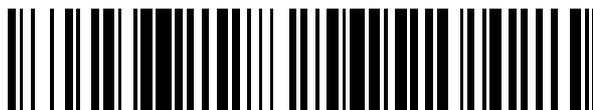


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 200**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2018 PCT/EP2018/080261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19096622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2018 E 18795675 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3512616**

54 Título: **Procedimiento para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación cromatográfica cíclica**

30 Prioridad:

16.11.2017 EP 17202010

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

12.06.2020

73 Titular/es:

**CHROMACON AG (100.0%)
Technoparkstrasse 1
8005 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**AUMANN, LARS;
MÜLLER-SPÄTH, THOMAS y
BAVAND, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 766 200 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

Procedimiento para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación cromatográfica cíclica

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimientos para monitorizar, evaluar y controlar procedimientos de purificación cromatográfica cíclica.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Los procedimientos cromatográficos se utilizan para la purificación de productos a partir de mezclas complejas.

15 En el caso de separaciones cromatográficas "difíciles", el producto de interés está acompañado de compuestos secundarios (impurezas) con un comportamiento de adsorción muy similar. En cromatogramas de cromatografía tradicionales con un único adsorbente, esto conduce a partes que se solapan de producto y compuestos secundarios diferentes en la parte anterior y en la parte posterior del pico del producto, lo que requiere una purificación con corte central. La purificación también se conoce como un desafío de separación ternaria, ya que, en un cromatograma, los compuestos que se van a separar pueden agruparse en tres clases, las impurezas/compuestos secundarios de elución temprana (se adsorben débilmente), el "producto" que se eluye en el centro y las impurezas/compuestos secundarios de elución tardía (se adsorben fuertemente). Las fracciones que se solapan en la parte anterior y en la parte posterior del pico del producto, respectivamente, contienen tanto producto de interés como impurezas/compuestos secundarios y, habitualmente, deben descartarse porque su pureza no cumple las especificaciones establecidas. Esto significa que en dicho desafío de separación ternaria, una fracción de producto de alta pureza sólo puede obtenerse a costa del rendimiento. La inclusión de fracciones secundarias mejoraría el rendimiento mediante la inclusión de compuesto de producto adicional, pero reduciría la pureza debido a la inclusión de compuestos secundarios/impurezas. Esta situación también se conoce como compensación rendimiento-pureza.

30 Se han sugerido varios procedimientos de cromatografía utilizando técnicas de reciclaje para recuperar el producto contenido en fracciones secundarias impuras, a efectos de paliar la compensación rendimiento-pureza. Se han sugerido procedimientos que utilizan un único adsorbente y que recogen fracciones secundarias impuras en recipientes separados para la purificación en un punto posterior en el tiempo en los casos en que el reprocesamiento es compatible con las directrices reguladoras.

35 En algunos procedimientos, las fracciones secundarias impuras se reciclan directamente sobre el mismo adsorbente sin almacenamiento intermedio.

40 Los procedimientos cromatográficos con más de un adsorbente cromatográfico permiten combinar la utilización de reciclaje interno de fracciones secundarias impuras y la utilización de principios de contracorriente, es decir, un movimiento opuesto relativo de la fase estacionaria (material adsorbente) y la fase móvil (fluidos). Mediante el reciclaje interno de fracciones secundarias impuras, el compuesto de producto contenido en estas fracciones se puede, en primer lugar, transferir directamente desde un adsorbente a otro sin almacenamiento en un depósito externo y, en segundo lugar, separar mediante principios de contracorriente y recuperar.

45 La combinación potente de reciclaje interno y principios de contracorriente permite la producción de un compuesto de producto con rendimiento y pureza elevados de manera simultánea en procedimientos con múltiples adsorbentes. Estos procedimientos son también conocidos como procedimientos de lecho móvil simulado (SMB). La utilización de procedimientos SMB iniciales se limitó a separaciones binarias, es decir, separaciones de dos compuestos de productos o separación de un compuesto de producto y un grupo de impurezas/compuestos secundarios de elución temprana o tardía. La separación ternaria de producto que se solapa con compuestos secundarios en la parte anterior y en la parte posterior del pico del producto sólo puede lograrse mediante el acoplamiento de dos procedimientos SMB, lo que requiere potencialmente una etapa de concentración entre medio de las dos configuraciones de SMB. La complejidad de estas configuraciones era prohibitiva para su aplicación práctica y condujo al desarrollo de procedimientos alternativos para separaciones ternarios utilizando los principios de contracorriente. Además, los procedimientos de SMB no pueden utilizar gradientes lineales de disolventes, que son importantes para la separación de compuestos con propiedades de adsorción similares.

50 En este sentido, un procedimiento muy eficaz para separaciones ternarias con capacidades de gradientes lineales de disolventes se conoce como procedimiento "MCSGP" (purificación en gradiente de disolvente a contracorriente en múltiples columnas) y se ha establecido en la industria, (véase la Patente EP-A-1 877 769). Este procedimiento ha sido descrito para 2-8 adsorbentes.

65 Se han sugerido otras técnicas cromatográficas con múltiples adsorbentes utilizando una multitud de adsorbentes y reciclaje interno, tal como un procedimiento con "gradiente con un reciclaje en estado de equilibrio" (GSSR). En los últimos años, la mayoría de aplicaciones de los procedimientos de cromatografía a contracorriente con múltiples

adsorbentes han sido descritas para el procedimiento MCSGP de dos adsorbentes, que tiene la ventaja de una baja complejidad de equipo y una alta flexibilidad operativa con respecto a la utilización de caudales, tiempos de conmutación y funcionamiento en el modo de gradiente lineal de disolventes. La Patente US-A-2017241992 propone un procedimiento para el control y/o la monitorización y/o la optimización de un procedimiento cromatográfico, en el que el procedimiento comprende, como mínimo, 2 columnas que funcionan, de manera alternativa, en el que este funcionamiento se puede realizar porque las, como mínimo, 2 columnas funcionan en estados interconectado y desconectado, en el que las columnas intercambian las posiciones después de dicha secuencia de estado interconectado y desconectado, y en el que aguas abajo, como mínimo, de una, o de cada columna, se encuentra un detector capaz de detectar el producto deseado y/o impurezas cuando atraviesa el detector. La Patente WO-A-2014166799 se refiere a un procedimiento de purificación cromatográfica para el aislamiento de una fracción de producto deseado a partir de una mezcla utilizando 2 columnas cromatográficas (adsorbentes), se refiere a procedimientos para el establecimiento de dicho procedimiento y se refiere también a procedimientos de control y/o monitorización y/u optimización en este contexto. El procedimiento comprende, dentro de un ciclo para llevar a cabo, como mínimo, una vez, las siguientes etapas: una primera etapa discontinua (B1), en la que durante un intervalo de tiempo discontinuo dichos adsorbentes están desconectados y un primer adsorbente se carga con alimentación a través de su entrada utilizando un primer caudal y su salida está dirigida a los residuos, y desde un segundo adsorbente se recupera el producto deseado a través de su salida y, posteriormente, se regenera el segundo adsorbente; una primera etapa interconectada (IC1), en la que la salida del primer adsorbente está conectada a la entrada del segundo adsorbente durante un intervalo de tiempo interconectado, el primer adsorbente se carga más allá de su capacidad dinámica de avance con alimentación a través de su entrada utilizando un segundo caudal que es igual o mayor que el primer caudal, y la salida del segundo adsorbente está dirigida a los residuos, una segunda etapa discontinua (B2) análoga a la primera etapa discontinua (B1), pero con adsorbentes intercambiados; una segunda etapa interconectada (IC2), análoga a la primera etapa interconectada (IC1), pero con adsorbentes intercambiados.

25 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de la presente invención es proponer un procedimiento mejorado para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación cromatográfica cíclica.

El procedimiento propuesto monitoriza la elución del perfil cromatográfico, es decir, una señal proporcional a la concentración, y actúa mientras la elución está en curso, teniendo, de este modo, un efecto inmediato. Además, el procedimiento no requiere un modelo cromatográfico que describa la separación ni un algoritmo de control que actúe en base a un error finito entre un valor real y un punto de ajuste. Por el contrario, el procedimiento utiliza valores umbral e inicia acciones de control en función de si alcanza o supera los umbrales. Para la determinación de los puntos de ajuste, el procedimiento requiere cierto conocimiento sobre la separación cromatográfica que puede adquirirse mediante la evaluación de un cromatograma diseñado con gradiente. En algunos casos, los puntos de ajuste pueden determinarse de forma automática, por ejemplo con respecto a un pico máximo. De este modo, la posición del cromatograma con respecto al tiempo/volumen de elución (eje x) no es relevante para la determinación de los puntos de ajuste, que sólo se basan en la magnitud del cromatograma (eje y).

El procedimiento de control del procedimiento propuesto trata el problema de las fluctuaciones de los parámetros ambientales y de funcionamiento y las diferencias en el rendimiento del adsorbente que pueden conducir a un rendimiento subóptimo del procedimiento en los procedimientos en contracorriente. Con el procedimiento propuesto, el procedimiento funciona de manera robusta en su punto de ajuste.

El procedimiento propuesto comprende los elementos de a.) monitorizar esencialmente de manera continua y b.) evaluar el cromatograma, de manera preferente, en la salida del adsorbente que está realizando las tareas de elución y c.) provocar una acción de control basándose en la información evaluada.

De manera más específica, la presente invención se refiere a un procedimiento para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación cromatográfica cíclica que implica, como mínimo, dos adsorbentes (de manera preferente, dos y no más adsorbentes, 3 y no más adsorbentes o 4 y no más adsorbentes), a través de los cuales se pasa un líquido con una mezcla de alimentación (Alimentación), que comprende los componentes (o compuestos) de productos deseados (P), así como las impurezas (W, S).

Habitualmente, los adsorbentes funcionan de forma alternada, de manera que los, como mínimo, dos adsorbentes funcionan en una secuencia de fases interconectadas y desconectadas y, de manera que los adsorbentes conmutan las posiciones después de dicha secuencia de fases interconectadas y desconectadas. En caso de que haya dos adsorbentes, por ejemplo, dos columnas, esa secuencia está completamente definida. En este contexto, cabe indicar que cada uno de estos dos adsorbentes también se puede proporcionar en un grupo de dos, tres o cuatro o incluso más adsorbentes (columnas) que están interconectados en serie y se mantienen en esa secuencia interconectada sin ninguna desconexión en el procedimiento. Para la situación en la que hay más de dos adsorbentes, las secuencias de las fases interconectadas y desconectadas se mantienen en el sentido de que siempre la fase interconectada que une dos adsorbentes (o grupos de adsorbentes) I1 es seguida por una fase discontinua B1 en la que funcionan los mismos dos adsorbentes y el producto P se eluye del adsorbente (o grupo de

adsorbentes) anteriores aguas arriba. Por lo tanto, un control, tal como se indica en las figuras 3-8 y se describe más adelante, es factible también en procedimientos que utilizan 3 o más columnas, ya que sólo requieren la existencia de una fase interconectada y una fase discontinua en este sentido, y la señal proporcional a la concentración, tal como se detalla a continuación, se mide, a continuación, de manera preferente en la salida, como mínimo, de uno de estos mismos adsorbentes, de manera preferente, justo en la salida del adsorbente aguas arriba, o en la salida de los dos adsorbentes o en la salida de todos los adsorbentes. Además, de manera preferente, la señal proporcional a la concentración se puede medir, como mínimo, en una de las siguientes posiciones: la salida del adsorbente en una fase de elución discontinua (B1) del producto deseado, la salida del adsorbente aguas arriba en una fase interconectada (I1, I2) y, de manera preferente, sólo en estas posiciones. En paralelo a cada una de dichas secuencias I1, B1 que implica dos adsorbentes o grupos de adsorbentes, los adsorbentes adicionales o grupos de adsorbentes pueden realizar otras tareas de forma independiente, tal como, por ejemplo, una etapa de limpieza, equilibrado o reacción.

En paralelo a cada fase I1, B1, pero también en paralelo a las fases I2, B2, que implican otros dos adsorbentes o grupos de adsorbentes, los adsorbentes adicionales o grupos de adsorbentes puede realizar otras tareas de forma independiente, tal como, por ejemplo, una etapa de limpieza, equilibrado o reacción. Un ejemplo de dicho procedimiento para tres adsorbentes se proporciona en la figura 10a. De este modo, en el procedimiento que utiliza 3 adsorbentes o grupos de adsorbentes, las posiciones de los adsorbentes se cambian sólo después de la fase B2 en los procedimientos. De manera análoga, se puede hacer funcionar un procedimiento con 4 adsorbentes o grupos de adsorbentes, tal como se ilustra en la figura 10b.

También los procedimientos, tal como se establecen en la Patente EP 1 877 769 B1, son totalmente compatibles y pueden funcionar utilizando el presente concepto con el requisito de tener una fase interconectada seguida por una fase discontinua, de este modo, la presente invención es aplicable también en este caso (por ejemplo para los procedimientos según las figuras 20, 22 o 23 en la Patente EP 1 877 769 B1). En la Patente EP 1 877 769 B1, las fases interconectadas correspondientes a "I1" e "I2" se denominan mediante "CCL" y las fases discontinuas "B1" y "B2" se denominan "BL".

En cuanto a las impurezas (W, S), sólo puede haber una impureza (W o S), por lo tanto una distribución (binaria) con impurezas que se adsorben más débilmente (W) que el producto. O sólo pueden haber impurezas que se absorben más fuertemente (S) que el producto. También es posible la situación en la que hay impurezas que se absorben más débilmente (W) que el producto, así como impurezas que se absorben más fuertemente (S) que el producto.

El procedimiento de purificación comprende, como mínimo, dos fases diferentes (I, B): como mínimo, una fase interconectada (I), en la que los dos adsorbentes están interconectados de manera que la salida de un adsorbente aguas arriba está conectada con conexión de fluidos a la entrada de un adsorbente aguas abajo, y como mínimo, una fase discontinua (B), en la que, como mínimo, un adsorbente no está conectado con conexión de fluidos a los otros y en la que los componentes del producto deseado (P) se recuperan en forma purificada, de manera preferente, desde un adsorbente desconectado.

