



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 621**

51 Int. Cl.:
G01N 30/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06721934 .5**

96 Fecha de presentación : **27.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1877769**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de purificación cromatográfica.**

30 Prioridad: **29.04.2005 EP 05405327**
01.07.2005 EP 05405421

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE ZÜRICH**
Ramistrasse 101
8092 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Aumann, Lars y**
Morbidelli, Massimo

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 621 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

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al campo de los procedimientos de purificación en múltiples columnas y con sus optimizaciones.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cromatografía por lotes es bien conocida y se aplica de forma rutinaria y preparatoria en las producciones industriales. Sin embargo, la técnica es bastante costosa, en particular para la separación y la purificación a gran escala, debido al elevado consumo de disolvente y al caro material de la columna, y requiere un uso óptimo del equipo cromatográfico para que resulte rentable.

10 Para las separaciones a gran escala en producciones reales, los procedimientos continuos son mucho más económicos que los procedimientos por lotes. Las ventajas de un procedimiento continuo son, por ejemplo, un rendimiento elevado, menor consumo de disolvente (recuperación), fraccionamiento y análisis menos costosos, mayor flexibilidad para las cantidades que han de ser purificadas, etc.

15 Una manera de llevar a cabo un procedimiento cromatográfico continuo es el denominado procedimiento de lecho móvil simulado (SMB; para una reseña, véase, por ejemplo, Markus Juza, Marco Mazzotti y Massimo Morbidelli, *Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology*, Trends in biotechnology, Elsevier B.V., TIBTECH, marzo de 2000, Vol. 18, pp. 108-118). Este procedimiento puede separar una mezcla en dos fracciones ajustando dos corrientes de entrada (suministro, eluyente) y dos corrientes de salida (refinado, extracto). El procedimiento de SMB es a contracorriente, de modo que es posible una separación bien definida de las dos fracciones con
20 rendimientos elevados. Ejemplos típicos de la técnica de SMB en la industria son las separaciones quirales, en las que se separan dos enantiómeros de una mezcla racémica. Si las selectividades son muy pequeñas, normalmente un procedimiento en lotes da como resultado rendimientos mucho menores, mientras que, sin embargo, el SMB permite tener una pureza elevada y rendimientos elevados.

25 Se han propuesto diversas modificaciones del procedimiento de SMB para optimizarlo y adaptarlo a problemas específicos. Así, por ejemplo, se ha propuesto variar los instantes de conexión y desconexión individuales de las corrientes de entrada y las corrientes de salida; es decir, las corrientes de entrada y las corrientes de salida no se conmutan de forma concomitante como en el SMB clásico, sino según un plan específico y en etapas (lo que se denomina técnica Varicol; véase, por ejemplo, el documento WO-A-30 2004/039468).

Otra variación ha sido propuesta por Morbidelli et al (véase, por ejemplo, "PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval" de Ziyang Zhang, Marco Mazzotti, Massimo Morbidelli, *Journal of Chromatography A*, 1006 (2003) 87-99, Elsevier B.V.), en la que, para compensar la variación temporal en la concentración de la producción del extracto y el refinado
35 debido a la conmutación diferenciada después de cada tiempo de ciclo, se varía el caudal del eluyente de manera compensatoria coordinada con el intervalo de conmutación, permitiendo que haya una pureza aún mayor (lo que se denomina técnica de suministro potenciado).

Se ha propuesto una tercera variación, casi análoga, en la que se varía no el caudal del eluyente, sino la concentración del suministro de una manera compensatoria para lograr el mismo objetivo (lo que se
40 denomina técnica Modicon; véase, por ejemplo, el documento WO 2004/014511).

Como ya se ha mencionado, en particular, la cromatografía a gran escala es una técnica laboriosa y cara. Es útil únicamente para la separación a gran escala de moléculas valiosas. Las moléculas más valiosas del mercado son las biomoléculas, como, por ejemplo, los péptidos, las proteínas y los anticuerpos. Normalmente, estas moléculas son purificadas por medio de la cromatografía en lotes con
45 gradiente de disolvente. A diferencia del término "separación", que en el contexto de estas aplicaciones significará la separación de una mezcla en dos fracciones, "purificación" significa que el producto deseado es un intermedio entre impurezas de adsorción ligeras y pesadas, y que se generan tres fracciones. Un ciclo de SMB solo puede separar la corriente de suministro en dos fracciones (separación), pero para las purificaciones se requieren tres fracciones, estando el componente deseado en la fracción intermedia. Se requeriría un SMB de dos etapas o secuencial para purificar una mezcla de múltiples componentes como una biomolécula intermedia deseada e impurezas pesadas y ligeras con el problema, sin embargo, de que
50 si, por ejemplo, en una primera etapa del SMB se generan un primer refinado y un primer extracto y en la segunda etapa del SMB el primer extracto es separado en un segundo refinado (producto deseado) y un segundo extracto, todos los constituyentes no deseados que deberían haber sido separados en la primera etapa (y que debería haber acabado en el primer refinado) acabarán, ciertamente, en el segundo refinado, lo que, en particular para concentraciones bajas de la fracción deseada, hace inútil tales procedimientos.

Aparte de lo anterior, también se aplicaron otras variaciones modificadoras del modelo de SMB, como, por ejemplo, durante algunos años los procedimientos de SMB vienen operándose también en lo que se

denomina "modo de gradiente de disolvente" (véase, por ejemplo, el documento US 4.031.155). El significado de este "gradiente de disolvente" es que el SMB contiene secciones, que operan con diferentes niveles de modificador. Este tipo de gradiente es un "gradiente escalonado". Sin embargo, para la purificación de biomoléculas, se desearía un gradiente lineal homogéneo, tal como se aplica de manera rutinaria en las purificaciones por lotes con un gradiente (lineal) de disolvente.

El documento EP-A-0495640 da a conocer un procedimiento y un aparato para separar de manera continua una mezcla de múltiples componentes que contiene al menos 3 componentes y purificar cada componente con una concentración elevada, una pureza elevada y una recuperación elevada, en el que el aparato comprende un grupo de columnas que comprende una zona de fraccionamiento, una zona de purificación y una zona de desorción que se forman combinando al menos 2 columnas para formar un subgrupo y combinando al menos 3 zonas; tuberías de conexión de subgrupos para conectar en serie las columnas en la zona de fraccionamiento; tuberías de conexión de subgrupos para conectar columnas correspondiente de dos subgrupos situadas en la zona de separación (en serie) y la zona de purificación (en paralelo); tuberías de conexión de zonas para conectar en paralelo cada columna de la zona de fraccionamiento y cada columna de la zona de purificación; tuberías de purificación/desorción de suministro del medio para suministrar cada medio de purificación/desorción a cada columna de las zonas de purificación y desorción; un medio de suministra de la mezcla objeto para suministra una mezcla de múltiples componentes a la columna de la corriente más superior de la zona de fraccionamiento; y un medio de desplazamiento de grupos de columnas para desplazar sucesivamente las columnas de la subzona presente a la subzona siguiente y/o un medio de conmutación para conmutar el flujo de las tuberías entre columnas mediante la apertura o el cierre de válvulas. Las columnas en este procedimiento siempre se conmutan como grupos completos. Además, dentro de la zona denominada desorción, la totalidad de los productos A, B, C se saca del sistema por lavado.

RESUMEN DE LA INVENCION

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado de purificación que permite separar tres fracciones. El procedimiento será simple de configurar, en particular teniendo en cuenta aplicaciones a gran escala, y permitirá una pureza elevada y un rendimiento elevado. Se propone un procedimiento para la purificación continua o casi continua de una mezcla de múltiples componentes por medio de columnas cromatográficas individuales a través de las cuales se suministra la mezcla por medio de al menos un disolvente. La meta del procedimiento no es simplemente la separación de dos fracciones, sino que la principal ventaja es que puede purificarse una verdadera mezcla de múltiples componentes que, al menos, comprende impurezas ligeras, un producto intermedio que ha de ser purificado e impurezas pesadas; es decir, puede aislarse un producto intermedio, y esto aunque este producto intermedio o deseado esté presente únicamente en cantidades pequeñas en comparación con las impurezas pesadas y ligeras.

La presente invención resuelve el problema anterior combinando la posibilidad de la cromatografía de gradiente en lotes con elementos de técnicas de lecho móvil simulado, o, más bien, principios de contracorriente, permitiendo, por ello, aprovecharse de las posibilidades de la cromatografía de gradiente en lotes, pero también de la purificación continua.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es un procedimiento según la reivindicación 1, así como un procedimiento para configurar tal procedimiento.

En tal procedimiento para la purificación continua o casi continua de una mezcla de múltiples componentes, se usan al menos dos, preferentemente al menos tres columnas cromatográficas individuales, a través de las cuales se suministra la mezcla por medio de al menos un disolvente. Tal como se ha mencionado más arriba, la mezcla de múltiples componentes comprende al menos impurezas ligeras, un producto intermedio que ha de ser purificado e impurezas pesadas, de modo que el sistema está concebido para aislar realmente una fracción intermedia.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que es posible hacer funcionar columnas en al menos una etapa o posición de un modo por lotes en el que la salida de una columna se usa para recoger el producto intermedio deseado, así como en al menos una etapa o posición de un modo continuo o casi continuo, en el que, en este modo, la salida de al menos una columna está conectada de forma fluida con la entrada de al menos otra columna. Tiene que hacerse notar que la etapa por lotes también puede incluir columnas que están conectadas de manera fluida, pero, no obstante, una salida se toma entonces para recoger el producto deseado.

Un elemento clave ahora es que, sorprendentemente, es posible que dicho modo por lotes y dicho modo continuo o casi continuo pueden realizarse o bien de manera sincrónica o secuencialmente, y, después de un tiempo de conmutación, o dentro del mismo, las columnas pueden ser desplazadas en sus posiciones en una dirección contraria a la dirección general del flujo del disolvente. Esta configuración es particularmente útil en el caso de una combinación con elución en gradiente, pero no depende necesariamente de una elución en gradiente.

Lo fundamental de la invención es, entre otras cosas, el hecho de que, por medio de una hábil combinación de etapas o funciones continuas y de etapas o funciones de lotes, que pueden llevarse a cabo secuencialmente (de forma escalonada) o sincrónica, es decir, de forma concomitante, y con un desplazamiento de las columnas a contracorriente (lecho móvil cuasisimulado), es posible una purificación sumamente eficiente de una fracción intermedia, debido al hecho de que en las etapas o posiciones por lotes puede efectuarse la elución de la fracción deseada o de las fracciones laterales de manera muy eficiente, y debido al hecho de que las etapas o posiciones continuas permiten el reciclado de las fracciones.

Como apreciará fácilmente la persona experta en la técnica, el concepto general no solo se aplica a las columnas cromatográficas, tal como se afirma en lo anterior y en lo que sigue, pero igualmente a los adsorbentes de membrana, que asumen la misma función que las columnas cromatográficas. De modo que, aunque las columnas cromatográficas se prefieren en este contexto, si, dentro de esta memoria, se usa la expresión columna cromatográfica, esto también incluirá los adsorbentes de membrana.

Además, aunque esto está claro para una persona experta en la técnica, debería hacerse notar que, en el contexto de las fracciones que han de separarse, se contempla que la designación "pesado" signifique un compuesto que se eluye con lentitud, es decir, tiene comparativamente una gran afinidad con la fase estacionaria, y que, por lo tanto, se eluye tardíamente en el procedimiento, mientras que se contempla que la designación "ligero" signifique un compuesto que se eluye con rapidez, es decir, tiene comparativamente una afinidad pequeña con la fase estacionaria y que, por lo tanto, se eluye temprano en el procedimiento.

El presente concepto puede aplicarse igualmente a los sistemas líquido-sólido clásicos, tanto a sistemas en los que la fase móvil denominada "disolvente" en el presente documento es líquida, así como a sistemas supercríticos, como a sistemas en los que el disolvente o el líquido están en un estado supercrítico (lo que se denomina cromatografía de fluidos supercríticos, SFC).

A diferencia, por ejemplo, de la cromatografía de fase inversa, en la que la intensidad del disolvente se ajusta con un modificador orgánico, las propiedades de adsorción de un sistema de SFC puede ser controlada de forma equivalente ajustando la densidad de la fase móvil. Los detalles técnicos en cuanto a cómo afecta la densidad el comportamiento de adsorción de los solutos en la SFC pueden deducirse, por ejemplo, de un artículo de Arvind Rajendran, Oliver Kräuchi, Marco Mazzotti, Massimo Morbidelli titulado "Effect of pressure drop on solute retention and column efficiency in supercritical fluid chromatography" (Journal of Chromatography A, 1092 (2005) 149-160).

En vez de gradientes en la concentración del disolvente (como se expondrá con mucho detalle en lo que sigue) durante un tiempo de conmutación, en la SFC se aplican gradientes de presión, de modo que se ajusta debidamente la densidad del disolvente supercrítico para lograr la separación deseada. Los gradientes de presión pueden ser ajustados mediante válvulas controladas por presión detrás de las columnas cromatográficas. En la SFC, el sistema puede ser operado en bucle cerrado, porque es posible reciclar el disolvente. Después de que el disolvente haya dejado el dispositivo en la sección delta (véase más abajo), puede ser reacondicionado fácilmente cambiando su presión y su densidad. Por ello, si, en lo que sigue, se hace mención de gradientes de concentración, esto, en el caso de un disolvente supercrítico, se entiende que incluye una variación correspondiente de densidad.

Una de las funciones clave de la invención es el hecho de que, básicamente, se propone una topología específica de columnas o de funciones cumplidas por las columnas (secciones) siguiendo estas líneas que, en algunas secciones, proporciona un uso óptimo de los principios de la contracorriente y evita los inconvenientes de un círculo plenamente cerrado con técnica de lecho móvil simulado, porque las secciones están interconectadas de una manera sorprendentemente simple pero sumamente eficiente que permite una purificación efectiva usando técnicas de gradiente y no únicamente la separación de dos, sino de tres fracciones. Por ello, puede usarse un procedimiento continuo junto con técnicas de gradiente, siendo estas en muchos procedimientos de purificación difícil la única forma de purificación disponible.

Esto se logra porque las columnas son agrupadas en al menos cuatro secciones, en las que la primera sección está dotada con al menos una entrada de un disolvente (s) y al menos una salida para un producto intermedio purificado, de tal modo que saca por lavado el producto intermedio purificado del sistema, pero mantiene las impurezas pesadas dentro de esta sección. Además de eso, una segunda sección está dotada de al menos una entrada para el disolvente (s) y al menos una salida conectada a una entrada de una cuarta sección, de tal modo que lava el producto intermedio, que está "contaminado" con impurezas pesadas, y lo introduce en la cuarta sección a través de dicha salida, pero mantiene las impurezas pesadas sustancialmente puras dentro de la sección; una tercera sección está dotada de al menos una entrada para el disolvente (s) y al menos una salida para impurezas pesadas, de tal modo que saca por lavado las impurezas pesadas a través de dicha salida y limpia la o las columnas cromatográficas; y una cuarta sección está dotada de al menos una entrada para recibir la producción de la salida de la segunda sección, así como al menos una entrada para suministrar la mezcla de múltiples componentes, y al menos una salida para las impurezas ligeras, de modo que saca por lavado las

impurezas ligeras del sistema, pero mantiene el producto intermedio dentro de la sección. En tal sistema, después de un tiempo de conmutación, o dentro del mismo, la última columna de la primera sección se desplaza a la primera posición de la segunda sección, la última columna de la segunda sección se desplaza a la primera posición de la tercera sección, la última columna de la tercera sección se desplaza a la primera posición de la cuarta sección y la última columna de la cuarta sección se desplaza para convertirse en la primera columna de la primera sección. Si la conmutación se lleva a cabo después del tiempo de conmutación, todas las columnas son conmutadas de forma concomitante en ese momento. Si la conmutación se lleva a cabo dentro del tiempo de conmutación, significa que también puede emplearse la técnica Varicol anteriormente mencionada. El casi "cortocircuito" entre las secciones segunda y cuarta permite "reciclar" la fracción intermedia y mantenerla en la región del sistema en la que es posible extraerla sin transferirla ni a la fracción pesada ni a la ligera. Las funciones de las secciones pueden cumplirse o bien de forma síncrona, es decir, de manera concomitante y ejecutándose lado a lado, o de forma secuencial, es decir, de una manera escalonada en sentido temporal. En este caso, hay, preferentemente, etapas secuenciales con una elución continua o casi continua y etapas con una elución en lotes dentro de un tiempo de conmutación.

En una realización preferente de la presente invención, tal procedimiento se combina explícitamente con técnicas de gradiente, es decir, se hace que el disolvente (s) suministrado a al menos una de las secciones varíe continuamente en composición durante el tiempo de conmutación.

Según otra realización preferente, hay presentes al menos dos, preferentemente al menos tres columnas individuales, y los agrupamientos de las secciones se realizan por columnas únicas. Esto quiere decir que estas funciones se llevan a cabo de manera secuencial y no simultáneamente. Preferentemente, las funciones de las secciones individuales se cumplen secuencialmente, preferentemente con etapas alternantes de elución continua o casi continua y con etapas con elución en lotes dentro de un tiempo de conmutación.

Preferentemente, el disolvente (s) suministrado a la totalidad o, al menos, a la mayoría de las secciones varía en composición de forma sustancialmente continua con una concentración creciente del modificador durante el tiempo de conmutación. Preferentemente, en el transcurso de la secuencia de las columnas de la cuarta a la primera sección, la concentración del modificador aumenta de una forma tal que, después de un desplazamiento de las columnas, la concentración del modificador en cada columna está sustancialmente en la concentración base del modificador en la nueva posición de la columna, y tal que, durante el siguiente tiempo de conmutación, la concentración del modificador dentro de cada columna aumenta hasta la concentración base de la siguiente posición después de un desplazamiento adicional de las columnas. Este modelo se aplica a los procedimientos cromatográficos como la cromatografía en fase inversa y la de intercambio iónico, en la que el mecanismo básico es que el modificador adsorbe y ocupa sitios de adsorción en la resina. Eso quiere decir, en este caso, que cuanto mayor sea la concentración de modificador, con menor intensidad pueden adsorberse las (bio)moléculas. Sin embargo, en otros sistemas, como, por ejemplo, la HIC (cromatografía de interacción hidrófoba), el mecanismo es que a una concentración elevada de sal, la solubilidad de la (bio)molécula en la fase líquida es pequeña. Por ello, en este caso, a la biomolécula no le gusta seguir ya en el líquido; se adsorbe en el sólido. Cuando disminuye la concentración de sal (modificador) en el líquido, la (bio)molécula puede volver a disolverse en el líquido y se desorbe de la superficie sólida. De manera correspondiente, en este caso, la concentración del modificador no aumenta, sino que disminuye, pero, aparte de eso, el sistema es operado en completa analogía a lo que se ha descrito en lo que antecede para el caso de procedimientos cromatográficos como la cromatografía de fase inversa y de intercambio iónico.

Si el sistema funciona así, el sólido experimenta verdaderamente un gradiente continuo según viaja por el sistema sustancialmente contra la trayectoria principal del disolvente. Como se conoce en la cromatografía en lotes, la composición de la fase móvil cambia para que, en particular, la concentración del modificador pueda variar linealmente; sin embargo, también puede variar casi linealmente, es decir, según un perfil específico deseado (incluso individual para cada columna posible) durante el tiempo de conmutación adaptado al problema de purificación. De manera análoga, en el caso de los disolventes supercríticos, la densidad puede variarse en consonancia.

Técnicamente, tal gradiente puede ser implementado con suma facilidad si, en cada entrada de disolvente, se proporciona un disolvente con una concentración base constante individual de modificador, y si se proporciona una corriente de disolvente con una composición y/o un caudal que varían periódicamente (es decir, por ejemplo, la concentración del modificador) a cada entrada y se mezcla con el disolvente con la concentración base constante individual del modificador para establecer el gradiente a lo largo del sistema. De forma análoga, en el caso de disolventes supercríticos, también puede variarse la densidad en consonancia.

Según una realización preferente del procedimiento, al menos una sección comprende al menos dos columnas. Sin embargo, tiene que señalarse que, en principio, en particular, las secciones primera, segunda y tercera también pueden combinarse en una columna, las fracciones de la cual se toman en una secuencia etapas separadas en el tiempo para lograr la misma meta o, al menos, una equivalente.

Básicamente, el problema de la purificación se separa en un producto principal que se cumple en la primera sección y que aborda la extracción del producto deseado. Las otras secciones son, principalmente, abordar la separación más eficiente de la interfase entre el producto deseado y las impurezas ligera y pesada, respectivamente. Por lo tanto, se demuestra que resulta ventajoso que, al menos, algunas de las secciones, preferentemente la sección segunda, comprendan al menos dos columnas conectadas de forma secuencial a contracorriente.

La cuarta sección es, en realidad, una de las claves para poder purificar la mezcla ternaria. Por lo tanto, puede estar estructurada de una manera más estructurada, y puede comprender, por ejemplo, al menos tres columnas agrupadas en tres subsecciones, o menos columnas que proporcionan secuencialmente la función de estas subsecciones. Una primera subsección comprende al menos una entrada para suministrar la mezcla de múltiples componentes, preferentemente con un caudal menor que el caudal global del sistema, y al menos una salida o bien para la eliminación directa de impurezas ligeras del sistema o para su introducción en una entrada de la tercera subsección. Una segunda subsección comprende al menos una entrada para tomar la producción de la segunda sección y al menos una salida conectada a al menos una entrada de la tercera subsección. Una tercera subsección comprende al menos una entrada para tomar la producción de la segunda subsección y posiblemente al menos una entrada para tomar la producción de la primera subsección y al menos una salida. También aquí, como en el sistema principal, después de un tiempo de conmutación (o dentro del mismo para procedimientos de conmutación asíncronos), se desplazan las columnas (o, se cambia en consonancia la funcionalidad de la misma columna proporcionando una conectividad diferente), concretamente una columna de la primera subsección se desplaza a la primera posición de la segunda subsección, una última columna de la segunda subsección se desplaza a la primera posición de la primera sección, una última columna de la tercera sección se desplaza a la primera posición de la tercera subsección y una última columna de la tercera subsección se desplaza para convertirse en una columna de la primera subsección. De nuevo, las funciones de las tres diferentes secciones de la cuarta sección pueden cumplirse o bien de manera sincrónica o secuencialmente.

