

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 461**

21 Número de solicitud: 201301126

51 Int. Cl.:

**B01D 15/10** (2006.01)

**B01D 15/22** (2006.01)

**G01N 30/60** (2006.01)

**B01D 15/18** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**22.11.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.05.2015**

Fecha de la concesión:

**24.11.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**01.12.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)  
Ctra. Sacramento, s/n, OTRI, edf. Central  
04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES**

72 Inventor/es:

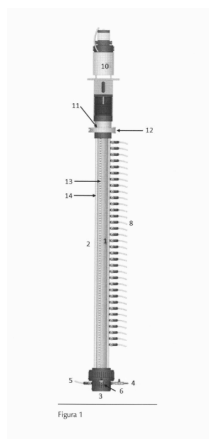
**IBÁÑEZ GONZÁLEZ, María José ;  
MAZZUCA SOBCZUK, Tania ;  
REDONDO MIRANDA, Rosa María;  
MOLINA GRIMA, Emilio ;  
COONEY, Charley L.;  
ORTEGA RUIZ, José y  
TORRES CASTAÑEDA, Juan**

54 Título: **Reactor de flujo de vórtices para la adsorción y purificación de biomoléculas**

57 Resumen:

Reactor de flujo de vórtices para la adsorción y purificación de biomoléculas.

La invención consiste en la construcción de un reactor de flujo de vórtices para ser utilizado en la cromatografía de adsorción de biomoléculas en lecho expandido y elución de las mismas, partiendo de un alimento, caldo de cultivo o extracto biológico sin clarificar.



ES 2 536 461 B2

**DESCRIPCIÓN**

**REACTOR DE FLUJO DE VÓRTICES PARA LA ADSORCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención se enmarca de manera general en el sector químico, farmacéutico y alimentario. Específicamente la invención consiste en la construcción de un reactor de flujo de vórtices para ser utilizado en la cromatografía de adsorción de biomoléculas en lecho expandido, para la obtención de biomoléculas de alta pureza.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La cromatografía de adsorción en lecho expandido se realiza desde principios de los noventa (Chase, H. A. 1994. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. Trends Biotechnol. 12: 296-303). Esta tecnología, que combina las etapas de adsorción y concentración en la purificación de biomoléculas, consta de dos etapas: una primera etapa de adsorción de la biomolécula de interés en lecho expandido a partir de un extracto biológico filtrado o centrifugado, en la que el alimento circula desde la base de la columna al tope pasando a través de un plato poroso o distribuidor, donde se produce la adsorción de la biomolécula de interés en el lecho expandido mientras que los restos de bioproductos salen de la columna y una segunda etapa de elución de la biomolécula de interés en lecho sedimentado, en la que el tampón eluye desde el tope a la base de la columna, saliendo la biomolécula de interés purificada y concentrada. Esta tecnología está siendo ampliamente utilizada en la actualidad para recuperar biomoléculas directamente de cultivos de bacterias, de levaduras, de células animales, de extracto de microalgas, leche y cualquier otro tipo de extracto biológico.

Las resinas Streamline comercializadas por la empresa GE Healthcare y las resinas Upfront Chromatography comercializadas por la empresa del mismo nombre son

30

los adsorbentes cromatográficos más utilizados para obtener lechos expandidos estables.

5 Las patentes US 5,522,993 y US 6,783,962 describen las partículas de adsorción cromatográficas comercializadas por la empresa GE Healthcare y Upfront Chromatography, respectivamente. Ambos tipos de resinas se caracterizan por tener una densidad superior a la del agua, lo que permite que puedan ser fluidizadas, permaneciendo en el interior de la columna. Las resinas comercializadas por Upfront son más resistentes físicamente, de un tamaño más  
10 pequeño y de mayor densidad que las resinas Streamline.

Las resinas comercializadas por Upfront Chromatography son muy resistentes a la ruptura siendo utilizadas en un tipo de columna también patentada y comercializada por la empresa Upfront Chromatography. Esta invención se  
15 describe en la solicitud de patente U.S 2006/0060533. Las columnas Upfront llevan en la base un distribuidor de aspas que gira para producir la mezcla. Las aspas tienen orificios por donde sale el extracto biológico. El giro de las aspas evita la formación de canales preferentes y permite la utilización de extractos sin centrifugar. La desventaja de la resina Upfront es su coste elevado, lo que hace  
20 que se utilicen más las resinas Streamline en el proceso de adsorción en lecho expandido en columna de plato poroso. Una desventaja de la resina Streamline es que no puede ser utilizada con extractos biológicos sin clarificar, debido a que el plato poroso se obstruiría. Otra desventaja de las resinas Streamline es su fragilidad, no pueden ser utilizadas en las columnas diseñadas por Upfront  
25 Chromatography, se romperían con el giro de las aspas.

El flujo de vórtices de Taylor fue descrito por primera vez por Taylor (Taylor, G.I. 1923. Stability of a viscous liquid contained between two rotating cylinders). Taylor estudia el movimiento de un fluido en la zona anular entre dos cilindros  
30 concéntricos. Analizó el movimiento del fluido en función de la rotación de

ambos cilindros a la vez o el movimiento de uno solo estando el otro fijo. Taylor demostró la existencia del flujo de vórtices en la zona anular cuando el cilindro externo permanecía estacionario y se movía solo el cilindro interno.

- 5 Un aumento de la velocidad angular ( $\omega$ ) del cilindro interno va acompañada de diferentes patrones de flujo que vienen caracterizados por un número adimensional, conocido como número de Taylor,  $Ta$ . Además de la velocidad angular del cilindro interno, el número de Taylor depende de la viscosidad cinemática del fluido ( $\nu$ ), del radio externo del cilindro interno ( $r_i$ ) y del ancho de la zona anular ( $d$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:
- 10

$$Ta = \frac{\omega \cdot r_i \cdot d}{\nu}$$

- donde  $d = r_e - r_i$
  - siendo  $r_e$  el radio interno del cilindro externo y  $r_i$  el radio externo del cilindro interno.
- 15

A bajas velocidad rotacionales, el movimiento del cilindro interno provoca un movimiento del fluido tangencial en la zona anular, un flujo de cizalla llamado laminar de Couette. Si la velocidad rotacional del cilindro interno se incrementa por encima de un nivel crítico, el movimiento del fluido deja de ser tangencial para ser toroidal, llamado flujo de vórtices. Aparecen alternativamente vórtices toroidales que rotan en sentido opuesto. Estos vórtices llamados vórtices de Taylor son rotacionalmente simétricos y tienen forma de “donuts” teniendo de diámetro aproximadamente el mismo del ancho de la zona anular.

