



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 234**

51 Int. Cl.:

B01D 15/42 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 30/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06826489 .4**

96 Fecha de presentación : **23.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1960077**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54

Título: **Procedimiento de cromatografía de desplazamiento de intercambio catiónico y compuestos orgánicos catiónicos para usar como compuestos desplazantes en el procedimiento de cromatografía de desplazamiento de intercambio catiónico.**

30

Prioridad: **04.11.2005 US 267823**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2011

73

Titular/es: **SACHEM, Inc.**
821 East Woodward Street
Austin, Texas 78704, US

72

Inventor/es: **Little, Charles;**
Van de Pas, Victor y
Haymore, Barry

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 234 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cromatografía de desplazamiento de intercambio catiónico y compuestos orgánicos catiónicos para usar como compuestos desplazantes en el procedimiento de cromatografía de desplazamiento de intercambio catiónico.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimientos de cromatografía de desplazamiento y a una composición respectiva para ellos.

ANTECEDENTES

10 El modo de desplazamiento de cromatografía fue reconocido primero en 1906 por Tswett, que advirtió que ocurría un desplazamiento de la muestra en condiciones de cromatografía de elución sobrecargada. En 1943, Tiselius propuso que la amplia materia de la cromatografía se podría organizar alrededor de tres distintos "modos": modo frontal, modo de elución y modo de desplazamiento. Desde entonces, la mayor parte de los desarrollos y aplicaciones, particularmente aquellos en cromatografía analítica, han tenido lugar en el área de la cromatografía de elución. Ciertamente, el término "cromatografía" sin calificación adicional hoy se refiere usualmente a cromatografía en el modo de elución.

15 El modo de elución y el modo de desplazamiento se distinguen fácilmente tanto en la teoría como en la práctica. En cromatografía de elución, una disolución de la muestra a purificar se aplica a una fase estacionaria, comúnmente en una columna. La fase móvil se escoge de tal modo que la muestra ni se adsorbe irreversiblemente ni no se adsorbe totalmente, sino que en su lugar se une reversiblemente. A medida que se hace fluir la fase móvil sobre la fase estacionaria, se establece un equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria por lo que, dependiendo de la afinidad por la fase estacionaria, la muestra pasa a lo largo de la columna a una velocidad que refleja la afinidad relativa respecto a otros componentes que pueden estar presentes en la muestra original. Es de interés particular en cromatografía de elución estándar el hecho de que el frente del disolvente de elución, o volumen cero de la columna en elución isocrática, siempre precede a la muestra a la salida de la columna.

20 Una modificación y extensión de la cromatografía de elución isocrática se encuentra en la cromatografía de gradiente en etapas en la que se hacen pasar sobre la fase estacionaria una serie de eluyentes de composición variable. En cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, se emplean cambios por etapa en la concentración de sal y/o pH de la fase móvil para eluir o desorber analitos que se están separando.

25 La cromatografía de desplazamiento emplea un compuesto desplazante para retirar componentes de una mezcla de la columna. El compuesto desplazante generalmente tiene una afinidad mucho más alta por la fase estacionaria que cualquiera de los componentes en la mezcla que se va a separar. Esto contrasta con la cromatografía de elución, en la que el eluyente tiene una afinidad más baja por la fase estacionaria que los componentes que se van a separar. Una característica operacional clave que distingue la cromatografía de desplazamiento de la cromatografía de elución o desorción es el uso de un compuesto desplazante. En cromatografía de desplazamiento, la columna se equilibra primero con un disolvente portador en condiciones en las que los componentes que se van a separar tienen todos una afinidad relativamente alta por la fase estacionaria. Un volumen de mezcla de alimentación, que puede ser grande y bastante diluido, se carga sobre la columna y los componentes individuales en la mezcla de alimentación se adsorberán en la fase estacionaria. Esto es, los componentes de la mezcla de alimentación se distribuyen y adsorben sobre la fase estacionaria, y permanecen allí. Si todos los componentes se van a resolver por desplazamiento, el disolvente portador emerge de la columna sin contener muestra. Los componentes de la mezcla de alimentación ahora residen sobre la fase estacionaria, y la posición de cada componente sobre la columna está correlacionada con su afinidad relativa por la fase estacionaria en las condiciones iniciales. En principio, una molécula de cualquier componente desplazará a una molécula de cualquier componente diferente que tenga una afinidad más baja en un sitio dado en la fase estacionaria. Como resultado, los componentes individuales estarán colocados sobre la columna finalmente en una secuencia de la más alta a la más baja afinidad.

A veces es ventajoso permitir que algunos componentes de la mezcla de alimentación, por ejemplo, los componentes que no tienen una afinidad significativa por la fase estacionaria, pasen a través de la columna con el disolvente portador; en este caso solo se resolverán por cromatografía de desplazamiento los componentes de la alimentación retenidos.

30 Una vez que se ha cargado la muestra en la columna, se introduce dentro de la columna una disolución que contiene un compuesto desplazante en un disolvente apropiado para pasar a través de la fase estacionaria. EL compuesto desplazante se selecciona de tal modo que tenga una afinidad más alta por la fase estacionaria que cualquiera de los componentes de la mezcla de alimentación. Suponiendo que el desplazante y la fase móvil son apropiadamente escogidos, los componentes individuales salen de la columna como zonas adyacentes de material relativamente puro altamente concentrado en el orden de afinidad de absorción creciente. Después de las zonas de los componentes individuales purificados, emerge de la columna el desplazante. Un cromatograma de desplazamiento se distingue fácilmente de un cromatograma de elución en virtud del hecho de que el compuesto

desplazante sigue a la muestra y de que los componentes de la alimentación salen de la columna como zonas adyacentes de material relativamente puro altamente concentrado.