Según una realización particularmente preferente de la presente invención, el sistema comprende tres columnas, en el que las funciones de las secciones primera, segunda y tercera son realizadas por una única columna, y en el que, dentro de un tiempo de conmutación, esta única columna toma secuencialmente la función de la primera sección, porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida se usa para recoger el producto intermedio sacándolo del sistema, mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección están conectadas en serie y mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección, se recogen las impurezas ligeras, sacándolas del sistema. De forma subsiguiente esta única columna toma la función de la segunda sección, porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida está directamente conectada a la primera columna de la cuarta sección, mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección están conectadas en serie y mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección, se recogen las impurezas ligeras, sacándolas del sistema. De forma subsiguiente esta única columna toma la función de la tercera sección, porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida se usa para recoger las impurezas pesadas, mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección están conectadas en serie, mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección, se sacan del sistema las impurezas ligeras y mientras que, entre las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección, se suministra la mezcla de múltiples componentes a la cuarta sección.

En otra realización, también preferente, se combinan pares de funciones secuenciales de las secciones dentro de una columna, y, dentro de un tiempo de conmutación, se alternan etapas de elución continua o casi continua y etapas con elución en lotes, que cumplen esas funciones de manera secuencial.

En este caso, la cuarta sección comprende preferentemente tres subsecciones, tal como se ha expuesto en lo que antecede, y se proporcionan tres columnas en el sistema completo, estando conectadas secuencialmente estas tres columnas en una etapa de elución continua o casi continua dentro de una primera parte de un tiempo de conmutación, y estando accionadas en una etapa de lotes para sacar fracciones individuales de la mezcla de múltiples componentes dentro de una segunda parte del tiempo de conmutación.

La cuarta sección también puede comprender tres subsecciones, y pueden proporcionarse cuatro columnas en el sistema completo, estando conectadas secuencialmente estas cuatro columnas en una etapa de elución continua o casi continua dentro de una primera fracción de un tiempo de conmutación, y estando accionadas en una etapa de lotes para sacar fracciones individuales de la mezcla de múltiples componentes dentro de una segunda fracción del tiempo de conmutación, en el que en esta etapa de lotes una de las columnas tiene un caudal cercano o igual a cero.

Según otra realización preferente con un número aún más reducido de columnas requeridas, el sistema comprende únicamente dos columnas, en el que la cuarta sección comprende tres subsecciones. En este caso, las dos columnas están en una primera parte del tiempo de conmutación conectadas en serie para la elución continua mientras que, por medio de la salida, se eliminan del sistema las impurezas

- ligeras; en una segunda parte del tiempo de conmutación las columnas están accionadas en modo de lotes para sacar la fracción intermedia en la columna corriente arriba e impurezas ligeras en la columna corriente abajo mientras que, a la vez, se suministra la mezcla de múltiples componentes a la columna corriente abajo; en una tercera parte del tiempo de conmutación las columnas están conectadas en serie para la elución continua mientras que, por medio de la salida, se eliminan del sistema las impurezas ligeras; y en una cuarta parte del tiempo de conmutación las columnas están accionadas en modo de lotes para sacar las impurezas pesadas en la columna corriente arriba e impurezas ligeras en la columna corriente abajo, en el que, después de cada tiempo de conmutación, se intercambian las posiciones de las dos columnas.
- 10 Preferentemente, en una estructura del cuarto sistema con tres subsección, la primera subsección comprende al menos dos columnas paralelas, y/o las subsecciones segunda y/o tercera comprenden al menos dos columnas paralelas o secuenciales a contracorriente.
- 15 Preferentemente, el suministro es introducido en el sistema de manera continua; sin embargo, aún más preferente es que sea introducido usando un perfil de concentración a impulsos periódicos (periódicos con la frecuencia de la conmutación) o con un perfil formado de concentración/densidad dentro de un tiempo de conmutación. De forma alternativa, o además de lo anterior, los flujos de disolventes/densidades varían dentro de un tiempo de conmutación y/o la conmutación de las entradas/salidas individuales está escalonada dentro de un tiempo (t^*) de conmutación. Resulta particularmente útil que el caudal en columnas individuales sea diferente.
- 20 Cuanto más complicada sea la configuración para una purificación, más importante se vuelve encontrar una manera fácil de configurar los parámetros para tal modelo de purificación. En el caso presente, esto es posible realizando en primer lugar un cromatograma estándar de gradiente en lotes del suministro y mediante un análisis simple, directo e intuitivo de los datos por lotes.
- 25 En la presente situación, la configuración de los parámetros es posible realizar en una primera etapa un cromatograma de gradiente en lotes; en una segunda etapa el cromatograma obtenido es dividido en una primera parte con la fracción ligera, una segunda parte con la fracción deseada, una tercera parte con la fracción deseada solapada con la fracción pesada, y una cuarta parte únicamente con la fracción pesada. En una tercera etapa se escogen los parámetros del procedimiento, de tal modo que la primera sección cumple una tarea igual a la del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la segunda parte, que la segunda sección cumple una tarea igual a la del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la tercera parte, que la tercera sección cumple una tarea igual a la del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la cuarta parte, y que la cuarta sección cumple la tarea igual a la del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la primera parte.
- 30 Así, el tiempo óptimo de conmutación con respecto a la productividad se calcula como el tiempo hasta que las impurezas ligeras han sido eluidas por completo en el cromatograma de gradiente en lotes multiplicado por el caudal del cromatograma de gradiente en lotes dividido por el caudal máximo de la configuración y dividido por el número de columnas de la cuarta sección que ejecutan el gradiente por lotes hasta que las impurezas ligeras han sido eluidas por completo en el cromatograma de gradiente en lotes. Preferentemente, el caudal en cada columna se determina en base al tiempo que lleva la parte correspondiente en el cromatograma de gradiente en lotes multiplicado por el caudal por lotes dividido por el tiempo de conmutación.
- 35 Además de eso, la presente invención describe un dispositivo para llevar a cabo un procedimiento tal como se ha presentado en lo que antecede. En este dispositivo, se prefiere una topología en la que se proporcionan al menos dos columnas cromatográficas individuales, preferentemente al menos tres, pero también 4, 5 o 6, a través de las cuales se puede suministrar una mezcla por medio de al menos un disolvente, en el que la mezcla de múltiples componentes comprende de nuevo al menos impurezas ligeras, un producto intermedio que ha de ser purificado e impurezas pesadas. El dispositivo comprende medios en forma de bombas, válvulas, tubos de conexión entre columnas, salidas de recogida, entradas de disolvente y al menos una toma de suministro, elementos que permiten hacer funcionar las columnas de tal modo que, en al menos una etapa o posición de un modo por lotes, la salida de una columna se usa para recoger el producto intermedio, así como en al menos una etapa o posición de un modo continuo o casi continuo, la salida de al menos una columna está conectada en comunicación de fluidos con la entrada de al menos otra columna, en el que dicho modo por lotes y dicho modo continuo o casi continuo se pueden llevar a cabo o bien de manera sincrónica o secuencialmente, y en el que, después de un tiempo de conmutación, o dentro del mismo, las columnas se desplazan en sus posiciones en una dirección contraria a la dirección general del flujo del disolvente.
- 45 50 55 60 Preferentemente, y según una primera realización del dispositivo, el dispositivo está estructurado de tal modo que las columnas se agrupan en al menos cuatro secciones, en las que la primera sección está dotada de al menos una entrada del disolvente (s) y al menos una salida para el producto intermedio purificado, de modo que saca por lavado el producto intermedio del sistema, pero mantiene las impurezas pesadas dentro de la sección; la segunda sección está dotada de al menos una entrada del disolvente (s)

- y al menos una salida conectada a una entrada de una cuarta sección, de modo que lava el producto intermedio, que está contaminado con impurezas pesadas y lo introduce en la cuarta sección a través de dicha salida, pero mantiene las impurezas pesadas puras dentro de la sección; la tercera sección está dotada de al menos una entrada del disolvente (s) y una salida para impurezas pesadas, de modo que saca por lavado las impurezas pesadas a través de dicha salida y limpia la o las columnas cromatográficas; la cuarta sección está dotada de al menos una entrada para recibir la producción de la salida de la segunda sección, así como al menos una entrada para suministrar la mezcla de múltiples componentes, y al menos una salida para las impurezas ligeras, de modo que saca por lavado las impurezas ligeras del sistema, pero mantiene el producto intermedio dentro de la sección, en el que se proporcionan medios de conexión y de desconexión, permitiendo desplazar la última columna de la primera sección a la primera posición de la segunda sección después de un tiempo de conmutación, o dentro del mismo, desplazar la última columna de la segunda sección a la primera posición de la tercera sección, la última columna de la tercera sección a la primera posición de la cuarta sección y la última columna de la cuarta sección para que se convierta en la primera columna de la primera sección.
- 15 Se bosquejan realizaciones adicionales de la presente invención en las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En los dibujos adjuntos se muestran realizaciones preferentes de la invención, en los cuales:

- la Figura 1 muestra un ejemplo de un SMB con gradiente de disolvente lineal de 6 de columnas;
- la Figura 2 muestra la realización técnica, aquí para 5 columnas, de un gradiente casi lineal por superposición de un gradiente (b) escalonado más un gradiente (a) de disolvente periódico;
- la Figura 3 muestra un diagrama de flujo esquemático de un SMB con gradiente de disolvente de 5 columnas para separar una mezcla de 4 componentes;
- la Figura 4 muestra un ejemplo concreto de una configuración de "SMB con gradiente de disolvente lineal cortocircuitado";
- la Figura 5 muestra un diagrama de flujo generalizado del "Procedimiento de purificación de gradiente continuo";
- la Figura 6 muestra un diagrama de flujo de un "Procedimiento de purificación de gradiente continuo" específico;
- la Figura 7 muestra un diagrama de flujo de otro "Procedimiento de purificación de gradiente continuo" específico;
- la Figura 8 muestra un diagrama de flujo de otro "Procedimiento de purificación de gradiente continuo" específico;
- la Figura 9 muestra un cromatograma cualitativo y secciones del procedimiento de purificación;
- la Figura 10 muestra un cromatograma de gradiente simulado para demostrar el diseño del procedimiento continuo;
- la Figura 11 muestra una simulación de un procedimiento en medio de una conmutación. Puede verse que la columna 1 ya está limpiada por completo;
- la Figura 12 muestra una simulación de un procedimiento antes de una conmutación;
- la Figura 13 muestra una simulación de un procedimiento después de una conmutación;
- la Figura 14 muestra un cromatograma de gradiente simulado para la elución por lotes con caudal máximo de 2,25 ml/min y 7 columnas cortas en una fila con una pureza del 79,0% y un rendimiento del 100%;
- la Figura 15 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de 8 columnas usado para el cromatograma de verificación y cualitativo;
- la Figura 16 muestra el análisis de gradiente del suministro con una columna analítica ODS ZORBAX ODS SB-300;

- la Figura 17 muestra la relación entre rendimiento y pureza en condiciones operativas ligeramente diferentes;
- la Figura 18 muestra dos sistemas de purificación en una fila;
- la Figura 19 muestra un modelo de una "unidad de 5 columnas" operada con 3 columnas en el que las secciones α , β , y γ se combinan en una columna;
- la Figura 20 muestra una unidad continua de 6 columnas con una vía a contracorriente y una vía de lotes;
- la Figura 21 muestra un diagrama de flujo del "Procedimiento de purificación de gradiente continuo" específico representado en la Figura 20;
- la Figura 22 muestra la operación de la configuración según la Figura 20 con solo tres columnas para valores experimentales específicos;
- la Figura 23 muestra el plan de conmutación de la configuración según la Figura 20;
- la Figura 24 muestra la operación de la configuración según la Figura 20 realizada explícitamente con solo tres columnas;
- la Figura 25 muestra las posiciones de las columnas durante un ciclo de la "unidad de 6 columnas" operada con 3 columnas;
- la Figura 26 muestra una configuración posible de cuatro columnas para la topología según la Figura 21, pero con las columnas a contracorriente en la sección β ;
- la Figura 27 muestra una configuración de dos columnas para la purificación de gradiente a contracorriente;
- la Figura 28 muestra una configuración según la Figura 27 en una vista esquemática que incluye las correspondientes tareas del cromatograma en la parte de abajo;
- la Figura 29 muestra una configuración secuencial semicontinua con "CEX", "AEX" e "HIC" en una planta.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

5 Para las eluciones por lotes de gradiente de disolvente preparativas y también analíticas se usan muy a menudo gradientes lineales de disolventes con respecto al tiempo. Para biomoléculas con isotermas rectangulares, una elución con gradiente lineal es, a menudo, el único tipo útil de elución. El sistema presentado en este trabajo usa gradientes casi lineales, que son análogos al usado en los sistemas por lotes.

El gradiente lineal de disolvente de la elución por lotes puede dividirse en niveles constantes y en gradientes lineales periódicos superpuestos con una periodo de un tiempo " t^* " de conmutación.

10 Esta "división de gradiente" se explica en el siguiente ejemplo ilustrado en la Figura 1, que muestra un "lecho móvil simulado (SMB) con gradiente de disolvente lineal" de 6 de columnas.

15 Después de una conmutación, las concentraciones de modificador en las columnas están a la concentración de la etapa base como (después de la conmutación), lo que se indica con la línea de abajo. Durante el siguiente tiempo de conmutación, la concentración dentro de cada columna cambia linealmente (naturalmente, también es posible no linealmente) hasta el nivel siguiente, lo que se indica con la concentración del nivel de arriba, designado b_s (antes de la conmutación) en la Figura 1. Cuando el sistema empieza a conmutar en " t^* ", es decir, cuando las columnas se desplazan en una dirección opuesta al flujo del disolvente, la concentración inicial de la nueva posición es exactamente la concentración final de la posición anterior. En el caso presente, conmutación significa que la columna 6 conmuta a la columna 5, 5->4, 4->3, 3->2, 2->1, 1->6, dado que el disolvente o eluyente fluye de izquierda a derecha.

20

25 Las moléculas de soluto dentro de las columnas no "ven" la conmutación en t^* . Se "dan cuenta" únicamente del cambio casi continuo de la concentración del modificador según pasa el tiempo, que es la parte periódica (empezando desde un nivel constante, que es diferente para cada columna, con niveles indicados como en la Figura 1). Por último, pueden viajar con la fase sólida, por ejemplo, desde la columna 6 hacia atrás hasta la columna 1 y "sienten" únicamente una concentración del modificador que aumenta linealmente desde C_{inicio} hasta C_{fin} , completamente análogo a la elución en lotes con gradiente lineal de disolvente.

La Figura 2 muestra cómo se vuelve disponible de manera efectiva el gradiente casi lineal. Una concentración de modificador $C_{\text{mod},v}$ (por ejemplo, un disolvente fuerte como el acetonitrilo, ACNL, añadido a un disolvente débil como agua con ácido, pero también son posibles sales y otros modificadores) que cambia en función del tiempo (Figura 2a) se combina o se superpone/mezcla con niveles constantes de una concentración de modificador $C_{\text{mod},c}$ para cada columna (Figura 2b). Si ambas concentraciones se combinan en C_{mod} , el gradiente efectivo se vuelve un gradiente lineal desde el punto de vista de una columna. En la Figura 2c la concentración de modificador C_{mod} se traza desde el punto de vista de una columna en un sistema de 5 columnas.

Cuando la columna está en la posición 5, “ve” la concentración mínima del modificador. Esa concentración aumenta linealmente con el tiempo. En el tiempo t^* de conmutación, la columna se conmuta a la posición 4. Aquí tiene lugar nuevamente un aumento lineal de la concentración, pero este empieza a partir de la concentración que es igual a aquella que había inmediatamente antes de la conmutación en la posición 5. Lo mismo sucede cuando la columna conmuta a las posiciones 3, 2 y 1. Después de un ciclo, la columna vuelve a conmutar a la posición 5, en la que vuelve a empezar el mismo procedimiento.

Para las “separaciones fáciles” (separaciones de línea de base) en las que la selectividad de los solutos es grande puede usarse un sistema como el mostrado en la Figura 3. Aquí cada columna i contiene un perfil de elución en la entrada, que contiene el componente lavado en la siguiente columna ($i-1$). La concentración mayor de modificador se aplica a la columna 1 (s.s.: disolvente fuerte), y la concentración desciende a lo largo de la secuencia de las columnas 2 – 5 (w.s.: disolvente débil). En este caso separan cuatro fracciones; concretamente, una fracción ligera A, dos fracciones intermedias B y C, y una fracción pesada D.

Cada columna tiene 3 tareas (aquí, para la columna nº 3): 1) “eluir un componente (aquí, el componente B)”, 2) “mantener a las otras sin moverse (C, D)” y 3) “coger el componente, que es eluido en la columna siguiente “3-1=2” (aquí C)”.

Para separaciones fáciles (alta selectividad, separación de la línea de base), son suficientes los gradientes escalonados; en realidad, no se requieren los gradientes casi lineales ni influyen sustancialmente en la producción ni en la selectividad del procedimiento.

Sin embargo, las separaciones fáciles son raras. Normalmente, una mezcla que ha de ser purificada consiste en cientos de diferentes componentes, de los cuales algunos pueden tener un comportamiento de adsorción muy similar y de los cuales, en realidad, solo uno, o un número muy pequeño, es la fracción deseada. Además de eso, la fracción deseada es, muy a menudo, muy pequeña y está eclipsada por enormes cantidades de componentes pesados y ligeros de los que nos gustaría deshacernos. En tal situación, el SMB que se muestra en la Figura 1 no sería capaz de purificar la fracción intermedia de una mezcla “normal” de múltiples componentes, como, por ejemplo, un polipéptido en una resina de fase inversa.

Por lo tanto, uno de los problemas de tal configuración es el hecho de que solo es aplicable de manera eficiente a situaciones en las que está presente la separación de la línea de base; en todos los demás casos, en particular si la fracción deseada (por ejemplo, la B) es solo un pequeño porcentaje de las fracciones deseadas, será muy difícil, si no imposible, obtener rendimientos elevados y una buena separación. Esto, dado que cualquier compuesto que se solape con la fracción deseada se perderá o bien en una fracción corriente abajo o corriente arriba, y la mezcla de fracciones en órdenes no deseados será inevitable.

Por lo tanto, si la conmutación de las columnas tiene lugar “tarde”, es decir, si ya no hay solapamiento con la fracción ligera (por ejemplo, la A), no queda mucho tiempo para eluir la fracción deseada (B), y se perderá entonces una parte importante de la fracción deseada (B) en la fracción pesada subsiguiente, dado que acabará por completo y con total certeza en la salida de la fracción C. O la fracción deseada (B) estará contaminada con cantidades de la fracción ligera (A) si las columnas son conmutadas “pronto” y si se tolera un solapamiento parcial de la fracción deseada B con una fracción ligera A en el momento de la conmutación. Tiene que señalarse que este es un problema inherente que no puede superarse mediante un SMB escalonado o secuencial según la Figura 3.

Por lo tanto, para superar estos y otros problemas, se ha desarrollado el procedimiento, que se denomina “Técnica de columnas móviles en cortocircuito”, según las reivindicaciones adjuntas.

Una de las ideas básicas que subyace a este concepto sorprendentemente eficiente y simple es que es posible, por medio del “cortocircuito” de un procedimiento similar al dado en la Figura 3, recuperar la fracción deseada a pesar del hecho de que se permita que la conmutación de las columnas ocurra “tarde”, es decir, si, antes de conmutar las columnas, la columna específica 3 casi ya no comprende nada de la fracción ligera A. Esto se logra básicamente porque se evita el solapamiento con la fracción pesada subsiguiente (en el caso de la Figura 3, la fracción C), y porque, por medio del cortocircuito de la “trayectoria del disolvente”, es decir, conectando directamente la salida de la columna 2 con la entrada de

la columna 4, cualquier cantidad de la fracción deseada B, que en una configuración según la Figura 3 acabaría mezclada con C y sería sacada del sistema, es devuelta a la columna 4 y, después, debido a la conmutación a contracorriente de las columnas, volverá a ser devuelta a la posición 3 para la elución.

5 Cómo generar un gradiente de disolvente lineal casi continuo se ha presentado en la Figura 1. La introducción de eluciones en lotes con gradiente de disolvente se realiza de forma discontinua antes de que comience la elución. El suministro se carga con concentraciones pequeñas del modificador, en las que la adsorción de los solutos es muy fuerte y los sitios de adsorción están libres. Después de la carga, la concentración del modificador aumenta con el tiempo y los solutos empiezan a eluirse uno tras otro. La carga continua en el SMB de gradiente mostrado en la Figura 1 no es muy útil. El suministro tendría que ser impulsado al comienzo de la conmutación para que el gradiente pueda realizar su efecto a tiempo.

10 Para obtener un rendimiento elevado, es preciso que la columna 5 de la Figura 1 sea conmutada a la posición 4 antes de que salga el E1 intermedio. Inmediatamente antes de la conmutación, la columna 5 sigue conteniendo algunas impurezas ligeras (refinado, R) que serán llevadas durante la conmutación siguiente con la corriente líquida procedente de la columna 4 a la columna 5. El efecto negativo es que los componentes ligeros se moverán hacia arriba con el sólido y alcanzará una posición en la columna 4 detrás del nuevo impulso de suministro. Por lo tanto, será imposible alcanzar una pureza elevada del componente intermedio deseado E1.

15 Una vez que el componente intermedio E1 está limpio en la salida de columna de la columna 3, solo parte de la corriente purificada se envía fuera del SMB en la corriente E1 del "Extracto 1". La mayor parte fluye a la columna 4, debido a la conexión líquida entre la columna 3 y la columna 4. En la entrada de la columna 4, los componentes pesados son adsorbidos en la resina, de modo que el componente intermedio purificado E1 se mezcla con las impurezas pesadas E2. Entonces la separación se vuelve imposible.

20 Según se indica en la Figura 4, la técnica de columnas móviles en cortocircuito resuelve estos problemas. La columna 3 no tiene ninguna conexión líquida con las otras columnas; la columna 2 está conectada con la columna 4, y la columna 5 se hace disponible para el suministro continuo, mientras que la columna 4 está conectada con la columna 6.

25 Se muestra un enfoque más general de esta técnica en la Figura 5, en la que se generaliza la topología de conexiones de columnas de la Figura 4 mostrando el principio subyacente. En este caso, se introduce en el sistema un suministro F (constante u objeto de impulso/distribución periódico) que comprende tres fracciones: A (fracción ligera), B (fracción deseada) y C (fracción pesada). Las flechas de trazo discontinuo muestra el movimiento de los sólidos, es decir, el desplazamiento de las columnas en el sistema. La flecha horizontal que apunta a la derecha en el centro indica el reciclado del líquido entre las secciones β y δ .

30 En el procedimiento generalizado mostrado en la Figura 5, están conectadas cuatro secciones α , β , γ , δ , que consisten en una o varias columnas cromatográficas con un movimiento simulado de sólidos en un bucle cerrado (flechas de trazo discontinuo). Después de cierto tiempo, el tiempo t^* de conmutación, la última columna de la sección α se desplaza a la primera posición de la sección β , y la última columna de la sección β se desplaza a la primera posición de la sección γ . La última columna de la sección γ se conmuta a la primera posición de la sección δ y la última columna de la sección δ se convierte en la primera columna de la sección α . Esto se realiza de tal forma que se obtiene continuamente una separación entre impurezas ligeras A, el producto intermedio B y las impurezas pesadas C. En relación con las corrientes líquidas, el desplazamiento de las columnas entre las secciones se realiza con flujo transversal, salvo la conexión entre las secciones β - δ , pero dentro de las secciones las columnas pueden ser desplazadas a contracorriente con respecto a las corrientes líquidas.