Según la presente invención, el procedimiento comprende, como mínimo, las siguientes etapas:

- a. monitorización del cromatograma que incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido;
 - b. evaluación del cromatograma que incluye una comparación, como mínimo, de una de dichas señales proporcionales a la concentración actual medida en la etapa a. con un valor umbral de la misma;
 - c. control del procedimiento de purificación cromatográfica mediante la adaptación de la terminación de la fase actualmente en ejecución en función de la comparación de la etapa b. e inicio de la siguiente fase,
- en el que la secuencia de a.-c. se lleva a cabo en un orden determinado, como mínimo, dos veces después de la otra en un procedimiento de separación.

Por lo tanto, el procedimiento se lleva a cabo de manera cíclica mediante la repetición de la secuencia a.-c. tantas veces como se requiera o sea necesario.

Habitualmente, el procedimiento se cicla mediante la repetición de la secuencia a.-c. durante un cierto tiempo, por ejemplo, durante un intervalo de tiempo entre 10' y 200 horas o, a menudo, 12-52 horas o 24-48 horas. De manera alternativa, el procedimiento se lleva a cabo de manera cíclica mediante la repetición de la secuencia a.-c., dependiendo del volumen de alimentación, es decir, la secuencia a.-c. se repite hasta que se ha tratado el volumen de alimentación.

Por ejemplo, en el caso de un procedimiento a base de fermentación continua, la secuencia a.-c. se puede ciclar hasta que termina el procedimiento de fermentación, lo cual puede ser hasta varias semanas o meses, por ejemplo, 1-20 semanas o 4-8 semanas. O el procedimiento se ejecuta de forma continua, es decir, la secuencia a.-c. se repite hasta que los adsorbentes deben reemplazarse o limpiarse.

Según una primera realización preferente, la señal proporcional a la concentración se tiene en cuenta en términos, como mínimo, de uno de su valor absoluto, su integral, su pendiente y el signo de su pendiente, en la que, de manera preferente, se tiene en cuenta una combinación de éstos, de la manera más preferente, una combinación del valor absoluto y el signo de su pendiente.

5 La señal proporcional a la concentración medida en la etapa a. se puede medir, de manera preferente, en la salida, como mínimo, de un adsorbente, de manera preferente, en la salida de dos adsorbentes o en la salida de todos los adsorbentes. De manera más preferente, la señal proporcional a la concentración se puede medir, como mínimo, en una o sólo en una de las siguientes posiciones: la salida de un adsorbente que está en una fase de elución discontinua (B1) del producto deseado, la salida del adsorbente aguas arriba en una fase interconectada (I1, I2). De este modo, de manera preferente, se mide sólo la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba de los dos activos, y en la fase discontinua del que eluye el producto.

15 Según una realización preferente, el procedimiento de purificación comprende, como mínimo, cuatro fases diferentes (I1, B1, I2, B2) en un orden determinado, como mínimo, una primera fase interconectada (I1), en la que dos adsorbentes están interconectados, de manera que la salida de un adsorbente aguas arriba está conectada con conexión de fluidos a la entrada de un adsorbente aguas abajo, el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba, y los componentes del producto deseado (P), así como impurezas que se adsorben débilmente (W), se transfieren desde el adsorbente aguas arriba al adsorbente aguas abajo, de manera preferente, hasta que esencialmente sólo los componentes del producto deseado (P) salen por la salida del adsorbente aguas arriba, en la que, de manera preferente, se lleva a cabo una dilución en línea entre el adsorbente aguas arriba y el adsorbente aguas abajo; como mínimo, una primera fase discontinua (B1), en la que los adsorbentes no están conectados con conexión de fluidos, y en la que se introduce el disolvente por medio de la entrada en un adsorbente aguas arriba desde la primera fase interconectada (I1) y a través de la salida de este adsorbente que eluye el producto, se recogen los componentes del producto deseado (P), mientras que el líquido con una mezcla de alimentación (Alimentación) se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas abajo de la primera fase interconectada (I1) y a través de la salida de este adsorbente, normalmente se recogen las impurezas que se adsorben débilmente; como mínimo, una segunda fase interconectada (I2), en la que dos adsorbentes están interconectados, de manera que la salida del adsorbente aguas arriba de la primera fase interconectada (I1) está conectada a la entrada del adsorbente aguas abajo de la primera fase interconectada (I1), el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba, y los compuestos del producto deseado (P), así como impurezas que se adsorben fuertemente (S), se transfieren desde el adsorbente aguas arriba al adsorbente aguas abajo, de manera preferente, hasta que esencialmente no salen más compuestos de producto deseado (P) mediante la salida del adsorbente aguas arriba, en la que, de manera más preferente, se lleva a cabo una dilución en línea entre el adsorbente aguas arriba y el adsorbente aguas abajo; y, como mínimo, una segunda fase discontinua (B2), en la que los adsorbentes no están conectados con conexión de fluidos, y en la que se introduce el disolvente por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba de la segunda fase interconectada (I2) y a través de la salida de este primer adsorbente aguas arriba se recogen las impurezas que se adsorben fuertemente (S), mientras que el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas abajo de la segunda fase interconectada (I2) y a través de la salida de este primer adsorbente aguas abajo, se recogen impurezas que se adsorben débilmente, en el que las funciones de las fases (I1, B1, I2, B2) se realizan de forma sincrónica o, de manera preferente, de forma secuencial, y se llevan a cabo de una manera cíclica, como mínimo, dos veces, en el que cuando se ciclan después o dentro de un tiempo de conmutación, el primer adsorbente aguas arriba de la segunda fase discontinua (B2) se desplaza para convertirse en el adsorbente aguas abajo en la siguiente primera fase interconectada (I1), y el primer adsorbente aguas abajo de la segunda fase discontinua se desplaza para convertirse en el adsorbente aguas arriba en la siguiente primera fase interconectada (I1). Este procedimiento es esencialmente el que se ilustra en la figura 1 que se detalla a continuación.

50 En el contexto de dicho procedimiento de purificación, la etapa a., de manera preferente, incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente aguas arriba en la primera fase interconectada (I1), en la que se mide, de manera preferente, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos.

55 Se pueden medir el valor absoluto y, de manera preferente también, el signo de su pendiente, y después de sobrepasar un umbral de valor absoluto, se puede iniciar la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada a más seguimiento, evaluación y control.

60 Después de superar un umbral de valor absoluto, se puede esperar un retraso fijo hasta que se inicia la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada después de monitorización, evaluación y control adicionales.

65 Después de superar un primer umbral de valor absoluto, se puede esperar un retraso mínimo fijo y después de esto, después de superar un segundo umbral de valor absoluto, de manera preferente, con la comprobación de la

condición adicional de que su pendiente sea positiva, se inicia la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada después de una monitorización, una evaluación y un control adicionales.

5 Cuando se menciona una primera fase discontinua B1 que tiene una duración adaptada después de monitorización, evaluación y control adicionales, esto se refiere, por ejemplo, al control de la duración de la etapa de elución del producto, tal como se detalla a continuación.

10 También se pueden combinar estos procedimientos diferentes para determinar cuándo la etapa de elución del producto debe comenzar.

15 La etapa a. puede incluir la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente que eluye el producto en la primera fase discontinua (B1), en la que se mide, de manera preferente, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos. En el contexto de dicha medición, después de caer por debajo de un umbral de valor absoluto, de manera preferente, con la comprobación (de forma continua) de la condición adicional de que su pendiente sea negativa, se puede iniciar la siguiente segunda fase interconectada (I2), ya sea como una segunda fase interconectada de duración fija o como una segunda fase interconectada que tiene una duración adaptada después de una monitorización, evaluación y control adicionales.

20 La etapa a. también pueden incluir la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente aguas arriba en la segunda fase interconectada (I2), en la que, de manera preferente, se mide, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos, en la que, de manera preferente, con la comprobación de la condición adicional de que su pendiente sea negativa, después de caer por debajo de un umbral de valor absoluto, se inicia la siguiente segunda fase discontinua (B2), ya sea como una segunda fase discontinua de duración fija o como una segunda fase discontinua que tiene una duración adaptada después de una monitorización, evaluación y control adicionales.

30 El procedimiento cromatográfico cíclico puede utilizar, como mínimo, dos adsorbentes y cada ciclo puede comprender, como mínimo, dos fases interconectadas en las que dos adsorbentes están conectados con conexión de fluidos para el reciclaje interno de diferentes fracciones secundarias parcialmente puras (W/P, P/S). De manera preferente, en la etapa a. se mide, como mínimo, uno de la señal absoluta y su pendiente en la salida del respectivo adsorbente aguas arriba.

35 Se puede utilizar también un cambio de la señal de la pendiente como criterio para una acción de control.

40 Un gradiente de elución del procedimiento puede tener una pendiente constante con respecto al volumen de la fase móvil líquida utilizada en el procedimiento sobre la fase interconectada y la primera fase discontinua (I1, B1, I2) o se puede ejecutar en modo isocrático (pendiente cero).

El umbral para detener una fase del procedimiento e iniciar una nueva fase del procedimiento se puede definir, de manera preferente, en relación con la señal proporcional a la concentración registrada durante el mismo ciclo o un ciclo anterior del procedimiento cromatográfico.

45 Además, se puede activar una acción de control en base a si no se consigue un umbral definido dentro de un volumen de elución o tiempo o concentración de gradiente predeterminados.

50 La señal proporcional a la concentración se basa habitualmente en la medición de la luz visible, UV, infrarroja, fluorescencia, Raman, fuerza iónica, conductividad o índice de refracción.

55 Una forma preferente de monitorizar el cromatograma incluye la monitorización de una señal proporcional a la concentración en la salida, como mínimo, de uno de los adsorbentes, de manera preferente, en ambas salidas en el caso de dos adsorbentes y, de manera preferente, en la salida de cada adsorbente en el caso de utilizar más de dos adsorbentes.

La monitorización de la señal proporcional a la concentración puede llevarse a cabo mediante la recopilación de la señal de UV, que puede ser en términos de su señal absoluta, su integral, su pendiente o el signo de su pendiente.

60 Una forma preferente de evaluar el cromatograma es comparar el valor actual, como mínimo, de uno de los parámetros mencionados anteriormente con un valor del punto de ajuste y provocar una acción de control en base a la comparación.

Una acción de control preferente es detener una fase actualmente en ejecución, por ejemplo, IC1 para el reciclaje interno del producto, e iniciar la siguiente fase, por ejemplo, B1 para la recogida del producto.

65 Se descubrió que el procedimiento de control puede compensar cambios en los parámetros del procedimiento, tales

como la composición y la temperatura de la fase móvil, la temperatura del adsorbente, la diferencia de altura del lecho compacto en el caso de adsorbentes en formato de columna, la compresión del empaquetamiento en el caso de adsorbentes en formato de columna, el ensuciamiento y la disminución de la capacidad, lo que conduce a desplazamientos del cromatograma.

5 La parte de monitorización del procedimiento puede incluir el registro de los valores de la señal proporcional a la concentración y/o la pendiente de esta señal en la salida del adsorbente aguas arriba durante las fases I1, B1 e I2 y durante la elución del compuesto "W" en la zona 4 en la fase B2.

10 Mediante la monitorización de la pendiente de la señal proporcional a la concentración, el procedimiento se puede aplicar para provocar una acción de control en la parte anterior del pico (pendiente de la señal proporcional a la concentración > 0) o en la cola del pico (pendiente de la señal proporcional a la concentración < 0). La parte de evaluación del procedimiento comprueba de manera continua si la señal proporcional a la concentración ha alcanzado un valor umbral definido y provoca una acción de control si se alcanza el valor umbral.

15 El valor umbral puede fijarse (por ejemplo, basándose en el conocimiento del cromatograma de diseño) o puede determinarse de forma automática mediante el procedimiento de control basado en la información de uno o varios ciclos anteriores. Por ejemplo, el umbral puede expresarse como el porcentaje de la altura del pico del compuesto principal o un compuesto "W" de elución anterior.

20 En una realización preferente adicional, el procedimiento para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación con gradiente de disolvente a contracorriente con múltiples adsorbentes comprende los siguientes elementos:

a. monitorización de una señal proporcional a la concentración en términos de su señal absoluta, su integral, su pendiente o el signo de su pendiente o una combinación de los mismos y

b. evaluación del cromatograma que incluye comparar de manera continua el valor actual, como mínimo, de uno de los parámetros mencionados anteriormente con un valor del punto de ajuste y

25 c. control del procedimiento que incluye la terminación de una fase actualmente en ejecución del procedimiento de purificación con gradiente de disolvente a contracorriente con múltiples adsorbentes basándose en la coincidencia del valor actual con el valor del punto de ajuste, e inicio de una nueva fase, en la que a.-c. se llevan a cabo, como mínimo, una vez durante el funcionamiento del procedimiento de purificación. La expresión señal proporcional a la concentración en el sentido de la presente invención puede referirse a la proporcionalidad de la señal con la concentración del producto o impurezas en la ejecución cromatográfica, pero, de manera alternativa, puede referirse a la proporcionalidad con la concentración del modificador, que incluye, pero sin limitación a los mismos, como
30 mínimo, uno de la concentración de sal o la concentración de modificador orgánico.

En una realización preferente, el procedimiento de purificación con gradiente de disolvente a contracorriente con múltiples adsorbentes utiliza dos adsorbentes. Sin embargo, también es posible utilizar más de 2 adsorbentes, por ejemplo 3, 4, 5 o, incluso, 6 adsorbentes.

40 En una realización preferente, el procedimiento monitoriza el cromatograma durante el reciclaje interno y las fases de elución del producto y provoca una acción de control basándose en un valor umbral.

De manera preferente, se utilizan, exactamente, dos adsorbentes en el procedimiento.

45 En una realización preferente, el procedimiento comprende
(a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba durante el reciclaje interno de las impurezas que se adsorben débilmente (fase I1)
(b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido,
50 mientras que la pendiente de la señal proporcional a la concentración es positiva, y después de alcanzar el umbral
(c) detener la ejecución de fase I1 e iniciar la fase B1, teniendo la fase B1 duración fija o variable dependiente de otro umbral.

En otra realización preferente, el procedimiento comprende
55 (a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba durante el reciclaje interno de las impurezas que se adsorben débilmente (fase I1)
(b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido, mientras que la pendiente de la señal proporcional a la concentración es positiva, y después de alcanzar el umbral
(c) continuar la fase I1 durante un período de tiempo (retraso) antes de detener la ejecución de la fase I1 e iniciar la
60 fase B1, teniendo la fase B1 una duración fija, y teniendo el retraso una duración prefijada o variable que depende de otro umbral.