20

25

Si el reactor de Taylor está provisto de una entrada y salida para el flujo axial el resultado es un reactor de flujo de vórtices de Taylor. A medida que aumente el número de Taylor por encima del valor crítico van apareciendo distintos patrones

de flujo: flujo de vórtices de Taylor cuando la relación  $Ta/Tac$  es menor de 15, flujo de vórtices ondulado y en espiral cuando  $Ta/Tac$  está comprendido entre 15 y 30, flujo de vórtices turbulento cuando la relación  $Ta/Tac$  es entre 30 y 160 y flujo turbulento cuando la relación  $Ta/Tac$  es superior a 250.

- 5 El valor del número de Taylor crítico,  $Ta_c$ , viene dado por la siguiente ecuación (Lee, S. and Lueptow, R.M. 2001. Rotating reverse osmosis: a dynamic model for flux and rejection. *Journal of Membrane Science*. 192: 129–143):

$$Ta_c = 41,02 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{0,5} + 25,75 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{0,5} + 1,85 \cdot \left(\frac{d}{r_i}\right)^{1,5}$$

10

La utilización del reactor de flujo de vórtices para la adsorción de biomoléculas se inicia a principios de los noventa (Moore C.M.V. 1994. Characterization of a Taylor-Couette vortex flow reactor, páginas 190-195, Tesis doctoral, Massachusetts Institute Technology). En este trabajo se llegó a trabajar con un 50%

15

de adsorbente con respecto al volumen del reactor, pero hubo importantes problemas de bloqueo del adsorbente a la salida del reactor. Diez años más tarde, se utilizó el reactor de flujo de vórtices para obtener  $\alpha 1$ - antitripsina recombinante humana a partir de un cultivo de *Escherichia Coli* clarificado en el que se había expresado (Ma, J. y Cooney, C.L. 2004. Application of Vortex Flow Adsorption

20

Technology to Intein-Mediated Recovery of Recombinant Human  $\alpha 1$ -Antitrypsin. *Biotechnol. Pro*: 20, 269-276). Para evitar el arrastre de la resina diseñaron una salida del reactor que ocupaba toda la zona anular del tope del reactor, haciendo disminuir el flujo axial a la salida. Utilizaron solo un 5% del volumen del reactor con adsorbente, por lo que obtuvieron una pobre productividad. En ambos

25

trabajos la suspensión de la resina es debida a la velocidad rotacional del cilindro interno y no a la velocidad axial. En ambos casos era necesaria la presencia de una membrana de nylon a la salida del reactor para evitar la salida de adsorbente, lo que les impedía poder trabajar con caldos de cultivo o extractos biológicos sin

clarificar. En ambos trabajos las productividades obtenidas fueron bajas al ser bajo el volumen de adsorbente empleado.

5 Se solucionaron los problemas de bloqueo de la resina a la salida el reactor cambiando las variables de operación del reactor de flujo de vórtices (Ibáñez-González, M.J. y Cooney, C.L. 2007 Studies on protein adsorption in a vortex flow reactor. Process Biochemistry 42: 1592–1601). La expansión del lecho en este trabajo es debida a la velocidad axial y no a la velocidad rotacional. Si solo hubiera rotación el adsorbente se quedaría en la base del reactor. A pesar de  
10 poder aumentar el porcentaje de adsorbente en el interior del reactor, cuando realizaron la adsorción en lecho expandido con una proteína patrón, obtuvieron una pobre adsorción acompañada de productividades bajas.

15 Los trabajos mencionados anteriormente han utilizado el reactor de flujo de vórtices para la adsorción de biomoléculas, pero en ningún caso se ha descrito un reactor con las características de la presente invención. Ni tampoco se ha descrito antes de la invención un reactor de flujo de vórtices que haya utilizado como alimento un caldo de cultivo sin clarificar.

20 La invención que se propone pretende solucionar los problemas encontrados en la literatura. Y se caracteriza por la construcción de un reactor de flujo de vórtices en el que se puede llevar a cabo de forma eficaz la adsorción de las biomoléculas de interés a partir de caldos de cultivo sin clarificar y extractos proteicos en lecho expandido.

25

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención consiste en la construcción de un reactor de flujo de vórtices para la adsorción de biomoléculas (Figura 1) y elución de las mismas. La invención está formado por:

- a) Un cuerpo interno que gira (1). De forma cilíndrica y hueco por dentro para ser más liviano. Este cuerpo está fabricado en acero inoxidable para ser totalmente recto y dar inercia al giro. Está sujeto a la base del reactor (3) mediante un cojinete (9) y por su parte superior a un motor (10).
- 5 b) De forma concéntrica al cuerpo interno (1) se coloca un cuerpo estacionario externo (2), hecho de material transparente y de forma cilíndrica. Entre la pared externa del cuerpo interno y la pared interna de dicho cuerpo externo existe un espacio anular (14), relleno por la resina adsorbente y donde se produce la adsorción de la biomolécula de interés en lecho expandido y la
- 10 elución de la misma en lecho sedimentado. En la pared exterior del cuerpo externo (2) se sitúan válvulas de salida (8) cada 2 cm a partir de una altura de 15 cm desde la base del reactor.
- c) En la pared externa del cuerpo externo se coloca un sistema de medida (13).
- d) La tapa superior (11) soporta al cuerpo interno y se deja apoyar en el cuerpo
- 15 externo uniéndose a él mediante una abrazadera (12).
- e) En la parte inferior de la carcasa externa, 2 milímetros por encima de la base del reactor (3) se encuentra una válvula de entrada de alimento en el proceso de adsorción (4), una válvula para retirar la resina adsorbente (5) y una válvula de salida en el proceso de elución (6) en la que está colocada una membrana
- 20 de nylon (7) para evitar la salida de la resina adsorbente.
- f) Un motor (10) responsable del giro del cilindro interno (1) que regula la velocidad de giro. El valor del número de Taylor está comprendido entre el valor del Tac y 15 veces su valor.
- g) La relación geométrica entre el radio externo del cilindro interno ( $r_i$ ) y el radio
- 25 interno de la carcasa estacionaria ( $r_e$ ) viene dada por la ecuación:

$$\eta = \frac{r_i}{r_e}$$

La relación de aspecto entre la longitud del reactor (L) y la anchura del espacio anular (d) se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{L}{d}$$

El valor de la relación de radios está comprendido de forma general entre 0,1 y 0,99 y en el caso de la relación de aspecto entre 10 y 500.