35 El número de columnas dentro de las secciones depende de la dificultad de la separación. Si los componentes pueden ser purificados con facilidad en una columna de lotes, el sistema no requiere el desplazamiento a contracorriente dentro y entre las secciones; entonces cada sección podría consistir en una sola columna, y la sección β ni siquiera hace falta. Sin embargo, para las separaciones difíciles, en las que solo puede obtenerse una purificación parcial en una elución por lotes, se prefieren una o más columnas dentro de las secciones β y δ para obtener rendimientos y purezas elevados. Las secciones β y δ están interconectadas con una corriente de reciclado líquido (flecha horizontal central). Todas las corrientes de entrada y salida son continuas, salvo el suministro, que puede ser una corriente continua o a impulsos. Los caudales en las secciones individuales y en las columnas dentro de las secciones no son necesariamente idénticos. El procedimiento puede transferir eluciones de gradiente isocrático y también lineal a una separación continua, parcialmente a contracorriente.

Las secciones tienen tareas específicas, que son:

Sección α : sacar por lavado el producto intermedio purificado del sistema, pero mantener las impurezas pesadas dentro de la sección.

- Sección β : lavar el producto intermedio, que está contaminado con impurezas pesadas, e introducirlo en la sección δ , pero mantener las impurezas pesadas puras dentro de la sección.
- Sección γ : sacar por lavado las impurezas pesadas y limpiar la o las columnas cromatográficas de la sección. Limpieza in situ (CIP).
- Sección δ : sacar por lavado las impurezas ligeras del sistema, pero mantener el producto deseado dentro de la sección. Introducir el suministro en el sistema de purificación.

Cada una de las secciones puede tener un diseño que está adaptado al problema de separación específica que tiene que resolverse. En las subsiguientes Figuras 6-8 se dan variaciones posibles para algunas de las secciones.

5 Por ejemplo, en la Figura 6 se da un diseño específico de la sección δ que incluye cinco columnas en esta sección. Lo más frecuente es que tener un número mayor de columnas en esta sección δ sea aconsejable, debido al hecho de que esta sección tiene que proporcionar el pleno barrido de gradiente hasta que las impurezas ligeras se hayan eluido por completo en la columna de lotes y se pueda sacar el producto puro deseado de la columna de lotes durante algún tiempo hasta que las impurezas pesadas empiecen a salir.

10 La Figura 7 muestra la posibilidad de tener varias columnas en la sección β que funcionen a contracorriente, para que esta sección esté estructurada realmente de forma estrechamente análoga a la de una disposición de SMB.

15 En las Figuras 7 y 8 se muestra también otra variación de la sección δ , en la que se usan 3 columnas. Para tener una disposición como la representada en la Figura 4, en la Figura 7 la salida de la columna 7 no está conectada a la entrada de la columna 8.

La Figura 6 muestra un ejemplo de un sistema de 8 columnas que se ha usado para una verificación experimental. Tiene que señalarse que, en principio, en una configuración como la mostrada en la Figura 6, también sería posible conectar la salida de la columna 2 con la entrada de la columna 4.

20 También puede establecerse una estructura específica dentro de la sección δ . Normalmente, es aconsejable tener al menos una columna (primera subsección δ_r), en este caso la columna 6, que se use para cargar el suministro, y que tenga un caudal bajo. Esta columna puede o bien eliminar directamente las impurezas ligeras del sistema o introducir las en otra columna de la sección δ . Otra segunda subsección δ_g dentro de la sección δ viene dada por las columnas 4 y 5, que proporcionan una entrada para capturar la salida de la segunda sección β y que dan salida a una tercera subsección adicional δ_r , que consiste en las columnas 7 y 8 en este caso específico.

30 La segunda subsección δ_g básicamente elimina todas las impurezas ligeras A y garantiza que sean transferidas directamente a la tercera subsección. Además de eso, la segunda subsección δ_g garantiza que el producto deseado B esté perfectamente colocado dentro de la columna 4 inmediatamente antes de la conmutación, cuando la columna 4 se desplaza a la posición 3, y de que se ejecute todo el gradiente necesario para transportar B de toda la posición del sólido. En este contexto tiene que señalarse que la segunda subsección es responsable de impulsar todo el gradiente hasta que las últimas partes de las impurezas ligeras alcancen el extremo de la última columna de la sección. Por lo tanto, el número de columnas en esta sección podría adaptarse si este tiempo es particularmente prolongado.

35 Específicamente, es aconsejable no conectar la salida de la columna 4 a la entrada de la columna 5 para evitar que las impurezas ligeras sean lavadas e introducidas en la columna 5 en la posición indebida en la fase sólida.

40 La tercera subsección, formada por las columnas 7 y 8, comprende al menos una entrada para capturar la producción de la segunda subsección δ_g y posiblemente al menos una entrada para capturar la producción de la primera subsección δ_r , y al menos una salida, y sirve para garantizar que B se mantenga en el sistema y que las impurezas ligeras sean eliminadas del sistema. En la configuración según la Figura 6, la salida de la columna 8 está formada por disolvente limpio.

45 La Figura 7 muestra otra configuración, en la cual, para una mejor separación en la sección β , se disponen tres columnas a contracorriente. En las Figuras 7 y 8 se da la estructura más simple de una subestructura en la sección δ tal como se detalla más arriba en el contexto de la Figura 6. En el caso de una separación difícil de las impurezas ligeras, se prefiere una configuración según la Figura 8 a una configuración según la Figura 4.

El plan generalizado puede adoptar muchas formas específicas; por ejemplo:

- Si el suministro es por impulsos, la sección δ requiere una columna menos que si el suministro fuera continuo.

- Si las impurezas pesadas se adsorben con mucha mayor intensidad que el producto intermedio, la sección β no contiene ninguna columna.
- Para casos afortunados, el procedimiento puede ser operado incluso sin aplicar gradientes de disolvente.

5 También tiene que señalarse que las secciones α , β , y γ pueden combinarse también en una columna en la que, de forma escalonada en el tiempo, se saquen las fracciones individuales que sean entonces iguales a la salida de las secciones α , β y γ según se dan en la Figura 5 y se suministran a la entrada de los elementos correspondientes de la Figura 5.

10 Para configuraciones variables como la propuesta en esta solicitud, es muy importante contar con modelos generalizados y simples para establecer los parámetros para hacer funcionar el sistema de una manera que esté adaptada a un problema específico de purificación. En el caso presente, hay un modelo y una técnica muy simples que, apartándose de un cromatograma de gradiente en lotes, permite encontrar, tal como se propone, los parámetros para el procedimiento continuo.

15 El procedimiento puede diseñarse fácilmente como sigue a partir de un perfil experimental (o simulado) de concentración. Como se muestra en la Figura 9, cada sección se refiere a un intervalo de tiempo. Las tareas de las secciones α - δ se refieren a eventos que suceden en el correspondiente intervalo de tiempo de la elución en lotes.

20 Se simula un ejemplo concreto para aumentar la comprensión de la transferencia de una purificación por lotes a una continua. En este ejemplo, se lleva a cabo un gradiente de disolvente (gradiente de modificador) de 170 g/l de ACNL (acetonitrilo) a 190 g/l de ACNL. El caudal es de 0,5 ml/min. Volumen de la columna 1,66 ml. El gradiente comienza a 0 min y acaba a 25 min. Se inyectan 25 μ l de calcitonina cruda a 1 g/l, en la que las impurezas son Ligera1 (A1): 25%, Ligera2 (A2): 5%, intermedia (B): 55%, pesada (C): 15%.

25 El rendimiento deseado es del 60% y la pureza es del 82,9%, de modo que la fracción intermedia se toma de 26,8–31 min.

Esto lleva al perfil dado en la Figura 10.

Apartándonos de un cromatograma de gradiente en lotes de este tipo, un procedimiento continuo se diseña como sigue:

Se usan 7 columnas, que tienen la misma dimensión de la columna única de lotes.

30 Se escoge para el ejemplo el sistema de la Figura 6, pero en la simulación se inyecta un impulso como suministro, y no hay suministro continuo. Debido al suministro a impulsos, la columna 6 no es necesaria y no se usa.

Las tareas de las secciones son las siguientes:

Sección α : hacer lo que ocurrió entre 26,8 – 31,0 minutos.

Sección δ : hacer lo que ocurrió entre 31,0 – 38,0 minutos.

Sección γ : hacer lo que ocurrió entre 38,0 – 43,0 minutos.

Sección δ : hacer lo que ocurrió entre 0,0 – 26,8 minutos y recoger la salida de la sección β . Introducir el suministro en el sistema.

35 Todas las tareas tienen que estar acabadas dentro de un tiempo t^* de conmutación. La tarea de la sección δ requiere el tiempo mayor, que es la razón de que haya 4 columnas en esa sección. Definimos los siguientes parámetros de diseño, valores que corresponden al cromatograma:

Tabla 1

Suceso	Tiempo (min)	Variable	Conc. del mod. en la entrada a la columna (g/l)
Inicio	0	t_Inicio	170
A empieza a eluir	18	Inicio_A	184,4
B empieza a eluir	22	Inicio_B	187,6
Comienza el fraccionamiento	26,8	Inicio_Frac	190

Suceso	Tiempo (min)	Variable	Conc. del mod. en la entrada a la columna (g/l)
Finaliza el fraccionamiento	31	Fin_Frac	190
B acaba de eluir	38	Fin_B	190
Todos los componentes están fuera	45	t_Fin	190

5 El procedimiento general para calcular el tiempo de conmutación es como sigue: para la configuración mostrada en la Figura 6, el gradiente desde el suministro hasta el momento en el que sale el producto intermedio deseado se transferirá a las columnas 4 y 5. La columna que es operada con mayor caudal está limitando el procedimiento. En el ejemplo aquí presentado, la columna 5 ejecuta la parte más prolongada del gradiente (Inicio_A – t_Inicio = 18 min), mientras que la columna 4 ejecuta la parte más breve (Inicio_Frac – Inicio_A = 26,8 – 18 = 8,8 min). Sería óptimo con respecto a la productividad que la columna 4 y la columna 5 fueran operadas con los mismos caudales.

10 En este ejemplo específico se decide ejecutar en la columna 5 la parte del gradiente en lotes hasta que la impureza ligera comience a eluirse. Por ello, el tiempo de conmutación requerido puede calcularse ahora como:

$$t^* = \frac{(Inicio_A - t_Inicio) Q_{lote}}{Q_{max}} = 4 \text{ min}$$

Por lo tanto, los caudales dentro de las columnas tienen que ser:

$$Q_1 > \frac{V_{Columna}}{t^*}$$

$$Q_2 = Q_{lote} \frac{Fin_B - Fin_Frac}{t^*} = 0,875 \frac{ml}{min}$$

$$Q_3 = Q_{lote} \frac{Fin_Frac - Inicio_Frac}{t^*} = 0,53 \frac{ml}{min}$$

$$Q_4 = Q_{lote} \frac{Inicio_Frac - Inicio_A}{t^*} = 1,1 \frac{ml}{min}$$

$$Q_5 = Q_{lote} \frac{Inicio_A - t_Inicio}{t^*} = 2,25 \frac{ml}{min}$$

$$Q_6 = Q_{Suministro}$$

en los que, como se ha mencionado en lo que antecede, aquí el suministro se introduce a impulsos en la columna 5 para que no se use la columna 6:

$$Q_7 \approx Q_4$$

$$Q_8 \approx Q_5$$

15 Los gradientes de disolvente son según la composición de la fase móvil en el tiempo característico en la entrada de la columna (véase la Tabla 1): Con estos valores para las concentraciones del modificador y los caudales internos, pueden calcularse los parámetros de entrada para las columnas.

Tabla 2: corrientes de fase móvil en las entradas a las columnas:

Columna	Conc. del modificador a t=0	Conc. del modificador a t=t*		ml/min
1	<i>Arbitrario, la tarea tiene que cumplirse aquí</i>	400 g/l isocráticos	Bomba 1	0,85
2	190 g/l	190 g/l	Bomba 2	0,88
3	190 g/l	190 g/l	Bomba 3	0,53

Columna	Conc. del modificador a t=0	Conc. del modificador a t=t*		ml/min
4	184,4 g/l	190 g/l	Bomba 4	1,10

(cont.)

Columna	Conc. del modificador a t=0	Conc. del modificador a t=t*		ml/min
5	157,1 g/l	184,4 g/l	Bomba 5	1,37
6	<i>Arbitrario, la tarea tiene que cumplirse</i>	No usada en la simulación		-
7	<i>Arbitrario, la tarea tiene que cumplirse</i>	Conectada con la salida de la Col. 4		0,0
8	<i>Arbitrario, la tarea tiene que cumplirse</i>	Conectada con la salida de la Col. 5 más 0,03 ml/min de acetonitrilo puro	Bomba 6	0,03

5 En las Figuras 11-13 se muestra la simulación del procedimiento continuo. Los perfiles de concentración dentro de las secciones se muestran antes (Figura 12), después (Figura 13) y en medio (Figura 11) de una conmutación en una situación de estado estable. En el eje Y de la izquierda, la concentración del péptido se da en g/l y en el eje Y de la derecha la concentración del modificador se da en g/l.

El rendimiento en esta simulación es de aproximadamente el 99,95% y la pureza es del 85,2%. En la Tabla 3 se muestra una comparación con el procedimiento por lotes, a partir del cual se ha diseñado el procedimiento continuo.

Tabla 3:

	LOTES	CONTINUO
RENDIMIENTO	60%	99,95%
PUREZA	82,8%	85,2%
NÚMERO DE COLUMNAS	1	7
NÚMERO DE BOMBAS	1 (bomba de gradiente)	6 (bombas de gradiente)
PRODUCTIVIDAD mg de producto purificado por ml de Columna y min	0,00070, calculado con Fin_Frac = 32 min y con el caudal máx. de 2,25 ml/min	0,000296, 2,36 veces menor
ml disolvente / mg suministrado	900 ml/mg (no se tiene en cuenta el equilibrio)	761,6 ml/mg

10 Las ventajas del procedimiento continuo se vuelven muy claras, aunque en este ejemplo la productividad del procedimiento por lotes es aproximadamente 2 veces mayor que para el procedimiento continuo. Es posible una disminución adicional del consumo de disolvente. Sin embargo, en este ejemplo, el procedimiento continuo ha sido transferido directamente desde el cromatograma por lotes. Todavía no está optimizado. Un ligero cambio de los caudales en las columnas 4 y 5 puede disminuir el tiempo mínimo de conmutación a 3 minutos, de modo que la productividad aumentaría en un 33%. Aún no se ha explorado plenamente el potencial de optimizaciones.

15 Cuando mayores se vuelven las limitaciones de calidad como el rendimiento y la pureza, más valioso se hace el procedimiento continuo. Esto es sumamente importante para solutos muy caros, como para las biomoléculas.

20 Es bien conocido que los procedimientos en lotes requieren un gran número de etapas teóricas. Por ello, el ejemplo anterior debe comparar también el procedimiento continuo con un procedimiento por lotes

en el caso de que la columna de lotes consista en la misma cantidad de resina que la planta de múltiples columnas continuas.

5 La Figura 14 muestra la elución en lotes realizada con el caudal máximo de 2,25 ml/min en 7 columnas únicas en una fila (7 veces más etapas y una carga 7 veces más elevada). Puede verse que la pureza, para un rendimiento del 99,95%, es de solo el 79%. Si la pureza requerida es del 85,2%, el rendimiento del lote sería del 99,6%. La productividad del lote con 7 columnas en una fila es de solo el 54% en comparación con el procedimiento continuo. Véase la Tabla 4.

Tabla 4:

	LOTES	CONTINUO
RENDIMIENTO	99,95%	99,95%
PUREZA	79,0%	85,2%
NÚMERO DE COLUMNAS	7	7
NÚMERO DE BOMBAS	1 (bomba de gradiente)	6 (bombas de gradiente)
PRODUCTIVIDAD mg de producto purificado por ml de Columna y min	0,000159, calculado con Fin_Frac = 52 min y con el caudal máx. de 2,25 ml/min	0,000296, 1,86 veces menor
ml disolvente / mg suministrado	900 ml/mg (no se tiene en cuenta el equilibrio)	761,6 ml/mg

10 Dado que la pérdida total de presión de una columna cromatográfica es proporcional a la longitud de la columna, el caudal máximo de la columna larga será mucho menor que el caudal máximo de la columna corta, lo que disminuirá adicionalmente la productividad de la elución por lotes.

Verificación experimental: Purificación de calcitonina

15 El procedimiento novedoso ha sido verificado experimentalmente con un sistema de bucle abierto de 8 columnas mostrado en la Figura 15. Los parámetros de entrada para el experimento se toman de una simulación. La figura inferior es equivalente a la Figura 6. El cromatograma, así como el gradiente de disolvente, se divide en tareas, cumplidas por las cuatro secciones α - β - γ - δ . El procedimiento es plenamente análogo a la elución por lotes de gradiente, pero permite el reciclado a contracorriente de las fracciones laterales en la sección δ y entre las secciones β y δ .

Las 8 columnas dentro de las cuatro secciones tienen las siguientes tareas:

Sección γ : (1 columna)

Columna 1 sacar por lavado el componente C del sistema.

Sección β : (1 columna)

Columna 2 sacar por lavado una pequeña cantidad valiosa de B, que está contaminada por C. Para reciclar B, se lava la corriente de la salida líquida de la columna 2 y se introduce en la columna 5.

Sección α : (1 columna)

Columna 3 sacar por lavado el producto purificado B. Se usa disolvente nuevo para garantizar la mayor pureza posible.

Sección δ : (5 columnas)

Columna 4 sacar por lavado una cantidad pequeña, pero valiosa, de B, que está contaminada por A. En este ejemplo, se usa disolvente nuevo. Otra tarea de la columna 4 es la separación parcial entre C y B. Tiene sentido hacer funcionar la columna 4 bajo condiciones de gradiente lineal. Los solutos eluidos son lavados e introducidos en la columna 7 para su reciclado.

Columna 5 sacar por lavado la parte fundamental de A e introducirla en la columna 8. El disolvente aquí usado consiste en disolvente reciclado proveniente de la columna 2 (sección β),

más disolvente débil procedente de la bomba 5, que hace falta para ajustar la concentración precisa del modificador. Otra tarea de la columna 5 es la separación parcial entre C y B.

- Columna 6 es la columna de suministro. Aquí, el caudal debería ser el menor posible para lograr un gran número de etapas teóricas y un perfil estrecho de carga.
- Columna 7 es una columna de reciclado. Su tarea es: a) coger A+B de la salida de la columna 4, y b) separar lo mejor posible A de B. El disolvente aquí usado consiste en disolvente reciclado proveniente de la columna 4, más disolvente débil procedente de la bomba P7, que hace falta para ajustar la concentración precisa del modificador.
- Columna 8 es también una columna de reciclado. Su tarea es: a) coger A+B de la salida de la columna 5, y b) separar lo mejor posible A de B. El disolvente aquí usado consiste en disolvente reciclado proveniente de la columna 5, más disolvente débil procedente de la bomba P8.

A veces resulta útil ejecutar un gradiente negativo de disolvente en las columnas 7 u 8, o lograr una estabilidad mayor en el caso de isotermas de adsorción no lineal. Además, la columna 2 debería ser operada con un gradiente negativo de disolvente (inicio con una alta concentración de modificador, final con una baja concentración de modificador).

- 5 La planta usada para los experimentos consiste en 3 sistemas "Äkta-Explorer Basic", que están equipados con varias válvulas adicionales de múltiples posiciones y bombas adicionales de gradiente. El soporte lógico para las tres máquinas Äkta es "UNICORN", de Amersham, y el control global de los tres sistemas UNICORN que corren simultáneamente se realiza con el soporte lógico "Genesis".

- 10 La mezcla que se está purificando es el polipéptido calcitonina, con una masa molecular de 3432 g/mol tomada del procedimiento de producción antes de la purificación de fase invertida. En la Figura 16 se muestra un cromatograma analítico del suministro. El suministro consiste en aproximadamente un 46% de calcitonina, aproximadamente el 19% de impurezas pesadas y el 35% de impurezas ligeras. La calcitonina es la fracción intermedia "B".

- 15 Las columnas dentro de la planta continua usada para purificar los péptidos están llenas de SOURCE RPC 15, de Amersham. Las dimensiones de la columna son 100 × 4,6 mm. La fase móvil es agua/H₃PO₄ y acetonitrilo. El número de etapas teóricas por columna es de alrededor de NTP = 100.

Los parámetros experimentales como caudales y concentraciones de modificadores se basan en la simulación. Los parámetros experimentales escogidos para la verificación son:

Disolvente A:	998,5 g/l de agua, 1,17 g/l de H ₃ PO ₄ (85%)
Disolvente B:	acetonitrilo puro
Suministro:	0,9 g/l de calcitonina cruda con un 43% de pureza disuelta en A
Tiempo de conmutación:	t* = 6 min.
Bomba 1	0,25 ml/min, del 60,0% de B al 30,1% de B en 0,73 t*
Bomba 2	0,75 ml/min, del 24,31% de B al 29,13% de B en t*
Bomba 3	0,13 ml/min, del 24,31% de B al 24,31% de B en t*
Bomba 4	0,15 ml/min, del 24,31% de B al 24,31% de B en t*
Bomba 5	0,13 ml/min, del 24,31% de B al 1,29% de B en t*
Bomba 6	0,045 ml/min, (suministrar a la col. 6, 0,03 ml/min de B puro en la col. 8)

- 20 Puede mostrarse por las señales UV en línea y las señales de conductividad de las salida de la columna 1 (C), 3 (B) y 7 (A) que las señales comienzan a alcanzar un patrón periódico constante después de aproximadamente 150 min. El sistema requiere aproximadamente 800 min para alcanzar un estado estable.

- 25 La pureza de la calcitonina en el estado estable es del 85%, que se corresponde al valor predicho por las simulaciones. El rendimiento también coincide con la simulación y tiene un valor de aproximadamente el 97%.

Se realizaron 16 experimentos. En la Figura 17 se muestra un diagrama de la pureza y el rendimiento de estos experimentos. La pureza, en %, se da como una función del rendimiento en % (eje X).

