



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 284 653**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 1/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01941486 .1**

⑧6 Fecha de presentación : **16.05.2001**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1349866**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2003**

⑤4 Título: **Purificación de insulina utilizando tecnología de lecho móvil simulado.**

③0 Prioridad: **16.05.2000 US 204701 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑦3 Titular/es: **Purdue Research Foundation
1291 Cumberland Avenue
West Lafayette, Indiana 47906, US**

⑦2 Inventor/es: **Wang, Nien-Hwa, Linda;
Xie, Yi;
Mun, Sungyong;
Kim, Jin-Hyun y
Hritzko, Benjamin J.**

⑦4 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 284 653 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

Purificación de insulina utilizando tecnología de lecho móvil simulado.

5 **Referencias a solicitudes anteriores**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos número 60/204701, presentada el 16 de Mayo de 2000.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la purificación de insulina a partir de mezclas binarias y multicomponente mediante tecnología de lecho fluidizado simulado. En general, la invención es aplicable a sistemas que muestran isoterms lineales, y en especial es aplicable a tales sistemas cuando las separaciones están inhibidas por resistencias de transferencia de masa.

Estado de la técnica*Principios de Cromatografía de Lecho Fluidizado Simulado*

La cromatografía en fase líquida se utiliza ampliamente en la industria para separar y purificar componentes en mezclas líquidas y gaseosas. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía en fase líquida son procesos cromatográficos discontinuos, con bajos rendimientos, que consumen grandes cantidades de eluyente, que utilizan el adsorbente ineficientemente, y que requieren mano de obra. Además, la naturaleza discontinua de los procesos cromatográficos discontinuos, y la dilución de los componentes recogidos, limita su atractivo para separaciones en plantas piloto y a escala de proceso industrial.

Para mejorar la eficacia de los procedimientos cromatográficos, se han propuesto (Berg, 1946; Kehde *et al.*, 1948; Ruthven y Ching, 1989) lechos móviles continuos ("CMBs") que consisten en una columna que sirve de soporte para poner en contacto fases móviles y sólidas (adsorbente) a contracorriente. La fase sólida, que cae gracias a la gravedad, sale de la columna por su parte inferior y se recicla en la superior. La fase móvil entra en la columna por la parte inferior, se bombea hacia arriba, y sale por la parte superior a partir de donde se recicla haciéndola llegar a la parte inferior de la columna. Este sistema tiene dos entradas de líquido (una entrada de alimentación y una entrada de desorbente) y dos salidas de líquido (Una salida de refinado y una salida de extracto).

La alimentación (que contiene 2 componentes o más para separar) se inyecta de manera continua en la mitad de la columna. Ya que la afinidad de los componentes hacia el empaquetamiento sólido es diferente, se pueden escoger los caudales de la fase móvil y del adsorbente en la columna para que provoquen que uno de los componentes se mueva en dirección a la parte superior y que el otro componente se mueva hacia la parte inferior provocando una separación espacial. Este sistema tiene dos líneas de salida: una está localizada por debajo de la alimentación por donde se elimina constantemente el componente que se mueve más lentamente (el extracto), y una localizada por encima de la alimentación por donde se elimina constantemente el componente que se mueve más rápidamente (el refinado). El desorbente se añade al sistema por la parte inferior para ayudar a empujar al componente más lento dentro de la columna (y para compensar la pérdida de desorbente a través de las corrientes de extracto y de refinado).

Los sistemas continuos de lecho móvil ofrecen varias ventajas potenciales sobre la cromatografía en discontinuo, incluyendo:

- Los sistemas pueden generar productos de una pureza similar o mayor a los de cromatografía en discontinuo, con unos rendimientos sustancialmente mayores que en la cromatografía en discontinuo.
- Los sistemas utilizan menos desorbente que la cromatografía en discontinuo.
- Los sistemas utilizan más eficientemente la fase sólida que la cromatografía en discontinuo.
- Los sistemas requieren un volumen mucho menor (a menudo de un orden de magnitud) que los sistemas discontinuos de cromatografía, para la misma producción.

Sin embargo, estas ventajas no se han comprobado en CMBs reales debido a las dificultades propias de la operación y el mantenimiento de una unidad CMB. El movimiento físico continuo de sólidos provoca el desgaste de las partículas, y puede llegar a ser difícil mantener un caudal estrictamente uniforme de las fases sólida y móvil. Estos problemas disminuyen mucho la eficiencia del proceso y la vida útil del adsorbente, e impone limitaciones serias a las propiedades mecánicas de las partículas adsorbentes.

Los lechos fluidizados simulados se han desarrollado para superar los problemas asociados con la corriente de sólido en los CMBs reales. Los lechos fluidizados simulados se describen en general en Ruthven y Ching (1989). Los procesos de lecho fluidizado simulado (SMB) presentan fases sólidas y líquidas en movimiento contracorriente

y las ventajas concomitantes de los lechos móviles continuos sobre la cromatografía en discontinuo sin movimiento físico de sólidos. Un proceso SMB normal tiene cuatro zonas con dos puertos de entrada (alimentación y desorbente) y dos puertos de salida (refinado y extracto), tal como se muestra en la Figura 1. Los procesos SMB utilizan series de columnas adsorbentes conectadas para formar un circuito. Generalmente, cada zona contiene dos o más columnas de tamaño uniforme, y estas columnas están conectadas para formar un circuito continuo. El movimiento del sólido se simula mediante movimientos periódicos de los puertos de entrada y salida en una columna posterior en la dirección de la corriente de la fase móvil, para que los puertos del producto siempre estén próximos de los frentes de concentración parcialmente separados de los productos del sistema. De manera similar al sistema de lecho móvil continuo, se ajusta el tiempo de intercambio de los puertos, la longitud de zona, y el caudal de zona para obtener el nivel de pureza deseado en el refinado o el extracto.

La función de cada zona en un SMB es como sigue: (1) Zona I: Esta zona se localiza entre la entrada de desorbente y la salida del extracto y se utiliza para desorber la fracción lenta. Una parte de la corriente que sale de esta zona sale en forma de extracto mientras que la restante fluye hacia la zona II. (2) Zona II: Esta zona se utiliza para desorber la fracción rápida. (3) Zona III: Esta zona se utiliza para adsorber la fracción lenta, y para la separación de la fracción lenta de la fracción rápida. Parte de la fracción rápida sale por el puerto de refinado. (4) Zona IV: Esta zona se utiliza para adsorber la fracción rápida a la vez que para recuperar el desorbente. El caudal que sale de esta zona sólo contiene desorbente puro que se recircula hacia la entrada de desorbente para reutilizarlo.

Aplicaciones Conocidas de la Cromatografía de lecho fluidizado simulado

Las separaciones con SMB se utilizaron por primera vez en una planta industrial por Universal Oil Products (UOP) para la purificación de hidrocarburos (Broughton y Gerhold, 1961; Broughton, 1968; Broughton *et al.*, 1970). El proceso de UOP evoluciono posteriormente hacia el proceso llamado actualmente Sorbex. La principal aplicación del proceso Sorbex de UOP es en la purificación de isómeros del xileno. De hecho, Parkinson *et al.* (1994) describe que UOP instaló 85 unidades de SMB para utilizarlas en su proceso Sorbex, y que la mayoría de ellas se instalaron en refinerías de petróleo para la purificación de p-xileno.

El proceso Sorbex de UOP para la purificación de p-xilenos tiene varias características únicas. Primero, separa p-xileno de una mezcla de isómeros de xileno y otros derivados de fenilo que provienen del proceso de fabricación de xileno. El proceso utiliza un adsorbente sólido de tipo zeolita que adsorbe p-xileno selectivamente. El proceso también se basa en un componente de desplazamiento que compite con el p-xileno por el adsorbente y los otros componentes de manera dependiente de la concentración, para prevenir la contaminación mutua del refinado y el extracto.

Parkinson *et al.*, (1994) también describe el amplio uso de los procesos SMB en la separación de azúcares. Por ejemplo, Parkinson *et al.* describe que desde 1980 hasta 1994, U.S Filter ha instalado aproximadamente 60 unidades SMB para la separación de azúcares. En 1994 U.S. Filter ha dirigido sistemas SMB para la separación de ácido cítrico y láctico, glicerina, glicoles, aminoácidos, y herbicidas. Según informó UOP, ésta instaló unidades SMB HPLC en plantas farmacéuticas en 1994.

Según se ha informado, en el mismo año, Soken (Japón) finalizó una prueba piloto de un año de un sistema continuo de HPLC que puede purificar mezclas de tres componentes y tiene seis columnas. En la bibliografía se han descrito otras aplicaciones de los SMB (Ching *et al.*, 1993; Pais *et al.*, 1997; Ruthven y Ching, 1989). Más recientemente esta técnica se ha desarrollado para la separación de compuestos quirales y la purificación de productos farmacéuticos y bioquímicos (Nicoud *et al.*, 1993; Pais *et al.*, 1997; Peddeferri, *et al.*, 1999; Lehoucq *et al.*, 2000). A continuación se resumen algunas de las referencias de la literatura que describen separaciones SMB.

Azúcares: Se han desarrollado varios procesos para la separación y la purificación de azúcares. Por ejemplo, utilizando una resina de intercambio de cationes calcio, Balannec *et al.* (1993) y Barker *et al.* (1960) describieron la separación de fructosa a partir de sacarosa, y de xilosa a partir de arabinosa utilizando procesos SMB. Balannec *et al.* (1993) también describe un proceso SMB en el cual se fracciona dextrano utilizando un proceso de exclusión por tamaño en gel de sílice.

Desalado: También se han descrito varios procesos SMB para la eliminación de sales de mezclas. Por ejemplo, Maki (1987) describe un proceso de retención iónica para la separación de glucosa y cloruro de sodio; Nicoud (1998) describe un proceso de exclusión de iones utilizando una resina de intercambio catiónico, para la separación de glicerol y cloruro de sodio; y Hashimoto *et al.* (1988) describe un proceso de exclusión por tamaño para la separación de proteínas y sulfato de amonio.

Purificación de proteínas: Al menos se han descrito cuatro procesos SMB desarrollados para la purificación de proteínas. Por ejemplo, Huang *et al.* (1986) describe la separación de tripsina a partir de un extracto de páncreas porcino utilizando cromatografía de afinidad; Houwing (1996) describe el fraccionamiento de albúmina sérica humana utilizando un sistema de dos columnas; Nicoud (1996) describe la separación de mioglobina a partir de lisozimas utilizando un proceso de adsorción; y Schulte *et al.* (2000) describe procesos de adsorción de fase inversa y en gel de sílice para separar ciclosporina A, oligopéptidos cíclicos, y varias impurezas.

Moléculas iónicas: Al menos dos referencias describen el uso de procesos SMB para la separación de moléculas iónicas. Por ejemplo, Van Walsem *et al.* (1996) describe la separación de betaína a partir de melazas utilizando dos

columnas de intercambio iónico; y Maki (1992) describe la separación de L-glutamina del ácido glutámico utilizando una resina de intercambio de cationes.

Disolventes orgánicos: Los procesos SMB también se han descrito para la separación de disolventes orgánicos. Por ejemplo, Szpepy *et al.* (1975) describe la separación SMB de varios ésteres metílicos C₁₆-C₂₂ de ácidos grasos utilizando una fase estacionaria no revelada; y Blehaut *et al.* (1996) describe la separación de estereoisómeros de fitol utilizando gel de sílice.

Isómeros ópticos: últimamente, el proceso SMB se ha revelado de especial interés en la separación de isómeros ópticos. Fuchs *et al.* (1992), por ejemplo, describe la separación de isómeros de treonina utilizando una resina de intercambio de ligandos; Balannec *et al.* (1993) describe la resolución del 1a-2,7,7a-tetrahidro-3-metoxinaftil-(2,3-b) oxirano racémico utilizando triacetato de celulosa microcristalina; y Archibald *et al.* (1999) describe la separación de diastereómeros de epóxido utilizando cromatografía SMB de fase inversa, fase normal, o fase estacionaria quiral.

A pesar de estos estudios, la tecnología SMB aún no está entre las separaciones industriales comunes. De hecho, en un artículo escrito recientemente, en 1995, Hill (1995) afirma, “La técnica de la cromatografía de lecho fluidizado simulado ha estado presente en la industria durante un tiempo considerable, aunque por razones comerciales mucho del trabajo no ha sido publicado. Debido a problemas relacionados con el diseño de esta técnica, su uso se ha limitado a separaciones sencillas de productos con requisitos de calidad bastante bajos”.

Resumen de Estrategias de Diseño

El éxito en el diseño y la operación de un SMB depende de la selección correcta de las condiciones de operación (caudales de zona y tiempo de intercambio), que provocan que los componentes lentos y rápidos se muevan en direcciones opuestas en relación al puerto de alimentación. En un sistema de isoterma lineal, las condiciones primarias de operación son los caudales de zona y el tiempo de intercambio de puertos en las zonas II y III, ya que estas son las dos zonas donde se da inicialmente la separación, y donde los caudales de zona y los tiempos de intercambio de puertos se deben equilibrar apropiadamente. El tiempo de intercambio de puertos y los caudales en las zonas I y IV también son importantes para prevenir la migración de los componentes móviles rápidos y lentos entre las zonas I y IV. Sin embargo, en general se puede compensar tal riesgo (a expensas de la economía del proceso) mediante el incremento de la entrada de desorbente en el sistema y la velocidad de salida de refinado del sistema.

En la bibliografía se han propuesto diferentes procedimientos para guiar en la selección inicial de los caudales de zona y los tiempos de intercambio de puertos. Algunos de estos, basados en la aproximación de la unidad como una serie de etapas de equilibrio y a continuación en la aplicación de un análisis de tipo McCabe-Thiele, han sido revisados por Ruthven (1984) y más recientemente por Hashimoto *et al.* (1993). Una aproximación alternativa se basa en la teoría del equilibrio local, que puede utilizarse para isotermas de adsorción lineales y no lineales. (Helfferich y Klein, 1970; Rheet *et al.*, 1971; Storti *et al.*, 1989). Generalmente, la teoría del equilibrio local es aplicable a sistemas ideales, es decir, aquellos sistemas en los que los efectos de la transferencia de masa son negligibles. Ver también, Ruthven y Ching (1989); Adachi (1994); Storti *et al.* (1993); Pais *et al.* (1997); y Strube *et al.* (1997).

La Figura 2 muestra la teoría del triángulo (Storti *et al.*, 1989) basada en la teoría del equilibrio local, y como se utiliza para llegar a los caudales de zona y los tiempos de intercambio de puertos en las zonas II y III. Mediante la realización de un análisis de equilibrio (que supone que no existen los efectos de la transferencia de masas) se puede representar en un gráfico una región triangular en dos dimensiones con velocidades adimensionales en las zonas II y III a lo largo de los ejes x e y, respectivamente. Las velocidades adimensionales representan las velocidades netas del caudal de zona divididas por la velocidad de movimiento del puerto. La región triangular define el grupo completo de condiciones de operación que garantizarán la separación completa (100% de pureza y rendimiento) de los componentes de movimiento rápido y lento en las zonas II y III.

El método del triángulo es útil pero está limitado a condiciones ideales (es decir, sin resistencias de transferencia de masa). Por lo tanto, el diseño no da ninguna información sobre la longitud de zona, las resistencias de transferencia de masa, o del rendimiento y pureza deseados para el producto. Para determinar los efectos de la transferencia de masa en la longitud de zona y en la pureza y rendimiento del producto, se puede realizar una serie de simulaciones por ordenador en las que se definen las resistencias de transferencia de masa y la pureza y rendimiento del producto. Los resultados de estas simulaciones pueden representarse para definir una región triangular más pequeña, que define la región entera de velocidades relativas de la fase móvil y del movimiento de los puertos en las zonas II y III que garantizan la separación con la pureza y el rendimiento definidos. Esto se muestra en la Figura 3, donde cada una de las zonas triangulares más pequeñas corresponde a un grupo diferente de resistencias de transferencia de masas.

De nuevo, el consumo mínimo de desorbente en sistemas no ideales solo puede determinarse aproximadamente a partir de la teoría del triángulo mediante largas series de simulaciones por ordenador de prueba y error de condiciones operativas dentro de la región triangular, para determinar el consumo de desorbente asociado con cada combinación de caudales en las zonas II y III, y se espera que en algún momento converjan en un consumo mínimo aproximado de desorbente. Azevedo y Rodríguez (1999) utilizaron simulaciones por ordenador en las que la solución del análisis de frente estacionario (Ma y Wang, 1997) corresponde al punto del vértice de la región triangular. El punto del vértice da la mayor producción con el menor consumo de desorbente (ver Figura 3).

El método previamente mencionado se utiliza para estimar las condiciones operativas en un sistema SMB dado. Para tener una visión del diseño del proceso SMB, la Figura 4 muestra los parámetros que pueden variarse para explorar las eficiencias del proceso y los parámetros que pueden estimarse en el diseño.

Además de las simulaciones necesarias para tener en cuenta los efectos de la transferencia de masas, y las simulaciones necesarias para llegar a un consumo mínimo de desorbente, también deben llevarse a cabo simulaciones por ordenador cada vez que se modifica uno de los parámetros (Figura 4) mencionados para optimizar la eficiencia del sistema. Un diseñador intentando escanear diseños de SMB para determinar cual es el más económico, únicamente explorando cuatro valores de cada uno de los parámetros mencionados, necesitaría realizar 4^{10} (1.048.576) simulaciones por ordenador (cada una de las cuales puede llevar de varios minutos a horas). Como consecuencia, los diseñadores siempre hacen una serie de suposiciones iniciales sobre el SMB que limitan significativamente la extensión de diseños SMB que se van a explorar.

Una de las variables más importantes es la combinación de la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil puede influir significativamente en las prestaciones y el coste del proceso ya que (1) la fase móvil determina la solubilidad de los solutos en el sistema, y la producción máxima en base a la concentración de sólido, (2) la fase móvil puede influir en la selectividad y la capacidad efectiva del adsorbente, (3) parte de la fase móvil puede irse completando continuamente, y (4) parte de la fase móvil puede separarse del producto final, y los costes de separación pueden variar entre un disolvente y otro. De manera similar, la fase sólida y el tamaño de partícula de la fase sólida pueden tener efectos sustanciales sobre las prestaciones y el coste del proceso ya que (1) la fase sólida determina la capacidad absorbente del sistema, la selectividad, y la producción máxima esperada, y (2) el tamaño y tipo de fase sólida determina la disminución de presión permisible y la velocidad máxima de la fase móvil.

Otro parámetro que puede influir significativamente en la eficiencia de un sistema en particular, pero que raramente se tiene en cuenta en las simulaciones por ordenador, es la longitud total de la columna (= número de columnas totales x longitud de la columna) y las longitudes de zona (= número de columnas en cada zona x longitud de columna) del SMB. Cuando se comienza el proceso de simulación por ordenador de prueba y error para determinar los caudales de zona, el diseñador generalmente supone: (1) un número fijo de columnas, y (2) una disposición de columnas en las zonas. Sin embargo, la disposición de las columnas puede influir significativamente en la eficiencia del sistema, e incluso pueden determinar si es posible la separación deseada.

Otro parámetro que puede influir significativamente en la eficiencia de un sistema en particular, que es único para separaciones multicomponente en las cuales el componente deseado es un componente con una afinidad intermedia, es la estrategia de separación. Tales separaciones generalmente precisan de los SMB en tándem o paralelo en los cuales la fracción de afinidad intermedia se separe sucesivamente de las fracciones de movimiento rápido y de movimiento lento. Cuando se separan mezclas multicomponente pueden observarse varias secuencias de separación. En una separación de dos anillos, por ejemplo, puede decidirse si separar la fracción intermedia de la fracción de movimiento rápido o de movimiento lento en el primer anillo. Otra opción (no conocida en el estado anterior de la técnica) es permitir o no que el componente que no va a separarse en el primer anillo se distribuya en el primer anillo, contaminando así tanto la corriente de extracto como de refinado. De nuevo, los procedimientos anteriores de la técnica requerían realizar un número excesivo de simulaciones por ordenador o de experimentos para evaluar la eficiencia de cada una de estas opciones.

En un estudio reciente realizado por Ma y Wang (1997), se desarrolló, para sistemas de lecho de movimiento continuo (CMB) y SMB con isotermas lineales, un procedimiento de análisis de frente estacionario para separaciones binarias. El análisis se basa en la idea de que el frente de concentración clave en cada zona puede migrar a la misma velocidad que la velocidad de movimiento del puerto (o mantenerlo estacionaria respecto a los puertos) para asegurar la pureza de los productos (Figura 5). Mediante la selección apropiada de los cuatro caudales de zona y de la velocidad de movimiento del sólido en un SMB, el frente de absorción de la fracción rápida puede mantenerse estacionario en la zona IV y su frente de desorción puede mantenerse estacionario en la zona II, mientras que el frente de adsorción de la fracción lenta se mantiene estacionario en la zona III y su frente de desorción se mantiene estacionario en la zona I (Figura 5). Bajo las condiciones de frente estacionario, Ma y Wang (1997) propusieron un grupo de ecuaciones algebraicas para sistemas binarios que presentan isotermas lineales y resistencias de transferencia de masas significativas, para relacionar la pureza del producto y el rendimiento con las longitudes de zona, los caudales de zona, el tiempo de intercambio de puertos, y los parámetros de retención y transferencia de masas.

El análisis de frente estacionario propuesto por Ma y Wang (1997) representa un avance significativo en el diseño de los SMB binarios, ya que elimina la necesidad de realizar numerosas simulaciones por ordenador o pruebas experimentales cuando al diseñar los SMB. Las simulaciones por ordenador todavía pueden realizarse, pero normalmente sólo para validar los resultados del análisis de frente estacionario. Sin embargo, el análisis de frente estacionario descrito por Ma y Wang (1997) se limitó a los SMB binarios, y por lo tanto no mostraron cómo diseñar y operar un SMB para separaciones multicomponente. Ma y Wang (1997) tampoco muestran cómo superar varios otros temas relacionados con el diseño de los SMB, específicamente SMB para separaciones multicomponentes, incluyendo las cuestiones de la disposición de las columnas, las estrategias de separación, y como tener en cuenta los efectos de los volúmenes muertos extracolumna y de frente.

Insulina

La insulina, una hormona polipeptídica, es esencial para el aporte de energía a las células de todos los vertebrados. La falta de insulina causa la enfermedad de la diabetes, la tercera mayor causa de muerte por enfermedad en los países industrializados después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Barfoed, 1987). El primer tratamiento con insulina efectivo contra la diabetes lo llevaron a cabo Frederick Banting y Charles Best en 1922. De 1922 a 1972, las únicas fuentes de insulina para el tratamiento de la diabetes eran las glándulas pancreáticas de animales, tales como vacas y cerdos. En los setenta, sin embargo, se constató que la demanda de insulina pronto excedería el suministro disponible de fuentes animales, y se desarrollaron técnicas de ADN recombinante. Actualmente la mayoría de los productos de insulina se producen utilizando organismos transformados con ADN recombinante. Tales productos se denominan Insulina Humana Biosintética ("BHI").

La purificación de BHI a partir de su caldo de fermentación implica varios procesos de cromatografía (Kroeff *et al.*, 1989; Ladisch y Kohlmann, 1992), incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), en la cual se eliminan $ZnCl_2$ y proteínas de alto peso molecular (HMWP) incluyendo la proinsulina. El proceso SEC es discontinuo, y consiste en las etapas de preequilibrado, carga, y elución. Es muy deseable un procedimiento para mejorar el rendimiento de insulina del proceso y para aumentar la producción del sistema.

El documento JENSEN T B *et al.*: "Novel simulated moving-bed method for reduced solvent consumption" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 873, no. 2, Marzo 2000 (2000-03), páginas 149-162, muestra la purificación de insulina con el método del triángulo.

Objetos de la invención

Un objeto de la presente invención es la mejora de los rendimientos de los procesos cromatográficos para la purificación de insulina de HMWP y cloruro de zinc.

Otro objeto de la invención es proporcionar procedimientos para la purificación de insulina utilizando cromatografía SMB, a partir de mezclas binarias y multicomponente.

Otro objeto de la invención es disminuir el consumo de disolvente e incrementar el aprovechamiento del adsorbente en las purificaciones cromatográficas de insulina.

Otro objeto de la invención es el proporcionar SMBs para la purificación de insulina donde se observan resistencias de transferencia de masa significativas.

Otro objeto es proporcionar SMBs para la purificación de insulina operando bajo isoterms lineales, opcionalmente utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

Otro objeto es proporcionar configuraciones de columna para la purificación SMB de insulina que maximicen la rentabilidad económica.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar SMBs para la separación de mezclas multicomponente de insulina en dos o más anillos utilizando normas de separación que optimicen la rentabilidad.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos para el diseño de sistemas para la purificación de insulina utilizando cromatografía SMB, utilizando el diseño de frente estacionario para minimizar el consumo de desorbente, y para permitir el cribado de sistemas SMB alternativos para llegar a una rentabilidad óptima.

Resumen de la invención

Sorprendentemente, los inventores han descubierto (1) un nuevo proceso para la purificación de insulina utilizando cromatografía SMB, y (2) los parámetros de diseño para la purificación de insulina a partir de mezclas binarias y multicomponente utilizando cromatografía SMB. Los parámetros de diseño representan una nueva extensión del diseño de frente estacionario propuesto por Ma y Wang (1997), y permite purificar insulina utilizando cromatografía SMB en un amplio espectro de condiciones de operación, configuraciones de columna, y combinaciones de desorbente y adsorbente, cuando se cumplen isoterms lineales. Significativamente, los parámetros de diseño permiten que tales sistemas puedan diseñarse a pesar de la presencia de resistencias de transferencia de masas significativas. Además, los parámetros siempre llevan a un sistema SMB que minimiza el uso de desorbente para un caudal de alimentación dado.

Así, en una de sus realizaciones la invención proporciona un procedimiento para la separación cromatográfica de insulina y uno o más componentes que comprende:

a) proporcionar un lecho fluidizado simulado que comprende un primer anillo, una fase estacionaria, y una primera corriente de desorbente;

b) proporcionar una corriente de alimentación que comprende insulina y un primer componente o fracción;

ES 2 284 653 T3

c) introducir la primera corriente de desorbente y la corriente de alimentación en el primer anillo bajo condiciones de frente estacionario para separar la insulina del primer componente o fracción; y

d) extraer del primer anillo la insulina sustancialmente separada del primer componente o fracción.

En los casos donde la corriente de alimentación comprende además un segundo componente o fracción, y la afinidad de la insulina por la fase estacionaria es intermedia a las afinidades por la fase estacionaria del primer y del segundo componente y/o fracciones, el procedimiento comprende además:

a) introducir la insulina del primer anillo y una segunda corriente de desorbente en un segundo anillo, bajo condiciones para separar la insulina del segundo componente o fracción; y

b) extraer del segundo anillo la insulina sustancialmente separada del segundo componente o fracción.

En otro de sus aspectos la invención proporciona procedimientos para el diseño, construcción, y operación de los SMB para purificar insulina cromatográficamente, específicamente para sistemas con isothermas lineales de adsorción. Así, en otro aspecto la invención proporciona un procedimiento para diseñar un SMB para la purificación de insulina a partir de una mezcla binaria o multicomponente que comprende:

a) proporcionar ecuaciones que se refieren al diseño, operación, y a los parámetros intrínsecos de diseño de un SMB que muestra isothermas lineales, donde las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario para cada una de las zonas;

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y operación suficientes para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para solucionar las ecuaciones para separar la mezcla multicomponente en un primer SMB; y

c) resolver las ecuaciones.

En una realización preferida, el SMB comprende un primer anillo A que comprende cuatro zonas, y las ecuaciones suponen las siguientes condiciones de frente estacionario en cada zona:

i) en la zona I: el frente de desorción del componente N;

ii) en la zona II: el frente de desorción del componente j;

iii) en la zona III: el frente de adsorción del componente j+1; y

iv) en la zona IV: El frente de adsorción del componente 1; donde los componentes se numeran 1,...j, j+1, ...,N, para incrementar la afinidad por la fase estacionaria, es deseable una separación entre los componentes j y j+1.

Otra característica importante de la presente invención es la capacidad de optimizar las prestaciones del sistema SMB cuando se purifica insulina, utilizando ecuaciones simplificadas que permiten cribar fácilmente múltiples parámetros de diseño y operación (por ejemplo varias configuraciones de columna). Así, la invención elimina la necesidad de llevar a cabo simulaciones de prueba y error por ordenador pormenorizadas para cada parámetro del SMB. Así, en otra realización la invención proporciona un procedimiento de optimización de un sistema SMB para la purificación de insulina, en el que el sistema muestra isothermas lineales, que comprende:

a) proporcionar ecuaciones que se refieren al diseño, operación, y a los parámetros intrínsecos de diseño de un SMB que muestra isothermas lineales, donde las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario;

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y de operación suficientes para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para resolver las ecuaciones para separar una mezcla binaria o multicomponente en un primer SMB;

c) predecir un segundo grupo de parámetros de diseño y operación suficientes para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para resolver las ecuaciones para separar la mezcla binaria o multicomponente en el segundo SMB; y

d) evaluar y comparar la rentabilidad del primer y el segundo SMB.

El diseño de onda estacionaria de la presente invención puede aplicarse fácilmente en la conversión de un proceso discontinuo industrial o de laboratorio en un proceso de lecho fluidizado simulado para incrementar el rendimiento, la pureza, y la producción del sistema. El uso de la fase estacionaria (es decir, la producción) y el consumo de desorbente puede mejorarse sustancialmente en tales procesos mediante diseños apropiados de longitudes de zona, caudales, y tiempos de intercambio de puertos. Un sistema SMB diseñado para la purificación de insulina por exclusión por tamaños, que consiste en dos SMB en serie y que utiliza gel Sephadex, alcanzó un 99,9% de pureza, un 99,0% de rendimiento, y una producción de 1,19 L/hr 100L BV.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un dibujo esquemático de un lecho fluidizado simulado de cuatro anillos, que muestra los puntos de entrada de las conducciones de alimentación y desorbente, los puntos de salida del extracto y refinado, y la dirección de la fase móvil y el movimiento de los puertos.