5 La invención es aplicada al proceso de adsorción de biomoléculas en lecho expandido (Figura 3a) y elución de las mismas en lecho sedimentado (Figura 3b). Para realizar dicho proceso es necesario disponer de un reactor de flujo de vórtices diseñado para este fin (Figura 1), resina adsorbente, disolución tampón, alimento sin clarificar y dos bombas peristálticas. El proceso de la invención está formado por las siguientes etapas:

10

- a) Se introduce la resina adsorbente en la zona anular del reactor (14) a través de una válvula de salida (8) hasta la altura deseada indicada por el sistema de medida (13). En la presente invención, se entiende por “resinas adsorbentes” a las resinas utilizadas en la adsorción en lecho expandido, entre las que se encuentran las resinas que contienen agarosa, un núcleo inerte de cuarzo cristalino y un intercambiador iónico (por ejemplo DEAE (dietilaminoetil)), un adsorbente de afinidad (por ejemplo agentes quelantes, heparina (adsorbente de afinidad para purificar proteínas plasmáticas) o rproteína A (adsorbente de afinidad para purificación de anticuerpos monoclonales y policlonales) o un adsorbente hidrofóbico.
- 15
- 20

Por tanto, una realización particular es el procedimiento de la invención, donde dicha resina adsorbente comprende agarosa, cuarzo y un adsorbente seleccionado del grupo compuesto por un intercambiador iónico, un adsorbente de afinidad y un adsorbente hidrofóbico. De forma preferible, dicho intercambiador iónico se selecciona del grupo compuesto por DEAE y SP, dicho adsorbente de afinidad se selecciona del grupo compuesto por un agente quelante, heparina y rproteína A.

25



- b) Se bombea la disolución tampón de equilibrio por la válvula de entrada (4) a la zona anular del reactor (14) con ayuda de una bomba peristáltica. La velocidad axial de la disolución tampón genera un lecho expandido inestable.
- 5 c) Se hace girar el cilindro interno (1) por encima del valor crítico apareciendo un flujo secundario formado por vórtices de Taylor que ocupan la zona anular (14) y estabiliza el lecho expandido.
- d) La salida del reactor elegida (8) se sitúa entre 2 y 4 cm por encima del tope del lecho expandido a través de otra bomba peristáltica que opera a la misma velocidad, siendo el flujo de salida llevado a un colector de tubos. La altura  
10 final del lecho expandido depende de la altura inicial de lecho sedimentado y de la velocidad axial pero no del flujo secundario que tiene como función estabilizar el lecho.
- e) Una vez estabilizado el lecho, se cambia el tampón de equilibrio por el alimento para que se produzca la adsorción en lecho expandido de la  
15 biomolécula de interés (Figura 3a).
- f) Una vez adsorbida la biomolécula de interés se cambia el alimento por la disolución tampón de equilibrio para eliminar los restos celulares y biomoléculas no adsorbidas que puedan quedar entre las partículas de resina adsorbente.
- 20 g) Para iniciar el proceso de elución, se para la rotación del cilindro interno y la bomba peristáltica de entrada. La resina adsorbente sedimenta. La bomba de salida se sitúa entre 2 y 4 cm por encima de la parte superior del lecho sedimentado y se cambia de sentido, convirtiéndose en bomba de entrada del tampón de elución (Figura 3b).
- 25 h) La elución de la biomolécula de interés se realiza a través de la válvula (6) que tiene el orificio cubierto con una membrana de nylon para evitar la salida de la resina. La elución es llevada a un colector de tubos con ayuda de una bomba peristáltica.

i) Las corrientes de adsorción y elución a la salida son recogidas en un colector de tubos analizándose las muestras en tubos individuales de volumen conocido. A dichas muestras se le calcula:

5 •  $C_i/C_o$ , que es la relación entre la concentración de biomolécula a la salida del reactor en la etapa de adsorción ( $C_i$ ), y la concentración de biomolécula del alimento ( $C_o$ ), que es bombeado al interior del reactor.

10 • La adsorción máxima de biomolécula por ciclo,  $A_{max}$  (mg/ciclo), que se obtiene multiplicando la concentración del alimento ( $C_o$ ) por el volumen de alimento introducido en el reactor ( $V_o$ ), y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A \text{ (mg / ciclo)} = C_o \times V_o$$

15 • La productividad,  $P$  (mg /ciclo), que se define como la cantidad de biomolécula adsorbida a la resina adsorbente por ciclo. Se obtiene, mediante la siguiente ecuación, restando la cantidad de biomolécula no retenida en las etapas de adsorción y lavado en lecho expandido a la cantidad de la adsorción máxima de biomolécula. Los subíndices  $i$  y  $j$

20 representan a cada tubo de la etapa de adsorción y lavado, respectivamente.  $N_a$  y  $N_l$  representan el número total de tubos de muestra recogidos durante las etapas de adsorción y lavado, respectivamente.  $C_i$  y  $C_j$ , son las concentraciones de biomolécula a la salida del reactor y  $V_i$  y  $V_j$  son los volúmenes de muestra recogidos en cada tubo.

25

$$P \text{ (mg / ciclo)} = C_o \times V_o - \sum_{i=1}^{i=N_a} C_i \times V_i - \sum_{j=1}^{j=N_l} C_j \times V_j$$

• La capacidad dinámica de adsorción,  $q$ , que se define como la cantidad de biomolécula adsorbida por mL de resina adsorbente para un valor

dado de  $C_i/C_o$  (mg de biomolécula adsorbidos/mL de resina adsorbente). Se obtiene mediante la siguiente ecuación, siendo  $V_{resina}$ , el volumen de resina adsorbente introducido en la columna.

5

$$q \text{ (mg / mL)} = \frac{C_o \times V_o - \sum_{i=1}^{i=N_a} C_i \times V_i - \sum_{j=1}^{j=N_l} C_j \times V_j}{V_{resina}}$$

La invención proporciona un reactor de flujo de vórtices que mejora el proceso de transferencia de materia y de adsorción. La presencia de los vórtices mejora el contacto entre el fluido y la resina adsorbente.

10

La invención proporciona un reactor de flujo de vórtices diseñado para trabajar con caldos de cultivo sin clarificar y extractos biológicos. Los vórtices de Taylor mezclan el alimento sin clarificar con la resina adsorbente manteniendo estable el lecho expandido.

15

La invención proporciona un reactor de flujo de vórtices diseñado para disminuir la viscosidad de los alimentos pseudoplásticos. Un aumento de la rotación del cilindro interno aumenta la velocidad de corte y disminuye la viscosidad del fluido, mejorando la transferencia de materia y la adsorción.