5 La cromatografía de desplazamiento tiene algunas características particularmente ventajosas para cromatografía a escala de proceso. Primero, la cromatografía de desplazamiento puede conseguir la separación y concentración de producto en una sola etapa. Por comparación, la cromatografía de elución isocrática da como resultado una dilución significativa del producto durante la separación. Segundo, dado que el proceso de desplazamiento funciona en la región no lineal de la isoterma de equilibrio, son posibles altas cargas de la columna. Esto permite una mucho mejor utilización de la columna que la cromatografía de elución. Tercero, el revelado de la columna y la separación de componentes requiere menos disolvente que un procedimiento de elución comparable. Cuarto, la cromatografía de desplazamiento puede concentrar y purificar componentes de mezclas que tienen bajos factores de separación, mientras que se requieren relativamente grandes factores de separación para la resolución satisfactoria en cromatografía de elución típica.

15 Con todas estas ventajas, se podría suponer que la cromatografía de desplazamiento fuera muy utilizada. Sin embargo, han persistido los problemas en cromatografía de desplazamiento. Uno de tales problemas es la necesidad de regenerar la columna, dado que no sería económico tirar la fase estacionaria después de cada uso. Otro de tales problemas es obtener compuestos desplazantes apropiados que sean compuestos relativamente simples, fácilmente sintetizados y/o comercialmente disponibles a un coste (económico) razonable. Estos dos problemas han presentado inconvenientes significativos para la cromatografía de desplazamiento cara a cara con la cromatografía de elución.

20 Con respecto a la regeneración, dado que el procedimiento de desplazamiento usa un compuesto desplazante con una afinidad muy alta por la fase estacionaria, el tiempo necesario para regenerar y reequilibrar la columna puede ser prolongado comparado con la cromatografía de elución. Además, se requieren a menudo cantidades relativamente grandes de disolvente durante la regeneración. Estos problemas han reducido efectivamente las ventajas de la cromatografía de desplazamiento sobre la cromatografía de elución.

25 El segundo problema, el de obtener compuestos desplazantes útiles que se puedan sintetizar con relativa facilidad y/o que estén comercialmente disponibles a un coste (económico) razonable, es debido a la necesidad de un compuesto desplazante que tenga tanto una alta afinidad por la fase estacionaria como que también pueda ser retirado con relativa facilidad de la columna durante la regeneración. Tales compuestos que han sido ofrecidos por la técnica anterior no cumplen uno o ambos de estos dos importantes criterios. Se han ofrecido varios compuestos como desplazantes de bajo peso molecular, pero estos han sido bastante difíciles de sintetizar y purificar y no han estado comercialmente disponibles a un coste razonable, o simplemente no han estado comercialmente disponibles.

30 Para que la cromatografía de desplazamiento se convierta en una técnica cromatográfica mayoritaria, sigue existiendo una necesidad significativa no satisfecha de desplazantes efectivos cuya síntesis y purificación sea sencilla y que sean susceptibles de producción a gran escala, y/o que estén comercialmente disponibles, y que permitan la regeneración eficiente de la fase estacionaria de modo que la fase estacionaria se pueda reutilizar subsecuentemente en procedimientos de cromatografía de desplazamiento.

SUMARIO

35 Se ha encontrado ahora que una clase de compuestos positivamente cargados de bajo peso molecular pueden funcionar muy eficientemente como compuestos desplazantes en un procedimiento de cromatografía de desplazamiento. De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento de cromatografía de desplazamiento. Los compuestos desplazantes usados según la presente invención se pueden retirar eficientemente de la fase estacionaria después de ser usados como compuesto desplazante en un procedimiento de cromatografía de desplazamiento, permitiendo la regeneración y reutilización de la fase estacionaria en subsecuentes procedimientos de cromatografía de desplazamiento. Además, estos compuestos desplazantes se pueden preparar con buen rendimiento y alta pureza, por métodos sintéticos relativamente sencillos y baratos. De este modo, la presente invención trata los anteriormente mencionados problemas en procedimientos de cromatografía de desplazamiento de la técnica anterior.

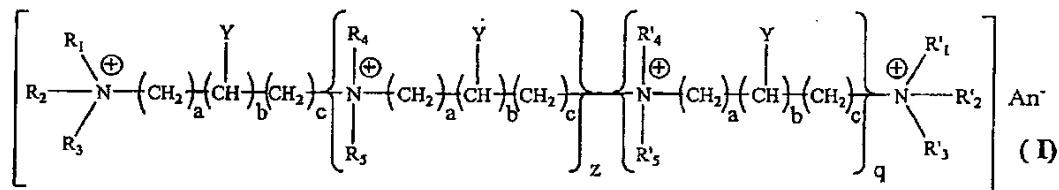
40 Los compuestos desplazantes usados según la presente invención pertenecen a una clase de compuestos conocidos como sales de amonio cuaternario (sales quat). Las sales cuaternarias son composiciones que comprenden átomos de nitrógeno positivamente cargado. Estas composiciones comprenden cadenas alifáticas, aunque sin embargo pueden ser solubles en agua en muchos casos. Cuando son solubles en agua, estos compuestos exhiben la útil propiedad de tener cargas positivas que no son afectadas por los cambios de pH. Esto es, la carga del centro nitrogenado no es el resultado de la simple protonación de una amina, de modo que el pH de las disoluciones acuosas de estas sales se puede ajustar en un amplio intervalo sin provocar la pérdida de la carga positiva sobre el centro nitrogenado. Las poliaminas comunes y compuestos relacionados usualmente no son útiles como compuestos desplazantes en cromatografía de desplazamiento de intercambio catiónico. Esto es porque no están totalmente protonadas – y por lo tanto no desarrollan suficiente carga positiva – en intervalos de pH que sean compatibles con resinas de cromatografía de desplazamiento. En contraste, los compuestos desplazantes usados

en la presente invención se pueden usar en cualquier intervalo de pH en el que es estable la resina de cromatografía.

