

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 300**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/22** (2006.01)

**G01N 30/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2010 PCT/EP2010/004621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010 E 10740547 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2459291**

54 Título: **Separador de columna de cromatografía móvil**

30 Prioridad:

**30.07.2009 EP 09009859**

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

**24.05.2018**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FALKENSTEIN, ROBERTO y  
BLASCHYK ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 669 300 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

Separador de columna de cromatografía móvil

5 La presente invención se encuentra en el campo de la cromatografía, en más detalle, en el campo de la purificación de polipéptidos mediante procedimientos cromatográficos que emplean columnas de cromatografía. En el presente documento se informa de un separador de columna de cromatografía que puede dividir una columna de cromatografía en una cámara de columna de cromatografía superior y una cámara de columna de cromatografía inferior, y que tiene una posición variable en la columna de cromatografía, es decir, el separador se puede deslizar a lo largo con la compresión dependiente de la presión del material de cromatografía circundante.

**Antecedentes de la invención**

15 Los polipéptidos desempeñan un papel importante en la cartera médica actual. Para su aplicación en seres humanos, cada sustancia farmacéutica ha de satisfacer distintos criterios. Para garantizar la seguridad de los agentes biofarmacéuticos para los seres humanos, se han de retirar especialmente los ácidos nucleicos, virus y proteínas de la célula huésped que provocarían daños graves. Para satisfacer la especificación reglamentaria, una o más etapas de purificación han de seguir el procedimiento de fabricación. Entre otras, la pureza, el rendimiento y la producción desempeñan un papel importante en la determinación de un procedimiento de purificación apropiado.

20 En los procedimientos cromatográficos generales, se emplean columnas de cromatografía que comprenden esencialmente un alojamiento de columna con un elemento de conexión superior e inferior que, a su vez, comprende una entrada en la parte superior de la columna, una salida en la parte inferior de la columna, una frita de columna de cromatografía superior, una frita de columna de cromatografía inferior, una placa de distribución superior y un material cromatográfico.

25 Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, *Chromatography*, 5.<sup>a</sup> edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (eds), Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, Países Bajos, (1998); *Chromatography Today*, Poole, C.F., y Poole, S.K., Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1991); *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice* (1982); *Sambrook, J., et al. (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

35 Para la purificación de inmunoglobulinas, que se han producido, por ejemplo, mediante procedimientos de cultivo celular, en general, se emplea una combinación de diferentes etapas de cromatografía. Normalmente, una cromatografía de afinidad con proteína A se sigue de una o dos etapas de separación adicionales. La etapa de purificación final es la llamada "etapa de pulido" para la retirada de contaminantes e impurezas traza, como inmunoglobulinas agregadas, HCP (proteína de la célula huésped) residual, ADN (ácido nucleico de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para esta etapa de pulido, normalmente se usa un material de intercambio aniónico en un modo de flujo continuo.

45 En el documento WO 2006/048514, se informa de un recipiente que comprende extremos superior e inferior abiertos y conformados de manera complementaria con una mezcla cromatográfica que se dispone en el recipiente, y un filtro de membrana que se fija al extremo inferior del recipiente. En el documento US 6.458.273, se informa de un conjunto de columna de cromatografía de líquidos de alto rendimiento que incluye una columna de carga con una cámara de carga con un primer diámetro interno y una primera longitud en comunicación fluida con una columna de separación que tiene una cámara de separación con un diámetro más pequeño que el diámetro interno de la columna de carga y una longitud mayor que la longitud de la columna de carga.

50 En el documento US 4.719.011, se informa de columnas de cromatografía de líquidos de alta presión que se pueden modificar de manera modular en cuanto a su longitud y/o diámetro interno y pueden contener otros componentes en el sistema modular, por ejemplo, secciones de columna, adaptadores y adaptadores de cono, para unir secciones de columna de diferentes diámetros internos, y unidades de placa terminal para canalizar o evacuar fluidos. En el documento EP 1 916 522, se informa de un dispositivo de columna que comprende una fase estacionaria que tiene una pluralidad de partículas adaptadas para interactuar con una fase móvil a fin de separar diferentes compuestos de un fluido de muestra disuelto en la fase móvil, un alojamiento para alojar al menos parcialmente la fase estacionaria y un separador que separa secciones de la fase estacionaria y que se acopla a la fuerza con el alojamiento.

55 En el documento WO 00/010675, se informa de una columna de cromatografía segmentada que incluye una pluralidad de lechos de medio separados y delimitados por una pluralidad de elementos porosos. En el documento US 3.398.512, se informa de un aparato de cromatografía. En el documento US 3.453.811, se informa de columnas de cromatografía con elementos de reparto en las mismas. En el documento EP-A 1 892 526, se informa de una columna y una columna con cartucho que usa la misma. En el documento US 3.657.864, se informa de un sistema

de separación para la resolución de mezclas volátiles.

En el documento US 5.667.676 se informa de una columna cromatográfica de flujo vertical, de volumen fijo, que comprende un elemento de columna que tiene una cámara interna para contener el sorbente particulado en un espacio rodeado por paredes laterales y dos fritas lisas, una en la parte superior y otra en la parte inferior.

### Sumario de la invención

Este separador como se informa en el presente documento permite el reemplazo del material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía superior sin la necesidad de reemplazar el material de columna de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior, también permite, por ejemplo, la combinación de dos materiales de cromatografía diferentes con diferentes grupos funcionales cromatográficos en una columna de cromatografía, y en presencia del separador, se pueden proporcionar columnas de cromatografía rellenas más homogéneamente. Además, el separador como se informa en el presente documento reduce la contrapresión ejercida por la columna, es decir, reduce la presión en el interior la columna. En cada separador añadido al relleno de la columna se induce un descenso de presión.

Un aspecto de la invención es una columna de cromatografía que comprende uno o más separadores de columna de cromatografía móviles que comprenden

un anillo de guía de forma circular (2) que tiene una sección transversal vertical que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas (5 y 6),

en el que cada una de las áreas en sección transversal axialmente simétricas tiene

- a) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía, y
- b) una muesca (8) con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita

y

una frita (1) montada en el anillo de guía,

con lo que cualquier separador de columna de cromatografía está en contacto con un primer material de cromatografía y en contacto con un segundo material de cromatografía, con lo que el primer y el segundo material de cromatografía son

- a) materiales de cromatografía con el mismo grupo funcional cromatográfico y del mismo o diferente tamaño de partícula, o
- b) materiales de cromatografía con diferentes grupos funcionales cromatográficos.

En el presente documento se informa de un anillo de guía de forma circular para su uso en una columna de cromatografía de líquidos, caracterizado por que el anillo de guía tiene una sección transversal vertical que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas (5 y 6), en el que cada una de las áreas en sección transversal axialmente simétricas tiene

- a) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía, y
- b) una muesca (8) con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita.

En un modo de realización, la muesca es una muesca rectangular. En otro modo de realización, cada una de las áreas en sección transversal tiene una forma triangular y el lado más largo (7) tiene una longitud de al menos 1,5 veces el diámetro de la muesca (8). En otro modo de realización, el anillo está hecho de caucho, plástico, silicona, politetrafluoroetileno, polietileno o polipropileno.

En el presente documento también se informa del uso de un anillo de guía como se informa en el presente documento para montar una frita en una columna de cromatografía de líquidos cilíndrica.

En el presente documento también se informa de un separador de columna de cromatografía que comprende un anillo de guía como se informa en el presente documento y una frita montada en el anillo de guía.

En un modo de realización, la frita es

- a) una única frita, o

b) dos fritas con una frita superior y una frita inferior.

En otro modo de realización a) la frita tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  o b) cada una de las fritas tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  independientemente la una de la otra, con lo que el tamaño de poro de la frita superior es más pequeño que el tamaño de poro de la frita inferior. En otro modo de realización, la frita está hecha de metal, silicona, polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, materiales sinterizados o combinaciones de los mismos. En otro modo de realización, el separador comprende soportes a distancia, todos unidos a un lado del separador.

10 En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía se caracteriza por que

a) el separador separa una columna de cromatografía en una cámara de columna de cromatografía superior y una cámara de columna de cromatografía inferior, y

15 b) el separador tiene una posición variable en la columna de cromatografía al deslizarse a lo largo de la pared interna de la columna de cromatografía.

En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía comprende una frita, en otro modo de realización, el separador comprende una frita superior y una frita inferior. En otro modo de realización, el separador de columna de cromatografía o dicha frita superior o dicha frita inferior tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , con lo que el tamaño de poro de la frita superior es más pequeño que el tamaño de poro de la frita inferior. En otro modo de realización, la frita está hecha de metal, silicona, polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, materiales sinterizados o combinaciones de los mismos. En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía tiene tres o más soportes a distancia unidos a un lado. En un modo de realización específico, los soportes a distancia se unen al lado del separador de columna de cromatografía con el tamaño de poro más grande.

En el presente documento se informa del uso de un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para dividir una columna de cromatografía en cámaras. En el presente documento se informa del uso de un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para separar una columna de cromatografía en una cámara de columna de cromatografía superior y una cámara de columna de cromatografía inferior. En el presente documento todavía se informa del uso de un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para separar el material de cromatografía en una columna de cromatografía en dos fracciones distintas. En el presente documento también se informa del uso de un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para separar dos materiales de cromatografía diferentes en una columna de cromatografía.

En el presente documento se informa adicionalmente del uso de un separador de columna de cromatografía de acuerdo con la invención para separar una columna de cromatografía que contiene un material de cromatografía en dos cámaras separadas, con lo que se incluye el separador de columna de cromatografía en un material de cromatografía en una columna de cromatografía, el uso de un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para separar una columna de cromatografía que contiene un material de cromatografía en dos cámaras separadas, con lo que el separador de columna de cromatografía separa dos materiales de cromatografía diferentes en una columna de cromatografía.

Todavía un aspecto como se informa en el presente documento es una columna de cromatografía que comprende al menos un, es decir, uno o más, separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento. En un modo de realización, la columna de cromatografía comprende uno o dos separadores de columna de cromatografía. En otro modo de realización de este aspecto, cualquier separador de columna de cromatografía está en contacto con un primer material de cromatografía y en contacto con un segundo material de cromatografía, con lo que el primer y el segundo material de cromatografía son

a) materiales de cromatografía con el mismo grupo funcional cromatográfico y del mismo o diferente tamaño de partícula, o

b) materiales de cromatografía con diferentes grupos funcionales cromatográficos.

Otro aspecto como se informa en el presente documento es el uso de una columna de cromatografía que comprende al menos un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento para la purificación de un polipéptido.

En el presente documento también se informa de un dispositivo de aplicación de separador de columna de cromatografía, con lo que el dispositivo tiene en su parte inferior una forma que es inversa a la forma de la superficie superior del separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento y un diámetro que es más pequeño que el diámetro externo del anillo de guía.

**Descripción detallada de la invención**

En el presente documento se informa de un anillo de guía de forma circular para su uso en una columna de cromatografía de líquidos, caracterizado por que el anillo de guía tiene una sección transversal vertical que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas, en el que cada una de las áreas en sección transversal axialmente simétricas tiene

5

- a) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía, y
- b) una muesca con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita.

10

Se informa de un separador de columna de cromatografía para separar un material de cromatografía en una columna de cromatografía en dos partes separadas, con lo que

15

- a) el separador separa la columna de cromatografía en una cámara de columna de cromatografía superior y una cámara de columna de cromatografía inferior, y
- b) el separador tiene una posición variable en la columna de cromatografía, y
- c) el separador se incluye en el material de cromatografía.

20

En cromatografía en columna, al menos uno o más polipéptidos de interés, es decir, uno o más polipéptidos que se van a purificar, se separan de otros polipéptidos y sustancias sin interés mediante un procedimiento de separación cromatográfica por medio de la interacción con un material de cromatografía.

25

El término "polipéptido" indica un polímero que consiste en residuos aminoacídicos unidos por enlaces peptídicos, bien producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoacídicos se pueden denominar "péptidos". Un polipéptido que comprende una o más cadenas aminoacídicas o una cadena aminoacídica de 100 o más residuos aminoacídicos se puede denominar "proteína". Los polipéptidos también pueden comprender adicionalmente componentes no aminoacídicos, tales como grupos glucídicos. Se pueden añadir grupos glucídicos y otros componentes no aminoacídicos por la célula en la que se produce el polipéptido, y variarán con el tipo de célula. Se definen polipéptidos en términos de sus estructuras de cadena principal aminoacídica; los sustituyentes, tales como los grupos glucídicos, no se especifican generalmente, pero, no obstante, pueden estar presentes. En un modo de realización, el polipéptido es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o una proteína de fusión que comprende una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina.