20

La invención nos proporciona un reactor de flujo de vórtices que permite utilizar resinas adsorbentes que puedan ser fluidizados en disoluciones acuosas. Se pueden utilizar tanto las resinas adsorbentes Streamline comercializadas por la empresa GE Healthcare como las resinas adsorbentes Upfront comercializadas por la empresa del mismo nombre.

25

La invención nos proporciona un reactor de flujo de vórtices que permite ser escalado variando la anchura de la zona anular o distancia entre las superficies.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Se muestra el diseño del reactor de flujo de vórtices que está formado por un cilindro interno que gira (1), una carcasa externa estacionaria (2). En la parte inferior de la carcasa externa 2 milímetros por encima de la base del reactor (3) se encuentra una válvula de entrada de alimento (4), una válvula para retirar la resina adsorbente (5) y una válvula de salida en lecho sedimentado (6) en la que está colocada una membrana de nylon (7) para evitar la salida de la resina adsorbente. En la carcasa externa (2) se colocan las válvulas de salida (8) cada 2 cm a partir de una altura de 15 cm desde la base del reactor. El cilindro interno gira con ayuda de un motor (10). La tapa superior del reactor (11) soporta el cilindro interno y se une al motor por un cierre mecánico y a la carcasa externa mediante una abrazadera (12). En la carcasa externa (2) se coloca un sistema de medida (13) para medir la altura inicial del lecho sedimentado y posteriormente del lecho expandido.

Figura 2. Se muestra de forma transversal la parte inferior de la carcasa externa del reactor que se encuentra unida al reactor mediante una unión de tres piezas. En el centro de la base del reactor (3) se coloca un cojinete (9) que se acopla al cilindro interno (1). En la parte inferior de la carcasa externa 2 milímetros por encima de la base (3) se encuentra una válvula de entrada de alimento (4), una válvula para retirar la resina adsorbente (5) y una válvula de salida en lecho sedimentado (6) en la que está colocada una membrana de nylon (7) para evitar la salida de la resina adsorbente.

Figura 3. Se muestra de forma esquemática la invención aplicada a la cromatografía de adsorción de lecho expandido (Figura 3a) y a la elución de la biomolécula de interés en lecho sedimentado (Figura 3b).

30

**MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE****Exposición detallada experimento 1:**

- El cultivo de la microalga *Phorphyridium cruentum* es centrifugado. El pellet es resuspendido con tampón 50 mM NaAc (acetato de sodio) y ajustado a pH 5,5 con HAc (ácido acético), aumentando por 10 la concentración del cultivo. A
- 5 continuación, el caldo del cultivo concentrado sufre el ciclo de congelación-descongelación cinco veces para romper la pared celular y liberar la proteína de interés.
- A partir de 620 mL de caldo concentrado de células rotas de la microalga
- 10 *Phorphyridium cruentum* se realiza la adsorción de la proteína de interés, en este caso B-ficoeritrina (BPE) mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido en el reactor de flujo de vórtices a 200 cm/h (22,4 mL/min). La altura de la resina adsorbente en lecho sedimentado es de 20 cm (135 mL de Streamline DEAE) pasando a ser de 37 cm en lecho expandido con el tampón de equilibrio 50 mM
- 15 NaAc, pH 5,5 con HAc y de 64 cm con el alimento. La velocidad de giro del cilindro interno es de 50 rpm. Para esta velocidad de giro la viscosidad del cultivo concentrado que sigue la ley de la potencia es de 3.5 mPa·s medida mediante un viscosímetro Brookfield DV-II+.
- 20 Durante el proceso de adsorción se adsorbe la proteína de interés BPE y otras ficocianinas presentes en el cultivo en pequeñas cantidades, R-ficocianina y aloficocianina. El resto de proteínas y compuestos del extracto proteico son eluidos y llevados a un colector de tubos donde se recogen las muestras en tubos de volumen conocido, a los que se les mide la concentración de B-ficoeritrina
- 25 mediante espectrofotometría. También mediante espectrofotometría se ha medido la concentración de B-ficoeritrina del alimento. En la tabla 1 se muestra para el experimento los valores de  $C_o$ ,  $V_o$ ,  $V_{resina}$ ,  $C_i/C_o$ ,  $A_{máx}$ ,  $P$  y  $q$  obtenidos.
- Se realizó por último la etapa de elución en lecho sedimentado en el reactor de
- 30 flujo de vórtices, siendo la altura del lecho sedimentado de 20 cm. A una

velocidad de 100 cm/h (11,2 mL/min) se introdujo la disolución tampón de elución (250 mM NaAc, pH 5,5 con HAc) de forma continua. Durante el proceso de elución se eluyó la proteína de interés BPE concentrada y con una pureza elevada; se detectaron pequeñas cantidades de otras proteínas y R-ficocianina. La B-ficoeritrina purificada se llevó a un colector de tubos donde se recogió en tubos, a los que se les midió el volumen y la concentración y la pureza de B-ficoeritrina mediante espectrofotometría. Para finalizar, se realizó una elución de lavado. Se incrementó la fuerza iónica de la disolución tampón (1 M NaAc, pH 5,5 con HAc) para arrastrar los restos de proteínas que hubiesen quedado sin eluir.

10

En la etapa de elución se obtuvo un pico cromatográfico de B-ficoeritrina, en el que se recogió el 73,1% de la cantidad de BPE inicial. La relación entre la absorbancia a 545 nm y 280 nm es un parámetro cualitativo de la pureza de la BPE obtenida. Valores superiores a 4 indican que la disolución es rica en BPE.

15

Para una relación  $A_{545}/A_{280} > 4$ , se obtuvieron 120 mg de BPE, representando el 68,5% de la cantidad de BPE de partida.

Exposición detallada experimento 2:

20

A partir de 5000 mL del caldo de cultivo del hibridoma 55/6 de ratón transgénico se realiza la adsorción del anticuerpo IgG2a mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido en un reactor de flujo de vórtices a 300 cm/h (10,2 mL/min). La molaridad y el pH del cultivo se ajustan al tampón de adsorción. La altura de la resina adsorbente en lecho sedimentado es de 20 cm (50mL de Streamline rprotein A) pasando a ser de 37 cm en lecho expandido con el tampón de equilibrio 200 mM fosfato de sodio, pH 7,5 y de 56 cm con el alimento. La velocidad de giro del cilindro interno es de 50 rpm. Para esta velocidad de giro la viscosidad del cultivo que sigue la ley de newton es de 1,3 mPa·s medida mediante un viscosímetro Brookfield DV-II+.