En aún otra realización preferente, el procedimiento anterior se modifica, de manera que la fase B1 se inicia basándose en un valor umbral, que puede ser el mismo o diferente del valor umbral utilizado para provocar el período de retraso en la fase I1 y en el que el período de retraso puede estar asociado con un valor mínimo. La razón para la asignación de una duración mínima al retraso es evitar el inicio prematuro de la fase B1 debido a las

impurezas que se eluyen antes del producto principal y que alcanzan el valor del segundo umbral. El período de retraso se puede formular en términos de tiempo o volumen.

En una realización más preferente, el procedimiento comprende, además,

- 5 (a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente que eluye el producto (fase B1) y,
 (b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido, mientras la pendiente de la señal proporcional a la concentración es negativa, y después de alcanzar el umbral
 10 (c) detener la ejecución de la fase B1 e iniciar la fase I2, en el que la carga de la muestra se modula, de manera que la carga de la muestra tiene lugar al comienzo de la fase B1 y se detiene después de un corto período de tiempo, mientras que la elución del otro adsorbente está en curso hasta que se alcanza el umbral, y teniendo I2 una duración prefijada o variable que depende de otro umbral.

15 En otra realización preferente, el punto final de I2 está determinado por un valor umbral, en el que, en cuanto se ha alcanzado este umbral, (c) se detiene la ejecución de la fase I2 y se inicia la fase B2.

En otras realizaciones preferentes, cualquiera de los procedimientos anteriores relacionados con el inicio de la fase B1 se combina con procedimientos relacionados con la terminación de la fase B1.

20 Por lo tanto, también son posibles combinaciones de estos procedimientos con el inicio del período de retraso dentro de I1 basándose en un primer umbral, el inicio de la fase B1 de recogida de producto basándose en un segundo umbral, mientras que la pendiente de la señal de UV es positiva y la terminación de la fase B1 (e iniciar la fase I2) basándose en un tercer umbral.

25 Otras realizaciones preferentes de cualquiera de los procedimientos anteriores utilizan información adicional de la pendiente del cromatograma para provocar acciones de control. En una realización preferente del procedimiento, los procedimientos anteriores que utilizan un volumen de retraso con duración fija, en cambio, pueden utilizar un cambio en el signo de la pendiente como criterio para detener el retraso y continuar con la evaluación de la señal para alcanzar el segundo umbral.

30 Todos los procedimientos pueden incluir continuar la ejecución y alargar el gradiente de elución a través de las fases I1, B1, I2, de manera preferente, en la pendiente de gradiente utilizada durante la elución de los componentes "W" (fase 4 en una configuración con dos adsorbentes), en referencia a la pendiente con respecto al volumen de la fase móvil utilizada en el procedimiento. Esto significa que el gradiente de elución del procedimiento con múltiples adsorbentes tiene una pendiente constante con respecto al volumen de la fase móvil utilizada en el procedimiento durante las fases I1, B1, I2.

35 En los procedimientos descritos, los umbrales también se pueden definir en base a la información obtenida durante la misma ejecución o ciclo, de este modo, no pueden conocerse cuando se inicia una ejecución o ciclo. En este caso, un primer ciclo puede ejecutarse parcial o completamente antes de que el procedimiento determine los valores umbral basándose en la evaluación de las señales registradas válidas para el resto del ciclo (en caso de que el ciclo se haya completado parcialmente en el momento de la evaluación) o para el resto de la ejecución del procedimiento cromatográfico. De este modo, el umbral para detener una fase del procedimiento e iniciar una nueva fase del procedimiento se define en relación a la señal proporcional a la concentración registrada durante la misma ejecución o una ejecución anterior del procedimiento cromatográfico.

40 El procedimiento propuesto también incluye provocar una acción de control en base a no alcanzar un umbral definido dentro de un volumen de elución específico. Esto puede suceder, por ejemplo, si el cromatograma no consigue eluir porque una de las bombas utilizadas en el procedimiento cromatográfico no está funcionando correctamente. Una acción preferente es detener las bombas utilizadas para suministrar la fase móvil. Los valores de referencia se pueden obtener a partir del cromatograma de diseño.

45 En realizaciones preferentes, la señal proporcional a la concentración se basa en la medición de la luz visible, UV, infrarroja, fluorescencia, Raman, fuerza iónica, conductividad o índice de refracción.

50 En la descripción del procedimiento anterior, las duraciones se realizan en términos de tiempo o volumen. El tiempo t y el volumen V se pueden convertir entre sí utilizando el caudal volumétrico Q utilizado en la fase correspondiente utilizando $V = Q \cdot t$. Además, la pendiente de la señal proporcional a la concentración se puede definir con respecto al volumen o tiempo.

55 Otras realizaciones de la presente invención se establecen en las reivindicaciones dependientes. El término "disolventes" en la presente invención incluye también tampones y otros tipos de fases móviles. El término "adsorbente" en la presente invención incluye columnas cromatográficas con lecho de relleno u otros dispositivos que contienen una fase estacionaria cromatográfica, que incluye membranas, adsorbentes a base de fibra y adsorbentes monolíticos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones preferentes de la presente invención se describen a continuación con referencia a los dibujos, que se proporcionan con el propósito de ilustrar las presentes realizaciones preferentes de la presente invención y no con el propósito de limitar la misma. En los dibujos,

la figura 1 muestra un esquema de un procedimiento MCSGP, de manera específica, es una ilustración de la primera mitad de ciclo ("conmutador") de un procedimiento de purificación con gradiente de disolvente a contracorriente con doble adsorbente (MCSGP); las líneas verticales discontinuas separan las diferentes tareas del procedimiento MCSGP correspondientes a las zonas del cromatograma discontinuo esquemático que se muestra en la parte inferior de la figura; las fases I1, B1, I2, B2 se llevan a cabo de forma secuencial;

la figura 2 muestra en a) un cromatograma en el que la zona 6 está situada correctamente; y en b) un cromatograma en el que la zona 6 está desplazada de forma perjudicial para incluir impurezas que se adsorben fuertemente; de manera específica, los cromatogramas esquemáticos de una sola elución de producto a partir de una ejecución de MCSGP se proporcionan con una posición de ventana de elución rígida del producto, sin procedimiento de control; a) muestra la ejecución en condiciones de funcionamiento óptimas, recogiendo el pico del producto y excluyéndose la mayoría de las impurezas de la agrupación de productos; b) muestra la ejecución con el cromatograma que tiene tiempo de elución de desplazados a más tempranos, lo que da lugar a un producto con una menor concentración y pureza;

la figura 3 muestra un esquema de un procedimiento de control (A) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 4 muestra un esquema de un procedimiento de control (B) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 5 muestra un esquema de un procedimiento de control (C) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 6 muestra un esquema de un procedimiento de control (D) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 7 muestra un esquema de un procedimiento de control (E) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 8 muestra un esquema de un procedimiento de control (F) basado en un cromatograma de MCSGP que muestra una sola elución de producto de uno de los dos adsorbentes y las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 9 muestra en a) cromatogramas de 10 ciclos de una ejecución de MCSGP desarrollada con dos adsorbentes diferentes; en b) cromatogramas superpuestos de 10 ciclos mencionados anteriormente indican el valor umbral a 100 mUA y que muestran las fases I1, B1, I2 y B2;

la figura 10 muestra un esquema de un procedimiento que implica 3 adsorbentes (a) y uno que implica 4 adsorbentes (b). Los adsorbentes implicados en el procedimiento de control están destacados en gris, mientras que los adsorbentes que llevan a cabo otras tareas, tales como limpieza, equilibrado o una etapa de reacción no están destacados.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES PREFERENTES

El principio del procedimiento de MCSGP de dos adsorbentes (por ejemplo, que tiene dos columnas cromatográficas o adsorbentes de membrana) se muestra en la **figura 1**. El cromatograma esquemático en la parte inferior de la figura 1 representa un cromatograma discontinuo que se ha dividido en diferentes secciones (líneas verticales discontinuas), según las tareas que se llevan a cabo en la ejecución de la cromatografía discontinua (equilibrado en la zona 1, alimentación en la zona 2, lavado en la zona 3, elución en las zonas 4-7, limpieza y reequilibrado en la zona 8). La fase de elución se subdivide en zonas adicionales según el orden de elución de las impurezas que se adsorben débilmente (W), producto (P) y las impurezas que se adsorben fuertemente (S) en el cromatograma (elución de W en la zona 4, la elución de la parte de solapamiento W/P en la zona 5, elución de P puro en la zona 6, elución de la parte de solapamiento de P/S en la zona 7). En el procedimiento de MCSGP de dos adsorbentes, estas tareas individuales de las zonas 4-7 se llevan a cabo como en la cromatografía discontinua con la diferencia decisiva de que el eluato de W/P y el eluato de P/S se dirigen a un segundo adsorbente para la recuperación de P (zonas 5 y 7). De este modo, las tareas de procedimiento del procedimiento discontinuo con un único adsorbente y el procedimiento de MCSGP son análogas y es posible derivar los parámetros de funcionamiento para MCSGP a partir de los parámetros de funcionamiento en discontinuo y el cromatograma correspondiente.

Un ciclo completo de un procedimiento MCSGP de dos adsorbentes comprende dos "conmutadores" con cuatro pares de tareas cada uno (I1, B1, I2, B2), tal como se ilustra en la figura 1. Las fases en cada conmutador son idénticas; la diferencia se encuentra sólo en la posición del adsorbente: en el primer conmutador, el adsorbente 1 está aguas abajo del adsorbente 2, mientras que en el segundo conmutador (no mostrado en la figura 1), el adsorbente 2 está aguas abajo del adsorbente 1. Las cuatro fases incluyen las siguientes tareas:

Fase I1: Primera fase interconectada. La parte de solapamiento W/P se eluye del adsorbente aguas arriba (zona 5 en la figura 1) y se recicla internamente en modo interconectado en el adsorbente aguas abajo (zona 1). Entre los adsorbentes, la corriente se diluye normalmente en línea con tampón/disolvente para la readsorción de P (y el solapamiento de W) en el adsorbente aguas abajo. Al final de la fase I1, el producto puro está listo para la elución en la salida del adsorbente

aguas arriba (zona 5).

En la figura 28 de la Patente EP-A-1 877 769, esta fase se denomina etapa "1"

5 Fase B1: Primera fase discontinua. P puro se eluye y se recoge del adsorbente en la zona 5 (adsorbente 2 en la figura 1), manteniendo la parte de solapamiento P/S y S en el adsorbente. Al mismo tiempo, se inyecta alimentación fresca en el adsorbente en la zona 2. En la figura 28 de la Patente EP-A-1 877 769, esta fase se denomina etapa "2"

10 Fase I2: Segunda fase interconectada. La parte de solapamiento P/S se eluye del adsorbente aguas arriba (zona 7) y se recicla internamente en el adsorbente aguas abajo (zona 3). Entre los adsorbentes, la corriente se diluye normalmente en línea con tampón/disolvente para la readsorción de P en el adsorbente aguas abajo. Al final de la etapa, todo el P restante se ha eluido del adsorbente aguas arriba y sólo queda S en el adsorbente aguas arriba. En la figura 28 de la Patente EP-A-1 877 769, esta fase se denomina etapa "3"

15 Fase B2: Segunda fase discontinua. El adsorbente en la zona 8 (adsorbente 2 en la figura 1) se limpia para eliminar S y se reequilibra. Al mismo tiempo, W se eluye del otro adsorbente en la zona 4.

20 En la figura 28 de la Patente EP-A-1 877 769, esta fase se denomina etapa "4".

Después de haber completado estas tareas, los adsorbentes conmutan posiciones y en la siguiente fase I1 (no mostrada en la figura 1), el adsorbente 2 está en la posición aguas abajo (zona 1) y el adsorbente 1 está en la posición aguas arriba (zona 5). Al comienzo de esta fase I1, el adsorbente 2 se limpia y se reequilibra y está listo para la captación de la fracción W/P del adsorbente 1. Después de haber completado B1, I2, y B2 por segunda vez, los adsorbentes vuelven a sus posiciones originales y se ha completado un ciclo. El adsorbente 1 está ahora limpio y listo para la captación de W/P del adsorbente 2 en la siguiente fase I1 (tal como se muestra en la figura 1).

25 Tal como en otros procedimientos cromatográficos a contracorriente, en la práctica, en MCSGP el movimiento del adsorbente se simula mediante la conexión y desconexión de las entradas y salidas del adsorbente a través de la conmutación de la válvula y no mediante el movimiento físico de los adsorbentes.

30 El diseño del procedimiento de dichos procedimientos a contracorriente con múltiples adsorbentes se basa en la división de un "cromatograma de diseño", tal como se ilustra en la figura 1, que muestra la elución de compuestos de productos y de impurezas, esencialmente en una serie de diferentes zonas. Son cruciales para el diseño del procedimiento una primera zona en la que las impurezas que se adsorben débilmente están presentes solas (zona 4 en la figura 1), una segunda zona en la que las impurezas que se adsorben débilmente W se solapan con el compuesto de producto P (zona 5 en la figura 1), una tercera zona en la que el producto P puro está presente (zona 6 en la figura 1), una cuarta zona en la que el producto P y las impurezas que se adsorben fuertemente S se solapan (zona 7 en la figura 1) y una quinta zona en la que las impurezas que se adsorben fuertemente S están presentes solas (zona 8 en la figura 1).

35 Como parte del diseño del procedimiento, los límites entre las diferentes zonas deben colocarse para conducir a la determinación de los parámetros de funcionamiento del procedimiento (concentraciones del gradiente, caudales de la bomba) a partir del cromatograma discontinuo con un único adsorbente. La colocación de los límites se realiza basándose en el volumen de elución, que está vinculado y se puede convertir en tiempo a través del caudal volumétrico. La colocación de los límites es crítica para el rendimiento del procedimiento, es decir, para la pureza y la productividad del producto. Por ejemplo, la colocación incorrecta del límite de la zona de elución del producto (zona 6 en la figura 1) puede conducir a la inclusión de impurezas que se adsorben débilmente en el conjunto de productos y no cumplir con las especificaciones de pureza.