30

35

El término "inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende en general dos polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera, LC) y dos polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada, HC). Cada una de las cadenas pesada y ligera comprende una región variable (generalmente la porción aminoterminal de la cadena) que contiene regiones de unión específica (CDR, región determinante de la complementariedad) que interaccionan con el antígeno. Cada una de las cadenas pesada y ligera también comprende una región constante (generalmente, la porción carboxiterminal de las cadenas) que media en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario, algunas células fagocíticas y un primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. En general, una cadena ligera comprende un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, mientras que una cadena pesada comprende un dominio variable de la cadena pesada, una región bisagra y dominios constantes de la cadena pesada, es decir, un dominio C<sub>H</sub>1, un dominio C<sub>H</sub>2, un dominio C<sub>H</sub>3 y opcionalmente un dominio C<sub>H</sub>4. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, los fragmentos F<sub>v</sub>, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como cadenas sencillas (por ejemplo, Huston, J.S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., *et al.*, Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood, L.E., *et al.*, Immunology, Benjamin N.Y., 2.<sup>a</sup> edición (1984) y Hunkapiller, T., y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16). Dependiendo de la secuencia aminoacídica de los dominios constantes de la cadena pesada, se asignan inmunoglobulinas a diferentes clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase de inmunoglobulina a la que pertenece una inmunoglobulina, las regiones constantes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas se llaman a (IgA), d (IgD), e (IgE), g (IgG) y m (IgM), respectivamente. Además, son posibles dos tipos de cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena ligera de tipo lambda y una cadena ligera de tipo kappa.

40

45

50

55

60

65

El término "material de cromatografía" como se usa en esta solicitud indica, por un lado, un material sólido que se puede usar sin modificación adicional en una purificación cromatográfica de un polipéptido de interés, tal como hidroxipatita, y también un material que comprende un material de núcleo a granel que se ha modificado mediante la introducción/acoplamiento de grupos funcionales cromatográficos, por ejemplo, mediante enlaces covalentes, tales como SP-Sephrose®. Se entiende que el material de núcleo a granel no está implicado en la separación cromatográfica, es decir, en la interacción entre el polipéptido que se va a separar y los grupos funcionales cromatográficos del material de cromatografía. Meramente se proporciona un marco tridimensional al que se unen los grupos funcionales cromatográficos y que garantiza que la solución que contiene el polipéptido que se va a

purificar pueda acceder a los grupos funcionales cromatográficos. En un modo de realización, el material de núcleo a granel es una fase sólida. Por tanto, en otro modo de realización, el "material de cromatografía" es una fase sólida a la que se unen grupos funcionales cromatográficos. En otro modo de realización, el "grupo funcional cromatográfico" es un grupo hidrófobo ionizable, o un grupo hidrófobo, o un grupo complejo en el que se combinan diferentes grupos funcionales cromatográficos a fin de unirse solo a un determinado tipo de polipéptido, o un grupo cargado positiva o negativamente unido covalentemente.

Generalmente, el polipéptido que se va a purificar se aplica al material de cromatografía como una solución acuosa tamponada.

El término "aplicar a" y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en esta solicitud indica una etapa parcial de una purificación cromatográfica de un polipéptido en la que una solución que contiene el polipéptido de interés que se va a purificar se pone en contacto con el material de cromatografía. Esto indica que la solución que contiene el polipéptido que se va a purificar se añade a la columna de cromatografía que contiene el material de cromatografía en la entrada superior de la columna. La solución que contiene el polipéptido de interés que se va a purificar pasa a través del material de cromatografía, permitiendo así una interacción entre el material de cromatografía y las sustancias en solución. Dependiendo de las condiciones, tales como, por ejemplo, pH, conductividad, concentración de sal, temperatura y/o caudal, las sustancias contenidas en la solución interaccionan específicamente con el material de cromatografía, con lo que su movimiento a través de la columna de cromatografía se efectúa dependiendo de la interacción con el material de cromatografía. El polipéptido de interés se puede recuperar de la solución obtenida después de la etapa de purificación, es decir, del eluido, mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica, tales como, por ejemplo, precipitación, desestabilización salina, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, cromatografía de afinidad o reducción del volumen del disolvente para obtener la sustancia de interés en una forma sustancialmente homogénea.

El término "tamponada" como se usa en esta solicitud indica una solución en la que los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas se nivelan mediante una sustancia tampón. Se puede usar cualquier sustancia tampón que dé como resultado dicho efecto. En un modo de realización, se usan sustancias tampón farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, ácido fosfórico o sales del mismo, ácido acético o sales del mismo, ácido cítrico o sales del mismo, morfolina o sales de la misma, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico o sales del mismo, histidina o sales de la misma, glicina o sales de la misma o tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sales del mismo. En un modo de realización, la sustancia tampón es ácido fosfórico o sales del mismo, o ácido acético o sales del mismo, o ácido cítrico o sales del mismo, o histidina o sales de la misma. Opcionalmente, la solución tamponada puede comprender una sal adicional, tal como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio.

En un procedimiento de purificación por cromatografía en columna de líquidos, el material de cromatografía se localiza en un alojamiento de columna y se indica como "fase estacionaria". Para posibilitar que una fase estacionaria interaccione con sustancias/polipéptidos en una solución aplicada a la misma, la fase estacionaria se rodea de/se incluye en una "fase móvil". El término "fase móvil" indica un líquido, por ejemplo, una solución acuosa tamponada, una mezcla de agua y un disolvente orgánico, o un disolvente orgánico, que se usa en el procedimiento de purificación cromatográfica en el que se emplea una fase estacionaria.

Están bien establecidos y se usan ampliamente diferentes procedimientos de cromatografía para la recuperación y purificación de polipéptidos, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con Phenyl-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelatos de metal (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (véase, por ejemplo, Vijayalakshmi, M. A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

El término "cromatografía de inducción de carga hidrófoba", abreviado "HCIC", indica un procedimiento de cromatografía que emplea un "material de cromatografía de inducción de carga hidrófoba". Un "material de cromatografía de inducción de carga hidrófoba" es un material de cromatografía que comprende grupos funcionales cromatográficos que, en un intervalo de pH, pueden formar enlaces hidrófobos con la sustancia/polipéptido que se va a purificar y que se cargan positiva o bien negativamente en otros intervalos de pH, es decir, la HCIC usa grupos hidrófobos ionizables como grupo funcional cromatográfico. Generalmente, el polipéptido se une al material de inducción de carga hidrófoba en condiciones de pH neutro y después se recupera mediante la generación de repulsión de carga mediante un cambio del valor de pH. Un "material de cromatografía de inducción de carga hidrófoba" ejemplar es BioSeptra MEP o HEA Hypercel (Pall Corp., EE. UU.).

El término "cromatografía de interacción hidrófoba", abreviado "HIC", indica un procedimiento de cromatografía en el que se emplea un "material de cromatografía de interacción hidrófoba". Un "material de cromatografía de interacción hidrófoba" es un material de cromatografía al que se unen grupos hidrófobos, tales como grupos butilo, octilo o

fenilo, como grupos funcionales cromatográficos. Aplicados a los polipéptidos, se separan dependiendo de la hidrofobia de sus cadenas laterales aminoacídicas expuestas a superficie, que pueden interactuar con los grupos hidrófobos del material de cromatografía de interacción hidrófoba. Las interacciones entre los polipéptidos y el material de cromatografía se pueden ver influenciadas por la temperatura, el disolvente y la fuerza iónica del disolvente. Un incremento de la temperatura, por ejemplo, facilita la interacción entre el polipéptido y el material de cromatografía de interacción hidrófoba a medida que se incrementa el movimiento de las cadenas laterales aminoacídicas y se vuelven accesibles las cadenas laterales aminoacídicas hidrófobas alojadas en el interior del polipéptido a temperaturas más bajas. También se promueve la interacción hidrófoba mediante sales cosmótropas y se disminuye mediante sales caótropas. Los "materiales de cromatografía de interacción hidrófoba" son, por ejemplo, Phenylsepharose CL-4B, 6 FF, HP, Phenyl Superose, Octyl-Sepharose CL-4B, 4 FF y Butylsepharose 4 FF (todos disponibles de Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Alemania), que se obtienen por medio de acoplamiento de éter glicídico al material a granel.

El término "cromatografía de afinidad" como se usa en esta solicitud indica un procedimiento de cromatografía que emplea un "material de cromatografía de afinidad". En una cromatografía de afinidad, los polipéptidos se separan basándose en su actividad biológica o estructura química dependiendo de la formación de interacciones electrostáticas, enlaces hidrófobos y/o formación de enlaces de hidrógeno con respecto a los grupos funcionales cromatográficos del material de cromatografía. Para recuperar el polipéptido unido específicamente del material de cromatografía de afinidad, se añade un ligando competidor o bien se cambian las condiciones de cromatografía, tales como el valor de pH, la polaridad o la fuerza iónica del tampón. Un "material de cromatografía de afinidad" es un material de cromatografía que comprende un grupo funcional cromatográfico complejo en el que se combinan diferentes grupos funcionales cromatográficos únicos a fin de unirse solo a un determinado tipo de polipéptido. Este material de cromatografía se une específicamente a un determinado tipo de polipéptido dependiendo de la especificidad de su grupo funcional cromatográfico. Los "materiales cromatográficos de afinidad" ejemplares son un "material de cromatografía de quelación de metales", tal como los materiales que contienen Ni(II)-NTA o Cu(II)-NTA, para la unión de polipéptidos de fusión que contienen una marca de hexahistidina o polipéptidos con una multitud de residuos de histidina, cisteína y/o triptófano expuestos a superficie, o un "material de cromatografía de unión a anticuerpo", tal como la proteína A, o un "material de cromatografía de unión a enzima", tal como los materiales de cromatografía que comprenden análogos de sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos o inhibidores enzimáticos como grupo funcional cromatográfico, o un "material de cromatografía de unión a lectina", tal como los materiales de cromatografía que comprenden polisacáridos, receptores de superficie celular, glucoproteínas o células inalteradas como grupo funcional cromatográfico.

El término "cromatografía de quelación de metales" como se usa en esta solicitud indica un procedimiento de cromatografía que emplea un "material de cromatografía de quelación de metales". La cromatografía de quelación de metales se basa en la formación de quelatos entre un ion de metal, tal como Cu(II), Ni(II) o Zn(II), que se une a un material de núcleo a granel como grupos funcionales cromatográficos, y grupos donantes de electrones de cadenas laterales aminoacídicas expuestas a superficie de polipéptidos, especialmente con cadenas laterales que contienen imidazol y cadenas laterales que contienen grupos tiol. El quelato se forma a valores de pH en los que esas cadenas laterales no están protonadas al menos parcialmente. El polipéptido unido se recupera del material de cromatografía mediante un cambio en el valor de pH, es decir, mediante protonación. Los "materiales de cromatografía de quelación de metales" ejemplares son HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Alemania) o Fractogel EMD (EMD Chemicals Inc, EE. UU.).

El término "cromatografía de intercambio iónico" como se usa en esta solicitud indica un procedimiento de cromatografía que emplea un "material de cromatografía de intercambio iónico". El término "material de cromatografía de intercambio iónico" engloba, dependiendo de si se intercambia un catión en una "cromatografía de intercambio catiónico", un "material de cromatografía de intercambio catiónico", o de si se intercambia un anión en una "cromatografía de intercambio aniónico", un "material de cromatografía de intercambio aniónico". El término "material de cromatografía de intercambio iónico" como se usa en esta solicitud indica una fase sólida inmóvil de alto peso molecular que tiene grupos cargados unidos covalentemente como grupos funcionales cromatográficos. Para obtener la neutralidad de carga global, los contraiones no unidos covalentemente se asocian con los grupos cargados unidos covalentemente. El "material de cromatografía de intercambio iónico" tiene la capacidad de intercambiar sus contraiones no unidos covalentemente por iones cargados de manera similar de la solución circundante. Dependiendo de la carga de sus contraiones intercambiables, el "material de cromatografía de intercambio iónico" se denomina "material de cromatografía de intercambio catiónico" o "material de cromatografía de intercambio aniónico". Adicionalmente, dependiendo de la naturaleza del grupo cargado, el "material de cromatografía de intercambio iónico" se denomina, por ejemplo, material de cromatografía de intercambio catiónico con grupos ácido sulfónico (S) o grupos carboximetilo (CM). Dependiendo de la naturaleza química del grupo cargado, el "material de cromatografía de intercambio iónico" se puede clasificar adicionalmente como material de cromatografía de intercambio iónico fuerte o débil, dependiendo de la fuerza del sustituyente cargado unido covalentemente. Por ejemplo, los materiales de cromatografía de intercambio catiónico fuerte tienen un grupo ácido sulfónico como grupo funcional cromatográfico y los materiales de cromatografía de intercambio catiónico débil tienen un grupo ácido carboxílico como grupo funcional cromatográfico. Los "materiales de cromatografía de intercambio catiónico", por ejemplo, están disponibles bajo diferentes nombres de una multitud de empresas, tales como, por ejemplo, Bio-Rex, Macro-Prep CM (disponible de Biorad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.),

5 intercambiador catiónico débil WCX 2 (disponible de Ciphergen, Fremont, CA, EE. UU.), Dowex® MAC-3 (disponible de Dow Chemical Company Liquid Separations, Midland, MI, EE. UU.), Mustang C (disponible de Pall Corporation, East Hills, NY, EE. UU.), celulosa CM-23, CM-32, CM-52, Hyper-D y Partisphere (disponible de Whatman plc, Brentford, Reino Unido), Amberlite® IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (disponible de Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania), CM 1500, CM 3000 (disponible de BioChrom Labs, Terre Haute, IN, EE. UU.) y CM-Sepharose™ de flujo rápido (disponible de GE Healthcare - Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo, Alemania).