Configuración secuencial

Normalmente, un tipo de separación cromatográfica no es suficiente para purificar por completo una biomolécula ni para cumplir las restricciones de seguridad. Entonces, pueden usarse dos sistemas en serie, como, por ejemplo, la cromatografía de intercambio de iones (IEX) y, después, la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Pueden ponerse en fila dos sistemas de purificación; véase, por ejemplo, la Figura 17. El suministro F se introduce en la sección δ_1 del primer sistema. La fracción purificada intermedia del sistema 1 se carga en la sección δ del sistema 2. También se introduce sal o modificador orgánico en esta sección δ_2 del sistema 2. Es posible aplicar un impulso a la salida de α_1 dentro de, por ejemplo, 1/3 de una conmutación. Los 2/3 restantes de la conmutación pueden usarse para sacar por lavado los trazadores de la columna de carga en la sección δ_2 . Dado que ambos procedimientos son continuos, los dos sistemas pueden operar con diferentes tiempos de conmutación. El sistema 2 puede diseñarse a partir de un cromatograma de la salida parcialmente purificada de la sección α_1 .

El procedimiento de purificación por gradiente también puede ser operado en modo casi continuo o semicontinuo. Entonces, pueden usarse hasta 3 columnas menos, es decir, por ejemplo, hasta dos o tres columnas, para cumplir la tarea de purificación. Esto puede aumentar la productividad en comparación con todo el procedimiento continuo dado más arriba para el caso en que la corriente del producto purificado y el caudal de suministro son pequeños en comparación con otros caudales. Además, la reducción del número de columnas simplifica la configuración, dado que el sistema requiere columnas casi idénticas para una operación fiable, y el relleno de un gran número de columnas casi idénticas puede ser agobiante.

Combinación de las secciones α , β y γ :

La configuración más obvia para la operación casi continua o semicontinua ya ha sido mencionada más arriba, en el sentido de que las secciones α , β , y γ también pueden combinarse en una columna en la que, de manera escalonada en el tiempo, se saquen fracciones individuales que sean entonces iguales a la salida de las secciones α , β y γ según se dan en la Figura 5, y se suministran a la entrada de los elementos correspondientes de la Figura 5.

En la Figura 19 se da tal posible configuración, que plasma un diagrama de flujo como el dado en la Figura 5, pero con una única columna como sección β . En este caso, las secciones α , β , y γ se combinan en una columna. Una caja negra en la Figura 19 significa que hay una columna que cumple esta función, una sombreada significa que no hay ninguna columna que cumpla esa posición. El modelo presentado en la Figura 19 conmuta según el plan siguiente: (1a-1b-1c)-(2a-2b-2c)-(3a-3b-3c)-(1a-1b-1c)-(2a-2b-2c)-... etc.

Esta figura muestra que las funciones de las secciones individuales no tienen necesariamente que ser cumplidas de manera concomitante, es decir, sincrónicamente por las columnas individuales, sino que es muy posible cumplir las funciones individuales de forma escalonada, como puede verse en la Figura 19, en las etapas 1a) - 1c), en las que, de forma secuencial, la columna 1 cumple la función de la sección α (etapa 1a), y luego la función de la sección β (etapa 1b) y, por último, la función de la sección γ (etapa 1c). Todas estas etapas 1a) - 1c) se llevan a cabo dentro de un tiempo de conmutación. Después de este primer tiempo de conmutación, por lo tanto después de las etapas 1a-1c), se recicla la posición de las columnas 1-3, lo que lleva a la condición a contracorriente del sistema.

El concepto de combinar las secciones α , β y γ también puede aplicarse a otras configuraciones, como, por ejemplo, a la configuración de la columna 8 (véase, por ejemplo, la Figura 6), para que se redujese a solo 6 columnas.

Combinación de pares de secciones en columnas únicas:

Otra forma muy atractiva de usar un número menor de columnas es la combinación de secciones a pares, de modo que se produzca, por ejemplo, la combinación de la sección $\delta+\alpha$ y de la sección $\beta+\gamma$, o, de manera más precisa, en pares $\gamma + \beta$; $\alpha + \delta_g$; $\delta_r + \delta_i$; o, de forma equivalente, $\beta + \alpha$; $\delta_g + \delta_i$; $\delta_r + \gamma$.

En la Figura 20 a) se muestra la configuración de 6 columnas según la Figura 4 y las secciones plasmadas por cada una de las columnas únicas están indicadas en la figura. Específicamente, las columnas cumplen las siguientes tareas con referencia a la numeración:

1. sacar todas las impurezas pesadas C de la columna
2. sacar todo el producto intermedio B de esta columna, pero mantener las impurezas pesadas en esta columna
3. asegurarse de que no sale ninguna impureza pesada C de esta columna, sino únicamente el producto intermedio B

4. sacar todas las impurezas ligeras A de la columna, pero mantener el producto intermedio B en la columna
5. introducir el suministro F en la columna y sacar las primeras impurezas ligeras A de la columna
6. asegurarse de que ningún producto intermedio B abandona la columna y eliminar los trazadores de la columna.

En la Figura 20 b), la configuración de 6 columnas es dividida en 3 columnas conectadas entre sí y en 3 no conectadas, lo que es idéntico a la configuración de 6 columnas dibujada en la Figura 20 a). La vía con las 3 columnas conectadas entre sí se denomina "CCL" (vía a contracorriente) y la que tiene las columnas sin conexión se denomina "BL" (vía de lotes).

10 La topografía general de la configuración según la Figura 20 se da en la Figura 21.

El CCL consiste en las posiciones 2, 4, 6 ($\beta, \delta_g, \delta_r$) de columna y la vía de lotes consiste en las posiciones 1, 3, 5 (γ, α, δ_l) de columna. Es obvio que cuando el sistema de 6 columnas conmuta entre los dos estados CCL y BL, todas las columnas de la vía a CC se convierten en columnas de la "vía de lotes" y que todas las columnas de la vía de lotes se convierten en columnas de la vía a CC. El tiempo local de conmutación de ambas vías es igual al tiempo global t^* de conmutación. Eso hace que el procedimiento global sea continuo. Las columnas de lotes y las columnas a contracorriente son operadas en la misma planta a la vez.

20 Para mostrar los efectos de tal reducción, se expondrá un ejemplo: En la Figura 22, la parte superior a) muestra el procedimiento en 6 columnas con un tiempo de conmutación de 3 minutos. En este ejemplo, el caudal máximo en una sola columna se supone que es de 2 ml/min. Por ello, la columna 6 está limitando el caudal y la productividad.

Como ya se ha mencionado, ambos tiempos de conmutación deben ser iguales para tener un procedimiento continuo "a tiempo completo". Dado que no hay corriente líquida entre las dos vías BL y CCL, las vías son independientes entre sí.

25 En consecuencia, resulta atractivo usar únicamente 3 columnas en vez de 6 columnas para todo el procedimiento y empezar con la vía de lotes, pero parar todos los caudales en la vía de lotes cuando las 3 columnas se conmutan a la vía a CC. Lo mismo es válido para la vía a CC. Cuando las 3 columnas vuelven a conmutarse a la vía de lotes, los caudales de la vía a CC se fijan a cero.

30 Así, cada columna adopta la función de dos secciones, y estas funciones se cumplen de forma escalonada en el tiempo en vez de que las funciones se cumplan de forma sincrónica. Los procedimientos locales siguen siendo continuos, pero detienen su operación mientras la otra vía está activa. Por ello, el procedimiento en su conjunto ya no es completamente continuo, sino casi continuo.

En el caso superior, se supone que la productividad es del 100%.

35 Tal como se muestra en la Figura 22 b), los tiempos de conmutación de la vía de lotes pueden ahora disminuir hasta, por ejemplo, 1 minuto, lo que lleva a un tiempo de conmutación total de 4 minutos. Entonces el caudal máximo de la vía de lotes sería de 1,8 ml/min ($< 2 \text{ ml/min} = Q_{\text{máx}}$), que es cercano al caudal máximo del sistema.

40 Ahora bien, se tienen dos procedimientos independientes de conmutación de columnas múltiples con diferentes tiempos de conmutación que son operados de forma alternante. El tiempo de conmutación de la vía a CC es de 3 minutos, y el tiempo de conmutación para la vía de lotes es de 1 min.

El tiempo global de conmutación aumenta hasta

$$t^* = t_{\text{lote}}^* + t_{\text{C.C.}}^*$$

pero el número de columnas disminuye de 6 a 3. Por ello, en este ejemplo, la productividad del procedimiento aumenta incluso en un 50%, dado que la productividad está dada por

$$P = 100\% \cdot 3 / (3 + 1) \cdot 6 / 3 = 150\%.$$

45 En la Figura 23 se indica esquemáticamente el plan de conmutación de una configuración según la Figura 22.

En la Figura 24 a) se muestra una configuración general de la operación casi continua o semicontinua, y puede verse que la configuración está tremendamente simplificada, de modo que hacen falta menos bombas y menos conexiones. Tal como se representa en la Figura 24 b), entre cada columna, una válvula cambia entre las dos vías para los dos diferentes estados.

Las posiciones de las columnas de la configuración explicadas más arriba se muestra de forma diagramática en el modelo dado en la Figura 25. Una caja negra indica que hay una columna que cumple la función dada arriba, una sombreada indica que no hay ninguna columna que cumpla esa función. Las seis posiciones diferentes de las columnas se operan en la secuencia 1a-1b-2a-2b-3a-3b-1a-1b-2a-2b-...

5

Si se requieren secciones internas β y δ a contracorriente, la configuración según se presenta en la Figura 21, pero con dos o más columnas en la sección β puede ser transferida al modo semicontinuo. La correspondiente configuración semicontinua consistente en 4 columnas se muestra en la Figura 26, en la que, durante las posiciones "β", el caudal en la primera columna de la sección β se pone a cero.

10

En principio, tal duplicación de columnas es posible para cada una de las secciones, y también para varias secciones.

Configuración de dos columnas:

Es incluso posible reducir el procedimiento semicontinuo de 3 columnas a solo 2 columnas dentro de lo fundamental de la presente invención, pero entonces el reciclado de las fracciones ligera y pesada C y A no puede cumplirse a la vez, sino que tiene que escalonarse también.

15

El principio es similar al de 3 columnas (véase más arriba), ya que en tres etapas (etapas 2-4 en la Figura 28) solo una de las tres funciones α , β , y es cumplida por una columna, de forma similar al caso representado en la Figura 19. Pero, además, en esta configuración en una etapa adicional (etapa 1 en la Figura 28), ninguna de las funciones α , β , y es cumplida por una columna, sino únicamente funciones de δ (etapa 1 en la Figura 28, funciones δ_g y δ_r).

20

La configuración de dos columnas se muestra esquemáticamente en la Figura 27. Es preciso que el procedimiento sea diseñado de tal manera que ninguna porción de B abandone la columna en la posición δ_g antes de que la columna de la posición γ haya sido conmutada a la posición δ_r . Si no, se perdería producto B valioso en la salida de la fracción ligera A.

25

Por ello, tal como se indica en la Figura 27, en una primera etapa en la parte superior (designada con el número de referencia 3 debido a la representación más esquemática de la Figura 28) el objetivo es reciclar la fracción pesada C y la fracción intermedia B entre las posiciones β y δ_g y recoger la fracción ligera A (nótese que las líneas cerradas están indicadas con una válvula entre ellas). En la etapa subsiguiente 4 el objetivo es recoger la fracción pesada C y, a la vez, recoger también la fracción ligera A. Esta etapa subsiguiente 4 se inicia en el momento en que solo C está abandonando la columna 1.

30

En estas dos primeras etapas 3 y 4, la tercera posición no está ocupada por una columna (rectángulo rayado).

Después de esta etapa 4, la columna en la posición 1 conmuta a la posición 3 para poder decir que la columna corriente arriba, en la posición 1, y la columna corriente abajo, en la posición 2, intercambian sus lugares. En las dos etapas subsiguientes, la posición 1 no estará ocupada por una columna. Esto quiere decir que solo la posición 2 está siempre ocupada.

35

En la etapa 1 siguiente ahora, el objetivo es reciclar la fracción ligera A, y recoger los trazadores. Esta etapa se realiza hasta que el producto intermedio B puro empieza a salir de la columna en la posición 2.

Tan pronto como así ocurre, se inicia la etapa 2 siguiente; es decir, en esta etapa 2, el objetivo es recoger la fracción intermedia B de la columna 2 en modo de lotes, a la vez que cargar el suministro en la columna en la posición 3 y recoger la fracción muy ligera A. Esta etapa 2 prosigue hasta inmediatamente antes de que la fracción intermedia B comience a abandonar la columna en la posición 2 en una mezcla con parte de la fracción pesada C.

40

Después de esta etapa 2, las columnas se conmutan, de tal forma que la columna de la posición 2 se desplaza a la posición 1, y la columna de la posición 3 se desplaza a la posición 2. El procedimiento se repite en una secuencia 3-4-1-2-3-4-1-2-..., y tiene que hacerse notar que un ciclo completo incluye dos series del tipo dado en la Figura 27.

45

La Figura 28 muestra el mismo procedimiento con una representación más sistemática. La configuración de 2 columnas se da en la parte superior incluyendo un ciclo completo. En la parte inferior se indican las tareas correspondientes del cromatograma de gradiente para la purificación por gradiente a contracorriente. También se indica en la parte inferior el perfil de concentración del modificador 16. De hecho, la configuración de dos columnas funciona en particular para un procesamiento en gradiente. El procedimiento repite las posiciones: 1-2-3-4-1-2-..., mientras se alternan las dos columnas.

50

Configuración secuencial de unidades semicontinuas:

5 Como ya se ha expuesto en lo que antecede, también es posible combinar unidades de purificación según la invención dentro de una planta que incluye varios tipos de purificaciones. La disminución a solo 3 columnas por unidad de purificación tal como se expone más arriba ofrece modos de operación atractivos, como, por ejemplo, se indica a continuación.

Un procedimiento general de purificación cromatográfica puede contener varias etapas, como, por ejemplo:

- Intercambio catiónico (CEX)
- Intercambio aniónico (AEX)
- 10 • Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

En la Figura 29 se sugiere una configuración secuencial del procedimiento de purificación semicontinua en el que se combinan "CEX", "AEX" y "HIC" en una planta.

15 En la Figura 29 no se considera una etapa de limpieza in situ. Para permitir la CIP, el enfoque más barato sería contar con una posición adelantada en la que una columna puede ser "aparcada" para la limpieza in situ.

A menudo, la etapa "AEX" es una etapa cromatográfica negativa, en la que el producto no se adsorbe, pero los virus, por ejemplo, sí se adsorben. Tal separación de dos componentes (eliminar virus del producto) solo requiere 2 columnas, de modo que no se requeriría la posición 1 en la unidad 2.

20 Los mezcladores entre la unidad 1 y la unidad 2 y entre la unidad 2 y la unidad 3 tienen la tarea de igualar las concentraciones del producto a lo largo de un ciclo. En el caso de isoterms no lineales, este puede ser un detalle importante.

LISTA DE NÚMEROS DE REFERENCIA

- 1 disolvente para bucle abierto
- 2 desagüe
- 3 primer cortocircuito
- 4 segundo cortocircuito
- 5 primera sección "aislada"
- 6 segunda sección "aislada"
- 11 C pura
- 12 reciclado
- 13 fraccionamiento
- 14 reciclado
- 15 A pura
- 16 gradiente de modificador
- 21 sistema 1, IEX
- 22 sistema 2, fase HIC o fase invertida
- 23 producto purificado
- 24 sal o modificador orgánico
- a primera sección del procedimiento de purificación
- b segunda sección del procedimiento de purificación
- c tercera sección del procedimiento de purificación

d	cuarta sección del procedimiento de purificación
A, B, C, D	fracciones
A	fracción ligera
B	fracción intermedia, producto deseado
C	fracción pesada
s	disolvente
E1	extracto 1
E2	extracto 2
R	refinado
F	suministro
t	tiempo
t*	tiempo de conmutación
tr	trazadores
bf	antes de la conmutación
as	después de la conmutación
$C_{\text{mod},v}$	concentración variable de modificador
$C_{\text{mod},c}$	concentración constante de modificador por posición
C_{mod}	concentración de modificador

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación continua o casi continua de una mezcla (F) de múltiples componentes por medio de al menos dos columnas cromatográficas individuales a través de las cuales se suministra una mezcla por medio de al menos un disolvente (s), en el que la mezcla (F) de múltiples componentes comprende al menos impurezas ligeras (A), un producto intermedio (B) que ha de ser purificado e impurezas pesadas (C),
- 5 en el que las columnas son operadas
- en al menos una posición de un modo por lotes, en el cual la salida de una columna se usa para recoger el producto intermedio (B), así como
- 10 en al menos una posición de un modo continuo o casi continuo, en el cual, en este modo, la salida de al menos una columna está conectada en comunicación de fluidos con la entrada de al menos otra columna,
- en el que dicho modo por lotes y dicho modo continuo o casi continuo se llevan a cabo o bien de manera sincrónica o secuencialmente,
- 15 en el que, después de un tiempo (t^*) de conmutación, o dentro del mismo, las columnas se desplazan en sus posiciones en una dirección contraria a la dirección general del flujo del disolvente, en el que las columnas se agrupan en al menos cuatro secciones (α , β , γ , δ) que consisten en una o varias columnas cromatográficas, y en las que
- 20 una primera sección (α) está dotada de al menos una entrada del disolvente (s) y al menos una salida para el producto intermedio (B) purificado, de modo que saca por lavado el producto intermedio (B) del sistema, pero mantiene las impurezas pesadas (C) dentro de la sección (α),
- una segunda sección (β) está dotada de al menos una entrada del disolvente (s) y al menos una salida conectada a una entrada de una cuarta sección (δ), de modo que lava el producto intermedio (B), que está contaminado con impurezas pesadas (C) y lo introduce en la cuarta sección (δ) a través de dicha salida, pero mantiene las impurezas pesadas (C) puras dentro de la segunda
- 25 sección (β),
- una tercera sección (γ) está dotada de al menos una entrada del disolvente (s) y una salida para impurezas pesadas (C), de modo que saca por lavado las impurezas pesadas (C) a través de dicha salida y limpia la o las columnas cromatográficas,
- 30 la cuarta sección (δ) está dotada de al menos una entrada para recibir la producción de la salida de la segunda sección (β), así como al menos una entrada para suministrar la mezcla (F) de múltiples componentes, y al menos una salida para las impurezas ligeras (A), de modo que saca por lavado las impurezas ligeras (A) del sistema, pero mantiene el producto intermedio (B) dentro de la sección (δ), en el que las funciones de las secciones se llevan a cabo o bien de manera sincrónica o
- 35 secuencialmente, y
- en el que después de un tiempo (t^*) de conmutación, o dentro del mismo,
- 40 la última columna de la primera sección (α) se desplaza a la primera posición de la segunda sección (β), la última columna de la segunda sección (β) se desplaza a la primera posición de la tercera sección (γ), la última columna de la tercera sección (γ) se desplaza a la primera posición de la cuarta sección (δ) y la última columna de la cuarta sección (δ) se desplaza para convertirse en la primera columna de la primera sección (α),
- en el que si los agrupamientos de las secciones (α ; β ; γ ; δ / δ_g , δ_f , δ_r) se realizan por columnas únicas, las funciones de las secciones individuales (α ; β ; γ ; δ / δ_g , δ_f , δ_r) se cumplen secuencialmente con etapas alternantes de elución continua o casi continua y con etapas con elución en lotes dentro
- 45 de un tiempo (t^*) de conmutación.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que para la purificación continua o casi continua de la mezcla (F) de múltiples componentes se usan al menos tres columnas cromatográficas individuales a través de las cuales se suministra la mezcla por medio de al menos un disolvente (s).
3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2 en el que el disolvente (s) suministrado a al menos una de las secciones (α , β , γ , δ) varía en composición de forma sustancialmente continua durante el tiempo (t^*) de conmutación y/o, en caso de un disolvente supercrítico, el disolvente (s) supercrítico suministrado a al menos una de las secciones (α , β , γ , δ) varía en densidad de forma sustancialmente continua durante el tiempo (t^*) de conmutación.
- 50

4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes en el que el disolvente (s) suministrado a todas las secciones (α , β , γ , δ) varía en composición de forma sustancialmente continua al aumentar o disminuir la concentración modificadora durante el tiempo (t^*) de conmutación y/o, en caso de un disolvente supercrítico, varía en densidad al aumentar o disminuir la densidad durante el tiempo (t^*) de conmutación, y en el que junto con la secuencia de las columnas desde la cuarta (δ) a la primera (α) sección, la concentración de modificador (C_{mod})/densidad aumenta o disminuye de tal manera que, después de un desplazamiento de las columnas, la concentración de modificador (C_{mod})/densidad en cada columna está sustancialmente en la concentración base de modificador/densidad del disolvente supercrítico en la nueva posición de la columna y de tal manera que, durante el siguiente tiempo (t^*) de conmutación, la concentración de modificador/densidad dentro de cada columna aumenta o disminuye hasta la concentración base de modificador/densidad de la posición siguiente después de un desplazamiento adicional de las columnas.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que el disolvente (s) suministra a todas o a algunas secciones (α , β , γ , δ) varía de forma sustancialmente continua de manera lineal o casi lineal o no lineal durante el tiempo (t^*) de conmutación en composición y/o densidad, en el que, preferentemente, la concentración de modificador varía de tal manera.
6. Un procedimiento según las reivindicaciones 4 o 5 en el que en cada entrada de disolvente se proporciona disolvente con una concentración base constante individual ($C_{mod,c}$) de modificador, y en el que se proporciona una corriente de disolvente de caudal y/o composición cambiantes, preferentemente una concentración cambiante de modificador ($C_{mod,v}$), a varias entradas y se mezcla con el disolvente a una concentración base constante individual ($C_{mod,c}$) del modificador para establecer el gradiente junto con el sistema.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente en el que al menos una sección (α , β , γ , δ) comprende al menos dos columnas.
8. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente en el que la segunda sección (β) comprende al menos dos columnas conectadas de manera secuencial a contracorriente.
9. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente en el que la cuarta sección (δ) comprende al menos tres columnas agrupadas en tres subsecciones (δ_r , δ_g , δ_l), o menos columnas que proporcionan secuencialmente la función de estas subsecciones, en el que la primera subsección (δ_r) comprende al menos una entrada para suministrar la mezcla (F) de múltiples componentes, preferentemente con un caudal menor que el caudal global del sistema, y al menos una salida o bien para la eliminación directa de impurezas ligeras (A) del sistema o para su introducción en una entrada de la tercera subsección (δ_l), en el que
- 35 la segunda subsección (δ_g) comprende al menos una entrada para tomar la producción de la segunda sección (β) y al menos una salida conectada a al menos una entrada de la tercera subsección (δ_l), en el que
- 40 la tercera subsección (δ_l) comprende al menos una entrada para tomar la producción de la segunda subsección (δ_g) y posiblemente al menos una entrada para tomar la producción de la primera subsección (δ_r), y al menos una salida,
- 45 en el que, después de un tiempo (t^*) de conmutación, o dentro del mismo, una columna de la primera subsección (δ_r) se desplaza a la primera posición de la segunda subsección (δ_g), la última columna de la segunda subsección (δ_g) se desplaza a la primera posición de la primera sección (α), la última columna de la tercera sección (γ) se desplaza a la primera posición de la tercera subsección (δ_l) y la última columna de la tercera subsección (δ_l) se desplaza para convertirse en una columna de la primera subsección (δ_r),
- y en el que las funciones de las secciones (δ_r , δ_g , δ_l) se cumplen o bien de manera sincrónica o secuencialmente.
- 50 10. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente en el que el sistema comprende tres columnas, en el que las funciones de las secciones primera (α), segunda (β) y tercera (γ) son realizadas por una única columna, y en el que, dentro de un tiempo de conmutación, esta única columna
- 55 en primer lugar toma una función de la primera sección (α), porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida se usa para recoger el producto intermedio (B), mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección (δ) están conectadas en serie y mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección (δ), se recogen las impurezas ligeras (A),

de forma subsiguiente esta única columna toma la función de la segunda sección (β), porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida está directamente conectada a la primera columna de la cuarta sección (δ), mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección (δ) están conectadas en serie y mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección (δ), se recogen las impurezas ligeras (A), y

5

de forma subsiguiente esta única columna toma la función de la tercera sección (γ), porque está dotada de una entrada para disolvente y porque su salida se usa para recoger las impurezas pesadas (C), mientras que las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección (δ) están conectadas en serie, mientras que, por medio de la salida de la cuarta sección (δ), se recogen las impurezas ligeras (A) y mientras que, entre las columnas que proporcionan la función de la cuarta sección (δ), se suministra la mezcla (F) de múltiples componentes a la cuarta sección (δ).

