revestimiento del núcleo puede ser una matriz de base polimérica que lleva grupos que pueden cargarse o ligandos de afinidad.

La introducción de la mezcla a purificar y la fase móvil a la fase estacionaria de la columna al tiempo que permite la formación estable de un lecho fluidizado es un problema que se ha tratado en la técnica anterior. Se sabe que la formación de canales en la fase estacionaria debido a la introducción de la mezcla y/o la fase móvil provoca una reducción en la estabilidad de la expansión del lecho (debido a, por ejemplo, una retromezcla y una turbulencia no deseada), y disminuye la eficacia de la separación. Este problema aumenta con el diámetro de la columna a usar, y por lo tanto es particularmente agudo en columnas destinadas a la purificación a escala comercial. Los documentos WO99/65586 y WO01/85329 tratan de resolver este problema proporcionando un distribuidor giratorio, donde la mezcla y/o la fase móvil se introducen a la columna. En el documento WO01/85329, el distribuidor comprende una pluralidad de salidas a través de las cuales puede pasar el líquido para llegar a la columna. En el caso de una columna de flujo ascendente, el distribuidor se proporciona en la base de la columna, y las salidas se dirigen preferiblemente hacia la parte inferior de la columna (es decir, la dirección opuesta a la dirección del movimiento de la fase móvil) a fin de minimizar la turbulencia en la fase estacionaria resultante de las corrientes de líquido que entran en la columna. El distribuidor se gira suficientemente rápido para asegurar una distribución uniforme del líquido a través de la parte inferior de la columna, pero suficientemente lento para minimizar la "zona de agitación" que se forma en la fase estacionaria en la que no se puede lograr la expansión estable. Se muestra en los Ejemplos que el uso de un distribuidor no giratorio conduce a la formación de canales en la fase estacionaria, y por lo tanto, a un lecho expandido menos estable. En el documento WO99/65586, la distribución de fluido se consigue mediante el uso de agitación magnética de la fase estacionaria en la parte inferior de la columna. Una vez más, se prefiere reducir al mínimo la altura de la zona de agitación.

El problema de la obstrucción de partes de la columna por partículas y sustancias insolubles en la mezcla a purificar se ha abordado en la técnica anterior. En el documento WO2006/001867, se analiza el sistema desarrollado por Pharmacia y vendido bajo la marca Streamline. Se afirma que la inclusión de un tamiz que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 micrómetros entre la placa del distribuidor de flujo y el medio de fase estacionaria en la parte inferior de la columna impedirá que el medio en fase estacionaria pase a través del tamiz en la placa del distribuidor de flujo, mientras que permite el paso de las células y los restos celulares. La solicitud establece que tal disposición no impide la formación de grumos de las partículas que forman una capa viscosa conocida como una "torta" que bloquea los poros del tamiz de entrada. La solución a este problema propuesto por el documento WO2006/001867 es el uso de una entrada y salida en la parte inferior de la columna por debajo del tamiz de entrada de manera que el flujo de fluido pueda circular en una corriente que pasa a través de la parte inferior del tamiz de entrada para lavar la "torta". Como alternativa, se propone el uso de flujos pulsantes o vibración de la columna para

desalojar bloqueos del tamiz de entrada.

Como se ha indicado anteriormente, la necesidad de limpiar y verificar la limpieza de las columnas de proteína A utilizadas ampliamente tiene la desventaja de consumir mucho tiempo, lo que da como resultado un período de tiempo significativo durante el cual el aparato de purificación no se puede utilizar. El proceso general para la producción de anticuerpos implica una etapa de fermentación, que se puede realizar en un tanque de balanceo de un único uso, la aclaración mediante filtración en filtros de un solo uso, seguido de la etapa de cromatografía que captura el producto como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente una o varias etapas de pulido de cromatografía para eliminar las impurezas, seguido de filtración de membrana del producto purificado realizado usando membranas desechables. Por lo tanto, es evidente que la única fase de la operación no realizada utilizando un aparato desechable de un único uso es/son la etapa o etapas de cromatografía. El documento WO99/65586 desvela la conveniencia de proporcionar una versión desechable de las columnas descritas en el presente documento. Estas columnas incluyen las palas del agitador de accionamiento mecánico o unas barras de agitador magnético.

Los inventores se han dado cuenta de que el uso de una columna desechable permitiría el suministro de columnas estériles que podrían intercambiarse después de su uso con un tiempo de inactividad del sistema mínimo. Sin embargo, la forma habitual de conducir la fase móvil a través de la columna usando una sola bomba situada aguas arriba de la entrada crea una presión en el espacio vacío de la columna (es decir, el espacio en la columna por encima de la fase móvil y por debajo de la parte superior) que es necesario para conducir la fase móvil a través de la salida después de pasar por todo el medio de fase estacionaria, y por lo tanto, las columnas descritas en el documento WO99/65586 han de ser capaces de soportar de forma segura tal presión. Además de la presión creada para conducir la fase móvil a través de la salida, la columna necesita una presión clasificada con respecto a la presión máxima administrada por la bomba de entrada con el fin de prevenir cualquier bloqueo accidental de la salida (por ejemplo, una válvula cerrada), mientras que la bomba de entrada todavía está funcionando. Dichas columnas serán costosas de construir y pesadas de transportar, lo que las hace poco adaptadas para su uso desechable debido al alto coste para el usuario. Una salida de aire que no elimina la necesidad de clasificación de presión de la columna se desvela como una característica opcional de las columnas en el documento WO99/65586, y se utiliza: (a) para proporcionar una presión negativa en el espacio vacío mientras se establece un lecho expandido estable, a fin de que la fase estacionaria se deje expandir y la fase móvil no salga a través de la salida; y (b) para proporcionar una presión positiva al espacio vacío con el fin de ayudar a la fase móvil a salir a través de la salida durante la fase de adsorción después de la formación de un lecho expandido estable. Está claro, entonces, que las columnas en el documento WO99/65586 deben ser capaces de soportar las presiones negativas y positivas aplicadas al espacio vacío, incluso si se pretende que se usen para la elución de lecho expandido en vez de la elución de lecho relleno.

Los inventores se han dado cuenta que si un sistema de adsorción en lecho expandido que requiere una presión de retorno mínima se usa en la etapa de cromatografía, entonces no es necesaria la instalación de contención para equipos a presión, y la columna puede estar hecha de un material ligero, desechable que no necesita ser capaz de resistir presiones elevadas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar cromatografía de adsorción en lecho expandido de flujo ascendente de un líquido que comprende al menos un componente a separar del mismo, que comprende:

- (i) suministrar el líquido a través de una entrada (20) a un medio de fase estacionaria (2) contenida en una columna (10), dando como resultado la expansión del medio de fase estacionaria por debajo de un volumen variable de espacio vacío;
- (ii) permitir la adsorción del al menos un componente del líquido por el medio de fase estacionaria;
- (iii) retirar el líquido de la columna a través de una salida (14);
- (iv) regular la expansión del medio de fase estacionaria por la regulación del caudal del líquido a través de al menos la entrada; en el que

el caudal se mantiene por el uso de dos bombas, una bomba (20) aguas arriba de la entrada de la columna y una segunda bomba (24) aguas abajo de la salida de la columna, cada una controlada individualmente por un monitor (26), y en el que cualquier sobrepresión en el espacio vacío con respecto a la presión fuera de la columna se restringe para que no sea de más de dicha presión exterior más 10 kPa (0,1 bar).

Preferiblemente, la sobrepresión no es de más de 0,08 bar, más preferiblemente no más de 0,05 bar, tal como 0,01 bar, o 0,005 bar.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un aparato para usarse junto con el método del primer

aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una columna para su uso junto con el método del primer aspecto y/o el aparato del segundo aspecto. La columna de acuerdo con este aspecto comprende: una porción inferior que comprende una entrada para el paso del líquido hasta la columna; una superior

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una columna para su uso junto con el método del primer aspecto y/o el aparato del segundo aspecto. La columna de acuerdo con este aspecto comprende: una porción inferior que comprende una entrada para el paso del líquido hasta la columna; una porción superior que comprende una entrada para dicho líquido; y un medio de fase estacionaria contenido en la columna; en la que la porción superior de la columna comprende adicionalmente un orificio de ventilación que proporciona una conexión de fluido entre el interior y el exterior de la columna.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una columna para su uso en cromatografía de lecho expandido, que comprende: una porción inferior que comprende una entrada para el paso del líquido hasta la columna; una porción superior que comprende una entrada para dicho líquido; y un medio de fase estacionaria contenido en la columna; en la que la entrada no está adaptada para la agitación dirigida del medio de fase estacionaria.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un aparato para realizar una cromatografía de lecho expandido, que comprende la columna del cuarto aspecto de la invención. Dicho aparato comprende al menos una primera bomba aguas arriba de la entrada de la columna y una segunda bomba aguas abajo de la salida de la columna.

Las características preferidas indicadas a continuación pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención en los que sean apropiados, y pueden combinarse de cualquier manera apropiada.

Convenientemente, el orificio de ventilación puede comprender un filtro protector, adecuadamente un microfiltro, y dicho filtro puede impedir la entrada de contaminantes en la columna, y/o puede evitar que los microorganismos salgan o entren en la columna.

Preferiblemente, el orificio de ventilación es una abertura sencilla en la columna. Como alternativa, el orificio de ventilación puede ser una válvula de alivio de presión. Como alternativa, el orificio de ventilación puede comprender medios para mantener una presión en el espacio vacío que está por debajo de la presión fuera de la columna.

La salida puede estar en forma de una tubería. La tubería puede ser móvil de tal forma que un extremo aguas arriba de la tubería se puede colocar en una posición seleccionada dentro de la columna. Por ejemplo, puede ser preferible que el extremo aguas arriba de la tubería se sitúe por debajo del nivel de líquido de la fase móvil en la columna, pero por encima del nivel de la fase estacionaria. De forma adecuada, tal posicionamiento se puede conseguir mediante el uso de un soporte flotante cerca del extremo aguas arriba de la tubería, flotando este apoyo sobre la superficie de la fase móvil y manteniendo la posición del extremo aguas arriba de la tubería en o por debajo de la superficie de la fase móvil. Como alternativa, dicha posición puede conseguirse por medios mecánicos tales como actuadores eléctricos o neumáticos. Preferiblemente, se proporciona un actuador lineal eléctrico o neumático fuera de la columna con el fin de mover la tubería de salida hacia arriba o abajo a través de una abertura opcionalmente sellada con un anillo en la parte superior de la columna. Preferiblemente, la columna se suministra con la tubería de salida como una unidad integrada.

Como alternativa, la columna puede suministrarse en dos partes, una columna sellada y la tubería de salida, que después se ensamblan antes de su uso mediante la inserción de la tubería a través de una abertura sellada en la parte superior de la columna. En cualquier caso, la tubería de salida se conectará a continuación a la tubería de la bomba y, tras la utilización final de la columna, la columna y la tubería de salida se separarán del soporte de la columna, los actuadores y la bomba (ninguno de los cuales han estado en contacto con el producto) y se desecharán.

Adecuadamente, la columna puede estar dotada de la entrada, salida y, cuando se incluye un orificio de ventilación, el orificio de ventilación se sella. Esto es particularmente preferible cuando la columna se pre-rellena con un medio de fase estacionaria estéril, ya que la esterilidad del medio puede ser verificada por el fabricante y garantizarse al usuario. Los sellos de la entrada, la salida y el orificio de ventilación se rompen antes del uso de la columna. De forma adecuada, la entrada, la salida y el orificio de ventilación pueden volverse a sellar. Esta característica es particularmente preferible cuando la columna pretende desecharse. Por lo tanto, la columna sellada se proporciona conteniendo una fase estacionaria estéril, los sellos se rompen antes de su uso, y después del uso, la columna puede volver a sellarse antes de disponer de toda la unidad, incluyendo preferiblemente el medio de la fase estacionaria. Preferiblemente, la columna puede comprender una fase de suspensión, así como un medio de fase

estacionaria. Preferiblemente, dicha fase de suspensión comprende una sustancia que es capaz de inhibir la aglomeración del medio de la fase estacionaria durante el transporte y/o el almacenamiento de la columna antes de su uso. Esto tiene la ventaja de facilitar la formación de un lecho expandido cuando la columna se usa. Las sustancias adecuadas incluyen glicerol, sacarosa, dextrano, PEG, PVP, y detergentes (neutros, con carga negativa, con carga positiva, o zwitteriónicos). Dicha suspensión de fase puede contener una combinación de dos o más de las sustancias de inhibición de la aglomeración. De forma adecuada, la concentración de la sustancia en la fase de suspensión es de al menos el 1 %, preferiblemente el 5 %, preferiblemente al menos el 10 %, tal como al menos el 30% o al menos el 50 % para sustancias de bajo peso molecular; al menos el 0,1 % tal como al menos el 0,5 %, 1 %, 2%, 5 %, o el 10 % para los polímeros; y al menos el 0,01 % tal como al menos el 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, o el 5 % para los detergentes.

De forma adecuada, la entrada puede ser un tipo conocido de entrada adaptada para proporcionar agitación dirigida de la fase estacionaria. Sin embargo, las entradas no adaptadas para proporcionar la agitación dirigida pueden ser preferibles en ciertas circunstancias, en particular cuando la columna está destinada a un único uso y eliminación, ya que esto reduce al mínimo la complejidad y el coste de producción de la columna, y mejora sus características de manejo. Una columna que se proporcionará para un único uso ha de ser capaz de colocarse y conectarse a las líneas requeridas de la manera más sencilla posible. Además, la columna debe ser capaz de resistir el transporte sin limitaciones en la manipulación.

Se ha descubierto ahora que al usar un medio de fase estacionaria que tiene suficiente densidad no es necesario agitar el medio de fase estacionaria para evitar la formación de canales y la turbulencia en la fase estacionaria. Además, la provisión de un tamiz de entrada para soportar el medio de fase estacionaria es innecesaria, eliminando el problema de la obstrucción de tal tamiz. Tales simplificaciones en el aparato requerido para la cromatografía de adsorción en lecho expandido permiten que un aparato desechable se vuelva viable por las razones que se han dado anteriormente.