10 El término "cromatografía con hidroxiapatita" como se usa en esta solicitud indica un procedimiento de cromatografía que emplea una determinada forma de fosfato de calcio como material de cromatografía. Los materiales de cromatografía con hidroxiapatita ejemplares son Bio-Gel HT, Bio-Gel HTP, Macro-Prep Ceramic (disponible de Biorad Laboratories), hidroxiapatita de tipo I, de tipo II, HA Ultrogel (Sigma Aldrich Chemical Corp., EE. UU.), hidroxiapatita de flujo rápido y de alta resolución (Calbiochem) o TSK gel HA-1000 (Tosoh Haas Corp., EE. UU.).

15 El término "modo de unión y elución" y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en la presente invención indica un modo de funcionamiento de un procedimiento de cromatografía, en el que se aplica una solución que contiene un polipéptido que se va a purificar a un material de cromatografía, con lo que la sustancia/polipéptido que se va a purificar se une al material de cromatografía. Como resultado, la sustancia/polipéptido que se va a purificar queda retenido en el material de cromatografía, mientras que las sustancias/polipéptidos sin interés se retiran con el flujo continuo. La sustancia/polipéptido que se va a purificar se eluye después del material de cromatografía en una segunda etapa y se recupera así de la fase estacionaria con una solución de elución. Esto no indica necesariamente que se retira un 100 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, pero esencialmente se retira un 100 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, es decir, en un modo de realización se retira al menos un 50 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, en otro modo de realización se retira al menos un 75 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, en otro modo de realización se retira al menos un 90 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, y en un modo de realización se retira más de un 95 % de las sustancias/polipéptidos sin interés.

30 El término "modo de flujo continuo" y equivalentes gramaticales del mismo como se usa en la presente invención indica un modo de funcionamiento de un procedimiento de cromatografía, en el que se aplica una solución que contiene una sustancia/polipéptido que se va a purificar a un material de cromatografía, con lo que la sustancia/polipéptido que se va a purificar no se une al material de cromatografía. Como resultado, se obtiene la sustancia/polipéptido que se va a purificar en el flujo continuo. Las sustancias/polipéptidos sin interés, que también estaban presentes en la solución, se unen al material de cromatografía y se retiran de la solución. Esto no indica necesariamente que se retira de la solución un 100 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, pero esencialmente se retira un 100 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, es decir, en un modo de realización se retira de la solución al menos un 50 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, en otro modo de realización se retira de la solución al menos un 75 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, en otro modo de realización se retira de la solución al menos un 90 % de las sustancias/polipéptidos sin interés, y en un modo de realización se retira de la solución más de un 95 % de las sustancias/polipéptidos sin interés.

45 Los términos "elución continua" y "procedimiento de elución continua", que se usan indistintamente en esta solicitud, indican un procedimiento de cromatografía en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que provoca la elución, es decir, la disolución de una sustancia/polipéptido unido de un material de cromatografía, se aumenta o reduce continuamente, es decir, se cambia la concentración mediante una secuencia de pequeñas etapas, cada una no más grande que un cambio en un modo de realización de un 2 %, en otro modo de realización de un 1 %, de la concentración de la sustancia que provoca la elución. En esta "elución continua", una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de un procedimiento de cromatografía, se pueden cambiar linealmente, o cambiar exponencialmente o cambiar asintóticamente. En un modo de realización, el cambio es lineal.

55 Los términos "elución por etapas" y "procedimiento de elución por etapas", que se usan indistintamente en esta solicitud, indican un procedimiento de cromatografía en el que, por ejemplo, la concentración de una sustancia que provoca la elución, es decir, la disolución de una sustancia/polipéptido unido de un material de cromatografía, se aumenta o reduce de una vez, es decir, en un modo de realización directamente desde un valor/nivel al siguiente valor/nivel. En esta "elución por etapas", una o más condiciones, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, la concentración de una sal y/o el flujo de un procedimiento de cromatografía, se cambia(n) todas a la vez desde un primer valor, por ejemplo, inicial, a un segundo valor, por ejemplo, final. En un modo de realización, el cambio en la etapa es más grande que un cambio de un 5 %, en otro modo de realización más grande que un cambio de un 10 %, de la concentración de la sustancia que provoca la elución. A diferencia de un cambio lineal, la "elución por etapas" indica que las condiciones se cambian incrementalmente, es decir, escalonadamente. En el "procedimiento de elución por etapas" después de cada incremento, se obtiene una nueva fracción. Después de cada incremento, se mantienen las condiciones hasta la siguiente etapa en el procedimiento de elución.

65 En el presente documento se informa de un separador de columna de cromatografía para su uso en una columna de cromatografía. La presencia de un separador divide la columna de cromatografía en una cámara de columna de

5 cromatografía superior y una cámara de columna de cromatografía inferior, y el separador tiene una posición variable en la columna de cromatografía proporcionada por el anillo de guía, es decir, se puede deslizar verticalmente en la columna dependiendo de la compresión y expansión dependientes de la presión del material de cromatografía, y el separador se incluye en el material de cromatografía.

5 En una separación o purificación por cromatografía en columna de un polipéptido en bruto, se emplea normalmente una columna de cromatografía que comprende un material de cromatografía y una fase móvil. La fase móvil se hace pasar a la fuerza a través de la columna de cromatografía y, con ello, a través del material de cromatografía aplicando presión a la fase móvil. Mediada por la fase móvil, también se aplica la presión al material de cromatografía, con lo que se establece un descenso de presión desde la entrada de la columna de cromatografía a la salida de la columna de cromatografía. En la salida de la columna de cromatografía, la presión ha descendido hasta la presión atmosférica exterior. Por tanto, a la fracción superior del material de cromatografía en la columna de cromatografía se aplica la fuerza de presión más alta.

15 La presión aplicada normalmente depende, por un lado, del tamaño de partícula del material de cromatografía, así como de la viscosidad de la fase móvil a medida que se fija un flujo constante a través de la columna de cromatografía, pero no una presión constante. Generalmente, se incrementa la presión con la disminución del tamaño de partícula del material de cromatografía. A un caudal constante a través del material de cromatografía, un cambio en la viscosidad de la fase móvil, por ejemplo, durante la regeneración o limpieza del material de cromatografía, da como resultado un cambio de la presión aplicada al material de cromatografía. El material de cromatografía no es en general un material insensible a la presión, es decir, se puede comprimir y expandir después de una compresión.

20 Por lo tanto, con un incremento de la presión aplicada, el material de cromatografía se comprime y la altura del material de cromatografía en el interior de la columna, es decir, la altura de lecho, se reduce. De manera similar, con una disminución de la presión aplicada, el material de cromatografía se expande de nuevo y se incrementa la altura del material de cromatografía en el interior de la columna como máximo a la altura antes de la aplicación de la presión. Esta compresión y expansión del material de cromatografía es, al mismo tiempo, un proceso macroscópico de todo el material de cromatografía, y un proceso microscópico de las partículas individuales del material de cromatografía. Con números crecientes de dichos ciclos de compresión-expansión, las partículas del material de cromatografía se descomponen en partículas más pequeñas. Con un tamaño de partícula decreciente de las partículas del material de cromatografía, el relleno del material de cromatografía se vuelve más compacto y, con ello, al mismo tiempo se incrementa la presión requerida para mantener un flujo de fase líquida constante a través de la columna, es decir, el material de cromatografía. Esto, a su vez, da como resultado de nuevo una descomposición adicional de las partículas del material de cromatografía que, de nuevo, da como resultado una presión incrementada, etc.

35 Se puede hacer funcionar generalmente una separación en columna de cromatografía hasta una presión máxima. Cuando se alcanza este límite de presión superior, se ha de reemplazar el relleno de la columna de cromatografía en su totalidad.

40 Se ha descubierto que un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento que consiste en un anillo de guía y una frita montada en el mismo no interfiere con el procedimiento de separación cromatográfica, pero posibilita que solo se pueda intercambiar una fracción del material de cromatografía, por ejemplo, cuando se alcanza la presión de funcionamiento máxima, sin la necesidad de reemplazar todo el relleno de la columna de cromatografía. Es decir, el separador de columna de cromatografía de acuerdo con la presente invención permite que el material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía superior se intercambie sin interferir con el material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior. Por tanto, es posible retirar una fracción limitada de todo el material de cromatografía contenido en una columna de cromatografía que contiene un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento, por ejemplo, después de que esta fracción se haya alterado o fragmentado o la calidad del relleno se haya reducido, sin la necesidad de retirar también la otra fracción del material de cromatografía. Esta retirada parcial del material de cromatografía es posible, ya que el separador, por un lado, divide el material de cromatografía total en la columna de cromatografía en fracciones distintas y, por otro lado, evita que el material de cromatografía relleno en la cámara de columna de cromatografía inferior se vea perturbado tras la retirada del material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía superior. Por tanto, se puede usar adicionalmente al menos la fracción del material de cromatografía que no se esponga a los cambios de presión máxima y, por tanto, no se fragmente, sin un impacto negativo en la eficacia de la separación. Pero, reteniendo una fracción del material de cromatografía, se puede lograr una reducción del coste de los productos.

60 El separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento comprende un anillo de guía en el que se puede montar una frita hecha de cualquier material inerte. Un "material inerte" es un material que no interfiere con el procedimiento de separación por cromatografía, es decir, un cromatograma obtenido con una columna de cromatografía que contiene uno o más separadores de columna de cromatografía como se informa en el presente documento es idéntico a un cromatograma obtenido con una columna de cromatografía que no contiene separadores de columna de cromatografía en/con condiciones de otro modo idénticas. Dichos materiales inertes

son, por ejemplo, metal, especialmente acero inoxidable, silicona, polipropileno, polietileno, politetrafluoroetileno, materiales sinterizados o combinaciones de los mismos, especialmente acero inoxidable recubierto de politetrafluoroetileno.

5 El separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento puede comprender en un modo de realización una única frita o en otro modo de realización una combinación de una frita superior y una frita inferior. Si el separador comprende una frita, la frita tiene un tamaño de poro que es más pequeño que el tamaño de las partículas del material de cromatografía. En un modo de realización, el tamaño de poro es un 10 % o menos del diámetro promedio de las partículas del material de cromatografía a fin de evitar el bloqueo de los poros de la frita por las partículas del material de cromatografía descompuestas. Si el separador comprende dos fritas, ambas fritas pueden tener el mismo tamaño de poro o ambas fritas pueden tener diferentes tamaños de poro. Ya que el material de cromatografía se descompone en partículas más pequeñas en un modo de realización, la frita superior tiene un tamaño de poro más pequeño que la frita inferior, en un modo de realización la frita superior tiene un tamaño de poro de un 10 % o menos del diámetro promedio de las partículas del material de cromatografía. En un modo de realización, la frita superior y/o la frita inferior del separador de columna de cromatografía es una malla de metal. En otro modo de realización, la frita superior tiene un tamaño de poro más pequeño que el tamaño de poro de la frita inferior. En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía o la frita inferior del separador de columna de cromatografía tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , o de desde 1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ , o de desde 1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ . En otro modo de realización, la frita superior del separador de columna de cromatografía tiene un tamaño de poro que es un 5 % o menos del tamaño de poro de la frita inferior del separador de columna de cromatografía, o la frita superior del separador de columna de cromatografía tiene un tamaño de poro que es un 10 % del tamaño de poro de la frita inferior del separador de columna de cromatografía, o la frita superior del separador de columna de cromatografía tiene un tamaño de poro que es un 20 % o menos del tamaño de poro de la frita inferior del separador de columna de cromatografía. En otro modo de realización, la frita inferior del separador de columna de cromatografía tiene un tamaño de poro de 20  $\mu\text{m}$  o 10  $\mu\text{m}$  o 5  $\mu\text{m}$  y la frita superior tiene un tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$  o 1  $\mu\text{m}$ .

Por lo tanto, el uso del separador de columna de cromatografía de acuerdo con la invención permite un uso más prolongado del material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior y simultáneamente una reducción de los costes del procedimiento de cromatografía.

En un modo de realización, la cámara de columna de cromatografía superior tiene de desde un 5 % a un 15 %, en otro modo de realización un 10 %, del volumen de la cámara de columna de cromatografía inferior. En otro modo de realización, la cámara de columna de cromatografía superior tiene de desde un 20 % a un 30 %, en un modo de realización un 25 %, del volumen de la cámara de columna de cromatografía inferior. En todavía otro modo de realización, la cámara de columna de cromatografía superior tiene el mismo volumen que la cámara de columna de cromatografía inferior.