La Figura 2 es una gráfica hipotética que muestra la región triangular de las condiciones de operación de SMB que asegura la separación completa de dos componentes en un sistema ideal, donde la velocidad normalizada de la fase móvil en la zona II está representada en el eje X, y la velocidad normalizada de la fase móvil en la zona III está representada en el eje y.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la región triangular de las condiciones de operación en las zonas II y III en un sistema ideal. Hay varias zonas triangulares más pequeñas superpuestas que representan las condiciones de operación que derivan de simulaciones por ordenador del SMB asumiendo varias resistencias de transferencia de masas, donde la pureza final de los componentes se mantiene constante en 99%. La gráfica está tomada de Azevedo y Rodriguez (1999). El punto del vértice de cada triángulo representa las condiciones bajo las cuales el consumo de desorbente se minimiza, tal como se determina mediante el análisis de frente estacionario de Ma y Wang (1997).

La Figura 4 es una lista de los parámetros involucrados en el diseño de un proceso SMB. Las relaciones entre estos parámetros también se muestran en la figura.

La Figura 5 es un perfil de concentración de los frentes estacionarios de concentración en un lecho móvil continuo para separar dos componentes en un sistema no ideal. El soluto 1 es el soluto de movimiento rápido; el soluto 2 es el soluto de movimiento lento.

Las figuras 6a y 6b son perfiles de concentración de los frentes de concentración estacionarios en un SMB para la separación de N componentes sin resistencias de transferencia de masa (a), y con resistencias de transferencia de masa (b), donde el soluto 1 es el soluto de movimiento más rápido, el soluto N es el soluto de movimiento más lento, y se desea una separación entre los componentes j y j+1.

La Figura 7 es un perfil de concentración que muestra cuatro estrategias para separar componentes numerados como 1, 2 y 3 en el anillo de un SMB, en una mezcla donde $a_1 < a_2 < a_3$ (es decir, la afinidad de a_1 por la fase estacionaria es menor a la afinidad de a_2 por la fase estacionaria, y así sucesivamente), y se desprecian las resistencias a la transferencia de masa.

La Figura 8 es una carta de flujo de los diferentes parámetros que están presentes en el diseño de un SMB utilizando el análisis de frente estacionario y como se utilizan para llegar a la rentabilidad económica de un SMB concreto.

Las figuras 9(a)-(d) son cromatogramas de elución que muestran datos experimentales y resultados de simulación por ordenador de pruebas de pulsos con una columna a escala de laboratorio a varias concentraciones de (a) dextrano azul, (b) NaCl, (c) BHI, y (d) $ZnCl_2$.

Las figuras 10(a)-(c) son cromatogramas de elución que muestran datos experimentales y resultados de simulación por ordenador de pruebas de pulsos largos con una solución de saturación de BHI saturada eluida con ácido acético 1 N y una columna a escala piloto, a (a) 8,1 mL/min, (b) 4,0 mL/min, y (c) 2,0 mL/min.

Las Figuras 11(a)-(c) son cromatogramas de elución que muestran datos experimentales y resultados de simulación de un ensayo de frentes múltiples de BHI con una columna a escala de laboratorio, incluyendo datos de frentes múltiples sin columna (a), datos de frentes múltiples con columna (b), y datos de isoterma de absorción frente a un modelo de isoterma anti langmuir (c).

Las figuras 12(a) y (b) muestran datos experimentales y resultados de simulación de a) el histórico de efluente en el puerto de refinado de BHI, HMWP y $ZnCl_2$, y (b) el histórico de efluente en el puerto de extracto de BHI, HMWP y $ZnCl_2$, en un proceso SMB para separar BHI de HMWP y $ZnCl_2$. La figura 12(c) muestra los perfiles de concentración a medio ciclo de la columna en el ciclo 45°.

Las figuras 13(a) y (b) muestran datos experimentales y resultados de simulación de a) el histórico de efluente en el puerto de refinado de BHI, y (b) el histórico de efluente en el puerto de extracto de BHI, en un proceso SMB para separar BHI de HMWP y $ZnCl_2$. La figura 13(c) muestra los perfiles de concentración a medio ciclo de la columna en el ciclo 45°. Se proporcionan datos de cinco simulaciones en las que el valor de E_b para la Zona III varía del valor estimado por la correlación de Chung y Wen hasta 200 veces el valor estimado por la correlación de Chung y Wen.

Las figuras 14(a) y (b) muestran datos experimentales y resultados de simulación de a) el histórico de efluente en el puerto de refinado de BHI, HMWP y $ZnCl_2$, y (b) el histórico de efluente en el puerto de extracto de BHI, HMWP y $ZnCl_2$, en un segundo proceso SMB para separar BHI de HMWP y $ZnCl_2$. La figura 14(c) muestra los perfiles de concentración de la columna a medio ciclo en el ciclo 45°.

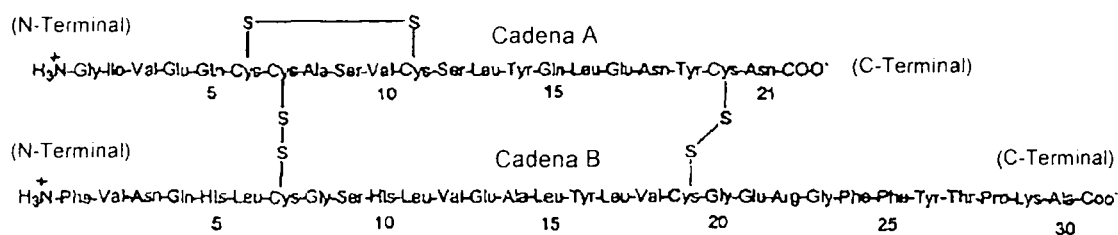
Las figuras 15(a) y (b) muestran datos experimentales y resultados de simulación de a) el histórico de efluente en el puerto de refinado de BHI, HMWP y ZnCl_2 , y (b) el histórico de efluente en el puerto de extracto de BHI, HMWP y ZnCl_2 , en un tercer proceso SMB para separar BHI de HMWP y ZnCl_2 . La figura 15(c) muestra los perfiles de concentración de la columna a medio ciclo en el ciclo 61°.

Las Figuras 16(a) y (b) muestran perfiles de concentración de columna para la estimación de las concentraciones de producto y los factores de empobrecimiento de los componentes que se enriquecerán en el puerto de refinado (a) y de los componentes que se enriquecerán en el puerto de extracto (b). La Figura 16(c) representa la unión de mezcla en el puerto de alimentación que muestra cómo se calcula el balance de masas para un componente del extracto en la estimación de las concentraciones de producto y los factores de empobrecimiento.

Descripción detallada

Definiciones

“Insulina”- El término insulina se refiere a una proteína con la siguiente secuencia de aminoácidos y estructura (insulina natural), y sus análogos biológicamente activos y derivados:



El término también incluye insulina derivada de especies humanas, porcinas, y bovinas, así como insulina sintetizada químicamente o expresada mediante sistemas de expresión recombinante de proteínas que utilizan como hospedador, por ejemplo *E. coli* o levadura. Una insulina preferida es insulina humana expresada utilizando un sistema de expresión de proteínas. En el presente documento, la insulina recombinante a veces se denomina insulina humana biosintética o BHI.

Un análogo de la insulina se refiere a insulina que contiene una o más sustituciones de aminoácidos, delecciones, adiciones, o transposiciones en comparación con la insulina humana en sitios tales que el análogo de la insulina aún interviene en el metabolismo de carbohidratos cuando se administra *in vivo*, y que puede utilizarse en el tratamiento de la diabetes mellitus. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen LysB28, ProB29-insulina humana, AspB28-insulina humana, y GlyA21, ArgB31, ArgB32-insulina humana.

Los derivados de insulina incluyen insulina natural y análogos de insulina que están modificados química o enzimáticamente en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones en el esqueleto, y modificaciones N y C-terminales, mediante, por ejemplo, acetilación, acilación, hidrolación, metilación, amidación, fosforilación o glicosilación, y que mantienen la actividad biológica *in vivo* de la insulina. Un ejemplo de un derivado de la insulina es el mirístil-Nε-LysB29-insulina humana.

Cromatografía - Tal como se utiliza en el presente documento el término cromatografía se refiere a cualquier técnica analítica que se utiliza para la separación química de mezclas y componentes, que se basa en la atracción selectiva entre los componentes de una mezcla hacia una fase estacionaria. Los ejemplos incluyen cromatografía de adsorción, cromatografía de separación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de afinidad.

“Adsorbente” - En el presente documento, el término adsorbente se utiliza genéricamente para referirse a la fase estacionaria utilizada en cromatografía hacia la que los componentes de la fase móvil muestran afinidad selectiva. Ya que tal afinidad puede darse de diferentes maneras diferentes a la adsorción (incluyendo exclusión por tamaño o complejación), el término se refiere a fases estacionarias que adsorben los componentes de una mezcla y a fases estacionarias que técnicamente no adsorben componentes de la fase móvil, pero que aún y así se comportan como adsorbente al ralentizar la velocidad de migración de un componente en relación con otro en un sistema cromatográfico.

“Purificado” - Se entiende que un componente o una fracción está purificada cuando su concentración relativa (el peso del componente o fracción dividido por el peso de todos los componentes o fracciones de la mezcla) se incrementa al menos un 20%. En una serie de realizaciones, la concentración relativa se incrementa al menos un 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 150%, o 200%. Un componente o fracción también puede considerarse como purificado cuando la concentración relativa de los componentes a partir de los cuales se purifica (el peso del componente o fracción del que se purifica dividido por el peso de todos los componentes o fracciones en la mezcla) desciende al menos el 20%, 40%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95%, 98%, o 100%. En otra serie de realizaciones, el componente o fracción está purificado a una concentración relativa de al menos 50%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99%. En una

realización, cuando un componente o fracción se “separa” de otros componentes o fracciones, se entenderá que en otras realizaciones el componente estará “purificado” en los niveles proporcionados en el presente documento.

Lecho fluidizado simulado- Un lecho fluidizado simulado se refiere a una configuración modificada de lecho móvil continuo en la que el movimiento de la fase adsorbente se simula mediante el movimiento periódico de las conducciones de alimentación, desorbente, extracto, y refinado en la dirección del caudal de la fase móvil. El lecho fluidizado simulado típico contiene cuatro zonas separadas y al menos 4 columnas de tamaño idéntico colocadas en las zonas. Sin embargo, el SMB no necesariamente consiste en 4 zonas exactamente. Por ejemplo, el número de zonas puede reducirse a tres si el desorbente no se regenera y se elimina completamente en las corrientes de refinado y extracto. De manera similar, se pueden emplear cinco zonas para permitir la eliminación del anillo de tres corrientes, concretamente cuando en el sistema se separan cuatro o más componentes. Como ejemplo adicional, el SMB puede comprender una o más zonas de regeneración.

Anillo - El término “anillo” se utiliza para describir cómo se configuran unas zonas en relación a las otras en un SMB ya que la salida de cada zona comprende la entrada de la siguiente zona, de manera circular. El término “anillo” no se debería entender como limitante a una configuración circular de las zonas y de las columnas dentro de las zonas.

Isotermas lineales- Un sistema que muestra isotermas lineales se refiere a un sistema en el que el coeficiente de partición del componente i (es decir, la relación de la concentración del componente i en la fase móvil dividido por la concentración del componente i en la fase estacionaria) es constante. Así, en un sistema lineal con efectos de transferencia de masa, la velocidad de migración del componente i está determinada por la siguiente ecuación:

$$(1) \quad u_{w,i} = \frac{u_0}{1 + P\delta_i}$$

donde $P \equiv (1 - \varepsilon_b)/\varepsilon_b$ es la relación de los volúmenes fase móvil/fase partícula, ε_b es la fracción vacía entre partículas, u_0 es la velocidad lineal intersticial, y δ_i es el factor de retención del soluto i:

$$(2) \quad \delta_i (\equiv K_{ei}\varepsilon_p + (1 - K_{ei}\varepsilon_p)a_i)$$

K_{ei} es el factor de exclusión por tamaño, ε_p es la fracción vacía de partículas, y a_i es el coeficiente de partición en base al volumen del sólido. Un sistema que muestra isotermas lineales puede estar bien representado por la relación de arriba. El sistema más simple de isotermas lineales es un sistema de exclusión por tamaños en el que el valor de a_i es cero. La adsorción débil (con valores de a_i cercanos a cero) puede representarse utilizando una K_{ei} aparente con un valor mayor al de la K_{ei} intrínseca. Muchos tipos de sistemas cromatográficos pueden operar en una región de isotermas lineales. Sin embargo, algunos sistemas observan isotermas no lineales en un amplio intervalo de condiciones de operación, o un gran número de combinaciones alimentación/adsorbente. Los sistemas generalmente se alejan de las isotermas lineales al incrementarse la concentración del componente (o al descender la capacidad del adsorbente), y entrar en juego la competición entre los componentes por la capacidad de adsorbente disponible.

Mezcla multicomponente - el término multicomponente se refiere a una mezcla fluida que comprende tres o más componentes o fracciones que pueden separarse utilizando un proceso cromatográfico recomendado, ya que cada componente o fracción muestra una diferente afinidad al adsorbente empleado.

Fracción o componente intermedio - El componente o fracción intermedia de una mezcla multicomponente se refiere al componente (o fracción de componentes) que, en un sistema cromatográfico en particular, muestra una afinidad por la fase estacionaria que es intermedia a las afinidades por la fase estacionaria de al menos otros dos componentes o fracciones. Los “componentes” o “fracciones” de una mezcla no incluyen disolventes y otros materiales que no muestran una afinidad significativas hacia el adsorbente, y que se separan de los componentes deseados después del proceso SMB mediante operaciones químicas convencionales como la destilación.

Efectos de transferencia de masa - En general, efectos de transferencia de masa se refiere a aquellos fenómenos físicos que provocan que los componentes de una mezcla muestren un comportamiento de dispersión en la mezcla diferente en un sistema determinado, y que lo alejan del sistema ideal. Así, los efectos de transferencia de masa incluyen aquellos efectos modelados utilizando coeficientes de dispersión axial, coeficientes de dispersión entre partículas, y coeficientes de transferencia de masa en películas. Así, los efectos de transferencia de masa también incluyen los efectos de frente y de dispersión provocados por el volumen muerto extracolumna. Una separación está dificultada por efectos de transferencia de masa no negligibles si el término de corrección de transferencia de masa, descrito en detalle abajo, es mayor al 2% de la velocidad de la fase móvil en cualquiera de las zonas como predicen las ecuaciones 3-6 (las velocidades de la fase móvil para un sistema ideal), para conseguir una determinada pureza y rendimiento. Los diseños de la presente invención también pueden extenderse a sistemas en los que la velocidad de corrección de

la transferencia de masa incrementa o disminuye la velocidad de la fase móvil del sistema ideal en más de 1, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100%, 200%, 400%, 600%, 1000%, o más.

5 Efectos de frente y/o extra-columna - Los efectos de frente se refieren a un fenómeno físico en el que las ondas de concentración se extienden en la dirección del caudal del fluido como resultado de una isoterma de tipo anti-Langmuir (Karger *et al.*, 1973) o de la desviación de flujo uniforme. Generalmente, la desviación está causada por un empaquetamiento no uniforme, efectos de viscosidad (Flodin, 1961; Collins, 1961), etc. Los efectos extracolumna se refieren a los efectos que resultan del volumen muerto extracolumna incluyendo las conducciones de conexión, conducciones de muestra, espacio muerto en la cabeza de las columnas. Los efectos extracolumna resultan en el retraso del movimiento de los solutos a través del recorrido por un sistema cromatográfico y también tiene como resultado la extensión del frente de concentración adicional a la extensión provocada por los efectos de transferencia de masa internos de la columna mencionados arriba.

15 Separación sustancial - se dice que un primer componente o fracción está separado sustancialmente de un segundo componente o fracción cuando la relación en peso del segundo componente o fracción respecto al primer componente o fracción se reduce al menos en 50%. La relación se reduce preferiblemente en al menos 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99%.

20 “Primero” - En muchos contextos, un identificador numeral como primero o segundo se utiliza para describir un elemento en particular de un sistema o procedimiento. Se debería entender que el identificador numeral simplemente se utiliza por necesidades de redacción, y no debe interpretarse que la existencia de un primero implica la existencia de un segundo. Así, la referencia a un primer anillo permite la presencia de un segundo, pero no implica que esté presente. De manera similar, cuando se describen elementos como primero y segundo, como las fases estacionarias primera y segunda de dos anillos en tándem, se entiende que estos dos elementos pueden ser el mismo (por ejemplo el mismo tipo de adsorbente), pero que los elementos son distintos en un sentido espacial o en otro sentido de separación.

30 “Resolver una ecuación” - A lo largo del presente documento, varias veces se especifican grupos de condiciones de operación y/o de parámetros de diseño, y se indica que las ecuaciones que relacionan esas condiciones de operación o parámetros de diseño se resuelven para llegar a los SMB de la presente invención. Cuando se definen tales relaciones, se entenderá que la relación no está limitada literalmente por las condiciones de operación o por los parámetros de diseño exactos definidos por el grupo, sino que las ecuaciones también pueden resolverse utilizando variables a partir de las cuales pueden derivar las condiciones de operación y/o parámetros de diseño. Por ejemplo, en varias realizaciones, se proporcionan ecuaciones que relacionan la pureza del producto y el rendimiento con otros términos. Se entiende que tales ecuaciones pueden referirse a la pureza de los componentes separados en el extracto y el refinado, ya que la pureza del producto y el rendimiento pueden extraerse fácilmente de tales purezas. Así, cuando se da una ecuación en concreto para el diseño de los SMB de la presente invención, y se indica que también puede emplearse un derivado de la ecuación, se entiende que tales derivados incluyen la sustitución de variables para las cuales existe una relación conocida, mediante la integración de tales relaciones en las ecuaciones.

40 “Optimizar la rentabilidad económica” - En el presente documento en varias ocasiones se indica que la rentabilidad económica de los SMB se puede mejorar u optimizar utilizando los procedimientos de la presente invención. Se entiende que el mejor rendimiento económico de un sistema se basa en un grupo de interrelaciones demasiado numerosas para expresarlas adecuadamente en el presente documento, pero que de manera general pueden determinarse mediante procedimientos comúnmente conocidos en el diseño de ingeniería química. Frecuentemente, la rentabilidad económica de un sistema particular puede valorarse mediante reglas generales. Por ejemplo, en muchos sistemas la rentabilidad puede valorarse únicamente por la producción, ya que predominan el capital y los gastos de mantenimiento asociados a la producción. En otros sistemas, la rentabilidad económica puede valorarse mediante la cantidad de desorbente utilizado, debido al gasto de la separación del desorbente de los componente(s) deseado(s), o del coste del material de partida del desorbente. Así, en las realizaciones preferidas de esta invención la rentabilidad económica se basa en la tasa de producción o en el uso de desorbente. Tales tasas y relaciones, como otras tasas y relaciones que se expresan en el presente documento, son volumétricas mientras no se exprese lo contrario, o mientras el contexto no lo requiera claramente de otra manera.

55 Cuando la producción o el uso de desorbente de un sistema en particular está “optimizado”, se entiende que la producción se aproxima o iguala el nivel máximo alcanzable bajo condiciones de frente estacionario, o que el uso de desorbente se aproxima o iguala el uso mínimo de desorbente que se puede alcanzar bajo condiciones de frente estacionario, para el sistema en concreto que se estudia. Así, la producción está maximizada si excede el 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% del máximo de frente estacionario. El uso de desorbente está minimizado si es inferior al 125%, 115%, 110%, 105%, 103%, 102%, o 101% del mínimo de frente estacionario.

65 Desorbente - El término desorbente se refiere a la fase móvil que se añade a un anillo del SMB entre los puertos de refinado y de extracto. Se utiliza el término “desorbente” porque, cuando se combina con el total de la fase móvil, el desorbente contribuye a los frentes de desorción de varios componentes en sus respectivas zonas, ya sea incrementando la velocidad de la fase móvil en un sistema de exclusión por tamaño, o desplazando físicamente o eliminando la solución de la fase sólida. Así, no se pretende que el término “desorbente” implique que la composición desorbente tenga ninguna capacidad de desorción en particular, o que desorba a través de ningún mecanismo físico en particular.

“Uso de desorbente” - El término desorbente se refiere al caudal volumétrico del desorbente en un SMB, y por tanto puede medirse directamente en la conducción de entrada de desorbente. El uso de desorbente está minimizado si, para una separación dada en un sistema definido, el uso de desorbente es menor que 125%, 115%, 110%, o 105% del uso de desorbente teórico definido por las ecuaciones de frente estacionario. El uso de desorbente es preferiblemente inferior a 102% o 101% del uso teórico.

Purificación de Insulina

Como se menciona arriba, los inventores han descubierto nuevos procedimientos para la purificación cromatográfica de insulina a partir de mezclas binarias y multicomponente que usan la tecnología de lecho fluidizado simulado. En el caso de mezclas multicomponente, los procedimientos pueden utilizarse para conseguir tanto separaciones pseudo-binarias como separaciones de fracciones y/o componentes de afinidad intermedia a partir de mezclas multicomponentes. En el caso de una separación pseudo-binaria, la insulina será el componente más rápido o el más lento de una mezcla multicomponente, y se separará de una fracción que comprende al menos dos componentes en una etapa de separación, utilizando sólo un anillo SMB. Si la insulina es un componente de afinidad intermedia, entonces será necesario que la insulina se separe de la fracción y/o componente más rápido y del más lento en dos separaciones sucesivas, utilizando dos anillos SMB.

Así, en una realización, la invención proporciona un procedimiento para la separación cromatográfica de insulina de uno o más componentes y/o fracciones que comprende:

- a) proporcionar un lecho fluidizado simulado que comprende un primer anillo, una fase estacionaria, y una primera corriente de desorbente;
- b) proporcionar una corriente de alimentación que comprende insulina y un primer componente o fracción;
- c) introducir la primera corriente de desorbente y la corriente de alimentación en el primer anillo bajo condiciones de frente estacionario para separar la insulina del primer componente o fracción; y
- d) extraer la insulina del primer anillo en forma de extracto o refinado sustancialmente separada del primer componente o fracción.

Si la insulina es un componente de afinidad intermedia, entonces el procedimiento además comprenderá:

- a) introducir la insulina del primer anillo y una segunda corriente de desorbente en un segundo anillo, bajo condiciones para separar la insulina del segundo componente o fracción; y
- b) extraer del segundo anillo un extracto o refinado que comprende la insulina sustancialmente separada del primer y segundo componentes y/o fracciones. En realizaciones preferidas, el uso de desorbente está minimizado en las separaciones en el primer y/o segundo anillo.

El procedimiento puede utilizarse para purificar cualquier tipo de insulina, entendiéndose éste término tan ampliamente como se describe en el presente documento, sin embargo, en una realización preferida, la insulina es insulina humana biosintética derivada de un sistema de expresión recombinante de proteínas. Los componentes a partir de los cuales se puede purificar la insulina preferiblemente incluyen proteínas de alto peso molecular que provienen del proceso de expresión recombinante (tales como proteasas y residuos de proteínas de fusión que no se enlazaron de manera apropiada) y proinsulina. El término proteína de alto peso molecular (HMWP) se utiliza para referirse a cualquier proteína que tiene un peso molecular mayor al de la insulina. Especialmente, en la purificación concreta descrita en el presente documento, la HMWP puede tratarse como un solo componente ya que en condiciones cromatográficas los componentes HMWP se comportan sustancialmente como una unidad. Otro componente para la separación a partir de insulina es una con un peso molecular inferior a la insulina, como un péptido de enlace o la sal de un metal, como una sal de calcio, zinc, níquel, cobalto, y similares, las cuales es necesario eliminar.

El procedimiento puede utilizarse para purificar insulina a partir de cualquier mezcla que pueda resolverse apropiadamente utilizando cromatografía, utilizando cualquier procedimiento cromatográfico incluyendo cromatografía de adsorción, cromatografía de separación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, y cromatografía de afinidad. Sin embargo, en una realización preferida, la purificación se realiza bajo isoterma lineales de adsorción. En una realización todavía más preferida, la purificación se realiza utilizando un proceso de exclusión por tamaño.

En la cromatografía de exclusión por tamaño, el procedimiento carece de cualquier interacción atractiva sustancial entre la fase estacionaria y el componente. La fase líquida o gaseosa pasa a través de un gel poroso que separa las moléculas en función del tamaño. Generalmente, los poros son pequeños y excluyen las moléculas más grandes del componente, pero permiten que las moléculas más pequeñas entren en el gel, provocando que fluyan por un volumen mayor. Esto provoca que las moléculas más grandes pasen a través de la columna a una velocidad superior que las más pequeñas. Para la separación de biomoléculas en sistemas acuosos, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se denomina cromatografía por filtración en gel (GFC), mientras que la separación de polímeros orgánicos en sistemas no acuosos se llama cromatografía de permeabilidad en gel (GPC).

Los ejemplos de materiales apropiados para exclusión por tamaños incluyen, entre otros, almidón (incluyendo almidón de maíz), galactomanano reticulado, dextrano reticulado, agar o agarosa, poliacrilamidas, copolímeros de acrilamida y bis-acrilamida de metileno, copolímeros de bis-acrilamida de metileno con viniletilcarbitol y con vinilpirrolidona, y similares. Para los medios más exigentes, se puede tomar en consideración un gel basado en polímeros rígidos formado por un material de base polimérica o silíceica. Los geles preferidos son los dextranos reticulados, tales como las series Sephadex de Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N.J.

Los geles hinchables en agua, preferiblemente tienen en su estado seco o no hinchado una recuperación de agua de al menos aproximadamente el 4 por ciento en peso, respecto al peso del gel seco, y los diámetros de partícula son menores a 100 micras. Preferiblemente, la recuperación de agua del gel estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 98 por ciento, y más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento. La relación media del diámetro de la partícula de gel hidratado respecto a la partícula de gel seco es preferiblemente de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,9, más preferiblemente de aproximadamente 1,45 a aproximadamente 1,65, y lo más preferiblemente 1,56. Preferiblemente, los diámetros de las partículas de gel seco serán menores a aproximadamente 80 micras; un intervalo de diámetros de partícula particularmente útil es de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 micras.

En el proceso de la presente invención pueden utilizarse varios desorbentes de manera similar, siempre que no degraden la insulina en ningún grado significativo. Sin embargo, un desorbente preferido mostrará una excelente solubilidad de insulina, especialmente cuando se utilice en un proceso de exclusión por tamaño donde se sigan isotermas lineales para un intervalo amplio de concentraciones de componente. En una realización la insulina es soluble en el desorbente hasta aproximadamente 60, 80, o incluso 100 g/l. Generalmente, el desorbente será una solución acuosa con un pH en el intervalo de la alimentación de insulina en el SMB (generalmente de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,5). Así, el desorbente puede ser cualquier solución acuosa de ácido orgánico u inorgánico respecto al que la insulina sea estable, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido isobutírico, ácido isobutírico, ácido pentanoico, y similares. En una realización preferida el desorbente comprende ácido acético. La configuración de la columna es una función del número de columnas, la longitud de la columna, y de como las columnas están dispuestas en las zonas. La disposición de las columnas (longitudes de zona) es crítica para satisfacer de los exigentes criterios de diseño (como las necesidades de pureza y/o rendimiento), ya que bajo algunas circunstancias no se pueden alcanzar la pureza y rendimiento deseados a menos de que las zonas sean lo suficientemente largas y/o las columnas están dispuestas apropiadamente. La configuración de columnas del SMB de la presente invención se selecciona para conseguir un rendimiento y pureza definidos. Además, la configuración preferiblemente está optimizada para la rentabilidad, ya sea maximizando la producción en el SMB, o minimizando el uso de desorbente, para un grupo de parámetros de diseño y/o operación suficientemente establecidos, tal como se describe más detalladamente en el presente documento (incluyendo rendimientos definidos de los componentes y/o fracciones purificados, la pureza y el rendimiento de un componente o fracción deseado, caudales de zona máximos definidos, y/o un caudal de alimentación deseado).

Así, en un aspecto de la invención el número de columnas utilizadas en un SMB se optimiza para una disposición de columnas en particular. Por supuesto, en esta realización se entiende que el número de columnas para las longitudes de zona definidas siempre pueden incrementarse para mejorar la eficiencia del sistema. Por lo tanto, en este contexto, un diseño óptimo proporcionará más de aproximadamente el 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o el 99% de la producción teórica, o menos del 125%, 110%, 105%, 103%, 102%, o 101% del consumo mínimo de desorbente, cada uno como se define por el diseño de frente estacionario, en un número infinito de columnas.

En otro aspecto de la invención el número de columnas en cada zona se disponen de manera óptima para un número establecido de columnas. Así, en una realización preferida la separación de la presente invención tiene lugar en un SMB donde:

a) el primer anillo comprende 4 zonas y 5 o más columnas, o 5 zonas y 6 o más columnas;

b) la disposición de las columnas en las zonas optimiza sustancialmente la producción del primer anillo, o el uso del desorbente en el primer anillo, para un número definido de columnas. En otras realizaciones el anillo comprende 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, o 20, o más, columnas.

Los procedimientos de la presente invención también incluyen varias estrategias de separación que pueden utilizarse en la purificación de insulina cuando ésta es el componente de afinidad intermedia de una mezcla multicomponente. Cuando se operan en serie dos unidades SMB de cuatro zonas, se pueden utilizar muchas estrategias de separación para obtener productos purificados. En la Figura 7, se muestran cuatro de estas estrategias (S1-S4) para la separación de componentes numerados 1, 2, y 3, en una mezcla donde el orden de retención es el siguiente: $a_1 < a_2 < a_3$.

En este análisis preliminar se desprecian las resistencias de transferencia de masa (un caso denominado caso "ideal") y se asume que los frentes de onda son definidos. Por comodidad, las ondas estacionarias mostradas en la Figura 7 para diferentes estrategias se resumen en la Tabla 1. Los números listados en la Tabla 1 representan los componentes estacionarios en cada zona. Por ejemplo, 3 significa que el componente 3 es estacionario en la zona asociada.

