

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 866**

21 Número de solicitud: 201200502

51 Int. Cl.:

G01N 30/04 (2006.01)

G01N 30/16 (2006.01)

G01N 30/24 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

B01D 15/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **04.05.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.06.2012

71 Solicitante/s:
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Otri-Ual Ctra. Sacramento s/n
04120 Almería , ES

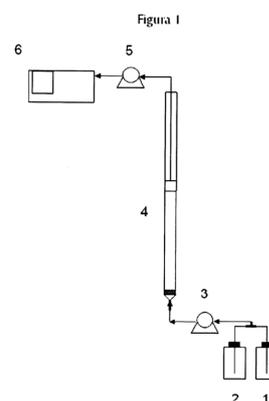
72 Inventor/es:
IBAÑEZ GONZÁLEZ , María José ;
MAZZUCA SOBCZUK , Tania y
MOLINA GRIMA , Emilio

74 Agente/Representante:
No consta

54 Título: **Procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido**

57 Resumen:

Un procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido, que comprende introducir de forma discontinua con un pulsador de membrana elástica un extracto biológico en dicho lecho expandido que comprende una resina adsorbente, lavar las moléculas no adsorbidas en dicha resina adsorbente y eluir las biomoléculas adsorbidas en dicha resina adsorbente. El procedimiento de la invención puede aplicarse a la purificación de B-ficoeritrina a partir de extracto de proteínas de la microalga Phorphyridium cruentum.



ES 2 383 866 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS QUE UTILIZA
CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se enmarca de manera general en el sector químico, farmacéutico y alimentario. Específicamente, la presente invención está relacionada con un procedimiento de separación y purificación de biomoléculas, principalmente proteínas de alta pureza, en el que se utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El pulsador de membrana elástica es un dispositivo que permite introducir una masa líquida en forma pulsante en un reactor químico, enzimático o fermentador, y se describe en la patente ES 2059228. El pulsador de membrana elástica está formado por un tubo flexible, una electroválvula y un temporizador, mediante el cual se controla el tiempo de cierre y de apertura de la válvula. Cuando se cierra la electroválvula el líquido queda retenido en la membrana flexible, aumentando la presión en la conducción. Cuando se abre la electroválvula el líquido almacenado en la membrana flexible se introduce rápidamente en el interior del equipo, logrando crear la pulsación.

20

El pulsador de membrana elástica puede trabajar a altas frecuencias para obtener una pulsación sin retromezcla o a bajas frecuencias para conseguir el efecto contrario de producir retromezcla. El pulsador de membrana elástica tiene como función aumentar la velocidad del proceso de transformación en un equipo de fermentación, en un reactor enzimático o un reactor químico. La frecuencia elegida para aumentar la velocidad de transformación dependerá del proceso al que sea acoplado. El pulsador de membrana elástica se ha utilizado en fermentadores de lecho fijo, fermentadores anaerobios, biorreactores y extractores.

30

En la presente invención se utiliza el pulsador de membrana elástica en una cromatografía de adsorción en lecho expandido.

5 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
10 adsorción de la biomolécula de interés en lecho expandido a partir de un extracto biológico filtrado o centrifugado y una segunda etapa de elución de la biomolécula de interés en lecho sedimentado, en la que el tampón eluyente circula desde el tope a la base de la columna, saliendo la biomolécula de interés purificada y concentrada por la base. A partir de un cultivo o extracto biológico
15 clarificado, se produce la adsorción de la biomolécula de interés en el lecho expandido mientras que los restos de bioproductos salen de la columna. El alimento circula desde la base de la columna al tope pasando a través de un plato poroso o distribuidor. Esta tecnología está siendo ampliamente utilizada en la actualidad para recuperar biomoléculas directamente de cultivos de bacterias, de
20 levaduras, de células animales, de extracto de microalgas, leche y cualquier otro tipo de extracto.

Las resinas Streamline comercializadas por la empresa GE Healthcare y las resinas Upfront Chromatography comercializadas por la empresa del mismo nombre son
25 los adsorbentes cromatográficos más utilizados para obtener lechos expandidos estables.

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
30 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 pequeño y de mayor densidad que las resinas Streamline.

5

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 describe en la solicitud de patente U.S 2006/0060533. Las columnas Upfront
10 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 que se utilicen más las resinas Streamline en el proceso de adsorción en lecho
15 expandido.