Se ha de señalar que un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento no hace que los separadores o fritas presentes en la entrada y en la salida de una columna de cromatografía sean obsoletos. Además, es un separador adicional dispuesto en el interior del material de cromatografía. Ya que la sección transversal de las columnas de cromatografía en columna perpendicular a la dirección del flujo de la fase móvil es circular, la frita y, de manera similar, el separador, también tiene una forma externa circular. El separador tiene una altura que es pequeña en comparación con la longitud global del relleno de la columna de cromatografía. En un modo de realización, el separador tiene una altura de desde 0,1 cm a 10 cm, en otro modo de realización de desde 0,25 cm a 5 cm, y en otro modo de realización de desde 0,5 cm a 2 cm. La altura del separador es la distancia entre la superficie de la frita dirigida a la cámara de columna de cromatografía superior y la superficie de la frita dirigida a la cámara de columna de cromatografía inferior. Si el separador comprende una frita superior y una frita inferior, la altura combinada de las dos fritas individuales puede ser menor que la altura del separador. En este modo de realización, está presente un espacio adicional en el interior del separador que se puede usar, por ejemplo, para disponer sensores en la frita para registrar, por ejemplo, la absorción UV, o la presión, o la conductividad de la fase móvil que pasa a través del separador o para proporcionar válvulas adicionales para retirar la fase móvil o para añadir una fase móvil en una posición en el relleno de la columna de cromatografía. Si el separador comprende una frita superior y una frita inferior, en un modo de realización, ambas fritas tienen la misma altura. En otro modo de realización, la frita superior y la frita inferior tienen diferentes alturas.

En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía tiene un diámetro que es más pequeño que el diámetro interno de la columna de cromatografía en la que se introduce.

En la figura 1, se muestran separadores de columna de cromatografía ejemplares. En la figura 1a), se representa un separador con una única frita que comprende una frita (1) y un elemento de conexión (2). En la figura 1b), se muestra un separador con una frita superior (3) y una frita inferior (4) y un elemento de conexión (2). En la figura 1c), se muestra la sección transversal vertical del anillo de guía del separador que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas (5 y 6), en el que cada una de las áreas en sección transversal axialmente simétricas tiene a) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía y b) una muesca (8) con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita.

El separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento comprende, además de la frita, un elemento de conexión o anillo de guía (se pueden usar indistintamente ambos términos) para sellar la distancia entre el borde externo de la frita y la pared de la columna de cromatografía cuando el separador se dispone en el interior de una columna de cromatografía. En un modo de realización, el elemento de conexión o anillo de guía está hecho de un material flexible, tal como caucho, plástico, silicona, politetrafluoroetileno, polietileno, polipropileno o similares. El elemento de conexión o anillo de guía ha de ser flexible a fin de nivelar pequeñas diferencias en el diámetro interior de una columna de cromatografía o entre diferentes columnas de cromatografía del mismo diámetro nominal para evitar que la fase líquida o el material de cromatografía pase al separador en el exterior de la frita. Se ha de señalar que el separador como se informa en el presente documento solo puede pasar por la fase móvil, pero no por el material de cromatografía. Es decir, la frita tiene un tamaño de poro que es más pequeño que el tamaño de las partículas del material de cromatografía.

El elemento de conexión o anillo de guía tiene una forma circular con una sección transversal que puede tener cualquier forma, siempre que tenga una muesca rectangular para acomodar la frita. Por ejemplo, en un modo de realización, la sección transversal del elemento de conexión tiene la forma de un triángulo con una muesca rectangular para acomodar la frita en la esquina del triángulo con el ángulo interior más grande. En otro modo de realización, el elemento de conexión o anillo de guía tiene la sección transversal o proporciona áreas en sección transversal en forma de un triángulo, en otro modo de realización de un triángulo rectangular, en la que la frita se une a la esquina del triángulo con un ángulo interno de 90°. En otro modo de realización, el área en sección transversal del anillo de guía tiene una forma trapezoidal con la muesca rectangular para acomodar la frita que está en el lado más corto de los lados paralelos. En un modo de realización, el elemento de conexión tiene la forma de un rectángulo, en otro modo de realización de un rectángulo con ángulos internos de 90°, 90°, 80° y 100°. En un modo de realización, los ángulos internos de 80° y 100° están en el lado superior o en el lado inferior del rectángulo. En un modo de realización, el lado más largo del anillo de guía es el borde externo del separador y está en contacto con la pared de la columna de cromatografía cuando el separador se dispone en el interior de una columna de cromatografía. En otro modo de realización, el lado más largo tiene una orientación vertical. En todavía otro modo de realización, las áreas en sección transversal del elemento de conexión o anillo de guía tienen la forma de un rectángulo con ángulos internos de 90° con la muesca rectangular para acomodar la frita en uno de los lados más cortos o, en el caso de un cuadrado, en uno de los lados. El lado con la muesca es el lado del elemento de conexión que se dirige al centro del separador y, de manera similar, la columna de cromatografía o, en otras palabras, la muesca está en el lado del elemento de conexión o anillo de guía que es paralelo a la dirección del flujo de la fase móvil y que tiene un diámetro más pequeño que el diámetro externo de la frita. Además de evitar que la fase líquida y las partículas del material de cromatografía pasen al separador junto a la frita, el anillo de guía tiene la función de evitar la inclinación y, con ello, el atascamiento de todo el separador en la columna de cromatografía durante la compresión y expansión del material de cromatografía tras la aplicación de la presión exterior. El separador como se informa en el presente documento se dispone en el interior del material de cromatografía relleno en una columna de cromatografía. El separador se puede mover libremente y disponer exactamente en el interior de la columna, ya que se puede deslizar a lo largo de la pared interna de la columna de cromatografía. Esto es útil durante el relleno de la columna de cromatografía y para retirar el separador de la columna de cromatografía. Por tanto, a fin de evitar la formación de una cavidad por debajo del separador y, con ello, provocar un impacto negativo en el procedimiento de separación por cromatografía, el separador como se informa en el presente documento está construido de manera que permita un deslizamiento del separador a lo largo de la pared interna de la columna de cromatografía junto con la compresión y expansión del material de cromatografía en el que se incluye el separador. En un modo de realización, las áreas en sección transversal vertical del anillo de guía tienen la forma de un triángulo o trapezoide en las que el anillo de guía tiene una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía, es decir, el anillo de guía es más alto en su borde externo que en su borde interno o en la muesca, respectivamente. En un modo de realización, el borde externo del anillo de guía tiene una altura que es al menos 1,5 veces la altura de la muesca. En otro modo de realización, el borde externo del anillo de guía tiene una altura que es al menos 1,5 veces, o dos veces, o tres veces, o más de tres veces la altura de la muesca.

Si el separador comprende una frita superior y una frita inferior, en un modo de realización el elemento de conexión o anillo de guía es un único elemento de conexión o anillo, y en otro modo de realización el elemento de conexión o anillo de guía está hecho de un elemento de conexión o anillo superior y un elemento de conexión o anillo inferior. En este último caso, los dos elementos de conexión o anillos tienen, en un modo de realización, un área de contacto que comprende el lado inferior del elemento de conexión o anillo superior y el lado superior del elemento de conexión o anillo inferior, con lo que los lados de contacto son lisos, es decir, no tienen muescas o ranuras, y están en línea con el lado inferior de la frita superior y el lado superior de la frita inferior, es decir, el lado inferior del elemento de conexión superior y el lado inferior de la frita superior forman una única superficie sin desplazamiento y, de manera similar, el lado superior del elemento de conexión o anillo inferior y el lado superior de la frita inferior forman una única superficie sin desplazamiento, con lo que ambas superficies son paralelas.

Generalmente, el diámetro interno más pequeño del elemento de conexión o anillo de guía o del elemento de conexión superior y del elemento de conexión inferior es más pequeño que el diámetro externo de la frita, es decir, el elemento de conexión o anillo de guía se extiende sobre el perímetro externo de la frita hacia el centro de la columna de cromatografía.

5 En un modo de realización, el elemento de conexión o anillo de guía comprende en su superficie superior tres o más orificios, cada uno con una rosca de tornillo, para su uso con un dispositivo de aplicación de separador de columna de cromatografía. Otro modo de realización comprende el elemento de conexión o anillo de guía inferior en su superficie superior, tres o más orificios sin una rosca de tornillo. En un modo de realización, el elemento de conexión comprende desde tres a seis orificios con o bien sin rosca de tornillo.

10 En la figura 2, se muestran áreas en sección transversal de diferentes elementos de conexión o anillos de guía. En la figura 2a), se muestra un área en sección transversal de un elemento de conexión triangular, en la figura 2b), se muestra un área en sección transversal de un elemento de conexión trapezoidal, y, en la figura 2c), se muestra un área en sección transversal de un elemento de conexión rectangular. Se puede ver a partir de las áreas en sección transversal en la figura 2 que los elementos de conexión o anillos guía se extienden bien sobre el perímetro externo de la frita.

15 En la figura 3, se muestra una vista en perspectiva de un separador con un anillo de guía que comprende tres orificios con rosca de tornillo.

20 El separador de columna de cromatografía se puede insertar en la columna de cromatografía con diferentes procedimientos. Un procedimiento para insertar el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento en una columna de cromatografía que contiene una primera fracción de un material de cromatografía comprende disponer el separador de columna de cromatografía en la parte superior de la superficie del líquido o material de cromatografía o suspensión de material de cromatografía en el interior de la columna de cromatografía, aplicar una presión a la parte superior de dicha columna de cromatografía y, con ello, mover el separador de columna de cromatografía a lo largo de la dirección del flujo de la fase móvil en el interior de la columna de cromatografía hasta que el separador de columna de cromatografía esté en una posición predeterminada en el interior de la columna de cromatografía.

30 En un procedimiento diferente o alternativo, se usa un dispositivo de aplicación de separador de columna de cromatografía. Este dispositivo comprende un cuerpo central en forma de campana, un medio para mover el dispositivo hacia arriba y hacia abajo que está unido a la parte superior del dispositivo, al menos tres conectores al separador de columna de cromatografía, con lo que los conectores se conectan/fijan al separador y al corpus, y al menos un orificio en el corpus para el ajuste de la presión entre el área por debajo del dispositivo y el área por encima del dispositivo al disponerse en una columna de cromatografía. En un modo de realización, los conectores son barras con una rosca de tornillo en su extremo inferior para fijar los conectores al elemento de conexión del separador de columna de cromatografía. Después de haber dispuesto el separador en su posición predeterminada, se retira de la columna el cuerpo del dispositivo, los conectores se desenroscan del elemento de conexión del separador y también se retiran de la columna. De manera similar, la retirada de la columna de un separador que comprende una única frita se realiza invirtiendo la secuencia de etapas.

40 Si el separador comprende una frita superior y una frita inferior, la frita superior se retira invirtiendo la secuencia de etapas como se esboza anteriormente. Para retirar la frita inferior, se usa un asa que se engancha en los orificios presentes en la superficie superior del anillo de guía inferior.

45 En la figura 4, se muestra un separador de columna de cromatografía con un anillo de guía que comprende tres orificios con una rosca de tornillo unidos por medio de tres conectores a un dispositivo de aplicación de separador de columna de cromatografía.

50 El relleno de una columna de cromatografía con un material de cromatografía con un separador de columna de cromatografía incluido como se informa en el presente documento se divide en dos fases de relleno. El relleno comienza con el relleno de una primera fracción del material de cromatografía en la columna de acuerdo con los procedimientos generales. Después, como se informa en el presente documento, el separador de columna de cromatografía se dispone en la parte superior de la primera fracción del material de cromatografía. Finalmente, la segunda fracción del material de cromatografía se rellena en la columna en la parte superior del separador de acuerdo con los procedimientos generales. Este procedimiento de relleno es un relleno desde la parte inferior hasta la parte superior. Por el contrario, las columnas que no contienen un separador de acuerdo con la presente invención se rellenan desde la parte superior, lo que requiere, entre otras cosas, una presión de relleno más alta. Por tanto, el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento proporciona un medio para rellenar una columna de cromatografía en dos etapas secuenciales si se usa un separador o en tres o más etapas secuenciales si se usan dos o más separadores. Con el separador como se informa en el presente documento, la columna se divide en una cámara superior y una cámara inferior (un separador) o una cámara inferior, una cámara central y una cámara superior (dos separadores), siendo equivalente cada una por sí misma a una columna de cromatografía con altura de lecho reducida del material de cromatografía. Con la división de la columna de cromatografía en cámaras más pequeñas, se cambia la proporción del volumen (del material de cromatografía en una cámara) con respecto a la superficie (de la cámara), es decir, se reduce, y se incrementa la estabilidad del relleno del material de cromatografía.