TABLA 1

Frentes estacionarios para varias estrategias de separación de sistemas de tres componentes

Estrategia	Frentes Estacionarios								
	Zona IA	Zona IIA	Zona IIIA	Zona IVA	Zona VA	Zona IB	Zona IIB	Zona IIIB	Zona IVB
S1	3*	1*	2 [†]	1 [†]		3*	2*	3 [†]	2 [†]
S2	3*	2*	3 [†]	1 [†]		2*	1*	2 [†]	1 [†]
S3	2*	1*	2 [†]	1 [†]		3*	2*	3 [†]	2 [†]
S4	3*	2*	3 [†]	2 [†]		2*	1*	2 [†]	1 [†]
S5	3*	2*	1*	2 [†]	1 [†]	3*	2*	3 [†]	2 [†]
S6	3*	2*	3 [†]	2 [†]	1 [†]	2*	1*	2 [†]	1 [†]

* Frente de desorción

† Frente de adsorción

En la Figura 7a, el componente 1 se separa de 2 y 3 en la primera unidad de SMB (anillo A), y el producto extraído (que contiene los componentes 2 y 3 sin resolver) se introduce como alimentación en una segunda unidad SMB (anillo B), en el que el componente 2 se separa del componente 3. La figura 7b es similar: el componente 3 se separa de 1 y 2 en el anillo A, y 1 se separa de 2 en el anillo B.

Un sistema de N componentes en el que se desea el componente purificado j seguiría estrategias similares de separación, como se establece en la Tabla 2.

TABLA 2

Frentes estacionarios para varias estrategias de separación de sistemas de N componentes

Estrategia	Frentes Estacionarios								
	Zona IA	Zona IIA	Zona IIIA	Zona IVA	Zona VA	Zona IB	Zona IIB	Zona IIIB	Zona IVB
S1	N*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]		N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	$j^{\dagger}$
S2	N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	1 [†]		j^*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]
S3	J*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]		N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	$j^{\dagger}$
S4	N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	$j^{\dagger}$		j^*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]
S5	N*	j^*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]	N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	$j^{\dagger}$
S6	N*	j^*	$j+1^{\dagger}$	$j^{\dagger}$	1 [†]	j^*	$j-1^*$	$j^{\dagger}$	1 [†]

* Frente de desorción

† Frente de adsorción

En particular, para la estrategia S1, los componentes 1... $j-1$ se extraerán con el extracto de la primera unidad SMB, y el producto extraído (que contiene los componentes j ...N sin resolver) serán introducidos como alimentación en la segunda unidad SMB en la que el componente j se separaría de los componentes $j+1$...N. La estrategia S2 es similar: los componentes 1... j se separarían de los componentes $j+1$...N en el primer anillo, y los componentes 1... $j-1$ se separarían del componente j en el segundo anillo.

Las figuras 7a-b muestran cómo obtener tres productos puros a partir de una mezcla de tres componentes. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es necesario obtener todos los componentes con pureza alta y con altos rendimientos. Cuando solamente se desea el producto intermedio de pureza alta y con rendimiento alto, los inventores inesperadamente han determinado que puede ser preferible permitir que un componente se distribuya por toda la unidad SMB. Por ejemplo, en la Figura 7c, los componentes 2 y 3 se separan de 1 en el primer anillo, por lo que el componente 1 se puede excluir del extracto y recogerse en el refinado; sin embargo, si no se precisa que los componentes 1 y 3 sean de pureza alta, entonces la condición de frente estacionario en la zona 1 puede relajarse para permitir que se envíe parte del componente 3 (es decir, que migre de la zona I a la zona IV) y se recoja en el refinado con el componente 1. Análogamente, en la Figura 7d, se permite enviar el componente 1 de manera que se extraiga tanto del refinado como del extracto.

Las condiciones se relajan en el sentido de que el componente que se puede enviar por fuera del SMB no está considerado en el diseño de frente estacionario. Así, las ecuaciones de frente estacionario que rigen una separación binaria de componentes, como el propuesto por Ma y Wang (1997), regirían el diseño del sistema ilustrado en las Figuras 7c y 7d. Para la primera separación mostrada en la Figura 7c, las ecuaciones son como se indica a continuación:

$$u_0^I = (1 + P\delta_2)v \quad (3)$$

$$u_0^{II} = (1 + P\delta_1)v \quad (4)$$

$$u_0^{III} = (1 + P\delta_2)v \quad (5)$$

$$u_0^{IV} = (1 + P\delta_1)v \quad (6)$$

El tándem SMB para el fraccionado multicomponente no está limitado a dos anillos de 4 zonas. La flexibilidad en el diseño se incrementa cuando se utilizan cinco zonas en el primer anillo del sistema SMB en tándem. Las Figuras 7e-f muestran representaciones esquemáticas de dos de dichos procesos para la separación de tres componentes. En la Figura 7e en la primera unidad SMB (anillo A) el componente 1 está completamente separado de los componentes 2 y 3. Parte del componente 3 se extrae purificado por una corriente de extracto, y el restante contamina una corriente intermedia de extracto que también contiene componente 2. El componente de la corriente intermedia de extracto (que contiene los componentes 2 y 3 sin resolver) se introduce como alimentación en una segunda unidad SMB (anillo B), en la cual se separa completamente el componente 2 del componente 3. La Figura 7f es similar: En el anillo A el componente 3 está completamente separado de 1 y 2, parte del componente 1 se extrae purificado por una corriente de refinado, y el restante contamina una corriente intermedia de refinado que también contiene componente 2. La corriente intermedia de refinado se introduce como alimentación en la segunda unidad SMB para separar los componentes 1 y 2.

Las ecuaciones de frente estacionario que rigen las separaciones descritas en las figuras 7e y 7f, para un sistema de tres componentes, modificadas con los términos de corrección de transferencia de masa (Δ) tal como se discute más detalladamente abajo, se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3a

Frentes estacionarios y Ecuaciones para un SMB de nueve zonas con Estrategia S5 (Figura 7e)

	Zona	Tipo de Frente	Soluto	Ecuación de Frente Estacionario
SMB 1	I	Desorción	3	$u_0^I = (1 + P\delta_3)\nu + \Delta_3^I$
	II	Desorción	2	$u_0^{II} = (1 + P\delta_2)\nu + \Delta_2^{II}$
	III	Desorción	1	$u_0^{III} = (1 + P\delta_1)\nu + \Delta_1^{III}$
	IV	Adsorción	2	$u_0^{IV} = (1 + P\delta_2)\nu - \Delta_2^{IV}$
	V	Adsorción	1	$u_0^V = (1 + P\delta_1)\nu - \Delta_1^V$
SMB 2	I	Desorción	3	$u_0^I = (1 + P\delta_3)\nu + \Delta_3^I$
	II	Desorción	2	$u_0^{II} = (1 + P\delta_2)\nu + \Delta_2^{II}$
	III	Adsorción	3	$u_0^{III} = (1 + P\delta_3)\nu - \Delta_3^{III}$
	IV	Adsorción	2	$u_0^{IV} = (1 + P\delta_2)\nu - \Delta_2^{IV}$

Nota: Δ_i^n son números positivos, el primer subíndice indica el número de zona y el segundo subíndice indica el soluto.

TABLA 3b

Ecuaciones de Frente estacionario para un SMB de nueve zonas con Estrategia S6 (Figura 7f)

	Zona	Tipo de Frente	Soluto	Ecuación de Frente Estacionario
SMB 1	I	Desorción	3	$u_0^I = (1 + P\delta_3)\nu + \Delta_3^I$
	II	Desorción	2	$u_0^{II} = (1 + P\delta_2)\nu + \Delta_2^{II}$
	III	Adsorción	3	$u_0^{III} = (1 + P\delta_3)\nu - \Delta_3^{III}$
	IV	Adsorción	2	$u_0^{IV} = (1 + P\delta_2)\nu - \Delta_2^{IV}$
	V	Adsorción	1	$u_0^V = (1 + P\delta_1)\nu - \Delta_1^V$
SMB 2	I	Desorción	2	$u_0^I = (1 + P\delta_2)\nu + \Delta_2^I$
	II	Desorción	1	$u_0^{II} = (1 + P\delta_1)\nu + \Delta_1^{II}$
	III	Adsorción	2	$u_0^{III} = (1 + P\delta_2)\nu - \Delta_2^{III}$
	IV	Adsorción	1	$u_0^{IV} = (1 + P\delta_1)\nu - \Delta_1^{IV}$

Las estrategias de separación de arriba generalmente se utilizan para mejorar la eficiencia de la separación, mediante el aumento de la producción del sistema, mediante el descenso del consumo de desorbente, o una combinación de ambos. Ya que el uso de desorbente puede minimizarse permitiendo que un componente se distribuya en el primer anillo, en una realización se permite que el primer o el segundo componente o fracción se distribuya en el primer anillo, y sólo se purifique insulina, para reducir el uso de desorbente.

Cuando interesa purificar más de un componente o fracción (es decir, que al menos se separe volumétricamente un 50%, 65%, 75%, 85%, o 95% de uno o más de los otros componentes o fracciones) de una separación multicomponente en la que la insulina es el componente de afinidad intermedia, entonces la separación más sencilla debería llevarse a cabo en primer lugar para minimizar el consumo de desorbente. Así, en otra realización preferida, a) la insulina se extrae del primer anillo sustancialmente separada de la primera fracción o componente, y b) la diferencia entre las afinidades de la insulina y el primer componente o fracción por la fase estacionaria en el primer anillo es menor que la diferencia entre las afinidades de la insulina y el segundo componente o fracción por la fase estacionaria en el segundo anillo.

Procedimiento de Diseño

La invención también proporciona un procedimiento de diseño que puede utilizarse en el diseño de cualquier proceso SMB para la purificación de insulina bajo isotermas de adsorción lineales. Este procedimiento preferiblemente se realiza en un entorno informático. Por ejemplo, el sistema está diseñado preferiblemente para introducir uno o más parámetros de diseño u operación en una máquina en la que se han codificado las ecuaciones que rigen el SMB, resolviendo las ecuaciones mediante la máquina, y obteniendo un resultado que define uno o más parámetros de diseño u operación. Además, generalmente al procedimiento de diseño le sigue la etapa de realizar una separación SMB (ya sea experimentalmente o mediante una simulación por computador) bajo las condiciones determinadas por el diseño. Sin embargo, en algunas situaciones puede ser beneficioso ajustar los caudales determinados por el diseño, en tal caso pueden relajarse las condiciones de frente estacionario determinadas por el diseño en una o más zonas, antes de realizar la separación SMB. La siguiente es una explicación del procedimiento y sus fundamentos.

En un SMB de cuatro zonas, la función de cada zona es la siguiente: (1) Zona I: Esta zona está localizada entre la entrada de desorbente y la salida del extracto y se utiliza para desorber la fracción lenta. Una parte de la corriente que sale de esta zona sale como extracto mientras que la restante fluye hacia la zona II. (2) Zona II: Esta zona se utiliza para desorber la fracción rápida y la separación de la fracción lenta. (3) Zona III: Esta zona se utiliza para la separación de la fracción lenta de la fracción rápida. Parte de la fracción rápida sale por el puerto de refinado. (4) Zona IV: Esta zona se utiliza para adsorber la fracción rápida a la vez que para la recuperación del desorbente. Idealmente, el caudal que sale de esta zona sólo contiene desorbente puro que se recircula hacia la entrada de desorbente para reutilizarlo.

Para tener una operación continua y estable en un SMB de cuatro zonas, los caudales en las cuatro zonas deben cumplir las siguientes condiciones:

$$F^I > F^{II} \quad (7)$$

$$F^{II} < F^{III} \quad (8)$$

$$F^{III} > F^{IV} \quad (9)$$

$$F^{IV} < F^I \quad (10)$$

Además, para separar dos componentes, deben tomarse en cuenta las velocidades de migración de los dos componentes para determinar los caudales de zona. En la literatura (Ruthven y Ching, 1989; Wankat, 1994) se conocen las siguientes condiciones para las velocidades en cada zona.

$$u_{12}^{III} - v < 0 \quad (11)$$

$$u_{s1}^{IV} - v < 0 \quad (12)$$

$$u_{s2}^I - v > 0 \quad (13)$$

$$u_{s1}^{II} - v > 0 \quad (14)$$

donde v es el movimiento medio del puerto a lo largo de la dirección de la corriente de desorbente, y u_{s2}^I y u_{s2}^{III} son las velocidades de migración lineal del componente 2 en las zonas I y III respectivamente. Se utiliza la misma convención para el componente 1 en las zonas II y IV. Las Ecuaciones 11 y 12 indican que la velocidad de migración de la fracción lenta (componente 2) debe ser inferior a v en la zona III y que la de la fracción rápida (componente 1) debe ser menor que v en la zona IV. Las Ecuaciones 13 y 14 indican que la velocidad del componente 2 debería ser mayor que v en la zona I y que la del componente 1 debería ser mayor que v en la zona II. Las Ecuaciones 11-14 definen todos los posibles caudales de zona y las velocidades de movimiento de puerto necesarias para garantizar la separación. Estas ecuaciones deben cumplirse para obtener la separación en sistemas con o sin resistencias de transferencia de masa.

Dentro de la región de estabilidad definida en las ecuaciones 11-14, existen infinitas combinaciones de caudales de zona y velocidades de movimiento de puerto (tiempo de intercambio) que garantizan la separación en un sistema dado. Entre ellos, los caudales de zona y la velocidad de movimiento de puertos óptima que lleva a la mayor producción y el menor uso de desorbente para una mezcla multicomponente puede encontrarse mediante la selección de los frentes de concentración apropiados para que permanezcan estacionarios en cada zona (es decir, el análisis de onda estacionaria). La Figura 6a ilustra, para un sistema sin efectos de transferencia de masas, que frentes deben permanecer estacionarios en cada zona para asegurar la completa separación de dos fracciones en un sistema multicomponente.

En particular, la Figura 6a muestra que:

- (1) en la zona I, el frente de desorción del componente más lento (componente N) debe permanecer estacionario;
- (2) en la zona II, el frente de desorción del componente j debe permanecer estacionario;
- (3) en la zona III, el frente de desorción del componente $j+1$ debe permanecer estacionario; y
- (4) en la zona IV, el frente de adsorción del componente más rápido (componente 1) debe permanecer estacionario.

Se ha probado experimentalmente, y se ha demostrado en los ejemplos del presente documento, que las condiciones precedentes aseguran que en un SMB se consigue una separación deseada. Las condiciones de frente estacionario asociadas con la separación mostrada en la figura 6a se puede expresar algebraicamente mediante las siguientes ecuaciones:

$$u_0^I = (1 + P\delta_N)v \quad (15)$$

$$u_0^{II} = (1 + P\delta_j)v \quad (16)$$

$$u_0^{III} = (1 + P\delta_{j+1})v \quad (17)$$

$$u_0^{IV} = (1 + P\delta_1)v \quad (18)$$

donde la velocidad de movimiento de los puertos está dada por

$$v = \frac{F^{\text{Alimentación}}}{SP \varepsilon_b (\delta_{j+1} - \delta_j)} \quad (19)$$

N representa el número de componentes en el sistema, numerados de menor a mayor afinidad como 1,...,j, j+1,..., N

y en el cual es deseable una separación entre el componente j y j+1. u_0 es la velocidad intersticial de la fase móvil, y la u_0 determinada mediante las ecuaciones 15-19 representan lo que en el presente documento se denomina como "velocidad ideal de la fase móvil". Los restantes términos se definen como sigue: S es el área de sección transversal de la columna; $\delta_i (\equiv K_{ei} \varepsilon_p + (1 - K_{ei} \varepsilon_p) a_i)$ es el factor de retención para sistemas lineales (a_i es la constante de partición entre la fase adsorbida y la fase líquida para el componente i a una concentración infinitesimal, y ε_p es la porosidad de la partícula); K_{ei} es el factor de exclusión por tamaño para el componente i respecto al material de empaquetamiento utilizado en el SMB.

$P \left(\equiv \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \right)$ es la velocidad de la fase del lecho; ε_b es la fracción muerta intersticial del lecho; y $F_{\text{alimentación}}$ es el caudal de la alimentación. Las variables α_i , ε_p , K_{ei} , y ε_p son parámetros de diseño intrínsecos que pueden estimarse a partir de los cromatogramas de elución o, para algunos sistemas y materiales de empaquetamiento, pueden tomarse de la literatura o de los manuales del fabricante.

Una vez se conocen los parámetros intrínsecos de diseño, y se selecciona una sección transversal inicial de la columna, se pueden determinar fácilmente los caudales de las cuatro zonas y la velocidad del movimiento de los puertos para una $F_{\text{alimentación}}$ dada, ya que hay cinco ecuaciones, ecuaciones 15-19, con cinco incógnitas u_0^I , u_0^{II} , u_0^{III} , u_0^{IV} , y v.

A la inversa, las ecuaciones pueden resolverse basándose en una velocidad de consumo de desorbente dada, utilizando la ecuación 20:

$$\frac{F^{\text{des}}}{\varepsilon_b S} = u_0^I - u_0^{IV} \quad (20)$$

donde F_{des} es el caudal de desorbente. Tomando esta aproximación, se puede identificar el mayor caudal de alimentación para una velocidad de consumo de desorbente dada, ya que u_0^{III} es el mayor y u_0^{IV} el menor entre todos los posibles diseños que garanticen la separación.

Por supuesto, si se contempla una separación pseudo-binaria, en la que el componente deseado es el componente más lento o más rápido de una mezcla multicomponente, entonces se necesitaría modificar apropiadamente las ecuaciones 15-18, como se muestra en la Tabla 2. En particular, si el componente deseado era el componente más rápido, entonces se utilizará el factor de retención del componente 1 para determinar el movimiento de la fase móvil en la zona II. Alternativamente, si el componente deseado era el componente más lento, el factor de retención del componente N se utilizaría para determinar la velocidad de la fase móvil en la zona III.

Ya que el consumo de desorbente y el caudal de alimentación son dos de los factores principales que determinan el coste y la eficiencia del sistema, la capacidad de identificar rápidamente los caudales máximos para un uso de desorbente dado, o un uso mínimo de desorbente para un caudal de alimentación dado, utilizando las ecuaciones precedentes, permite el cribado rápido y eficiente de varias relaciones desorbente/alimentación y la determinación de parámetros de sistema que optimizan la rentabilidad económica del sistema. Esto es especialmente cierto en los sistemas ideales regidos por los parámetros de operación de arriba, en los que se supone el 100% de rendimiento del producto.

Resistencias de Transferencia de Masa: Así, el discurso anterior se ha limitado al diseño de sistemas ideales en los que no hay resistencias de transferencia de masa significativas. Ya que no hay dispersión de los componentes entre las zonas, pueden obtenerse productos puros en ambos puertos de salida para cualquier longitud de zona y sin ningún límite de producción o de caudal de alimentación. Teóricamente, el caudal de alimentación puede ser tan alto como permita el equipamiento o la resina. Esto se ilustra mediante los frentes de concentración perpendiculares de la Figura 6a. Ya que los frentes de concentración son perpendiculares, las longitudes de zona pueden comprimirse y los componentes no migrarán inesperadamente de una zona a la siguiente.

En contraste, para sistemas no ideales (es decir, sistemas con resistencias de transferencia de masa), existe un caudal máximo de alimentación que es función de las longitudes de zona, las purezas deseadas de producto, las isotermas, y los parámetros de transferencia de masa. La Figura 6b muestra este punto. Como se muestra en la Figura 6b, los efectos de la transferencia de masa provocan que los frentes de concentración se dispersen en sus respectivas zonas (es decir, los frentes ya no son perpendiculares). Además, si los frentes de concentración no están confinados provocarán la contaminación de los puertos de extracto y refinado.

Los frentes pueden confinarse en sus respectivas zonas, y los productos puros que se obtienen en el puerto de extracto y refinado, mediante el incremento de las longitudes de zona, o alterando las velocidades del movimiento de puertos y de la fase móvil. Sin embargo, generalmente es aceptable cierto grado de contaminación e incluso es deseable desde un punto de vista económico. Así, el SMB también puede diseñarse para permitir un grado concreto de contaminación, y para permitir una operación del SMB más económica.

Los SMB de la presente invención pueden diseñarse para acomodar sistemas en los que la separación está dificultada por resistencias de transferencia de masa no negligibles, sin tener en cuenta qué mecanismo o mecanismos de transferencia de masa predominan, mediante una extensión a sistemas no ideales de los conceptos precedentes de frente estacionario. En particular, para diseñar un sistema con resistencias de transferencia de masa significativas (Sistemas no ideales), se modifican las ecuaciones 15-19 mediante términos de corrección para tener en cuenta la dispersión del frente de los componentes que mantienen estacionarios sus frentes de concentración en cada zona, atribuible a los efectos de transferencia de masa. Las soluciones completas de las velocidades lineales de una separación multicomponente en las cuatro zonas de un SMB, corregidas para los efectos de transferencia de masa, pueden encontrarse a partir de las ecuaciones 19 y 21-24, basándose en el concepto de frentes estacionarios (Figura 6b).

$$u_0^I - (1 + P\delta_N)v = \beta_N^I \left(\frac{E_{b,N}^I}{L^I} + \frac{Pv^2 \delta_N^2}{K_{f,N}^I L^I} \right) \quad (21)$$

$$u_0^{II} - (1 + P\delta_j)v = \beta_j^{II} \left(\frac{E_{b,j}^{II}}{L^{II}} + \frac{Pv^2 \delta_j^2}{K_{f,j}^{II} L^{II}} \right) \quad (22)$$

$$u_0^{III} - (1 + P\delta_{j+1})v = -\beta_{j+1}^{III} \left(\frac{E_{b,j+1}^{III}}{L^{III}} + \frac{Pv^2 \delta_{j+1}^2}{K_{f,j+1}^{III} L^{III}} \right) \quad (23)$$

$$u_0^{IV} - (1 + P\delta_1)v = -\beta_1^{IV} \left(\frac{E_{b,1}^{IV}}{L^{IV}} + \frac{Pv^2 \delta_1^2}{K_{f,1}^{IV} L^{IV}} \right) \quad (24)$$

Las variables de las ecuaciones precedentes se definen como sigue:

N representa el número de componentes en el sistema, numerados de menor a mayor afinidad como 1,..., j, j+1,..., N, y en los que es deseable una separación entre los componentes j y j+1.

- u_0 es la velocidad intersticial
- S es el área de la sección transversal de la columna
- $\delta_i (\equiv K_{ei}\varepsilon_p + (1 - Ke_i\varepsilon_p)a_i)$ (a_i es la constante de partición entre la fase adsorbida y la fase líquida para el componente i en una concentración infinitesimal, y ε_p es la porosidad de la partícula)
- Ke_i es el factor de exclusión por tamaño del componente i
- $P (\equiv \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b})$ es la relación de la fase del lecho

• ε_b es la fracción vacía intersticial del lecho

• $F_{\text{alimentación}}$ es el caudal de alimentación

• F_{des} es el caudal de desorbente

• L es la longitud de zona

• E_b es el coeficiente de dispersión axial

• K_f es el coeficiente de transferencia de masa efectivo

• β está relacionada con la proporción entre la mayor concentración y la menor concentración del frente estacionario en una zona determinada.

Si se especifican las purezas de los productos (es decir, la pureza de los componentes separados en el extracto y el refinado), el área de la sección transversal de la columna (S), las longitudes de zona, y el caudal de alimentación, las ecuaciones de frente estacionario pueden utilizarse para encontrar la velocidad de movimiento de puerto y las velocidades lineales de la fase móvil en las cuatro zonas del SMB. Estas ecuaciones definen las condiciones de frente estacionario cuando E_b y K_f son significativas. Además, definen las velocidades lineales máximas en las zonas III y IV y las velocidades lineales mínimas en las zonas I y II para un sistema con isotermas lineales. Cualquier velocidad inferior en las zonas III y IV y cualquier velocidad superior en la zona I y II resulta en purezas y recuperaciones de producto mejores de las especificadas. Sin embargo, tales diseños tendrán una producción inferior o un mayor consumo de desorbente que el diseño de frente estacionario. Las ecuaciones también definen el consumo mínimo de desorbente para un caudal de alimentación dado, ya que u_0^{IV} es el mayor y u_0^{I} el menor entre todos los diseños posibles que garantiza la separación con un rendimiento y pureza determinada.

El lado derecho de las ecuaciones 21-24 es el término de corrección de la transferencia de masa para cada zona, que establece el grado en el que puede alterarse la “velocidad ideal de la fase móvil” en cada zona para cumplir con el nivel de separación deseado. Los factores de corrección de transferencia de masa afectan a la difusión del frente a través de los componentes retenidos (o liberados) en cada zona. Como se ha mencionado arriba, la velocidad de la fase móvil permitida en cada zona es función de las longitudes de zona, las purezas deseadas de producto, las isotermas y los parámetros de transferencia de masa. Las isotermas afectan a través del factor de retención a la velocidad del centro de masa de cada frente de concentración que se mantiene constante en las cuatro zonas. Los demás factores están asociados exclusivamente con la transferencia de masa, y se toman en consideración por el término de corrección de la transferencia de masa para cada frente de concentración que debe mantenerse estacionario en las cuatro zonas.

Así, L es la longitud de zona, E_b es el coeficiente de dispersión axial, K_f es el coeficiente de transferencia de masa efectivo, β está relacionado con la proporción entre la mayor concentración y la menor concentración del frente estacionario en una zona específica (Figura 6b), y los términos restantes son como se define arriba. De nuevo, los parámetros intrínsecos de diseño E_b y K_f pueden determinarse experimentalmente mediante cromatogramas de elución de pulso largo o corto, o mediante referencias a la literatura para algunos sistemas. Alternativamente, el coeficiente de transferencia de masa efectivo, $K_{f,i}^m$, para el componente i en la zona m puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{K_{f,i}^m} = \frac{R_p^2}{15 K_{e,i} \varepsilon_p D_{p,i}} + \frac{R_p}{3 k_{f,i}^m} \quad (25)$$

Este parámetro conjuga los efectos de la transferencia de masa en film y la difusión de poro en un único término (Ruthven, 1984). El coeficiente de transferencia de masa en film (k_f) puede estimarse a partir de correlaciones de la literatura (por ejemplo, Wilson y Geankopolis, 1966). La difusión de poro (D_p) se estima a partir de ensayos de pulsos (Wooley *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998).

Los términos β son el índice de pureza y rendimiento del producto, y en último término determinan las purezas y rendimientos generales de los productos en los puertos de extracto y refinado. A causa de su relación con los gradientes de concentración en una zona en particular, en ocasiones los términos β se denominan en el presente documento como “coeficientes de disminución”. Los términos β únicamente derivan en función de las concentraciones de componente en zonas en particular. β_2^{III} , por ejemplo, es el logaritmo natural de la proporción entre la concentración en la entrada de la zona III ($C_{s,\text{max}}$) y en el puerto de refinado del componente 2 (Figuras 5 y 16). Cuanto mayor sea el valor de β_2^{III} , mayor será la pureza del producto del componente 1 en el refinado y mayor el rendimiento del componente 2 en el extracto. Para conseguir un rendimiento alto del componente 1 en el refinado y una pureza alta del componente 2 en el extracto se requiere un valor alto de β_1^{II} . Para asegurar pureza alta y rendimiento alto de ambos componentes, se necesitan valores altos tanto de β_2^{III} como de β_1^{II} .

Así, el parámetro β_i^m se define algebraicamente como sigue:

$$\beta_i^m \equiv \ln \left(\frac{C_{i,\max}^m}{C_{i,\min}^m} \right) \quad (26)$$

donde $C_{i,\max}^m$ representa la concentración máxima promediada con el tiempo del componente i en la zona m .

Los valores β pueden derivarse conociendo la pureza y el rendimiento de uno de los componentes a separar en un sistema de dos componentes, o conociendo el rendimiento de todos los componentes (o fracciones) en un sistema de N componentes. Alternativamente, los valores β pueden derivarse conociendo la pureza de los dos componentes a separar a través de un análisis de balance de masas, ya que al conocer la pureza de los dos componentes a separar se conoce la pureza y el rendimiento de ambos componentes a separar, y viceversa.

En los ejemplos que se incluyen se proporciona un procedimiento detallado para determinar los coeficientes de disminución para cada componente. Sin embargo, para muchos sistemas será suficiente un valor β aproximado. Los valores β pueden aproximarse suponiendo que la concentración del componente 1 en el puerto de refinado es la misma que el de la entrada a la zona III (c_1^{III}) (es decir, se supone que la zona I está casi saturada). También se puede suponer que la proporción entre la concentración de los dos componentes en la entrada de la zona I (c_1^{III}/c_2^{III}) es la misma que la proporción en la alimentación. Si los componentes tienen las mismas concentraciones de alimentación, $\beta_2^{III} = \beta_1^{II}$, la pureza debería ser la misma para ambos productos.

Para obtener una solución de v con significado físico, se debe satisfacer la siguiente ecuación (27):

$$P^2(\delta_{j+1} - \delta_j)^2 - 4 \left(\frac{P \beta_{j+1}^{III} \delta_{j+1}^2}{K_{f,j+1}^{III} L^{III}} + \frac{P \beta_j^{II} \delta_j^2}{K_{f,j}^{II} L^{II}} \right) \left(\frac{F^{feed}}{\epsilon_b S} + \frac{\beta_{j+1}^{III} E_{b,j+1}^{III}}{L^{III}} + \frac{\beta_j^{II} E_{b,j}^{II}}{L^{II}} \right) \geq 0 \quad (27)$$

A partir de la ecuación 27 pueden obtenerse los valores máximos de β , si las longitudes de las zonas I a IV son conocidas, igualando a 0 el término izquierdo de la ecuación. Si se fijan los valores de β , puede obtenerse la $F_{alimentación}$ máxima igualando a 0 el término izquierdo de la ecuación. Una vez más, debería tenerse en cuenta que la $F_{alimentación}$ determinada a partir de estas ecuaciones define el menor caudal de desorbente para la $F_{alimentación}$ ya que es el más alto y el más bajo de entre todos los posibles diseños que garantiza la separación.