40 Sin embargo, incluso si se diseña de manera correcta inicialmente, los factores externos pueden tener un efecto perjudicial sobre la pureza del producto y sobre el rendimiento de procedimiento del procedimiento a contracorriente con múltiples adsorbentes descrito en una etapa posterior. Las fases móviles recién preparadas pueden tener una composición ligeramente diferente; las temperaturas ambientales pueden variar, influyendo en el procedimiento de adsorción cromatográfica. La capacidad de la fase estacionaria puede cambiar con el tiempo.

45 En la mayoría de los casos, estos factores conducen a un desplazamiento del perfil cromatográfico, mientras que la resolución del producto y de las impurezas sigue siendo similar. Sin embargo, el cromatograma desplazado puede tener diferentes posiciones de los picos en comparación con el cromatograma de diseño original que se utilizó para diseñar el procedimiento a contracorriente con múltiples adsorbentes.

50 Esto significa que la colocación de los límites entre las diferentes zonas basada en el cromatograma de diseño original ya no es exacta y la pureza del producto puede verse afectada como resultado de los picos desplazados.

55 Un ejemplo se muestra en la **figura 2**: aunque la ventana de recogida de producto se coloque de manera óptima (figura 2a), en el caso de una elución más temprana del cromatograma en aproximadamente 1 min, el intervalo de

elución del producto de la zona 6 (que tiene una posición fija basada en la original), carece del pico máximo del producto e incluye una parte principal de las impurezas que se adsorben fuertemente (figura 2b). Como resultado, la concentración del producto en la fracción recogida y, de manera más destacada, la pureza disminuye, de manera que el producto puede que ya no cumpla las especificaciones de pureza. Un desplazamiento de 1 min podría ser causado por un cambio de temperatura en unos pocos grados Celsius.

Cabe indicar que, normalmente, el detector sólo puede registrar una señal proporcional a la concentración acumulativa, por ejemplo una señal acumulativa de UV (línea negra gruesa, UV). Para visualizar la inclusión de impurezas en el conjunto de productos, la señal proporcional a la concentración acumulativa se descompuso numéricamente para mostrar los picos del producto y de las impurezas.

A efectos de justificar los cambios en las condiciones ambientales, debe registrarse un nuevo cromatograma de diseño para cada nueva condición que sólo puede completarse con un esfuerzo experimental extremo y prácticamente no tiene sentido.

Una forma de añadir seguridad al diseño del procedimiento es estrechar la fracción de producto (zona 6), lo que conduce a aumentar la anchura de las zonas para el reciclaje interno (zonas 5 y 7), pero esto tiene un impacto negativo en la productividad del procedimiento y sólo se puede hacer si el desplazamiento del cromatograma es significativamente menor que la anchura de la ventana de elución. Una forma más preferente para justificar las variaciones en los parámetros de funcionamiento es utilizar el control en línea. Una posibilidad es utilizar la evaluación de la posición máxima del pico o el primer momento del pico para derivar las acciones de control para la siguiente elución de producto o el siguiente ciclo.

Otra posibilidad es utilizar la evaluación del eluato de producto mediante HPLC en línea para determinar el rendimiento y la pureza.

Estos procedimientos de control para MCSGP utilizan algoritmos de control sofisticados capaces de controlar y optimizar el procedimiento basándose en un ciclo a ciclo. La ventaja de los procedimientos de control es su capacidad de realizar de manera simultánea el control del procedimiento y la optimización del procedimiento. Sus inconvenientes se encuentran en el efecto retardado de las acciones de control que resultan eficaces más pronto para la posterior elución de producto, ya que los procedimientos requieren información sobre la fase de elución del producto completo antes de ser capaces de derivar una acción de control. Otro inconveniente es el requisito de un análisis fuera de línea y la complejidad de los algoritmos de control. En general, los algoritmos de control evalúan las eluciones de producto para determinar un valor real relacionado con el rendimiento del procedimiento y/o la pureza del producto y calculan un error basándose en la diferencia entre el valor real y un valor de punto de ajuste. A continuación, se provoca una acción de control en base a la magnitud del error.

Otros procedimientos tienen por objetivo describir el procedimiento de MCSGP utilizando un modelo cromatográfico y utilizan el modelo para predecir el rendimiento del procedimiento y realizar la optimización (control predictivo basado en modelos). A pesar de ser potentes, estos procedimientos son difíciles de aplicar en la práctica, ya que necesitan una descripción precisa del procedimiento y la separación cromatográfica basada en una serie de parámetros relacionados con los compuestos a separar y con las fases estacionarias y móviles cromatográficas para utilizar, los cuales son difíciles y requieren mucho tiempo para ser determinados y requieren un conocimiento de modelaje importante.

La **figura 3** muestra el cromatograma que utiliza un procedimiento que comprende

- (a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba durante el reciclaje interno de las impurezas que se adsorben débilmente (fase I1)
- (b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido, mientras que la pendiente de la señal proporcional a la concentración es positiva, y después de alcanzar el umbral
- (c) detener la ejecución de la fase I1 e iniciar la fase B1, teniendo la fase B1 una duración fija o variable dependiente de otro umbral.

En este caso, la señal proporcional a la concentración es la señal de UV y el umbral de UV es de 0,6 UA y la duración fija de B1 es de 1,5 ml.

La **figura 4** muestra el cromatograma que utiliza un procedimiento que comprende

- (a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba durante el reciclaje interno de las impurezas que se adsorben débilmente (fase I1)
- (b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido, mientras que la pendiente de la señal proporcional a la concentración es positiva, y después de alcanzar el umbral
- (c) continuar la fase I1 durante un período de tiempo o volumen de elución (retraso) antes de detener la ejecución de la fase I1 e iniciar la fase B1, teniendo la fase B1 una duración fija, y teniendo el retraso una duración prefijada o variable que depende de otro umbral.

En este ejemplo, lo siguiente es cierto: la señal proporcional a la concentración es la señal de UV, el umbral es de

0,5 UA, el volumen de retraso es de 1,1 ml, la recogida (fija) de producto B1 es de 1,5 ml.

La **figura 5** muestra el cromatograma que utiliza un procedimiento con una modificación del procedimiento anterior, de manera que la fase B1 se inicia basándose en un valor umbral, que puede ser el mismo o diferente del valor umbral utilizado para provocar el período de retraso en la fase I1 y en el que el periodo de retraso puede estar asociado con un valor mínimo. La razón para la asignación de una duración mínima al retraso es evitar el inicio prematuro de la fase B1 debido a las impurezas que se eluyen antes del producto principal y que alcanzan el valor del segundo umbral. El período de retraso se puede formular en términos de tiempo o volumen. En este ejemplo lo siguiente es cierto: la señal proporcional a la concentración es la señal de UV, el umbral 1: 0,5 UA, el periodo mínimo de retraso es de 1,0 ml, el umbral 2: 0,6 UA, la recogida (fija) de producto B1 es de 1,5 ml.

La **figura 6** muestra el cromatograma que utiliza un procedimiento que comprende
 (a) monitorizar la pendiente y/o el valor de la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente que eluye el producto (fase B1) y,
 (b) comparar de manera continua el valor de la señal proporcional a la concentración con un valor umbral definido, mientras la pendiente de la señal proporcional a la concentración es negativa, y después de alcanzar el umbral
 (c) detener la ejecución de la fase B1 e iniciar la fase I2, en el que la carga de la muestra se modula, de manera que la carga de la muestra tiene lugar al comienzo de la fase B1 y se detiene después de un corto periodo de tiempo, mientras que la elución del otro adsorbente está en curso hasta que se alcanza el umbral, y teniendo I2 una duración prefijada o variable que depende de otro umbral.

Aquí, la señal proporcional a la concentración es la señal de UV, el umbral es de 0,2 UA, la duración fija del intervalo de alimentación es de 0,5 ml, la duración fija de la fase I2 es de 1,2 ml.

La **figura 7** muestra el cromatograma que utiliza un procedimiento en el que el punto final de I2 se determina mediante un valor umbral, en el que, a medida que se alcanza este umbral, (c) se detiene la ejecución de la fase I2 y se inicia la fase B2. Aquí, la señal proporcional a la concentración es la señal de UV, el umbral 1 para el inicio de I2: 0,2 UA, la duración fija del intervalo de alimentación es de 0,5 ml, el umbral 2 para el final de I2: 0,1 UA.

Cualquiera de los procedimientos anteriores relacionados con el inicio de la fase B1 se puede combinar con procedimientos relacionados con la terminación de la fase B1.

La **figura 8** muestra una combinación de los procedimientos a los que se hace referencia en las figuras 5 y 6 con el inicio del período de retraso dentro de I1 basándose en un primer umbral, el inicio de la fase B1 de recogida de producto basándose en un segundo umbral, mientras que la pendiente de la señal de UV es positiva y la terminación de la fase B1 (y el inicio de la fase I2) basándose en un tercer umbral.

En otras realizaciones preferentes de cualquiera de los procedimientos anteriores, se utiliza la información adicional de la pendiente del cromatograma para provocar acciones de control. En una realización preferente del procedimiento, los procedimientos anteriores que utilizan, en cambio, un volumen de retraso con duración fija, pueden utilizar un cambio en el signo de la pendiente como criterio para detener el retraso y continuar la evaluación de la señal para alcanzar el segundo umbral.

Todos los procedimientos incluyen continuar la ejecución y alargar el gradiente de elución a lo largo de las fases I1, B1, I2, de manera preferente, en la pendiente del gradiente utilizado en la fase 4 durante la elución del compuesto "W", en relación a la pendiente con respecto al volumen de la fase móvil utilizado en el procedimiento. Esto significa que el gradiente de elución del procedimiento con múltiples adsorbentes tiene una pendiente constante con respecto al volumen de fase móvil utilizado en el procedimiento durante las fases I1, B1, I2, tal como se ilustra en las figuras 3-8.

En los procedimientos descritos, los umbrales también pueden definirse basándose en la información obtenida durante la misma ejecución o ciclo, de este modo no pueden conocerse cuando se inicia una ejecución o ciclo. En este caso, un primer ciclo puede ejecutarse parcial o completamente antes de que el procedimiento determine los valores umbral basándose en la evaluación de las señales registradas válidas para el resto del ciclo (en caso de que el ciclo se haya completado parcialmente en el momento de la evaluación) o para el resto de la ejecución del procedimiento cromatográfico. De este modo, el umbral para detener una fase del procedimiento e iniciar una nueva fase del procedimiento se define en relación a la señal proporcional a la concentración registrada durante la misma ejecución o una ejecución anterior del procedimiento cromatográfico. Como ejemplo, el procedimiento monitoriza la señal de UV durante el funcionamiento de una ejecución cromatográfica de MCSGP. El procedimiento ha sido configurado, de manera que detiene la fase B1 e inicia la fase I2 tan pronto como se ha alcanzado el 25% del valor máximo de UV que debe obtenerse durante la fase B1. Durante la fase B1, se eluye un pico con un valor máximo de pico de 0,80 UA (véase la figura 6). Tan pronto como el procedimiento alcanza el 25% del valor máximo de pico, correspondiente a 0,20 UA, la fase B1 se detiene y el procedimiento continúa con la fase I2. En el ciclo posterior, durante la fase B1, el valor máximo de pico puede solamente alcanzar 0,72 UA (por ejemplo, debido a variaciones en la calidad del adsorbente). Configurando el procedimiento para que actúe cuando alcanza el 25% del valor máximo de pico alcanzado durante la fase B1, el procedimiento continuaría hasta alcanzar un umbral de 0,18 UA,

después de lo cual la fase B1 se detendría y la fase I2 fase se iniciaría. Este tipo de configuración del procedimiento relativo a un umbral con respecto a un valor proporcional a la concentración obtenido previamente durante la ejecución, permite equilibrar las variaciones en la calidad de adsorbente o la calidad del detector o la calibración del detector. El procedimiento también incluye la utilización del número de picos contados en el cromatograma para provocar una acción de control.

Ejemplo 1 [figura 9]:

Se hizo funcionar un sistema Contichrom (ChromaCon AG) utilizando el procedimiento de control (A). Dos columnas, empaquetadas con fases estacionarias de intercambio catiónico diferentes (Fractoprep SO3(M) y Gigacap SO3), se empaquetaron en columnas de 0,5 cm de diámetro interior y 10 cm de altura de lecho. Se utilizaron las dos resinas diferentes para simular las columnas con diferente calidad de relleno de la columna. El software de funcionamiento del sistema se programó para monitorizar de manera continua la señal de UV a A280 en ambas salidas de la columna y el umbral de UV para el inicio de la fase de recogida de producto se ajustó a 0,1 UA (= 100 mUA) basándose en el conocimiento del cromatograma de diseño. La duración de la fase de elución del producto se fijó a 5,5 minutos.

El material de carga fue una solución de lisozima y los tampones utilizados fueron tampón A: fosfato 25 mM, pH 6,0; tampón B: fosfato 25 mM, pH 6,0, NaCl 1 M; solución de limpieza: NaOH 1M. La figura 9A muestra los cromatogramas de la operación cíclica del procedimiento MCSGP sobre 10 ciclos con los repetitivos picos de elución del producto de cada columna. Se puede observar que los picos de producto tienen una anchura y altura muy diferentes (picos Fractoprep anchos, picos Gigacap estrechos), dependiendo de qué columna se eluyen. La figura 9B muestra un solapamiento de los cromatogramas de los 10 ciclos y confirma que las eluciones de producto de cada columna son muy reproducibles en comparación entre las eluciones de producto de la misma columna. Además, la figura muestra la posición de la válvula de salida que se utiliza (V1b, V2b), que es representativa de las fases del procedimiento. La posición de la válvula 4 corresponde a la fase I1, la posición 3 a la fase B1, la posición 4 a la fase I2 y las posiciones 1 y 5 corresponden a la fase B2.

Los cromatogramas muestran que, a pesar de unas formas de pico muy diferentes, la recogida de producto se inicia en el umbral fijado de 0,1 UA y que la recogida de producto se realiza con una duración fija, recogiendo los picos máximos en ambos casos que corresponden a la mayor concentración y pureza del producto.

La **figura 10** muestra un esquema de un procedimiento similar al ilustrado en la figura 1, en el que en a) se muestra una configuración que implica 3 adsorbentes y en b) una configuración que implica 4 adsorbentes.