En la figura 5 se representan columnas de cromatografía que comprenden uno (figura 5a), dos (figura 5b) y tres (figura 5c) separadores de columna de cromatografía.

5 El punto temporal en el que se ha de reemplazar un material de cromatografía se ha de determinar individualmente para cada combinación del material de cromatografía, del polipéptido que se va a purificar y de las condiciones de cromatografía. Esto puede depender, por ejemplo, de la especificación que se va a seguir o de la producción. Una vez que se decidió que se tenía que cambiar el material de cromatografía, la fracción del material de cromatografía en la cámara superior se puede retirar sin perturbar o dañar al relleno de la fracción del material de cromatografía en la cámara inferior de la columna de cromatografía. La descomposición del material de cromatografía durante el uso de la columna de cromatografía da como resultado partículas del material de cromatografía con un diámetro (tamaño) reducido. Cuanto más pequeñas se vuelvan estas partículas, se bloquean más poros de la frita del separador. Por lo tanto, también es aconsejable retirar el separador de la columna, limpiar la frita e introducir de nuevo el separador en la columna una vez que se haya retirado la fracción del material de cromatografía en la cámara superior y antes de que se cargue nuevo material de cromatografía en la cámara superior de la columna de cromatografía. Si se usa un separador que comprende una frita superior y una frita inferior, solo se ha de retirar la frita superior, y la frita inferior puede permanecer en su lugar. En este modo de realización, el relleno del material de cromatografía en la cámara inferior se perturba menos o incluso no se perturba en absoluto.

20 Se puede usar el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento en cualquier columna de cromatografía a fin de dividir la columna de cromatografía en dos, tres o más cámaras individuales e independientes.

25 El polipéptido eritropoyetina estaba disponible en el laboratorio en el momento en el que se hizo la invención en cantidad suficiente para evaluar las propiedades del separador de columna de cromatografía. Esto no pretende ser una limitación del alcance de la invención, sino que solo se presenta como un ejemplo para ilustrar la presente invención.

30 En la figura 6, se muestra el diagrama de absorción UV-elución de una cromatografía de eritropoyetina con un material de cromatografía Vydac C4, con lo que el cromatograma a) se obtiene con una columna de cromatografía que no comprende ningún separador de columna de cromatografía y el cromatograma b) se obtiene con una columna de cromatografía que comprende un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento. Se puede ver que los cromatogramas son idénticos, no mostrando así ninguna influencia del separador sobre el comportamiento cromatográfico. Por tanto, con el separador de acuerdo con la invención es posible dividir el material de cromatografía en la columna de cromatografía en dos o más fracciones o cámaras distintas sin interferir en el procedimiento de separación cromatográfica.

40 En la figura 7, se muestra el incremento de la contrapresión de una columna de cromatografía que comprende un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento en sucesivos ciclos de regeneración de una columna de cromatografía multiuso. La etapa de regeneración es la más adecuada para ejemplificar esto, ya que en esta etapa se produce la contrapresión más alta en un ciclo de cromatografía. Como se puede ver en la figura 7, la contrapresión se incrementa continuamente en sucesivas etapas de regeneración probablemente debido a la destrucción creciente del material de cromatografía. Después del ciclo 58, el material de cromatografía usado y descompuesto en la cámara superior de la columna de cromatografía se reemplaza por nuevo material de cromatografía, es decir, recién preparado.

45 Con el reemplazo de solo la fracción superior del material de cromatografía, se logra una reducción drástica de la contrapresión en la siguiente etapa de regeneración. Por tanto, el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento, en primer lugar, no afecta a la separación cromatográfica y, en segundo lugar, proporciona una renovación fácil, eficaz y rentable de un relleno de la columna de cromatografía. Se ha de señalar que el material de cromatografía en esta columna se intercambiaba una segunda vez y, con ello, el material de cromatografía en la cámara inferior se hizo funcionar durante 98 ciclos de separación consecutivos sin la necesidad de cambiarse. Sin el uso de un separador como se informa en el presente documento, el material de columna se ha de cambiar en promedio después de 15 ciclos.

55 En la figura 8, se muestra la determinación del número de placas de una columna de cromatografía Vydac C4. En el cromatograma a), el pico de la sustancia indicadora usada para la determinación del número de placas se divide en dos picos. Esto demuestra que el relleno de la columna de cromatografía tiene un defecto, por ejemplo, una fisura en el material de cromatografía, por ejemplo, que abre una trayectoria de flujo alternativa que da lugar a la duplicación del pico observado. En el cromatograma b) se muestra la determinación del número de placas después del reemplazo de la fracción del material de cromatografía en la cámara superior de la columna de cromatografía. No se puede ver más duplicación del pico.

60 Además, con el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento, es posible rellenar un primer material de cromatografía en la cámara inferior y un segundo material de cromatografía diferente en la cámara superior de una columna de cromatografía. Con dos materiales de cromatografía diferentes, se obtiene una columna de cromatografía híbrida.

65

En las figuras 9 y 10, se muestran diferentes diagramas de absorción UV-elución de una cromatografía de un anticuerpo frente al receptor de IL13 alfa. Generalmente, se puede purificar un anticuerpo mediante una combinación de una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de intercambio aniónico, con lo que las cromatografías de intercambio iónico pueden tener cualquier secuencia. En la figura 9, se muestran el diagrama de absorción UV-elución de una primera cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharose en una primera columna (figura 9a) y una segunda cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose en una segunda columna (figura 9b). En este procedimiento de dos etapas, el eluido que contiene el anticuerpo se ha procesado antes de la aplicación a la segunda columna de cromatografía. En la figura 10, se muestra el diagrama de elución de SEC analítica de la purificación del anticuerpo mediante una cromatografía híbrida como se informa en el presente documento. La figura 10a) muestra el diagrama del análisis del pico del producto de la figura 9b). La figura 10 b) es el diagrama del pico del producto de una cromatografía híbrida con SP-Sepharose en la cámara superior de la columna de cromatografía híbrida y Q-Sepharose en la cámara inferior de la columna de cromatografía híbrida. La figura 10c) proporciona el diagrama del pico del producto de una cromatografía híbrida con Q-Sepharose en la cámara superior de la columna de cromatografía híbrida y SP-Sepharose en la cámara inferior de la columna de cromatografía híbrida. Como se puede ver a partir de los cromatogramas presentados en la figura 10, los resultados de la cromatografía híbrida son esencialmente idénticos a las etapas de cromatografía separadas solo con tiempos de retención ligeramente diferentes debido a la diferente secuencia de etapas cromatográficas.

El separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento:

- proporciona un medio para usar diferentes tipos del mismo material de cromatografía en las cámaras de columna de cromatografía superior e inferior; por ejemplo, en la cámara de columna de cromatografía superior se puede usar un material de cromatografía con estabilidad mecánica más alta y en la cámara de columna de cromatografía inferior se puede usar un material de cromatografía con estabilidad mecánica más baja;
- proporciona un medio para reemplazar material de cromatografía usado o fragmentado o alterado en la cámara de columna de cromatografía superior sin la necesidad de reemplazar el material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior;
- proporciona un medio para usar, en cada una de las cámaras de columna de cromatografía, un material de cromatografía diferente con diferentes grupos funcionales cromatográficos, permitiendo la combinación de dos procedimientos cromatográficos diferentes.

Usando el separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento, por ejemplo, se puede usar un material de cromatografía sensible a la presión en la cámara de columna de cromatografía inferior, ya que el separador reduce la presión dirigida al material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior. Es decir, usando un separador como se informa en el presente documento, se puede efectuar una reducción de presión en el interior del material de cromatografía. Por tanto, las columnas de cromatografía que comprenden un separador como se informa en el presente documento tienen una contrapresión reducida en comparación con las columnas de cromatografía con la misma altura de lecho, pero sin un separador como se informa en el presente documento (la contrapresión es la presión requerida para hacer pasar a la fuerza la fase móvil a través del material de cromatografía), es decir, se reducen la presión total, así como los cambios de presión, así como el incremento de presión. Como se esboza anteriormente, una presión reducida y cambios de presión reducida pueden proporcionar un número incrementado de ciclos de cromatografía sin el requisito de cambiar el material de cromatografía en el interior de la columna de cromatografía. En un modo de realización, el material de cromatografía en la cámara de columna de cromatografía inferior de una columna de cromatografía que comprende un separador de columna de cromatografía con soportes a distancia se selecciona de DEAE-Sepharose o HA-Ultrogel.

Adicionalmente, usando un separador como se informa en el presente documento, se puede hacer funcionar una columna de cromatografía en caudales incrementados de la fase móvil. Esto se debe a la reducción de la presión requerida que se ha de aplicar a la columna para lograr un caudal predeterminado (véase la figura 11).

En un modo de realización, el separador de columna de cromatografía comprende soportes a distancia dirigidos al extremo inferior de la columna de cromatografía. En otro modo de realización, el separador de columna de cromatografía comprende de tres a seis soportes a distancia.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### **Descripción de las figuras**

**Figura 1** Separadores de columna de cromatografía ejemplares de acuerdo con la invención: a) separador con una única frita que comprende una frita (1) y un elemento de conexión (2); b) separador con una frita superior (1) y una frita inferior (3) y un elemento de conexión superior (2) y un elemento de

conexión inferior (4); c) sección transversal vertical del anillo de guía del separador que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas (5 y 6), teniendo cada una i) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía e i) una muesca (8) con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita.

- 5 **Figura 2** Áreas en sección transversal de diferentes elementos de conexión: a) sección transversal de un elemento de conexión triangular, b) área en sección transversal de un elemento de conexión trapezoidal, c) área en sección transversal de un elemento de conexión rectangular, d) área en sección transversal de un elemento de conexión superior y un elemento de conexión inferior.
- 10 **Figura 3** Se muestran vistas en perspectiva de un elemento de conexión que comprende tres orificios con rosca de tornillo.
- 15 **Figura 4** Sección transversal de un separador de columna de cromatografía con un elemento de conexión que comprende tres orificios con una rosca de tornillo unidos por medio de tres conectores a un dispositivo de aplicación de separador de columna de cromatografía.
- 20 **Figura 5** Columnas de cromatografía que comprenden uno (a), dos (b) y tres (c) separadores de columna de cromatografía.
- 25 **Figura 6** Diagrama de absorción UV-elución de una cromatografía de eritropoyetina con un material de cromatografía Vydac C4, con lo que el cromatograma a) se obtiene con una columna de cromatografía que no comprende ningún separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento y el cromatograma b) se obtiene con una columna de cromatografía que comprende un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento.
- 30 **Figura 7** Incremento de la contrapresión de una columna de cromatografía que comprende un separador de columna de cromatografía como se informa en el presente documento en sucesivos ciclos de regeneración de una columna de cromatografía multiuso.
- Figura 8** Determinación del número de placas de una columna de cromatografía Vydac C4.
- 35 **Figura 9** Diagrama de absorción UV-elución con Q-Sepharose de un cromatograma de un anticuerpo frente al receptor de IL13 alfa: a) cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharose; b) cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose.
- 40 **Figura 10** Diagrama de elución de SEC analítica: a) diagrama del análisis del pico del producto de la figura 9; b) diagrama del pico del producto de una cromatografía híbrida con SP-Sepharose en la cámara superior de la columna de cromatografía híbrida y Q-Sepharose en la cámara inferior de la columna de cromatografía híbrida; c) diagrama del pico del producto de una cromatografía híbrida con Q-Sepharose en la cámara superior de la columna de cromatografía híbrida y SP-Sepharose en la cámara inferior de la columna de cromatografía híbrida.
- 45 **Figura 11** Diagrama que muestra la (contra)presión de columna resultante frente al flujo de fase móvil fijado para un material de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE Sepharose). Rombos: columna de cromatografía sin un separador como se informa en el presente documento; triángulos: columna de cromatografía con separador como se informa en el presente documento. Se puede ver que se puede lograr una reducción de la contrapresión para alturas de lecho más altas con un separador como se informa en el presente documento.
- 50

### Ejemplo 1

#### **Fermentación y purificación de eritropoyetina**

- 55 La fermentación y purificación de la eritropoyetina se llevó a cabo como se informa en la patente europea n.º 1 064 951 B1. Los datos presentados en el presente documento se obtuvieron en la HPLC de fase inversa en un material de cromatografía Vydac C4 como se informa en el ejemplo 1d) del documento EP 1 064 951.
- 60 El material de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, de las que sus superficies tienen cadenas alquilo C4. La separación de la eritropoyetina de las impurezas proteínicas se basa en las diferencias en la fuerza de las interacciones hidrófobas. La elución se realiza con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. La HPLC preparativa se realiza usando una columna de acero inoxidable (cargada con de 2,8 a 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluido de hidroxipapatita-Ultrogel se acidifica añadiendo ácido trifluoroacético y se carga en la columna Vydac C4. Para el lavado y la elución, se usa un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido. Se obtienen las fracciones y se neutralizan inmediatamente con tampón fosfato.
- 65

**Ejemplo 2**

**Producción de un anticuerpo anti-(IL-13R $\alpha$ 1)**

5

Se produjo un anticuerpo anti-receptor de IL13 alfa de acuerdo con los datos y procedimientos que se informan en el documento WO 2006/072564, especialmente de acuerdo con los ejemplos 10 a 12.