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de cromatografía de desplazamiento, que comprende:

- 5 cargar en una fase estacionaria apropiada una mezcla que comprende por lo menos un componente que se va a separar;

desplazar dicho por lo menos un componente de la fase estacionaria aplicando a la fase estacionaria una mezcla que comprende un compuesto desplazante que tiene la fórmula general (I):



- 10 en la que:

cada grupo R₁, R₂, R₃, R'₁, R'₂, y R'₃, independientemente se puede seleccionar de alquilo, arilo, y aralquilo, y en el que se puede formar un anillo que contiene uno o más nitrógenos cuaternarios con uno o más de R₁ y R₂, R₁ y R'₁, R₁ y R₄, R₄ y R'₄, o R₄ y R₅;

- 15 cada R₄, R'₄, R₅ y R'₅ independientemente se puede seleccionar de alquilo, arilo, aralquilo y -(CH₂)_a-(CHY)_b-(CH₂)_c-N⁺R₁R₂R₃An⁻, en la que R₁, R₂ y R₃ son como se define anteriormente;

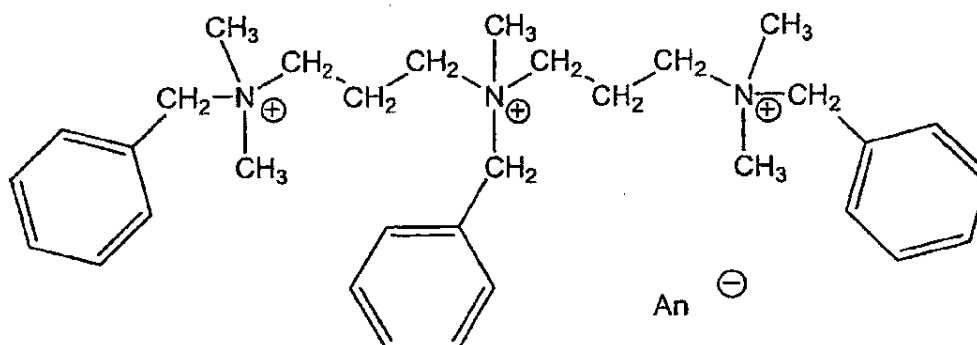
cada Y independientemente se puede seleccionar de -H, -OH, -OR₆, halo, alquilo, arilo y aralquilo, en la que -R₆ puede ser alquilo o -(CH₂)_a-(CHOH)_b-(CH₂)_c-N⁺R₁R₂R₃An⁻, en la que R₁, R₂ y R₃ son como se define anteriormente, y uno o más Y puede ser un grupo detectable por uno o más métodos electromagnéticos;

- 20 cada q y z independientemente puede ser cualquier número entero de 0 a 6, con la condición de que q+z sea igual o menor de 6;

cada a, b y c independientemente puede ser cualquier número entero de 0 a 2, con la condición de que la suma de a+b+c en cualquier fragmento sea por lo menos 1; y

cada An⁻ independientemente puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos según sea necesario para obtener un compuesto neutro.

- 25 En una realización, la presente invención se refiere a una composición que tiene la siguiente estructura denominada TBTQ-A:



En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para una o más de detección, recogida o cuantificación de componentes traza en la muestra sometida a cromatografía de desplazamiento.

- 30 De este modo, la presente invención proporciona compuestos desplazantes, composiciones y procedimientos para cromatografía de desplazamiento que tratan de la necesidad de compuestos desplazantes efectivos cuya síntesis y purificación es sencilla y susceptible de producción a gran escala, que permiten la eficiente regeneración de la fase estacionaria de modo que la fase estacionaria se pueda reutilizar eficientemente. Además, la presente invención

proporciona un procedimiento por el que componentes traza de la muestra o mezcla se pueden detectar, recoger y/o cuantificar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La FIG. 1 es un gráfico que representa la salida de un detector de HPLC UV/Vis a varias longitudes de onda durante la cromatografía de desplazamiento de una mezcla de citocromo C bovino y citocromo C equino, según una realización de la invención.

La FIG. 2 es un gráfico que representa la concentración de fracciones recogidas durante la cromatografía de desplazamiento de una mezcla de citocromo C bovino y citocromo C equino, según una realización de la invención

10 La FIG. 3 es un gráfico que representa la salida de un detector de HPLC UV/Vis a varias longitudes de onda durante la cromatografía de desplazamiento de una mezcla de citocromo C bovino y α -quimotripsinógeno AC bovino, según una realización de la invención.

15 La FIG. 4 es un gráfico que representa la concentración de fracciones recogidas durante la cromatografía de desplazamiento de una mezcla de citocromo C bovino y α -quimotripsinógeno AC bovino, según una realización de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se usa aquí, "halo" se refiere a un grupo que comprende un halógeno, tal como cloro, bromo, flúor o yodo.

20 Tal como se usa aquí, "alquilo" y "alquileno" se refiere a un grupo de átomos de carbono e hidrógeno derivado de una molécula de alcano retirando uno o dos átomos de hidrógeno, según sea apropiado. "Alquilo" y "alquileno" pueden incluir radicales hidrocarbonados saturados monovalentes y divalentes que tienen restos lineales, ramificados o cíclicos. Los grupos "alquilo" o "alquileno" pueden incluir doble o triple enlace carbono-carbono opcional en los que dicho grupo alquilo comprende por lo menos tres átomos de carbono. Se entiende que para restos cíclicos se requieren por lo menos tres átomos de carbono en dicho grupo alquilo. En la presente invención, los grupos alquilo y alquileno pueden incluir cualquier número de átomos de carbono. En una realización de la presente invención, se pueden usar alrededor de 20 o menos átomos de carbono. Por ejemplo, en una realización, se pueden emplear grupos alquilo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 carbonos en la presente invención. Por supuesto, se pueden emplear grupos alquilo de mayor longitud o ramificados en la presente invención. Se pueden usar grupos alquileno, por ejemplo, en una realización en la que se va a formar un anillo de los dos grupos que de otro modo serían grupos alquilo.

30 Tal como se usa aquí "arilo" se refiere a una estructura aromática substituida o sin substituir tal como fenilo, naftilo, fluorenilo, fenantrilo, etc. El grupo arilo, cuando está substituido, puede estar substituido con un grupo halo, un grupo alquilo, otro grupo arilo o un grupo aralquilo, como se define aquí.