10

11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que se combinan pares de funciones secuenciales de las secciones (α ; β ; γ ; δ / δ_g , δ_f , δ_r) dentro de una columna y en el que, dentro de un tiempo de conmutación, se alternan etapas de elución continua o casi continua y etapas con elución en lotes, que cumplen esas funciones de manera secuencial.

15

12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que la cuarta sección (δ) comprende tres subsecciones (δ_f , δ_g , δ_r) según la reivindicación 10, y en el que se proporcionan tres columnas en el sistema completo, estando conectadas secuencialmente estas tres columnas en una etapa (CCL) de elución continua o casi continua dentro de una primera fracción de un tiempo de conmutación, y estando accionadas en una etapa de lotes (BL) para sacar fracciones individuales (A, B, C) de la mezcla (F) de múltiples componentes dentro de una segunda fracción del tiempo de conmutación.

20

13. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que la cuarta sección (δ) comprende tres subsecciones (δ_f , δ_g , δ_r) según la reivindicación 10, y en el que se proporcionan cuatro columnas en el sistema completo, estando conectadas secuencialmente estas cuatro columnas en una etapa (CCL) de elución continua o casi continua dentro de una primera fracción de un tiempo de conmutación, y estando accionadas en una etapa de lotes (BL) para sacar fracciones individuales (A, B, C) de la mezcla (F) de múltiples componentes dentro de una segunda fracción del tiempo de conmutación, en el que en esta etapa de lotes (BL) una de las columnas tiene un caudal cercano o igual a cero.

25

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 en el que el sistema comprende dos columnas, en el que la cuarta sección (δ) comprende tres subsecciones (δ_f , δ_g , δ_r) según la reivindicación 10, en el que las dos columnas están

30

en una primera parte del tiempo de conmutación conectadas en serie para la elución continua mientras que, por medio de la salida, se recogen impurezas ligeras (A), en el que

35

en una segunda parte del tiempo de conmutación las columnas están accionadas en modo de lotes para recoger la fracción intermedia (B) en la columna corriente arriba e impurezas ligeras (A) en la columna corriente abajo mientras que, a la vez, se suministra la mezcla (F) de múltiples componentes a la columna corriente abajo, en el que

40

en una tercera parte del tiempo de conmutación las columnas están conectadas en serie para la elución continua mientras que, por medio de la salida, se recogen impurezas ligeras (A), y en el que

en una cuarta parte del tiempo de conmutación las columnas están accionadas en modo de lotes para recoger las impurezas pesadas (C) en la columna corriente arriba e impurezas ligeras (A) en la columna corriente abajo,

45

en el que, después de cada tiempo de conmutación, se intercambian las posiciones de las dos columnas.

15. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 14 en el que la primera subsección (δ_f) comprende al menos dos columnas paralelas, y/o en el que las subsecciones segunda (δ_g) y/o tercera (δ_r) comprenden al menos dos columnas paralelas o secuenciales a contracorriente.

50

16. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente en el que el suministro es continuo, a impulsos o con un perfil formado de concentración/densidad dentro de un tiempo (t^*) de conmutación y/o en el que los flujos de disolventes varían dentro de un tiempo (t^*) de conmutación y/o en el que la conmutación de las entradas/salidas individuales está escalonada dentro de un tiempo (t^*) de conmutación.

55

17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que es diferente el caudal en las columnas individuales.

- 5
- 10
- 15
- 20
18. Un procedimiento para establecer los parámetros para ejecutar un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que en una primera etapa se realiza un cromatograma de gradiente en lotes, en una segunda etapa el cromatograma obtenido es dividido en una primera parte con la fracción ligera, una segunda parte con la fracción deseada, una tercera parte con la fracción deseada solapada con la fracción pesada, y una cuarta parte únicamente con la fracción pesada, y en el que en una tercera etapa se escogen los parámetros del procedimiento, de tal modo que la primera sección (α) cumple la tarea del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la segunda parte, que la segunda sección (β) cumple la tarea del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la tercera parte, que la tercera sección (γ) cumple la tarea del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la cuarta parte, y que la cuarta sección (δ) cumple la tarea del cromatograma de gradiente en lotes en el tiempo de la primera parte.
 19. Un procedimiento según la reivindicación 18 en el que el tiempo (t^*) de conmutación se calcula como el tiempo hasta que la fracción deseada empieza a eluirse con la pureza deseada multiplicado por el caudal (Q_{lote}) del cromatograma de gradiente en lotes dividido por el caudal máximo ($Q_{\text{máx}}$) de la configuración y dividido por el número (N) de columnas de la cuarta sección (δ) que ejecutan esa parte del gradiente.
 20. Un procedimiento según las reivindicaciones 18 o 19 en el que el caudal en cada columna se determina en base al tiempo que lleva la parte correspondiente en el cromatograma de gradiente en lotes multiplicado por el caudal por lotes (Q_{lote}) dividido por el tiempo (t^*) de conmutación.