La patente US 5,759,395 describe las columnas de plato poroso comercializadas por GE Healthcare para ser utilizadas por las resinas Streamline. Las resinas Streamline tienen como ventaja que se adaptan perfectamente a columnas de
20 plato poroso o cromatográficas que son más económicas y comercializadas por distintas empresas.

En la Figura 1, se muestra un diagrama de flujo de un proceso convencional de adsorción de biomoléculas en lecho expandido. Está formado por un adsorbente
25 (resina Streamline) expandido en una columna cromatográfica y estabilizado inicialmente por una disolución tampón que fluye desde la base al tope de la columna con ayuda de dos bombas peristálticas colocadas en los extremos de la columna. Una vez estabilizado el lecho se cambia la disolución tampón por el extracto biológico centrifugado o filtrado para producirse la adsorción de la
30 biomolécula de interés.

La desventaja del proceso convencional de cromatografía de adsorción en lecho expandido es la formación de canales preferentes por donde fluye el extracto biológico, desaprovechándose una parte del área de contacto que podría ofrecer el adsorbente. Estos canales preferentes son más persistentes con el aumento de la viscosidad del extracto biológico. Para las resinas Streamline comercializadas por la empresa comercial GE Healthcare, la alternativa que se puede utilizar es diluir el extracto biológico para disminuir su viscosidad y de esta forma disminuir los canales preferentes (Bermejo, R. et al. 2003. Preparative purification of B-Phycocyanin from the microalga *Phorphyridium cruentum* expanded bed adsorption chromatography. Journal of Chromatography B. 490: 317-325). La desventaja que presenta la dilución del extracto biológico es la disminución de la productividad (mg de biomolécula/ciclo) para un mismo volumen de alimento. Otra desventaja de las resinas Streamline es su fragilidad, no pueden ser utilizadas en las columnas diseñadas por Upfront Chromatography, se romperían con el giro de las aspas.

El problema del estado de la técnica es proveer un procedimiento cromatográfico alternativo de cromatografía en lecho expandido. La presente invención soluciona el problema técnico planteado mediante el procedimiento descrito en las reivindicaciones. El procedimiento de la invención mejora el contacto entre el extracto biológico y la resina adsorbente en lecho expandido respecto a los procedimientos cromatográficos en corriente continua, donde se forman canales preferentes por donde fluye el extracto biológico. Asimismo, el procedimiento de la invención es más económico que la cromatografía en lecho expandido con resinas y columnas Upfront.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es un procedimiento de purificación de biomoléculas caracterizado por que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido, que comprende:

- 5 a) introducir de forma discontinua un extracto biológico en dicho lecho expandido que comprende una resina adsorbente,
 - b) lavar las moléculas no adsorbidas en dicha resina adsorbente y
 - c) eluir las biomoléculas adsorbidas en dicha resina adsorbente.
- 10 En el procedimiento de la invención, en la etapa a) se introduce de forma discontinua un extracto biológico en un lecho expandido que comprende una resina adsorbente, produciéndose la adsorción de la biomolécula de interés. En la etapa b) se lava el resto de las biomoléculas no adsorbidas en dicha resina adsorbente en lecho expandido y en la etapa c) se eluye la biomolécula de interés
- 15 adsorbida en dicha resina adsorbente en lecho sedimentado.

Una ventaja de la invención es la mejora del contacto entre el extracto biológico y la resina adsorbente en lecho expandido respecto a un procedimiento en corriente continua.

- 20 Una cromatografía convencional de adsorción en lecho expandido se puede realizar utilizando una columna de plato poroso, resina Streamline, disolución tampón, extracto biológico centrifugado o filtrado y varias bombas peristálticas (Figura 1). La disolución tampón es impulsada a través del plato poroso mediante
- 25 una bomba peristáltica. La velocidad de la disolución tampón y la altura inicial de la resina determinará la altura final del lecho expandido, a mayor velocidad y mayor altura inicial, mayor será la altura final del lecho expandido. La salida de la disolución tampón se realiza varios centímetros por encima del lecho expandido, a través de una bomba peristáltica. Ambas bombas trabajan al mismo caudal. Una
- 30 vez que se alcanza un lecho expandido estable se cambia la disolución tampón

por el extracto biológico previamente centrifugado. Al pasar el extracto biológico a través del lecho expandido se forman canales preferentes, dichos canales se ven favorecidos por la viscosidad del extracto biológico, dificultando la adsorción de la biomolécula de interés.