**Cromatografía secuencial**

10

Para la cromatografía de intercambio iónico, se ajusta el eluido de proteína A que comprende el anticuerpo anti-IL13R alfa a pH 6,5 y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico con SP-Sepharose que se ha equilibrado con tampón fosfato de potasio 10 mM. Después de una etapa de lavado con tampón fosfato de potasio 10 mM, el anticuerpo se eluye con un tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 6,5. Se ajusta el valor de pH del eluido de SP-Sepharose a pH 7,1 y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose que se ha equilibrado con tampón fosfato de potasio 35 mM. El anticuerpo purificado se obtiene del flujo continuo de la columna de cromatografía de intercambio aniónico.

15

**Cromatografía híbrida**

20

Para la cromatografía de intercambio iónico híbrida con una columna de cromatografía que contiene un separador de columna de cromatografía de acuerdo con la presente invención, se ajusta el eluido de proteína A que comprende el anticuerpo anti-IL13R alfa a pH 7,1 y se aplica a la columna de cromatografía híbrida que se ha equilibrado con tampón fosfato de potasio 10 mM. Después de una etapa de lavado con tampón fosfato de potasio 10 mM, el anticuerpo se eluye con un tampón fosfato de potasio 20 mM a pH 7,1.

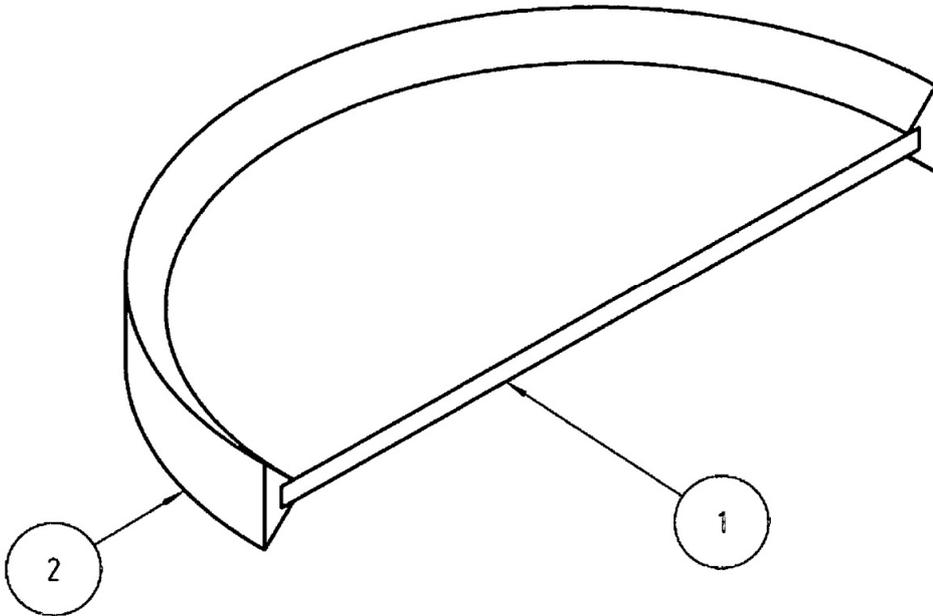
25

**REIVINDICACIONES**

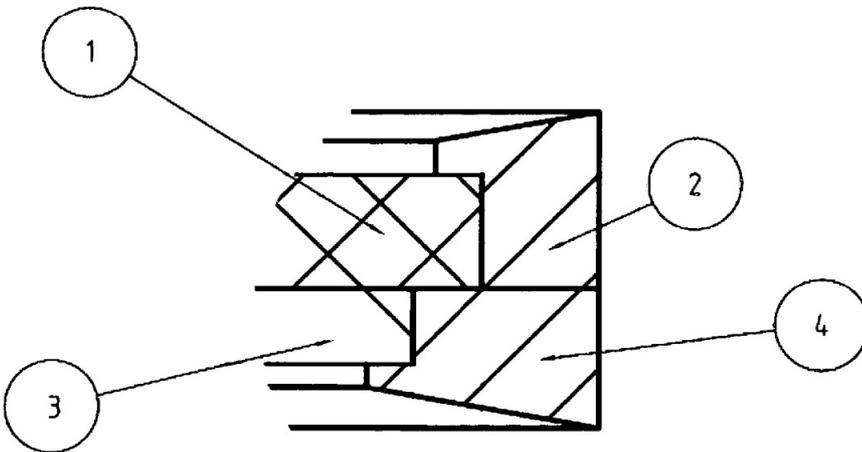
1. Columna de cromatografía que comprende uno o más separadores de columna de cromatografía móviles que comprenden un anillo de guía de forma circular (2) que tiene una sección transversal vertical que comprende dos áreas en sección transversal axialmente simétricas (5 y 6), en el que cada una de las áreas en sección transversal axialmente simétricas tiene
- 5
- a) una estructura ahusada, en la que el ahusamiento es desde el exterior al interior del anillo de guía, y
- 10
- b) una muesca (8) con una abertura dirigida al interior del anillo de guía para montar una frita
- y
- 15
- una frita (1) montada en el anillo de guía,
- con lo que cualquier separador de columna de cromatografía está en contacto con un primer material de cromatografía y en contacto con un segundo material de cromatografía, con lo que el primer y el segundo material de cromatografía son
- 20
- a) materiales de cromatografía con el mismo grupo funcional cromatográfico y del mismo o diferente tamaño de partícula, o
- b) materiales de cromatografía con diferentes grupos funcionales cromatográficos.
- 25
2. La columna de cromatografía de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la frita es
- a) una única frita, o
- 30
- b) dos fritas con una frita superior y una frita inferior.
3. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que
- 35
- a) la frita tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ , o
- b) cada una de las fritas tiene un tamaño de poro de desde 1  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  independientemente la una de la otra, con lo que el tamaño de poro de la frita superior es más pequeño que el tamaño de poro de la frita inferior.
- 40
4. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la muesca es una muesca rectangular.
5. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que cada una de las áreas en sección transversal tiene una forma triangular y el lado más largo tiene una longitud de al menos 1,5 veces el diámetro de la muesca.
- 45
6. La columna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que la columna de cromatografía comprende uno o dos separadores de columna de cromatografía.
- 50
7. Uso de una columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la purificación de un polipéptido.

**Fig. 1**

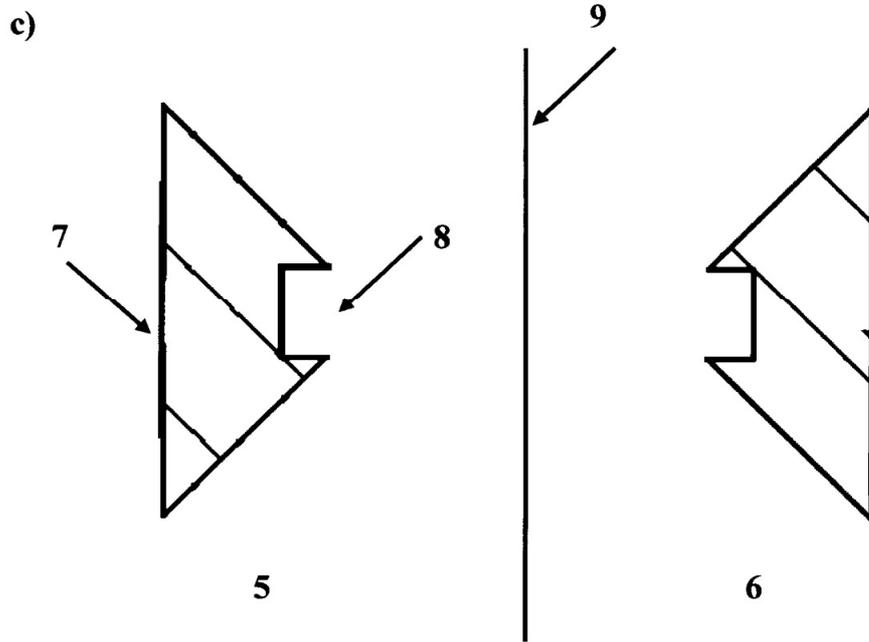
**a)**



**b)**

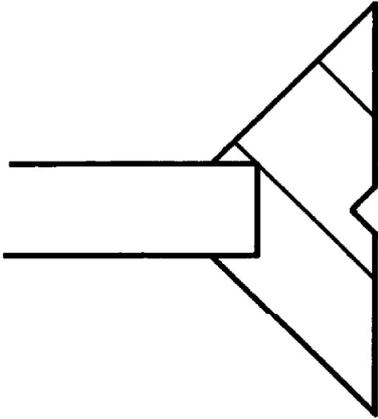


**Fig. 1**

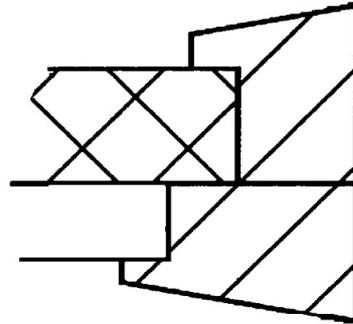


**Fig. 2**

a)



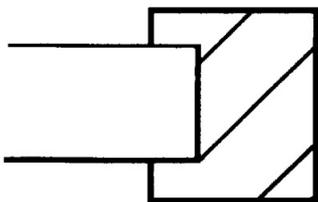
d)



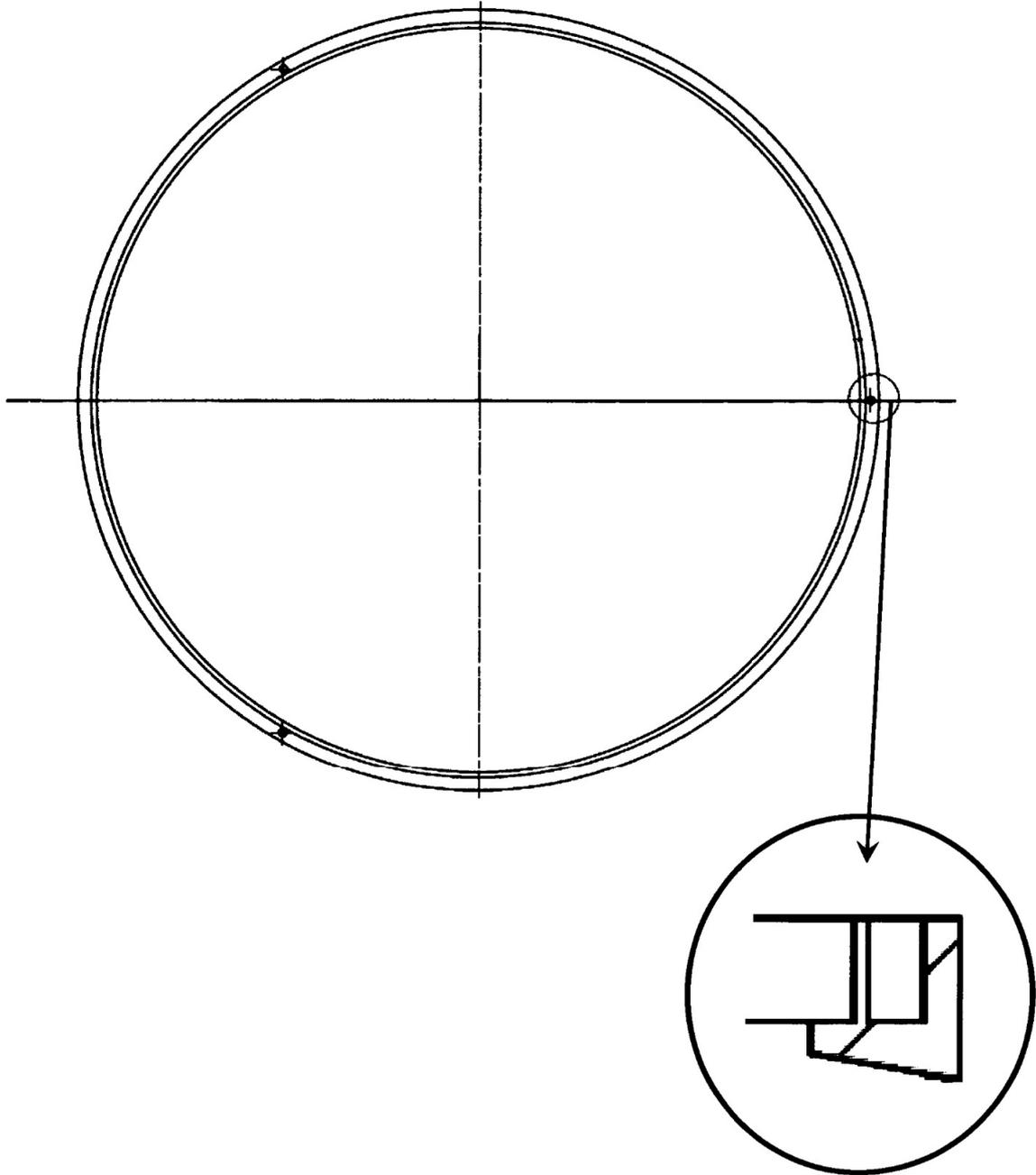
b)