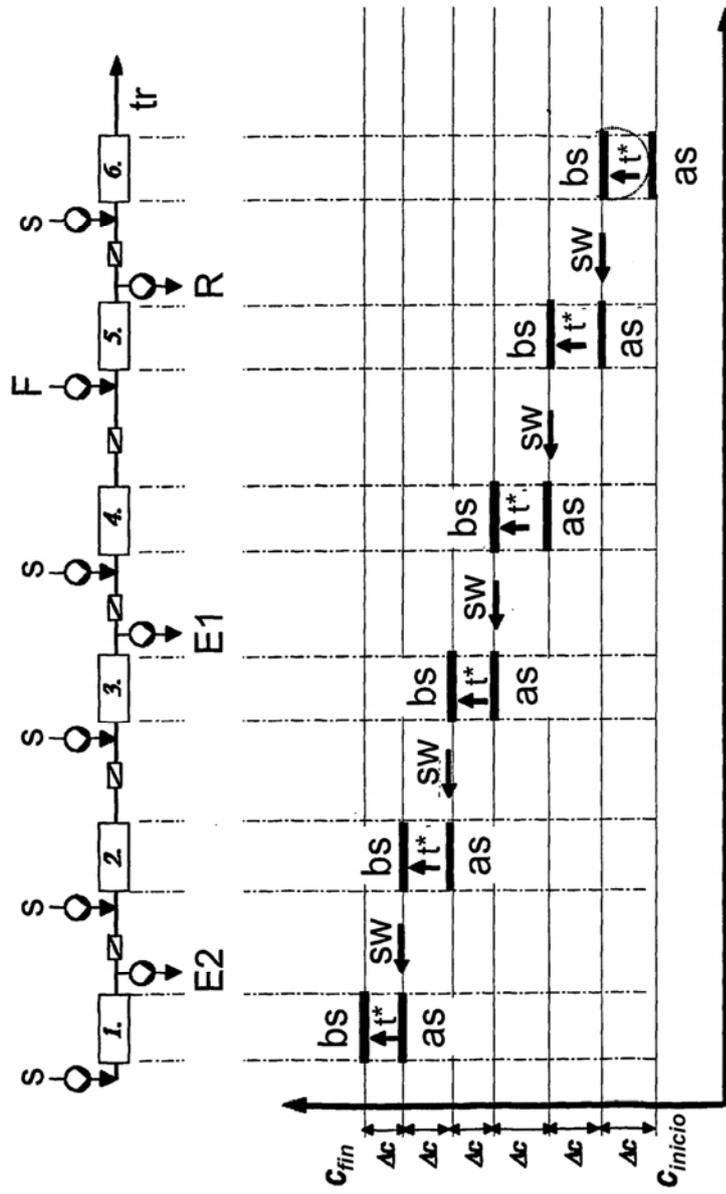


Fig. 1

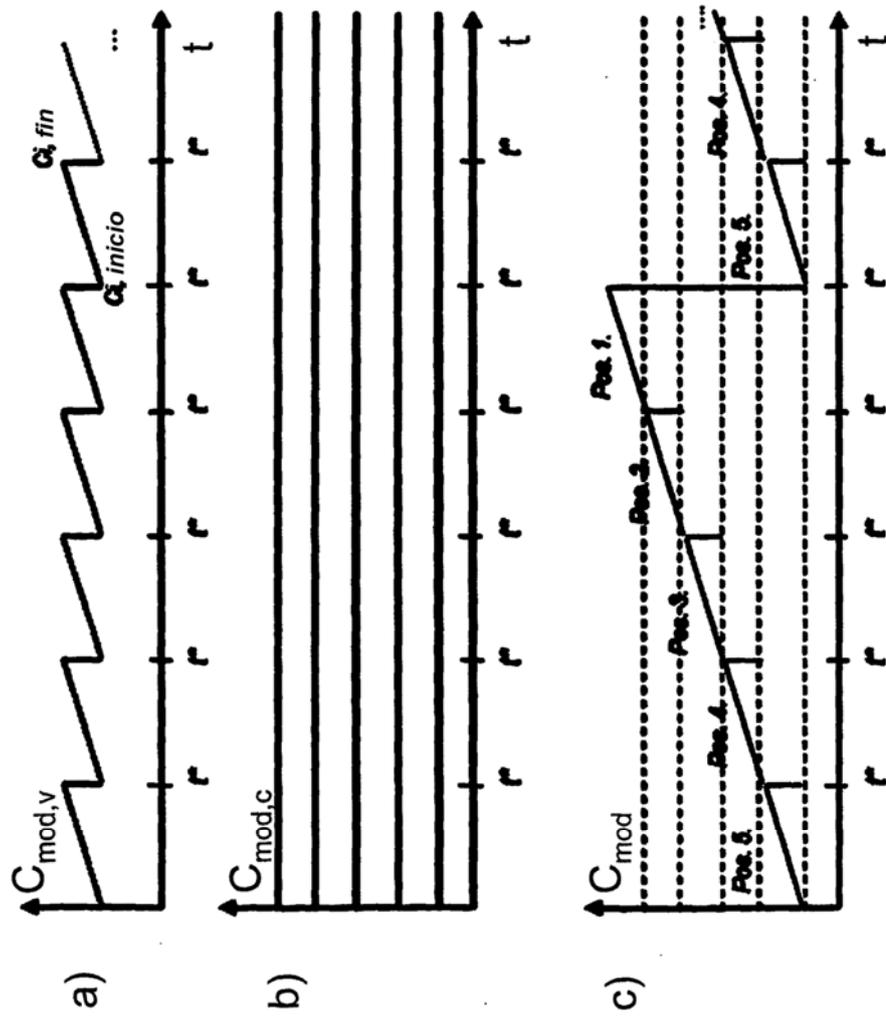


Fig. 2

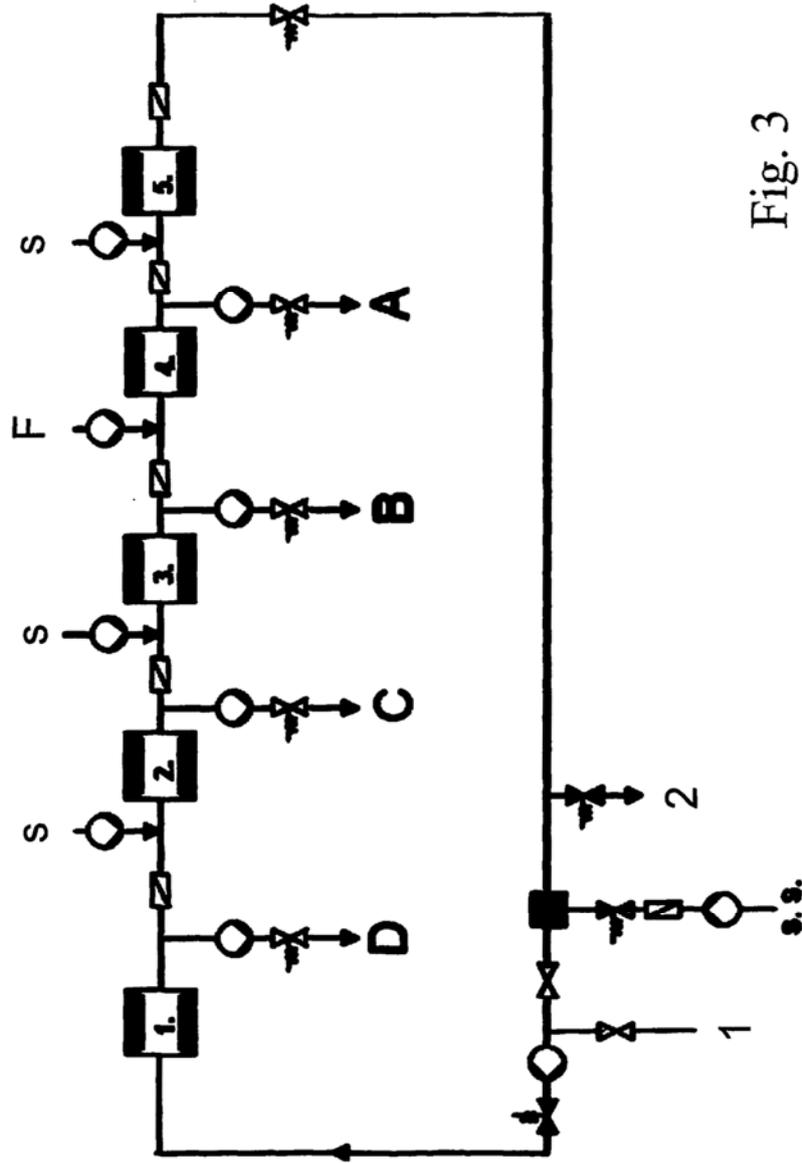


Fig. 3

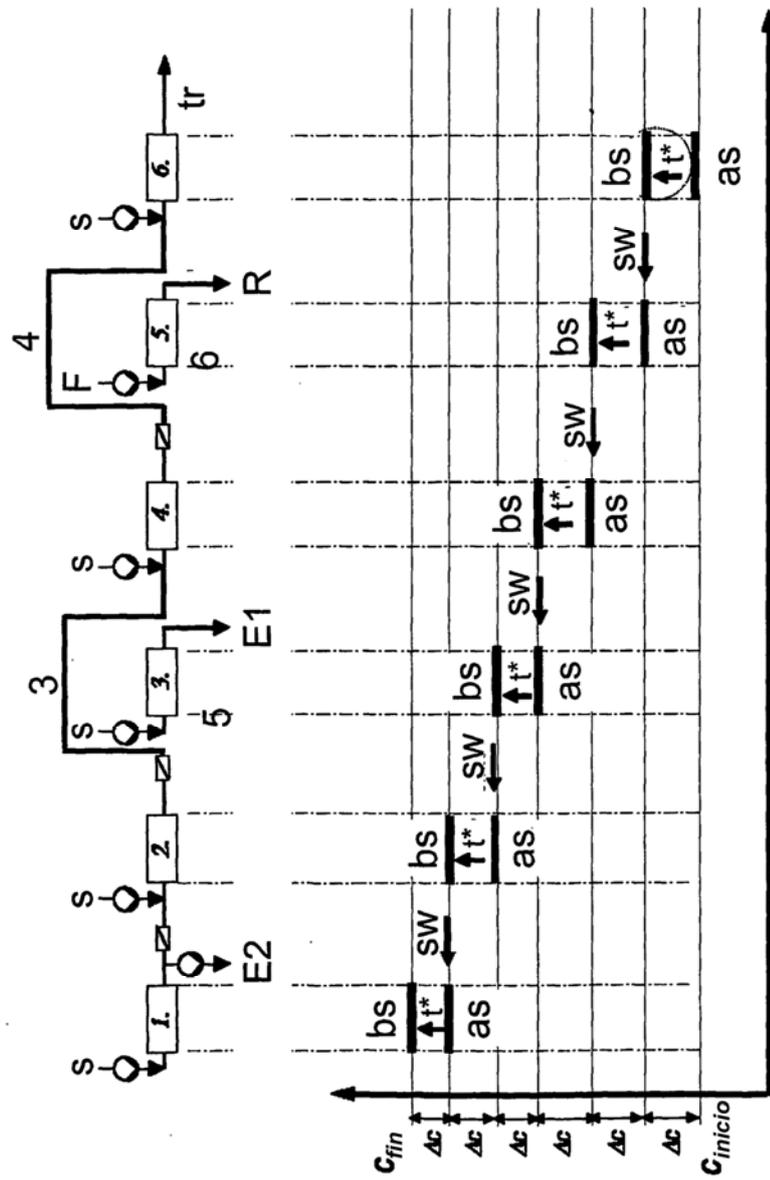


Fig. 4

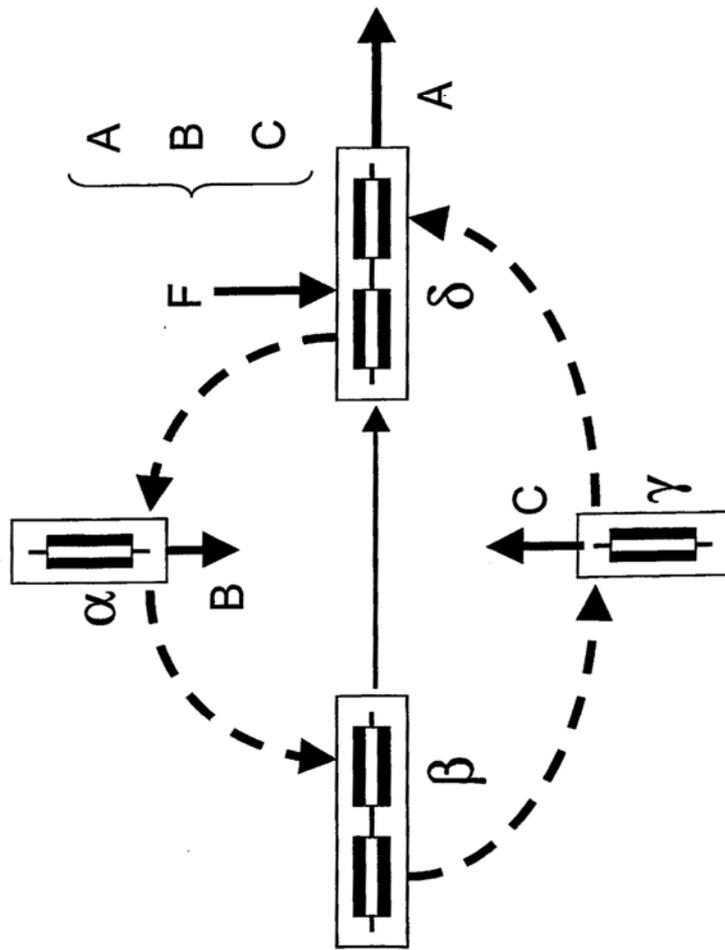


Fig. 5

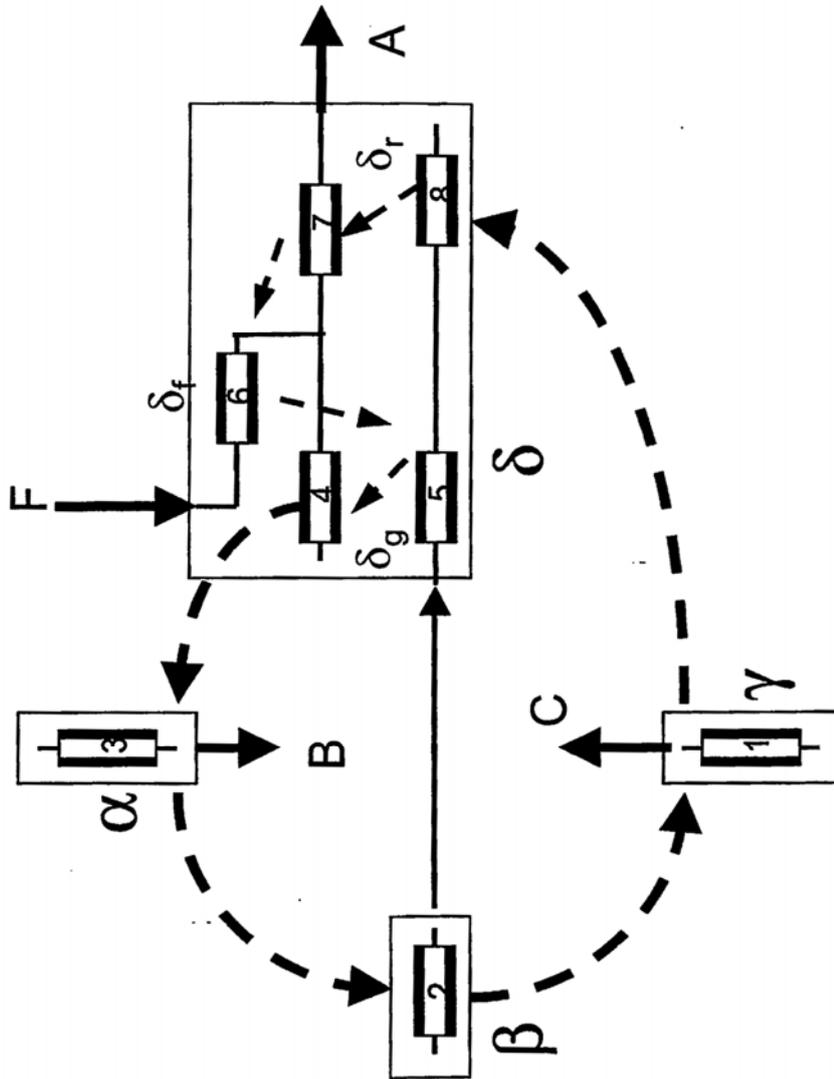


Fig. 6

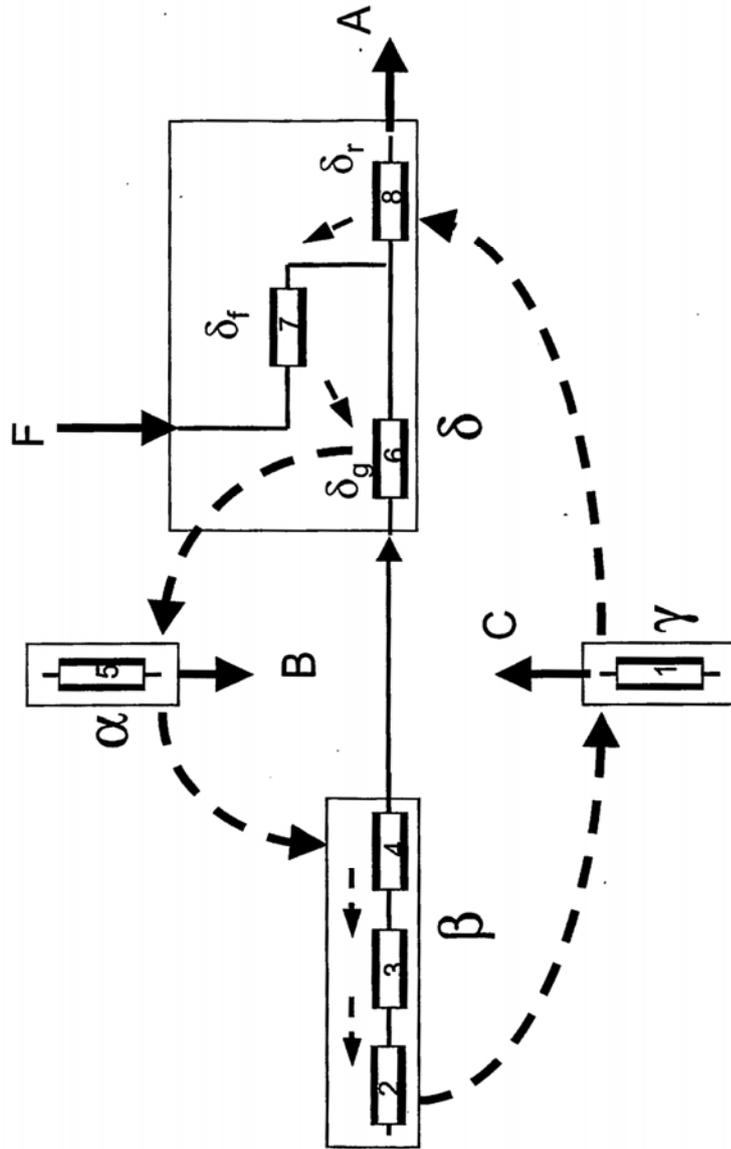


Fig. 7

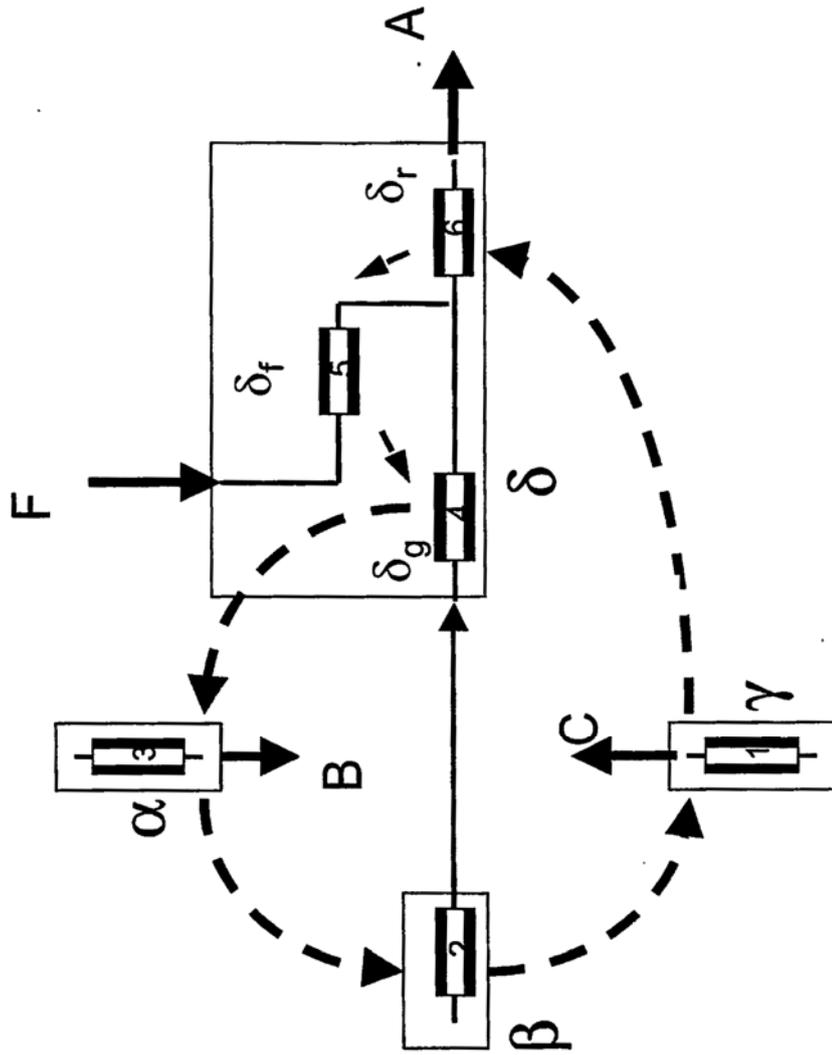


Fig. 8

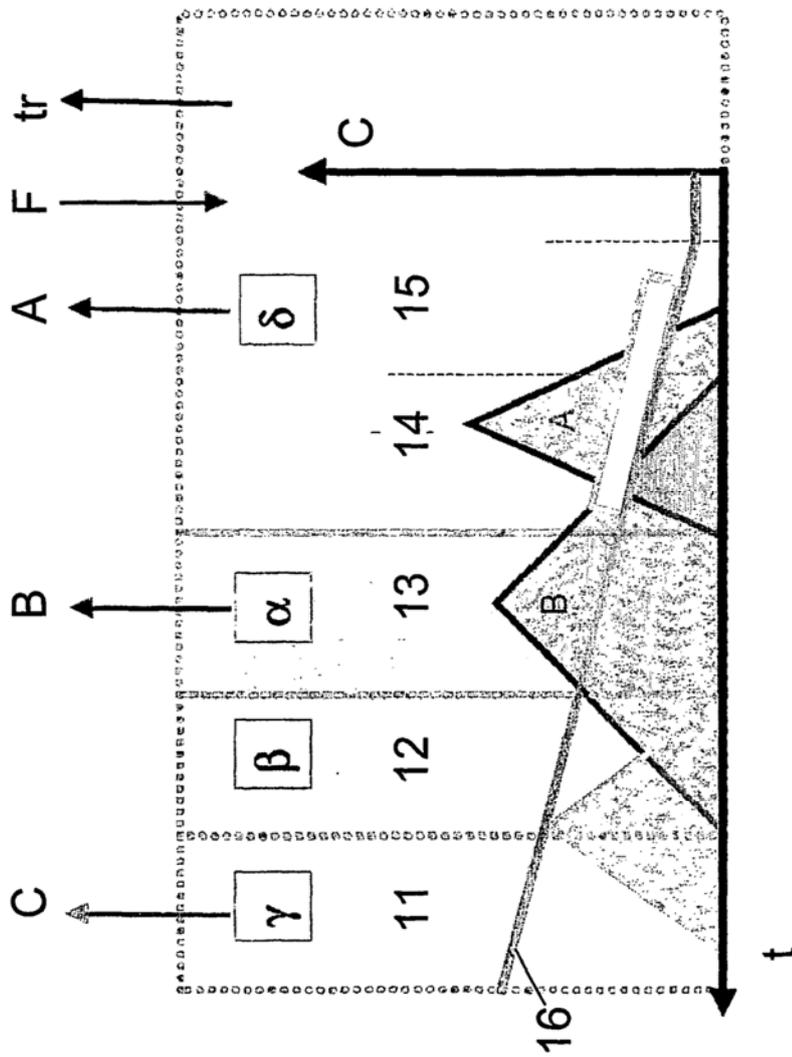


Fig. 9

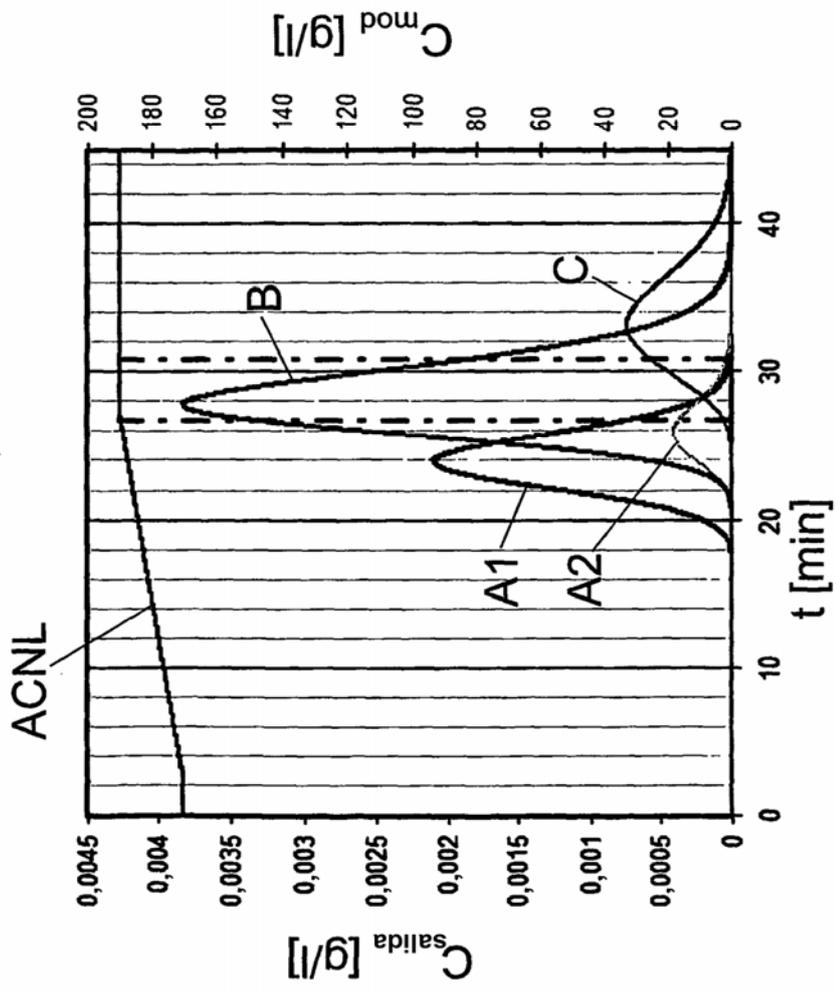
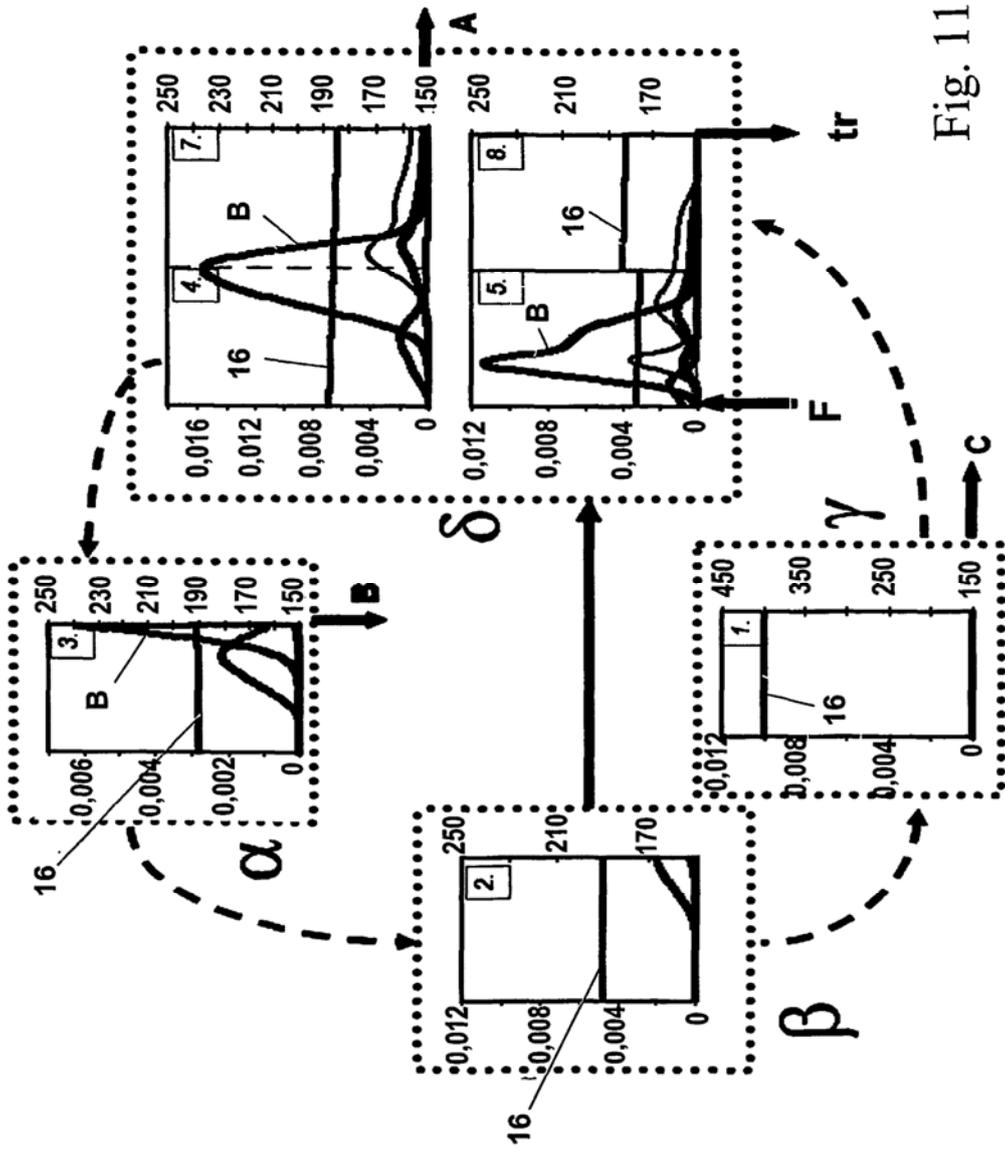