30

Durante el proceso de adsorción solo se adsorbe el anticuerpo IgG2a. El resto de proteínas procedentes del medio de cultivo y células de hibridoma son eluidos y llevados a un colector de tubos donde se recogen las muestras en tubos de volumen conocido a los que se les mide la concentración de IgG2a mediante el método ELISA. Mediante el método ELISA se ha medido la concentración de IgG2a del alimento. En la tabla 1 se muestra para el experimento los valores de  $C_i/C_o$ , A, P y q obtenidos.

Se realizó por último la etapa de elución en lecho sedimentado en el reactor de flujo de vórtices, siendo la altura del lecho sedimentado de 20 cm. A una velocidad de 105 cm/h (3,6 mL/min) se introdujo la disolución tampón de elución (100 mM citrato sódico, pH 5,0). Durante el proceso de elución se eluyó el anticuerpo de interés IgG2a que fue llevado a un colector de tubos. A los tubos se les midió el volumen y la concentración mediante espectrofotometría a 280 nm utilizando una recta patrón de IgG2a. Para finalizar, se realizó una elución de lavado con tampón 100 mM citrato sódico, pH 3,0.

En la etapa de elución se obtuvo un pico cromatográfico de IgG2a, en el que se recogió el 74,9% de la cantidad de IgG2a inicial. Se recogieron 188 mg de IgG2a.

Exposición detallada experimento 3:

A partir de huevos frescos se separa la clara de huevo y se diluye con tampón 20 mM glicina, pH 9 hasta un 16% en peso. La disolución es agitada para obtener una disolución homogénea, a dicho pH se produce la desnaturalización y coagulación de otras proteínas que son eliminadas con un colador.

A partir de 238 mL de extracto proteico se realiza la adsorción de la proteína de interés, en este caso lisozima mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido en un reactor de flujo de vórtices a 200 cm/h (6,8 mL/min). La altura de la resina adsorbente en lecho sedimentado es de 20 cm (47 mL de Streamline SP) pasando a ser de 38 cm en lecho expandido con el tampón de equilibrio 20

mM glicina, pH 9 y de 42 cm con el alimento. La velocidad de giro del cilindro interno es de 50 rpm. Para esta velocidad de giro la viscosidad del extracto que sigue la ley de newton es de 1,3 mPa·s medida mediante un viscosímetro Brookfield DV-II+.

5

Durante el proceso de adsorción se adsorbe la lisozima. El resto de proteínas de la clara del huevo y compuestos del extracto proteico son eluidos y llevados a un colector de tubos, a los que se les mide el volumen y la concentración de lisozima mediante el ensayo de actividad y calibración con lisozima patrón. También se le determinó la concentración al alimento. En la tabla 1 se muestra para el experimento los valores de  $C_0$ ,  $V_0$ ,  $V_{resina}$ ,  $C_i/C_0$ ,  $A_{máx}$ ,  $P$  y  $q$  obtenidos.

10

Se realizó por último la etapa de elución en lecho sedimentado en el reactor de flujo de vórtices, siendo la altura del lecho sedimentado de 20 cm. A una velocidad de 100 cm/h (3,4 mL/min) se introdujo la disolución tampón de elución (20 mM glicina, 2 M NaCl, pH 9). Durante el proceso de elución se eluyó la lisozima que se llevó a un colector de tubos, a los que se les midió el volumen y la concentración mediante el ensayo de actividad y calibración con lisozima patrón.

15

En la etapa de elución se obtuvo un pico cromatográfico de lisozima, 76,6 mg, en el que se recogió el 81% de la cantidad inicial de lisozima con un factor de concentración de 21.

20

Tabla 1. Valores de  $C_0$ ,  $V_0$ ,  $V_{resina}$ ,  $C_i/C_0$ ,  $A_{máx}$ ,  $P$  y  $q$  obtenidos para cada experimento.

25

Biomolécula	$C_0$ (mg/mL)	$V_0$ (mL)	$V_{resina}$ (mL)	$C_i/C_0$	$A_{máx}$ (mg/ciclo)	$P$ (mg/ciclo)	$q$ (mg/mL)
B-ficoeritrina	0,265	620	135	0,05	164	156	1,15
Anticuerpo IgG2a	0,05	5000	50	0,00	250	250	5,0



ES 2 536 461 B2

Lisozima	0,4	238	47	0,00	95	95	2,0
----------	-----	-----	----	------	----	----	-----

**REIVINDICACIONES**

1. Reactor de flujo de vórtices para la adsorción y purificación de biomoléculas, a partir de un alimento, caldo de cultivo o extracto biológico sin clarificar, que comprende:
- 5 a) Un cuerpo interno que gira (1), de forma cilíndrica y hueco por dentro para ser más liviano. El cuerpo interno está fabricado en acero inoxidable para ser totalmente recto y dar inercia al giro. Sujeto a la base del reactor (3) mediante un cojinete (9) y por su parte superior a un motor (10).
- 10 b) Un cuerpo estacionario externo (2), que se coloca de forma concéntrica al cuerpo interno (1) y está fabricado de material transparente y con forma cilíndrica. Entre la pared externa del cuerpo interno y la pared interna de dicho cuerpo externo existe un espacio anular (14) relleno por la resina adsorbente y donde se produce la adsorción de la biomolécula de interés en lecho expandido y la elución de la misma en lecho sedimentado. En la pared exterior del cuerpo externo (2) se sitúan
- 15 válvulas de salida (8) cada 2 cm a partir de una altura de 15 cm desde la base del reactor.
- c) Un sistema de medida (13) que se coloca en la pared externa del cuerpo externo.
- 20 d) Una tapa superior (11) que soporta al cuerpo interno y se deja apoyar en el cuerpo externo uniéndose a él mediante una abrazadera (12).
- e) Una válvula de entrada de alimento en el proceso de adsorción (4), que se encuentra en la parte inferior de la carcasa externa, 2 milímetros por encima de la base del reactor (3), una válvula para retirar la resina adsorbente (5) y una válvula de salida en el proceso de elución (6) en la
- 25 que está colocada una membrana de nylon (7) para evitar la salida de la resina adsorbente.
- f) Un motor (10) responsable del giro del cilindro interno (1) que regula la
- 30 velocidad de giro. Cuando la rotación del cilindro interno supera un

valor crítico se forman los vórtices toroidales que se solapan al flujo principal y rellenan el espacio anular (14) entre ambos cuerpos interno y externo. El valor del número de Taylor está comprendido entre el valor del  $Tac$  y 15 veces su valor.