Si se especifican las purzas de los productos (es decir, la pureza de los componentes separados en el extracto y el refinado), el área de la sección transversal de la columna (S), las longitudes de zona, y el caudal de alimentación, se pueden utilizar las ecuaciones 19 y 21-24 para encontrar las cuatro velocidades lineales y la velocidad de movimiento de puerto. Estas ecuaciones definen las condiciones de frente estacionario cuando E_b y K_f son significativas. Además, definen las velocidades lineales máximas para las zonas III y IV y las velocidades lineales mínimas para las zonas I y II en un sistema con isotermas lineales. Cualquier velocidad inferior en la zona III y IV y velocidad superior en la zona I y II resulta en purzas y recuperaciones de producto mejores que las especificadas. Sin embargo, tales diseños tendrán una producción inferior o un mayor consumo de desorbente que los diseños de frente estacionario.

Estas ecuaciones también pueden utilizarse para encontrar tanto la producción máxima como el consumo mínimo de desorbente. La producción y el consumo de desorbente se definen en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Producción} = \frac{F^{feed}}{BV} \quad (28)$$

$$\text{Consumo de desorbente} = \frac{F^{des}}{F^{feed} c_i^{feed}} \approx \frac{\gamma}{c_i^{feed}} \quad (29)$$

donde BV es el volumen total del lecho, c_i^{feed} es la concentración del componente i (producto) en la alimentación, y γ es la proporción del caudal de desorbente respecto al caudal de alimentación. Cuanto mayor sea el caudal de alimentación, mayor será la producción. Cuanto mayor sea la proporción del caudal de desorbente respecto al caudal de alimentación, mayor será el consumo de desorbente.

De nuevo, si se contempla una separación pseudo-binaria, en la que el componente deseado es el componente más lento o más rápido de una mezcla multicomponente, entonces sería necesario modificar apropiadamente las ecuaciones 19 y 21-24. En particular, si el componente deseado es el componente más rápido se utilizará el factor de retención del componente 1 para determinar la velocidad de la fase móvil en la zona II. Alternativamente, si el componente deseado era el componente más lento, para determinar la velocidad de la fase móvil en la zona III se utilizaría el factor de retención del componente N.

Los presentes descubrimientos proporcionan un número de procedimientos generales que se utilizan en el diseño de lechos fluidizados simulados como soporte a las diferentes realizaciones independientes de la presente invención. Todos estos procedimientos pueden utilizarse para llegar a un diseño SMB hipotético, que puede utilizarse en la operación o la simulación por ordenador de un SMB.

Así, una realización de la invención proporciona un procedimiento para diseñar un SMB para separar una fracción deseada o un componente de una primera fracción o componente, en una mezcla multicomponente de componentes numerados $1...j, j+1, ...N$, de menor a mayor afinidad, que comprende:

a) Proporcionar ecuaciones relacionadas con los parámetros de diseño intrínseco, operación y diseño de un SMB que muestra isotermas lineales, donde las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario para todas las zonas del SMB;

b) predecir un primer grupo de parámetros de operación y diseño suficiente para determinar los parámetros de diseño intrínseco y para resolver las ecuaciones para la resolución de una mezcla multicomponente en un primer SMB; y

c) resolver las ecuaciones.

En una separación multicomponente de cuatro zonas las ecuaciones preferiblemente aceptan las siguientes condiciones de frente estacionario: En la zona I: el frente de desorción del componente N, en la zona II: el frente de desorción del componente j ; en la zona III: el frente de desorción del componente $j+1$; y en la zona IV: el frente de adsorción del componente 1; donde los componentes se numeran $1...j, j+1, ...N$ en orden del incremento de la afinidad hacia la fase estacionaria, y se desea una separación entre los componentes j y $j+1$. En un SMB de cinco zonas preferiblemente se observan las condiciones de frente estacionario para el primer anillo descritas en la estrategia S6 en las Tablas 1 y 2 (cuando se desea una separación entre los componentes j y $j+1$). En un SMB de dos anillos, preferiblemente se observan las condiciones de frente estacionario propuestas para las estrategias S1-S6 en las Tablas 1 y 2.

Los frentes de concentración permanecen estacionarios en el sentido de que los frentes de adsorción y desorción del sistema, cuando se representan en una gráfica de dos dimensiones que relaciona las concentraciones de componente con la posición del lecho (ver, Figura 6b), se supone que permanecen estacionarias como en un lecho fluidizado continuo. En realidad, los frentes migrarán a una velocidad continua hacia la siguiente zona hasta que vuelvan a sus respectivas zonas mediante un movimiento de puerto. Generalmente, sin embargo, se ha determinado experimentalmente y mediante la utilización de simulaciones por ordenador que este problema se evita al incrementar la frecuencia del movimiento, y al incrementar el número de columnas en las zonas de separación (zonas I y II).

A partir de un origen algebraico, los frentes permanecen estacionarios en el sentido de que las ecuaciones definen una velocidad de fase ideal y una velocidad de movimiento de los puertos para un caudal de alimentación dado, modificado para tener en cuenta la dispersión del frente causada por los efectos de transferencia de masa. En las zonas I y II, la velocidad de la fase móvil se incrementa para compensar la dispersión del frente, y en las zonas III y IV, la velocidad de la fase móvil se disminuye para compensar la dispersión del frente.

Tal como se menciona arriba, una de las principales ventajas de la presente invención es la capacidad de resolver de manera sencilla un grupo de ecuaciones algebraicas para identificar todos los parámetros de operación de un SMB, incluyendo el uso mínimo de desorbente. Así, en otra realización la invención proporciona un procedimiento de diseño de un SMB para separar insulina de una primera fracción o componente, en una mezcla multicomponente, que comprende:

a) Proporcionar ecuaciones relacionadas con los parámetros de diseño, operación y diseño intrínseco suponiendo condiciones de frente en un SMB que muestra isotermas lineales,

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y operación suficiente para determinar los parámetros de diseño intrínseco y para resolver las ecuaciones para resolver la mezcla multicomponente en un primer SMB; y

c) resolver las ecuaciones.

donde las ecuaciones definen el caudal mínimo de desorbente para un caudal de alimentación dado.

En otra realización, la invención proporciona procedimientos de diseño de SMB para la purificación de insulina utilizando las reglas de separación de la presente invención. Así, en otra realización la invención proporciona un procedimiento para diseñar y operar un SMB suponiendo condiciones de frente para la separación de insulina de una fracción o componente rápido y una fracción o componente lento, donde el SMB comprende un primer y segundo

anillo, que comprende:

a) proporcionar reglas de separación que estipulan:

i) cuando sólo la fracción o componente deseado se purifica, permitiendo que el componente lento o rápido se distribuya en el primer anillo;

ii) cuando el componente lento y/o rápido y/o fracción se purifica, realizar la separación más sencilla en el primer anillo;

b) seleccionando una estrategia de separación basada en que se purifica un componente y/o fracción cualquiera o más de los componentes lentos o rápidos; y operar en SMB utilizando la estrategia de separación seleccionada.

Efectos extracolumna y de frente: Los SMB de la presente invención también pueden estar diseñados para acomodar efectos extracolumna y de frente, además de los efectos de transferencia de masa del interior de la columna. Así, en otra realización las separaciones que se alcanzan en los diferentes procedimientos de la presente invención están dificultadas por efectos de flujo no ideal tales como efectos de frente no negligibles y/o efectos extracolumna (ver la sección de definiciones para explicación). La separación está dificultada por efectos de frente y/o efectos extracolumna si tales efectos causan una contaminación significativa entre zonas, si no fuera porqué el diseño del sistema tiene en cuenta estos efectos. En términos numéricos, los efectos extracolumna se consideran no negligibles si, cuando se evalúan según los procedimientos descritos a continuación, causan que δ_i para un frente estacionario en cualquier zona cambie más del 1%, 2%, 5%, 10%, o 20% respecto al valor que tendría a no ser por los efectos extracolumna. Los efectos de frente y/o extracolumna también se consideran no negligibles si, cuando se evalúan según los procedimientos descritos a continuación, provocan que el término de corrección de la transferencia de masa para el frente estacionario del componente i en cualquier zona varíe en más del 1%, 5%, 20%, 50%, 200%, o 100% respecto al valor que tendría a no ser por los efectos extracolumna y/o de frente.

Para diseñar sistemas con efectos de frente y volumen muerto externo a la columna, pueden modificarse apropiadamente las ecuaciones 19 y 21-24 para tener en cuenta el incremento del tiempo de retención del frente y la dispersión del frente adicional provocado por este fenómeno. El incremento del tiempo de retención en sistemas lineales puede tomarse en cuenta añadiendo al factor de retención δ el tiempo que tarda el frente en recorrer el volumen muerto externo a la columna. Para los sistemas de exclusión por tamaño se puede utilizar un factor de retención modificado δ_i^* de la siguiente manera:

$$\delta_i^* = K e_i \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) \alpha_i + \frac{V_{CSTR}}{P} \quad (30)$$

$$V_{CSTR}^* = \frac{V_{CSTR}}{L_c S \varepsilon_b} \quad (31)$$

donde u_o es la velocidad intersticial, S es el área de la sección transversal de la columna, V_{CSTR} es el volumen muerto externo a la columna asociado con cada columna (que puede modelarse como un reactor de agitación continua), $P \left(\equiv \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \right)$ es la velocidad del lecho móvil, ε_b es la fracción muerta intersticial del lecho, ε_p es la fracción muerta intrapartícula, y L_c es la longitud de la columna.

La dispersión adicional del frente debido a la dispersión en el volumen muerto externo a la columna o a los efectos de frente pueden tomarse en cuenta multiplicando el coeficiente de dispersión intracolumna E_b en cada zona por un factor f , que se estima a partir de una correlación de la literatura de Chung y Wen (1968) para un fluido en una columna empaquetada uniformemente. Este factor puede estimarse a partir de datos directos de cromatografía en discontinuo o a partir de datos SMB. Este factor puede variar desde la unidad en un SMB a escala piloto de U.S. Filter, hasta un valor tan elevado como 200 en algunos SMB de AST (Advanced Separation Technologies).

Así, en un SMB de cuatro zonas pueden tomarse en cuenta los efectos extracolumna y de frente mediante las siguientes ecuaciones:

$$u_0^I - (1 + P\delta_N^*)v = \beta_N^I \left(\frac{f^I E_{b,N}^I}{L^I} + \frac{Pv^2 (\delta_N^*)^2}{K_{f,N}^I L^I} \right) \quad (32)$$

$$u_0^II - (1 + P\delta_J^*)v = \beta_J^II \left(\frac{f^{II} E_{b,J}^{II}}{L^{II}} + \frac{Pv^2 (\delta_J^*)^2}{K_{f,J}^{II} L^{II}} \right) \quad (33)$$

$$u_0^{III} - (1 + P\delta_{J+1}^*)v = -\beta_{J+1}^{III} \left(\frac{f^{III} E_{b,J+1}^{III}}{L^{III}} + \frac{Pv^2 (\delta_{J+1}^*)^2}{K_{f,J+1}^{III} L^{III}} \right) \quad (34)$$

$$u_0^{IV} - (1 + P\delta_1^*)v = -\beta_1^{IV} \left(\frac{f^{IV} E_{b,1}^{IV}}{L^{IV}} + \frac{Pv^2 (\delta_1^*)^2}{K_{f,1}^{IV} L^{IV}} \right) \quad (35)$$

En general, el factor f puede tomar en cuenta la dispersión debida al efecto de frente, de colas, u otros efectos de fluido no ideal.

Optimización del Diseño

Una de las ventajas más significativas del procedimiento de diseño de la presente invención es la capacidad de cribar con relativa facilidad variables de diseño y operación para llegar a un SMB que sea el más eficiente económicamente. El procedimiento puede utilizarse para optimizar separaciones SMB de mezclas binarias y multicomponente. Como se discute en la sección del estado de la técnica anterior de este documento, la técnica sólo proporciona ecuaciones a partir de las cuales se puede derivar la región triangular de separaciones para un sistema ideal (que a su vez define las velocidades relativas del movimiento de puertos y la fase móvil en las zonas II y III del SMB). Cualquier otro diseño del sistema que tenga en cuenta los efectos de transferencia de masa, o que identifique el consumo mínimo de desorbente, requiere la realización de simulaciones por ordenador largas y complejas o de pruebas experimentales caras. Si se desean cribar otros diseños SMB mediante, por ejemplo, alterar las configuraciones de columna, la combinación desorbente/adsorbente, o los tamaños de las partículas de adsorbente, para mejorar la eficiencia del sistema, entonces se necesita volver a ejecutar todas las simulaciones por ordenador para cada variación potencial.

Las ecuaciones de diseño de la presente invención simplifican este proceso en varios ordenes de magnitud, mediante la reducción de todas las variables asociadas con el diseño de un SMB a un grupo simplificado de cinco ecuaciones 19 y 21-24. Resolviendo las ecuaciones 19 y 21-24 es posible llegar al grupo completo de condiciones de operación para un SMB para la separación de mezclas multicomponentes, en un sistema no ideal bajo isotermas de adsorción lineales.

Así, dependiendo de qué se conozca o suponga de un sistema particular, se pueden explorar reiterativamente varias estrategias de separación para encontrar la configuración más económica, mediante la variación de los siguientes parámetros:

- Pureza y/o Rendimiento (si no se especifica)
- Combinación de Fase móvil/Fase estacionaria

- Estrategias de separación

- Longitudes de Zona

5

- Caudal de alimentación

- Longitud de columna

- Tamaño de partícula

10

La figura 8 contiene un dibujo esquemático que muestra la interrelación de estos diferentes parámetros. En términos generales, primero se supone un número de parámetros de diseño y operación, se realizan algunas pruebas iniciales y cálculos para determinar los parámetros de retención y transferencia de masa, y se realizan algunos cálculos iniciales para determinar el descenso máximo de presión que permite el adsorbente (y por lo tanto la velocidad intersticial máxima). A partir de estas suposiciones y determinaciones iniciales, se puede realizar el análisis de frente estacionario para determinar el caudal máximo de alimentación, las concentraciones máximas de alimentación, los caudales de zona, y la velocidad de movimiento de puerto del SMB que conseguirán la separación prescrita.

15

Una vez se ha evaluado un sistema básico, puede variarse cualquiera de los parámetros de diseño u operación para determinar si otros sistemas podrían ser más rentables económicamente. El diseño de frente estacionario elimina la necesidad de realizar complejas simulaciones por ordenador cada vez que se varía cualquiera de los parámetros de diseño u operación, y permite la evaluación sencilla de las variaciones resolviendo iterativamente las ecuaciones de frente estacionario para cada elección de variables (después de realizar cualquier cálculo o experimento necesario para derivar un nuevo grupo de parámetros de diseño). Una vez se han realizado estas iteraciones, se puede comparar la producción del sistema por volumen de lecho y la velocidad del consumo de disolvente para cada sistema SMB que se evalúa. Ya que la producción y el consumo de disolvente son las consideraciones más importantes cuando se evalúa la rentabilidad de un sistema SMB particular, tanto en términos de operación como de coste de capital, estos pueden utilizarse para cribar los diferentes sistemas en base a la rentabilidad.

20

25

Así, la invención proporciona varias realizaciones para optimizar los SMB utilizando las ecuaciones de diseño de la presente invención, variando varios de los parámetros de diseño. En una realización particular la invención proporciona un procedimiento para la optimización de un sistema SMB no ideal para la purificación de insulina que muestra isothermas lineales que comprende:

30

a) Proporcionar ecuaciones relacionadas con los parámetros de diseño, operación, y diseño intrínseco suponiendo condiciones de frente de un SMB,

35

b) predecir un primer grupo de parámetros de operación y diseño suficiente para determinar los parámetros de diseño intrínseco y para resolver las ecuaciones de un primer SMB;

40

c) predecir un segundo grupo de parámetros de operación y diseño suficiente para determinar los parámetros de diseño intrínseco y para resolver las ecuaciones de un segundo SMB; y

45

d) evaluar y comparar la rentabilidad económica de los dos o más SMB.

50

En las ecuaciones utilizadas en el diseño precedente preferiblemente se observan las condiciones de frente estacionario. Además, las ecuaciones definen preferiblemente la proporción mínima entre desorbente y alimentación para un caudal de alimentación dado.

Como se discute arriba, los parámetros de diseño preferiblemente se seleccionan entre: longitud de zona, tipo de desorbente, tipo de adsorbente, tamaño de partícula de adsorbente, y estrategia de separación, y el presente procedimiento puede utilizarse para cribar variaciones en cualquiera de estos parámetros de diseño. Por supuesto, en muchos sistemas no se necesita explorar estrategias de separación alternativas, gracias a las reglas de separación que ya se han establecido en la presente invención. Además, ya que las ecuaciones de frente estacionario definen el caudal máximo de alimentación para un caudal de desorbente dado, o el caudal mínimo de desorbente para un caudal de alimentación dado, las ecuaciones eliminan la necesidad de variar el caudal de alimentación o el caudal de desorbente al llevar a cabo el diseño.

55

Respecto a la longitud de zona, se debe indicar que la longitud de zona tiene tres componentes: la longitud de las columnas utilizadas en el SMB, el número de columnas utilizadas, y la disposición de las columnas en las zonas. La variabilidad de cualquiera de estos componentes puede explorarse utilizando el procedimiento de diseño de la presente invención, como se describe con más detalle abajo.

60

Los parámetros de operación integrados en las ecuaciones de arriba se seleccionan preferiblemente entre: caudales de zona, velocidades de movimiento de puertos, caudal de alimentación. De nuevo, cualquiera de estos parámetros puede variarse en el procedimiento de cribado de la presente invención para optimizar el SMB.

65

Los parámetros de diseño intrínsecos para un sistema no ideal que muestra isotermas lineales de adsorción son los parámetros de transferencia de masa y los parámetros de retención. Tal como se discute arriba, estos parámetros pueden modelarse y ser tenidos en cuenta en las ecuaciones mediante el coeficiente de dispersión axial E_b y el coeficiente de transferencia de masa efectivo K_f . De manera similar, los parámetros de retención pueden estar bien representados en las ecuaciones mediante el término δ , ya que este término toma en cuenta todos los fenómenos de retención (exclusión por tamaños y adsorción) en forma de relación lineal. Sin embargo, se entiende que en el campo de la ingeniería química se han definido varias ecuaciones y variables para la modelización de los efectos de transferencia de masa, o la retención relativa de componentes en un proceso cromatográfico lineal, y la invención pretende abarcar todas estas ecuaciones y variables.

En los ejemplos del presente documento se propone una aproximación directa para la optimización de la rentabilidad económica de un sistema. Una de las características principales de esta aproximación es determinar primero la velocidad máxima de la fase móvil que permite el adsorbente o el equipamiento SMB, ya que el SMB se debe operar a la máxima velocidad posible de la fase móvil para maximizar la producción del sistema (es decir, entre aproximadamente el 85, 90, 95, 97, 98%, o 99% de la velocidad máxima de la fase móvil permitida). La mayoría de los adsorbentes y del equipamiento SMB (válvulas, columnas, conexiones, y bombas) tienen un límite máximo de presión o un límite máximo de caudal. A partir de las ecuaciones de frente estacionario (ecuaciones 19, 21-24, y 27) se puede calcular el caudal de alimentación máximo y las velocidades de fase móvil que pueden proporcionar las purezas necesarias. La velocidad en cada zona no puede exceder la velocidad máxima correspondiente calculada a partir del límite de presión o de caudal. Si esta condición no se satisface, se reduce el caudal de alimentación en las ecuaciones de frente estacionario (ecuaciones 19 y 21-24) hasta que se satisface esta condición. De manera similar, se puede empezar con una velocidad de fase móvil del porcentaje inferior del límite máximo de caudal, por ejemplo 50%, para llegar a los parámetros de operación.

Frecuentemente, desde el inicio pueden fijarse otras variables para minimizar aún más el número de variables que deben explorarse cuando se optimiza el sistema SMB. Por ejemplo, el caudal de alimentación puede fijarse en función de las necesidades de producción o las limitaciones del fabricante de producción de material de partida. De manera similar, en muchos casos el coste del material de partida es tan alto, y las necesidades de pureza tan exigentes (como en las aplicaciones farmacéuticas), que la pureza del producto y el rendimiento se fijarán necesariamente desde un inicio.

Ejemplos

Ejemplo 1

Purificación a escala piloto de insulina a partir de cloruro de zinc/mezcla de proteínas de alto peso molecular

Materiales: La alimentación de insulina en la columna y los experimentos SMB se realizó con un caldo que contenía HMWP/HPI, insulina, $ZnCl_2$, y agua. Se compró ácido acético glacial a Mallinckrodt Baker Inc. (Paris, KY) y etanol puro a Pharmaco Products Inc. (Brookfield, CT). Se preparó agua destilada desionizada (DDW) a través de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA). Se compró acetonitrilo de grado HPLC a Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Se preparó un tampón de sulfato a partir de sulfato de sodio y un 85% de ácido fosfórico, que se compraron a Mallinckrodt Baker Inc. El cloruro de sodio y el cloruro de zinc también se compraron a Mallinckrodt Baker Inc. El dextrano azul utilizado para la determinación de la porosidad del lecho se compró a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Las partículas de gel tienen un diámetro medio de 54 μm . Todas las columnas y montajes se compraron a Ace Glass Inc. (Louisville, KY). Las columnas son de 5,10 cm de diámetro y 13,7 cm de longitud de empaquetamiento.

Se compró una columna HPLC Vydac C-18 (25 cm x 4,6 mm) para el análisis de proteínas y péptidos a Vydac Co. (Hesperia, CA) y se utilizó para determinar la concentración de BHI (Biosynthetic Human Insulin). Se compró una columna HPLC Waters insulín HMWP (30 cm x 7,8 mm) a Millipore Corp. (Milford, MA) y se utilizó para determinar la concentración de HMWP.

Equipamiento: El sistema HPLC consiste en dos bombas (Waters 510), un detector de longitud de onda única regulable (Waters 486) y un inyector (Waters U6K). En los experimentos de columna única se utilizó un sistema de cromatografía en fase líquida de alto rendimiento para proteínas (FPLC) de Pharmacia (Piscataway, NJ), y una válvula de inyección (Pharmacia MV-7). El sistema consistió en dos bombas (Pharmacia P-500), un controlador de cromatografía en fase líquida (Pharmacia LCC-500), y una válvula de inyección (Pharmacia MV-7). Advanced Separation Technologies (Lakeland, FL) construyó una unidad de SMB a escala de laboratorio. Consistía en un controlador para el ajuste del tiempo de intercambio y una estructura que soporta un engranaje de rotación, un conjunto impulsor, y un soporte para la columna. Las dos bombas de pistón simple (Modelo RHV) se compraron a Fluid Metering Inc. (Syosset, NY) y se utilizaron para controlar los caudales de la Zona II y la Zona IV. Los caudales de alimentación y desorbente se controlaron con dos bombas de FPLC. Los caudales de alimentación fueron reproducibles y controlables en un 61%.

Preparación de la columna: En un recipiente con 1,8 L de DDW, se introdujeron lentamente aproximadamente 150 g de resina Sephadex G50. Se rotó el recipiente a 70 RPM durante media hora y a continuación a 110 RPM durante nueve horas y media para asegurar la mezcla completa de la resina con el DDW. Se decantó el DDW y se añadió

ES 2 284 653 T3

lentamente ácido acético 1 N a la resina y se agitó durante 50 minutos. A continuación, el sobrenadante se decantó y la resina húmeda se transfirió a una columna de vidrio, donde se lavó con ácido acético 1 N. Después de repetir cuatro veces la etapa de lavado, la resina se suspendió en ácido acético 1 N antes de empaquetar la columna.

5 Todas las columnas las proporcionó Ace Glass Company y se diseñaron para tener una longitud de empaquetamiento de 13,7 cm. Cada columna se conectó con un alargador de columna para más comodidad en el empaquetamiento. La columna alargada se llenó con 0,5 BV de ácido acético 1 N. La suspensión de resina se vertió en la columna hasta que alcanzó aproximadamente 2/3 de la columna alargada. Se eliminó el exceso de líquido en la parte superior del empaquetado de resina. En este punto, el empaquetamiento de resina debería ser 0,8 cm más alto que la altura final de empaquetamiento deseada y se midió el peso de la columna empaquetada para mantener la uniformidad en el peso de cada columna. Notese que el peso medido en este punto es mayor que el peso final de la columna empaquetada, ya que el empaquetamiento de resina es más alto que la altura deseada. Se introdujo en la columna una solución de etanol 20% hasta que llenó ¾ de la columna alargada. La dispersión se mezcló correctamente agitando la columna. A continuación se dejó que la resina se asentara. Cuando se formó una pulgada de líquido por encima de la resina, se eliminó el líquido por la parte inferior mediante una bomba de vacío. Cuando la mayor parte del líquido se hubo eliminado, se desconectó la columna del alargador y se conectó a una bomba (Bomba FPLC, Pharmacia) para continuar con el procedimiento de empaquetado. Se pasó a través de la columna una solución de ácido acético 1 N con un caudal de 1 ml/min durante 50 min. El caudal se incrementó gradualmente cada 15 minutos hasta el caudal máximo (9 ml/min). Después de 30 minutos al caudal máximo, se cambió el sentido de la corriente. El caudal se volvió a incrementar de la misma manera que para el sentido anterior. Se mantuvo este sentido de corriente durante 50 minutos.

Se realizó la prueba HETP (altura equivalente al plato teórico) para comprobar la eficiencia de cada columna. Se inyectó un pulso de 2 ml de cloruro de sodio (5 g/L en ácido acético 1 N) en la columna, seguido de elución con ácido acético 1 N al caudal máximo. Ya que el detector de conductividad tiene una resistencia relativamente alta al paso de la corriente, el efluente de la columna se separó en dos corrientes en una proporción de 8 a 1. La separación es necesaria para mantener la disminución de presión en la columna por debajo de 6,89 bar (100 psi). La corriente más pequeña se hizo pasar por el detector de conductividad. Finalmente, el número de platos teóricos (N) se determinó a partir del pico de conductividad con el objetivo de que fuera mayor de 150 platos.

30 *Experimentos de columna única:* Todos los experimentos, incluyendo los experimentos SMB se llevaron a cabo a presión atmosférica (1 bar) y a temperatura ambiente baja (4°C). La solución de alimentación se equilibró a 4°C y se utilizó en las 12 horas siguientes a su preparación. Antes de los experimentos, las columnas se equilibraron con ácido acético 1 N. El volumen muerto extra-columna se determinó mediante la medida por separado del volumen muerto de la cabeza de la columna y de las canalizaciones. Para la determinación del volumen muerto de la cabeza de la columna, se midió la cantidad de agua que cabía en la cabeza. El volumen muerto de las canalizaciones se midió mediante un ensayo de pulsos sin montar la columna después de cada experimento de columna única.

Para realizar ensayos de pulsos, se conectó un bucle de 2 mL a la válvula de inyección (Pharmacia MV-7). En la posición de carga, el bucle se llenó con solución de alimentación. El caudal de alimentación se controló mediante un controlador (Pharmacia LCC-500). A continuación la válvula de inyección se puso en la posición de inyección mediante el controlador para iniciar la inyección. La recopilación de datos se inició simultáneamente. Se realizaron tres pruebas de pulsos: NaCl, ZnCl₂ y BHI. Las concentraciones de BHI se detectaron mediante el detector UV a 294 nm. Todos los ensayos de pulsos se realizaron a un caudal de 6 ml/min.

45 Para los ensayos de frente, se utilizó ácido acético para el equilibrado de la columna, seguido de la introducción de la solución de BHI en la columna. Después de que apareciera el máximo de concentración en la salida de la columna, se utilizó ácido acético 1 N para lavar la columna. Debido a la alta concentración de BHI, tuvo que monitorizarse el efluente a una longitud de onda de 306 nm. Se realizaron tres ensayos de frente, cada uno de ellos a diferentes caudales, 2,0 ml/min, 4,0 ml/min, y 8,1 ml/min.

50 Para los ensayos múltiples de frente, se utilizaron ambas bombas FPLC. Una bombeaba ácido acético 1 N y la otra solución BHI. Las dos corrientes se mezclaron antes de entrar en la columna. El caudal total de la corriente mezclada se mantuvo constante a 6 ml/min. Se obtuvieron varias composiciones (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) al variar la proporción entre las dos corrientes. La proporción se cambió sólo después de que la concentración se estabilizara a la salida de la columna. El efluente de la columna se monitorizó a 310 nm utilizando un detector UV.

55 *Experimentos SMB:* Se empaquetaron las 10 columnas del SMB con resina Sephadex G50 utilizando el procedimiento mencionado previamente. La configuración de la columna fue 2-3-3-2 (habían 2, 3, 3, y 2 columnas en las Zonas I, II, III, y IV, respectivamente) o 2-2-4-2. El volumen muerto extracolumna se determinó mediante la medida de la cantidad de agua que cabía en las conducciones y la válvula rotatoria. Antes de cada experimento SMB, se ajustaron manualmente los caudales de las cuatro bombas utilizando el controlador SMB y después se comprobaron periódicamente. El experimento se inició encendiendo las bombas simultáneamente. La alimentación y el desorbente se bombearon continuamente dentro de las columnas. La alimentación del anillo I se preparó mediante la disolución de polvo de insulina en crudo (conteniendo ZnCl₂) en un caldo de HMWP. La alimentación del anillo II fue una mezcla binaria de BHI y ZnCl₂, que se preparó disolviendo el polvo de insulina en crudo en ácido acético 1 N. El desorbente era ácido acético 1 N. Se tomaron muestras de la salida de extracto y de la de refinado durante todo un periodo de intercambio (entre dos intercambios). Por lo tanto, la concentración de cada muestra representa la concentración media de cada periodo de intercambio. Los experimentos del anillo I se detuvieron a la mitad de la etapa 45ª y el experimento

ES 2 284 653 T3

del anillo II se paró a la mitad de la etapa 61ª. A continuación se obtuvieron los perfiles de zona recogiendo muestras en los puertos de muestreo, localizados en la salida de cada columna.

Caracterización de columna: Los resultados de la caracterización de columna se muestran en la Tabla 4. El número de platos teóricos (N) fue mayor a 150 platos en todas las columnas estimadas a partir de los ensayos de pulsos con NaCl.