Fig. 10



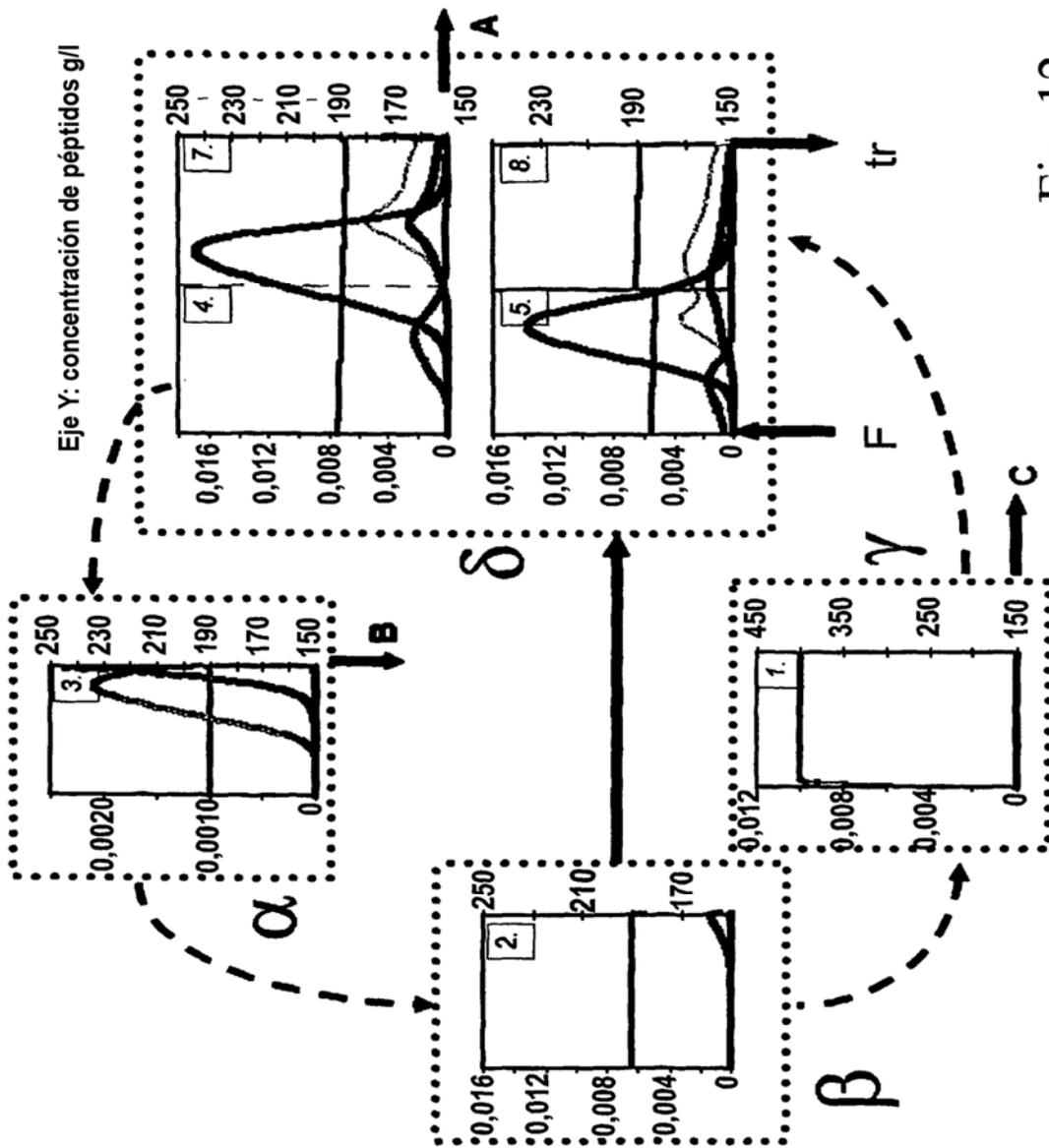


Fig. 12

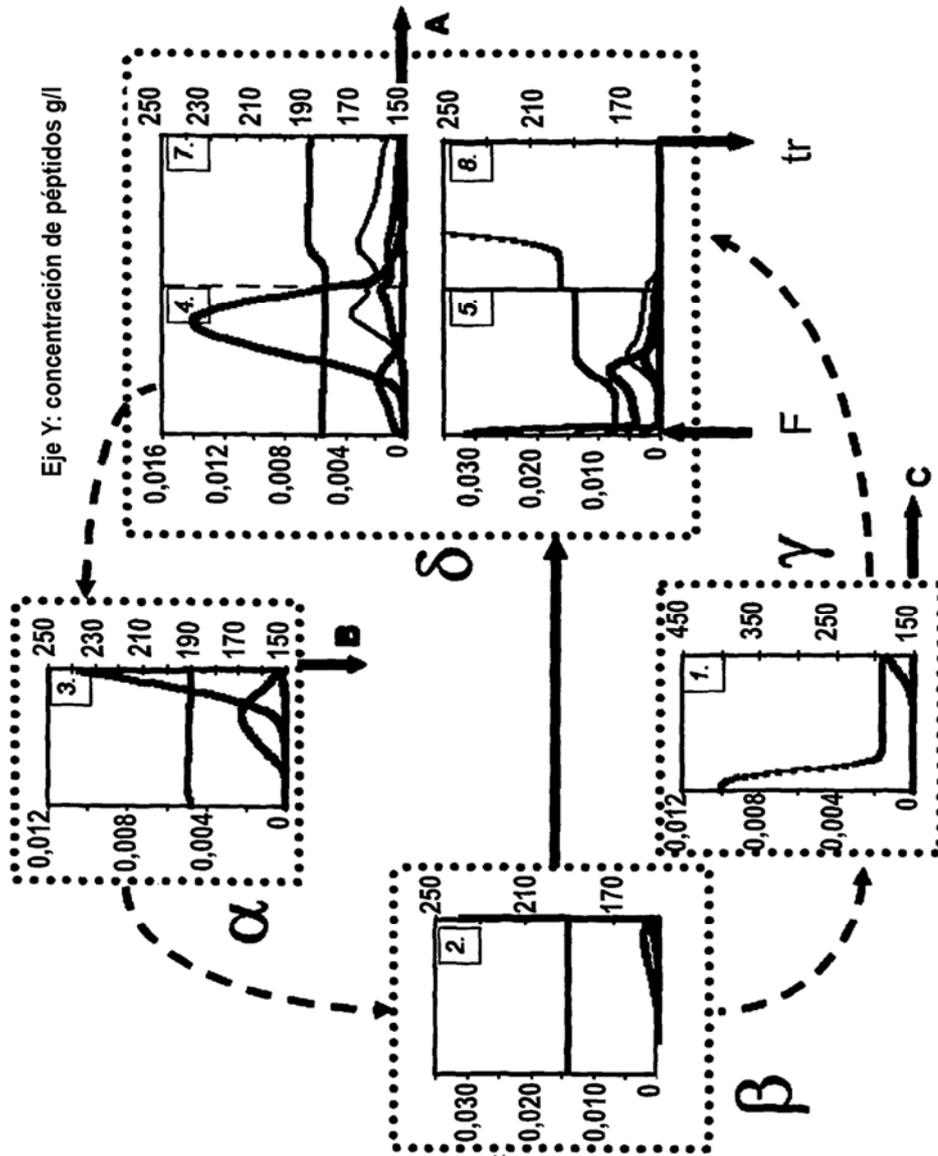


Fig. 13

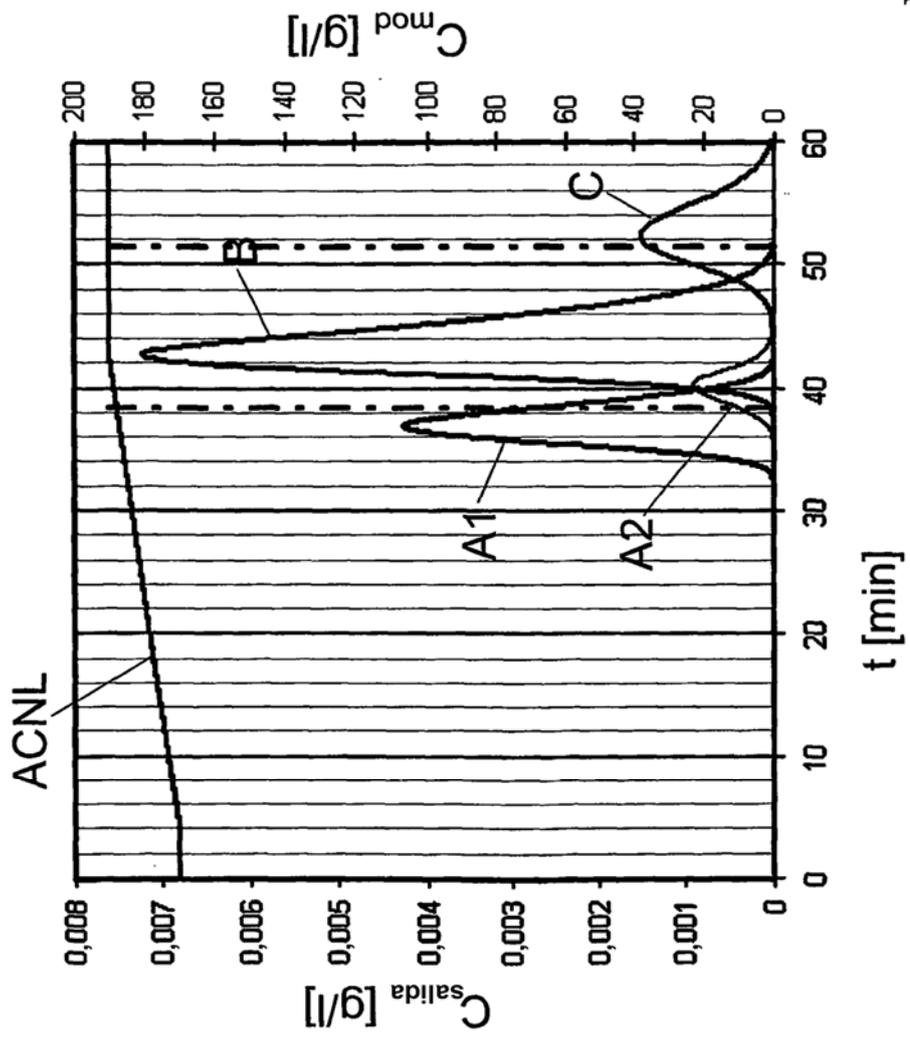


Fig. 14

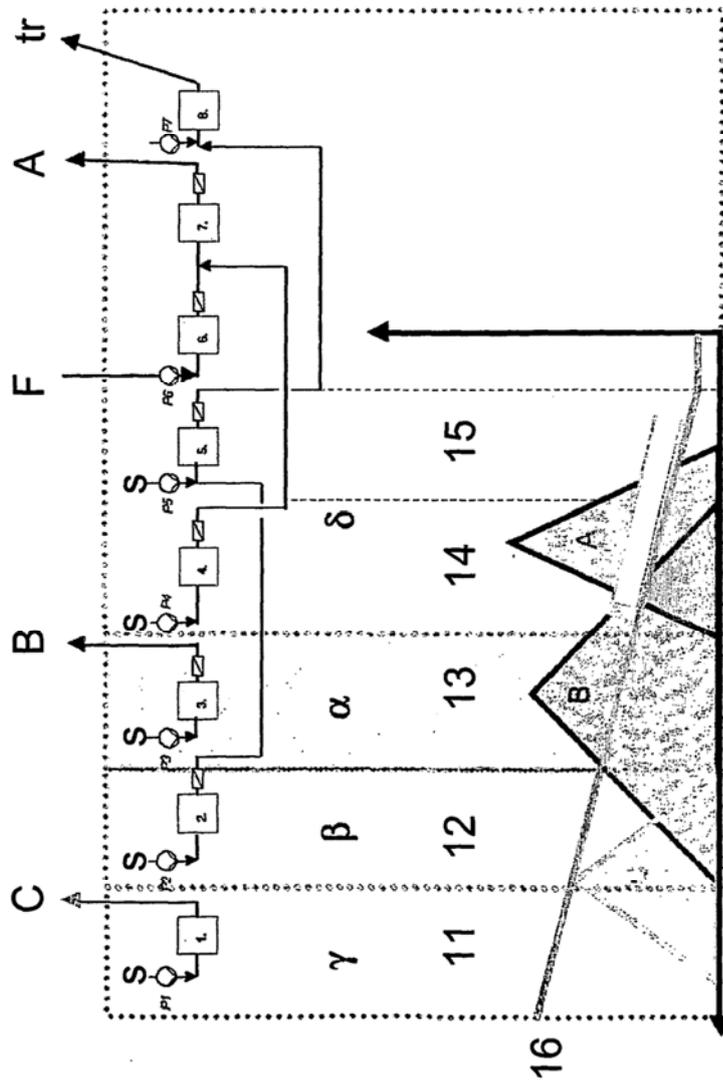


Fig. 15

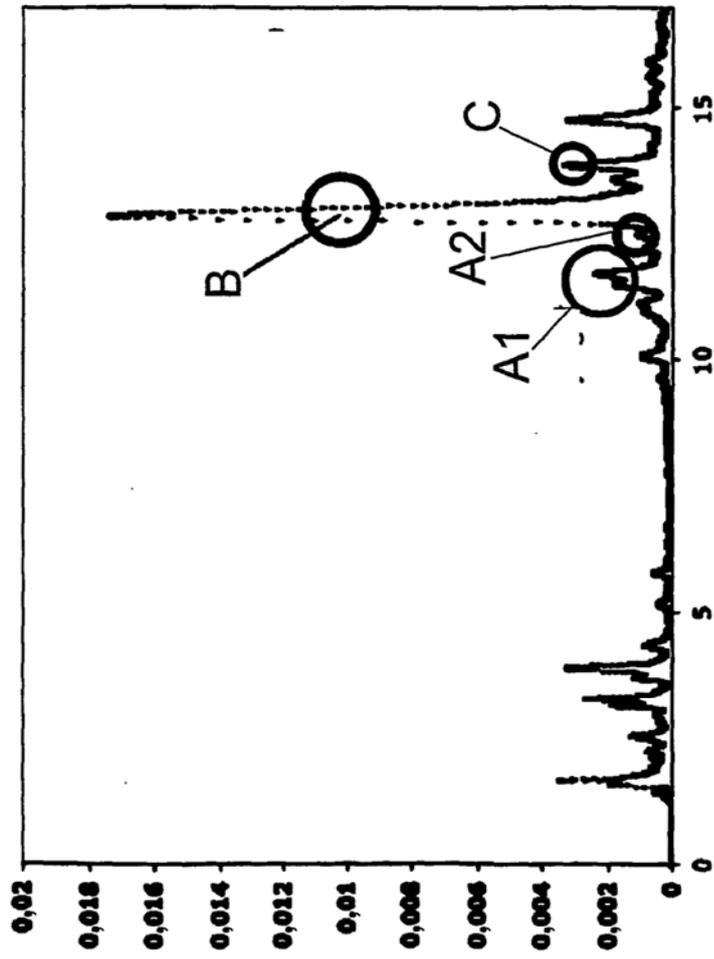


Fig. 16

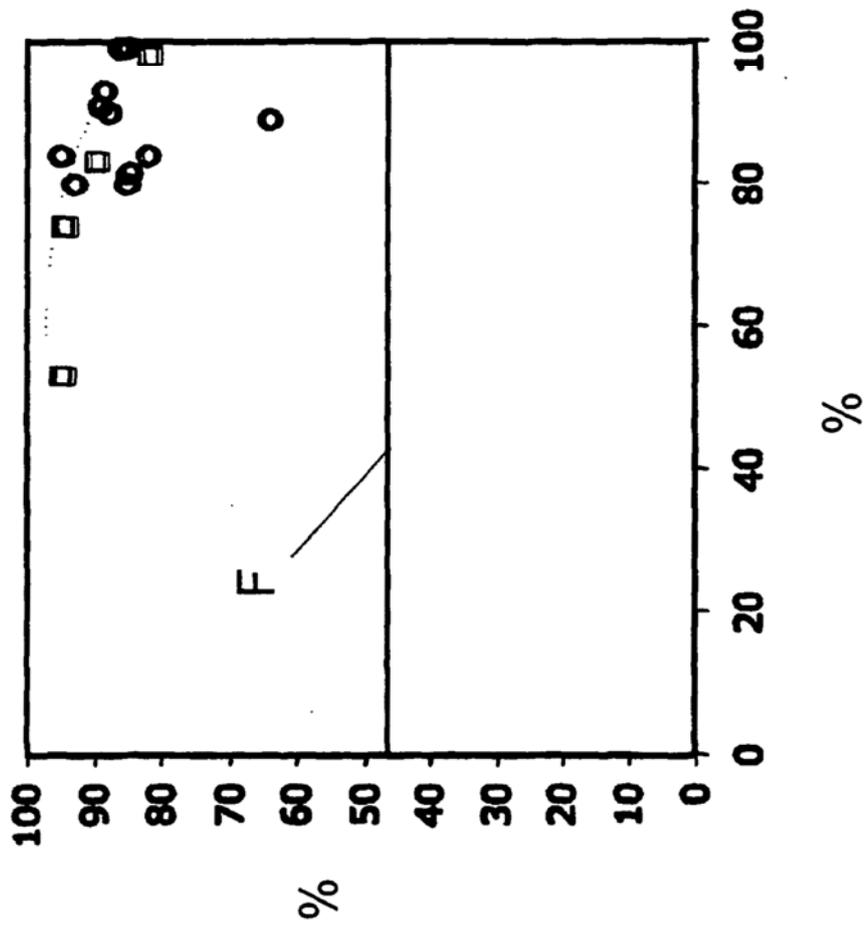


Fig. 17

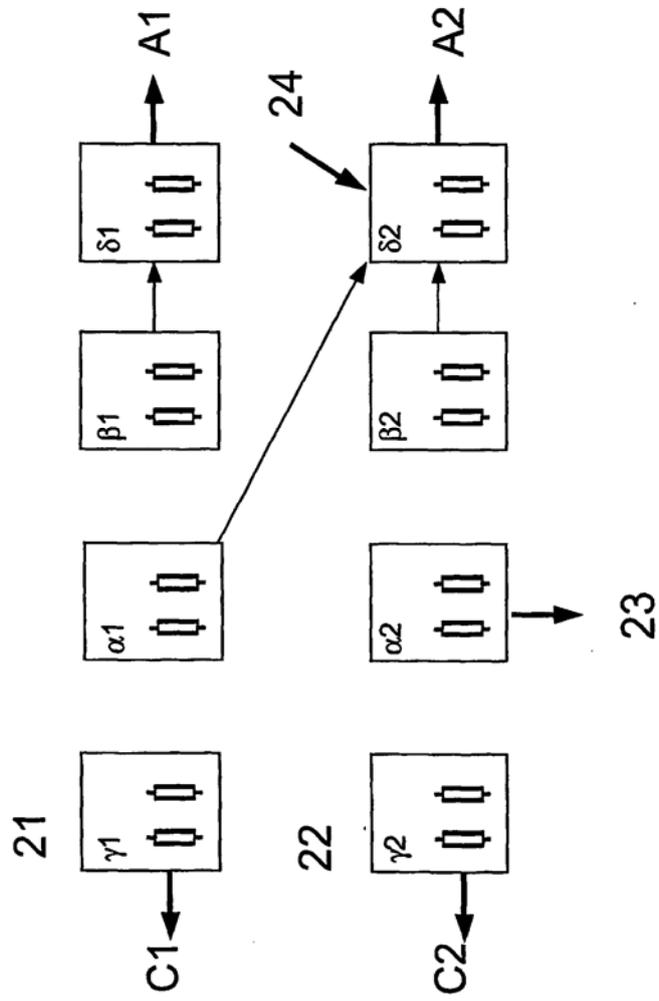


Fig. 18

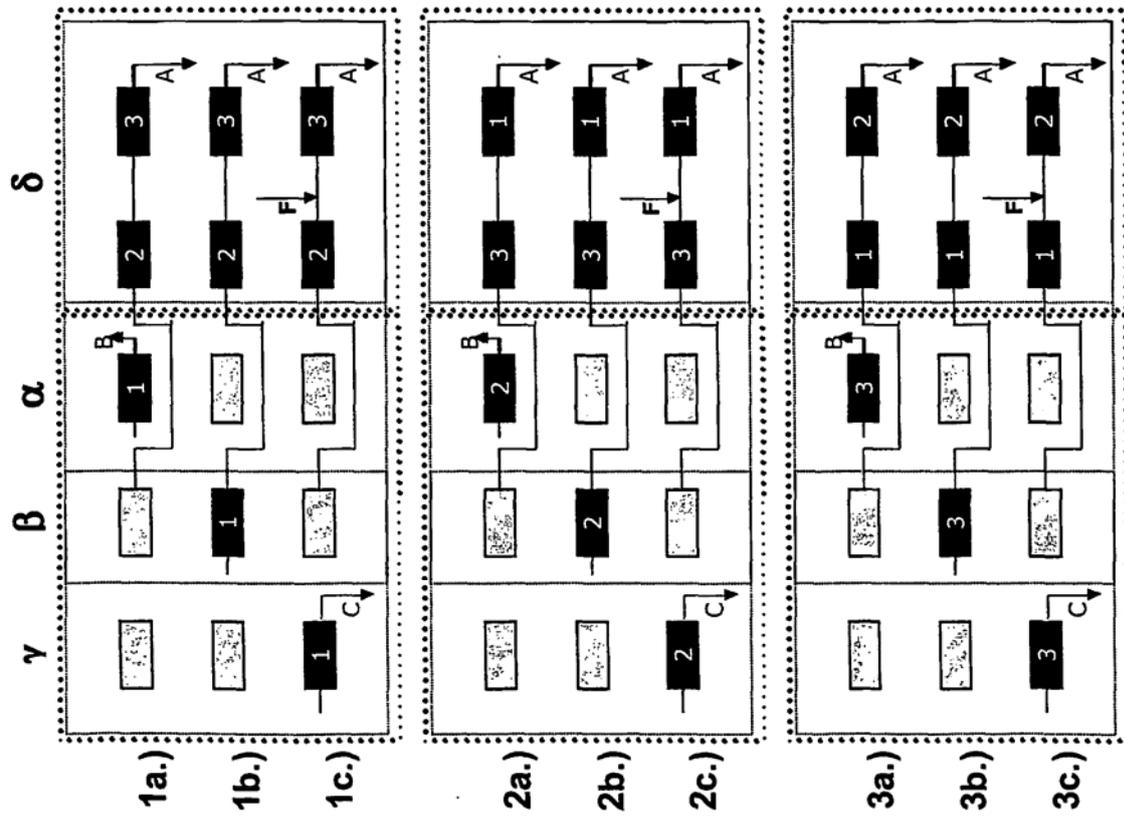
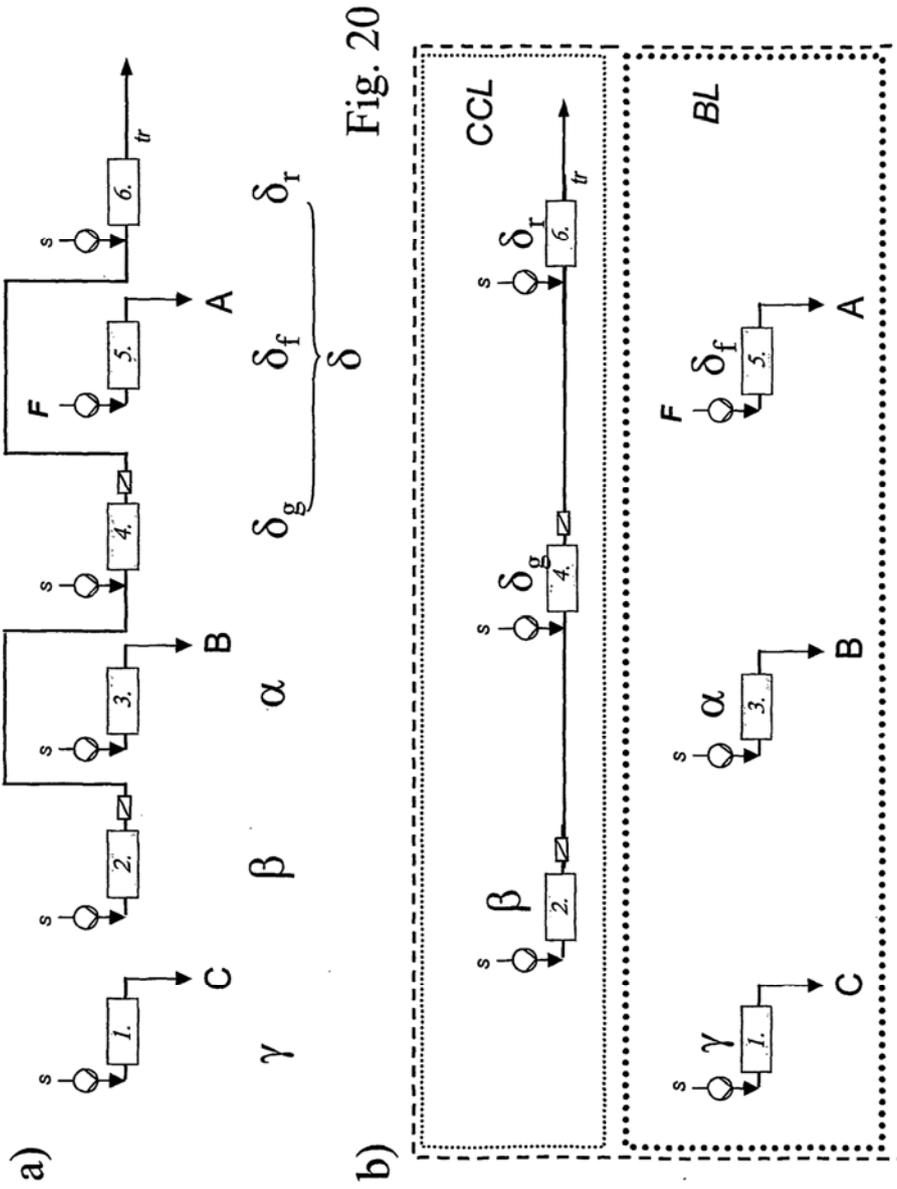