- 5 g) La relación geométrica entre el radio externo del cuerpo interno ( $r_i$ ) y el radio interno del cuerpo externo ( $r_e$ ) es:

$$\eta = \frac{r_i}{r_e} \quad \text{estando su valor comprendido entre } 0,1 \text{ t } 0,99.$$

La relación de aspecto entre la longitud del reactor ( $L$ ) y la anchura del espacio anular (14) es:

10 
$$\Gamma = \frac{L}{d} \quad \text{estando su valor comprendido entre } 10 \text{ a } 500.$$

2. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 1 donde la resina adsorbente es colocada en el espacio anular (14), estando en suspensión durante el proceso de adsorción.

15

3. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 1 donde la resina adsorbente comprende agarosa, cuarzo y un adsorbente seleccionado del grupo compuesto por un intercambiador iónico, un adsorbente de afinidad y un adsorbente hidrofóbico.

20

4. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 3, caracterizado por que dicho adsorbente de intercambiador iónico se selecciona del grupo compuesto por DEAE y SP.

25

5. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 3, caracterizado por que dicho adsorbente de afinidad se selecciona del grupo compuesto por un agente quelante, heparina y rproteína A.

6. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 1 donde la relación de los radios es entre 0,3 y 0,9 y la relación de aspecto entre 50 y 250.
7. Un reactor de acuerdo a la reivindicación 1 donde el número de Taylor está comprendido entre  $Tac$  y 5 veces el  $Tac$ .
8. Un procedimiento que emplea el reactor de flujo de vórtices de la reivindicación 1 para la adsorción y purificación de biomoléculas a partir de un alimento, caldo de cultivo o extracto biológico sin clarificar caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- Se introduce la resina adsorbente en la zona anular del reactor utilizándose una válvula de salida (8) hasta la altura deseada indicada por el sistema de medida (13).
  - Se bombea la disolución tampón por la válvula de entrada (4) hasta obtener un lecho expandido inestable.
  - Se hace girar el cilindro interno (1) por encima del valor crítico apareciendo vórtices toroidales que ocupan la zona anular (14) favoreciendo la formación de un lecho expandido estable.
  - La salida del reactor (8) se sitúa entre 2 y 4 cm por encima del tope del lecho expandido a través de otra bomba peristáltica que opera a la misma velocidad, siendo el flujo de salida llevado a un colector de tubos.
  - Una vez estabilizado el lecho, se cambia el tampón de equilibrio por el alimento para que se produzca la adsorción en lecho expandido de la biomolécula de interés. La presencia de los vórtices mejora el contacto entre el fluido y la resina adsorbente mejorando la adsorción. Para los alimentos pseudoplásticos adicionalmente se puede variar la viscosidad con la rotación del cilindro interno. Un aumento de la rotación produce una disminución de la viscosidad y de la resistencia externa entre la biomolécula de interés y la resina adsorbente mejorándose la adsorción.

- f) Una vez adsorbida la biomolécula de interés se cambia el alimento por disolución tampón de equilibrio para eliminar los restos celulares y biomoléculas no adsorbidas que puedan quedar entre las partículas de resina adsorbente.
- 5 g) Para iniciar el proceso de elución, se para la rotación del cilindro interno y la bomba peristáltica de entrada. La resina adsorbente sedimenta. La bomba de salida se sitúa entre 2 y 4 cm por encima de la parte superior del lecho sedimentado y se cambia de sentido, convirtiéndose en bomba de entrada del tampón de elución.
- 10 h) La elución de la biomolécula de interés se realiza a través de la válvula (6) que tiene el orificio cubierto con una membrana de nylon para evitar la salida de la resina. La elución es llevada a un colector de tubos con ayuda de una bomba peristáltica.