5

En la Figura 2 se muestra un diagrama de un modo de realización del procedimiento de la invención, en el que se ha acoplado un pulsador de membrana elástica (7) entre la columna y la bomba peristáltica de entrada. El pulsador de membrana elástica impulsa al extracto biológico de forma discontinua mediante pulsos. Se generan perturbaciones en forma de onda cuadrada sin retromezcla en la base de la columna que favorecen el contacto entre el extracto y el adsorbente manteniéndose estable el lecho expandido. El pulsador de membrana elástica opera con frecuencias de pulsación altas para evitar la retromezcla en el proceso de adsorción. La invención elimina o disminuye la formación de canales preferentes en la base de la columna. Elimina zonas muertas entre el extracto biológico y el adsorbente, favoreciendo el contacto entre ambos y el proceso de adsorción. Otra ventaja es la utilización de extractos biológicos sin diluir, pudiéndose trabajar con viscosidades superiores a la del agua. Las ventajas de la invención tienen como resultado un aumento de la eficacia del sistema, aumentando la capacidad dinámica de adsorción (mg biomolécula/mL de resina) y la productividad de la biomolécula de interés (mg de biomolécula/ciclo).

Una realización particular es el procedimiento de la invención, donde en la etapa a) dicho extracto biológico se introduce con un pulsador de membrana elástica a una frecuencia de pulsación entre 0,1 y 4 s⁻¹. De forma preferible, dicha frecuencia de pulsación es entre 0,1 y 0,5 s⁻¹.

Una realización particular es el procedimiento de la invención, donde la viscosidad de dicho extracto biológico es entre 1,5 y 2,5 mPa·s.

30

En la presente invención, se entiende por “resinas adsorbentes” a las resinas utilizadas en el estado de la técnica en la realización de procedimientos cromatográficos de adsorción en lecho expandido, entre las que se encuentran las resinas que contienen agarosa, un núcleo inerte de cuarzo cristalino y un
5 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.

10

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 es
15 DEAE, dicho adsorbente de afinidad se selecciona del grupo compuesto por un agente quelante, heparina y rproteína A y dicho adsorbente hidrofóbico comprende grupos fenilo.

20

Una realización particular es el procedimiento de la invención, donde dicho extracto biológico es un extracto de proteínas de la microalga *Phorphyridium cruentum*.

25

Una realización preferible es el procedimiento de la invención, donde la biomolécula eluida en la etapa c) es la proteína B-ficoeritrina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Se muestra un diagrama de flujo de un proceso convencional de adsorción de biomoléculas en lecho expandido. Está formado por un adsorbente
30 expandido en una columna de plato poroso y estabilizado inicialmente por una

disolución tampón que fluye desde la base al tope de la columna con ayuda de dos bombas peristálticas (3) y (5) colocadas en los extremos de la columna. Una vez estabilizado el lecho se cambia la disolución tampón de equilibrio (1) por el extracto biológico (2) centrifugado o filtrado para producirse la adsorción de la biomolécula de interés. A continuación se describen los elementos mostrados en la figura: disolución tampón de equilibrio (1), extracto biológico (2), bomba de entrada (3), columna de lecho expandido (4), bomba de salida (5) y espectrofotómetro UV-V (6).

10 Figura 2. Se muestra un diagrama de flujo de un proceso de adsorción de biomoléculas en lecho expandido como el de la presente invención, en el que se ha acoplado un pulsador de membrana elástica (7) entre la bomba de entrada y la columna. Los elementos mostrados en esta figura se han descrito más arriba en la figura 1; en la figura 2 hay un elemento adicional: pulsador de membrana elástica
15 (7).

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Purificación mediante cromatografía de lecho expandido de B-ficoeritrina (BPE) a partir de un extracto de proteínas de *Phorphyridium cruentum*.