Fig. 19



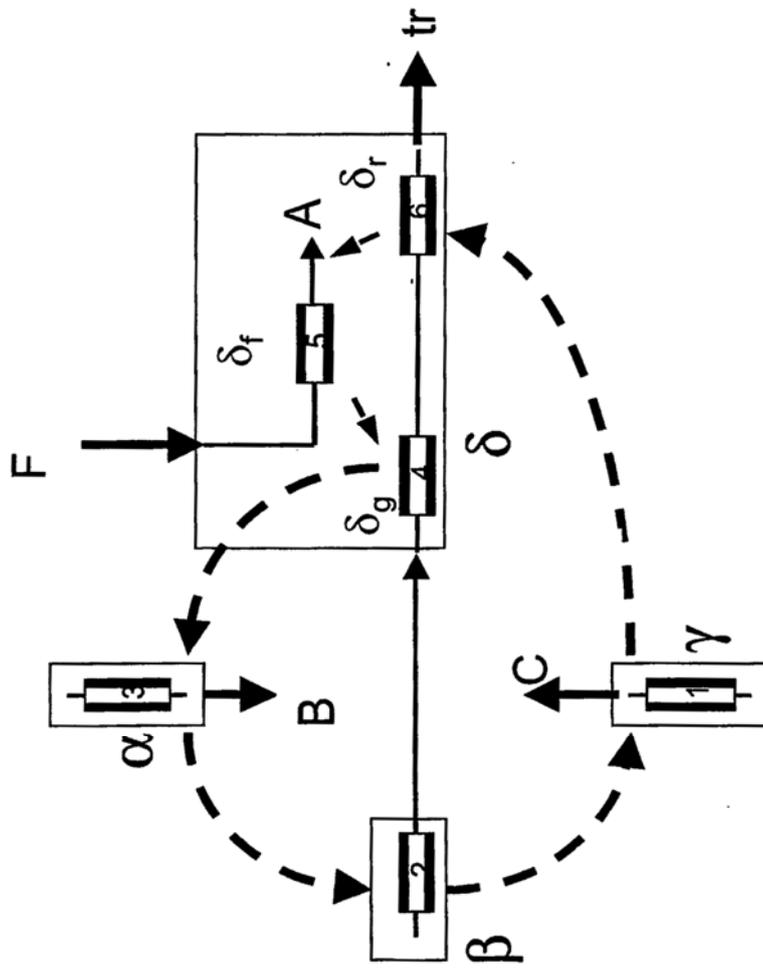


Fig. 21

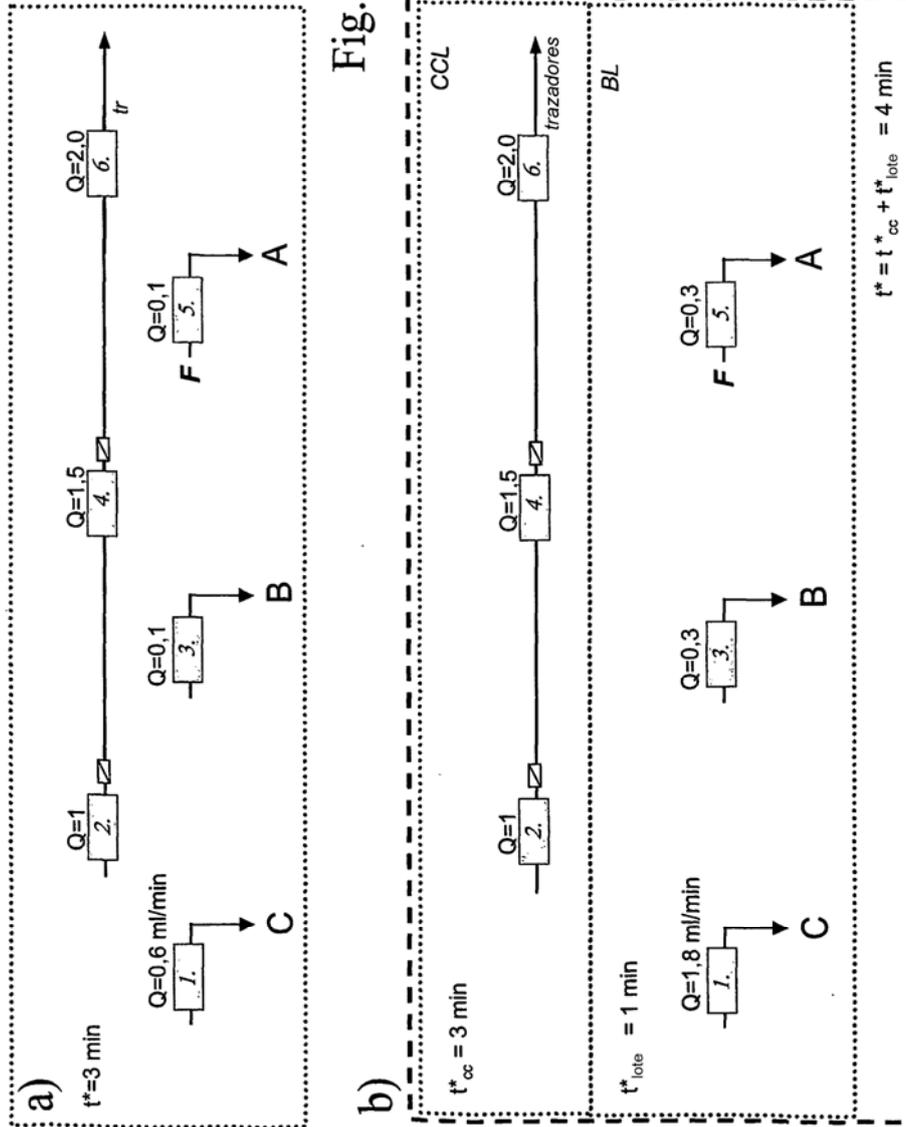


Fig. 22

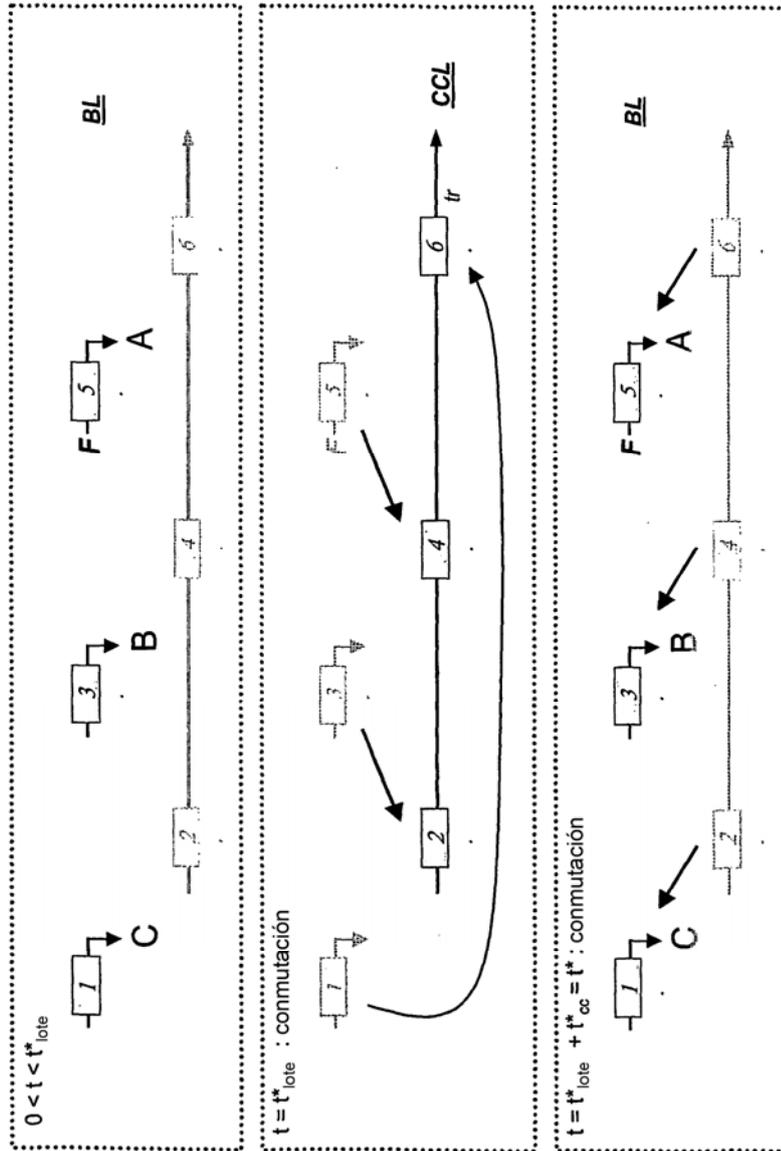


Fig. 23

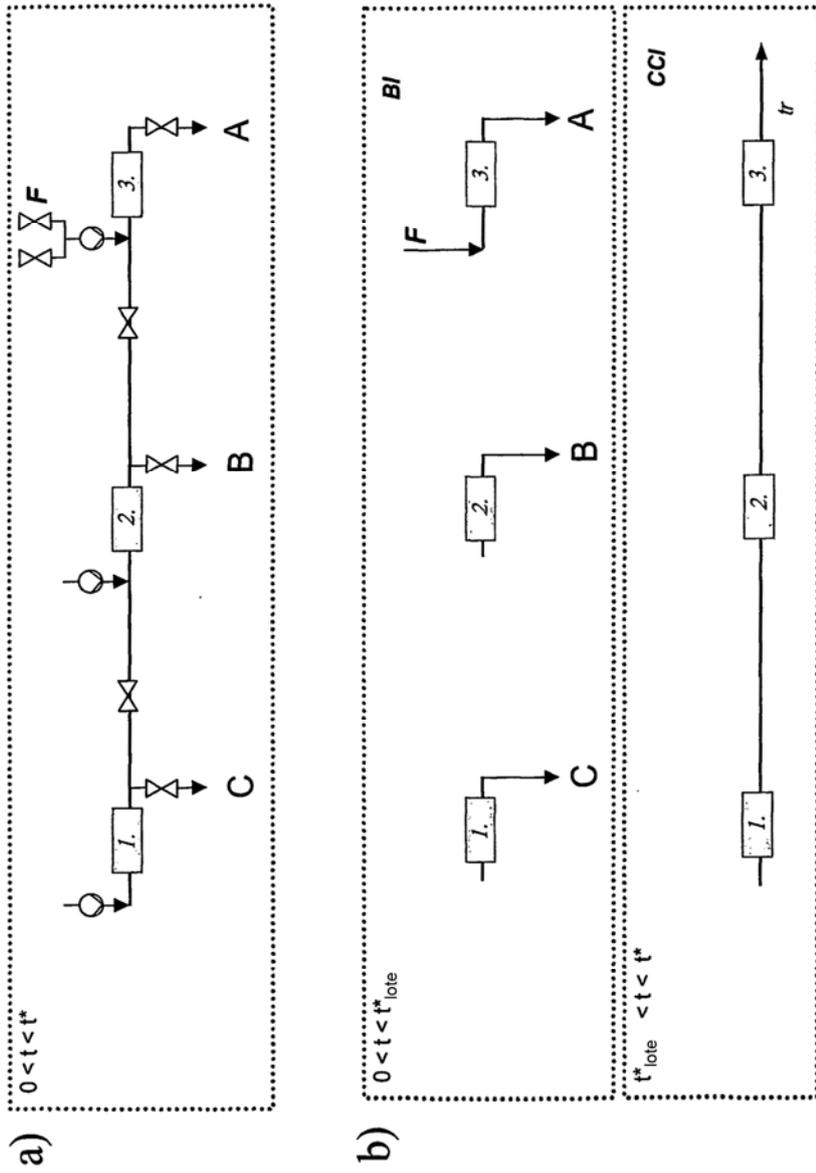


Fig. 24

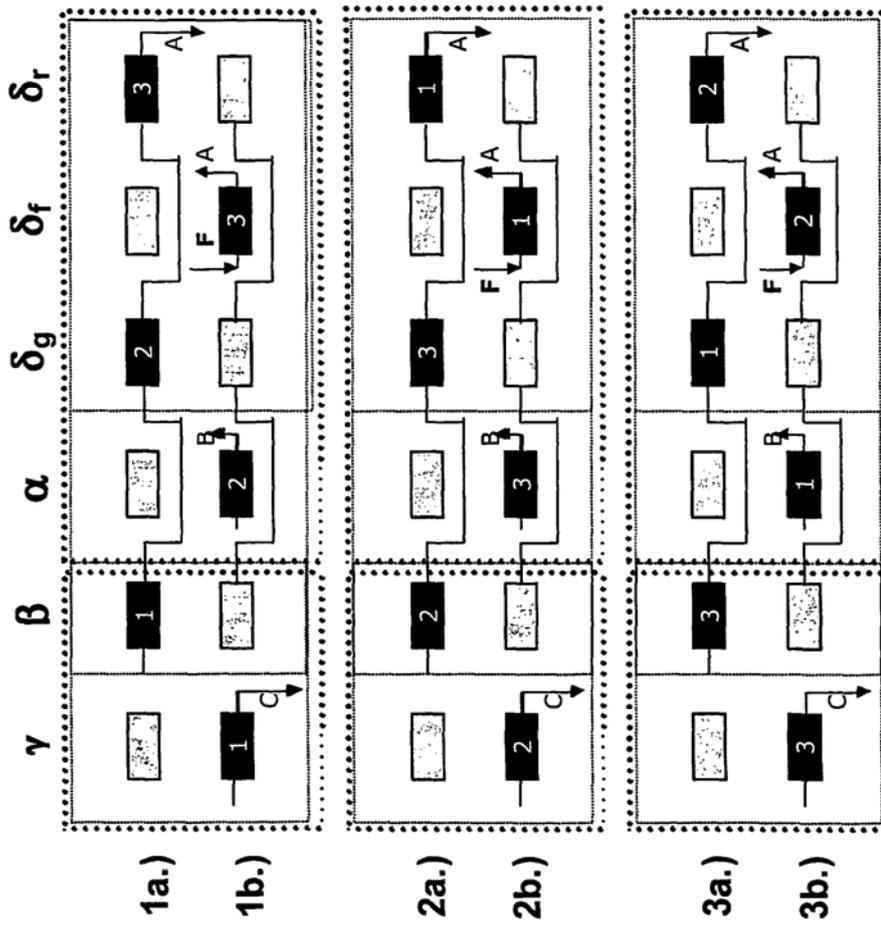


Fig. 25

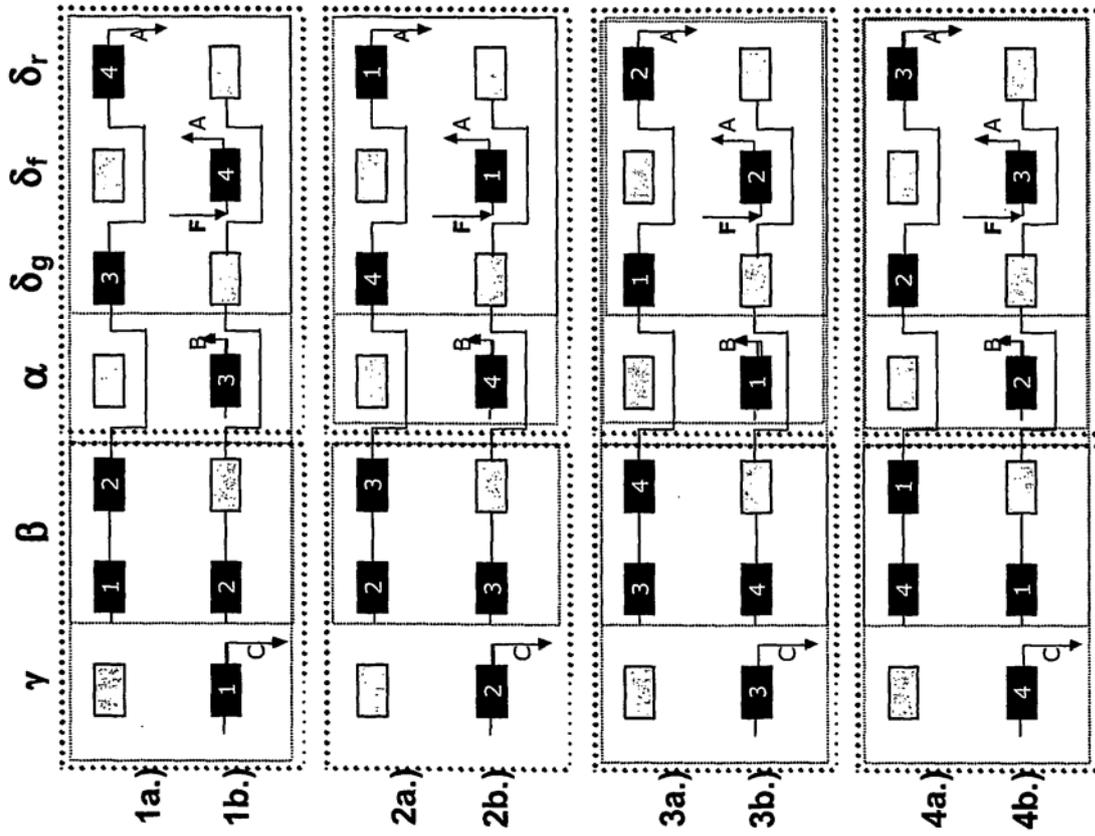


Fig. 26

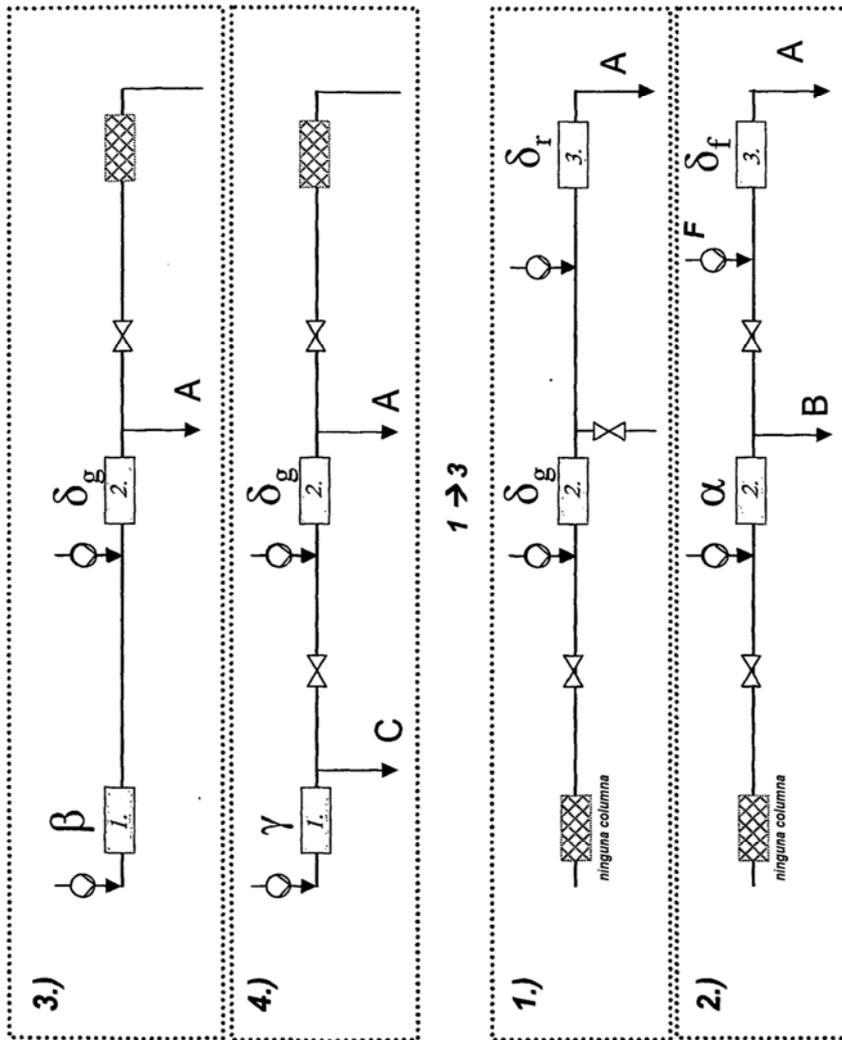


Fig. 27

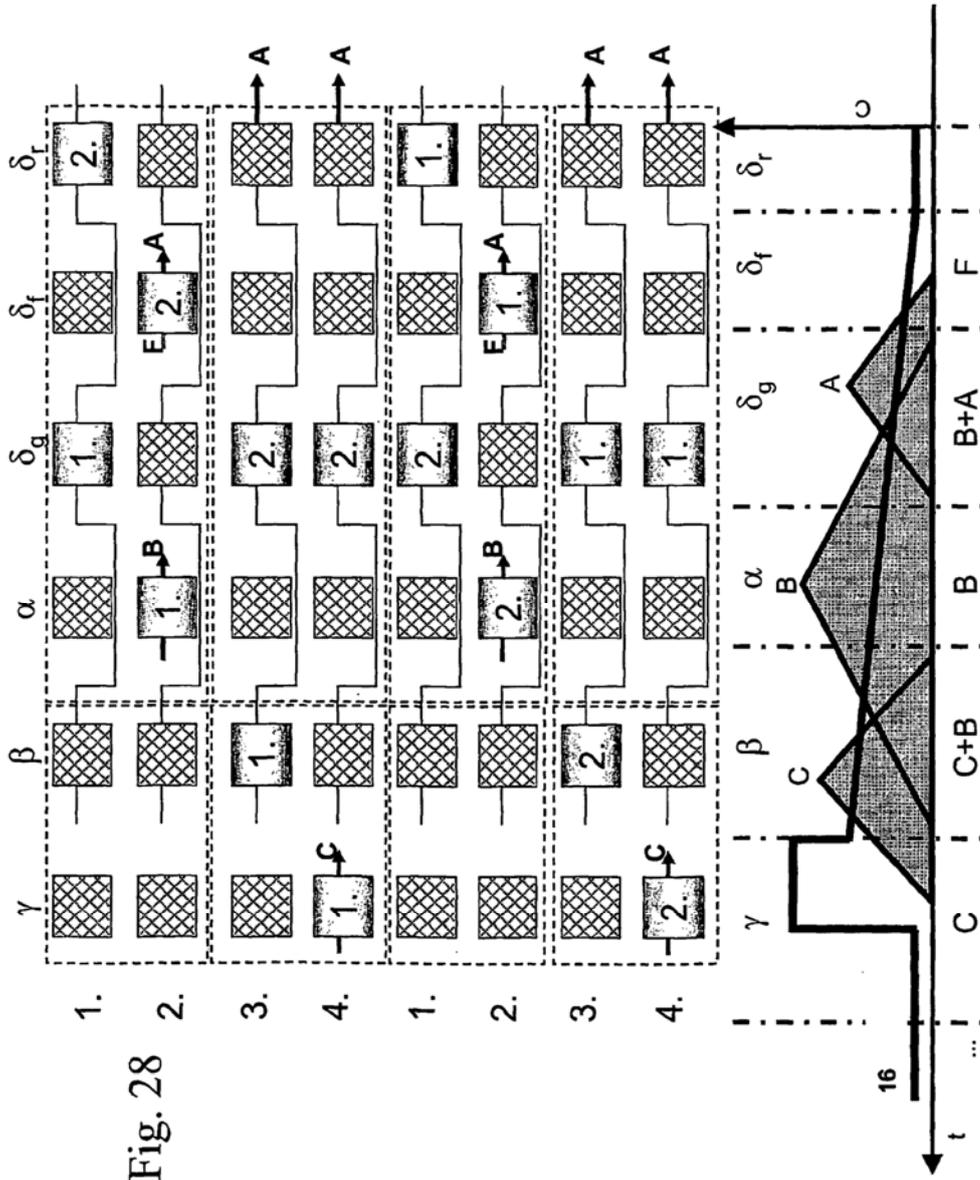


Fig. 28

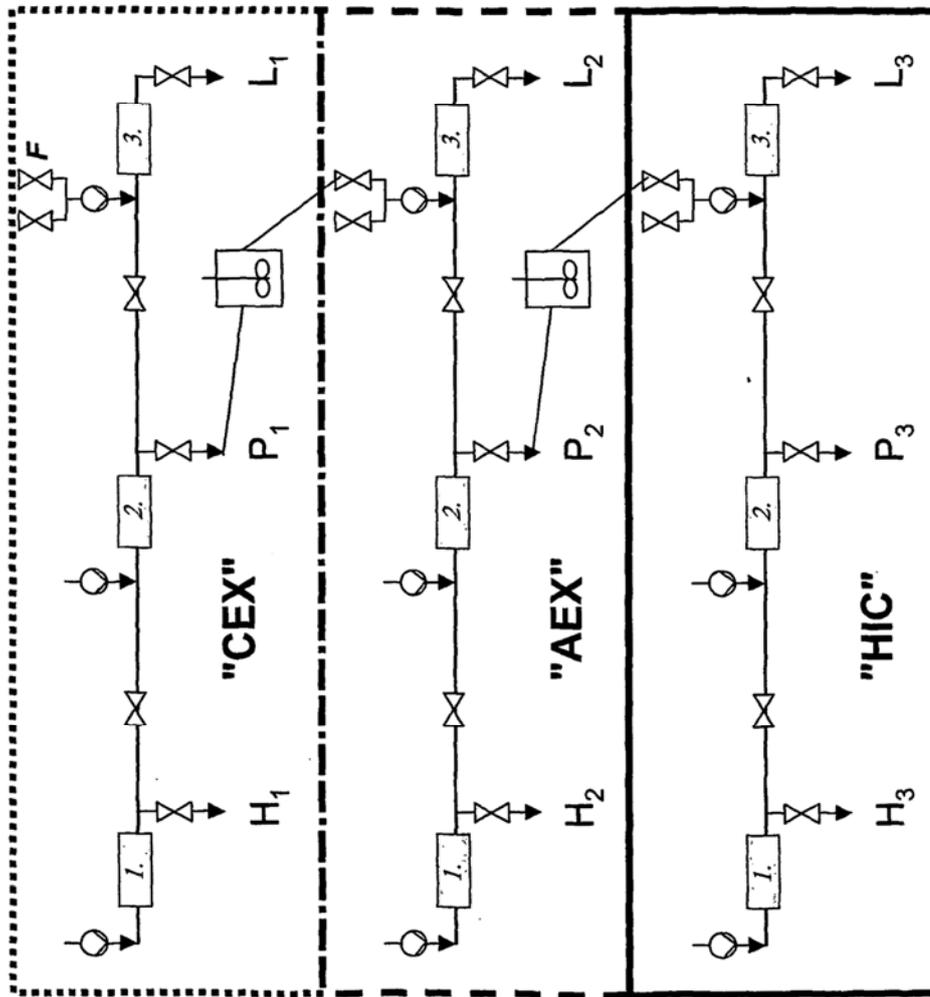


Fig. 29