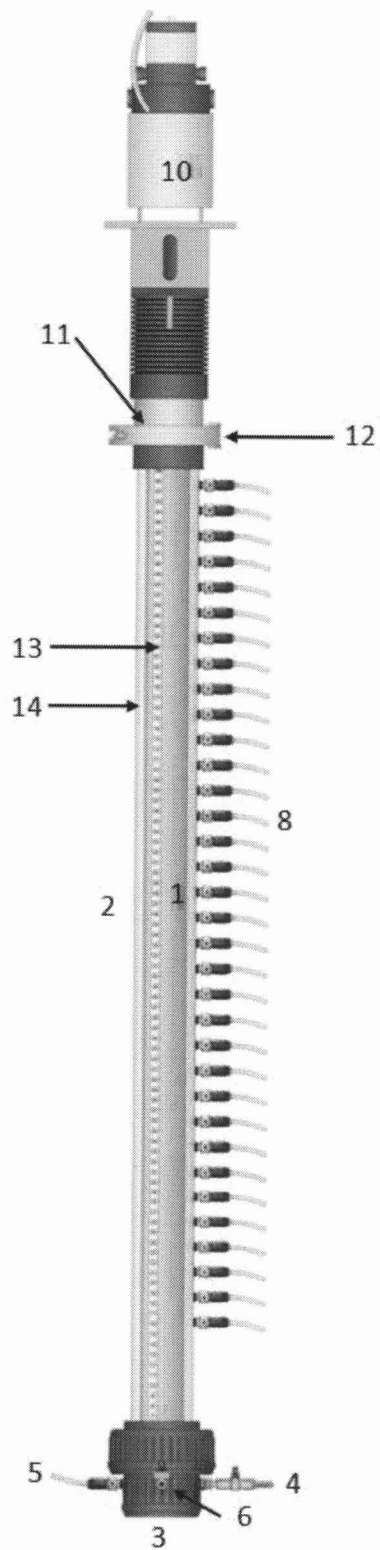


Figura 1

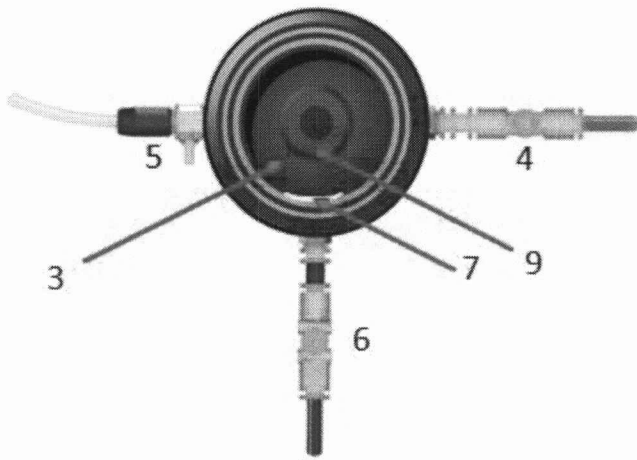


Figura 2

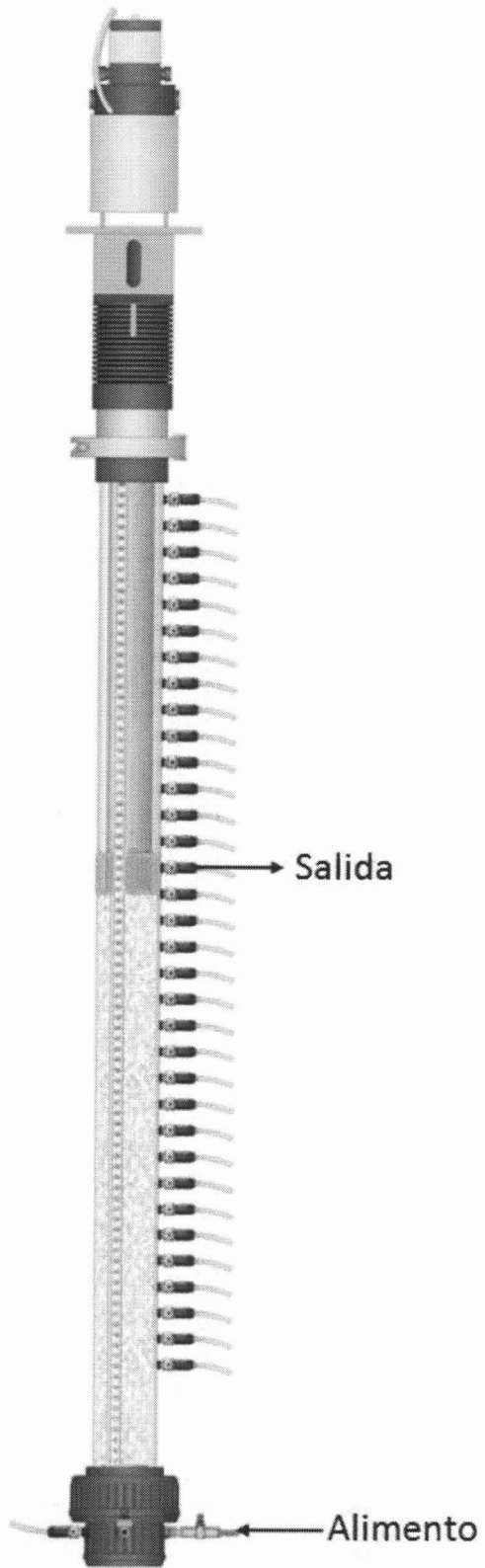


Figura 3a



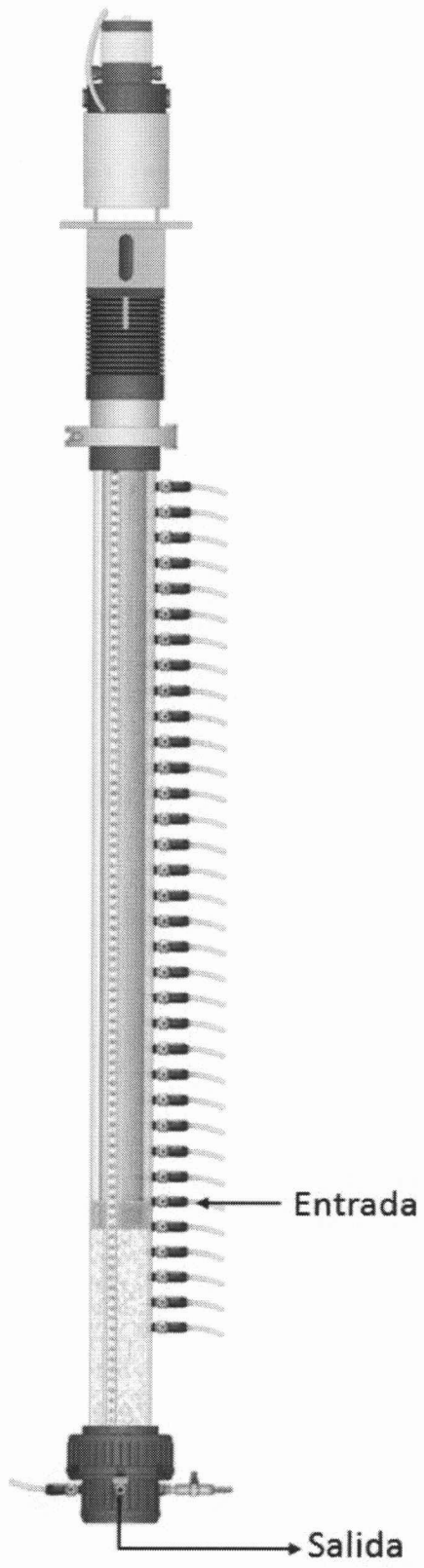


Figura 3b



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201301126  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 22.11.2013  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	IBÁÑEZ-GONZÁLEZ, MJ et al. Studies on protein adsorption in a vortex flow reactor. Process Biochemistry. 2007, vol 42, páginas 1592-1601, especialmente resumen; páginas 1592-1593; figuras 2 y 3.	1-8
A	GIORDANO, RC et al. Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor-I: Flow patterns and mass transfer characteristics. Chemical Engineering Science. 1998, vol. 53 (20), páginas 3635-3652, especialmente resumen; páginas 3639-3640.	1-8
A	MA, J & COONEY, CL. Application of Vortex Flow Adsorption Technology to Intein-Mediated Recovery of Recombinant Human $\alpha$ 1-Antitrypsin. Biotechnology progress. 2004, vol. 20(1), páginas 269-276, especialmente resumen; páginas 269, 272 y 275.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
19.02.2015

Examinador  
J. Collado Martínez

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**B01D15/10** (2006.01)

**B01D15/22** (2006.01)

**G01N30/60** (2006.01)

**B01D15/18** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B01D, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, NPL, IEEE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.02.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	IBÁÑEZ-GONZÁLEZ, MJ et al. Process Biochemistry. 2007, vol 42, páginas 1592-1601	2007
D02	GIORDANO, RC et al. Chemical Engineering Science. 1998, vol. 53 (20), páginas 3635-3652	1998
D03	MA, J & COONEY, CL. Biotechnology progress. 2004, vol. 20(1), páginas 269-276	2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud tiene por objeto un reactor de flujo de vórtices para la adsorción y purificación de biomoléculas a partir de un alimento, caldo de cultivo o extracto biológico sin clarificar. Asimismo, la solicitud se refiere a un procedimiento de adsorción y purificación de biomoléculas llevado a cabo con el reactor de la invención.