En a) con los 3 adsorbentes, las cuatro líneas superiores de I1 a B2 corresponden esencialmente, en cuanto a las tareas de los adsorbentes 1 y 2 se refiere, al procedimiento, tal como se ilustra en la figura 1. El adsorbente 3 es pasivo en lo que se refiere al procedimiento de separación real que implica los componentes W (fracción que se adsorbe débilmente), P (fracción de producto) y S (fracción que se adsorbe fuertemente). La columna 3 puede someterse a las etapas de limpieza, equilibrado o reacción en este primer bloque.

Después de la transición al segundo bloque I1-B2 (transición ilustrada por la flecha superior de la izquierda), el adsorbente 1 del primer bloque asume la función del adsorbente 2 en el primer bloque, el adsorbente 2 del primer bloque asume la función del adsorbente 3 en el primer bloque (función pasiva) y el adsorbente 3 del primer bloque asume la función del adsorbente 1 en el primer bloque.

Después de la transición al tercer bloque I1-B2 (transición ilustrada por la flecha inferior de la izquierda), el adsorbente 1 asume la función del adsorbente 3 en el primer bloque (función pasiva), el adsorbente 2 asume la función del adsorbente 1 en el primer bloque y el adsorbente 3 asume la función del adsorbente 2 en el primer bloque.

Las señales proporcionales a la concentración se pueden medir en el procedimiento con tres adsorbente en la figura 10 a en la salida de las columnas activas, como en el primer bloque de la parte superior en la salida de las columnas 1 y 2 (tal como se detalla en la descripción de la figura 1), en el segundo bloque de la parte superior de forma análoga en la salida de las columnas 1 y 3, y en el bloque inferior de forma análoga en la salida de las columnas 2 y 3. De manera preferente, sólo se mide la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba de los dos activos en el modo interconectado (I1, I2) y en la fase discontinua del que eluye el producto (B1), como, por ejemplo, en la salida del adsorbente 2 en las etapas 1-4 (primer bloque), en la salida del adsorbente 1 en las etapas 5-8 (segundo bloque) y en la salida del adsorbente 3 en las etapas 9-12 (bloque 3).

En la figura 10 b) con los 4 adsorbentes, las cuatro líneas superiores de I1 a B2 corresponden esencialmente, en cuanto a las tareas de los adsorbentes 1 y 2 se refiere, al procedimiento, tal como se ilustra en la figura 1. Los adsorbentes 3 y 4 son pasivos en lo que se refiere al procedimiento de separación real que implica los componentes W (fracción que se adsorbe débilmente), P (fracción de producto) y S (fracción que se adsorbe fuertemente). Los adsorbentes 3 y 4 pueden someterse a las etapas de limpieza, equilibrado o reacción en este primer bloque.

Después de la transición al segundo bloque I1-B2 (transición ilustrada por la flecha superior de la izquierda), el adsorbente 1 del primer bloque asume la función del adsorbente 2 en el primer bloque, el adsorbente 2 del primer bloque asume la función del adsorbente 3 en el primer bloque (función pasiva), el adsorbente 3 del primer bloque asume la función del adsorbente 4 en el primer bloque (función pasiva) y el adsorbente 4 del primer bloque asume la función del adsorbente 1 en el primer bloque.

Después de la transición al tercer bloque I1-B2 (transición ilustrada por la flecha central de la izquierda), el adsorbente 1 asume la función del adsorbente 3 en el primer bloque (función pasiva), el adsorbente 2 asume la función del adsorbente 4 en el primer bloque (función pasiva), el adsorbente 3 asume la función del adsorbente 1 en el primer bloque y el adsorbente 4 asume la función del adsorbente 2 en el primer bloque.

Después de la transición al cuarto bloque I1-B2 (transición ilustrada por la flecha inferior de la izquierda), el adsorbente 1 asume la función del adsorbente 4 en el primer bloque, el adsorbente 2 asume la función del adsorbente 1 en el primer bloque, el adsorbente 3 asume la función del adsorbente 2 en el primer bloque y el adsorbente 4 asume la función del adsorbente 3 en el primer bloque.

Las señales proporcionales a la concentración se pueden medir de nuevo en el procedimiento con cuatro adsorbentes en la figura 10 b en la salida de los adsorbentes activos, como en el primer bloque de la parte superior en la salida de los adsorbentes 1 y 2 (tal como se detalla en la descripción de la figura 1), en el segundo bloque de la parte superior de forma análoga en la salida de los adsorbentes 1 y 4, en el tercer bloque en la salida de los adsorbentes 3 y 4 y en el bloque inferior de forma análoga en la salida de los adsorbentes 2 y 3. De nuevo, de manera preferente, se mide sólo la señal proporcional a la concentración en la salida del adsorbente aguas arriba de los dos activos y en la fase discontinua del que eluye el producto (B1), como en la salida del adsorbente 2 en las etapas 1-4 (primer bloque), en la salida del adsorbente 1 en las etapas 5-8 (segundo bloque) y en la salida del adsorbente 4 en las etapas 9-12 (bloque 3) y en la salida del adsorbente 3 en las etapas 13-16 (bloque 4).

LISTA DE LOS SIGNOS DE REFERENCIA

1	zona de equilibrado	B1	primera fase discontinua
2	zona de alimentación	I1	primera fase interconectada
3	zona de lavado	B2	segunda fase discontinua
4	zona de elución para W	I2	segunda fase interconectada
5	zona de reciclaje de solapamiento, elución de la parte de solapamiento W/P	W	fracción de impurezas que se adsorbe débilmente
6	zona de elución del producto P puro	P	fracción/compuestos del producto deseado
7	zona de reciclaje de solapamiento, elución de la parte de solapamiento P/S	S	fracción de impurezas que se adsorbe fuertemente
8	zona de limpieza y reequilibrado	UV	señal UV
		V	volumen
I	fase interconectada	t	tiempo
B	fase discontinua	Q	caudal volumétrico

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para monitorizar, evaluar y controlar un procedimiento de purificación cromatográfica cíclica que implica, como mínimo, dos adsorbentes, a través de los cuales, pasa un líquido con una mezcla de alimentación (Alimentación), que comprende los componentes del producto deseado (P), así como impurezas (W, S), comprendiendo dicho procedimiento de purificación, como mínimo, dos fases diferentes (I, B), como mínimo, una fase interconectada (I), en la que los dos adsorbentes están interconectados de manera que la salida de un adsorbente aguas arriba está conectada con conexión de fluidos a la entrada de un adsorbente aguas abajo, y
- 10 como mínimo, una fase discontinua (B), en la que, como mínimo, un adsorbente no está conectado con conexión de fluidos a los otros y en la que los componentes del producto deseado (P) se recuperan en forma purificada desde un adsorbente desconectado, en el que el procedimiento comprende, como mínimo, las siguientes etapas:
- 15 a. monitorización del cromatograma que incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido;
- b. evaluación del cromatograma que incluye una comparación, como mínimo, de una de dichas señales proporcionales a la concentración actual medida en la etapa a. con un valor umbral de la misma;
- 20 c. control del procedimiento de purificación cromatográfica mediante la adaptación de la terminación de la fase actualmente en ejecución en función de la comparación de la etapa b. e inicio de la siguiente fase, en el que la secuencia de a-c se lleva a cabo en un orden determinado, como mínimo, dos veces.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la señal proporcional a la concentración se tiene en cuenta en términos, como mínimo, de uno de su valor absoluto, su integral, su pendiente y el signo de su pendiente, en el que, de manera preferente, se tiene en cuenta una combinación de éstos, de la manera más preferente, una combinación del valor absoluto y el signo de su pendiente.
- 25 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la señal proporcional a la concentración medida en la etapa a. se mide en la salida, como mínimo, de un adsorbente, de manera preferente, en la salida de dos adsorbentes o en la salida de todos los adsorbentes, y en el que, de manera más preferente, la señal proporcional a la concentración se mide, como mínimo, en una de las siguientes posiciones: la salida de un adsorbente que está en una fase de elución discontinua (B1) del producto deseado, la salida de un adsorbente aguas arriba en una fase interconectada (I1, I2).
- 30 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho procedimiento de purificación comprende, como mínimo, cuatro fases diferentes (I1, B1, I2, B2) en un orden determinado, como mínimo, una primera fase interconectada (I1), en la que dos adsorbentes están interconectados, de manera que la salida de un adsorbente aguas arriba está conectada con conexión de fluidos a la entrada de un adsorbente aguas abajo, el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba, y los componentes del producto deseado (P), así como impurezas que se adsorben débilmente (W), se transfieren desde el adsorbente
- 40 aguas arriba al adsorbente aguas abajo, de manera preferente, hasta que esencialmente sólo los componentes del producto deseado (P) salen por la salida del adsorbente aguas arriba, en la que, de manera preferente, se lleva a cabo una dilución en línea entre el adsorbente aguas arriba y el adsorbente aguas abajo;
- 45 como mínimo, una primera fase discontinua (B1), en la que los adsorbentes no están conectados con conexión de fluidos, y en la que se introduce el disolvente por medio de la entrada en un adsorbente aguas arriba desde la primera fase interconectada (I1) y a través de la salida de este adsorbente que eluye el producto, se recogen los componentes del producto deseado (P), mientras que el líquido con una mezcla de alimentación (Alimentación) se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas abajo de la primera fase interconectada (I1) y a través de la salida de este adsorbente, de manera preferente, se recogen las impurezas que se adsorben débilmente;
- 50 como mínimo, una segunda fase interconectada (I2), en la que dos adsorbentes están interconectados, de manera que la salida del adsorbente aguas arriba de la primera fase interconectada (I1) está conectada a la entrada del adsorbente aguas abajo de la primera fase interconectada (I1), el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba, y los componentes del producto deseado (P), así como impurezas que se adsorben fuertemente (S), se transfieren desde el adsorbente aguas arriba al adsorbente aguas abajo, de manera preferente, hasta que esencialmente no salen más componentes de producto deseado (P) mediante la salida del adsorbente
- 55 aguas arriba, en la que, de manera más preferente, se lleva a cabo una dilución en línea entre el adsorbente aguas arriba y el adsorbente aguas abajo;
- y, como mínimo, una segunda fase discontinua (B2), en la que los adsorbentes no están conectados con conexión de fluidos, y en la que se introduce el disolvente por medio de la entrada en el adsorbente aguas arriba de la segunda fase interconectada (I2) y a través de la salida de este primer adsorbente aguas arriba se recogen las impurezas que se adsorben fuertemente (S), mientras que el disolvente se introduce por medio de la entrada en el adsorbente aguas abajo de la segunda fase interconectada (I2) y a través de la salida de este primer adsorbente aguas abajo, se recogen las impurezas que se adsorben débilmente,
- 60 en el que las funciones de las fases (I1, B1, I2, B2) se realizan de forma sincrónica o, de manera preferente, de forma secuencial, y se llevan a cabo de una manera cíclica, como mínimo, dos veces, en el que cuando se ciclan después o dentro de un tiempo de conmutación, el primer adsorbente aguas arriba de la segunda fase discontinua (B2) se desplaza para convertirse en el adsorbente aguas abajo en la siguiente primera fase interconectada (I1), y el
- 65

primer adsorbente aguas abajo de la segunda fase discontinua se desplaza para convertirse en el adsorbente aguas arriba en la siguiente primera fase interconectada (I1).

5 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la etapa a. incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente aguas arriba en la primera fase interconectada (I1), en la que se mide, de manera preferente, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos.

10 6. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que se miden el valor absoluto y, de manera preferente, también el signo de su pendiente, y en el que después de superar un umbral de valor absoluto, se inicia la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada después de monitorización, evaluación y control adicionales, o, en el que después de superar un umbral de valor absoluto, se espera un retraso fijo hasta que se inicia la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada después de monitorización, evaluación y control adicionales, o, en el que después de superar un primer umbral de valor absoluto, se espera un retraso fijo mínimo y después de superar un segundo umbral de valor absoluto, de manera preferente, con la comprobación de la condición adicional de que su pendiente sea positiva, se inicia la siguiente primera fase discontinua (B1), ya sea como una primera fase discontinua de duración fija o como una primera fase discontinua que tiene una duración adaptada después de una monitorización, evaluación y control adicionales.

25 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 4-6, en el que la etapa a. incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente que eluye el producto en la primera fase discontinua (B1), en la que se mide, de manera preferente, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos.

30 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que después de caer por debajo de un umbral de valor absoluto, de manera preferente, con la comprobación de la condición adicional de que su pendiente sea negativa, se inicia la siguiente segunda fase interconectada (I2), ya sea como una segunda fase interconectada de duración fija o como una segunda fase interconectada que tiene una duración adaptada después de una monitorización, evaluación y control adicionales, en el que, de manera preferente, se inicia la alimentación del adsorbente que no eluye producto en la primera fase discontinua (B1) al comienzo de la primera fase discontinua (B1) y, de manera preferente, se detiene, normalmente, después de un tiempo de alimentación fija, antes de iniciar la conmutación a la posterior fase interconectada (I2).

35 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 7-8, en el que la etapa a. incluye la medición, como mínimo, de una señal proporcional a la concentración actual en el líquido en la salida del adsorbente aguas arriba en la segunda fase interconectada (I2), en el que se mide, de manera preferente, como mínimo, uno del valor absoluto y el signo de su pendiente, de manera preferente, una combinación de los dos, en el que, de manera preferente, con la comprobación de la condición adicional de que su pendiente sea negativa, después de caer por debajo de un umbral de valor absoluto, se inicia la siguiente segunda fase discontinua (B2), ya sea como una segunda fase discontinua de duración fija o como una segunda fase que tiene una duración adaptada después de una monitorización, evaluación y control adicionales.

40 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento cromatográfico cíclico utiliza, como mínimo, dos adsorbentes y cada ciclo comprende, como mínimo, dos fases interconectadas (I1, I2), en las que dos adsorbentes están conectados con conexión de fluidos para el reciclaje interno de diferentes fracciones secundarias parcialmente puras (W/P, P/S), y en el que, de manera preferente, en la etapa a. se mide, como mínimo, uno de la señal absoluta y su pendiente en la salida del respectivo adsorbente aguas arriba.

45 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se utiliza un cambio del signo de la pendiente como criterio para una acción de control.