Por consiguiente, los inventores han ideado entradas que, sorprendentemente, proporcionan un lecho expandido estable sin el uso de agitación dirigida para distribuir la fase móvil de manera uniforme entre la fase estacionaria. Tales entradas se pueden utilizar junto con las columnas ventiladas del tercer aspecto de la invención y en el método y el aparato del primer y segundo aspectos de la invención. Sin embargo, se apreciará por el experto que tales entradas también se pueden usar en las columnas sin ventilación tales como las del cuarto aspecto de la invención, y en los métodos de cromatografía de lecho expandido usando columnas sin ventilación, tal como la del sexto aspecto de la invención.

Tal entrada puede formarse como una tubería de extremos abiertos. El extremo abierto de la tubería puede proporcionarse de tal manera que el flujo de líquido de la misma esté en cualquier dirección deseada, tal como horizontalmente, verticalmente hacia arriba o verticalmente hacia abajo. Preferiblemente, sin embargo, la entrada comprende un conducto de entrada que termina en un distribuidor de líquido que tiene al menos una abertura. Preferiblemente, la al menos una abertura se dirige horizontalmente o en una dirección inclinada hacia abajo, es decir hacia el extremo inferior de la columna en más de 0° por debajo de la horizontal. Más preferiblemente, la al menos una abertura está dirigida al menos 45° por debajo de la horizontal, tal como 90° por debajo de la horizontal. De forma adecuada, la al menos una abertura puede estar en forma de un orificio sustancialmente circular. Como alternativa, la abertura puede estar en forma de una ranura. Adecuadamente, al menos una capucha en forma de cúpula o cónica puede proporcionarse por encima de la entrada, que tiene su vértice dirigido hacia el extremo superior de la columna. Tal capucha puede rodear parcialmente la entrada. Adecuadamente, una superficie deflectora horizontal puede proporcionarse por encima o sustancialmente al mismo nivel que la entrada y tal superficie puede formar el fondo de dicha capucha.

Como alternativa, la entrada puede comprender al menos un tubo que comprende medios para crear un flujo divergente de líquido de la misma. Adecuadamente, dicho flujo divergente puede formar una distribución sustancialmente cónica de fluido, y dicha distribución cónica puede tener un semiángulo de al menos 45°, tal como 60°. De forma adecuada, la entrada puede comprender al menos una boquilla. De forma adecuada, el tubo puede comprender placas transversales e internas a las paredes del tubo, que puede disponerse para crear un flujo en espiral del líquido. Adecuadamente, dichas placas también pueden estar adaptadas para impedir el paso del medio de fase estacionaria a través de la entrada. Adecuadamente, tal tubo puede usarse junto con una columna cuyo extremo inferior interno forma una copa de radio decreciente hacia el extremo inferior de la columna. Tal forma se puede formar por moldeo de la columna a la forma interna requerida, o mediante la inserción de un inserto de forma apropiada en la parte inferior de la columna. En el caso de una entrada que comprende varios tubos, se prefiere que la superficie interna de la parte inferior de la columna se forme para proporcionar una copa de radio decreciente centrado en cada una de los tubos.

Como alternativa, la entrada puede comprender al menos un tubo que se extiende a través de la columna y que tiene al menos una abertura proporcionada en el mismo. De forma adecuada, la al menos una abertura puede estar

orientada horizontal o hacia abajo, tal como al menos 0° con respecto a la horizontal, por ejemplo, 45° con respecto a la horizontal, preferiblemente 90° con respecto a la horizontal. De forma adecuada, la al menos una abertura puede estar adaptada para proporcionar un flujo divergente de líquido desde la misma. Adecuadamente, la entrada comprende una cámara hueca central en conexión de fluido con el al menos un tubo.

5

Preferiblemente, el tamaño de la al menos una abertura es grande en comparación con la de las impurezas, por ejemplo, particulados e insolubles, contenidas en el fluido a tratar. Sin embargo, la al menos una abertura todavía debe ser lo suficientemente pequeña para proporcionar la distribución prevista de flujo a un caudal dado.

10 Preferiblemente, la al menos una abertura tendrá un tamaño mínimo de 0,05 mm, tal como al menos 0,1 mm y un tamaño máximo de 2 mm, tal como un máximo de 1 mm, o un máximo de 0,75 mm.

Preferiblemente, no hay flujo lateral de líquido a través de la base de la columna.

15 Preferiblemente, no hay ninguna placa de abertura prevista encima de la entrada.

Para que los dispositivos de distribución de flujo que se han mencionado anteriormente realicen la distribución prevista de flujo sin la formación de canales, se prefiere que el caudal lineal aplicado a la columna de EBA es de al menos 3 cm.min<sup>-1</sup>, tal como al menos 4 cm.min<sup>-1</sup>, tal como al menos 5 cm.min<sup>-1</sup> o 6, 7, 8, 9, o 10 cm.min<sup>-1</sup>.

20

De forma adecuada, el medio de fase estacionaria tiene una densidad de al menos 1,5 gml<sup>-1</sup>, tal como al menos 1,8 gml<sup>-1</sup>, por ejemplo 2,0 gml<sup>-1</sup>. Preferiblemente, particularmente, el medio de fase estacionaria tiene una densidad de entre 2,5 y 4,0 gml<sup>-1</sup>. Preferiblemente, el medio de fase estacionaria tiene un diámetro de partícula medio de 20 - 200 µm, más preferiblemente en el intervalo de 40-160 µm, incluso más preferiblemente en el intervalo de 60 - 120 µm, incluso más preferiblemente en el intervalo de 70 - 110 µm, incluso más preferiblemente en el intervalo de 80 - 100 µm.

25

Cuando la materia prima aplicada a la columna de lecho expandido es un caldo de fermentación en bruto que comprende una alta concentración de células enteras o restos de células, es particularmente ventajoso emplear un medio de fase estacionaria que tenga una alta densidad combinada con un tamaño medio de partícula que da como resultado una expansión aceptable del lecho durante la operación. Por lo tanto, se prefiere que cuando el material de partida comprenda más del 5 % vol/vol de células y/o restos celulares, tal como más del 10 % vol/vol, tal como más del 15 % vol/vol, tal como más del 20 % vol/vol, tal como más del 25 % vol/vol, la densidad del medio de fase estacionaria es de al menos 2,8 g/ml, tal como al menos 3,0 g/ml, tal como al menos 3,5 g/ml, tal como al menos 4,0 g/ml, tal como al menos 4,5 g/ml, y el tamaño de partícula medio está en el intervalo de 50-110 µm, tal como 60-100 µm, tal como 70-90 µm.

35

Preferiblemente, el medio de fase estacionaria comprende perlas o partículas de acero, o perlas o partículas de carburo de tungsteno.

40

El caudal, el tamaño de las partículas y la densidad de las partículas pueden tener todos influencia sobre la expansión del lecho fluido, y es importante controlar el grado de expansión de tal manera que se mantengan las partículas dentro de la columna. El grado de expansión se puede determinar como H/H<sub>0</sub>, donde H<sub>0</sub> es la altura del lecho en el modo de lecho relleno y H es la altura del lecho en modo expandido.

45

Preferiblemente, el grado de expansión H/H<sub>0</sub> durante el uso del medio de fase estacionaria está en el intervalo de 3,0 a 1,2, tal como de 2,5 a 1,3, de 2,2 a 1,4, o de 2,0 a 1,5. Preferiblemente, el valor máximo de H/H<sub>0</sub> es 3,0, o más preferiblemente 2,5, tal como máximo 2,2, 2,0, 1,8, o 1,6. Preferiblemente, el grado de expansión es de al menos 1,2, tal como al menos 1,3, tal como al menos 1,4, tal como al menos 1,5.

50

Preferiblemente, la presión máxima que la columna está adaptada a contener es 0,35 atm; tal como máximo 0,30 atm; 0,25 atm; 0,20 atm; 0,15 atm; 0,10 atm; 0,05 atm.

La columna EBA puede fabricarse preferiblemente de un material de plástico de bajo coste, preferiblemente un material de plástico transparente o semi-transparente. Preferiblemente, el material de plástico también cumple con los requisitos para un uso seguro en la producción de productos farmacéuticos con una fuga mínima de los compuestos tóxicos. Los ejemplos de materiales plásticos adecuados son polipropileno, polietileno, TPX (copolímero de metilpenteno), policarbonato, plexiglás y PVC. La columna puede producirse preferiblemente mediante moldeo por inyección o extrusión.

60

En algunas situaciones, puede preferirse hacer la columna EBA fuera del vidrio.

Adecuadamente, la columna EBA de acuerdo con el tercer o el cuarto aspecto de la invención puede suministrarse

conectada a dos bombas, una situada aguas arriba de la entrada y una situada aguas abajo de la salida.

La eficiencia de separación de las columnas cromatográficas se expresa a menudo en cuando al número de placas teóricas,  $N$  en una columna dada o normalizado como el número de placas teóricas por metro de lecho empaquetado,  $N/m$ . Cuanto mayor sea el número mejor será la eficiencia de separación cromatográfica que tiene la columna.

Para las columnas de lecho expandido, el número de placas teóricas puede determinarse por la prueba de distribución del tiempo de residencia (como se describe en el manual "Expanded Bed Adsorption", página 14-16, Edición AA, ISBN 91-630-5519-8, de Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), que es un método de estímulo trazador que puede usarse para evaluar el grado de mezcla axial longitudinal (dispersión) en el lecho expandido. Un alto número de placas teóricas indica un bajo grado de mezcla axial (o una turbulencia y canalización no deseadas) y, por lo tanto, un alto grado de eficiencia de separación. Como también se menciona en el manual, en general se acepta que se logra una separación eficaz si la columna de lecho expandido tiene un número de placas teóricas de  $N = 25-30$  o  $N/M = 170-200$  placas por metro de adsorbente sedimentado en el columna. Para algunas aplicaciones que implican una unión y liberación sencillas (captura y liberación), puede que no sea necesario tener tal elevada eficiencia de separación como se indica por el número  $N/m = 170-200$ , en cuyo caso puede ser suficiente emplear una columna que tenga un número de placas teóricas de 50-75  $N/m$ .

Para las columnas de lecho relleno, se descubre en general que el número de placas teóricas y, por lo tanto, la eficiencia de separación disminuye cuando el caudal se aumenta y esto también sería de esperar para las columnas de lecho expandido, cuando el caudal lineal se aproxima a la velocidad de sedimentación terminal de las perlas adsorbentes, o cuando la cinética de transferencia de masa se convierte en el factor limitante.

Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando se emplean las entradas de columna de acuerdo con la invención en columnas de lecho expandido que contienen perlas adsorbentes de densidad muy alta, el número de placas teóricas sigue siendo alto e incluso aumenta con un aumento en el caudal dentro de un intervalo muy amplio de caudales que son particularmente adecuados para la producción de proteínas y otras biomoléculas con una alta productividad.

Se ha descubierto ahora que la combinación específica de entradas de columna de acuerdo con el tamaño invención, la densidad de adsorbente y el tamaño de partículas y los altos caudales conducen a sistemas de lecho expandido muy atractivos que, a diferencia de las soluciones de la técnica anterior, logran varias tareas importantes al mismo tiempo. Especialmente, las características combinadas de la invención que incluyen la prevención de sobrepresión en la columna, permite la producción y el empleo de columnas de adsorción en lecho expandido que tienen un alto grado de eficiencia de separación (un alto número de placas teóricas) a altos caudales lineales (es decir, alta productividad por volumen unitario de adsorbente) en una columna sellable hecho de un material de bajo coste.

Por lo tanto, es particularmente preferiblemente emplear columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención que tienen un número de placas teóricas de al menos 25, tal como al menos 50, 75, 100, 125, 150 o 200, cuando se prueban a un caudal lineal de al menos 5 cm/min, tal como al menos 6 cm/min, 7, 8, 9, 10, o 15 cm/min.

Asimismo, es particularmente preferible emplear columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención que tienen un número de placas teóricas por metro de adsorbente sedimentado de al menos 50  $N/m$ , tal como al menos 75, 100, 125, 150, 175 o 200  $N/m$ , al probarse a un caudal lineal de al menos 5 cm/min, tal como al menos 6 cm/min, 7, 8, 9, 10, o 15 cm/min.

Preferiblemente, los métodos de acuerdo con la invención usan un medio de fase estacionaria con una densidad de al menos  $2,5 \text{ gml}^{-1}$ , por ejemplo, al menos  $3,0 \text{ gml}^{-1}$ , y un caudal de líquido a través de la entrada de al menos 5 cm/min, tal como al menos 7,5 o al menos 10 cm/min, cuando la entrada de la columna no está adaptada para la agitación dirigida del medio de fase estacionaria.

Preferiblemente, el aparato de acuerdo con el segundo o el cuarto aspecto de la invención comprende adicionalmente al menos una primera bomba aguas arriba de la entrada y una segunda bomba aguas debajo de la salida. Preferiblemente, las bombas son bombas peristálticas.

Se apreciará que el uso de al menos una primera bomba aguas arriba de la entrada y una segunda bomba aguas abajo de la salida puede usarse junto con columnas ventiladas o no ventiladas, y en los métodos de realización de adsorción en lecho expandido usando columnas ventiladas o no ventiladas.

Preferiblemente, el aparato comprende adicionalmente un monitor para el nivel líquido y/o un monitor para el nivel del medio de fase estacionaria en la columna. Adecuadamente, el o cada monitor puede ser un monitor de



ultrasonidos o un monitor óptico. Preferiblemente, tal monitor es un monitor de ultrasonidos.

Convenientemente, el aparato comprende además un controlador, de forma adecuada en la forma de un accionador lineal, para controlar la posición del extremo aguas arriba de la tubería de salida, donde se utiliza esta forma de salida, como se ha descrito previamente. El control del accionador que posiciona la tubería de salida en el interior de la columna puede acoplarse preferiblemente al monitor midiendo el nivel de líquido y/o el nivel del medio de fase estacionaria en la columna.

De forma adecuada, el aparato puede comprender adicionalmente una fuente de caldo de fermentación. Convenientemente, el aparato puede comprender adicionalmente un receptáculo para el caldo gastado. Adecuadamente, el aparato puede comprender adicionalmente una fuente de eluyente. De forma adecuada, el aparato puede comprender adicionalmente un medio para la purificación adicional de al menos un componente del caldo de fermentación, tal como un aparato de filtración de membrana.

Preferiblemente, la regulación de la expansión del medio de fase estacionaria se consigue por el uso de una primera bomba aguas arriba de la entrada para bombear dicho líquido a la columna.