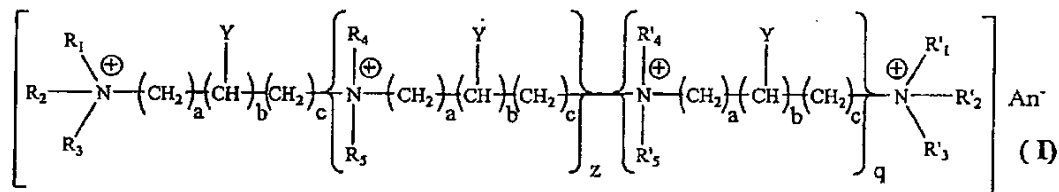
35 Tal como se usa aquí "aralquilo" se refiere a un radical en el que un grupo arilo está substituyendo a un átomo de hidrógeno de un grupo alquilo. "Arilo" es como se define anteriormente. En la presente invención, los grupos aralquilo pueden incluir cualquier número de átomos de carbono. En una realización de la presente invención, el grupo aralquilo contiene alrededor de 20 o menos átomos de carbono. Por ejemplo, en una realización, se pueden emplear grupos aralquilo de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 carbonos en la presente invención. Por supuesto, se pueden emplear grupos aralquilo de más átomos de carbono en la presente invención.

40 Tal como se usa aquí "An⁻" representa uno o más aniones monovalentes o polivalentes orgánicos o inorgánicos asociados a los compuestos desplazantes de la presente invención. El número y carga total de los aniones negativamente cargados asociados a los iones de amonio cuaternario de la presente invención variará dependiendo del pH de la mezcla y del anión del ácido o ácidos usados para la neutralización. Los aniones An⁻ de la presente invención pueden ser cualquier anión monovalente o polivalente, orgánico o inorgánico conocido por los expertos en la técnica, incluyendo los aniones monovalentes, divalentes o multivalentes tales como sulfonato, triflato, triflamida, carboxilato, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, ClO₃⁻, HSO₄⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻, PO₃²⁻, HPO₃⁻, BF₄⁻, PF₆⁻ y similares. En general, la valencia y número de An⁻ se pueden seleccionar según se necesite para obtener un compuesto neutro.

45 50 55 Cualquier valor numérico citado aquí incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior en incrementos de una unidad con tal de que haya una separación de por lo menos 2 unidades entre cualquier valor inferior y cualquier valor superior. Como ejemplo, si se afirma que la cantidad de un componente o un valor de una variable de proceso tal como, por ejemplo, temperatura, presión, tiempo y similares es, por ejemplo, de 1 a 90, preferentemente de 20 a 80, más preferentemente de 30 a 70, se desea que los valores tales como de 15 a 85, 22 a 68, 43 a 51, 30 a 32 y similares, se enumeran expresamente en esta memoria descriptiva. Para valores que son menores de uno, una unidad se considera que es 0,0001, 0,001 o 0,1 según sea apropiado. Estos son solo ejemplos de lo que se desea específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado se va a considerar que son expresamente indicados en esta solicitud de una manera similar.

Compuestos desplazantes catiónicos

Los compuestos desplazantes catiónicos usados en la presente invención incluyen aquellos que tienen la fórmula (I)



en la que

- 5 cada grupo R_1 , R_2 , R_3 , R'_1 , R'_2 , y R'_3 , se puede seleccionar independientemente de alquilo, arilo, y aralquilo, y en el que se puede formar un anillo que contiene un nitrógeno cuaternario por uno o más de R_1 y R_2 , R_1 y R'_1 , R_1 y R_4 , R_4 y R'_4 , o R_4 y R_5 ;

cada R_4 y R_5 se selecciona independientemente de alquilo, arilo, aralquilo y $-(CH_2)_a-(CHY)_b-(CH_2)_c-N^+R_1R_2R_3An^-$, en la que R_1 , R_2 y R_3 son como se define anteriormente;

- 10 cada Y se puede seleccionar de independientemente de $-H$, $-OH$, $-OR_6$, halo, alquilo, arilo y aralquilo, en el que $-R_6$ puede ser alquilo o $-(CH_2)_a-(CHOH)_b-(CH_2)_c-N^+R_1R_2R_3An^-$, en la que R_1 , R_2 y R_3 son como se define anteriormente, y uno o más Y puede ser un grupo detectable por uno o más métodos electromagnéticos;

cada q y z pueden ser un cualquier número entero de 0 a 6, con la condición de que $q+z$ sea igual o menor de 6;

- 15 cada a , b y c puede ser cualquier número entero de 0 a 2, con la condición de que la suma de $a+b+c$ en cualquier fragmento sea por lo menos 1; y

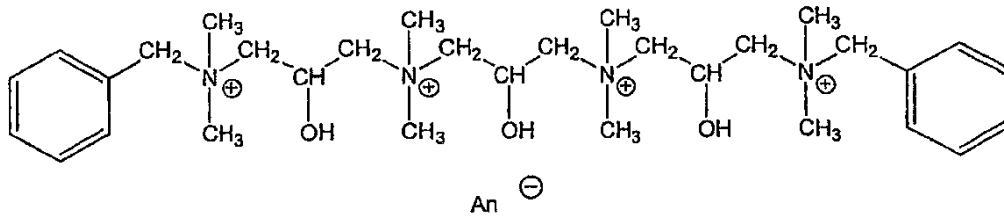
An^- puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos según sea necesario para obtener un compuesto neutro.

- 20 Un compuesto desplazante de fórmula (I) puede contener un sustituyente adicional que lo hace fácilmente detectable por espectroscopía UV/Vis, por fluorescencia, o por cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. Tal sustituyente puede influir también en la afinidad del compuesto para cromatografía de intercambio catiónico, haciéndolo menos fuertemente unido o más fuertemente unido. En algunos casos sería ventajoso no tener sustituyente que interfiriese con los medios normales de detectar los compuestos que se van a purificar por cromatografía de desplazamiento. Un ejemplo de este último caso sería un compuesto desplazante de fórmula I que no absorbiese luz UV a 280 nm, una longitud de onda a la que absorben característicamente ciertos biopolímeros
- 25 (proteínas, oligopéptidos, anticuerpos, etc.). Los agentes de derivación apropiados para mejorar la detectabilidad son conocidos y pueden ser seleccionados apropiadamente por los expertos en la técnica.