50 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un gradiente de elución del procedimiento tiene una pendiente constante con respecto al volumen de fase móvil líquida utilizada en el procedimiento sobre las fases interconectadas y la primera fase discontinua (I1, B1, I2) o una pendiente de cero.

55 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el umbral para detener una fase del procedimiento e iniciar una nueva fase del procedimiento se define en relación a la señal proporcional a la concentración registrada durante el mismo ciclo o un ciclo anterior del procedimiento cromatográfico.

60 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se provoca una acción de control basándose en si no se alcanza un umbral definido dentro de un volumen de elución o tiempo o concentración de gradiente predeterminados.

15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la señal proporcional a la concentración se basa en la medición de luz visible, UV, infrarroja, fluorescencia, Raman, fuerza iónica, conductividad o índice de refracción.

5

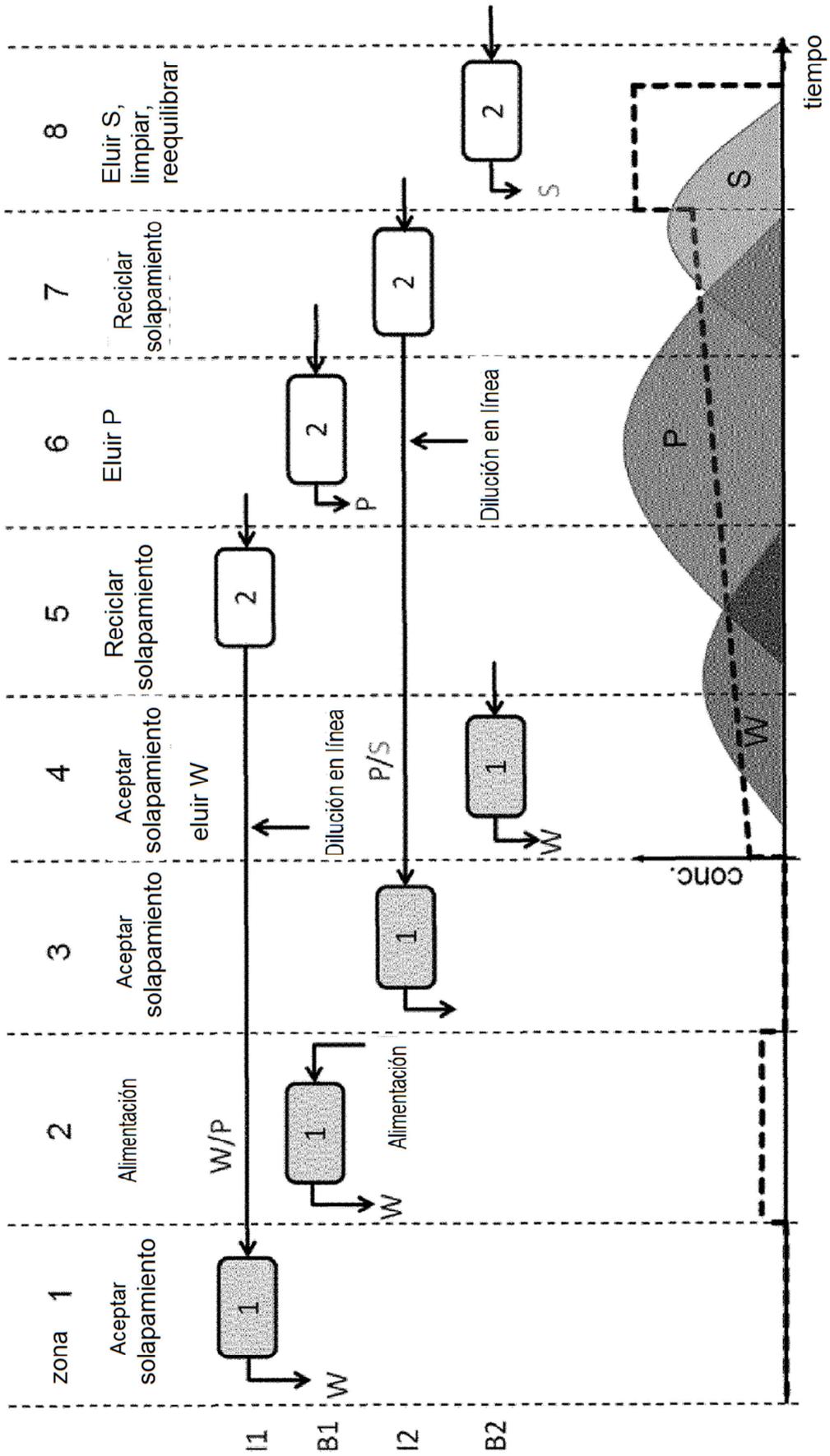


FIG. 1

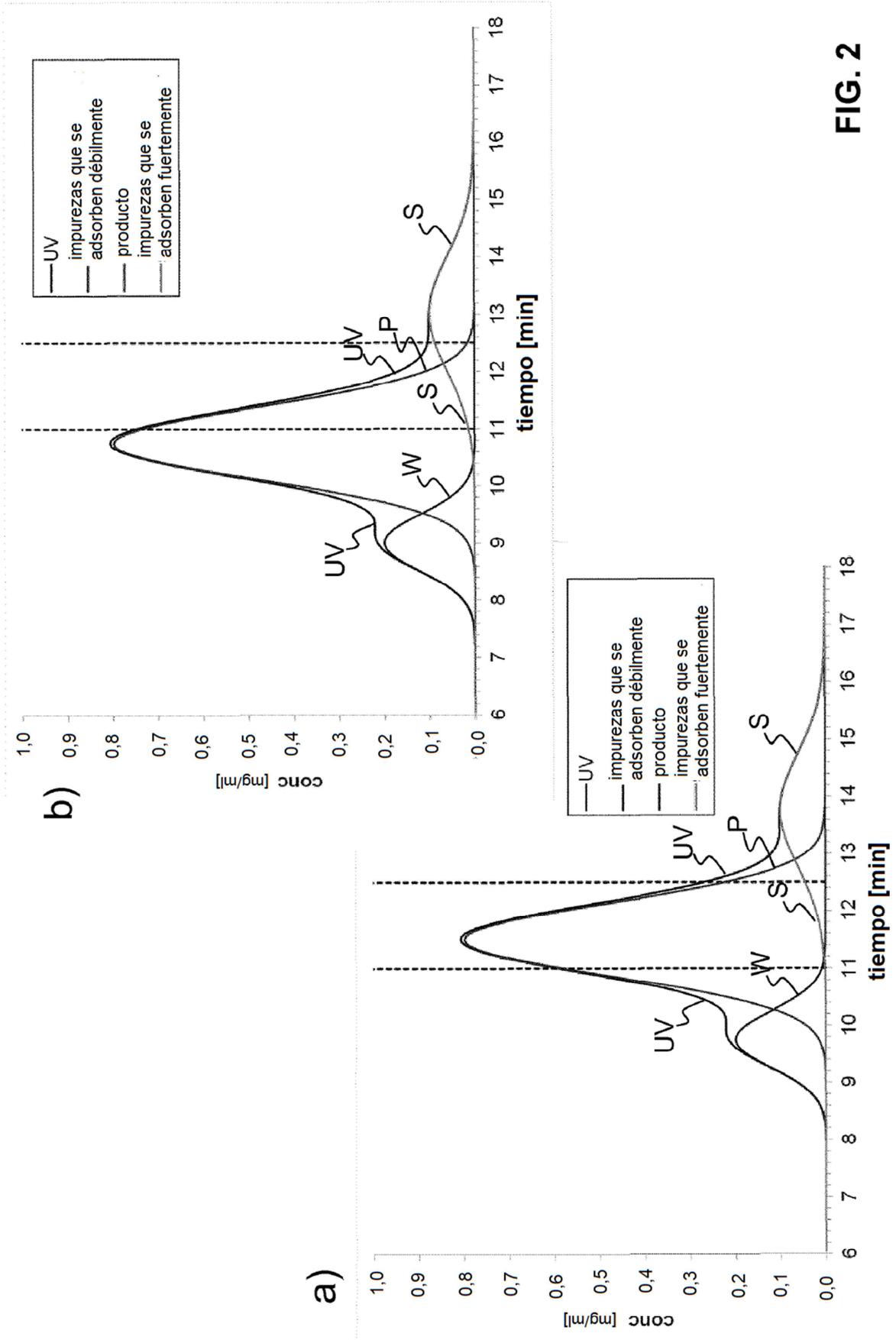


FIG. 2

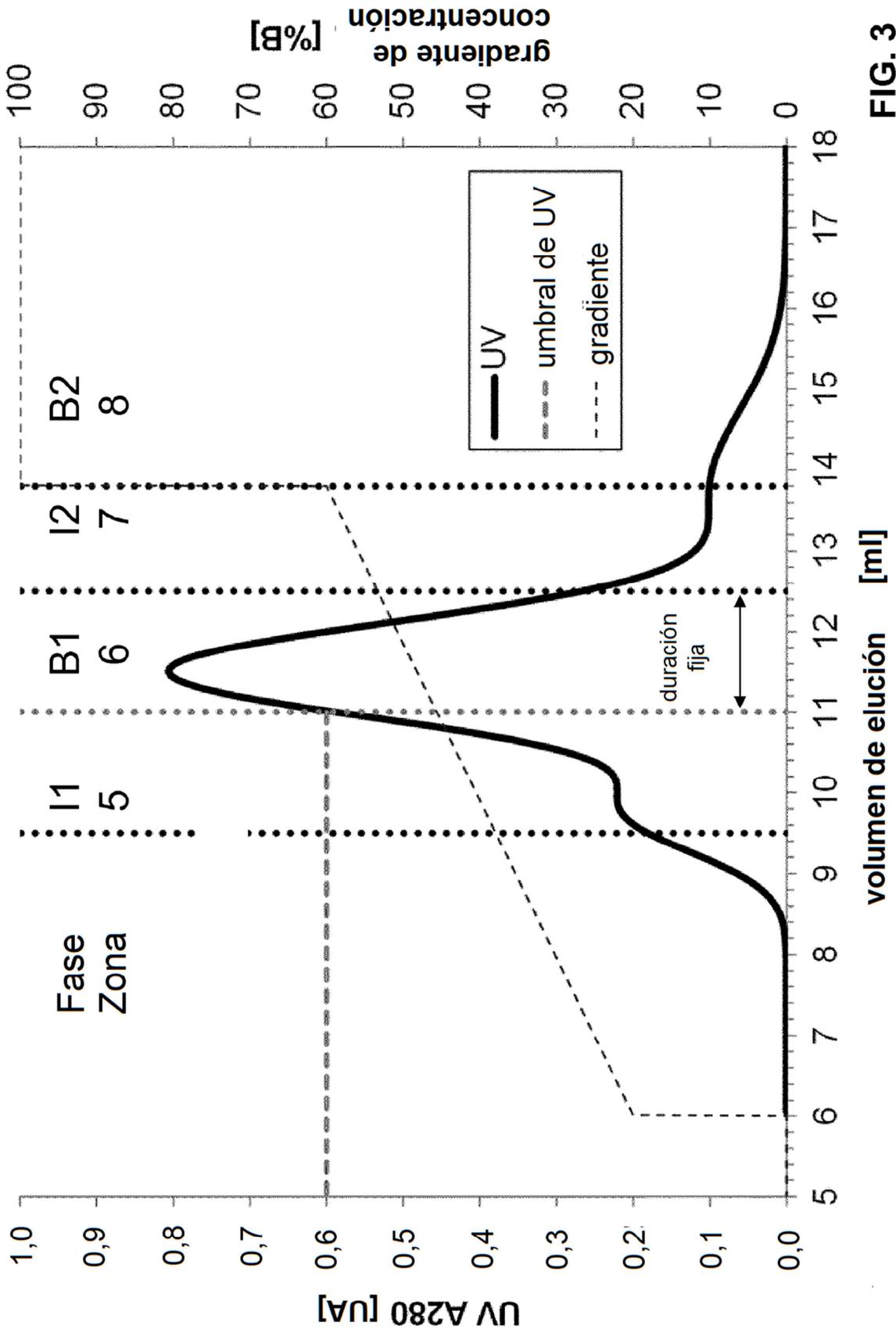
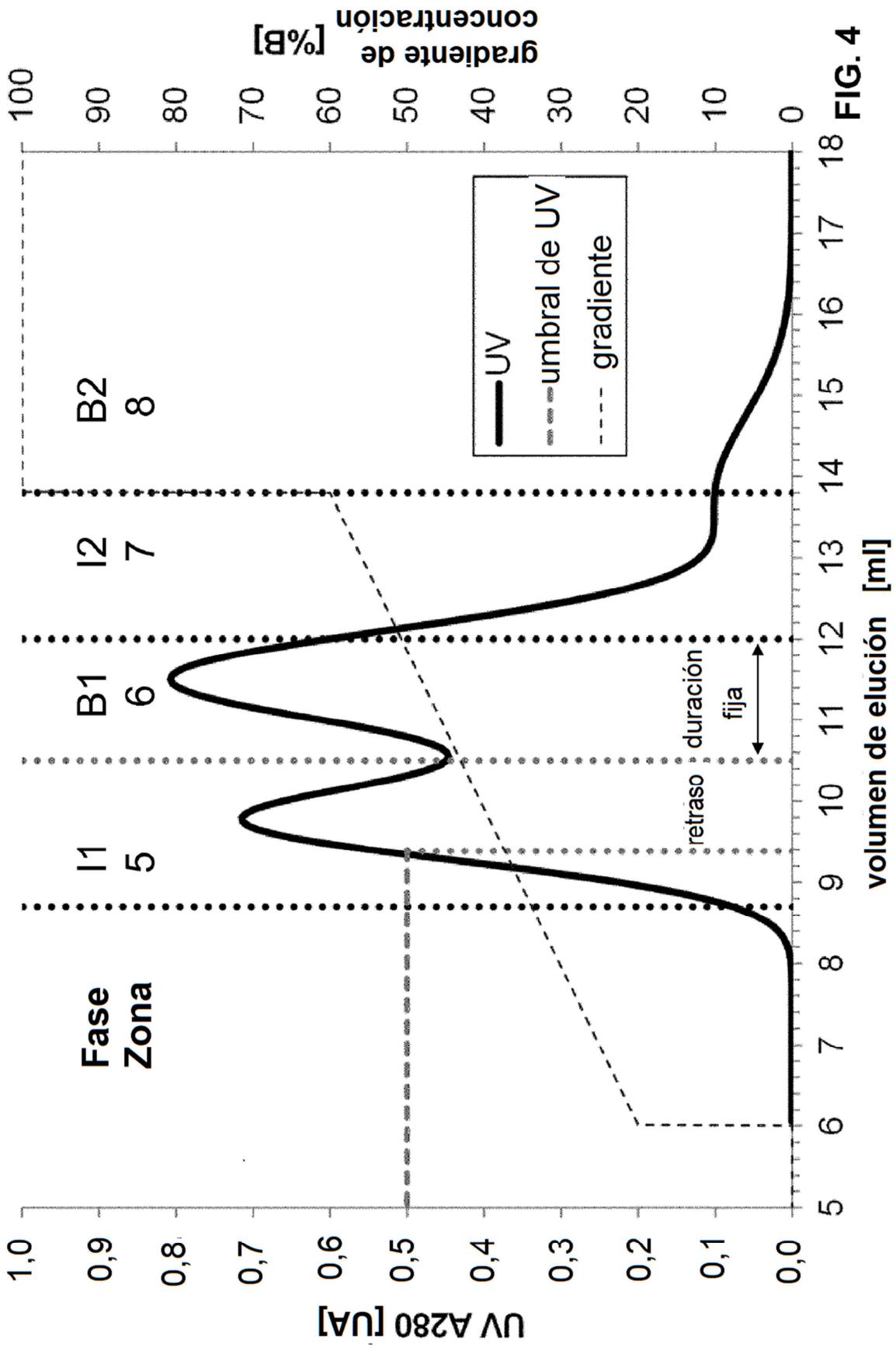