Preferiblemente, la altura del líquido por encima del medio de fase estacionaria expandida se regula por una segunda bomba aguas debajo de la salida para bombear dicho líquido fuera de la columna.

Preferiblemente, la expansión del medio de fase estacionaria se determina por monitorización por ultrasonidos del nivel de líquido y/o el nivel del medio de fase estacionaria dentro de la columna. Dichos métodos de monitorización se conocen en la técnica.

Preferiblemente, la restricción de la sobrepresión se consigue por medio de un orificio de ventilación.

Preferiblemente, la salida comprende una tubería adaptada de tal forma que un extremo aguas arriba de la tubería puede moverse hasta una posición seleccionada dentro de la columna, y el método comprende adicionalmente la etapa de mover el extremo aguas arriba de la tubería hasta una posición deseada en la columna.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprende las etapas adicionales de:

proporcionar un medio de fase estacionaria contenido en una columna que tiene una porción inferior que comprende una entrada sellada y una porción superior que comprende una salida sellada y un orificio de ventilación sellado, proporcionando todos, cuando están sin sellar, una conexión de fluido entre el interior y el exterior de dicha columna; y eliminar los sellos de dicha entrada, salida y orificio de ventilación antes de suministrar el líquido al medio de fase estacionaria. Preferiblemente, el método de acuerdo con el sexto aspecto de la invención comprende las etapas adicionales de: proporcionar un medio de fase estacionaria contenido en una columna que tiene una porción inferior que comprende una entrada sellada y una porción superior que comprende una salida sellada, proporcionando ambas, cuando están sin sellar, una conexión de fluido entre el interior y el exterior de dicha columna; y eliminar los sellos de dicha entrada y salida antes de suministrar el líquido al medio de fase estacionaria. Esto permite que la columna se suministre prerrellenada del proveedor, conteniendo posiblemente no sólo el medio de fase estacionaria sino también una fase de suspensión como se ha descrito previamente, por ejemplo, conteniendo un inhibidor de aglomeración.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el primer o sexto aspecto de la invención comprende las etapas adicionales de, después de permitir la adsorción del al menos un componente: eluir el al menos un componente del medio de fase estacionaria; y, después de al menos una iteración de las etapas de adsorción y elución desechar dicha columna, que aún contiene preferiblemente el mismo medio de fase estacionaria con el que se usó en primer lugar la columna.

Adecuadamente, sin embargo, el método puede comprender las etapas de limpieza del medio de fase estacionaria, la verificación de la limpieza del medio de fase estacionaria, y la reutilización del aparato de lecho expandido después de la elución del al menos un componente. Preferiblemente, la limpieza y la reutilización tienen lugar sin incluir una etapa de verificación. Sin embargo, la verificación de la limpieza puede realizarse tomando muestras para el ensayo microbiano en diferentes sitios dentro de la columna y sus conexiones, y/o tomando muestras del adsorbente y probándolas para determinar la contaminación microbiana y/o la presencia de materia extraña en la superficie de las perlas.

Preferiblemente, después de la elución del al menos un componente del medio de fase estacionaria, y antes de la eliminación de la columna, el método comprende la etapa de:

volver a sellar el orificio de ventilación (si procede), la salida y la entrada de la columna.

Preferiblemente, el al menos un componente del líquido es una proteína.

- 5 Preferiblemente, el contenido de la cámara no se agita mediante ningún medio distinto de la introducción del fluido, el eluyente u otro líquido a través de la entrada.

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de una columna para su uso en la invención.

Las figuras 2 a 12 muestran medios de administración de fluido alternativo de la invención.

10 La figura 13 muestra un diagrama esquemático de un aparato de la invención.

La figura 14 muestra los resultados experimentales del Ejemplo 1.

La figura 15 muestra los resultados experimentales del Ejemplo 2.

La figura 16 muestra los resultados experimentales del Ejemplo 3.

La figura 17 muestra los resultados experimentales del Ejemplo 4.

15

Haciendo referencia a la figura 1, la columna 10 contiene el medio de fase estacionaria 2. Se puede formar a partir de materiales plásticos o de vidrio, como se ha descrito anteriormente, de una manera convencional. Por ejemplo, la columna 10 puede moldearse de un material plástico, tal como polietileno. Este material es particularmente preferido cuando la columna 10 está destinada a un solo uso, ya que es fuerte, ligero, desechable y de bajo coste. La columna 20 es típicamente de una forma sustancialmente cilíndrica y limitada en el extremo inferior por una parte inferior 4 y en el extremo superior por una parte superior 8. A través de la parte inferior 4 se proporciona una entrada 20. La entrada 20 puede proporcionarse con una válvula 6 u otros medios de sellado adecuados que impide el escape de la fase estacionaria 2 o el fluido que puede rodearla en tránsito, y que puede abrirse cuando la columna está conectada al aparato requerido para su uso. De forma similar, a través de la parte superior 8 se proporciona una salida 14 y un orificio de ventilación 12, ambos o cualquiera de los cuales pueden estar dotados de una válvula 6 u otro medio de sellado adecuado. Se prevé, en una realización preferida, que la columna 10 se suministra como una única unidad sellada destinada a un solo uso. Preferiblemente, el cierre superior de la columna no puede eliminarse sin causar daño a la columna, con el fin de evitar la tentativa de reutilización de la columna o el reemplazo del medio de fase estacionaria. Sin embargo, se contempla que la parte superior 8 puede eliminarse con el fin de que la fase estacionaria pueda reemplazarse, y/o que la fase estacionaria puede limpiarse, lo que permite que la columna 10 se reutilice.

20

25

30

Se prevé que la forma preferida del orificio de ventilación 12 será una abertura simple en la parte superior de la columna, con la inclusión opcional de un filtro de protección como se describe a continuación. Sin embargo, también se contempla que el orificio de ventilación puede tomar la forma de una válvula de alivio de presión, tal como una válvula de bola o una válvula de agua accionada por resorte o por la gravedad, en cuyo caso la presión en el espacio vacío será una cantidad elegida por encima de la presión fuera de la columna dependiente de la presión a la que la válvula se adapta para liberar la presión en el espacio vacío, o como alternativa, que el orificio de ventilación puede tomar la forma de una bomba que mantiene el espacio vacío a una presión por debajo de la que hay fuera de la cámara.

35

40

De forma adecuada, el medio de fase estacionaria puede muestrearse eliminando una pequeña cantidad a través del orificio de ventilación o la salida. Sin embargo, cuando la columna está diseñada para un uso limitado seguido de la eliminación, no se prevé que el muestreo del medio de fase estacionaria sea necesario.

45

La figura 2A muestra una sección de la columna 10 tomada a lo largo de la línea X-X en la figura 2C, que muestra la columna 10 desde arriba. La figura 2B muestra la sección 2A en una vista en perspectiva. Las figuras 3-12 A-C se disponen de una manera similar.

50

La figura 2 muestra la sección inferior de la columna 10 mostrada en la figura 1. La entrada 20 se muestra aquí como un tubo cerrado que tiene pequeñas aberturas 30 en su superficie vertical. El extremo cerrado de la entrada 20 se representa con una forma cónica; se apreciará por el experto que otras formas del extremo cerrado pueden estar sustituidas. Las aberturas 30 son preferiblemente grandes con relación al tamaño de cualquier partícula u otras materias insolubles presentes en el líquido a tratar. Esto proporciona la ventaja de que no requiere una etapa de filtración o clarificación preliminar antes de introducir el líquido a la columna 10, simplificando y acortando así el proceso de purificación. Las aberturas 30 están también preferiblemente en ángulo descendente con el fin de que no se bloqueen por las partículas de fase estacionaria (no mostradas) que rodean la entrada 20, y también para dirigir la turbulencia producida por los chorros de líquido en la fase estacionaria mediante la limitación de los chorros a la parte inferior de la columna 10. Esto permite además que las aberturas 30 sean significativamente más grandes que el tamaño esperado de cualquier particulado en el fluido sin el problema del medio de fase estacionaria que bloquea las aberturas o pasando a través de las aberturas 30 en la entrada 20. Por lo tanto, se minimiza la probabilidad de bloqueos de las aberturas 30 producidos por cualquiera de las partículas en el líquido o el medio en fase estacionaria.

55

60

La figura 3 muestra una realización alternativa de la entrada 20 en la que las aberturas 30 están en forma de ranuras. De nuevo, el tamaño de las aberturas es preferentemente grande con relación a la materia insoluble en el fluido, y las aberturas están dirigidas preferiblemente hacia abajo

5

Las figuras 4 y 5 muestran la entrada de la figura 2, pero con la adición de una capucha cónica 40. La capucha cónica 40 funciona para dirigir el líquido hacia abajo a la parte inferior de la columna 10 después de salir de las aberturas 30, y permite que el líquido fluya de manera uniforme alrededor de la base del cono y hasta la fase estacionaria a la parte superior de la columna. Además, la turbulencia y la canalización de la fase estacionaria 2 se reduce al mínimo según las partes de la fase estacionaria cerca de las aberturas 30 se separan de la mayor parte de la fase estacionaria por la superficie deflectora horizontal (inferior) de la capucha cónica 40. Se puede observar a partir de las figuras que la capucha 40 puede funcionar como la tapa del extremo del tubo que forma la entrada 20, y que la cubierta puede rodear las aberturas 30 (como en la figura 4) o estar situadas encima de las aberturas (como en la figura 5).

10

15

La figura 6 muestra una capucha cónica 40 como en la figura 5 en combinación con la entrada mostrada en la figura 3.

20

La figura 7 muestra la entrada de la figura 2 en combinación con un inserto cónico 50 que reduce el volumen de la columna 10 en su extremo inferior, y por lo tanto, el volumen de fase estacionaria que rodea la entrada 20. La turbulencia de la fase estacionaria creada en el volumen cónico disminuye la probabilidad de desarrollar "espacio muerto" en la columna debido a la presencia de la fase estacionaria no puesta en contacto con el líquido y, por lo tanto, sin formar parte del lecho expandido. Se prevé que la forma interna de la parte inferior de la columna 10 lograda por el uso del inserto 50 puede conseguirse alternativamente por moldeo de la parte inferior de la columna para tener la forma cónica requerida en la cara interior.

25

La figura 8 muestra la entrada de la figura 3 en combinación con el inserto cónico 50.

30

La figura 9 muestra una realización alternativa de la entrada 20, en la que la abertura 30 está en forma de una tobera adaptada para proporcionar un chorro difuso y divergente de líquido. Adecuadamente, el semiángulo del cono descrito por el chorro de líquido puede ser de al menos 45°, por ejemplo 60°. Preferiblemente, tal tobera se utiliza junto con el inserto cónico 50 mostrado en la figura, a fin de que el espacio muerto de la columna se reduzca al mínimo. El semiángulo descrito por las caras inclinadas del inserto cónico 50 puede ser adecuadamente sustancialmente el mismo que el descrito por el chorro de líquido a fin de que la cantidad máxima posible de la fase estacionaria 2 se ponga en contacto con el líquido.

35

40

La figura 10 muestra una realización alternativa de la entrada 20, en la que la entrada es un tubo dotado de placas 60 en la pared interior adaptado para hacer que el líquido que pasa a través del tubo gire. La abertura 30 está a nivel con la parte inferior 4 de la columna 10, y no está limitada pero es del mismo diámetro que el tubo 20. De este modo, el líquido giratorio, al llegar a la abertura 30, formará un chorro divergente, y será distribuido ampliamente dentro de la columna 10. Preferiblemente, esta entrada se utiliza junto con un inserto cónico 50 que tiene su abertura más pequeña del mismo diámetro que el de la abertura 30. El chorro divergente de este modo puede ponerse en contacto con sustancialmente la totalidad de la fase estacionaria en la proximidad de la abertura 30, evitando la formación de espacio muerto en la columna. En ausencia del inserto cónico 50, es poco probable que el chorro divergente producido por la apertura 30 sea suficientemente divergente para ponerse en contacto con la fase estacionaria que ocupa el área de trama en la figura 10A. El chorro de líquido producido por la entrada 20 debe ser lo suficientemente difuso para que no se cause una canalización significativa en la fase estacionaria por el chorro.

45

50

La figura 11 muestra una columna 10 que tiene cuatro de las entradas 20 mostradas en la figura 10. Esta disposición es adecuada para una columna de mayor diámetro, tal como al menos 20 cm de diámetro. Además, la división de la corriente de líquido en cuatro permite que el líquido se distribuya de manera más uniforme a lo largo de la parte inferior de la columna 10. Tal disposición de una pluralidad de entradas puede utilizar cualquiera de las realizaciones que se han descrito anteriormente de las entradas.

55

La figura 12 muestra una entrada alternativa 20, que comprende los tubos 70 que se extienden radialmente dentro de la columna 10. Las aberturas 30 se proporcionan en los tubos 70. El líquido a tratar se suministra a través de un tubo central 80 a los tubos radiales 70 y pasa a través y fuera de las aberturas 30. Preferiblemente, las aberturas están dirigidas hacia abajo, por las razones expuestas anteriormente. Puede proporcionarse una pluralidad de aberturas en cada uno de los tubos 70, y puede proporcionarse una pluralidad de tubos 70. De nuevo, las aberturas son preferiblemente grandes en relación con cualquier particulado o materia insoluble en el líquido a tratar.

60

La fase estacionaria 2 debe tener una densidad de al menos  $1,5 \text{ gml}^{-1}$  a fin de que los distribuidores de la invención no causen inestabilidad y turbulencia en el lecho expandido de la fase estacionaria, lo que dará como resultado un

menor rendimiento de la fase estacionaria. El tamaño de partícula medio del medio de fase estacionaria puede estar en el intervalo de 20 a 200  $\mu\text{m}$ . Las fases estacionarias adecuadas incluyen las descritos en los documentos WO 92/00799 y WO 00/57982.

- 5 La figura 13 muestra una representación esquemática de un aparato para la realización de la cromatografía de lecho expandido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. El aparato incluye una columna 10, que tiene una entrada 20, una salida 14 y un orificio de ventilación 12, y que contiene el medio de fase estacionaria 2

En esta figura, el orificio de ventilación 12 se representa con un filtro 16 proporcionado sobre la abertura en el mismo. Tal filtro puede usarse para impedir la entrada y/o salida de contaminantes, tales como polvo y microbios, a y/o de la columna 10. Un filtro adecuado puede ser un microfiltro tal como un filtro de gas general de Pall Corp. [número de producto 9004500 Pallflex media, de 4,8 a 3,2 mm (3/16 a 1/8 pulgadas) HB] o un filtro de alto flujo de Intervene Intervene™, de Pall Corp.