El extracto proteico se preparó a partir de una pasta húmeda congelada (80-95% de agua en peso) de la microalga *Phorphyridium cruentum*. Se mezcló la pasta húmeda con tampón 250 mM NaAc (acetato de sodio) y ajustado a pH 5,5 con HAc (ácido acético). La primera extracción se realizó a temperatura ambiente en un vaso de precipitado durante aproximadamente dos horas a 200 rpm con un agitador de varilla de acero inoxidable, la relación tampón/biomasa libre de agua era 15/1 (mL/g). A continuación el extracto se centrifugó a 3500 g a 8 °C durante 15 minutos. Se volvió a realizar una segunda extracción con el precipitado en las mismas condiciones que la primera con una relación tampón/biomasa libre de
25
30

agua, 10/1 (mL/g). Posteriormente se unieron ambos sobrenadantes. A continuación se añadió agua destilada al sobrenadante para obtener un extracto proteico (50 mM NaAc, pH 5,5 con HAc). Se midió la viscosidad del extracto proteico final con un viscosímetro de Ostwald, siendo su valor 2,1 mPa·s.

5

A partir de este extracto se realizó la adsorción de la proteína de interés, en este caso B-ficoeritrina (BPE) mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. En una columna de 2 cm de diámetro se introdujo el adsorbente (la resina Streamline DEAE) hasta alcanzar una altura de 20 cm en lecho sedimentado que equivale a 63-64 mL de resina. A una velocidad de 200 cm/h (10,5 mL/min) se introdujo la disolución tampón de equilibrio (50 mM NaAc, pH 5,5 con HAc) hasta obtener un lecho expandido estable de 37 cm de altura. La salida de la columna se situó a unos 4 cm del tope del lecho expandido a través de otra bomba peristáltica que operaba a la misma velocidad. Una vez que se alcanzó la estabilidad del lecho expandido se procedió al cambio de disoluciones y se cambió la disolución de equilibrio por el extracto proteico. Se introdujeron 472,5 mL de extracto proteico en disolución tampón 50 mM NaAc, pH 5,5 (la viscosidad del extracto era 2,1 mPa·s). Una vez introducido el extracto proteico se realizó de nuevo el cambio a la disolución de lavado con el propósito de lavar o eliminar las proteínas no adsorbidas en el lecho expandido.

10

15

20

Durante el proceso de adsorción se adsorbió la proteína de interés BPE y otras ficocianinas presentes en el extracto en pequeñas cantidades, R-ficocianina (RPC) y aloficocianina (APC). Se eluyeron el resto de proteínas y compuestos del extracto proteico y se llevaron a un colector de tubos donde se recogieron las muestras en tubos de 31,5 mL de capacidad cada uno, a los que se les midió la concentración de BPE mediante espectrofotometría. Se recogieron 15 tubos en el proceso de adsorción y 10 tubos en el proceso de lavado, en total 25 tubos.

25

En un primer experimento se introdujo el alimento de forma continua siguiendo el modelo de la Figura 1. En un segundo experimento se introdujo de nuevo 472,5 mL del mismo extracto proteico, siguiendo el modelo de la Figura 2. La frecuencia de la pulsación empleada fue $0,2 \text{ s}^{-1}$, trabajando la electroválvula, 1 segundo abierta y 4 segundos cerrada. La frecuencia de la pulsación debe ser lo suficientemente baja para crear mezcla o turbulencia en la base de la columna pero sin desestabilizar el lecho expandido. Se ha experimentado con distintas frecuencias de pulsación que cumplen estas características, entre ellas la empleada en el experimento. La frecuencia de la pulsación (f) se define como la inversa de la suma del tiempo que está cerrada la electroválvula (t_c) y el tiempo que está abierta la electroválvula (t_a) tal y como se muestra en la ecuación [1].

$$f(\text{s}^{-1}) = \frac{1}{t_c + t_a} \quad [1]$$

Mediante espectrofotometría se midió la concentración de BPE del alimento siendo su valor de $0,16 \text{ mg/mL}$ y de $0,14 \text{ mg/mL}$ en el experimento sin pulsación y con pulsación, respectivamente. En la tabla 1 se muestra para cada experimento los valores de C_i/C_o , A , P y q .

Tabla 1

20

Adsorción	f (s^{-1})	C_o (mg/mL)	V_o (mL)	V_{resina} (mL)	C_i/C_o	A (mg/ciclo)	P (mg/ciclo)	q (mg/mL)
Sin pulsación	-	0,16	472,5	63	0,40	77,7	52,2	0,83
Sin pulsación	-	0,16	94,5	63	0,10	15,5	15,2	0,24
Pulsación	0,2	0,14	472,5	64	0,07	67,6	63,6	0,99

C_i/C_o , es la relación entre la concentración de BPE a la salida de la columna en la etapa de adsorción (C_i), medida de forma discreta en tubos individuales de 31,5 mL de capacidad y la concentración de BPE del alimento o extracto proteico (C_o), que es bombeado al interior de la columna.