FIG. 3



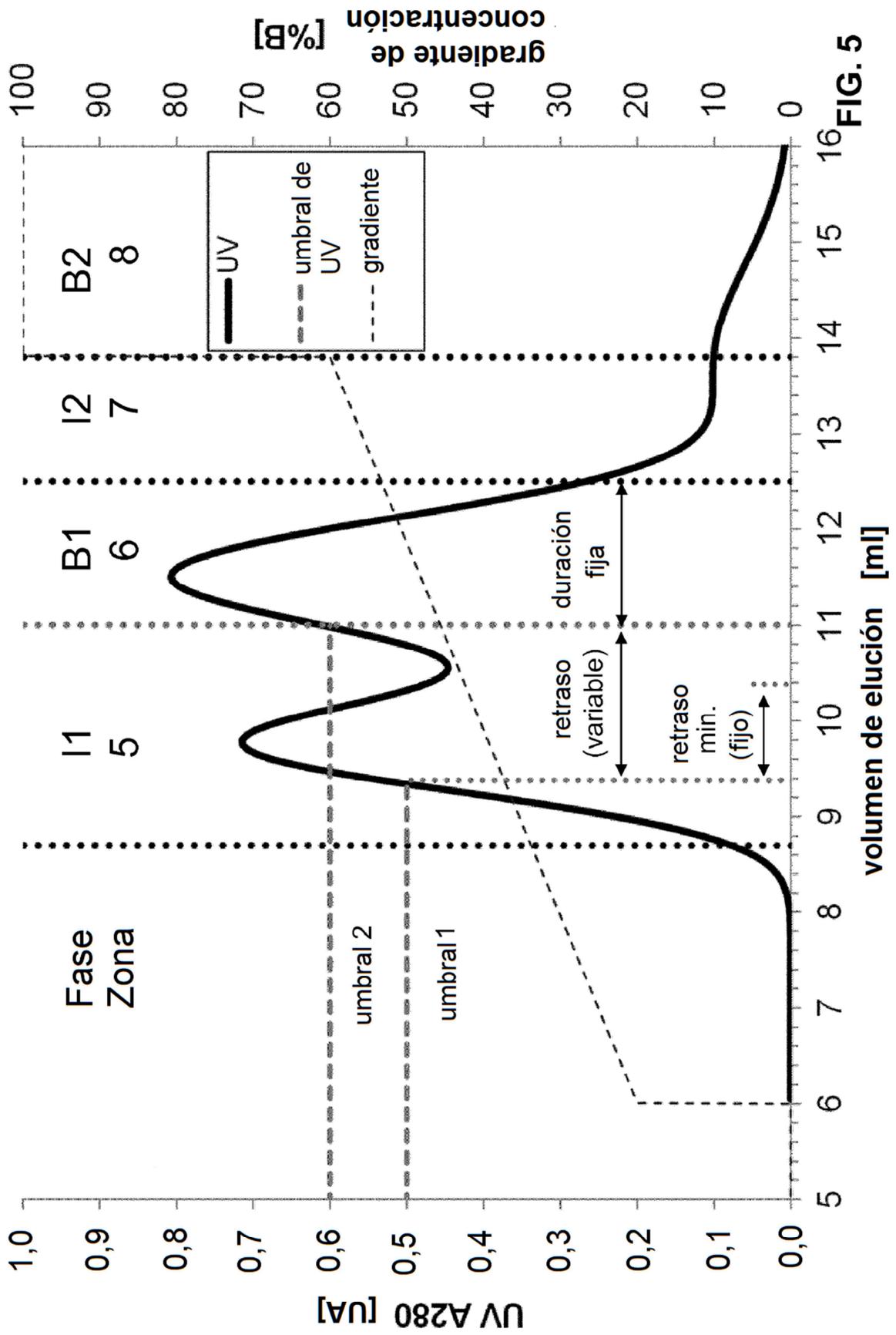


FIG. 5

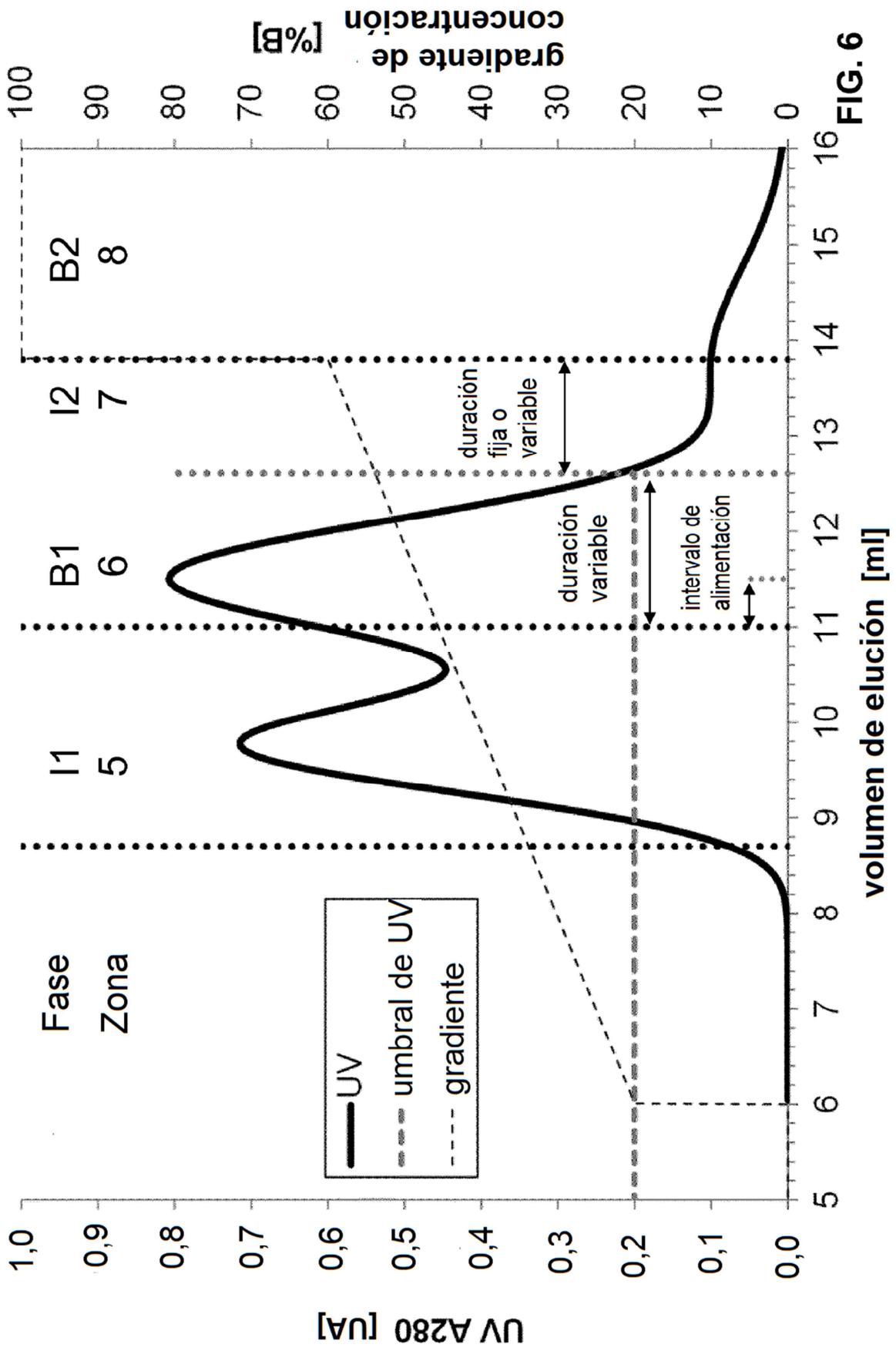


FIG. 6

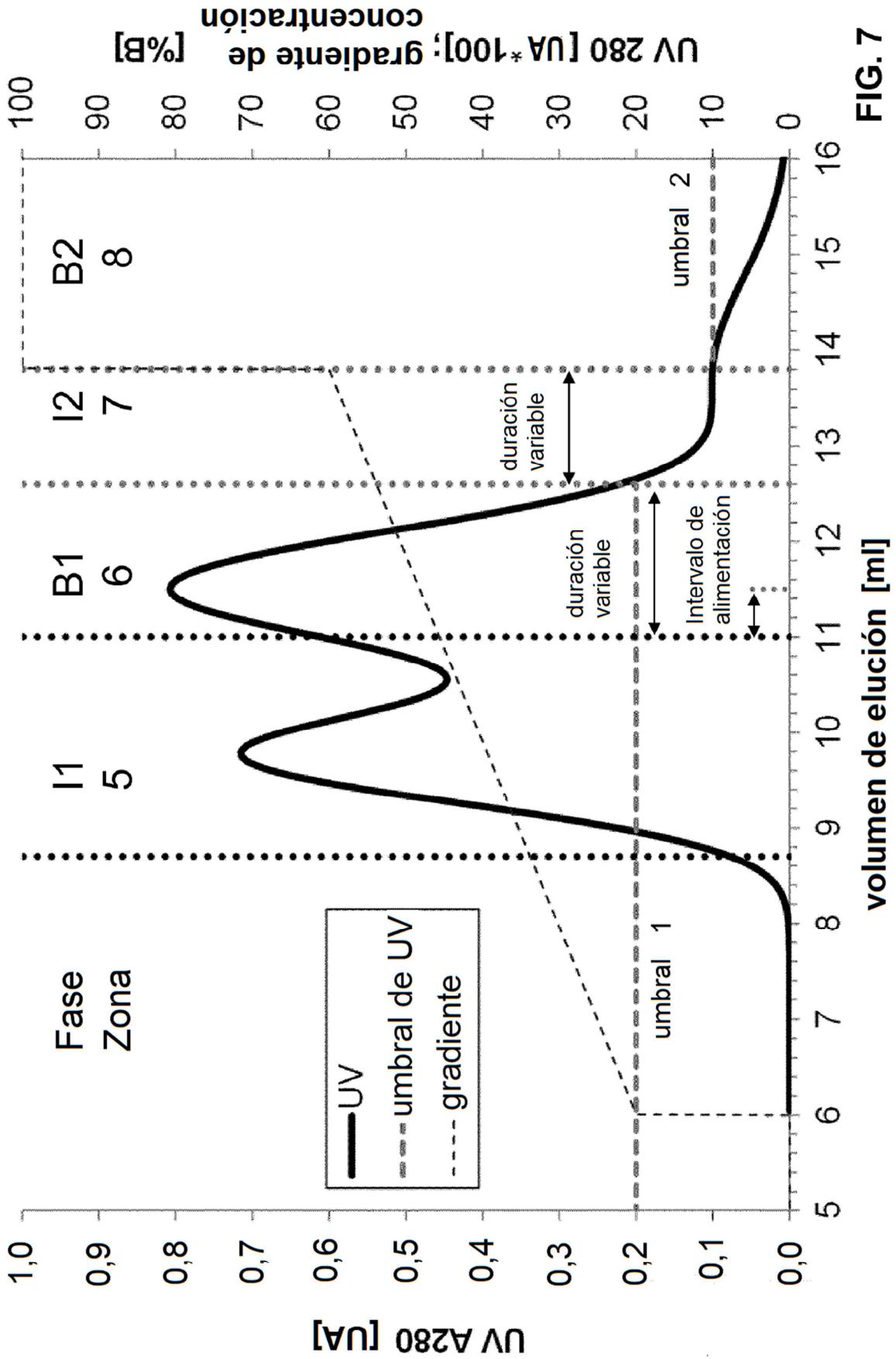


FIG. 7

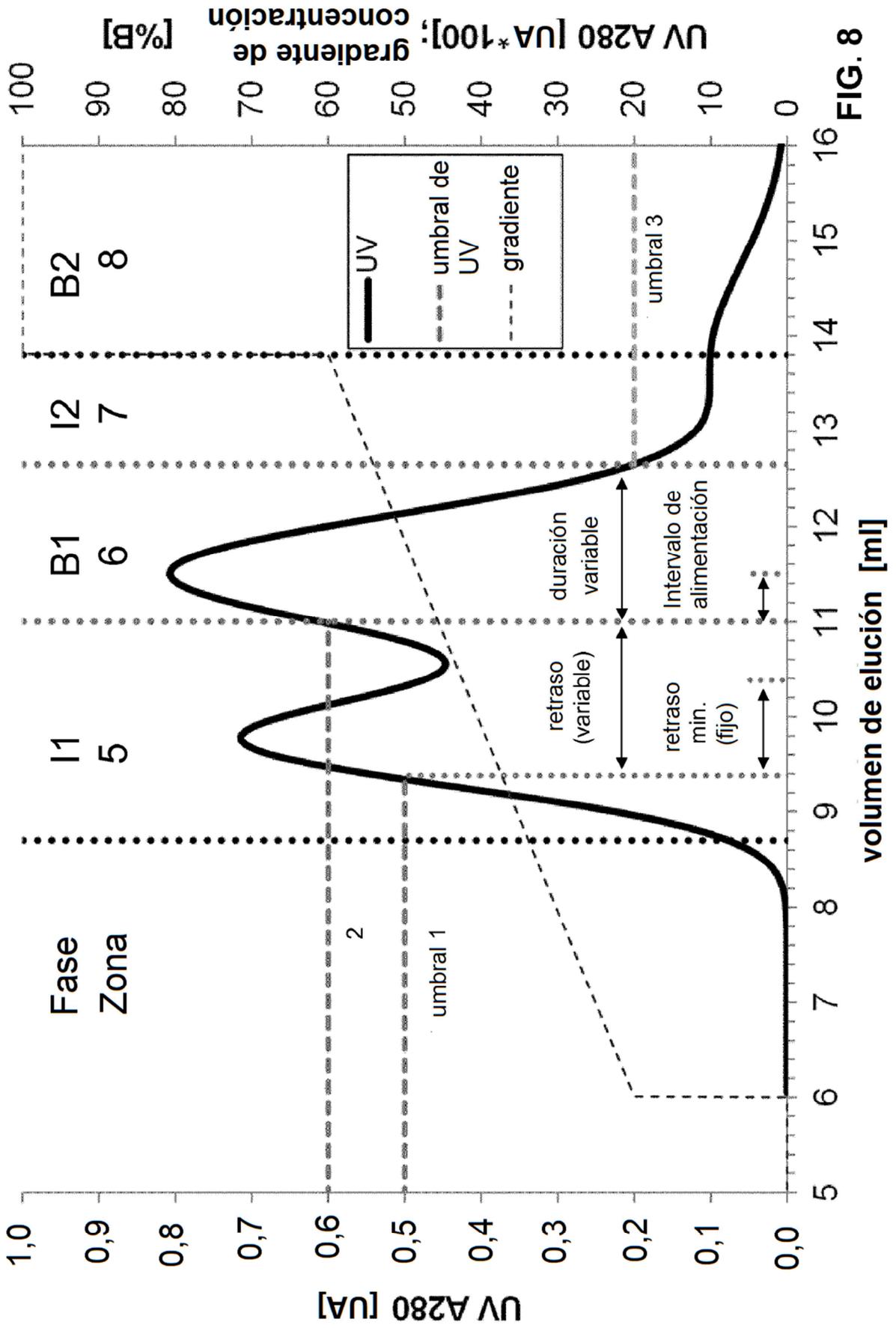
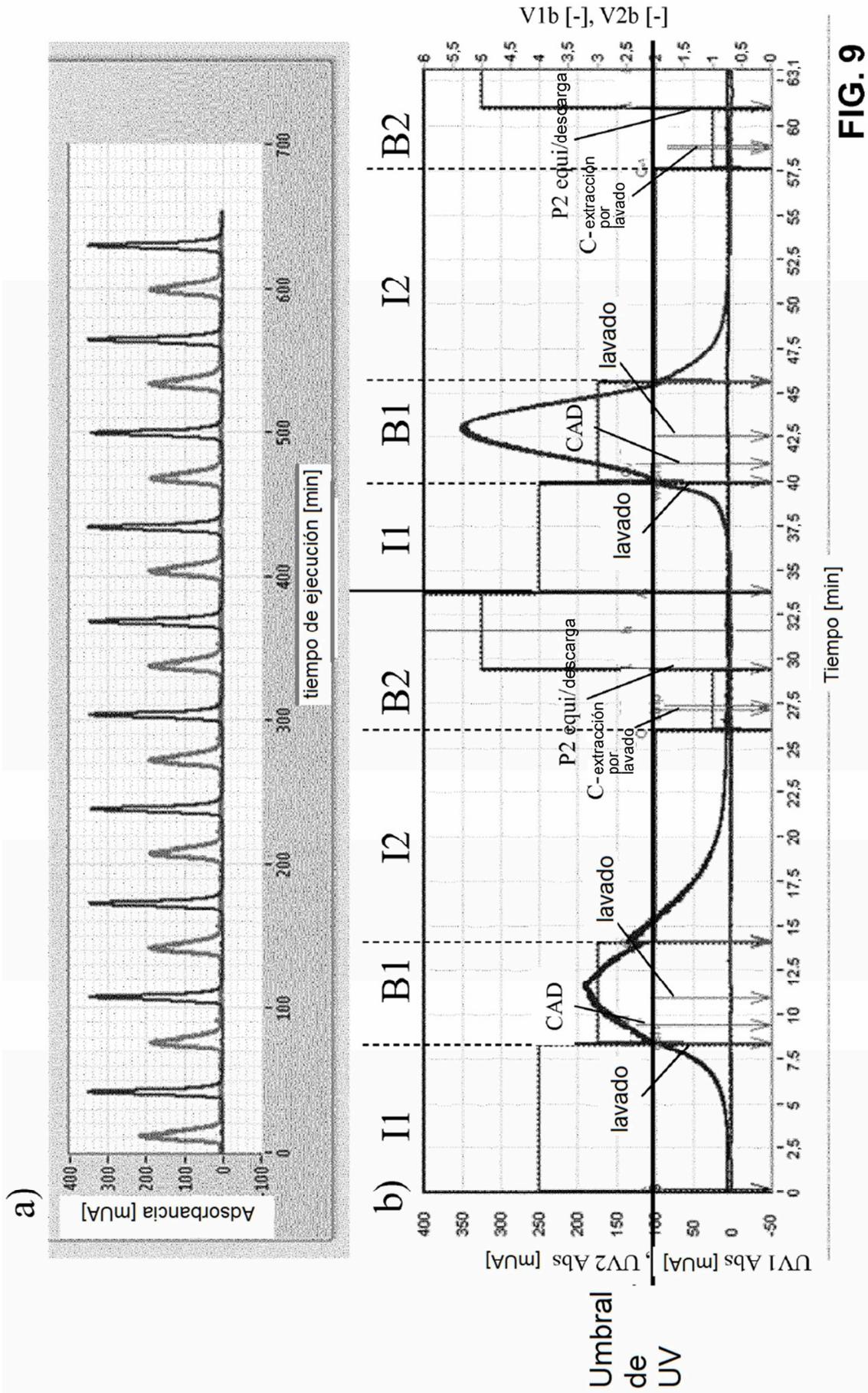