15 La entrada 20 puede ser una entrada no adaptada para la agitación dirigida del contenido de la columna, tales como los descritos anteriormente en relación a las figuras 2 a 12, o puede ser otro tipo conocido de entrada, tal como una entrada giratoria accionada mecánicamente o una entrada giratoria accionada magnéticamente. Se describen entradas de este tipo en el documento WO99/65586.

20 La entrada 20, la salida 14 y el orificio de ventilación 12 se muestran cada uno con una válvula 6 que puede cerrar y sellar la entrada, la salida y el orificio de ventilación antes del uso de la columna y después del uso de la columna. De esta manera, el contenido de la columna puede mantenerse estéril antes del uso de la columna, y, cuando la columna está destinada a suministrarse prerrellenada con una fase estacionaria para un solo uso o un número limitado de usos, seguido de la eliminación, la columna puede suministrarse en estado estéril verificado por el proveedor y puede cerrarse después de su uso para facilitar la eliminación segura del contenido.

La salida 14 se muestra aquí en la forma de una tubería que se puede mover a un nivel deseado dentro de la columna. Esta tubería puede proporcionarse integralmente con la salida 14, o puede ser un elemento separado conducido a través de una salida 14 como se muestra en la figura 1. La interfaz entre la tubería y la salida 14 se puede sellar con un retén que permite que la tubería se deslice hacia arriba y abajo sin que ningún contaminante macroscópico entre o salga de la columna. La parte exterior de la tubería (la parte de la tubería que se coloca fuera de la columna, pero puede entrar en el interior cuando la posición de la tubería se ajusta hacia abajo) puede además estar cubierta por un tubo flexible fijo, lavarse opcionalmente con un gas estéril, a fin de evitar contaminaciones incluso microbianas o químicas. Es deseable que el extremo aguas arriba de la salida se coloque por debajo del nivel del líquido 18 y por encima del nivel superior de la fase estacionaria 2 durante el uso de la columna. Por lo tanto, se proporcionan medios (no mostrados) para permitir el movimiento del extremo aguas arriba de la salida 14 a una posición adecuada dentro de la columna. Esto se puede conseguir mediante un medio motorizado, accionados por el usuario; mediante el uso de un soporte flotante que mantiene el extremo aguas arriba de la salida 14 en o ligeramente por debajo del nivel del líquido 18; o, preferiblemente, un medio motorizado que responde a la retroalimentación del monitor 26 que controla el nivel del líquido 18 y/o el nivel de la fase estacionaria 2. Tales medios accionados por motor pueden ser un actuador lineal, que puede ser un accionador neumático o un actuador eléctrico.

El monitor 26 puede ser cualquier forma de monitor capaz de controlar el nivel de líquido y/o fase estacionaria dentro de la columna. Por ejemplo, el monitor puede ser un monitor óptico. Sin embargo, dado que el líquido 18, la fase estacionaria 2, y/o el material del que la columna 10 se construye pueden ser opacos, ya sea individualmente o en combinación, se prefiere utilizar un monitor de ultrasonidos como monitor 26. El monitor puede proporcionar retroalimentación a cualquiera o todos de: la bomba 22 aguas arriba de la entrada 20; la bomba 24 aguas abajo de la salida 14; y el controlador (no mostrado) para posicionar el extremo aguas arriba de la salida 14.

50 Aguas arriba de la entrada 20 y aguas abajo de la salida 14 se proporcionan bombas para la administración de líquido a la columna a través de la entrada y la conducción de líquido de la columna a través de la salida. Estas bombas pueden ser cualesquiera bombas adecuadas conocidas en la técnica. Sin embargo, se prefiere el uso de las bombas peristálticas con el fin de que el líquido no entre en contacto con ninguna parte de la propia bomba. Los ejemplos de bombas peristálticas adecuadas incluyen bombas sanitarias Bredel Watson-Marlow o bombas peristálticas MasterFlex de Cole-Parmer. El uso de bombas peristálticas contribuye al objetivo de proporcionar un aparato de un solo uso para la purificación de líquidos, ya que el tubo que pasa a través de las bombas y la conexión a la entrada y la salida de la columna puede usarse una vez y eliminarse, sin la necesidad de la limpieza de la bomba.

60 Durante el uso, la columna 10 se coloca entre el aparato y se conecta a la entrada del tubo que conduce a la bomba 22, y en la salida a un tubo que conduce a la bomba 24. Los sellos de la entrada 20, la salida 14 y el orificio de ventilación 12 se rompen a continuación. El líquido a tratar se conduce a través de la entrada 20 por la bomba 22

- para distribuirse de manera uniforme entre la fase estacionaria 2 en el extremo inferior de la columna 10. El líquido fluye entonces hacia arriba a través de la fase estacionaria 2, provocando la expansión de la fase estacionaria, y se conduce fuera de la salida por la bomba 24. El caudal del líquido debe equilibrarse con la densidad y tamaño de partícula de la fase estacionaria para que la fase estacionaria 2 se expanda suficientemente para formar un lecho expandido estable, pero no se desborde la parte superior de la columna 10. El caudal requerido se mantiene mediante el uso de dos bombas, una bomba 22 aguas arriba de la entrada 20 de la columna 10 y una segunda bomba 24 aguas abajo de la salida 14 de la columna 10. La expansión de la fase estacionaria y el nivel de líquido por encima del nivel de la fase estacionaria se controlan usando el monitor 26. El monitor 26 puede proporcionar retroalimentación a las dos bombas 22 y 24 a fin de que los caudales de estas bombas se puedan controlar individualmente para lograr el grado deseado de expansión de la fase estacionaria y el nivel de líquido por encima de la fase estacionaria. Además, el uso de medidores de flujo precisos, tales como medidores de flujo másico, para determinar el caudal en la entrada y fuera de la salida, facilita el control manual independiente del sistema. El grado de expansión se rige por el caudal en la columna y, por lo tanto, se controla esencialmente por la bomba de entrada. La altura del líquido por encima del medio expandido puede controlarse disminuyendo temporalmente el caudal a través de la bomba de salida para aumentar el nivel de líquido, y aumentando temporalmente el caudal a través de la bomba de salida para disminuir el nivel de líquido. Además, el monitor 26 puede proporcionar retroalimentación a un controlador (no mostrado) que determina la posición del extremo aguas arriba de la salida 14, con el fin de que el extremo aguas arriba de la salida se mantenga en una posición deseada, tal como por debajo del nivel del líquido pero por encima del nivel de la fase estacionaria, durante la expansión y el uso de la fase estacionaria. Como alternativa, sin embargo, la posición del extremo aguas arriba de la salida 14 puede determinarse por el operador de la columna, o se puede determinar mediante el uso de un soporte flotante que mantiene el extremo aguas arriba de la salida 14 en una posición seleccionada relativa a la superficie del líquido, tal como una pequeña distancia por debajo de la superficie del líquido.
- 25 Durante la expansión de la fase estacionaria, y cualquier ajuste posterior del nivel del líquido y/o la estacionaria dentro de la columna 10, se permite que la presión del aire por encima del nivel de líquido en la columna se equilibre con la presión fuera de la columna por medio del orificio de ventilación 12. Por lo tanto, la columna puede operarse sin ninguna acumulación de presión significativa. Esto permite el uso de materiales más ligeros para la construcción de la columna 10 que los usados normalmente en la técnica, ya que no hay necesidad de que la parte superior de la columna 10 soporte presiones significativamente por encima de la presión ambiente.

Preferiblemente, la columna 10 y la fase estacionaria 2 se usan en forma de lecho expandido tanto para la adsorción del compuesto o compuestos de interés como para su elución.

### 35 Ejemplo 1 - Determinación del número de placas teóricas en columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención

Una columna de adsorción en lecho expandido en general se ensambla como se ilustra en la figura 13 pero teniendo una entrada de acuerdo con la figura 9 (siendo la altura del cono 15 cm) y se conecta a dos bombas de tubo peristálticas (Watson Marlow). Contenía un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 25 cm. El adsorbente consistía en perlas de conglomerado de agarosa - carburo de tungsteno que tenían un tamaño de partícula medio (d (0,5)) en volumen de 149  $\mu\text{m}$  y una densidad de 3,1 g/ml. El adsorbente se suspendió en una solución al 25 % de glicerol para evitar la formación de grumos y un envasado denso. Justo antes del uso, la columna se lavó con 30 volúmenes de lecho de agua desionizada.

45 La columna se ensayó mediante la determinación del número de placas teóricas por metro (medición de distribución del tiempo de residencia, RTD) en función del caudal.

El método de entrada de etapa negativa como se describe en el manual "Expanded Bed Adsorption", página 14-16, Edición AA, ISBN 91-630-5519-8, de Amersham Pharmacia Biotech, Suecia, y que se usa comúnmente por los expertos en la técnica de adsorción en lecho expandido se utilizó para evaluar el rendimiento del sistema.

Se bombeó una solución de acetona (0,5 % en agua) a la columna a un caudal predeterminado y el avance de la acetona a la salida de la columna se siguió de la medición continua y el registro de la absorbencia del fluido a una longitud de onda de 280 nm (luz UV). Cuando la acetona salió de la columna con una concentración constante de acuerdo con la señal UV, la solución de fluidificación se cambió de acetona de nuevo a agua. El lavado con agua se realizó con el mismo caudal que durante la carga de la solución de acetona. El lavado de la columna con agua se continuó hasta que toda la acetona se lavó de acuerdo con la señal UV registrada, el experimento se detuvo y se determinó/calculó el número de placas por metro de la señal UV registrada y se representó en función del caudal aplicado.

El experimento se repitió usando un intervalo de diferentes caudales de acuerdo con la tabla que se indica a continuación y la relación entre el caudal y el número de placas teóricas observado se registró como se ilustra en la

tabla que se indica a continuación y en la figura 14.

Caudal lineal cm/min	Número de placas teóricas N/m
3,0	11
5,0	39
7,5	123
10	148
20	263
30	321

El resultado del experimento indica que el distribuidor estático y el sistema del lecho fluido tenían un número de placas teóricas en aumento (N) por metro de lecho sedimentado de soporte de fase sólida a través del régimen de caudal investigado. Se demuestra adicionalmente que es necesario un caudal por encima de 5 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m.

Ejemplo 2 - Determinación del número de placas teóricas en columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención

10

Una columna de adsorción en lecho expandido se ensambló como en el Ejemplo 1, pero con una entrada de acuerdo con la figura 8 (siendo la altura del cono 15 cm). Contenía un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 25 cm. El adsorbente consistía en perlas de conglomerado de agarosa - carburo de tungsteno que tenían un tamaño de partícula medio (d (0,5)) en volumen de 130 µm y una densidad de 2,8 g/ml. El adsorbente se suspendió en una solución al 25 % de glicerol para evitar la formación de grumos y un envasado denso. Justo antes del uso, la columna se lavó con 30 volúmenes de lecho de agua desionizada.

15

La columna se ensayó mediante la determinación del número de placas teóricas por metro (medición de distribución del tiempo de residencia, RTD) en función del caudal como se ha descrito en el ejemplo 1.

20

El experimento se repitió usando un intervalo de diferentes caudales de acuerdo con la tabla que se indica a continuación y la relación entre el caudal y el número de placas teóricas observado se registró como se ilustra en la tabla que se indica a continuación y la figura 15.

Caudal lineal cm/min	Número de placas teóricas N/m
3,0	42
5,0	99
7,5	203
10	293

25 El resultado del experimento indica que el distribuidor estático y el sistema del lecho fluido tenían un número de placas teóricas en aumento (N) por metro de lecho sedimentado de soporte de fase sólida a través del régimen de caudal investigado. Se demuestra adicionalmente que es necesario un caudal por encima de 5 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m.

30 Ejemplo 3 - Determinación del número de placas teóricas en columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención.

Una columna de adsorción en lecho expandido se ensambló como en el Ejemplo 1, excepto que se equipó con una entrada de acuerdo con la figura 3 (sin cono). Contenía un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 25 cm. El adsorbente consistía en perlas de conglomerado de agarosa - carburo de tungsteno que tenían un tamaño de partícula medio (d (0,5)) en volumen de 149 µm y una densidad de 3,1 g/ml. El adsorbente se suspendió en una solución al 25 % de glicerol para evitar la formación de grumos y un envasado denso. Justo antes del uso, la columna se lavó con 30 volúmenes de lecho de agua desionizada.

35

40 La columna se ensayó mediante la determinación del número de placas teóricas por metro (medición de distribución del tiempo de residencia, RTD) en función del caudal como se ha descrito en el ejemplo 1.

El experimento se repitió usando un intervalo de diferentes caudales de acuerdo con la tabla que se indica a continuación y la relación entre el caudal y el número de placas teóricas observado se registró como se ilustra en la tabla y la figura a continuación. El experimento se repitió adicionalmente usando un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 50 cm.

45

Caudal lineal cm/min	Número de placas teóricas N/m (25 cm de altura del lecho)	Número de placas teóricas N/m (50 cm de altura del lecho)
5,0	61	38
7,5	98	47

10	142	61
20	217	181
30	331	281

El resultado del experimento indica que el distribuidor estático y el sistema del lecho fluido tenían un número de placas teóricas en aumento (N) por metro de lecho sedimentado de soporte de fase sólida por todo el régimen de caudal investigado. Se demuestra adicionalmente que es necesario un caudal por encima de 7 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m cuando la altura del lecho sedimentado del adsorbente es 25 cm, mientras que es necesario un caudal por encima de 13 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m cuando la altura del lecho sedimentado del adsorbente es de 50 cm.

10 Ejemplo 4 - Determinación del número de placas teóricas en columnas de lecho expandido de acuerdo con la invención

Una columna de adsorción en lecho expandido (10 cm de diámetro) se ensambló como se describe en el Ejemplo 3. El adsorbente consistía en perlas de conglomerado de agarosa - carburo de tungsteno que tenían un tamaño de partícula medio (d (0,5)) en volumen de 130 µm y una densidad de 2,8 g/ml. El adsorbente se suspendió en una solución al 25 % de glicerol para evitar la formación de grumos y un envasado denso. Justo antes del uso, la columna se lavó con 30 volúmenes de lecho de agua desionizada.