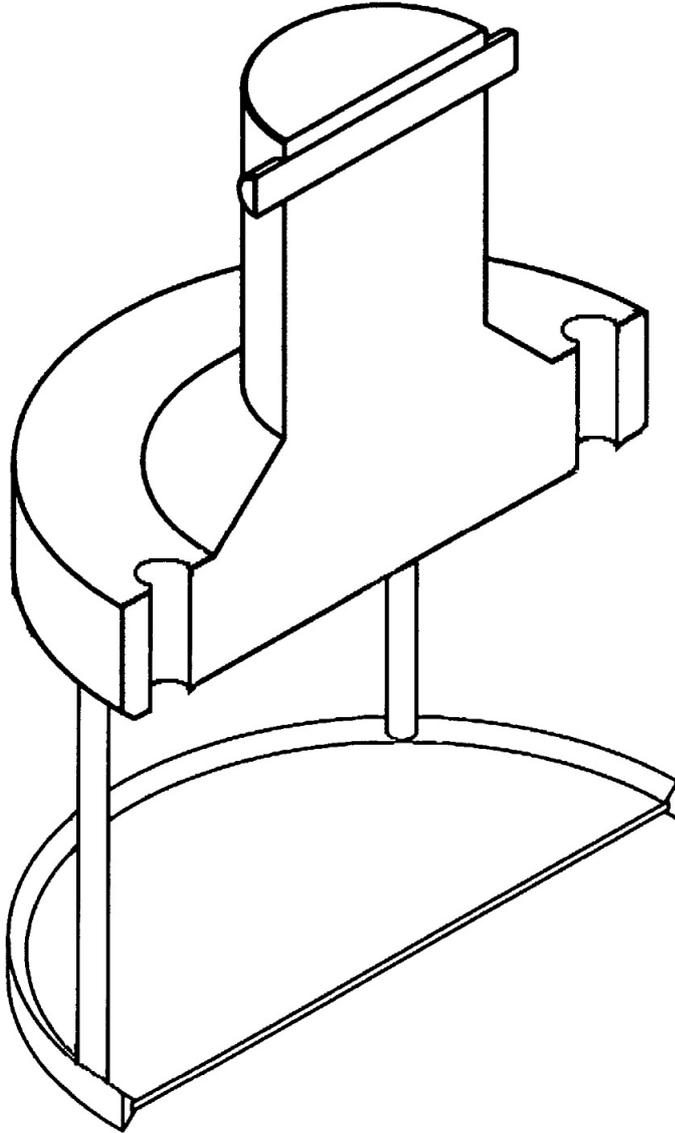
c)



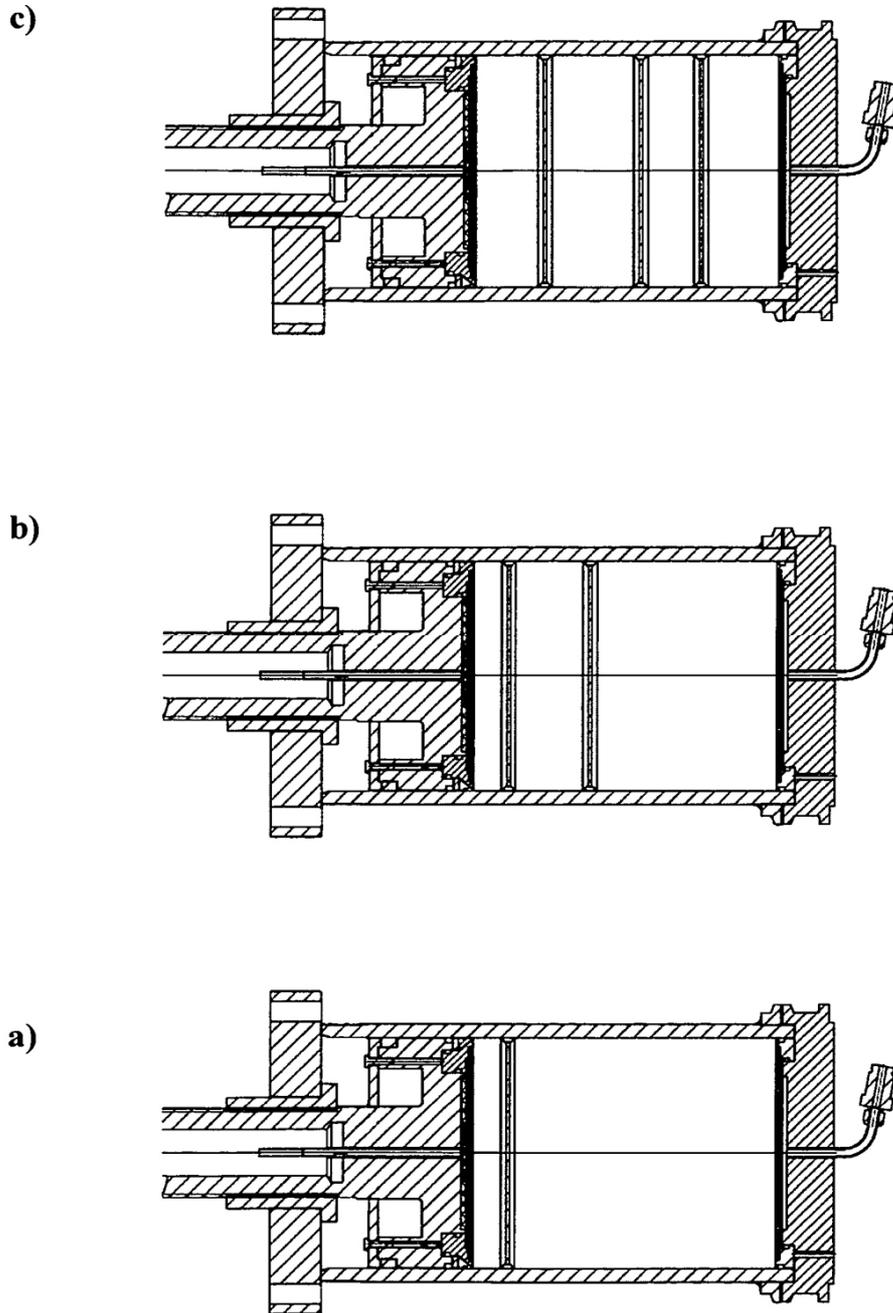
**Fig. 3**



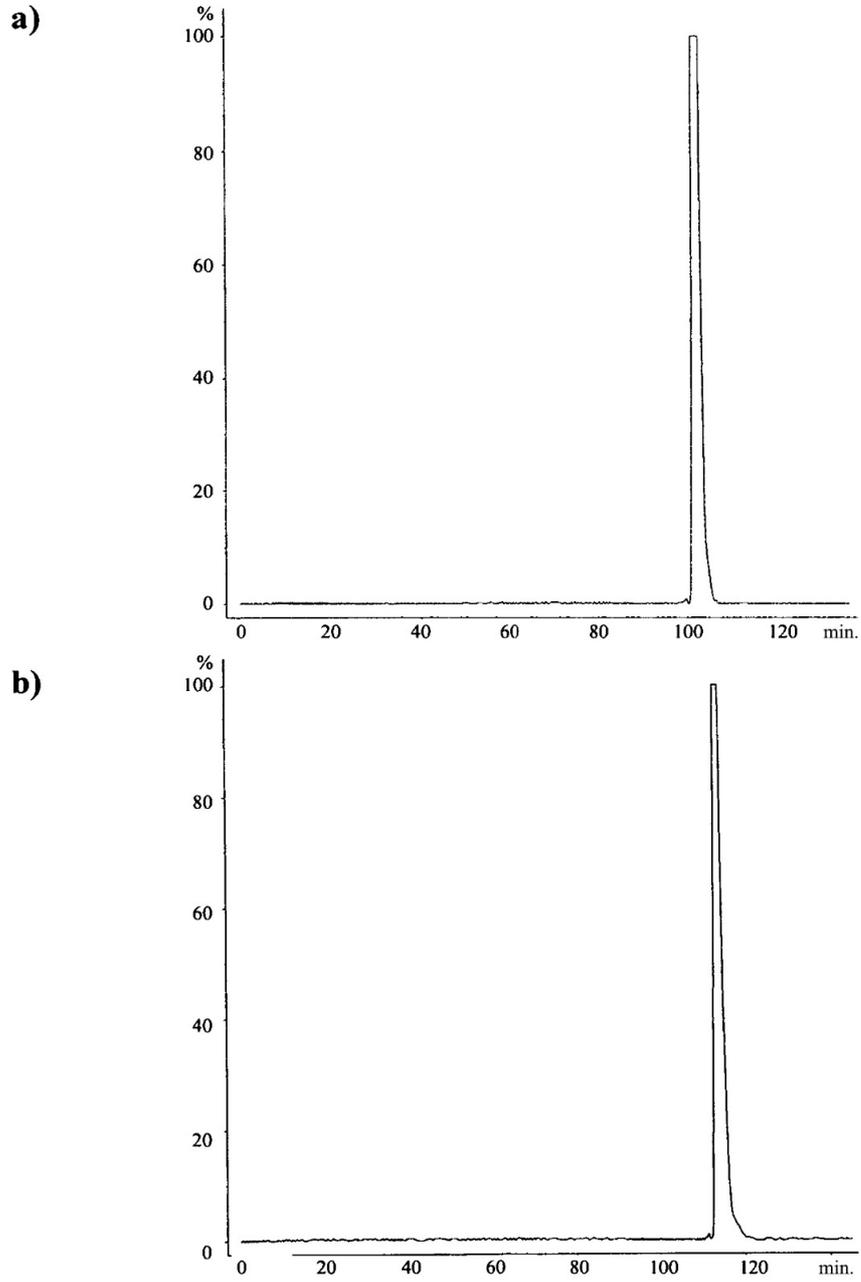
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