Tabla 4. Resumen de los resultados de la caracterización de columna			
Nombre de la columna	Peso* (g)	Tiempo de retención de NaCl (min)	N (platos)
Columna A	308,3	28,85	371
Columna B	313,2	28,91	691
Columna C	314,1	28,93	606
Columna D	310,2	28,90	518
Columna E	308,0	28,88	563
Columna F	308,6	28,82	416
Columna G	309,7	28,89	670
Columna H	309,2	28,88	670
Columna I	307,5	28,83	478
Columna J	310,4	28,89	500
Media	309,9	28,88	
Desviación max.	1.3%	0.21%	
*El peso está referido al peso del empaquetamiento de un volumen de empaquetamiento intermedio de 304 ml, que es mayor que el volumen final del lecho (280 ml).			

Ensayos de pulsos: Los cromatogramas de los ensayos de pulsos se muestran en la figura 9. El volumen de elución de cada pulso se estima a partir del centro de masas del cromatograma y se utiliza para determinar las propiedades de columna y los factores de exclusión por tamaños. Notese que el volumen muerto extra-columna se resta para obtener el volumen neto de elución a través de la columna.

El volumen de elución de un pulso de dextrano azul es el volumen inter-partícula o volumen muerto (V_0), ya que la molécula de dextrano azul es mucho mayor que el tamaño de poro medio de la resina y esta totalmente excluido de la partícula. La porosidad del lecho, ε_b , se calcula a partir del volumen muerto de la siguiente manera:

$$\varepsilon_b = \frac{V_0}{BV} \quad (36)$$

donde BV es el volumen del lecho (ml).

La molécula de NaCl es más pequeña que la molécula de HPI, BBI, o $ZnCl_2$, y se escoge como señal para estimar el volumen intrapartícula. El volumen muerto total (V_t) que incluye el volumen intrapartícula e interpartícula se obtiene a partir del pulso de NaCl. Combinado con el volumen muerto, el volumen muerto total puede utilizarse para calcular la porosidad de la partícula, ε_p .

$$\varepsilon_p = \frac{V_i - V_0}{BV - V_0} \quad (37)$$

Con la porosidad del lecho (ε_b) y la porosidad de la partícula (ε_p), los factores de exclusión por tamaño de BHI y ZnCl_2 pueden estimarse de la siguiente manera:

$$K_e = \frac{\frac{V_e}{BV} - \varepsilon_b}{(1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p} \quad (38)$$

donde K_e es el factor de exclusión por tamaños y V_e es el volumen de elución de BHI o ZnCl_2 . Los valores de ε_b , ε_p , el volumen muerto extra-columna, y K_e se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Resumen de los resultados de las pruebas de pulsos en las columnas a escala de laboratorio y de planta

	ε_b	ε_p	K_e BHI*	K_e ZnCl_2	Volumen muerto extra- columna	Volumen de lecho único
Escala de laboratorio	0,35	0,89	0,68	0,99	11,1 mL	280 mL
Escala de planta	0,35	0,89	0,74	0,99		
*La K_e estimada a partir de la columna a escala de laboratorio con un pulso corto, en la que el pico de concentración es muy bajo, es próximo a la K_e intrínseca. La K_e de la columna a escala de planta es una K_e aparente, que es dependiente de la concentración.						

Las propiedades de columna y los factores de exclusión por tamaño estimados para las columnas a escala de laboratorio (Tabla 5) se aplicaron a un modelo, VERSE, para simular los datos de los experimentos a escala de laboratorio. Los parámetros numéricos y de transferencia de masa utilizados en las simulaciones se muestran en la Tabla 6. Los cromatogramas simulados están en concordancia con los datos experimentales que se muestran en la Figura 9.

Pruebas de Saturación y elución: Durante las pruebas de pulsos de BHI, la solución de BHI inyectada se diluye más de 25 veces ya que el volumen de alimentación sólo es de 2 ml (0,7% volumen del lecho). La dilución en SMB, sin embargo, normalmente es mucho menor que el proceso cromatográfico discontinuo asociado. Además, la operación de un SMB es similar a un pulso largo, es decir una gran cantidad de carga seguida de elución. Por estas razones, se realizaron pruebas de pulso largo que incluyen saturación con una solución de BHI y la elución con ácido acético 1 N.

Tabla 6. Transferencia de masa y parámetros numéricos utilizados en las simulaciones de este estudio

	Parámetros de transferencia de masa			
	Dextrano azul*	NaCl*	BHI**	ZnCl ₂ **
D_m (cm ² /min)	2,21 x 10 ⁻⁵	4,88 x 10 ⁻⁴	5,49 x 10 ⁻⁵	3,96 x 10 ⁻⁴
D_p (cm ² /min)	-	3,53 x 10 ⁻⁴	2,29 x 10 ⁻⁵	1,65 x 10 ⁻⁴
K_f (cm/min)	correlación Wilson y Geankoplis (1966)			
E_b (cm ² /min)	correlación Chung y Wen (1968)			
Parámetros numéricos				
Elementos axiales por columna	Puntos de Posición		Tolerancia absoluta	Tolerancia relativa
	Axial	Partícula		
50	4	2	0.0001	0.001

*Los valores de D_m de dextrano azul y NaCl se obtienen de Hritzko et al. (1999) y se ajustan a la temperatura y viscosidad utilizando la correlación de Wilke y Chang (1955). Los valores de D_p de NaCl se estiman a partir de la correlación de Mackie y Meares (1955).

** Los valores de D_m de BHI y ZnCl₂ se obtienen a partir de la correlación de Wilke y Chang (1955). Los valores de D_p de BHI y ZnCl₂ se obtienen mediante el ajuste de los datos con simulaciones VERSE.

La figura 10 muestra los cromatogramas de las pruebas de saturación y de elución a tres caudales diferentes y los resultados de las simulaciones (líneas punteadas) con la K_e intrínseca estimada a partir de la prueba de pulso corto (Tabla 5). Los cromatogramas simulados están por delante de los datos de los procedimientos de carga y elución en los tres caudales.

Prueba de frente múltiple: Primero se realizó una prueba de frente múltiple sin la columna. Esta prueba sirve para determinar el volumen muerto extra-columna y para obtener la curva de calibración de absorbancia en el UV como función de la concentración. El cromatograma mostrado en la Figura 11a se utiliza para estimar el volumen muerto existente en el mezclador y en los conductos de conexión. El tiempo muerto de cada frente que se obtiene sin la columna se resta de tiempo de avance del correspondiente frente obtenido con la columna. El cromatograma de la prueba de frente múltiple con la columna se muestra en la Figura 11b.

Siguiendo el procedimiento descrito por Ma *et al.* (1996), se puede calcular la cantidad de BHI adsorbido en la resina asociado con cada máximo de concentración. Los datos de la isoterma de adsorción se muestran en la Figura 11c. Para ajustar los datos se aplica un modelo de isoterma anti-langmuir.

Los parámetros de la isoterma anti-langmuir se utilizaron en una simulación para predecir los datos de la prueba de frente múltiple. En la Figura 11b se muestra una buena concordancia entre la predicción del modelo y los datos. Ya que la curvatura de la isoterma es bastante pequeña, la isoterma puede representarse correctamente mediante una isoterma lineal de adsorción o una K_e aparente, que tiene un valor mayor que la K_e intrínseca. Por esta razón, los datos de la prueba de frente múltiple pueden simularse con una K_e aparente. Los cromatogramas simulados con adsorción (anti-Langmuir) y con la K_e aparente son casi idénticos (Figura 11b). El valor de la K_e aparente que se aplica a las simulaciones es de 0,74 (>0,68, el valor de la K_e intrínseca de BHI).

Con los parámetros de isoterma y con la K_e aparente de BHI, se pueden volver a ejecutar las simulaciones de los procesos de saturación y elución (el pulso largo). Los cromatogramas simulados con adsorción y con la K_e aparente son más próximos a los datos experimentales que las simulaciones con la K_e intrínseca (Figura 10). Los frentes experimentales aún quedan por detrás de la predicción del modelo a causa de la adsorción excesiva durante el periodo de carga inicial. Sin embargo, esta incongruencia no tiene un impacto negativo en el diseño del SMB, ya que el frente de adsorción predicho está por delante de los datos experimentales.

Experimentos SMB: Se estimó que el volumen muerto extra-columna de la unidad SMB era 10,4 ml por columna o el 3,7% del volumen del lecho. Este volumen muerto se tomó en consideración al diseñar los caudales de zona y el tiempo de intercambio del proceso SMB. Los resultados del diseño se resumen en la Tabla 7.

La velocidad máxima intersticial en la resina Sephadex G50 no puede superar 1,28 cm/min. En las columnas a escala de laboratorio (5,1 cm de diámetro), el caudal de zona máximo se estima en 9 ml/min. Este límite de caudal se aplicó tanto en el diseño del Anillo I como del anillo II con las columnas a escala de laboratorio. Ya que se utilizaron columnas del mismo tamaño tanto en los experimentos del anillo I como del anillo II, el caudal de extracto del anillo I no coincide con el caudal de la alimentación del anillo II como muestra la Tabla 7. Sin embargo, esta inconsistencia, que se tiene en cuenta al calcular la producción total, no afecta a la validación del diseño y el modelo del tándem SMB.

La ejecución I del experimento SMB (anillo I) duró 21 horas o 45 ciclos. La simulación y los datos experimentales de los históricos de efluente en los puertos de refinado y extracto y los perfiles de columna del ciclo final a mitad de ciclo se muestran en la Figura 12. La ajustada concordancia entre la predicción del modelo y los datos experimentales indican que las propiedades de columna y los factores de exclusión por tamaño utilizados en los diseños SMB son precisos y que el procedimiento de diseño es robusto, incluso cuando las simulaciones no predicen con exactitud los datos de los procesos de frente discontinuos.

Tabla 7. Condiciones de operación diseñadas para probar el proceso SMB en tándem*

		Anillo I		Anillo II
		Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3
Configuración de zona		2-3-3-2	2-2-4-2	2-3-3-2
Caudales de Zona (ml/min)	Zona I	8,31	8,48	8,01
	Zona II	5,01	5,13	5,01
	Zona III	8,06	7,38	7,95
	Zona IV	4,92	5,03	6,66
Caudales de entrada y salida (mL/min)	Alimentación	3,05	2,25	1,10
	Desorbente	3,39	3,46	1,35
	Refinado	3,13	2,36	1,29
	Extracto	3,30	3,35	1,17
Tiempo de intercambio (min)		28,0	27,4	33,7
* El K_e de BHI utilizado en el diseño es aparente K_e (=0,74) y el volumen muerto extracolumna por columna es 10,4 ml por columna o el 3,7% del volumen del lecho.				

El perfil de la columna de BHI (Figura 12c) es el más interesante entre los resultados experimentales de la ejecución 1 del SMB. En el Anillo I, se observa en la Figura 12c un ligero efecto de frente de BHI. Como resultado, una pequeña cantidad de BHI se pierde en el refinado tal como se muestra en la Figura 12a. Sin embargo, la pérdida de BHI sólo es del 3% (Tabla 8), que es mucho menor que la del proceso SEC discontinuo de referencia (11%). La mejora del rendimiento por el Anillo SMB I en relación con el proceso SEC discontinuo de referencia se atribuye a las características de separación del SMB, es decir, que en un SMB sólo se necesita una separación parcial. La banda de solapamiento se mantiene en las columnas SMB. En contraste, en el proceso discontinuo la banda de solapamiento se recicla.

Tabla 8. Resumen de los resultados experimentales de SMB

Tabla 8. Resumen de los resultados experimentales de SMB				
		Ejecución 1 (anillo I)	Ejecución 2 (anillo II)	Ejecución 3 (anillo II)
Impurezas en el producto	HMWP/HPI (ppm)	0	0	0
	ZnCl ₂ (g/g BHI)	-	-	4 x 10 ⁻⁶
Pureza (%)*		100	100	100
Rendimiento (%)**		97,0	99,3	> 96,7 (99,7)†
Producto (L/hr/100L BV)		6,54	4,82	2,36
Consumo de disolvente (L/Kg BHI)		32,2	18,5	18,3
Rendimiento global (%)			> 96,0 (99,0)†	
Producto total (L/hr/100L BV)			1,19	
Consumo de disolvente global (L/Kg BHI)			42,0	

* La pureza en el Anillo I se define como $(C_{BHI} + C_{ZnCl_2}) / (C_{BHI} + C_{ZnCl_2} + C_{HMWP}) \times 100\%$.

** El rendimiento se estimó con la concentración promediada en un periodo de intercambio del ciclo final.

† El experimento en el anillo II (experimento 3) no consiguió el estado estacionario cíclico. Los valores entre paréntesis se estimaron a partir de las simulaciones en el estado estacionario cíclico

El frente de BHI en la Zona II del Anillo I puede simularse mediante la utilización de un coeficiente de dispersión axial (E_b) mayor. Los resultados de las simulaciones con diferentes E_b para BHI en la Zona III se muestran en la Figura 13. Al incrementarse la E_b , se incrementa la pérdida de BHI en el refinado (Figura 13a) y el frente de adsorción de BHI en la Zona III se dispersa (Figura 13c). La Figura 13 muestra que la curva de avance de BHI en el refinado puede predecirse bien cuando el valor de E_b es 40 veces mayor que el estimado por la correlación de Chung y Wen (1968). Para reducir la pérdida de BHI en el Anillo I, debe tenerse en cuenta el frente y el valor de E_b ajustado debe utilizarse en el diseño de frente estacionario.

La Tabla 9 muestra los resultados del diseño del Anillo I, en el que se toma en cuenta el frente de BHI utilizando el E_b ajustado (40 veces mayor que el estimado por la correlación de Chung y Weng). En el diseño de frente estacionario se probaron diferentes configuraciones de zona. Se necesitaron al menos 2 columnas por cada zona para reducir la diferencia entre el lecho fluido real y el lecho fluidizado simulado. En algunas configuraciones de zona no existen condiciones de operación que puedan cumplir con los requisitos de rendimiento (99,99% de BHI). Entre las tres configuraciones de zona que pueden cumplir el requisito de un rendimiento alto, 2-2-4-2 dio el menor consumo de disolvente (relación entre desorbente y alimentación) tal como se muestra en la Tabla 9. Se realizaron simulaciones VERSE para verificar los resultados del diseño. Los resultados de la simulación se muestran en la Tabla 10.

En el experimento SMB 2 se aplicó la configuración de zona de 2-2-4-2 y los parámetros de operación asociados que se muestran en la Tabla 9. Los datos experimentales y los resultados de la simulación se muestran en la Figura 14. En comparación con la figura 12a, la Figura 14a muestra que la pérdida de BHI en el refinado se reduce significativamente. Como resultado, el rendimiento de BHI se incrementa del 97,0% en la ejecución 1 a 99,3% en el experimento 2 (Tabla 8). El frente de BHI en la Zona III se predice correctamente y el frente de adsorción de BHI está confinado en la Zona III como se muestra en la Figura 14c. Este resultado indica que un SMB bien diseñado es capaz de eliminar el frente de BHI. Además, el ajuste preciso entre los datos y la predicción del modelo prueba que la aproximación al diseño basada en la modelación que incluye el diseño de frente estacionario y la simulación VERSE es eficiente.

Tabla 9. Resultados del diseño de frente estacionario para el anillo I con
 E_b BHI en la zona III = 40 C&W*

Configuración de zona	Caudal de zona (ml/min)				tiempo de intercambio (min)	Desorbente/ Alimentación
	I	II	III	IV		
4-2-2-2	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
2-4-2-2	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
2-2-4-2	8,48	5,13	7,38	5,03	27,4	1,54
2-2-2-4	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
3-3-2-2	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
3-2-3-2	8,48	5,17	7,17	5,05	27,2	1,72
3-2-2-3	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
2-3-3-2	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
2-3-2-3	No apropiado para la pureza y rendimiento deseados					
2-2-3-3	8,47	5,13	7,12	5,04	27,4	1,73
* C&W permanece estable para el valor estimado por la correlación de Chung y Wen. Los caudales de zona son inferiores a 8,5 ml/min, que es un 5% inferior que el valor máximo teórico.						

Tabla 10. Resumen de los resultados de la simulación del Anillo I con
 $BHI E_b$ en la zona III = 40 C&W

Configuración de zona	Concentración en extracto*			Rendimiento (%)	Balance de Masas(%)**
	$C_{BHI}/C_{F,BHI}$	C_{HMWP}/C_{FHMWP}	C_{HMWP}/C_{BHI} (mg/kg)		
2-2-3-3	0,592	$1,91 \times 10^{-4}$	1,09	99,7	99,7
2-2-4-2	0,668	$3,29 \times 10^{-4}$	1,66	99,4	99,4
3-2-3-2	0,597	$12,7310^{-4}$	7,18	99,1	99,1
* El subíndice "F" representa alimentación.					
** La simulación acabó al final del 50º ciclo.					

El experimento en el Anillo II del SMB (Ejecución 3) se realizó después de los experimentos SMB del Anillo I. Las condiciones de operación del Anillo II se muestran en la Tabla 7. Los resultados experimentales del Anillo II se resumen en la Tabla 8 y en la Figura 15 se muestran los históricos de efluente y los perfiles de columna. La predicción del modelo se verifica de nuevo con los datos experimentales (Figura 15). Notese que el experimento del Anillo II (Experimento 3) no alcanzó el estado estacionario cíclico y se utilizó la concentración de BHI al final de la etapa (etapa 61) para calcular el rendimiento. Ya que el modelo se ha verificado con los datos transitorios, la concentración en el estado estacionario cíclico (después de 150 etapas) predicha por el modelo puede utilizarse para estimar el rendimiento. El rendimiento estimado se muestra en los paréntesis de la Tabla 8. La concentración de BHI en el estado estacionario cíclico es mayor que la del estado transitorio. Por esta razón, el rendimiento en el estado estacionario es mayor que el de la etapa 61.

Se calculó el rendimiento global, la producción, y el consumo de disolvente de los experimentos SMB del Anillo I y el Anillo II (Ejecución 2 y Ejecución 3). El rendimiento global es el producto de los rendimientos de las Ejecuciones SMB 2 y 3.

Ya que el caudal de extracto del Anillo I es mayor que el caudal de alimentación del Anillo II, se necesita más resina en el Anillo II que en el Anillo I de modo que el Anillo I y el Anillo II pueden operarse en tándem. Esto puede hacerse incrementando los diámetros de las columnas del Anillo II mientras las velocidades intersticiales se mantienen iguales a las del experimento del Anillo II. Por esta razón, la producción global (por 100 L de volumen de lecho) de los experimentos SMB en tándem se calculó como sigue:

$$\frac{F_F}{\left(1 + \frac{F_E^{Ring I}}{F_F^{Ring II}}\right) \times (10BV)} \times (60 \text{ min/hr} \times 100 \text{ L}) \quad (39)$$

dónde F_F es el caudal de alimentación (ml/min), F_E es el caudal de extracto (ml/min), BV se mantiene como el volumen en los experimentos del lecho de una sola columna.

Por una razón similar, en la estimación del consumo global de disolvente deben tomarse en cuenta los diferentes volúmenes de lecho del Anillo I y el Anillo II en el tándem SMB. Además, la concentración de la alimentación del Anillo II (Ejecución 3 del SMB) no es la misma que la concentración del extracto (o concentración del producto) del Anillo I (Ejecución 2 del SMB) tal como muestra la Tabla 8. En el presente tándem SMB, estas dos concentraciones deberían ser las mismas. Para estimar la concentración del producto final del tándem SMB a partir de los experimentos individuales del Anillo I y el Anillo II, se debe utilizar la proporción entre la concentración del extracto del Anillo I y la alimentación del Anillo II. La concentración estimada del producto final (BHI en el refinado del Anillo II) se utiliza para el cálculo del consumo global de disolvente de la siguiente manera:

$$\frac{F_D^{Ring I} + \frac{F_E^{Ring I}}{F_F^{Ring II}} F_D^{Ring II}}{\left(\frac{F_E^{Ring I}}{F_F^{Ring II}} F_R^{Ring II}\right) \left(\frac{C_{BHI, Ext}^{Ring I}}{C_{BHI, Feed}^{Ring II}} C_{BHI, Raff}^{Ring II}\right)} \times (1000 \text{ mL/L}) \quad (40)$$

donde F_D es el caudal de desorbente (ml/min), F_R es el caudal de refinado (ml/min), y el subíndice "Ext" denota extracto y "Raff" refinado. La unidad de la concentración de BHI es g/L.

Los resultados calculados se resumen en la Tabla 8. Ya que el experimento del Anillo II (experimento 3) no alcanzó el estado cíclico estacionario, el rendimiento calculado en base al último punto de datos de la curva del histórico de efluente es menor que el rendimiento en el estado estacionario cíclico. El rendimiento esperado en base a la simulación VERSE en el estado estacionario cíclico del Anillo II es de 99,7%. En otras palabras, si el experimento del Anillo II se prolonga lo suficiente para alcanzar el estado estacionario cíclico (después de 150 pasos), el proceso SMB en tándem alcanzará un rendimiento global del 99%. La producción global del proceso SMB es de 1,19L/hr/100L BV. Todos estos resultados experimentales muestran que el proceso SMB es más eficiente que el presente proceso discontinuo para la purificación de BHI. Si el caudal máximo permisible no estuviera tan limitado por la resina, se podrían esperar mayores mejoras respecto al rendimiento y la producción de los procesos discontinuos.

Ejemplo 2

Modelo de velocidades VERSE

En estos Ejemplos se han realizado muchas simulaciones para comprobar la validez del procedimiento de diseño simplificado derivado del análisis de frente estacionario. En los estudios de una columna y los de múltiples columnas, se ha utilizado un modelo matemático que se basa en la difusión de poro. Las soluciones numéricas de las ecuaciones principales y sus condiciones límite así como los métodos numéricos utilizados para resolverlas se han descrito con anterioridad (Berninger *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996; Whitley, 1990) como el modelo VERSE. Las ecuaciones se resuelven mediante el método de disposición ortogonal en elementos finitos en la dirección espacial, y se utiliza DASSL (Petzold, 1982) se utiliza para integrar en el dominio del tiempo. El modelo supone partículas adsorbentes uniformemente esféricas, caudal constante con velocidad lineal constante, equilibrio local en el adsorbente y difusividades constantes.

Ejemplo 3

Determinación de los coeficientes de disminución

Para realizar un diseño en presencia de resistencias de transferencia de masa (ecuaciones 21 a 24) es necesario especificar los coeficientes de disminución de los frentes estacionarios de concentración en cada zona. Pueden fijarse coeficientes de descenso β_i^m suficientemente altos como para alcanzar una pureza alta y un rendimiento alto (Wu *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2000). Sin embargo, es conveniente fijar β_i^m en función del rendimiento deseado para cada componente. En el presente documento se propone una aproximación que puede utilizarse para relacionar el rendimiento del producto con los valores de β_i^m . La aproximación se basa en simples balances de materia alrededor de los puertos de entrada y de salida. Para cada componente, se supone que el perfil de concentración es plano en una zona en la que ni es estacionario ni con un “perfil agudo”. El puerto de alimentación se trata como una unión de conexión entre las zonas II y III y la entrada de alimentación. El puerto de desorbente se trata como una unión de conexión entre las zonas I y IV y la entrada de desorbente. Para utilizar esta aproximación es necesario especificar el rendimiento del producto de cada componente en la mezcla. Éste puede indicarse como Y_i para cada componente i . La figura 16 muestra perfiles de columna esquemáticos para los componentes estacionarios en un SMB de cuatro zonas. Para cada componente que se desea recuperar en el refinado,

$$C_i^R = \frac{F C_i^F Y_i}{R}, \quad \forall i \in \{1, \dots, j\} \quad (41)$$

$$C_i^E = \frac{F C_i^F (1 - Y_i)}{E}, \quad \forall i \in \{1, \dots, j\} \quad (42)$$

$$C_i^{FP} = \frac{F^{III} C_i^R - F C_i^F}{F^{II}}, \quad \forall i \in \{1, \dots, j\} \quad (43)$$

$$C_i^{DP} = \frac{F^I}{F^{IV}} C_i^E, \quad \forall i \in \{1, \dots, j\} \quad (44)$$

donde C_i^R es la concentración promediada con el tiempo del componente i en el puerto de refinado, F es el caudal de alimentación, C_i^F es la concentración de i en la solución de alimentación, C_i^E es la concentración de i en el extracto, C_i^{FP} es la concentración de i en el puerto de alimentación (que se considera como diluido respecto a la alimentación real debido al reciclado de la zona II), C_i^{DP} es la concentración de i en el puerto de desorbente, R es el caudal de refinado, y E es el caudal de extracto. Para cada componente que se desea recuperar en el extracto,

$$C_i^R = \frac{F C_i^F (1 - Y_i)}{R}, \quad \forall i \in \{j+1, \dots, N\} \quad (45)$$

$$C_i^E = \frac{F C_i^F Y_i}{E}, \quad \forall i \in \{j+1, \dots, N\} \quad (46)$$

$$C_i^{FP} = \frac{F^{II} C_i^E + F C_i^F}{F^{III}}, \quad \forall i \in \{j+1, \dots, N\} \quad (47)$$

$$C_i^{DP} = \frac{F^{IV}}{F^I} C_i^R, \quad \forall i \in \{j+1, \dots, N\} \quad (48)$$

pueden aplicarse las ecuaciones 41 a 48 para resolver la concentración de cada componente en cada puerto, el cual puede utilizarse a su vez para calcular el coeficiente de disminución para cada zona:

$$\beta_N^I = \ln \left(\frac{C_N^E}{C_N^{DP}} \right) \quad (49)$$

$$\beta_j^{II} = \ln \left(\frac{C_j^{FP}}{C_j^E} \right) \quad (50)$$

$$\beta_{j+1}^{III} = \ln \left(\frac{C_{j+1}^{FP}}{C_{j+1}^R} \right) \quad (51)$$

$$\beta_1^{IV} = \ln \left(\frac{C_1^R}{C_1^{DP}} \right) \quad (52)$$

La solución de los caudales de las cuatro zonas y el tiempo de intercambio (ecuaciones 19 y 21-24) es iterativa. La suposición inicial de los caudales de zona y del tiempo de intercambio proviene de las ecuaciones ideales (ecuaciones 15 a 19). Estos parámetros se utilizan para determinar los parámetros de transferencia de masa para cada componente en cada zona, que a su vez se utilizan para recalculer los caudales de zona y en tiempo de intercambio. El cálculo y la resustitución se continúa hasta que los caudales y los tiempos de intercambio cambian menos de un 0,01% en cada etapa.

Nomenclatura

a_i = Coeficiente de distribución de equilibrio lineal del componente i , ml/ml S.V.

c_i = concentración del componente i en la fase móvil (función de z y t), mg/ml

c_{pi} = concentración del componente i en la fase porosa (función de r y t), mg/ml

$C_{i,max}^m$ = concentración máxima promediada con el tiempo del componente i en la zona m , mg/ml

$C_{i,min}^m$ = concentración mínima promediada con el tiempo del componente i en la zona m , mg/ml

C_i^{DP} = concentración del componente i en el puerto de desorbente, mg/ml

C_i^E = concentración del componente i en el puerto de extracto, mg/ml

C_i^{FP} = concentración del componente i en el puerto de alimentación, mg/ml

C_i^R = concentración del componente i en el puerto de refinado, mg/ml

D = Caudales de desorbente, ml/min

D_{pi} = difusividad intrapartícula del componente i , cm²/min

D_A = caudal de desorbente al Anillo A en un SMB de dos anillos, ml/min

D_B = caudal de desorbente al Anillo B en un SMB de dos anillos, ml/min

ES 2 284 653 T3

D_{total} = caudal de desorbente total en un SMB de dos anillos, ml/min

D_i^∞ = difusividad Browniana del componente i , cm^2/min

5 E = Caudal de extracto, ml/min

E_A = Caudal de extracto del Anillo A en un SMB de dos anillos, ml/min

E_{bi}^m = coeficiente de dispersión axial del componente i en la zona m , cm^2/min

10 F = Caudal de alimentación, ml/min

F_m = caudal en la zona m , ml/min

15 F_A = caudal de alimentación al Anillo A en un SMB de dos anillos, ml/min

F_B = caudal de alimentación al Anillo B en un SMB de dos anillos, ml/min

J = índice de componente

20 K_{fi}^m = coeficiente de transferencia de masa de film del componente i en la zona m , cm/min

K_{el} = coeficiente de exclusión por tamaño del componente i

25 K_{fi}^m = coeficiente efectivo de transferencia de masa del componente i en la zona m , min

L_C = longitud de una sola columna, cm

L_m = longitud de la zona m , cm

30 n = número de intercambios de puerto

N = Índice numérico del componente de mayor afinidad

35 N_c^m = Número de columnas en la zona m

$P \equiv (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_b$ = Proporción partículas-fase fluida móvil

40 q_i = concentración en la fase sólida del componente i (función de r y t), mg/ml S.V.

R = caudal de refinado, ml/min

R_p = radio de partícula, cm

45 S = área de la sección transversal de la columna, cm^2

S.V. = Volumen sólido

t = tiempo, min

50 t_p = tiempo necesario para inyectar una pulsación

t_{ri} = tiempo de retención del componente i , min

55 t_s = tiempo de intercambio, min

t_{oi} = tiempo de elución del componente i neglgiendo la adsorción, min

u_0^m = Velocidad de líquido intersticial en la zona m , cm/min

60 V_c = volumen total de la columna (partículas+vacío), ml

Y_i = rendimiento del componente i en su puerto de producto deseado

65 z = distancia axial a lo largo del SMB, cm

z_0^m = posición del punto más alejado en el sentido de la corriente en la zona m , cm

β_i^m = Factor de disminución del frente estacionario i en la zona m

$\delta_i \equiv K_{ei} \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)a_i$ = Factor de retención del componente i

Δ_i^m coeficiente de corrección de transferencia de masa del componente estacionario i en la zona m

ε_b = fracción vacía intrapartícula

ε_p = fracción vacía interpartícula

v = velocidad de movimiento del sólido, cm/min

v_A = velocidad de movimiento del sólido en el anillo A en un SMB de dos anillos, cm/min

v_B = velocidad de movimiento del sólido en el anillo B en un SMB de dos anillos, cm/min

Referencias

1. **Adachi**, S., "Simulated Moving Bed Chromatography for Continuous Separations of Two Components and Its Application to Bioreactors", *J. Chromatogr. A*, 658, 271 (1994).