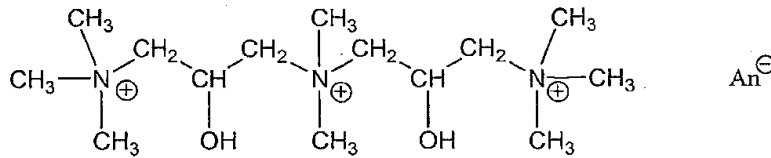
- 30 En una realización, uno o más Y en el compuesto desplazante usado según la presente invención puede ser un grupo detectable por uno o más métodos electromagnéticos. Tales métodos electromagnéticos incluyen, por ejemplo, espectrofotometría UV/Visible, espectrofotometría de fluorescencia, y métodos de detección radiactiva. Los grupos Y apropiados y los métodos apropiados para detectar tales grupos Y son conocidos por los expertos en la técnica para el uso de tales métodos.

- 35 Los compuestos desplazantes catiónicos ejemplares apropiados incluyen, por ejemplo, los siguientes ejemplos específicos, en los que, en cada caso, An^- puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos, con el número de valencia de cada An^- apropiadamente seleccionado para proporcionar un compuesto neutro (esto es, cada molécula debe tener carga neta cero, estando equilibradas las cargas positivas y negativas en los respectivos iones). Los siguientes compuestos específicos se proporcionan como ejemplos de los compuestos desplazantes definidos por la fórmula general (I) expuesta anteriormente, que incluye sustituyentes como se define aquí. Los siguientes ejemplos no se desea que sean limitantes, sino en su lugar se desea que proporcionen ejemplos específicos que ilustran compuestos desplazantes usados según varias realizaciones de la invención.

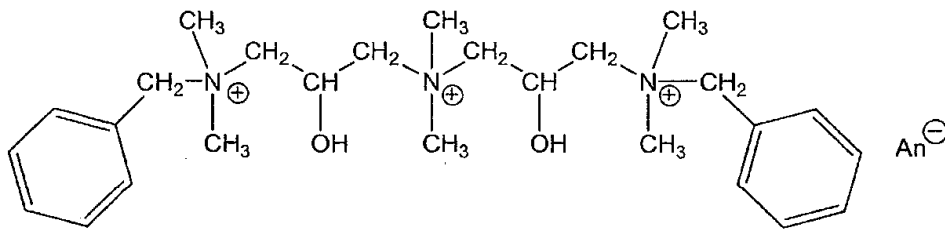
- 40 DBQ, que tiene la fórmula estructural:



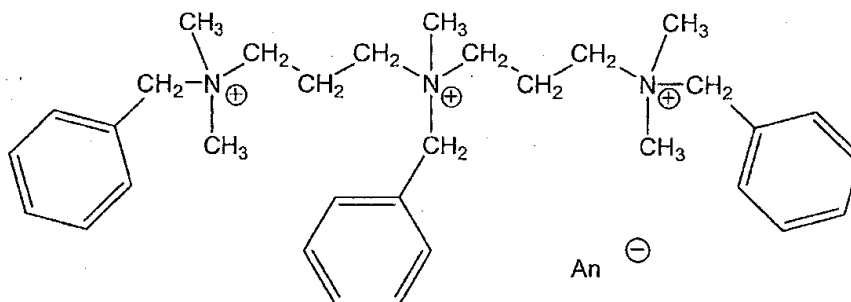
DMTQ, que tiene la fórmula estructural:



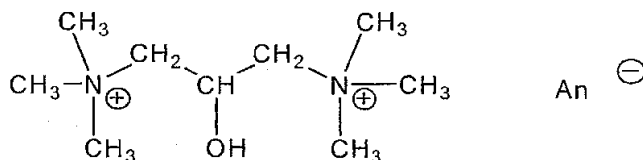
DBTQ, que tiene la fórmula estructural:



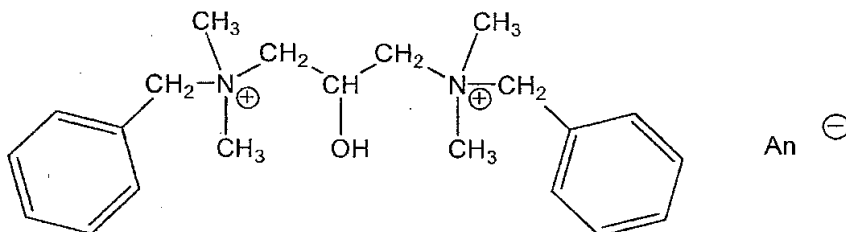
TBTQ-A, que tiene la fórmula estructural:



BTA, que tiene la fórmula estructural:

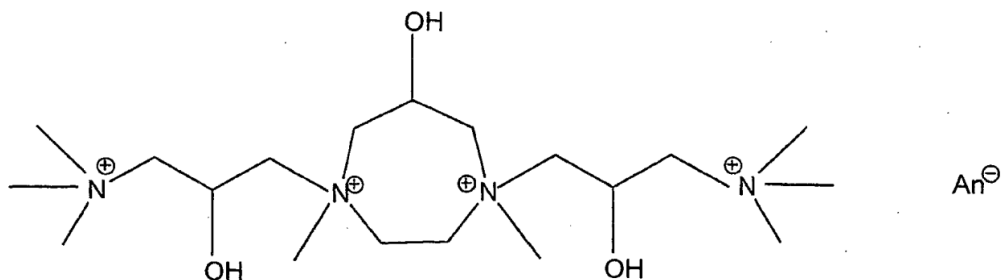


DBD, que tiene la fórmula estructural:



5 en la que en cada una de tales estructuras (es decir, DBQ, DMTQ, DBTQ, TBTQ-A, BTA y DBD), An^- puede ser uno o más aniones monovalentes orgánicos o inorgánicos, o An^- puede ser un anión polivalente, en cuyo caso están presentes un número apropiado de tales restos para obtener una molécula neutra. Esta definición y uso de An^- vale para toda esta descripción.