FIG. 8



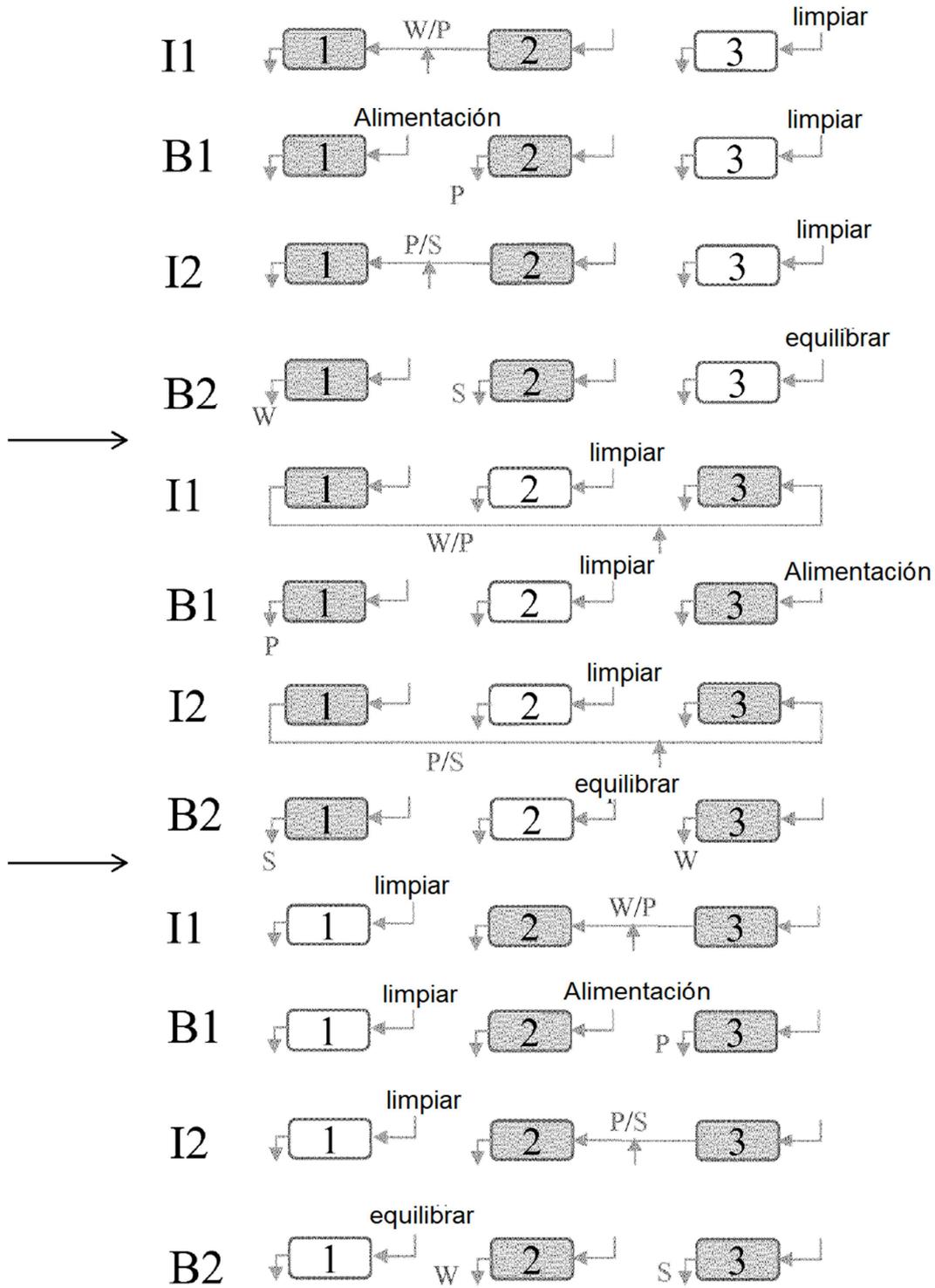


FIG. 10a

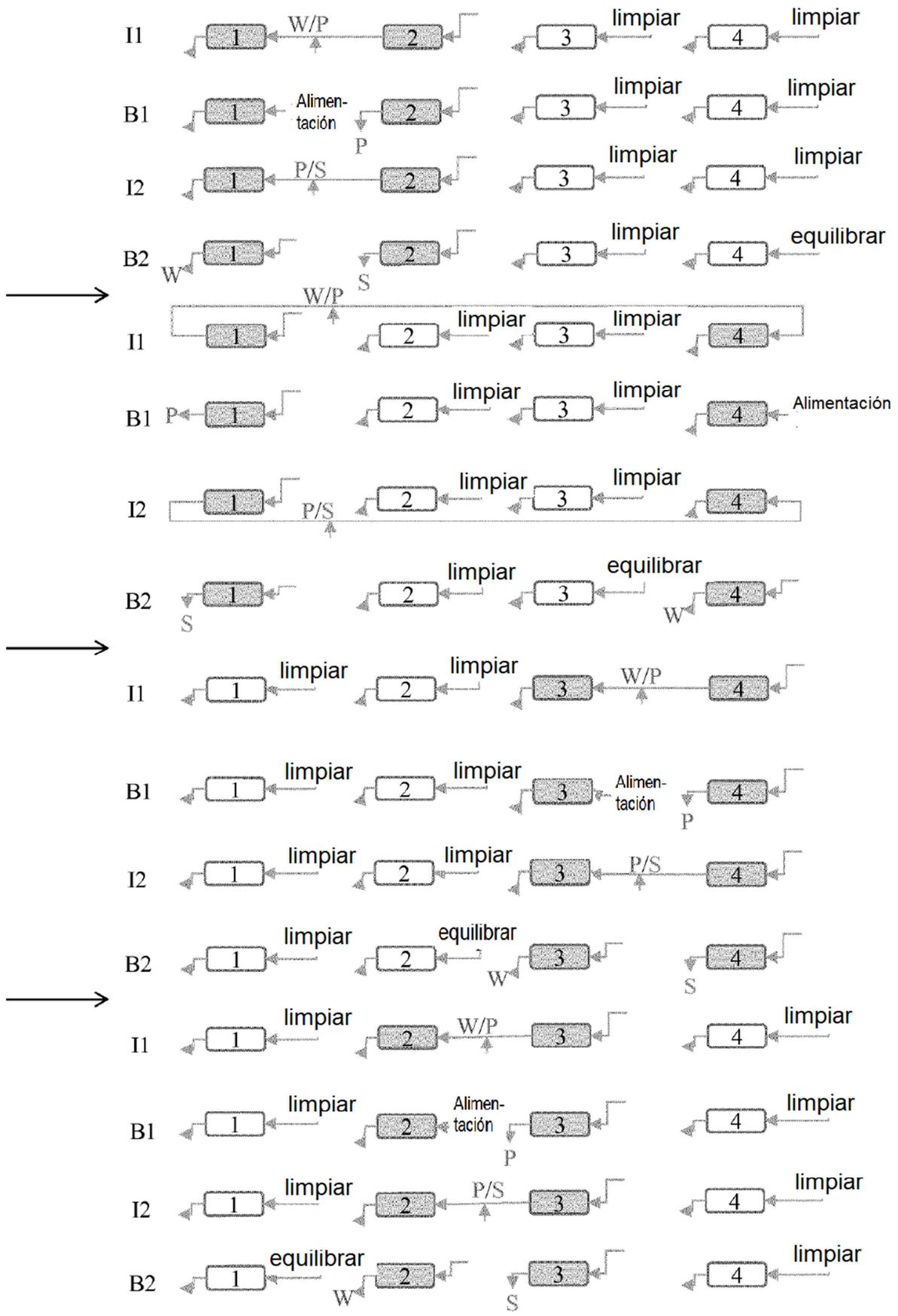


FIG. 10b

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 1877769 A
 - US 2017241992 A
 - WO 2014166799 A
 - EP 1877769 B1
- 10