5

La adsorción máxima de BPE por ciclo, A (mg BPE/ciclo), se calculó multiplicando la concentración del alimento (C_o) por el volumen de alimento introducido en la columna (V_o), ecuación [2].

$$A \text{ (mg BPE/ciclo)} = C_o \times V_o \quad [2]$$

10

La productividad, P (mg BPE/ciclo), se define como la cantidad de BPE adsorbida en la resina por ciclo. Se calculó, restando la cantidad de proteína BPE no retenida en las etapas de adsorción y lavado en lecho expandido a la cantidad de la adsorción máxima de BPE, tal y como se muestra en la ecuación [3]. Los subíndices i y j 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 BPE a la salida de la columna y V_i y V_j son los volúmenes de muestra recogidos en cada tubo.

20

$$P \text{ (mg BPE/ciclo)} = C_o \times V_o - \sum_{i=1}^{i=N_a} C_i \times V_i - \sum_{j=1}^{j=N_l} C_j \times V_j \quad [3]$$

La capacidad dinámica de adsorción, q , se define como la cantidad de BPE adsorbida por mL de resina para un valor dado de C_i/C_o (mg de BPE adsorbidos/mL de resina). Se calculó mediante la ecuación [4], siendo V_{resina} el volumen de resina introducido en la columna.

25

$$q \text{ (mg BPE/mL)} = \frac{C_0 \times V_0 - \sum_{i=1}^{i=N_a} C_i \times V_i - \sum_{j=1}^{j=N_l} C_j \times V_j}{V_{\text{resina}}} \quad [4]$$

La pulsación demuestra que para un mismo volumen de alimento bombeado a la columna la concentración de proteína eluida es menor, es menor la relación C/C_0 y por lo tanto es mayor la cantidad de proteína adsorbida en la resina en el proceso de adsorción con pulsación. Se eluyó el 7% de la proteína de interés en el proceso de adsorción con pulsación y un 40% en el proceso de adsorción sin pulsación. Si comparamos la productividad y la adsorción máxima para cada experimento, se observa que en la adsorción hecha con pulsación sólo un 6% de la proteína no ha quedado retenida en la resina con respecto al 33% en el proceso sin pulsación. En la experiencia sin pulsación sería necesario reducir el volumen de alimento bombeado en cinco veces (94,5 mL) para que las pérdidas de la proteína de interés fuesen insignificantes, reduciéndose también en cinco veces la cantidad de proteína adsorbida.

La pulsación aumenta la productividad y la capacidad dinámica de adsorción de la proteína BPE. La pulsación permite introducir extractos con una viscosidad superior a la del agua.

Se realizó por último la etapa de elución en lecho sedimentado, siendo la altura del lecho sedimentado de 20 cm. A una velocidad de 100 cm/h (5,2 mL/min) se introdujo la disolución tampón de elución (250 mM NaAc, pH 5,5 con HAc) de forma continua (sin pulsación) por el tope de la columna a unos 2 cm del lecho sedimentado a través de una bomba peristáltica. 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 (RPC). La BPE purificada salió por la base de la columna a través del plato poroso, con ayuda de otra bomba peristáltica que operó a la misma velocidad. La BPE purificada se llevó

a un colector de tubos donde se recogió en tubos de 15,5 mL de capacidad cada uno, a los que se les midió la concentración y la pureza de BPE 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
5 arrastrar los restos de proteínas que hubiesen quedado sin eluir. Se recogieron aproximadamente 25 tubos en el proceso de elución y 10 tubos en el proceso de lavado.

En la etapa de elución se obtuvo un pico cromatográfico de BPE, en el que se
10 recogió el 58,7% y el 77,8% de la cantidad de BPE inicial, para la experiencia sin pulsación y con pulsación, respectivamente.

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. Para una relación $A_{545}/A_{280} > 4$, se obtuvieron 11,7 y 26,8 mg de
15 BPE en el experimento sin pulsación y con pulsación, respectivamente. Representando el 15,1% y el 38,7% de la cantidad de BPE de partida.