Un compuesto desplazante ejemplar que incluye un anillo que contiene nitrógeno cuaternario, en el que R_4 está unido a R'_4 por medio de un grupo etileno, en el que todos los $R_1, R_2, R_3, R'_1, R'_2, R'_3, R_5$ y R'_5 son metilo, An^- es como se define anteriormente, y en el que $Y=OH$ tiene la siguiente fórmula estructural:



- 10 En una realización, el compuesto desplazante usado en la presente invención está libre de grupos éter en la molécula. En una realización, los compuestos desplazantes usados en la presente invención están libres de grupos éter que conectan átomos de nitrógeno cuaternario adyacentes. En una realización, los compuestos desplazantes usados en la presente invención comprenden grupos policuaternarios en los que los grupos policuaternarios adyacentes no están conectados por restos que contienen éter. En una realización, los compuestos desplazantes
- 15 usados en la presente invención están libres de un poliéter dendrítico. En una realización, los compuestos desplazantes usados en la presente invención comprenden átomos de nitrógeno cuaternario que no están unidos por un grupo obtenido de un éter o poliéter.

20 Según una realización de la presente invención, la fase estacionaria apropiada es una resina de intercambio catiónico. Las resinas de intercambio catiónico apropiadas son conocidas en la técnica, y generalmente incluyen resinas tales como metacrilato, sílice, poliestireno o pliestireno-divinilbenceno, que se han derivado con un resto aniónico, tal como carboximetilo, sulfopropilo, ácido sulfónico, ácido carbónico, etc., al que están unidos los cationes. Los materiales de intercambio catiónico apropiado pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica basado en el tipo de materiales que se van a separar. En una realización, las resinas de intercambio catiónico apropiadas para uso con la presente invención incluyen, por ejemplo, resinas de intercambio catiónico Tosoh SP-5PW, Tosoh

CM-650, SP-650 y SP-550, TOYOPEARL® Super-Q 650S, TOYOPEARL® CM 650S, y TSK Gel SP-5PW, disponibles de Tosoh Corp., Tokyo, Japan y Montgomeryville, Pa. Las resinas de intercambio catiónico apropiadas adicionales incluyen, por ejemplo, UnoSphere S y MacroPrep S/MacroPrep High-S, disponibles de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA); CHIROBIOTIC®, disponible de Advanced Separation Technology (Whippany, N.J.); SP-8HR y SP-15 HR, disponibles de Waters Corporation (Milford, MA.); Mini S, Source 15S, Mono S, SP SEPHAROSE® HP, y SP SEPHAROSE® FF, disponibles de GE-Amersham Biosciences (Piscataway, NJ); SHOWDEX® IEC SP-825 y SHOWDEX® IEC SP-2025, disponibles de Showa Denko (New York, NY); PL-SCX, disponible de Polymer Laboratories (Amherst, MA); Macrosphere300, disponible de Alltech Laboratories (Deerfield, Ill.); PolySulfoEthylA, disponible de PolyLC, Inc. (Columbia, MD); y FRACTOGEL® EMD SE Hicap y FRACTOGEL® EMD SO3, disponibles de EMD Chemicals Inc. (Gibbstown, NJ). Se pueden usar también otras resinas de intercambio catiónico apropiadas.

Según una realización de la presente invención, el procedimiento de cromatografía de desplazamiento se puede usar para separar y purificar proteínas y polipéptidos. Tal como se usa aquí, una proteína se define en general como un poliaminoácido que tiene un peso molecular mayor de alrededor de 5 kDa (kilodaltons), y un polipéptido es un poliaminoácido que tiene un peso molecular menor de alrededor de 5 kDa. Como se entenderá por los expertos en la técnica, la diferencia entre una proteína y un polipéptido es más una de grado. En general, una proteína exhibe estructura terciaria, mientras que el polipéptido generalmente no.

En una realización, la presente invención es particularmente aplicable a la separación de componentes tales como proteínas y polipéptidos de mezclas que contienen tales componentes. En una realización, el uno o más componentes en la mezcla comprende uno o más polipéptidos, una o más proteínas o una mezcla de cualquiera de dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. Esto es, el procedimiento de la presente invención es aplicable para la separación de mezclas de proteínas, mezclas de polipéptidos y mezclas de tanto una proteína como un polipéptido. En una realización, la una o más proteínas comprende un peso molecular de alrededor de 5 kDa o mayor. En una realización, la mezcla comprende dos o más proteínas, dos o más polipéptidos, o una de sus mezclas.

En una realización, una proteína y/o polipéptido de la mezcla se desplaza de la fase estacionaria en una fracción en la que la proteína y/o polipéptido está sustancialmente enriquecido y/o en la que la proteína y/o polipéptido está sustancialmente separado de otros componentes de proteína y/o polipéptido. Esto es, en una realización, cuando una mezcla que contiene la proteína o polipéptido de interés se aplica a la fase estacionaria, cuando la proteína o polipéptido se desplaza de la fase estacionaria y se recoge en una o más fracciones, la proteína y/o polipéptido se obtiene en la fracción en una o ambas de una forma enriquecida, es decir, más concentrada, o se obtiene sustancialmente separada de otros componentes de proteína y/o polipéptido diferentes en la mezcla original. De este modo, claramente la mezcla puede incluir dos o más componentes para ser separados. Como se discute a continuación, en algunas realizaciones, la mezcla sometida a cromatografía de desplazamiento según la presente invención puede incluir una combinación de muchos materiales diferentes de una variedad de fuentes diferentes, y el procedimiento de la presente invención se puede aplicar útilmente a tales mezclas complejas para separar sus distintos componentes.

En otra realización, la presente invención es aplicable a una mezcla que contiene por lo menos un componente (tal como una proteína, polipéptido u otro, como se define a continuación) y por lo menos una impureza. En esta realización, el procedimiento de la presente invención se puede usar para purificar el componente de impurezas. Tal retirada de impurezas puede ser (1) por inmovilización o retención en la fase estacionaria después de que el componente buscado o deseado ha sido desplazado (por ejemplo, cuando la fase estacionaria actúa como un filtro), o (2) siendo separado por lavado o eluido de la fase estacionaria, cuando la impureza se retira por un medio más similar a la cromatografía de elución "tradicional". En esta realización, cuando la impureza ha sido inmovilizada o retirada de la columna, el componente deseado se puede retirar entonces de la columna por cromatografía de desplazamiento como se describe aquí.