El documento D01 divulga un reactor de flujo de vórtices empleado para la adsorción de albúmina sérica bovina (ver resumen; páginas 1592-1593; figuras 2 y 3).

El documento D02 se refiere a un aparato útil como bio-reactor y como dispositivo de adsorción cuyo funcionamiento se basa en el flujo de vórtices (ver resumen; páginas 3639-3640).

El documento D03 divulga un reactor de flujo de vórtices aplicado a la purificación de  $\alpha$ 1-antitripsina (ver resumen; páginas 269, 272 y 275).

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).****Reivindicaciones 1-8**

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Dicho documento divulga un reactor de flujo de vórtices para la adsorción de albúmina sérica bovina, que sería adecuado también para la adsorción y purificación de proteínas a partir de un caldo de cultivo sin clarificar (D01: resumen; página 1592). Este reactor comprende:

- Un cuerpo interno que gira, de forma cilíndrica y hueco por dentro, que contiene en su interior una barra de acero para dar inercia al giro y reducir el tambaleo del cilindro. Dicho cuerpo interno está unido por su parte superior a un motor (D01: página 1593, figuras 2 y 3).
- Un cuerpo estacionario cilíndrico externo transparente, que se coloca de forma concéntrica al cuerpo interno. Entre la pared interna de este cuerpo externo y la pared externa del cuerpo interno existe un espacio anular que se rellena con una resina adsorbente (DEAE). En la pared exterior del cuerpo externo se sitúan válvulas de salida (D01: página 1593; figuras 2 y 3).
- Una tapa superior que soporta al cuerpo interno y se deja apoyar en el cuerpo externo uniéndose a él mediante una abrazadera (D01: figuras 2 y 3).
- Una válvula de entrada de alimento que se encuentra en la parte inferior de la carcasa externa y una válvula adicional que puede considerarse adecuada como válvula de salida para retirar la resina adsorbente. Además, el dispositivo de D01 presenta una válvula de salida en la parte superior de la carcasa externa, que contiene una membrana de nylon para evitar la salida de la resina (D01: página 1593 y figuras 2 y 3).
- Un motor responsable del giro del cilindro interno que regula la velocidad de giro de forma tal que el régimen de flujo en el espacio anular corresponde a vórtices laminares (D01: página 1593). A partir de la descripción aportada y del estado de la técnica, se entiende que dicho régimen sería compatible con un valor del número de Taylor comprendido entre el valor crítico y 15 veces dicho valor crítico.
- Un valor para la relación geométrica entre el radio externo del cuerpo interno ( $R_i$ ) y el radio interno del cuerpo externo ( $R_o$ ) entre 0.68 y 0.88 (valores calculados a partir de los datos de la tabla 1) (D01: página 1593 y figura 3b). La relación de aspecto entre la longitud del reactor y la anchura del espacio anular está a su vez comprendida entre 14,6 y 40 (D01: tabla 1, página 1593; figura 3b).

De lo inmediatamente expuesto se deduce que D01 no divulga todas las características definidas en la reivindicación 1. Así pues, tanto el reactor objeto de la reivindicación 1 y de las reivindicaciones dependientes 2 a 7, como el procedimiento de adsorción y purificación de biomoléculas que emplea el reactor de la reivindicación 1, y que constituye el objeto de la reivindicación 8, satisfacen el requisito de novedad en los términos del art. 6.1 de la LP 11/1986.

## 2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).

Reivindicaciones 1-8

Como ya se ha indicado en el punto 1 correspondiente a la evaluación de la novedad, existen diferencias entre el reactor divulgado en D01 y el reactor objeto de la reivindicación 1. Dichas diferencias se discuten a continuación:

- En primer lugar, en D01 se indica que en el interior del cilindro interno se introduce una barra de acero inoxidable para incrementar la inercia del sistema y reducir el tambaleo del cilindro, mientras que en el reactor de la invención la solución adoptada es un cuerpo interno cilíndrico hueco fabricado en acero inoxidable, que se sujeta a la base del reactor mediante un cojinete. Sin embargo se considera que, a la vista de D01, la solución de los inventores de la presente solicitud constituiría una alternativa obvia para el experto en la materia enfrentado al problema de incrementar la inercia del sistema y mantener recto el cilindro interno.

- En lo que se refiere a la pared exterior del cuerpo externo, el dispositivo de D01 no cuenta con un sistema de medida como el del dispositivo de la invención, si bien la inclusión de dicho sistema de medida se considera también obvio para un experto en la materia que desee controlar la altura del lecho de resina en el dispositivo.

- El reactor de D01 no cuenta en la pared exterior del cuerpo externo con válvulas situadas cada 2 cm a partir de una altura de 15 cm desde la base del reactor. Por otra parte, el reactor divulgado en D01 tampoco presenta la misma configuración de válvulas de entrada de alimento y de salida de resina y de elución en la base del dispositivo que el reactor de la presente solicitud. En relación con estas diferencias, se entiende que las válvulas laterales cada 2 cm han sido incluidas por los inventores para permitir la aplicación de la bomba a la altura adecuada en el proceso de adsorción en lecho expandido primero y posteriormente en el proceso de elución con flujo inverso en lecho sedimentado. Asimismo, la existencia en la base del cuerpo externo del reactor de la presente invención de una válvula de salida de la elución está determinada por el procedimiento particular llevado a cabo con el reactor, que permite realizar una primera etapa de adsorción y lavado en lecho expandido empleando un flujo ascendente y una etapa posterior de elución en lecho sedimentado empleando un flujo descendente. Dicho procedimiento, de acuerdo con lo descrito en la presente solicitud (página 5, líneas 9-24), mejora la productividad de la purificación y es fruto de las investigaciones realizadas por los inventores. Por ello, la configuración de las distintas válvulas de salida/entrada del reactor de la presente solicitud no se considera en modo alguno obvia para un experto en la materia meramente a la vista de lo divulgado en D01, o combinando las enseñanzas de D01, D02 y D03.

En base a lo anterior, teniendo en cuenta que el reactor de la reivindicación 1 presenta ciertas características que no resultarían obvias para un experto en la materia a la vista de los documentos del estado de la técnica, se considera que el objeto de dicha reivindicación 1 cumple con el requisito de actividad inventiva del art. 8.1 de la LP 11/1986, y confiere actividad inventiva al objeto de las reivindicaciones dependientes 2 a 7, así como al de la reivindicación independiente 8.