Cuando se realiza la etapa de adsorción con pulsación la cantidad de BPE
20 adsorbida es mayor, por lo tanto es mayor la cantidad de BPE obtenida en el pico cromatográfico, siendo también mayor la fracción de BPE de elevada pureza obtenida dentro de dicho pico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de biomoléculas caracterizado por que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido, que comprende:
 - a) introducir de forma discontinua un extracto biológico en dicho lecho
 - 5 expandido que comprende una resina adsorbente,
 - b) lavar las moléculas no adsorbidas en dicha resina adsorbente y
 - c) eluir las biomoléculas adsorbidas en dicha resina adsorbente.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa
 - a) dicho extracto biológico se introduce con un pulsador de membrana elástica
 - 10 a una frecuencia de pulsación entre 0,1 y 4 s⁻¹.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicha frecuencia de pulsación es entre 0,1 y 0,5 s⁻¹.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la viscosidad de dicho extracto biológico es entre 1,5 y 2,5 mPa·s.
- 15 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que 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.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho
 - 20 intercambiador iónico es DEAE.
7. El procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho adsorbente de afinidad se selecciona del grupo compuesto por un agente quelante, heparina y rproteína A.
8. El procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho
 - 25 adsorbente hidrofóbico comprende grupos fenilo.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicho extracto biológico es un extracto de proteínas de la microalga *Phorphyridium cruentum*.
- 10.El procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que la
 - 30 biomolécula eluida en la etapa c) es la proteína B-ficoeritrina.

Figura 1

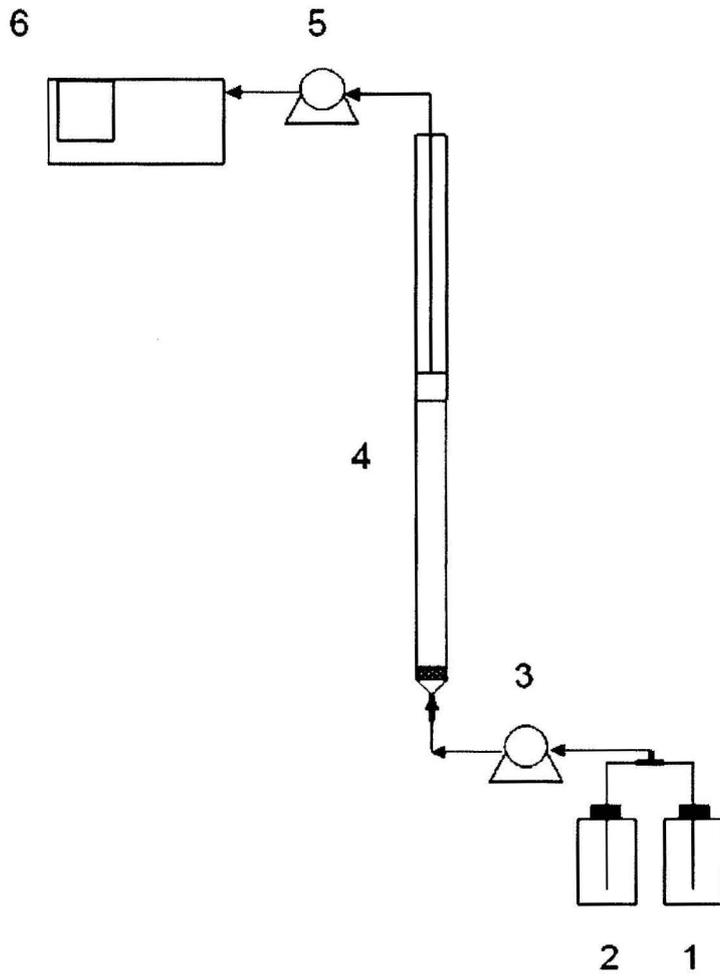
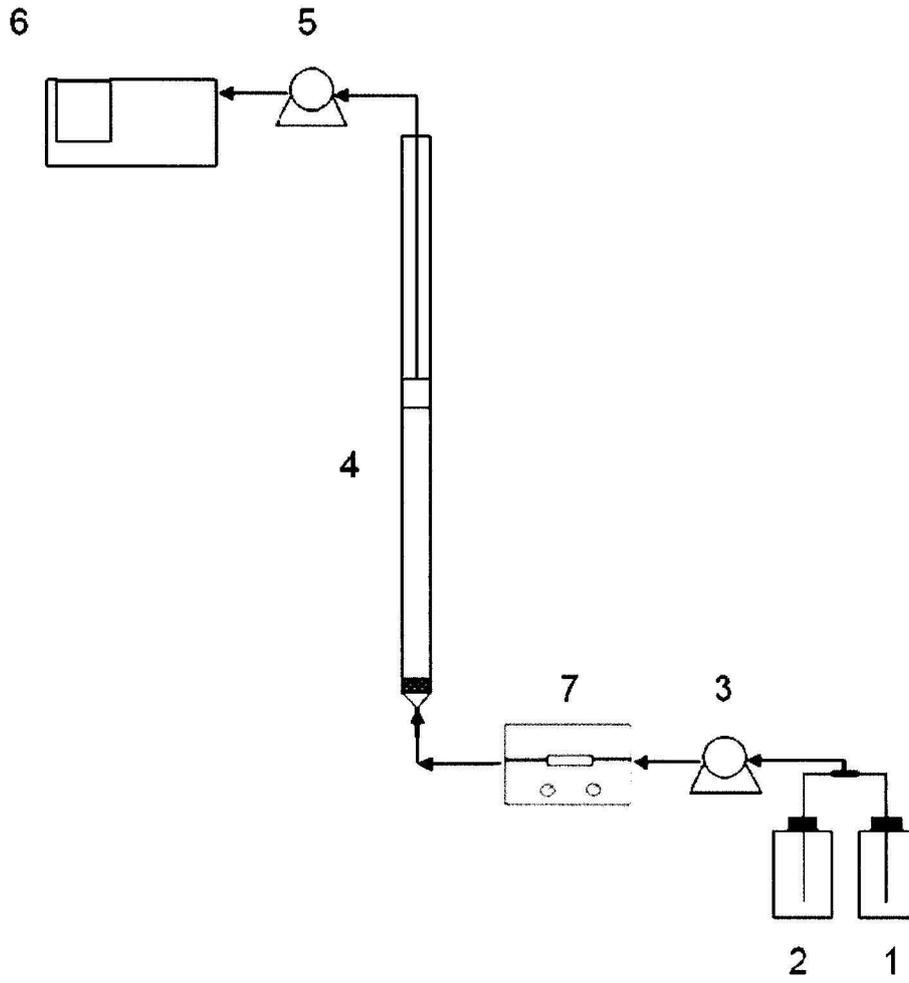