La presente invención es aplicable a una amplia variedad de componentes, que incluyen no solo las anteriormente mencionadas proteínas, polipéptidos, e impurezas, sino muchos otros componentes. En una realización, la mezcla puede incluir uno o más anticuerpos naturales o recombinantes o una mezcla de cualquiera de dos o más de tales anticuerpos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más enzimas naturales o recombinantes o una mezcla de cualquier dos o más de tales enzimas. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos naturales o recombinantes para uso diagnóstico, o una mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas o polipéptidos naturales o recombinantes para uso terapéutico humano o veterinario, o una mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más plasmas de sangre humana o animal naturales o recombinantes o una mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más materiales de plantas naturales o recombinantes, o mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de una o más leches humanas o animales o leche derivada de un animal recombinante, o mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas o polipéptidos derivados de un huevo aviar natural o recombinante, o mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de una o más bacterias, levaduras, hongos, virus o insectos naturales o recombinantes, o mezcla de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una

realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más cultivos celulares de mamífero o tejidos animales naturales o recombinantes, o mezclas de cualquier dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización la mezcla puede incluir uno o más compuestos orgánicos, fármacos o intermedios de fármacos, o mezclas de cualquier dos o más de ellos. En una realización, uno o más del uno o más compuesto orgánico, fármaco o intermedio de fármaco es quiral. En una realización, la mezcla puede comprender una mezcla o combinación de cualquiera de los precedentes, tales como una mezcla de un anticuerpo y una enzima, o una mezcla de proteínas y/o polipéptidos obtenidos de material de plantas y un huevo aviar, o cualquier mezcla de cualquiera de los componentes ejemplares precedentes a los que puede ser aplicable el procedimiento de la presente invención.

En una realización, el procedimiento de la presente invención incluye adicionalmente una etapa de detectar el compuesto de desplazamiento cuando emerge de la fase estacionaria, en el que la detección se realiza por una o más de espectroscopía de absorción UV/Visible, espectroscopia de fluorescencia de emisión, espectrometría de masas, pH, conductividad y uno o más métodos electroquímicos. Los precedentes son los métodos más comúnmente aplicables para detectar los compuestos desplazantes; se pueden usar otros métodos apropiados como se sabe en la técnica. Tal detección puede ser de uno o más substituyentes "Y" como se discutió anteriormente.

En una realización, el método usado para detectar el(los) componente(s) que está(n) siendo desplazado(s) de la fase estacionaria se puede determinar apropiadamente basado en el componente específico buscado. De este modo, por ejemplo, las proteínas y polipéptidos se pueden determinar basado en sus espectros de absorción UV/Visible o longitudes de onda de absorción característica, o derivándolas con un agente visualizante. Similarmente, se pueden determinar fármacos o intermedios de fármacos basado en sus espectros de absorción UV/Visible o longitudes de onda de absorción característica.

En una realización, el procedimiento de la presente invención incluye adicionalmente una o más etapas de regenerar la fase estacionaria. En una realización, la regeneración puede incluir, por ejemplo, tratar la fase estacionaria con una disolución de uno o más de un hidróxido de metal alcalino, una sal de metal alcalino, un hidróxido alcalinotérreo, una sal alcalinotérrica, un ácido orgánico, un ácido alquilsulfónico, un hidróxido de amonio cuaternario, una sal de amonio cuaternario, una alquilamina, en las que la disolución puede comprender adicionalmente un tampón de pH apropiado. Se pueden añadir otras etapas regenerantes apropiadas, incluyendo lavado simple con agua purificada, según sea necesario y según sea apropiado. En una realización, la regeneración incluye el uso de un co-disolvente orgánico junto con agua.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para una o más de detección, recogida o cuantificación de componentes traza en la muestra sometida a cromatografía de desplazamiento. Aunque el procedimiento de la presente invención se puede usar generalmente como método de purificación preparativa como se describe en realizaciones previas, la cromatografía de desplazamiento es también una potente técnica de preparación de muestras que permite la fácil detección, recogida y cuantificación de componentes traza en la muestra. Los componentes de la muestra cuya concentración es insuficiente para saturar la capacidad de la resina cromatográfica en cualquier punto puede que no participen en el tren de desplazamiento sino que en su lugar pueden ser arrastrados en las estrechas zonas de transición entre los componentes principales en la muestra y entre el último componente principal y el desplazante. Esto se muestra claramente en la Figura 2 con las zonas de transición etiquetadas A, B y C. Aunque, sin estar vinculados a la teoría, parece que estos componentes traza puede que no participen totalmente en el procedimiento de cromatografía de desplazamiento. En cualquier caso, los componentes traza salen de la columna y así pueden ser detectados, recogidos y/o cuantificados.

El aislamiento de las fracciones que corresponden a estas zonas de transición proporciona muestras que están significativamente enriquecidas (10-400X) en los componentes traza y significativamente empobrecidas en componente(s) principal(es). Esta combinación permite la identificación y cuantificación mucho más fácil de los componentes e impurezas minoritarias comparado con la muestra original. El análisis de estas muestras enriquecidas se puede realizar por cualquier método apropiado, que incluye la cromatografía de elución sobre la misma resina que se usa para la cromatografía de desplazamiento. Alternativamente, si se recogen cantidades suficientes de los componentes traza, estos componentes se pueden someter a cromatografía de desplazamiento. Esta realización es útil en análisis de producto final, descubrimiento de biomarcadores, control de procesos y optimización de procesos. Tal como se usa aquí, la expresión "componentes traza" se refiere a componentes relativamente minoritarios presentes en la mezcla sometida a cromatografía de desplazamiento, y cada uno de tales componentes traza puede constituir de alrededor de 0,01% en peso a alrededor de 10% en peso de la mezcla inicialmente sometida al procedimiento de cromatografía de desplazamiento de la presente invención.