La columna se ensayó mediante la determinación del número de placas teóricas por metro (medición de distribución del tiempo de residencia, RTD) en función del caudal como se ha descrito en el ejemplo 1.

El experimento se repitió usando un intervalo de diferentes caudales de acuerdo con la tabla que se indica a continuación y la relación entre el caudal y el número de placas teóricas observado se registró como se ilustra en la tabla y la figura a continuación. El experimento se repitió adicionalmente usando un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 50 cm.

Caudal lineal cm/min	Número de placas teóricas N/m (25 cm de altura del lecho)	Número de placas teóricas N/m (50 cm de altura del lecho)
3,0	73	ND
5,0	124	37
7,5	174	71
10	249	127
15	516	384

El resultado del experimento indica que el distribuidor estático y el sistema del lecho fluido tenían un número de placas teóricas en aumento (N) por metro de lecho sedimentado de soporte de fase sólida por todo el régimen de caudal investigado. Se demuestra adicionalmente que es necesario un caudal por encima de 5 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m cuando la altura del lecho sedimentado del adsorbente es de 25 cm, mientras que es necesario un caudal por encima de 10 cm/min para obtener un número de placas teóricas de al menos 100 N/m cuando la altura del lecho sedimentado del adsorbente es de 50 cm.

Ejemplo 5 - Adsorción de IgG humana de plasma humano

Una columna de adsorción en lecho expandido (10 cm de diámetro) se ensambló como en el Ejemplo 2 y contenía un volumen de adsorbente igual a una altura de lecho sedimentado de 50 cm. El adsorbente consistió en perlas de conglomerado de agarosa - carburo de tungsteno entrecruzadas, acopladas con ácido 4-amino-benzoico como el ligando, y que tenían un tamaño de partícula medio (d (0,5)) en volumen de 95 µm y una densidad de 2,9 g/ml (UpFront Chromatography A/S, Copenhagen, Dinamarca, producto n.º: CS118, lote 45818 WV). El adsorbente se suspendió en una solución al 25 % de glicerol en un tampón de fosfato potásico a pH 7,2. Justo antes del uso, la columna se lavó con 30 volúmenes de lecho de agua desionizada.

La columna se ensayó mediante la determinación del número de placas teóricas por metro (medición de distribución del tiempo de residencia, RTD) como se ha descrito en el ejemplo 1 a un caudal lineal de 10 cm/min y se descubrió que tenía 185 placas por metro de lecho sedimentado (185 N/m)

Posteriormente, la columna se lavó con 20 l de imidazol 0,1 M valorado con ácido clorhídrico a pH 6,2 seguido de 50 l de imidazol 0,002 M valorado con ácido clorhídrico a pH 6,2 a un caudal lineal de 10 cm/min. Posteriormente, la columna se cargó con 40 l de plasma humano que se dializó frente a imidazol 0,002 M/HCl a pH 6,2 a un caudal lineal de 10 cm/min. Tras la carga del plasma, la columna se lavó con 40 l de imidazol/HCl a pH 6,2, después el material unido que quedaba en la columna se eluyó lavando la columna con 40 l de fosfato potásico 0,1 M + cloruro sódico 0,5 M a pH 7,5. El efluente de la columna se controló por un monitor UV y la proteína eluida de la columna se

recogió de acuerdo con la señal UV. La proteína única y posteriormente eluida se recogió en un volumen de elución de 13 l. Tras la elución de la proteína unida, la columna (aún conectada al tubo de entrada y el tubo de salida) se desmontó de su soporte y se selló mediante la conexión del tubo de entrada y el tubo de salida en un bucle cerrado, donde después toda la columna se dispuso en un área designada material de residuos biológicos.

5

La fracción no unida que transcurre a través de la columna, y el producto unido y posteriormente eluido, se analizaron para determinar el contenido de proteína y se descubrió que más del 90 % de la inmunoglobulina G presente en la mezcla de plasma humano normal se unió al adsorbente, y posteriormente se eluyó en el tampón de fosfato potásico. Otras fracciones de proteínas principales, tales como albúmina, no se unen al adsorbente en estas

10

condiciones.

Durante el funcionamiento, la columna se observó mediante inspección visual y no se observó canalización o turbulencia no deseada en el adsorbente por encima de aproximadamente 10 cm desde la parte inferior de la columna. Cerca de la parte inferior se pudo observar algo de mezcla y turbulencia que se asignó al efecto diseñado

15

del distribuidor.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de realización de cromatografía de adsorción en lecho expandido de flujo ascendente de un líquido que comprende al menos un componente a separar del mismo, que comprende:
- 5 (i) suministrar el líquido a través de una entrada (20) a un medio de fase estacionaria (2) contenido en una columna (10), dando como resultado la expansión del medio de fase estacionaria por debajo de un volumen variable de espacio vacío;
- 10 (ii) permitir la adsorción del al menos un componente del líquido por el medio de fase estacionaria;
- (iii) retirar el líquido de la columna a través de una salida (14);
- (iv) regular la expansión del medio de fase estacionaria por la regulación del caudal del líquido a través de al menos la entrada;
- caracterizado por que** el caudal se mantiene por el uso de dos bombas, una bomba (22) aguas arriba de la entrada de la columna y una segunda bomba (24) aguas abajo de la salida de la columna, cada una controlada individualmente por un monitor (26), y cualquier sobrepresión en el espacio vacío con respecto a la presión fuera de la columna se restringe para que no sea de más de dicha presión exterior más 10 kPa (0,1 bar).
- 20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sobrepresión no es de más de 5 kPa (0,05 bar).
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la sobrepresión no es de más de 1 kPa (0,01 bar).
- 25 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el caudal de dicho líquido hasta la columna proporcionado por las dos bombas es de al menos 3 cm/min.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la restricción de la sobrepresión se consigue por medio de un orificio de ventilación (12).
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende las etapas adicionales de:
- 35 (i) proporcionar un medio de fase estacionaria contenido en una columna que tiene una porción inferior que comprende una entrada sellada y una porción superior que comprende una salida sellada y un orificio de ventilación sellado, proporcionando todos, cuando están sin sellar, una conexión de fluido entre el interior y el exterior de dicha columna; y
- 40 (ii) romper los sellos en dicha entrada, salida y orificio de ventilación antes de suministrar el líquido al medio de fase estacionaria.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las etapas adicionales de, después de permitir la adsorción del al menos un componente:
- 45 eluir el al menos un componente del medio de fase estacionaria; y, después de al menos una iteración de las etapas de adsorción y elución desechar dicha columna.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el número máximo de iteraciones de las etapas de adsorción y elución es 20.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el número máximo de iteraciones de las etapas de adsorción y elución es 10.
- 55 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que, después de la etapa de elución, el medio de fase estacionaria se limpia y la columna se usa de nuevo.
11. Aparato para realizar una cromatografía de adsorción en lecho expandido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende:
- 60 (a) una columna (10) que comprende:
- (i) una porción inferior que comprende una entrada (20) para el paso del líquido hasta la columna;
- (ii) una porción superior que comprende una salida (14) para dicho líquido; y

(iii) un medio de fase estacionaria (2) contenido en la columna;

en el que la porción superior de la columna comprende adicionalmente un orificio de ventilación (12) que proporciona una conexión de fluido entre el interior y el exterior de la columna; y

5 **caracterizado por que** el aparato comprende adicionalmente:

(b) dos bombas, una bomba (22) aguas arriba de la entrada de la columna y una segunda bomba (24) aguas abajo de la salida de la columna, para la regulación del caudal a través de la entrada y la salida de la columna; y

10 (c) un monitor (26) del nivel de líquido y/o medio de fase estacionaria en la columna.

12. Aparato de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el monitor es un monitor de ultrasonidos.

13. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el medio de fase  
15 estacionaria tiene una densidad de al menos  $1,5 \text{ g.ml}^{-1}$ .

14. Aparato de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medio de fase estacionaria tiene una densidad entre  $2,5$  y  $4,0 \text{ g.ml}^{-1}$ .

20 15. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el medio de fase estacionaria tiene un diámetro de partícula medio de  $20$  a  $200 \mu\text{m}$ .

16. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el medio de fase  
25 estacionaria tiene un diámetro de partícula medio de  $60$  a  $120 \mu\text{m}$ .

17. Aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que la columna tiene al menos 25 placas teóricas.

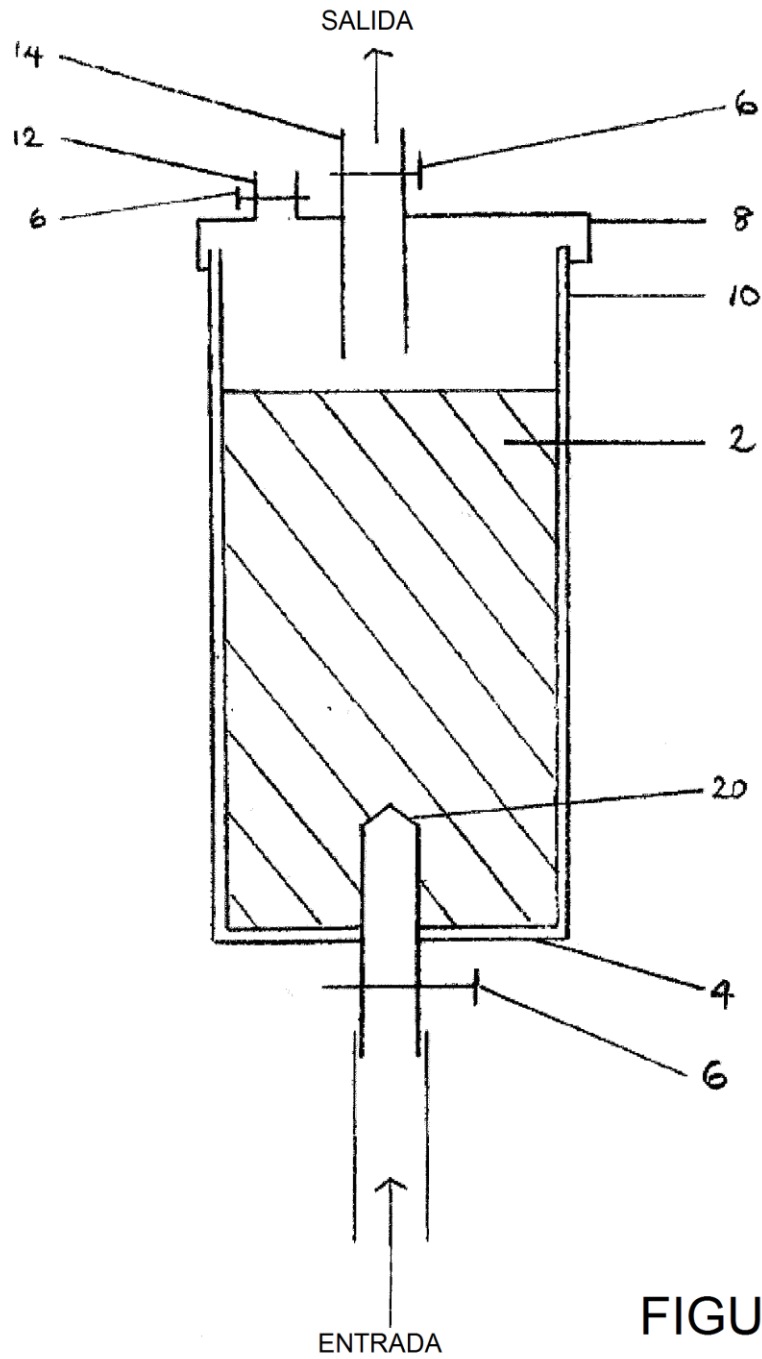


FIGURA 1

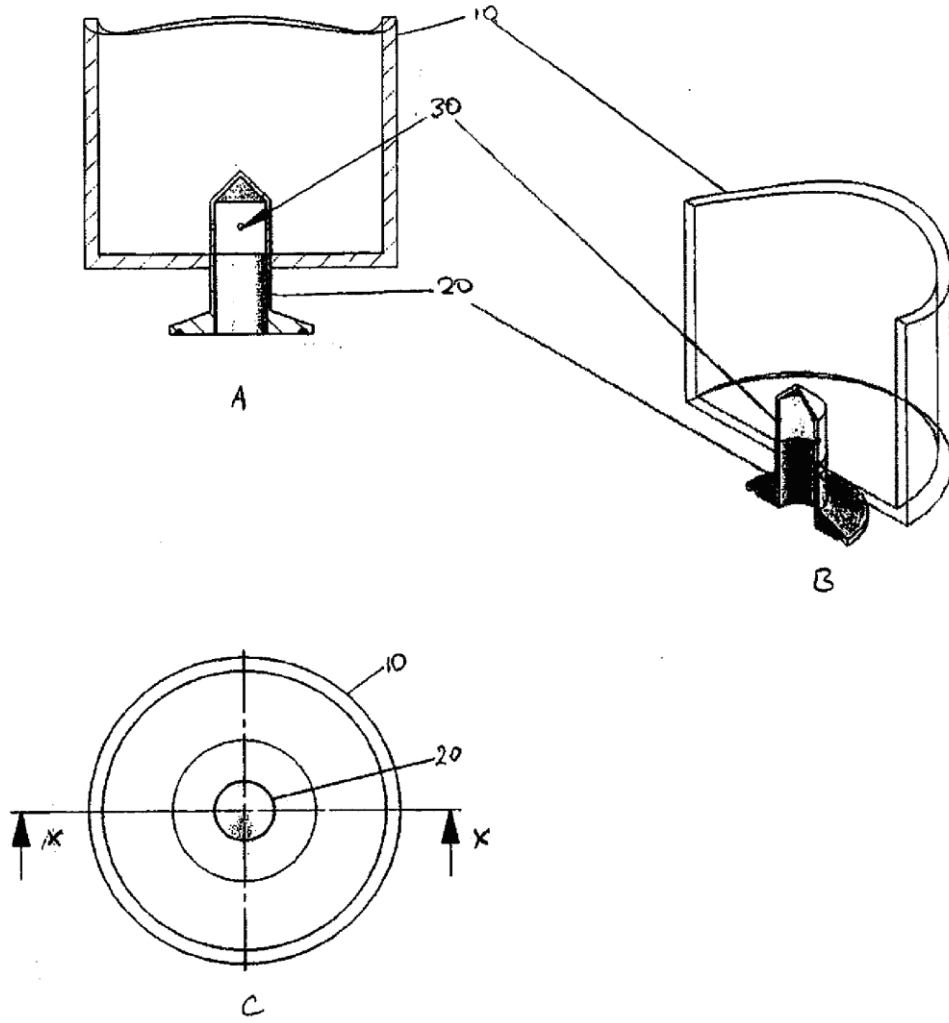


FIGURA 2

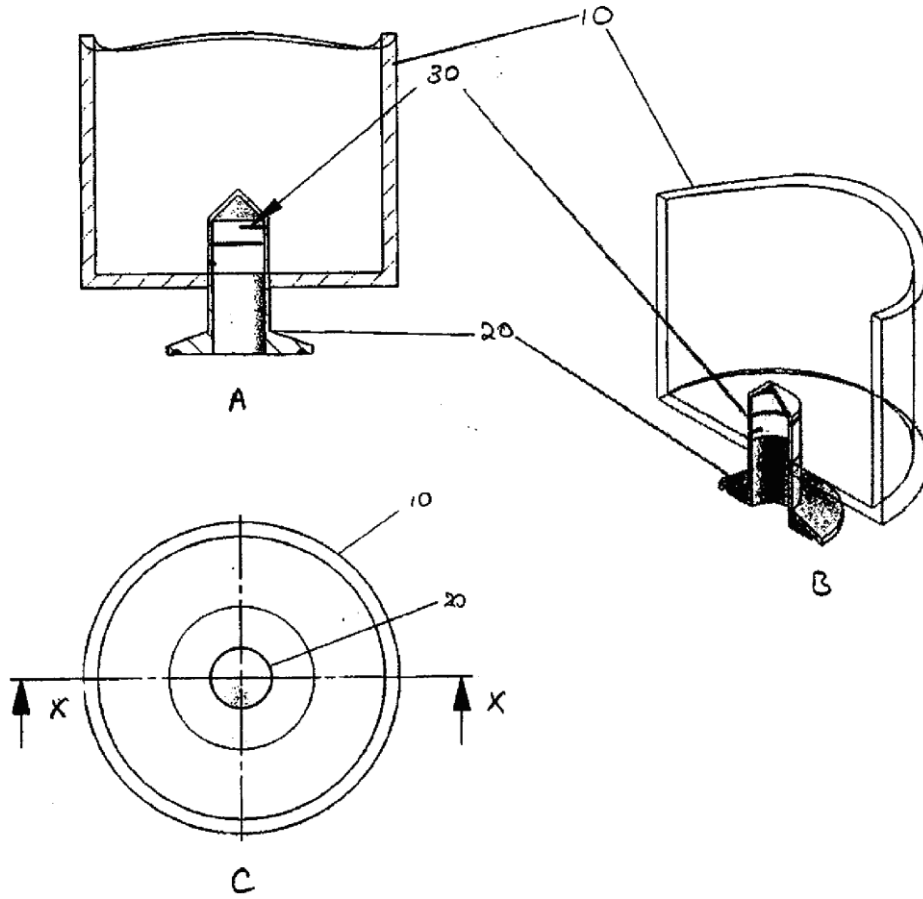


FIGURA 3

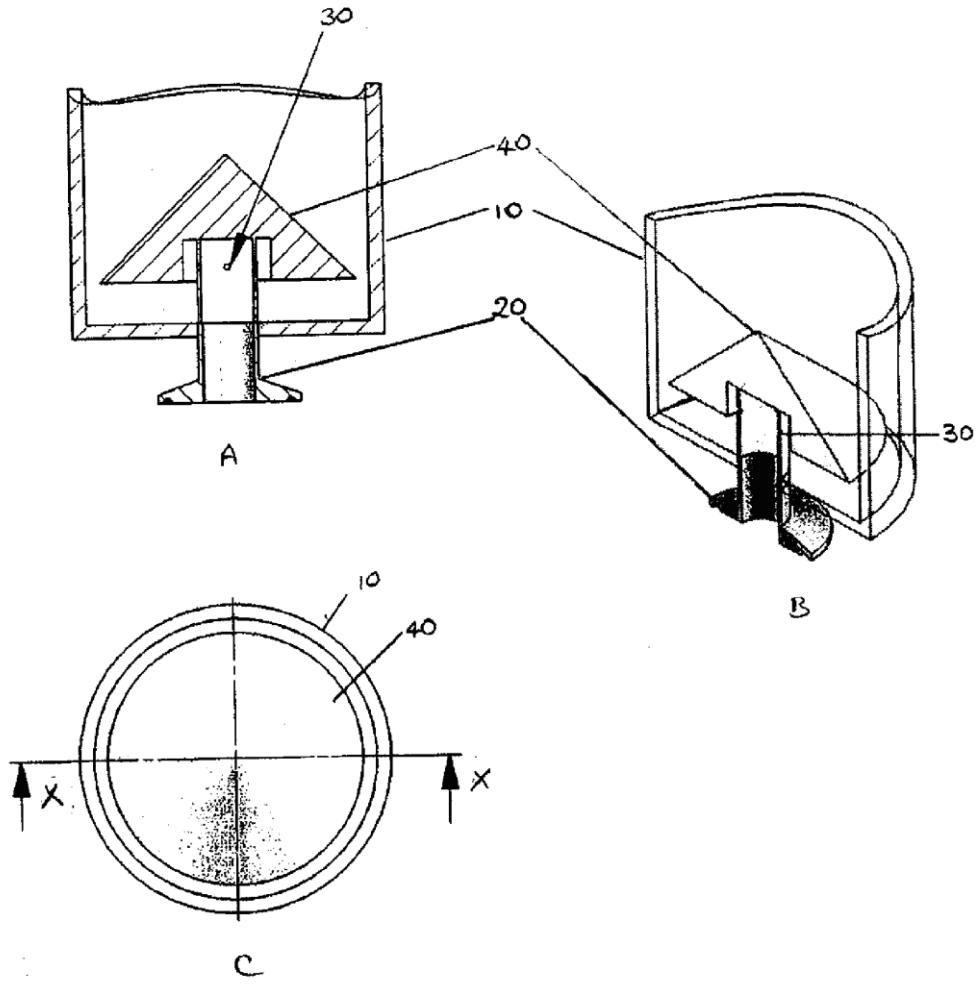


FIGURA 4

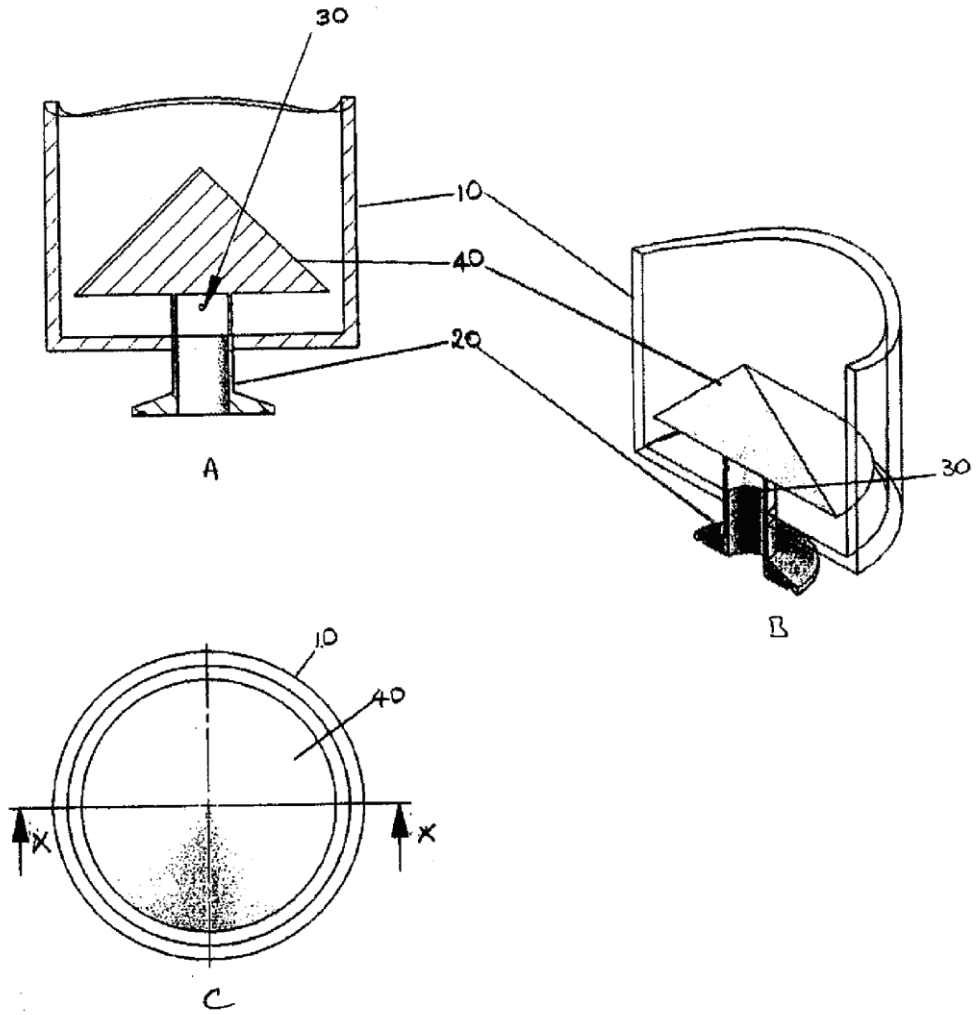


FIGURA 5