2. **Archibald**, T.G., G.G. **McParland**, M. **Chalker**, B. **Kelson**, A.A. **Malik**, T.E. **Clement**, and H. **Palandoken**, "Commercial Scale Counter Current Chromatographic Separation of a Pharmaceutical Intermediate: Achieving Purity When Conventional Chemical Approaches Fail", paper presented at the *Eastern Analytical Symposium and Exposition*, Somerset, New Jersey, November (1999).

3. **Azevedo**, D.C.S. and A.E. **Rodrigues**, "Design of a Simulated Moving Bed in the Presence of Mass-Transfer Resistances", *AIChE J.*, 45(5), 956 (1999).

4. **Balannec** B. and G **Hotier**, in *Preparative and Production Scale Chromatography*, G Ganetsos and P.E. Barker, Eds. (Marcel Dekker, New York, 1993), pp. 301-357.

5. **Barker**, P.E. and D. **Critcher**, "The Separation of Volatile Liquid Mixtures by Continuous Gas-Liquid Chromatography", *Chem. Eng. Sci.*, 13, 82 (1960).

6. **Berg**, C., *Trans. Am. Inst. Chem. Eng.*, 42, 665 (1946).

7. **Biressi**, G, O. **Ludeman-Hombourger**, M. **Mazzotti**, R.-M. **Nicoud**, and M. **Morbidelli**, "Design and Optimization of a Simulated Moving Bed Units: Role of Deviations from Equilibrium Theory", *J. Chromatogr. A*, 876, 3 (2000).

8. **Blehaut**, J., F. **Charton**, and R.-M. **Nicoud**, *LCGC Int.* 9(4), 228-238 (1996).

9. **Broughton**, D.B.; **Gerhold**, C.G *Continuous Sorption Process Employing Fixed Bed of Sorbent and Moving Inlets and Outlets*. US Patent 2,985,589 (1961).

10. **Broughton**, D. B., "Molex: Case History of a Process", *Chem. Eng. Prog.*, 64, 60 (1968).

11. **Broughton**, D. B., R. W. **Neuzil**, J. M. **Pharis**, and C. S. **Brearely**, "The Parex Process for Recovering Paraxylene", *Chem. Eng. Prog.*, 66, 70 (1970).

12. **Ching**, C.B., B.G. **Lim**, E.J.D. **Lee** and S.C. **Ng**, "Preparative Resolution of Praziquantel Enantiomers by Simulated Counter-Current Chromatography", *J. Chromatogr.*, 634, 215 (1993).

13. **Chung**, S. F. and C. Y **Wen**, "Longitudinal Dispersion of Liquid Flowing through Fixed and Fluidized Beds", *AIChE J.*, 14, 857 (1968).

14. **Collins**, R. E. *Flow of Fluids Through Porous Materials*. Rheinhold, NY (1961).

15. **Flodin**, P., "Methodological Aspects of Gel Filtration with Special Reference to Desalting Operations", *J. Chromatogr.*, 5, 103 (1961).

16. **Fuchs**, G, R.-M. **Nicoud**, and M. **Bailly**, in *Proceedings of the Ninth Symposium on Preparative Chromatography "Prep 92"* (INPL, Nancy, France) 205-220 (1992).

17. **Hashimoto**, K., S. **Adachi**, and S. **Shirai**, "Continuous Desalting of Proteins with a Simulated Moving-Bed Adsorber", *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2161 (1988).

18. **Hill**, D. in *Process Scale Liquid Chromatography*, G Subramanian, Ed. (VCH-Weinheim, New York) 78 (1995).
19. **Houwing**, J. in *Proceedings of the First European Symposium on Biochemical Engineering Science*, B. Glennon, P.M. Kieran, and K.Ch.A.M. Luyben, Eds. (ESBES Secretariat, Dublin City University, Dublin, Ireland) 57 (1996).
20. **Huang**, S.Y, C.K. **Lin**, W.H. **Chang**, and W.S. **Lee**, "Enzyme Purification and Concentration by Simulated Moving Bed Chromatography: an Experimental Study", *Chem. Eng. Commun.*, 456, 291 (1986).
21. **Kehde**, H., R. G **Fairfield**, I. C. **Frank**, and L. W. **Zahenstecher**, *Chem. Eng. Prog.*, 44, 575 (1948).
22. **Lehoucq**, S., D. **Verheve**, A. V. **Wouwer**, E. Cavoy "SMB Enantioseparation: Process Development, Modeling, and Operating Conditions", *AIChE J.*, 46, 247 (2000).
23. **Ma**, Z. and N.-H.L. **Wang**, "Standing Wave Analysis of SMB Chromatography: Linear Systems", *AIChE J.* 43 (10), 2488 (1997).
24. **Maki**, H., H. **Fukuda**, and H. **Morikawa**, "The Separation of Glutathione and Glutamic Acid Using a Simulated Moving-Bed Adsorber System", *J. Ferment. Technol.*, 65, 61 (1987).
25. **Maki**, H. in *Preparative and Production Scale Chromatography*, G. Ganetsos and P.E. Barker, Eds. (Marcel Dekker, New York) 359-371 (1993).
26. **Nicoud**, R.-M. in *Bioseparation and Bioprocessing, A Handbook*, G. Subramanian, Ed. (Wiley-VCH, New York, vol I) 3-39 (1998).
27. **Nicoud**, R.-M., "Recovery of Biological Products VIII", paper presented at the *American Chemical Society Meeting*, Tucson, Arizona, October (1996).
28. **Nicoud**, R. M., G **Fuchs**, P. **Adam**, M. **Bailly**, E. **Kusters**, F. D. **Antia**, F. **Reuille**, and E. **Schmid**, "Preparative Scale Enantioseparation of a Chiral Epoxide: Comparison of Liquid Chromatography and Simulated Moving Bed Adsorption Technology", *Chirality*, 5, 267 (1993).
29. **Pais**, L.S., J.M. **Loureiro**, and A.E. **Rodrigues**, "Separation of 1,1'-bi-2-Naphthol Enantiomers by Continuous Chromatography in Simulated Moving Bed", *Chem. Eng. Sci.*, 52(2), 245 (1997).
30. **Parkinson**, G, G**Ondrey**, and S. **Moor**, "Chromatographers Think Big", *Chem. Eng.*, 101, 30 (1994).
31. **Pedefferri**, M., G **Zenoni**, M. **Mazzotti**, M. **Morbidelli**, "Experimental Analysis of a Chiral Separation through Simulated Moving Bed Chromatography", *Chem. Eng. Sci.*, 54, 3735 (1999).
32. **Ruthven**, D.M., C.B. **Ching**, "Counter-Current and Simulated Counter Current Adsorption Separation Process", *Chem. Eng. Sci.*, 44, 1011 (1989).
33. **Schulte**, M., L. **Britsch**, and J. **Strube**, "Continuous Preparative Liquid Chromatography in the Downstream Processing of Biotechnological Products", *Acta Biotechnol.*, 29(1), 345 (2000).
34. **Storti**, G, M. **Masi**, S. **Carra**, and M. **Morbidelli**, "Optimal Design of Multicomponent Countercurrent Adsorption Separation Processes Involving Nonlinear Equilibria", *Chem. Eng. Sci.*, 44, 1329 (1989).
35. **Storti**, G, M. **Mazzotti**, M. **Morbidelli**, and S. **Carra**, "Robust Design of Binary Counter-Current Adsorption Separation Processes", *AIChE J.*, 39, 471 (1993).
36. **Storti**, G, R. **Bacocchi**, M. **Mazzotti**, and M. **Morbidelli**, "Design of Optimal Operating Conditions of Simulated Moving Bed Adsorptive Separation Units", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34(1), 288 (1995).
37. **Strube**, J., U. **Altenhoner**, M. **Meurer**, H. **Schmidt-Traub**, and M. **Schulte**, "Dynamic Simulation of Simulated Moving-Bed Chromatographic Processes for the Optimization of Chiral Separations", *J. Chromatogr.*, 769, 81 (1997).
38. **Szepesy**, L., Z. **Sebestyen**, I. **Feher**, and Z. **Nagy**, "Continuous Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 108, 285-297 (1975).
39. van **Walsem**, J.J. and M.C. **Thompson**, in *Proceedings of the First European Symposium on Biochemical Engineering Science*, B. Glennon, P.M. Kieran, and K.Ch.A.M. Luyben, Eds. (ESBES Secretariat, Dublin City University, Dublin, Ireland) 27 (1996).
40. **Wankat**, P.C., *Rate-Controlled Separations*. Blackie Academic & Professional, NY, 524 (1994).

41. **Wilson**, E. J. and C. J. **Geankoplis**, "Liquid Mass Transfer at Very Low Reynolds Numbers in Packed Beds", *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 5, 9 (1966).

42. **Wooley**, R, Z. **Ma**, and N.-H.L. **Wang**, "A Nine-Zone Simulating Moving Bed for the Recovery of Glucose and Xylose from Biomass Hydrolyzate", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37(9), 3699 (1998).

43. **Wu**, D.J., Y. **Xie**, Z. **Ma**, and N.-H.L. **Wang**, "Design of Simulated Moving Bed Chromatography for Amino Acid Separations", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37(10), 4023 (1998).

44. **Xie**, Y., D.J. **Wu**, Z. **Ma**, and N.-H.L. **Wang**, "Extended Standing Wave Design Method for Simulated Moving Bed Chromatography: Linear System", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, 1993 (2000).

45. **Yun**, T., G. **Zhong**, and G **Guiochon**, "Experimental Study of the Influence of the Flow Rates in SMB Chromatography", *AIChE J.*, 43, 2970 (1997).

46. **Zhong**, G, M.S. **Smith**, and G **Guiochon**, "Effect of the Flow Rates in Linear, Ideal, Simulated Moving Bed Chromatography", *AIChE J.*, 43, 2960 (1997).

47. **Zhong**, G. and G. **Guiochon**, "Simulated Moving Bed Chromatography: Effects of Axial Dispersion and Mass Transfer Under Linear Conditions", *Chem. Eng. Sci.*, 52, 3117 (1997).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para separar cromatográficamente insulina de uno o más componentes que comprende

5 a) proporcionar un lecho fluidizado simulado que comprende un primer anillo, una fase estacionaria, y una primera corriente de desorbente;

b) proporcionar una corriente de alimentación que comprende insulina y un primer componente o fracción;

10 c) introducir la primera corriente de desorbente y la corriente de alimentación en el primer anillo bajo condiciones de frente estacionario para separar la insulina del primer componente o fracción; y

d) extraer del primer anillo la insulina sustancialmente separada del primer componente o fracción.

15 2. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la corriente de alimentación además comprende un segundo componente o fracción, y la afinidad de la insulina por la fase estacionaria es intermedia a las afinidades por la fase estacionaria del primer y segundo componente y/o fracciones, comprendiendo además:

20 a) introducir la insulina del primer anillo y una segunda corriente de desorbente en un segundo anillo, bajo condiciones suficientes para separar la insulina del segundo componente o fracción; y

b) extraer del segundo anillo la insulina sustancialmente separada del segundo componente o fracción.

25 3. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la insulina es insulina humana biosintética.

4. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la insulina es un análogo o derivado de insulina.

30 5. Procedimiento de la reivindicación 2 donde el primer componente o fracción comprende cloruro de zinc y el segundo componente o fracción comprende una proteína de peso molecular elevado distinta a la insulina.

6. Procedimiento de la reivindicación 5 donde la proteína de peso molecular elevado es proinsulina.

35 7. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la separación se consigue mediante la utilización de cromatografía de adsorción, cromatografía de partición, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, o cromatografía de afinidad.

8. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la separación se consigue mediante la utilización de cromatografía de exclusión por tamaño, y la fase estacionaria comprende un gel de exclusión por tamaño.

40 9. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la fase estacionaria comprende dextrano reticulado con una recuperación de agua mayor del 4% en peso y un diámetro de partícula medio de menos de aproximadamente 100 micras.

10. Procedimiento de la reivindicación 1 donde el desorbente comprende ácido acético.

45 11. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la utilización de desorbente en el primer anillo está minimizada.

12. Procedimiento de la reivindicación 11 donde la utilización de desorbente en el primer anillo es menor del 110% del uso mínimo de desorbente definido por el diseño de frente estacionario.

50 13. Procedimiento de la reivindicación 1 donde:

a) el primer anillo comprende 4 zonas y 5 o más columnas, o 5 zonas y 6 o más columnas;

55 b) la configuración de la columna optimiza sustancialmente la producción del primer anillo, o la utilización de desorbente en el primer anillo.

14. Procedimiento de la reivindicación 1 donde:

60 a) el primer anillo comprende 4 zonas y 5 o más columnas, o 5 zonas y 6 o más columnas;

b) la disposición de las columnas en las zonas optimiza sustancialmente la producción del primer anillo, o la utilización de desorbente en el primer anillo.

65 15. Procedimiento de la reivindicación 14 donde el primer anillo comprende 8 o más columnas.

16. Procedimiento de la reivindicación 14 donde el primer anillo comprende 12 o más columnas.

ES 2 284 653 T3

17. Procedimiento de la reivindicación 2 donde se permite que el primer o el segundo componente se distribuya por el primer anillo.

18. Procedimiento de la reivindicación 2 donde:

a) la insulina se extrae del primer anillo sustancialmente separada del primer componente o fracción, y

b) la diferencia entre las afinidades de la insulina y del primer componente o fracción por la fase estacionaria en el primer anillo es menor que la diferencia entre las afinidades por la fase estacionaria de la insulina y el segundo componente o fracción en el segundo anillo.

19. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la separación se realiza bajo isotermas lineales de absorción.

20. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la separación está dificultada por efectos de transferencia de masa no negligibles.

21. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la corrección de transferencia de masa de las velocidades de la fase móvil en una o más zonas es mayor que el 2% de la velocidad ideal de la fase móvil para la zona o más zonas.

22. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la corrección de transferencia de masa de las velocidades de la fase móvil en una o más zonas es mayor al 10% de la velocidad ideal de la fase móvil para la zona o más zonas.

23. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la separación está dificultada por efectos extracolumna y/o de frente no negligibles.

24. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la insulina se separa en un 95%, en base al volumen, de la primera fracción en el primer anillo.

25. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la insulina se separa en un 98%, en base al volumen, de la primera fracción en el primer anillo.

26. Procedimiento de la reivindicación 2 donde el rendimiento de insulina es mayor de 98%, en base al volumen.

27. Procedimiento de la reivindicación 1 donde la velocidad de la fase móvil en una o más zonas se aproxima al máximo de velocidad permisible para la zona.

28. Procedimiento para el diseño de un SMB para la purificación de insulina a partir de una mezcla binaria o multicomponente que comprende:

a) proporcionar ecuaciones que se refieren al diseño, operación, y a los parámetros intrínsecos de diseño de un SMB que muestra isotermas lineales, donde las ecuaciones asumen condiciones de frente estacionario para todas las zonas del SMB;

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y operación suficiente para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para solucionar las ecuaciones para resolver la mezcla multicomponente en un primer SMB;

c) resolver las ecuaciones.

29. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende un primer anillo A, la mezcla comprende componentes numerados 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, es deseable una separación entre los componentes j y j+1, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer anillo para:

a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;

b) el frente de desorción del componente j+1 en la zona IIA;

c) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;

d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA.

30. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;

b) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIA;

c) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;

5 d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;

e) el frente de desorción del componente N en la zona IB;

f) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;

10 g) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIB; y

h) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

15 31. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de $1...j...N$, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de onda estacionaria en el primer y segundo anillo para:

20 a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;

b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;

25 c) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIA;

d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;

e) el frente de desorción del componente j en la zona IB;

30 f) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIB;

g) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y

35 h) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

40 32. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de $1...j...N$, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

a) el frente de desorción del componente j en la zona IA;

b) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIA;

45 c) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;

d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;

e) el frente de desorción del componente N en la zona IB;

50 f) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;

g) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIB; y

55 h) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

60 33. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de $1...j...N$, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;

b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;

65 c) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIA;

d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;

ES 2 284 653 T3

- e) el frente de desorción del componente j en la zona IB;
- f) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIB;
- 5 g) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y
- h) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

34. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende un anillo A de cinco zonas y un anillo B de
10 cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de $1...j...N$, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- 15 a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- c) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIIA;
- 20 d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;
- e) el frente de adsorción del componente 1 en la zona VA.
- f) el frente de desorción del componente N en la zona IB;
- 25 g) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;
- h) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIB; y
- 30 i) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

35. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el SMB comprende un anillo A de cinco zonas y un anillo B de
cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de $1...j...N$, en orden de afinidad creciente por la fase
35 estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- 40 c) el frente de adsorción del componente $j+1$ en la zona IIIA;
- d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;
- 45 e) el frente de adsorción del componente i en la zona VA.
- f) el frente de desorción del componente j en la zona IB;
- g) el frente de desorción del componente $j-1$ en la zona IIB;
- 50 h) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y
- i) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

55 36. Procedimiento de la reivindicación 28 donde la mezcla es binaria.

37. Procedimiento de la reivindicación 28 donde la mezcla es multicomponente.

38. Procedimiento de la reivindicación 28 donde las ecuaciones definen la velocidad mínima de uso de desorbente
60 para una velocidad de alimentación dada.

39. Procedimiento de la reivindicación 28 donde el primer grupo de parámetros de diseño y operación es suficiente
para determinar la disminución máxima de presión permisible a través de las columnas del SMB; y las ecuaciones se
resuelven en base a una velocidad máxima permisible de la fase móvil en una o más de las zonas.

65 40. Procedimiento de la reivindicación 28 donde las ecuaciones se resuelven en base a una velocidad máxima permisible de la fase móvil para la zona I.

ES 2 284 653 T3

41. Procedimiento de la reivindicación 28 donde la separación está dificultada por resistencias de transferencia de masa no negligibles, y las ecuaciones relacionan:

- a) la longitud de la zona;
- b) caudal de alimentación;
- c) caudal de desorbente;
- d) caudales de zona;
- e) velocidad de movimiento de puertos;
- f) pureza y rendimiento del producto;
- g) resistencias de transferencia de masa; y
- h) índices de retención de componente.

42. Procedimiento para la optimización de un SMB para la purificación de insulina, donde el sistema muestra isotermas lineales, que comprende:

a) proporcionar ecuaciones que se refieren al diseño, operación, y a los parámetros intrínsecos de diseño bajo condiciones de frente estacionario de un SMB que muestra isotermas lineales;

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y operación suficientes para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y resolver las ecuaciones para separar la mezcla binaria o multicomponente en un primer SMB;

c) predecir un segundo grupo de parámetros de diseño y operación suficientes para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y resolver las ecuaciones para separar la mezcla binaria o multicomponente en el segundo SMB;

d) evaluar y comparar la rentabilidad económica del primer y el segundo SMB.

43. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende un primer anillo A, la mezcla comprende componentes numerados 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea una separación entre los componentes j y j+1 purificados, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer anillo para: el frente de desorción del componente N en la zona IA;

- a) el frente de desorción del componente j+1 en la zona IIA;
- b) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;
- c) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA.

44. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIA;
- c) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;
- d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;
- e) el frente de desorción del componente N en la zona IB;
- f) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;
- g) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona IIIB; y
- h) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

ES 2 284 653 T3

45. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- c) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona IIIA;
- d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;
- e) el frente de desorción del componente j en la zona IB;
- f) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIB;
- g) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y
- h) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

46. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente j en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIA;
- c) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIA;
- d) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVA;
- e) el frente de desorción del componente N en la zona IB;
- f) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;
- g) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona IIIB; y
- h) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

47. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende dos anillos A y B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- c) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona MA;
- d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;
- e) el frente de desorción del componente j en la zona IB;
- f) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIB;
- g) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y
- h) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

48. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende un anillo A de cinco zonas y un anillo B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

ES 2 284 653 T3

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- 5 c) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIIA;
- d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;
- e) el frente de adsorción del componente 1 en la zona VA.
- 10 f) el frente de desorción del componente N en la zona IB;
- g) el frente de desorción del componente j en la zona IIB;
- 15 h) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona IIIB; y
- i) el frente de adsorción del componente j en la zona IVB.

20 49. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el SMB comprende un anillo A de cinco zonas y un anillo B de cuatro zonas, la mezcla comprende componentes numerados de 1...j...N, en orden de afinidad creciente por la fase estacionaria, se desea el componente j purificado, y las ecuaciones suponen condiciones de frente estacionario en el primer y segundo anillo para:

- a) el frente de desorción del componente N en la zona IA;
- 25 b) el frente de desorción del componente j en la zona IIA;
- c) el frente de adsorción del componente j+1 en la zona IIIA;
- 30 d) el frente de adsorción del componente j en la zona IVA;
- e) el frente de adsorción del componente i en la zona VA.
- 35 f) el frente de desorción del componente j en la zona IB;
- g) el frente de desorción del componente j-1 en la zona IIB;
- h) el frente de adsorción del componente j en la zona IIIB; y
- 40 i) el frente de adsorción del componente 1 en la zona IVB.

50 50. Procedimiento de la reivindicación 42 donde las ecuaciones definen la velocidad mínima de alimentación de desorbente para un caudal de alimentación dado.

45 51. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el primer y el segundo grupo de parámetros de diseño y operación son suficientes para determinar la disminución máxima de presión permisible a través de las columnas del primer y el segundo SMB, y las ecuaciones se resuelven en base a una velocidad máxima permisible de la fase móvil en una o más de las zonas.

50 52. Procedimiento de la reivindicación 42 donde las ecuaciones se resuelven en base a una velocidad máxima de la fase móvil para la zona I.

53. Procedimiento de la reivindicación 42 donde la rentabilidad económica se basa en el consumo de desorbente.

55 54. Procedimiento de la reivindicación 42 donde la rentabilidad económica se basa en la producción.

55. Procedimiento de la reivindicación 42 que comprende además:

- 60 a) predecir un tercer grupo de parámetros de diseño y operación suficiente para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para resolver las ecuaciones para un tercer SMB; y
- b) evaluar y comparar la rentabilidad económica del tercer SMB.

65 56. Procedimiento de la reivindicación 42 donde la disposición de las columnas varía entre el primer y segundo grupo de parámetros de diseño y operación.

57. Procedimiento de la reivindicación 42 donde el número de columnas varía entre el primer y el segundo grupo de parámetros de diseño y operación.

ES 2 284 653 T3

58. Procedimiento de la reivindicación 42 donde la longitud de las columnas varía entre el primer y el segundo grupo de parámetros de diseño y operación.

59. Procedimiento de diseño y operación de un SMB suponiendo condiciones de frente estacionario para la separación de insulina de un componente o fracción rápida y de un componente o fracción lenta, donde el SMB comprende un primer y un segundo anillo, que comprende:

a) proporcionar normas de separación que estipulan que:

i) cuando sólo se purifica la fracción o componente deseado, se permite que el componente lento o rápido se distribuya en el primer anillo;

ii) cuando se purifica el componente y/o la fracción lenta y/o rápida, la separación más sencilla se lleva a cabo en el primer anillo;

b) seleccionar una estrategia de separación basada en que si se purifica uno o más de los componentes lentos o rápidos y/o fracciones lentas o rápidas;

c) operar el SMB utilizando la estrategia de separación seleccionada.

60. Procedimiento de la reivindicación 59 donde sólo se purifica el componente o fracción deseado.

61. Procedimiento de la reivindicación 59 donde se purifica el componente o fracción rápido y/o lento.

62. Procedimiento de la reivindicación 59 donde se observan efectos de transferencia de masa no negligibles.

63. Procedimiento de la reivindicación 59 donde no se observan efectos de transferencia de masa no negligibles.

64. Procedimiento de diseño de un SMB para separar insulina de una primera fracción o componente, en una mezcla multicomponente, que comprende:

a) proporcionar ecuaciones relacionadas con los parámetros de diseño, operación y diseño intrínseco suponiendo condiciones de frente en un SMB que muestra isothermas lineales,

b) predecir un primer grupo de parámetros de diseño y operación suficiente para determinar los parámetros intrínsecos de diseño y para solucionar las ecuaciones para resolver la mezcla multicomponente en un primer SMB; y

c) resolver las ecuaciones.

d) donde las ecuaciones definen la velocidad mínima de uso de desorbente para una velocidad de alimentación dada.

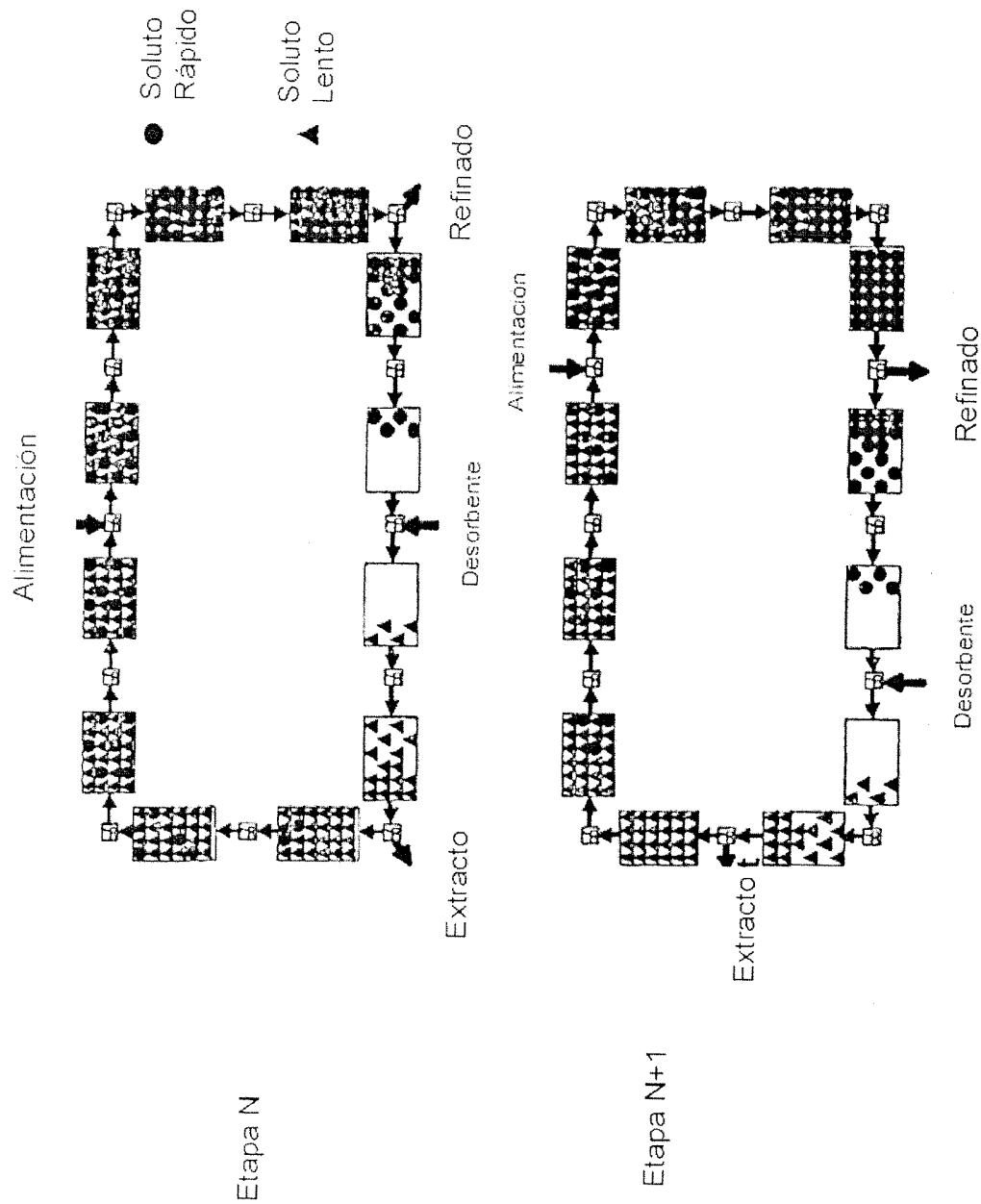


Figura 1. Diagrama esquemático de un lecho fluidizado simulado (SMB) de cuatro zonas