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201200502

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.05.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	IBAÑEZ GONZALEZ M J. Fluidodynamic and protein adsorption studies in an expanded bed pulsing column. NEW BIOTECHNOLOGY, vol 25S, septiembre 2009, páginas S176-S177.	1-10
A	R. BERMEJO et al. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: scale-up of the process. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 40, 2007, páginas 927-933. Resumen y páginas 928-932.	1-10
A	RUPERTO BERMEJO et al. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga <i>Porphyridium cruentum</i> by expanded-bed adsorption chromatography. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, vol. 790, 2003, páginas 317-325. Resumen, páginas 318-320.	1-10
A	ES 2059228 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 01.11.1994, resumen; reivindicaciones 1-4.	1-10

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 nº:

Fecha de realización del informe
11.06.2012

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N30/04 (2006.01)

G01N30/16 (2006.01)

G01N30/24 (2006.01)

B01D15/08 (2006.01)

B01D15/18 (2006.01)

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

G01N, B01D

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, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO

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	IBAÑEZ GONZALEZ M J. Fluidodinamic and protein adsorption studies in an expanded bed pulsing column. NEW BIOTECHNOLOGY, vol 25S, septiembre 2009, páginas S176-S177.	
D02	R. BERMEJO et al. Recovery of B-phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography: scale-up of the process. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 40, 2007, páginas 927-933. Resumen y páginas 928-932.	
D03	RUPERTO BERMEJO et al. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga <i>Porphyridium cruentum</i> by expanded-bed adsorption chromatography. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, vol. 790, 2003, páginas 317-325. Resumen, páginas 318-320.	
D04	ES 2059228 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA)	01.11.1994