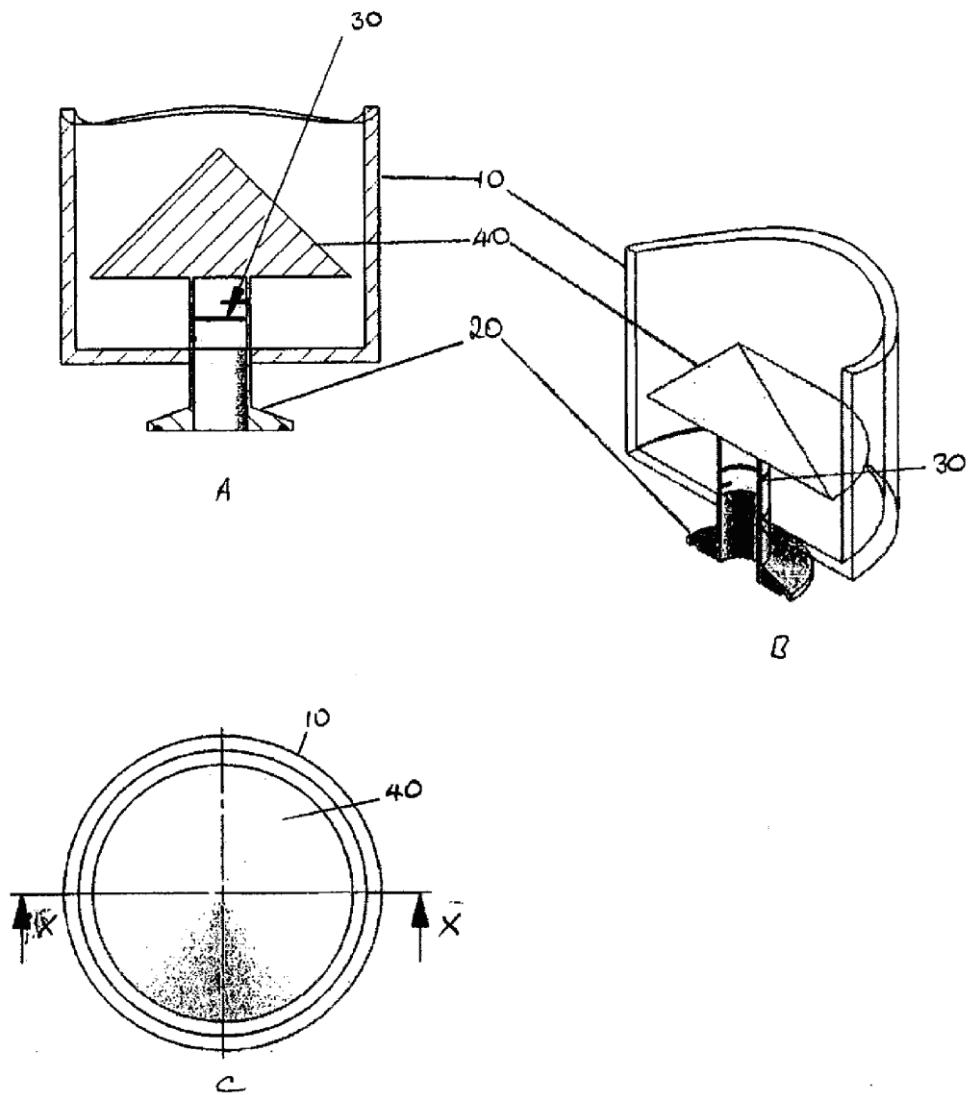


FIGURA 6



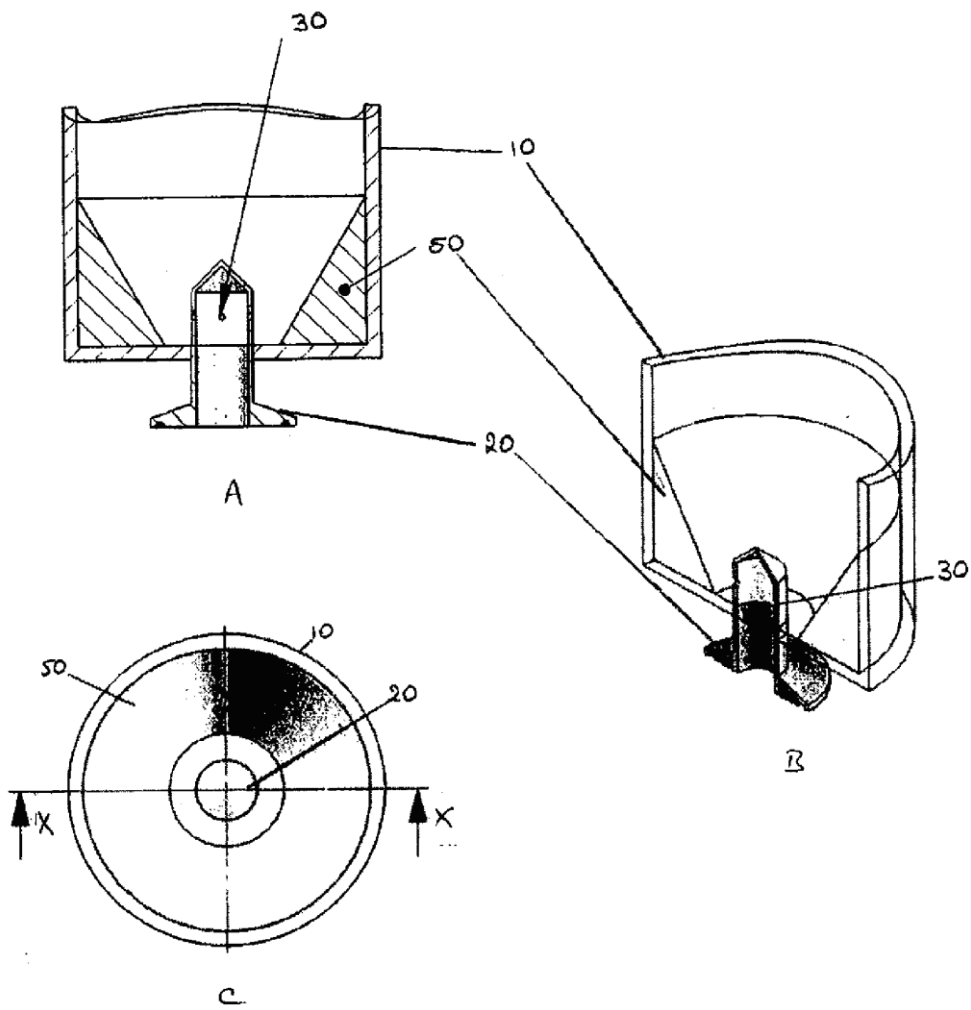


FIGURA 7

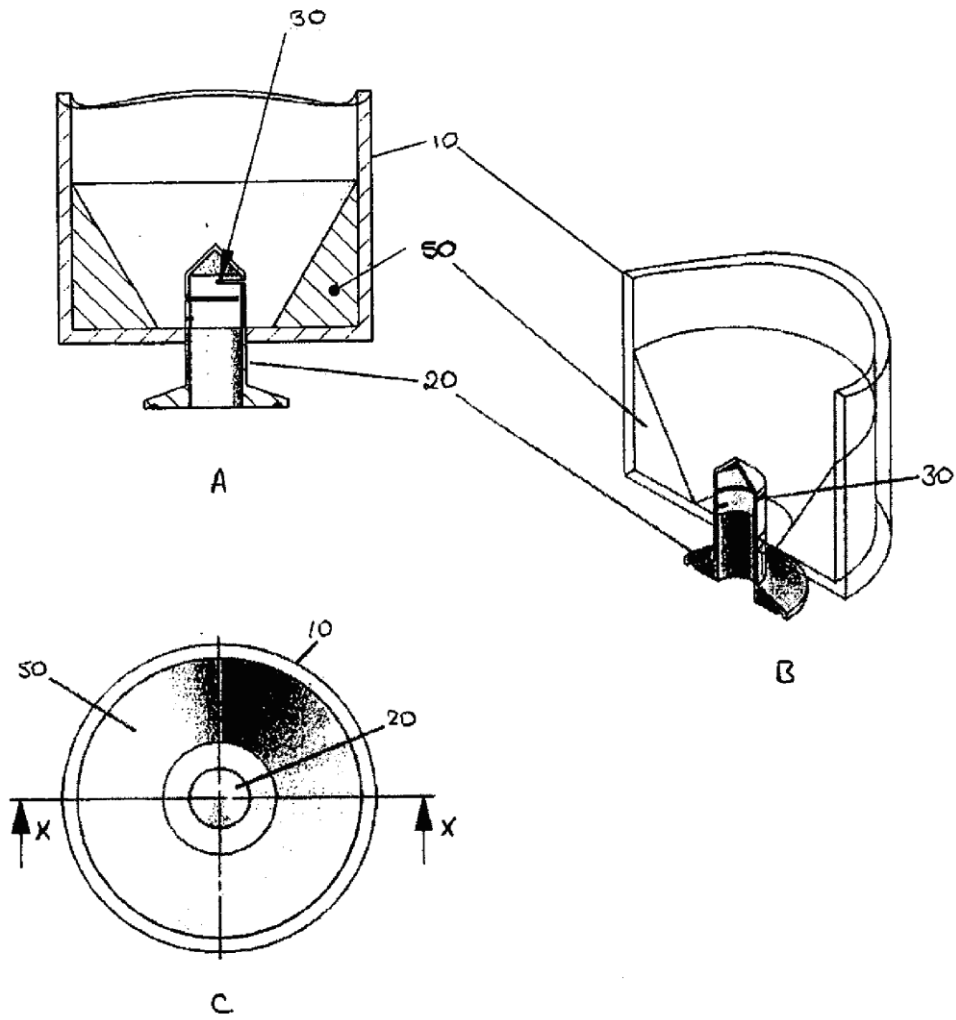


FIGURA 8

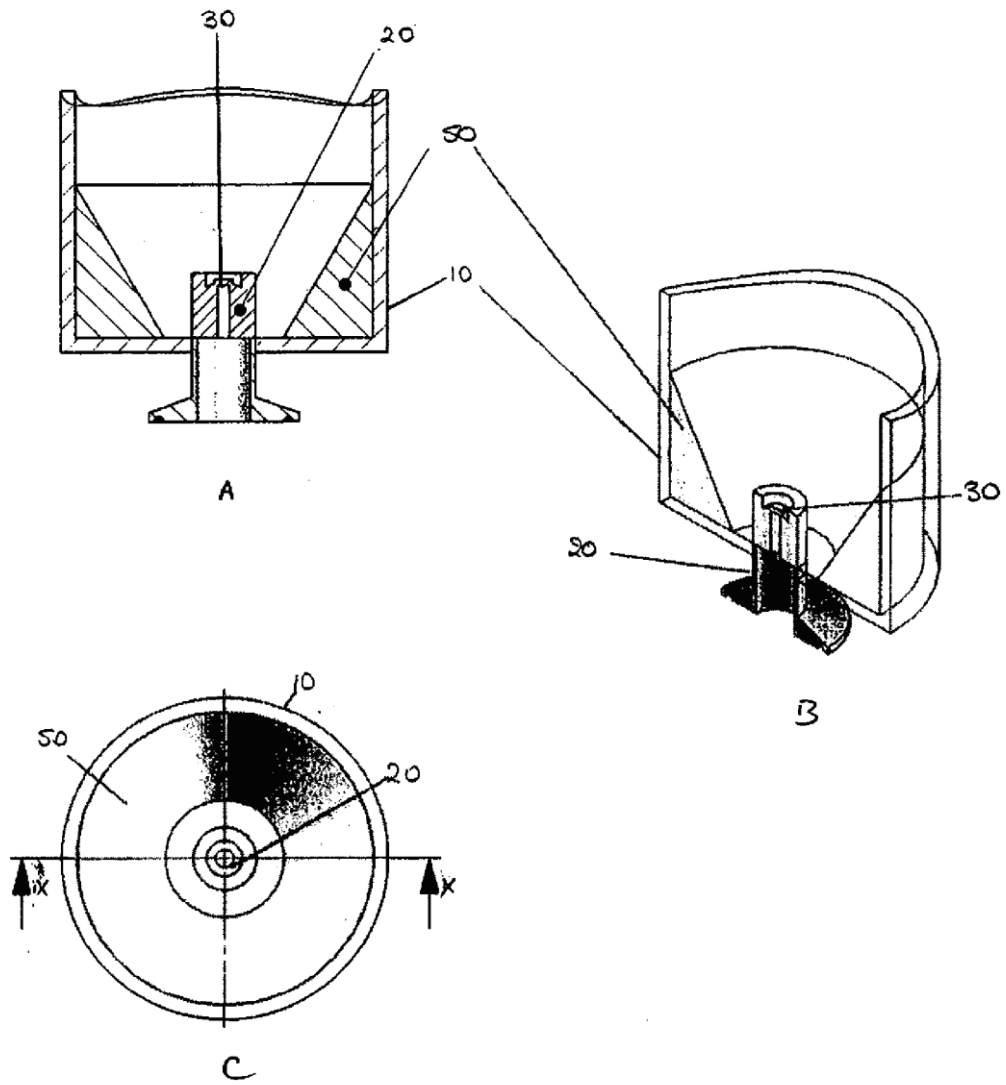


FIGURA 9

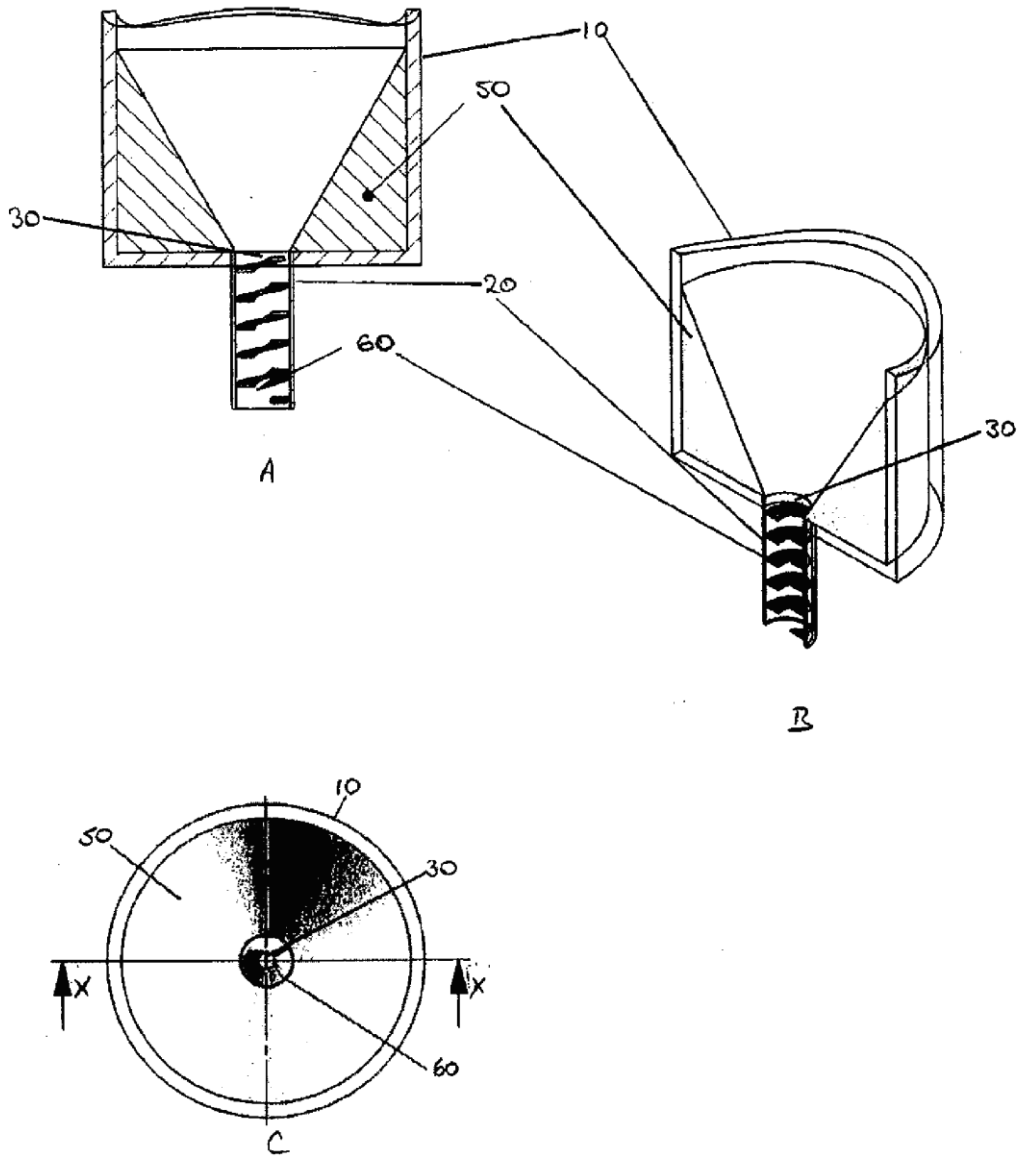


FIGURA 10

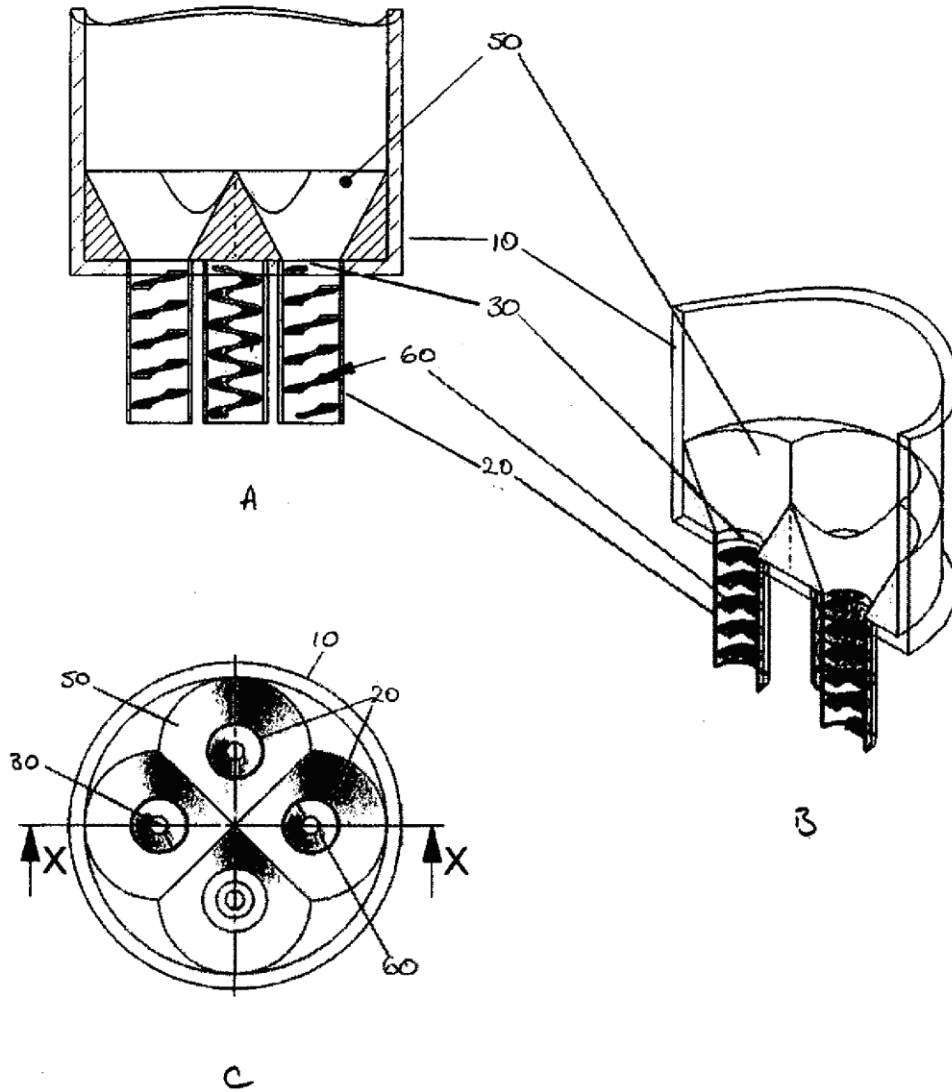


FIGURA 11

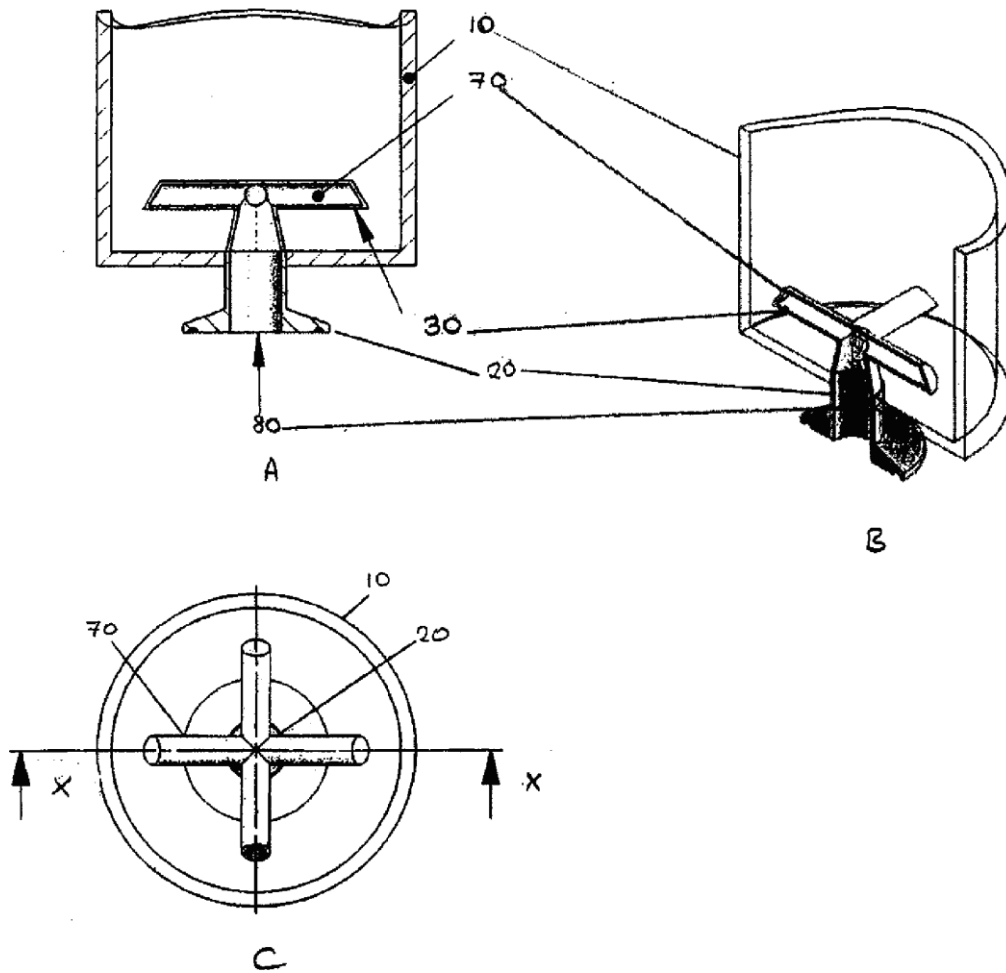


FIGURA 12

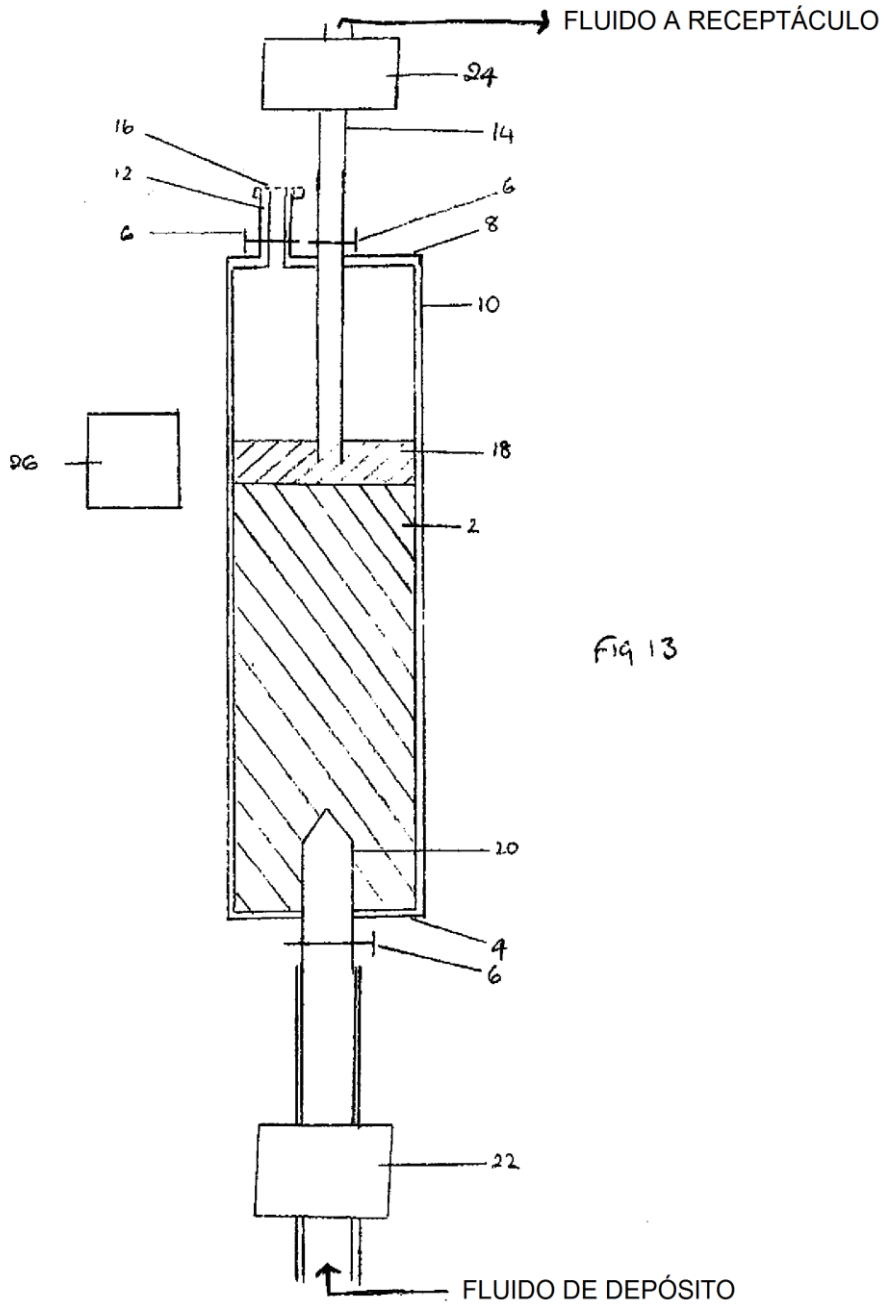