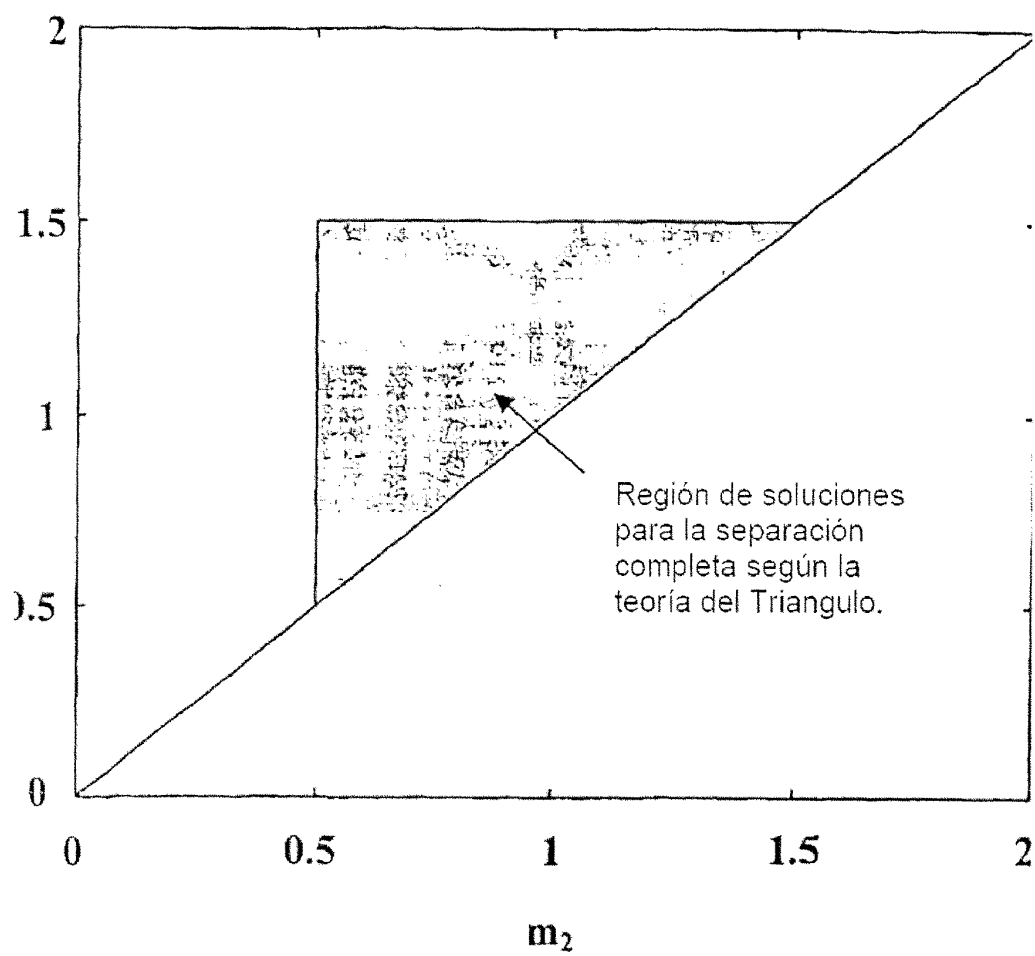


Figura 2. Teoría del triángulo de sistema ideal con isoterma lineal

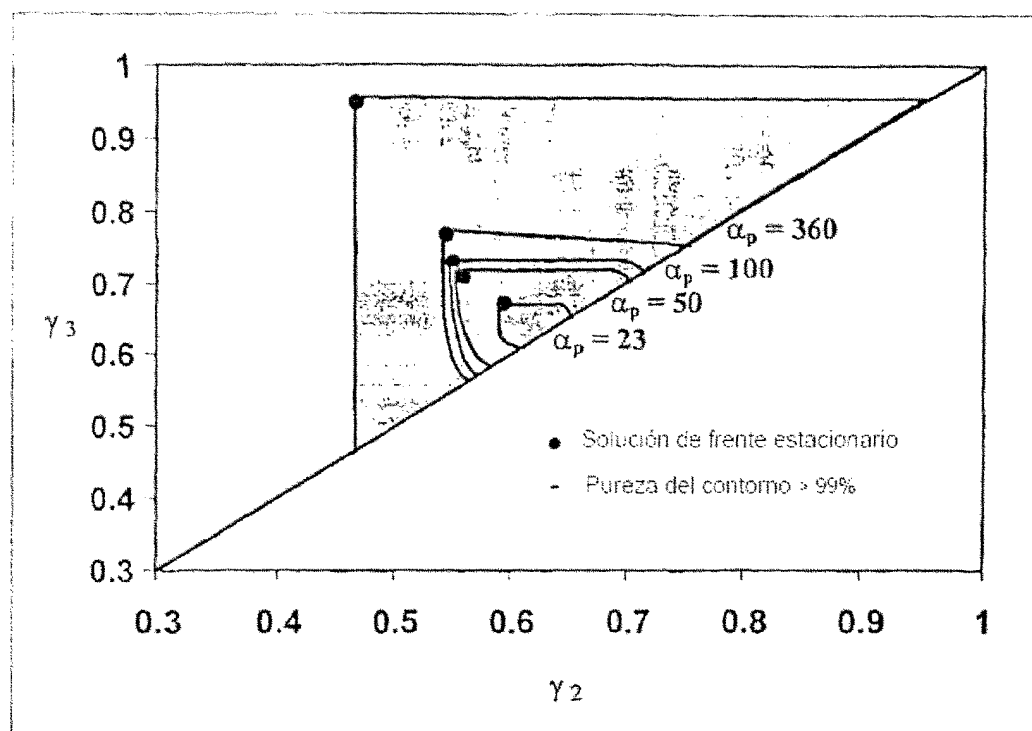


Figura 3 Sistema no ideal con isotermas lineales: Comparación de la teoría del Triángulo y el análisis de frente estacionario para un sistema lineal

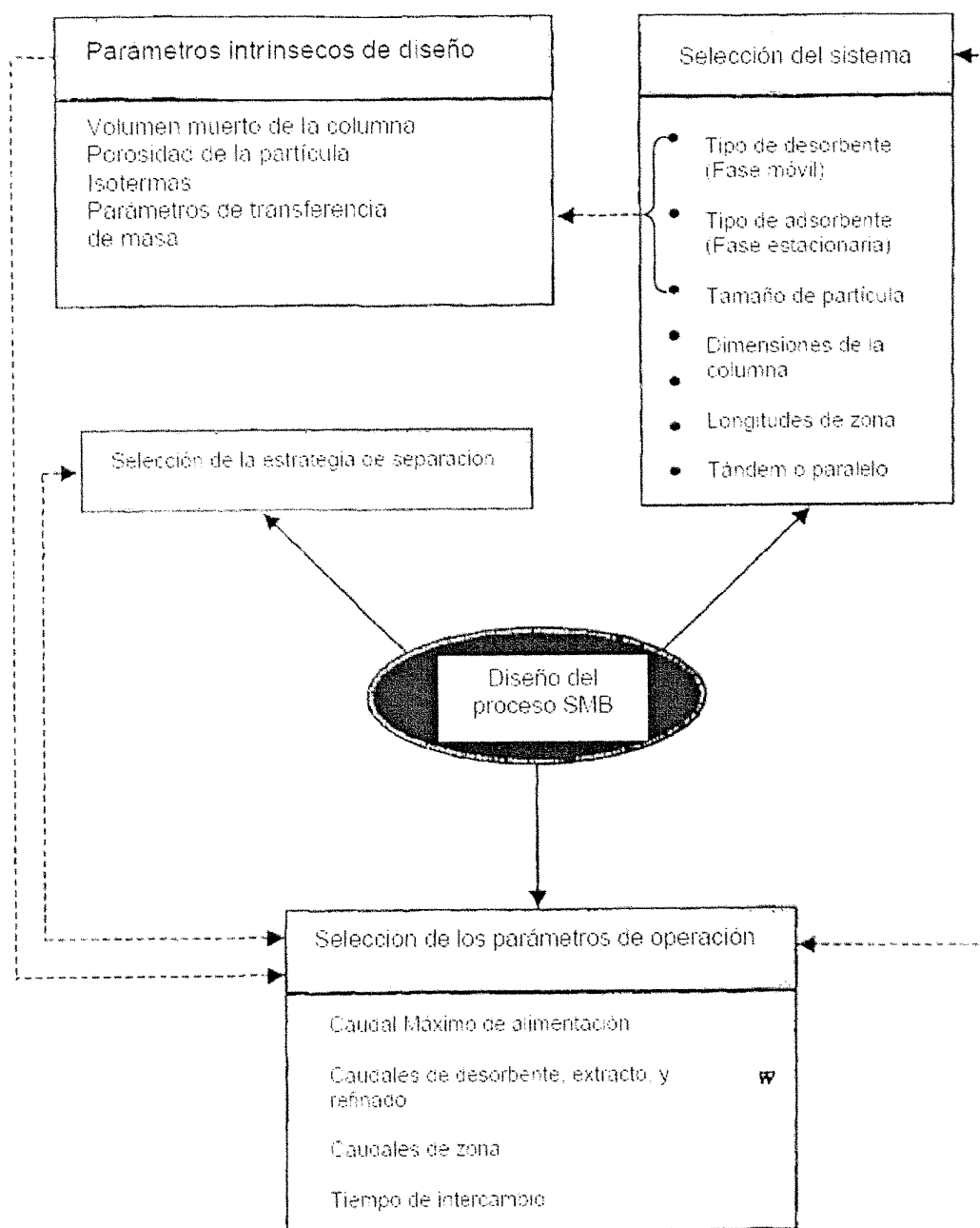


Figura 4. Parámetros involucrados en el diseño del proceso SMB

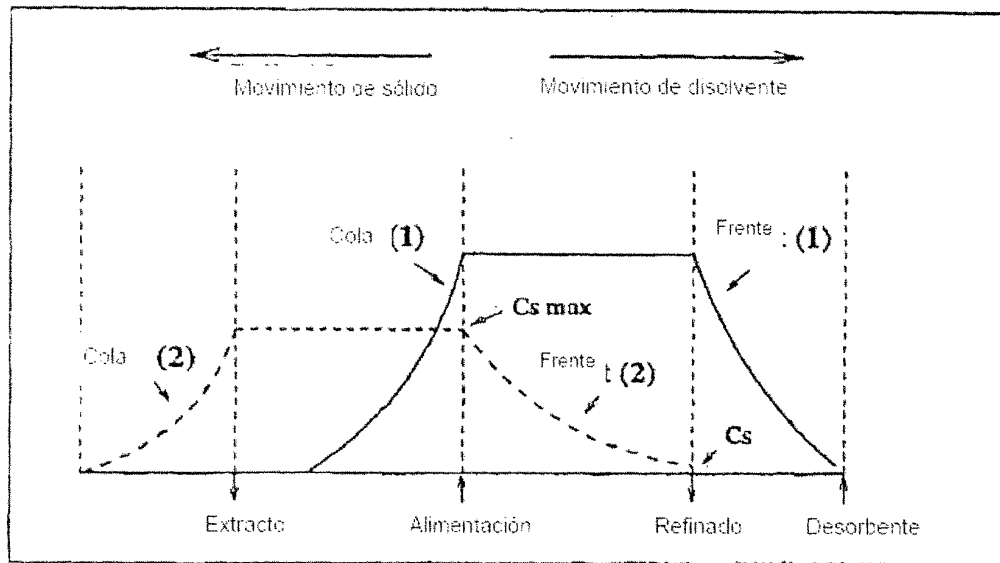


Figura 5. Frentes estacionarios en sistemas binarios de lecho fluido continuo. El soluto 1 es el soluto rápido, y el soluto 2 es el soluto lento.

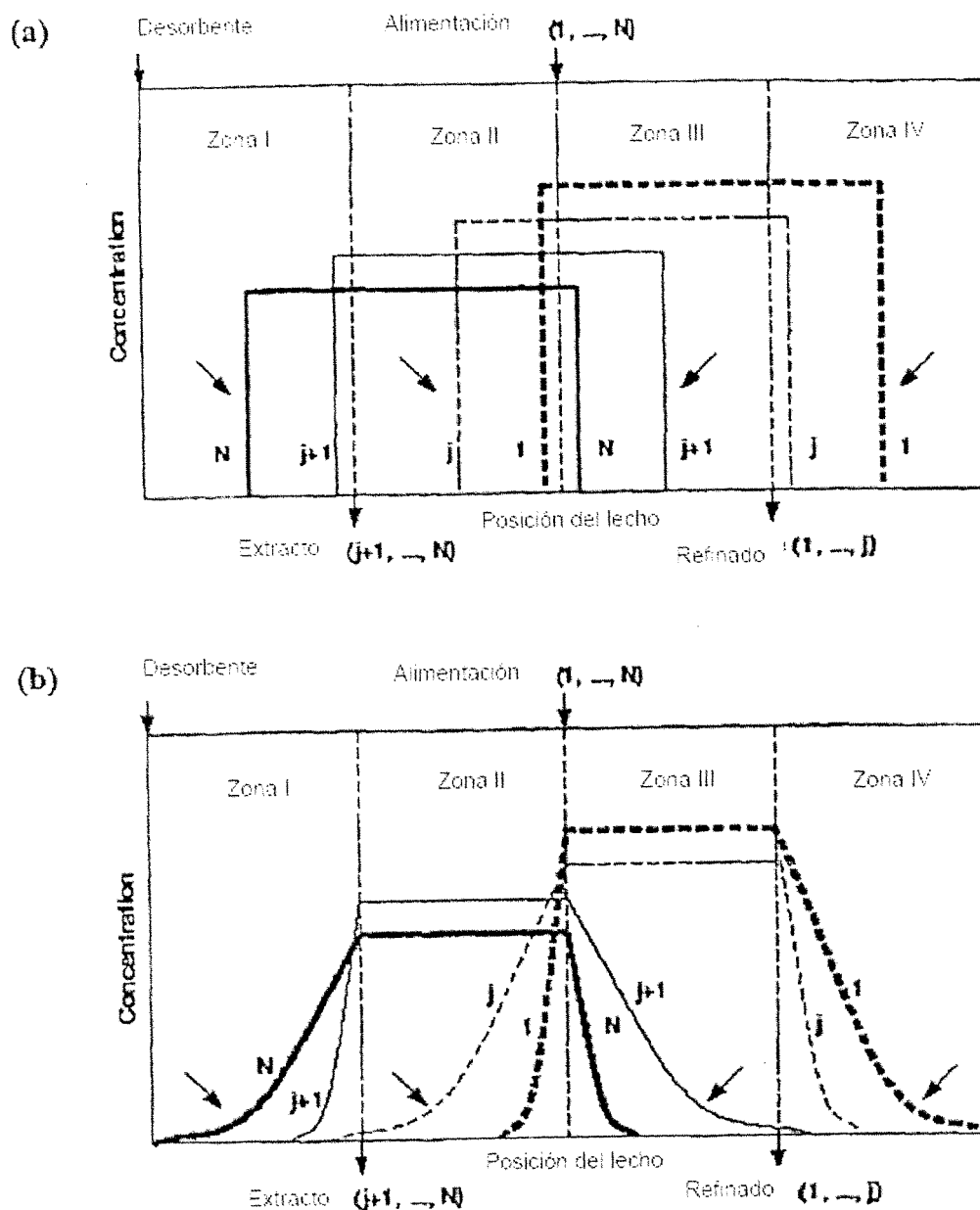


Figura 6. Aproximación de frente estacionario para separar un mezcla de N componentes en dos grupos de componentes utilizando un SMB de cuatro zonas. Las flechas en diagonal indican frentes que se mantienen estacionarias en una zona dada. (a) Sistema ideal; (b) Sistema no-ideal.

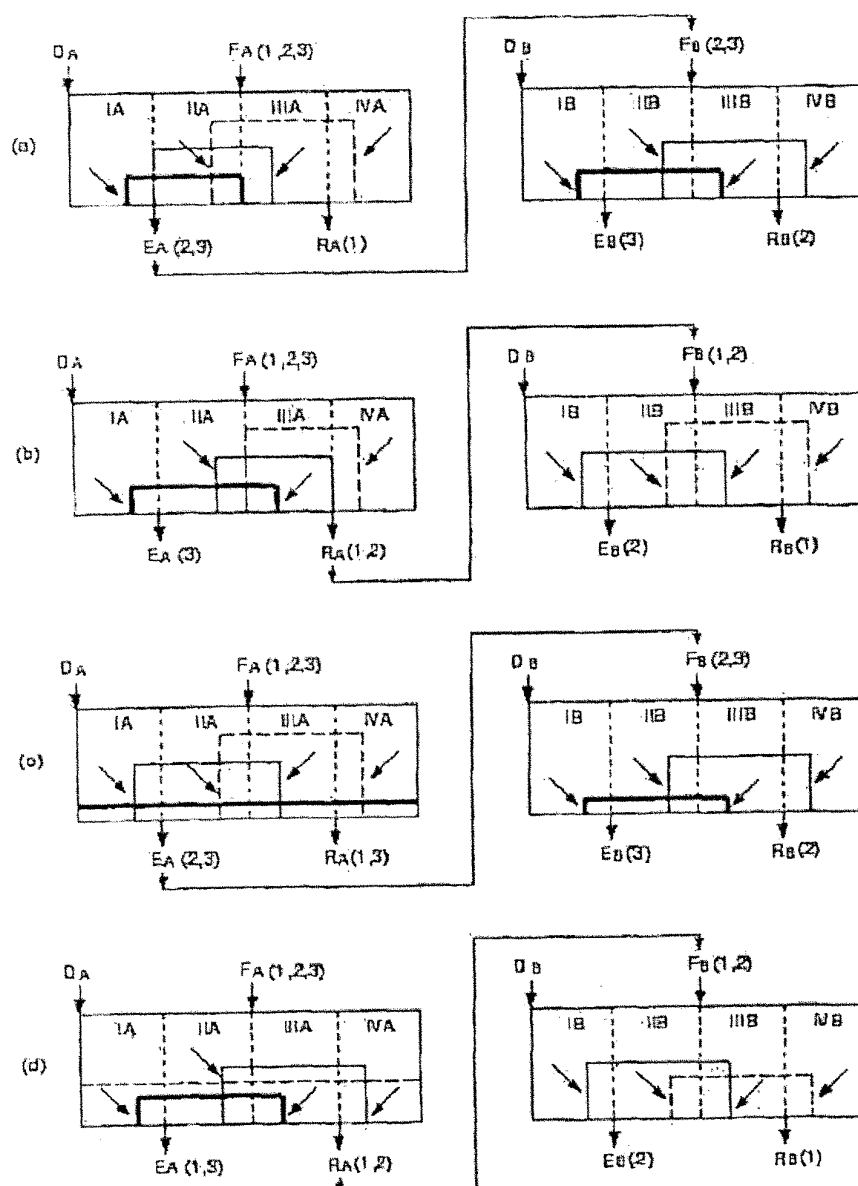


Figura 7 Estrategias para separar componentes en unidades SMB en tándem. Las resistencias de transferencia de masa son negligibles. línea punteada: componente 1; línea fina sólida: componente 2; línea gruesa sólida: componente 3. (a) Estrategia S1: componente 1 se separa de los componentes 2 y 3 en el primer anillo y el componente 2 se separa del componente 3 en el segundo anillo; (b) Estrategia S2: el componente 3 se separa de los componentes 1 y 2 en el primer anillo y el componente 2 se separa del componente 1 en el segundo anillo; (c) Estrategia S3: el componente 3 se distribuye por el primer anillo y el componente 2 se separa del componente 3 en el segundo anillo; (d) Estrategia S4: el componente 1 se distribuye por el primer anillo y el componente 2 se separa del componente 1 en el segundo anillo;

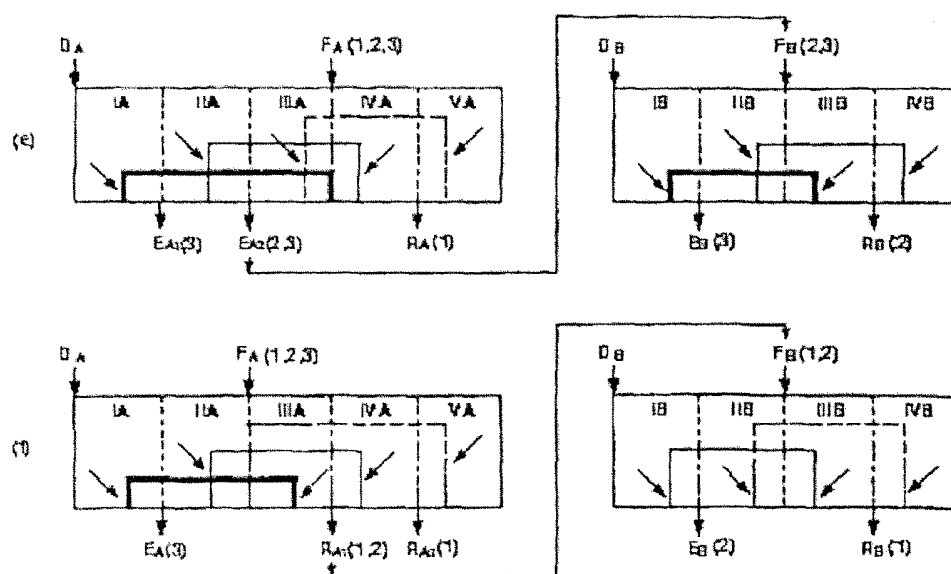


Figura 7 (Continuación) Estrategias para separar componentes en unidades SMB en tándem. Las resistencias de transferencia de masa son negligibles. línea punteada: componente 1; línea fina sólida: componente 2; línea gruesa sólida: componente 3. (e) Estrategia S5: componente 1 se separa de los componentes 2 y 3 en el primer anillo (5 zonas) y el componente 2 se separa del componente 3 en el segundo anillo (4 zonas); (f) Estrategia S6: el componente 3 se separa de los componentes 1 y 2 en el primer anillo (5 zonas) y el componente 2 se separa del componente 1 en el segundo anillo (4 zonas).

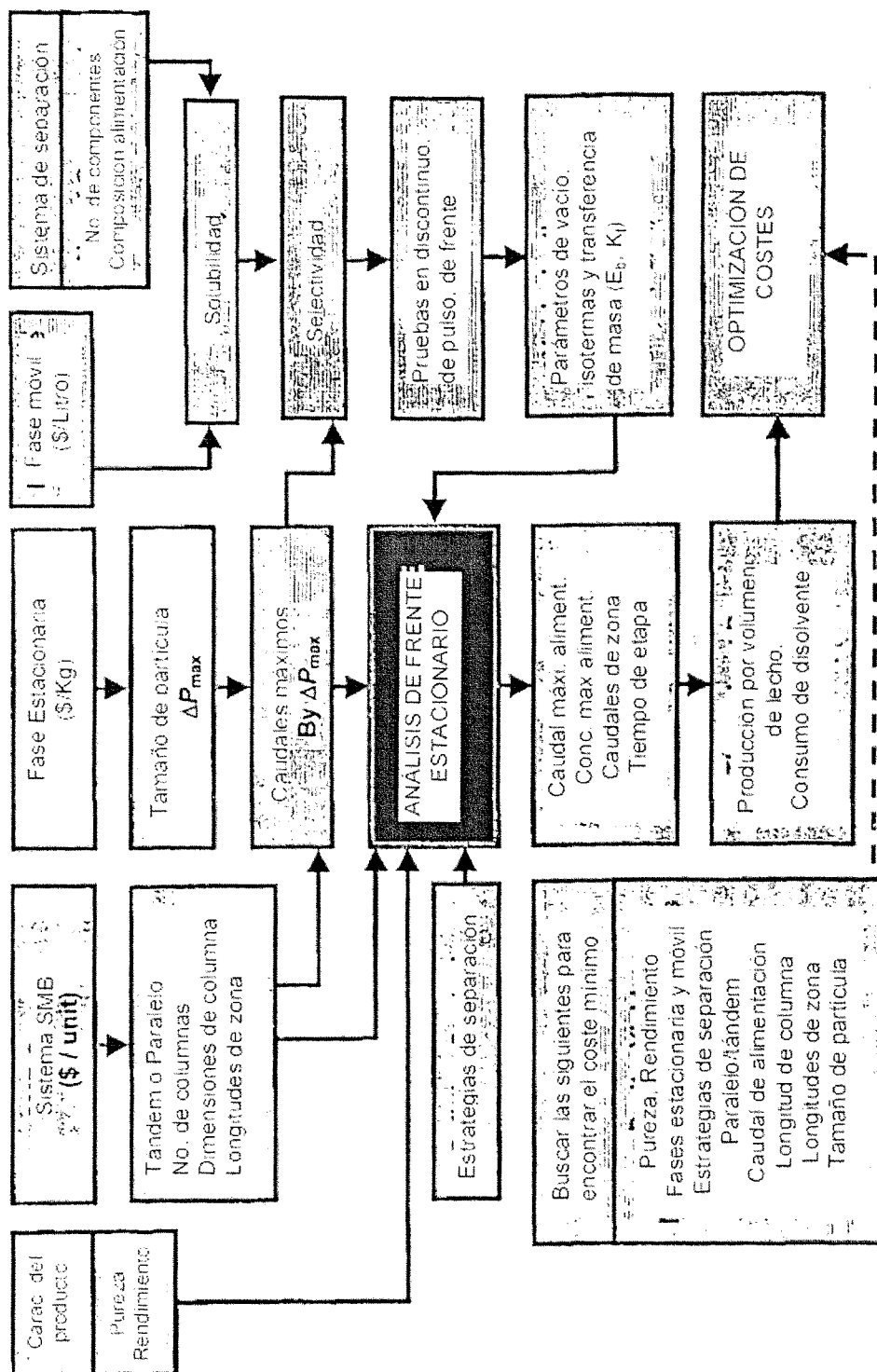


Figura 8. Análisis de costes par lecho fluidizado simulado utilizando el diseño de frente estacionario

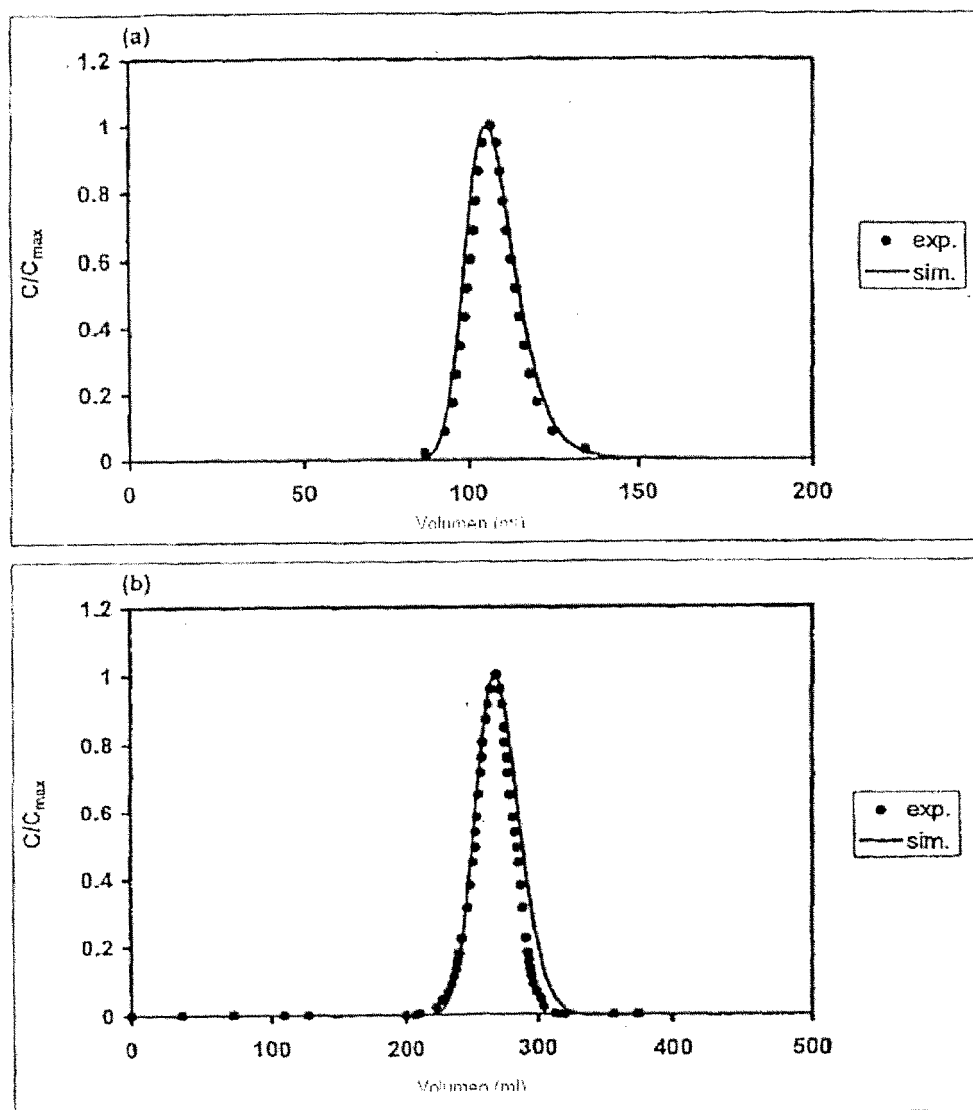


Figura 9. Datos experimentales y resultados de simulación para las pruebas de pulsos con una columna a escala de laboratorio. (c) Dextrano azul (d) NaCl.

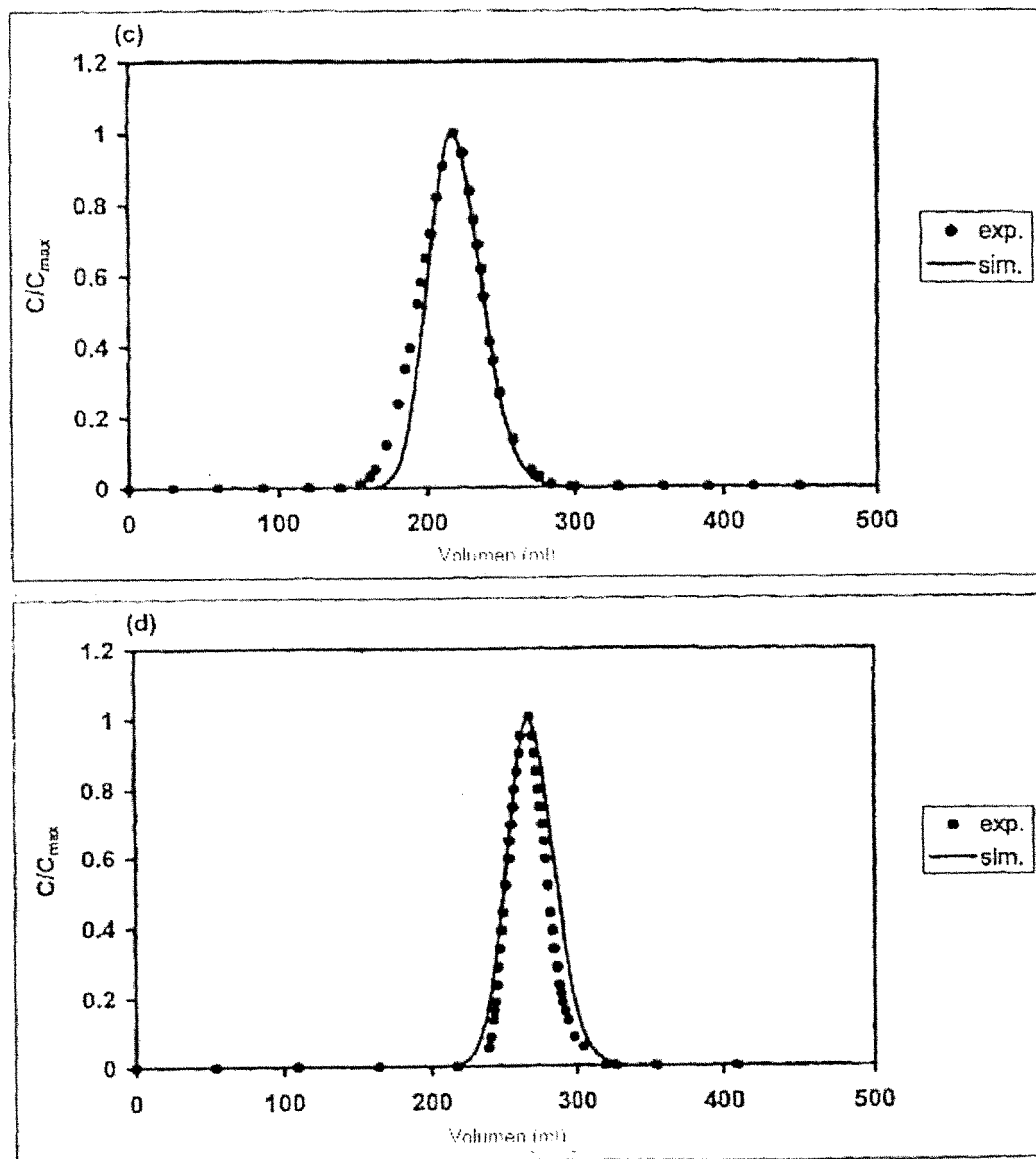


Figura 9 (continuación). Datos experimentales y resultados de simulación para las pruebas de pulsos con una columna a escala de laboratorio. (c) BHI (d) $ZnCl_2$.