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 de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido, que comprende: introducir de forma discontinua con un pulsador de membrana elástica, un extracto biológico en dicho lecho expandido formado por una resina adsorbente, lavar las moléculas no adsorbidas en dicha resina adsorbente y eluir las biomoléculas adsorbidas en dicha resina adsorbente (reivindicación 1). El extracto biológico se introduce con un pulsador de membrana elástica a una frecuencia de pulsación de entre 0,1 y 4 s⁻¹ (reivindicaciones 2 y 3). La viscosidad de dicho extracto biológico está comprendida entre 1,5 y 2,5 mPa.s (reivindicación 4). 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 (reivindicación 5). El intercambiador iónico es DEAE (dietilaminoetil) (reivindicación 6). El adsorbente de afinidad puede ser un agente quelante, heparina o rproteína A (reivindicación 7). El adsorbente hidrofóbico comprende grupos fenilo (reivindicación 8). El extracto biológico es un extracto de proteína de la microalga *Porphyridium cruentum* (reivindicación 9). Y por último, la biomolécula eluida en dicho procedimiento es B-ficoeritrina (reivindicación 10).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a estudios fluidodinámicos y de adsorción de proteínas en cromatografía de adsorción en lecho expandido, concretamente, para B-ficoeritrina. En dicha cromatografía de adsorción en lecho expandido se utiliza un pulsador de membrana elástica para introducir el extracto biológico, en este caso B-ficoeritrina, evitando, de este modo, la aparición de retromezcla (véase páginas S176-S177).

El documento D02 se refiere al estudio de los parámetros cromatográficos llevado a cabo para la purificación de B-ficoeritrina (B-PE) obtenida de un extracto de proteínas de la microalga *Porphyridium cruentum*, utilizando cromatografía de adsorción en lecho expandido que tiene como resina adsorbente Streamline-DEAE. Los parámetros cromatográficos estudiados fueron la cantidad de la muestra, la viscosidad y el grado de expansión. Las condiciones óptimas fueron la cantidad de la muestra de 0,88 mg B-PE/ml, resina adsorbente Streamline-DEAE (dietilaminoetil), un volumen de lecho expandido dos veces mayor que el establecido y una viscosidad de la muestra de 1.068mP (véase resumen y páginas 928-932).

El documento D03 describe un método para la purificación de biomoléculas de B-ficoeritrina, obtenidas de un extracto de proteínas de la microalga *Porphyridium cruentum*, mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido; en la que se utiliza una columna que tiene como resina adsorbente Streamline-DEAE (dietilaminoetil) equilibrada con una solución tampón de ácido acético-acetato sódico. Después se lavaron las moléculas no adsorbidas en la resina y por último se eluyeron las biomoléculas adsorbidas (véase resumen y páginas 318-320).

El documento D04 trata sobre un dispositivo de pulsación para ser acoplado a equipos de fermentación, reactores enzimáticos o reactores químicos. Dicho dispositivo permite la introducción de una masa líquida en forma pulsante en un sistema en donde se produzca una transformación debida a una acción microbiana, enzimática o química. Esta pulsación genera una perturbación en forma de onda cuadrada en la fase líquida del equipo sin originar retromezcla (véase resumen y reivindicaciones 1-4).

Por lo tanto, a partir de los documentos citados anteriormente, la presente solicitud de patente, carece de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP, ya que se ha encontrado un procedimiento de purificación de biomoléculas que utiliza cromatografía de adsorción en lecho expandido, en el que se introduce de forma discontinua un extracto biológico, en este caso, B-ficoeritrina, mediante el uso de un pulsador de membrana elástica (véase documento D01, páginas S176-S177). Además, las etapas de lavado de las moléculas no adsorbidas en la resina adsorbente y la dilución de las moléculas adsorbidas en dicha resina son ampliamente conocidas en el estado de la técnica (véase documento D03 resumen y páginas 318-320). Las resinas adsorbentes utilizadas en la presente solicitud de patente son las mismas que aparecen en el estado de la técnica, esto es, streamline DEAE (véase documento D02, resumen y documento D03 resumen). Y por último, el procedimiento de purificación se utilizó para un extracto biológico de proteínas de la microalga *Porphyridium cruentum*, concretamente, la proteína B-ficoeritrina. Por todo ello, el objeto de las reivindicaciones 1-10 carece de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.