Fig 13

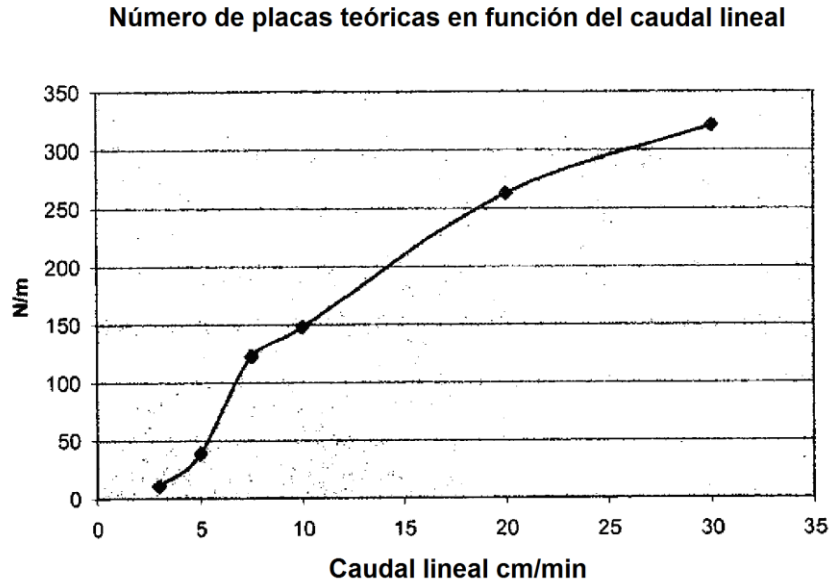


Figura 14



Número de placas teóricas en función del caudal lineal

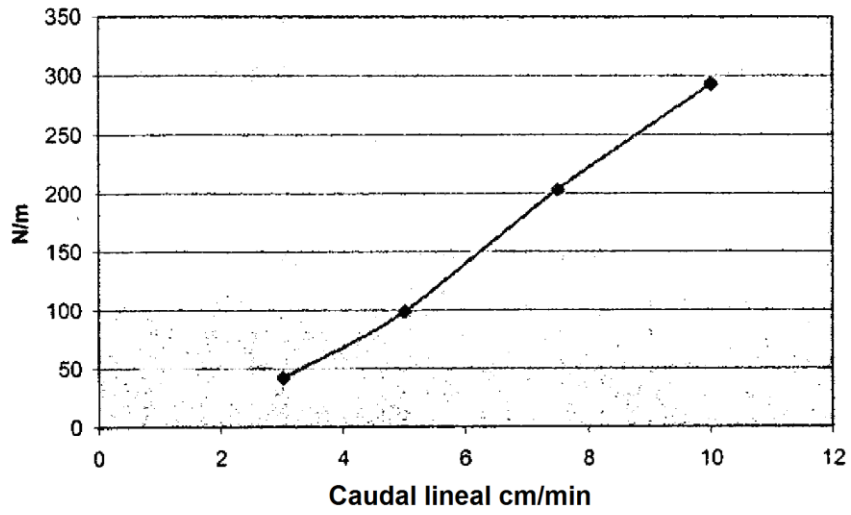


Figura 15

Número de placas teóricas en función del caudal lineal

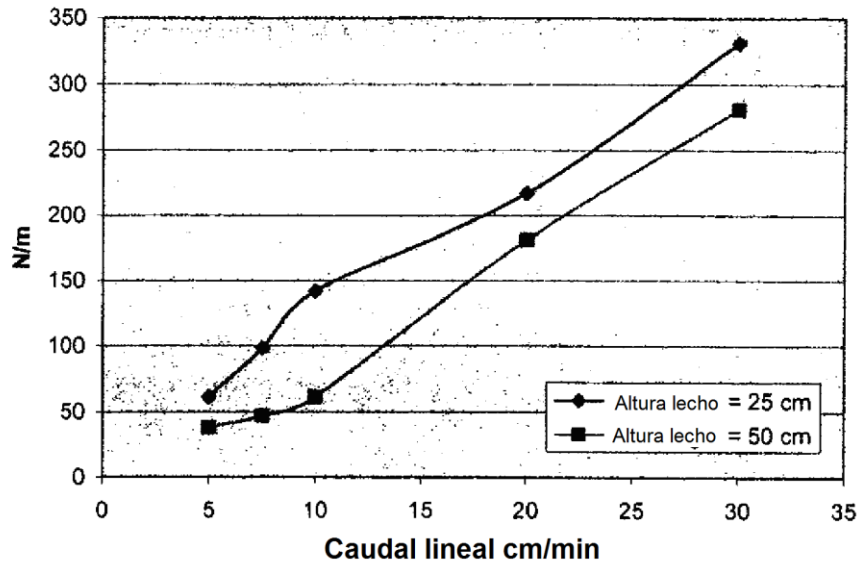


Figura 16

Número de placas teóricas en función del caudal lineal

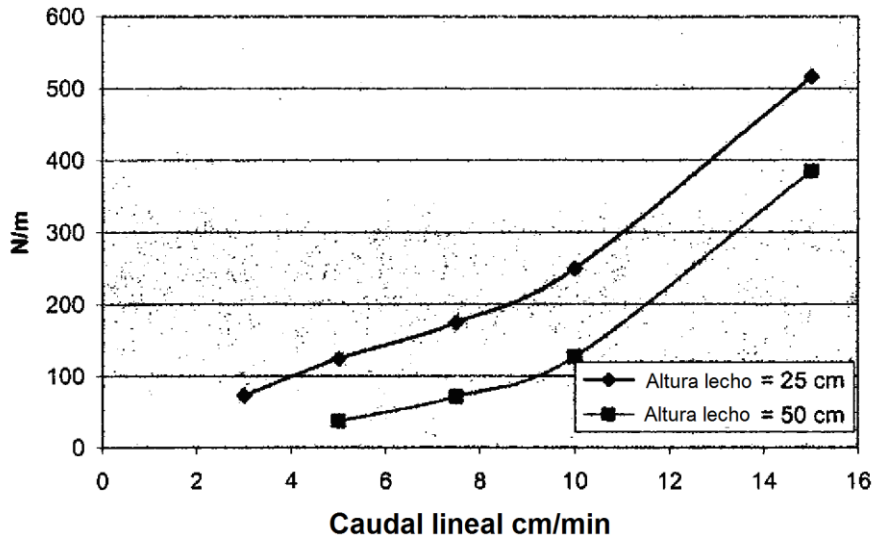


Figura 17