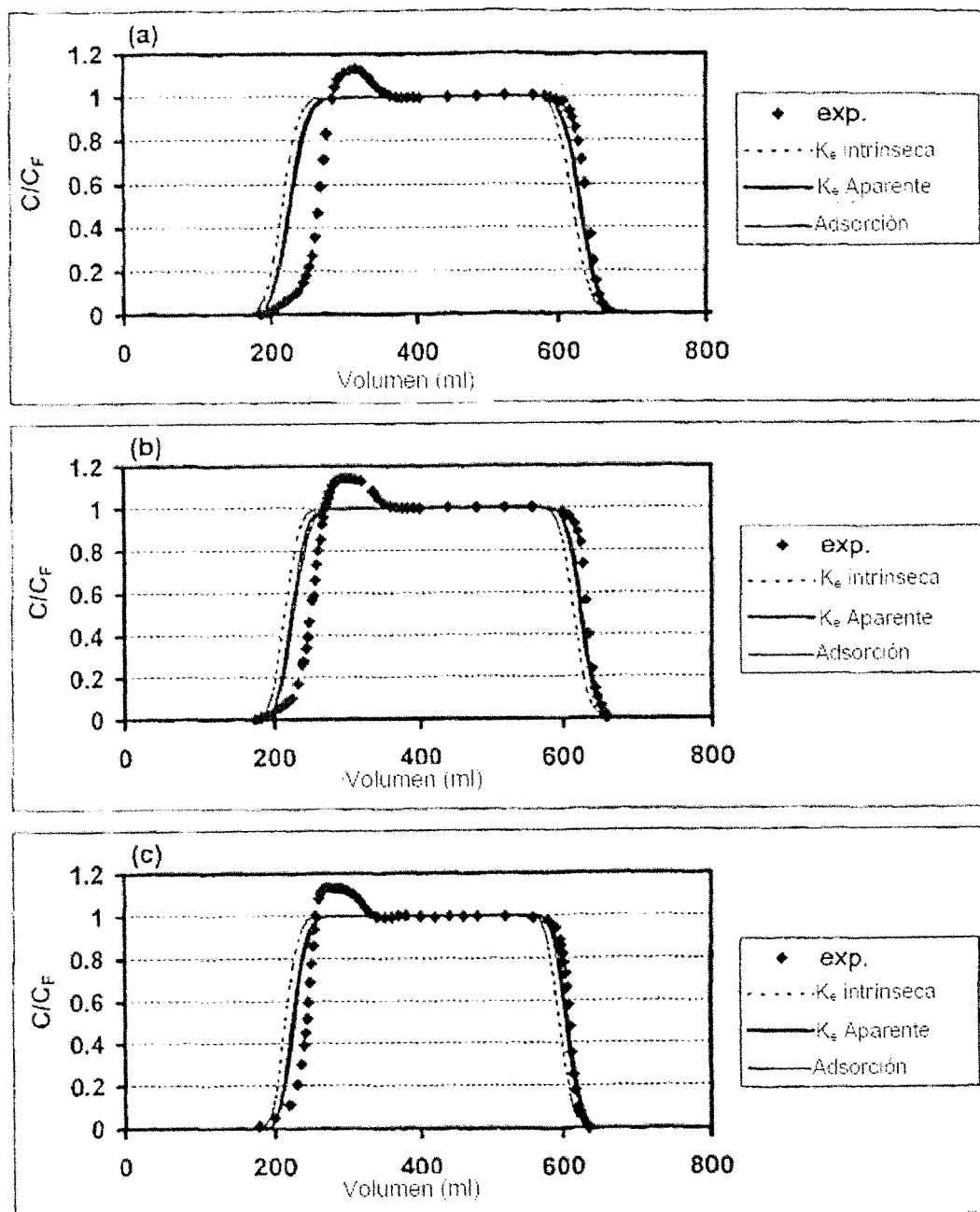


Figura 10. Datos experimentales y resultados de simulación de las pruebas de saturación y elución de BHI con una columna a escala de laboratorio. Los símbolos son datos experimentales y las líneas son simulaciones: Caudal a (a) 8.1 ml/min; (b) 4.0 ml/min; (c) 2.0 ml/min.

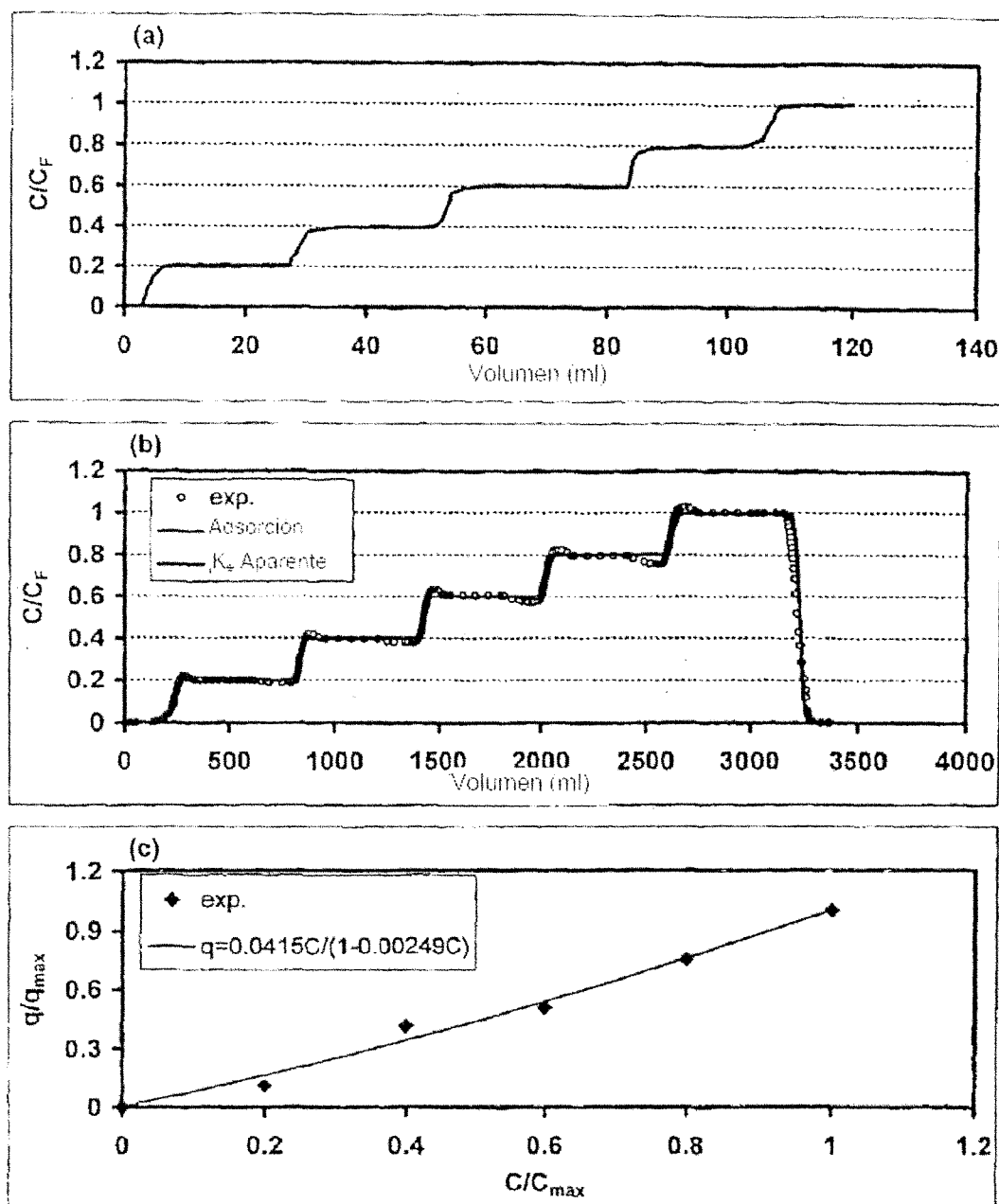


Figura 11. Datos experimentales y resultados de simulación de las pruebas de frente múltiple de BHI con columna a escala de laboratorio. (a) Datos de frente múltiple sin columna; (b) Datos de frente múltiple y simulación con columna. Los símbolos son datos experimentales y las líneas son simulaciones; (c) datos de adsorción isotérmica estimados a partir de las pruebas de frente múltiple a 4 °C y ajustándola con un modelo de isoterma anti-Langmuir.

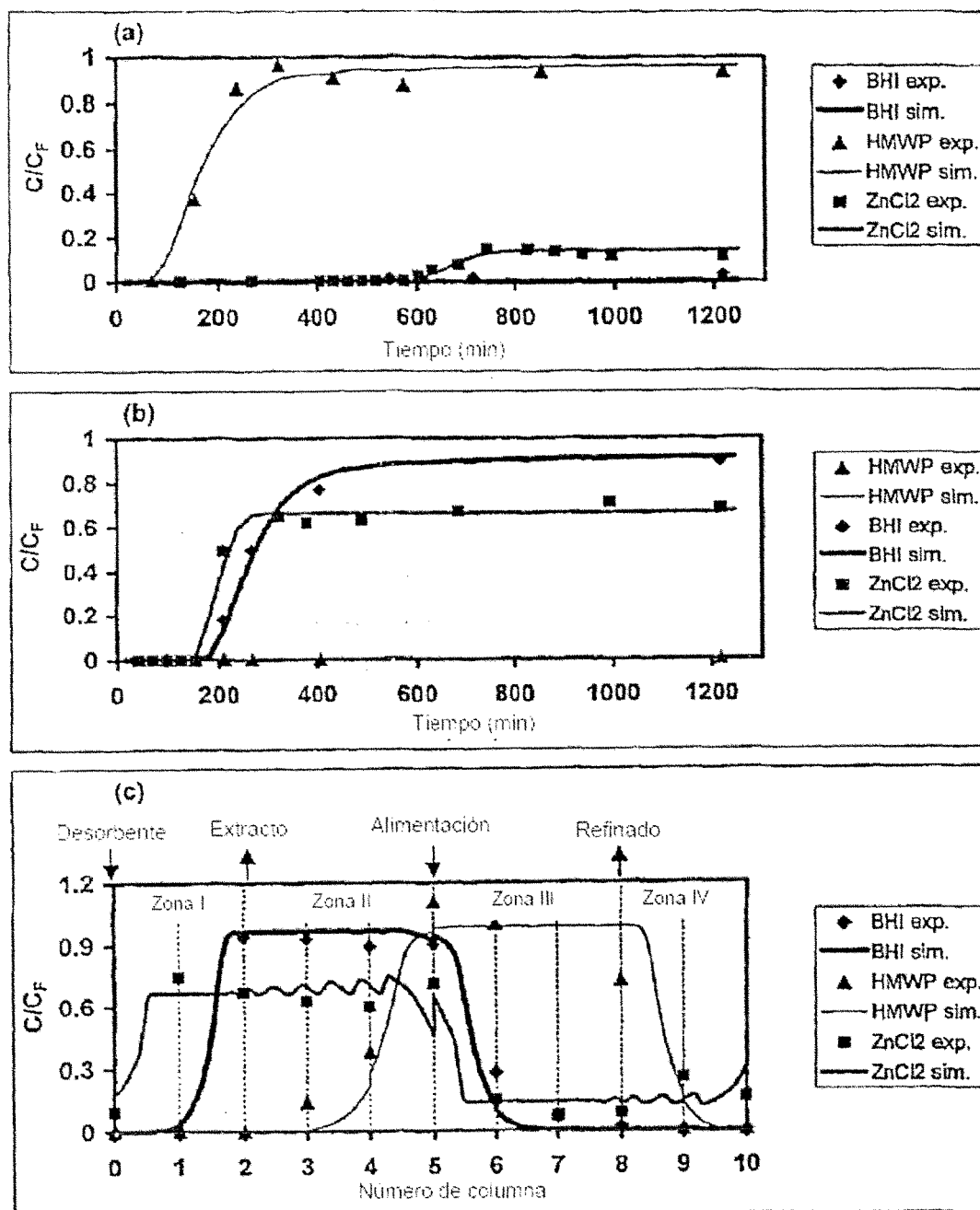


Figura 12 Datos experimentales y resultados de simulaciones de la Ejecución 1 del proceso SMB (Anillo I). (a) Histórico de efluente en el puerto de refinado; (b) Histórico de efluente en el puerto de extracto; (c) Perfiles de mitad de ciclo en el 45^a ciclo. Las concentraciones en los históricos de efluente están promediadas en un periodo de intercambio.

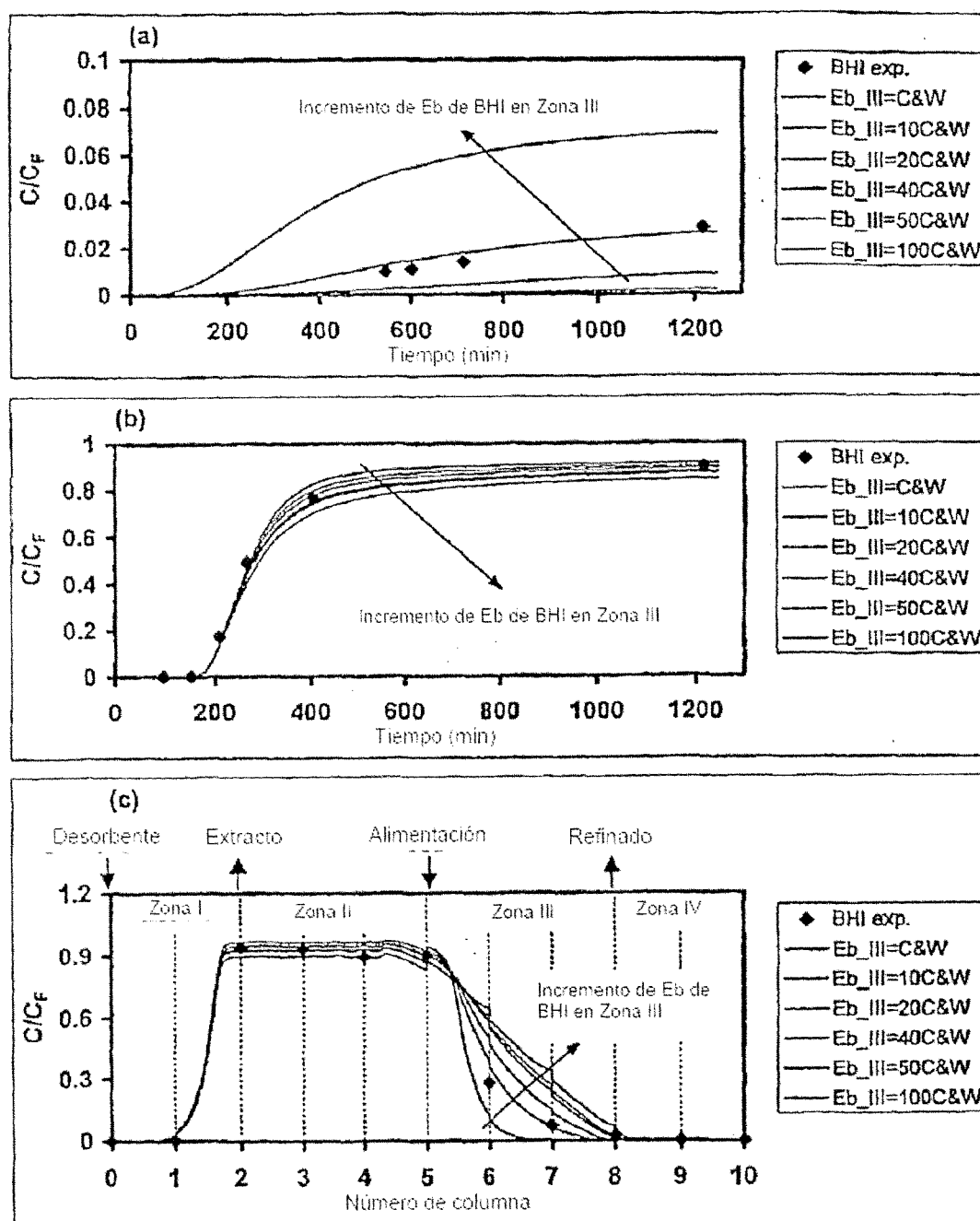


Figura 13 Datos de BHI en la Ejecución 1 del experimento SMB (Anillo I) y simulaciones con diferentes E_b de BHI en la Zona III. (a) Histórico de efluente en el puerto de refinado; (b) Histórico de efluente en el puerto de extracto; (c) Perfiles de mitad de ciclo en el 45^a ciclo. C & W se mantienen constantes para el valor de E_b estimado a partir de la correlación de Chung y Weng.

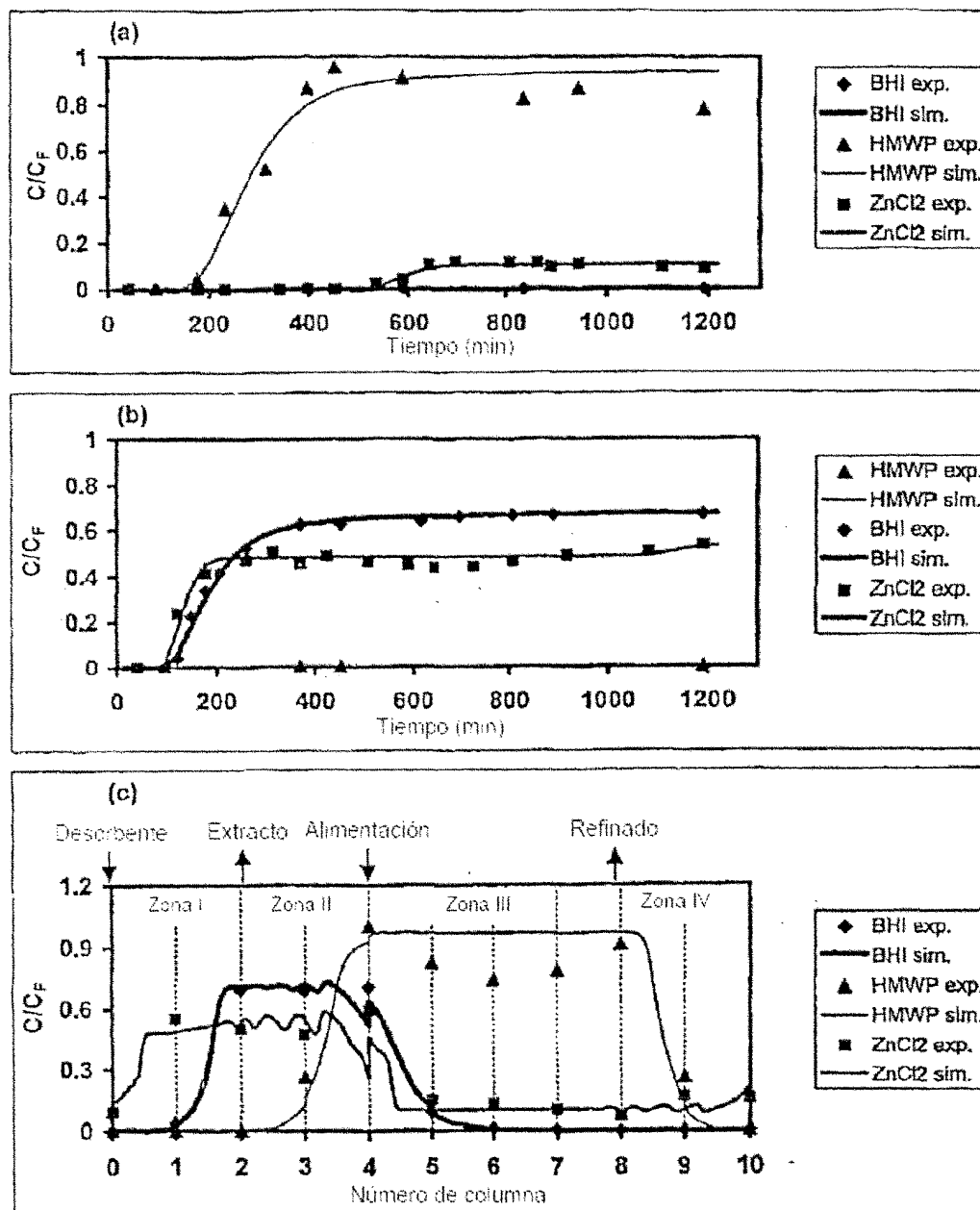


Figura 14 Datos experimentales y resultados de simulaciones de la Ejecución 2 del proceso SMB (Anillo I). (a) Histórico de efluente en el puerto de refinado; (b) Histórico de efluente en el puerto de extracto; (c) Perfiles de mitad de ciclo en el 45^a ciclo. Las concentraciones en los históricos de efluente están promediadas en un periodo de intercambio.

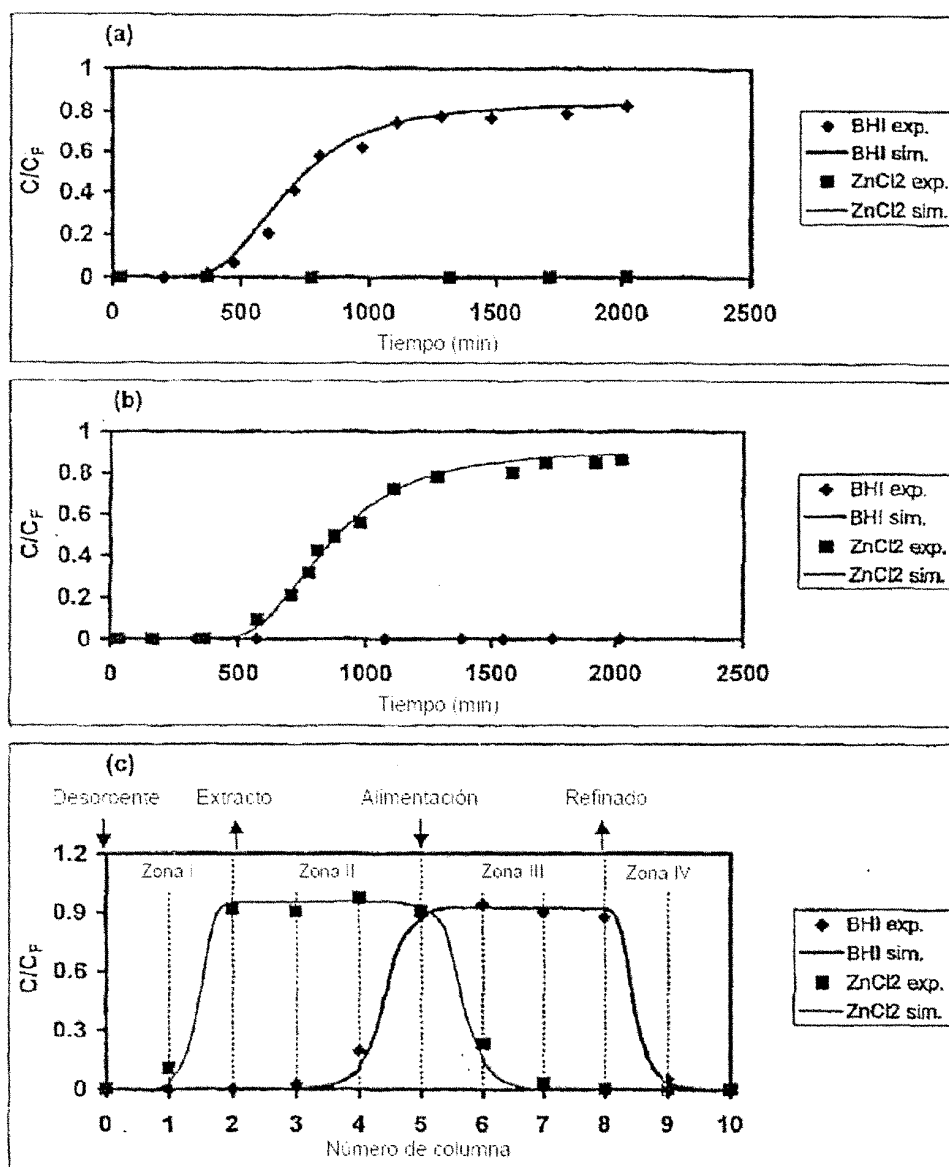


Figura 15 Datos experimentales y resultados de simulaciones de la Ejecución 3 del proceso SMB (Anillo II). (a) Histórico de efluente en el puerto de refinado; (b) Histórico de efluente en el puerto de extracto; (c) Perfiles de mitad de ciclo en la etapa 61^a. Las concentraciones en los históricos de efluente están promediadas en un periodo de intercambio.

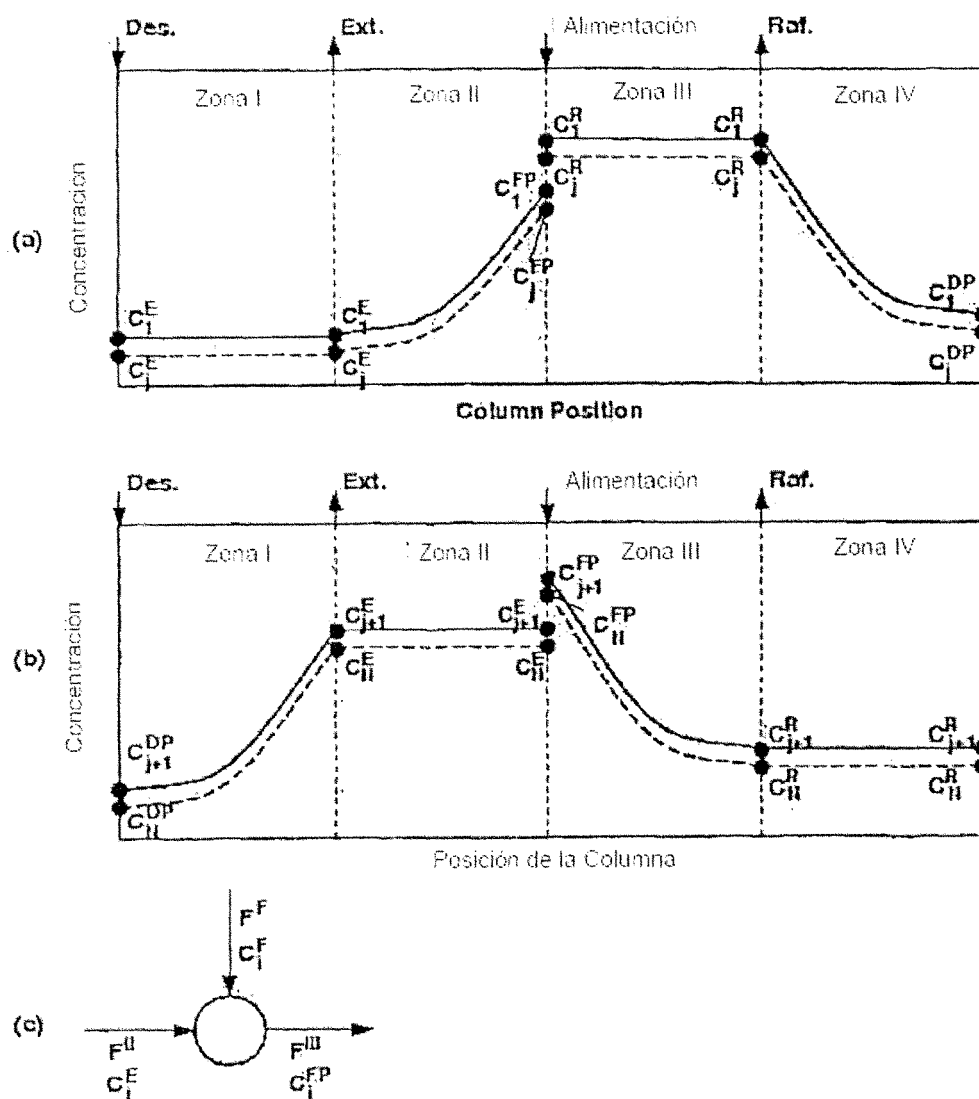


Figura 16 Perfiles de columna aproximados para la estimación de las concentraciones de producto y los factores de disminución. (a) Perfiles de columna de componentes que normalmente se enriquecen en el puerto de refinado ($i \in \{1, \dots, j\}$); (b) perfiles de columna de componentes que normalmente se enriquecen en el puerto de extracto ($i \in \{j+1, \dots, N\}$); (c) Unión de mezcla en el puerto de alimentación que muestra cómo se calcula el balance de masa para un componente del extracto.