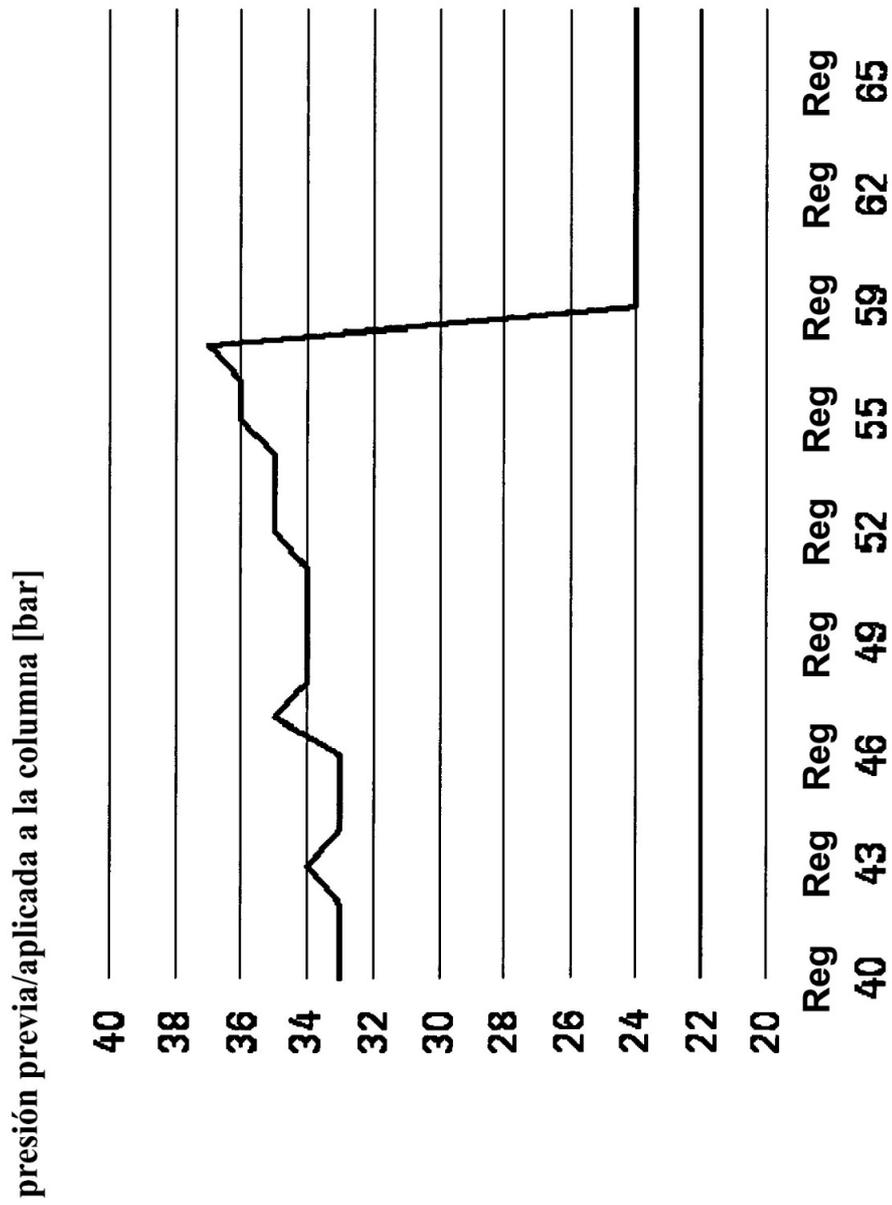
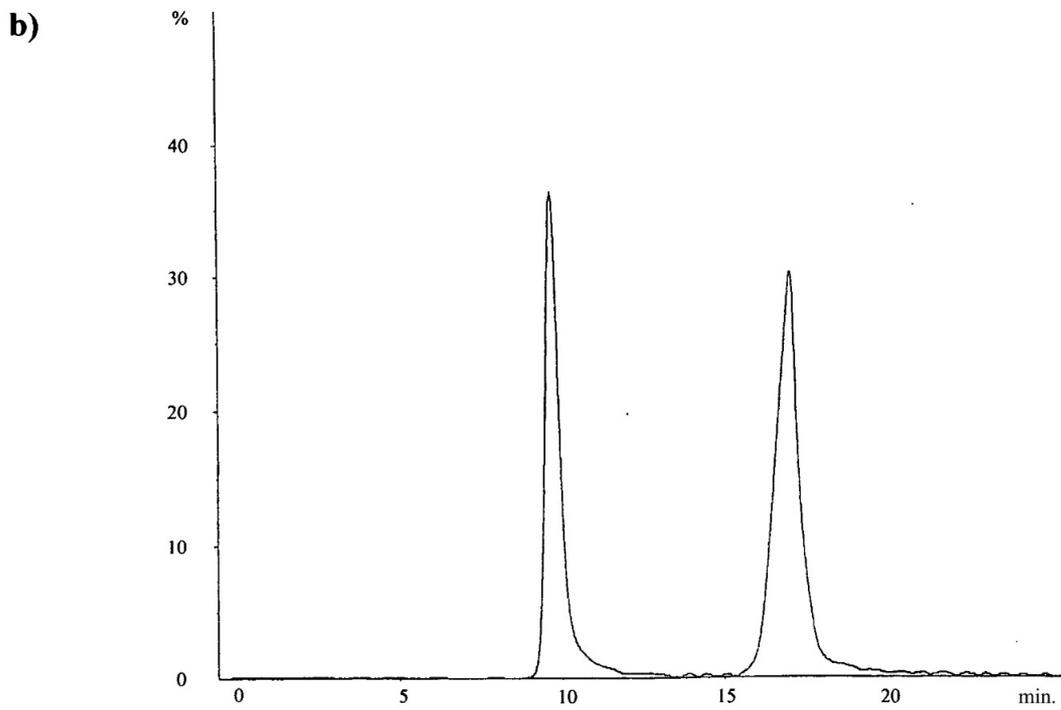
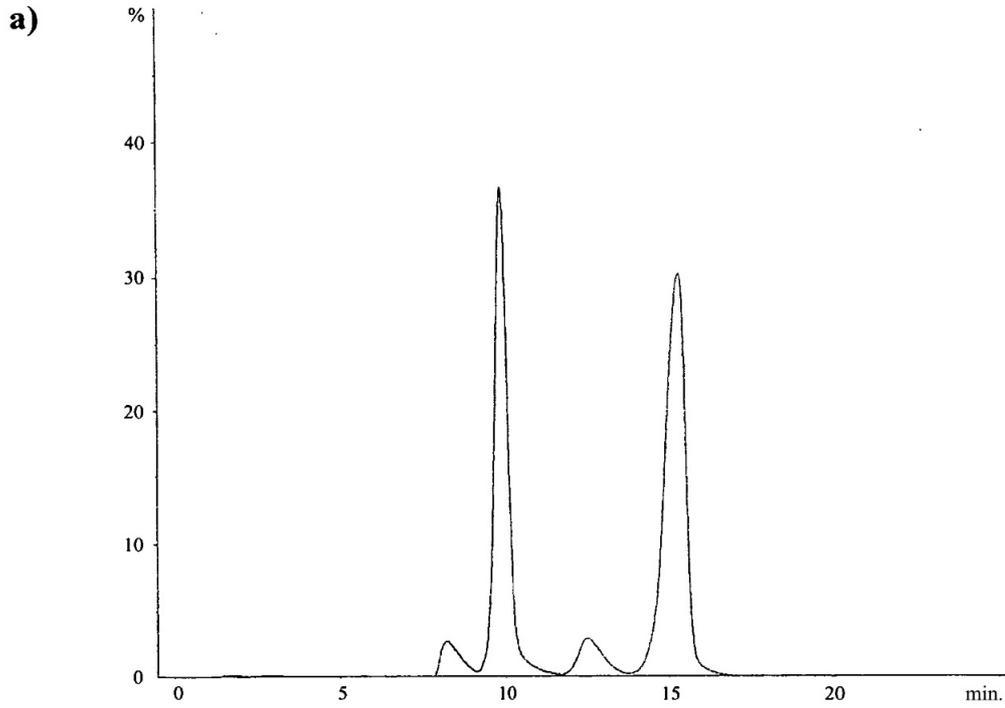
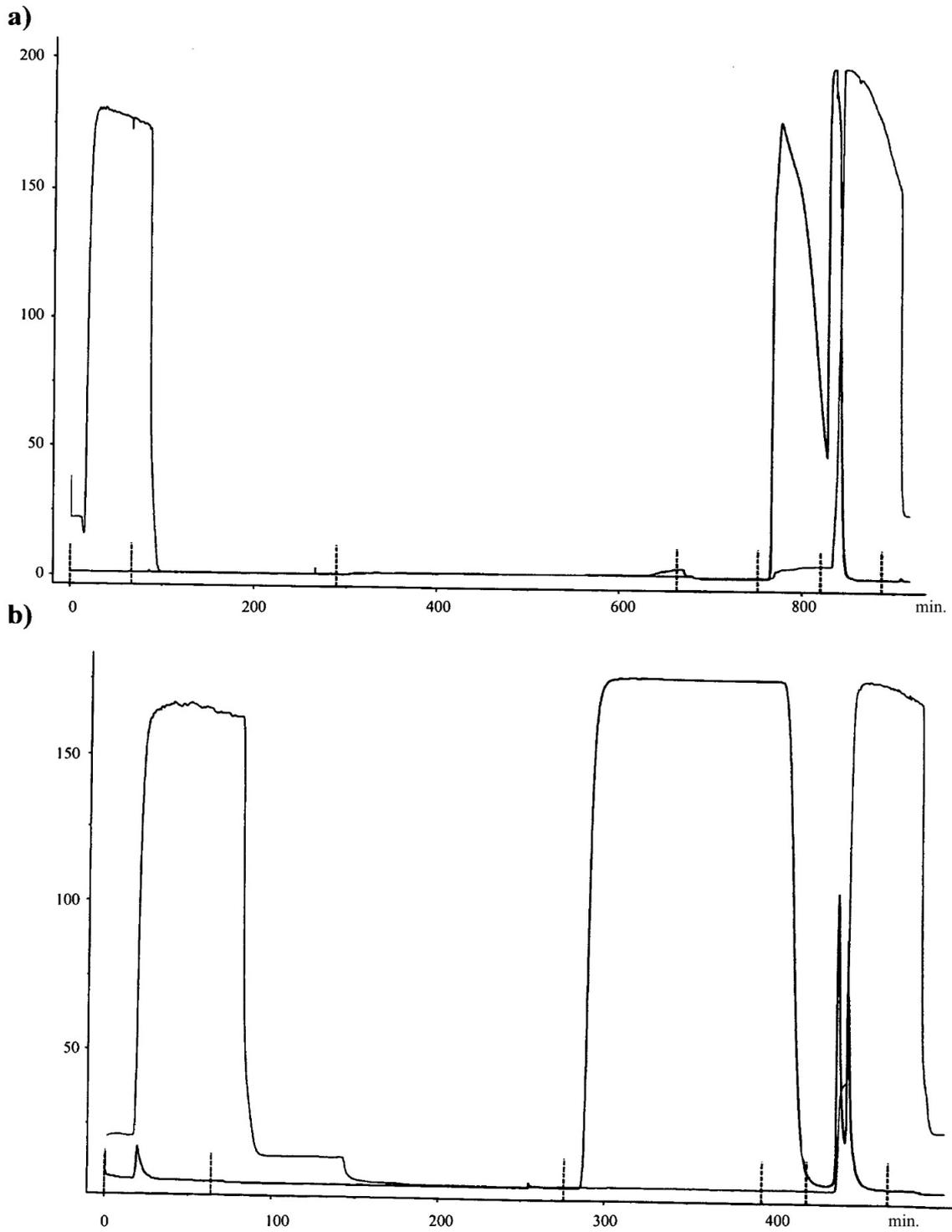


Fig. 7

**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**

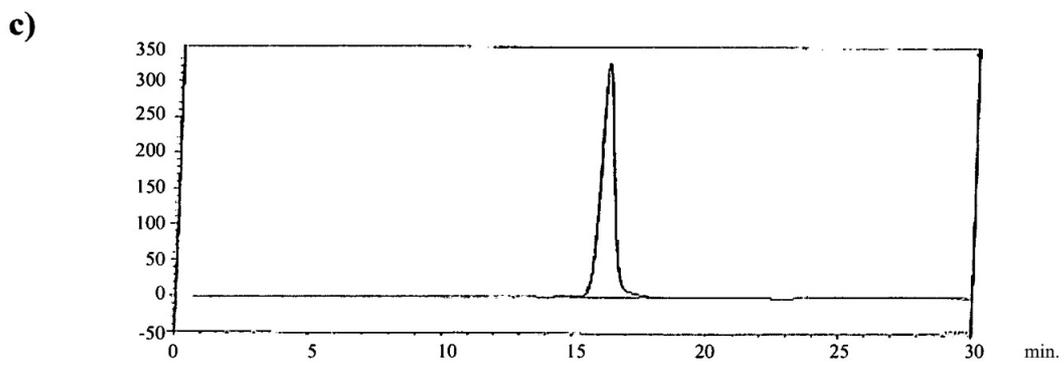
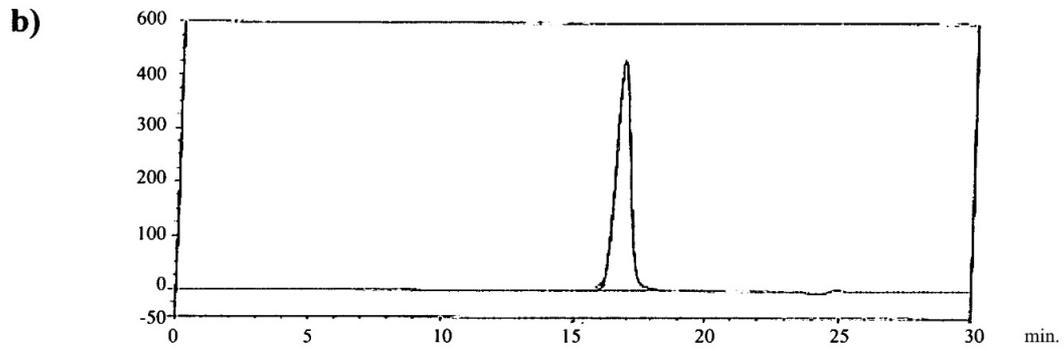
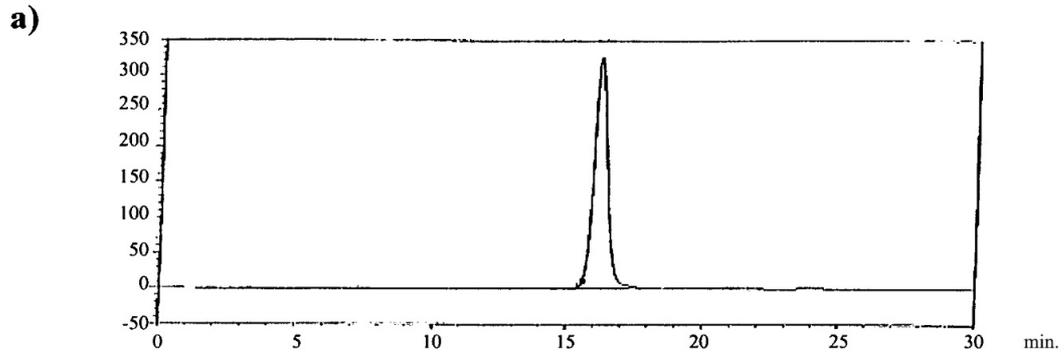


Fig. 11