En los siguientes ejemplos, se proporcionan procedimientos sintéticos ejemplares por medio de los que se pueden sintetizar estos compuestos desplazantes catiónicos ejemplares. Otros compuestos desplazantes catiónicos apropiados dentro del alcance de la invención se pueden sintetizar por métodos conocidos y/o adaptados de los precedentes como se entenderá por los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el

inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y de este modo se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1 – Síntesis de un Tetraquat, DBQ:

5 1,3-Dicloro-2-propanol (DCP) se convierte en 1,3-bis(N,N-dimetilamino)-2-propanol ("BDAP") por reacción con dos equivalentes de dimetilamina, esencialmente como se describe por Perrine (J. Organic Chemistry, vol. 18, pp. 1137-1141 (1953)). A continuación el recién destilado BDAP (146 g, 1 mol) y aproximadamente 170 ml de agua se cargan en un matraz de fondo redondo con un condensador de reflujo. Se añade gota a gota durante un periodo de 3 horas una disolución acuosa de cloruro de N-(2-hidroxi-3-cloropropil)-N-bencil-N,N-dimetilamonio (905 g @ 59,8% de sólidos = 541 g = 2 moles). La disolución resultante se agita durante 11 horas a temperatura ambiente. La disolución se calienta a continuación a 50°C y se mantiene a esta temperatura durante 1 hora con agitación continua, después de lo cual se deja enfriar hasta temperatura ambiente. La disolución acuosa resultante de DBQ es apropiada para uso como compuesto desplazante en una fase estacionaria tal como un medio de intercambio catiónico. El DBQ sólido, también apropiado para uso como compuesto desplazante, se puede recuperar por retirada de agua por evaporación rotatoria, seguido de precipitación repetida en 2-propanol y retirada final de disolvente a alto vacío.

15 **Ejemplo 2 – Síntesis de un Triquat, DMTQ:**

Se usa una disolución acuosa de cloruro de glicidiltrimetilamonio (GMAC) (Aldrich, CAS # 3033-77-0) que se encontró por ensayo de titulación (método de yoduro de tetrabutilamonio/ácido perclórico) que contenía 72,9% de especies de epoxi activo. Una disolución de hidrocloreto de dimetilamina (408 g, 5 moles, Aldrich) en alrededor de 400 ml de agua se agita vigorosamente en un matraz de fondo redondo provisto de un condensador de reflujo. A esto se añaden 1040 g de la disolución de GMAC (= 758 g activos = 5 moles) gota a gota durante alrededor de 1 hora sin calentamiento o enfriamiento externo. Esta adición generalmente no provoca una exotermia apreciable. La disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora después de que la adición es completa. En este momento se comienza la adición gota a gota de otra porción igual de disolución de GMAC (5 moles). Esta adición provoca una fuerte exotermia, y la adición continua de disolución de GMAC finalmente llevará la disolución a reflujo. La velocidad de adición de esta segunda carga de GMAC se ajusta para mantener la exotermia bajo control. Cuando la adición es completa la disolución se agita mientras se deja enfriar. Cuando su temperatura llega a alrededor de 70°C (después de alrededor de 3 horas), se aplica calentamiento externo con una manta calefactora controlada por un controlador electrónico (J-Kem Electronics) en un punto de trabajo de 70°C. La disolución se mantiene a 70°C durante aproximadamente 24 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente la disolución de DMTQ es apropiada para su uso como un compuesto desplazante en una fase estacionaria apropiada tal como un medio de intercambio catiónico.

Ejemplo 3 – Síntesis de un Triquat, TBTQ-A:

Se prepara una disolución patrón de triamina-N-[3-(dimetilamino)propil]-N,N',N'-trimetil-1,3-propanodiamina, también conocida como POLYCAT@77, en 2-propanol y se seca agitando con CaH_2 durante varios días con N_2 seco. En un matraz de 250 ml, de fondo redondo y 3 bocas provisto de un termopar revestido con teflón y un tapón de caucho se cargan 107 ml de esta disolución filtrada, que contiene 12,5 g de POLYCAT@77 (0,66 moles) y una barra de agitación magnética. El matraz se inunda con nitrógeno y se sella a presión positiva de nitrógeno. Se añade bromuro de bencilo (35 g, 0,2 moles, Aldrich) durante aproximadamente 3 horas al matraz agitado por medio de una aguja de teflón con una velocidad constante por medio de una bomba de jeringa. Se advierte una exotermia suave, elevando la temperatura interna hasta alrededor de 30°C. Cuando la adición de cloruro de bencilo es completa, la disolución se calienta a 40-45°C durante 14 horas, se enfría hasta temperatura ambiente, se evapora hasta un aceite viscoso en un evaporador rotatorio, se recoge en metanol y se extrae con tres porciones de 60 ml de ciclohexano, se decolora con carbón, se filtra y evapora hasta sequedad para dar TBTQ-A en forma de un sólido blancuzco. Este material es apropiado para su uso como compuesto desplazante en una fase estacionaria apropiada tal como un medio de intercambio catiónico.

Ejemplo 4 – Síntesis de un Diquat, BTA:

Se cargan DCP (80 g, 0,6 moles) y trimetilamina acuosa al 40% (188 g @ 40% en peso = 75 g = 1,27 moles) a un matraz de 500 ml, de fondo redondo, provisto de un condensador de reflujo. Esta mezcla se calienta a 75°C y se mantiene a esta temperatura con agitación magnética vigorosa durante 48 horas. Al final de este tiempo, la disolución incolora transparente se deja enfriar hasta temperatura ambiente. El rendimiento de BTA es >98%. Al enfriar hasta temperatura ambiente la disolución de BTA es apropiada para su uso como compuesto desplazante en una fase estacionaria apropiada tal como un medio de intercambio catiónico.

Ejemplo 5 – Síntesis de un Diquat, DBD:

Se carga bromuro de bencilo (87 g, 0,5 moles, Aldrich), 100 ml de acetonitrilo (grado de HPLC, Fisher), y una barra de agitación magnética en un matraz de fondo redondo, de 500 ml y 3 bocas provisto de un termopar, que se sella a continuación con N_2 . Se pesa BDAP (35 g, 0,24 moles) destilado en un cilindro graduado, a continuación se carga en un embudo de adición de 60 ml y se lava con 20 ml de acetonitrilo seco. La adición gota a gota de la disolución de BDAP resultante se lleva a cabo durante 80 min. Se advierte inmediatamente una fuerte exotermia; la adición

continua elevó la temperatura de la disolución lentamente hasta alrededor de 45°C. Cuando la adición de disolución de BDAP es completa, se coloca en su sitio una manta de calentamiento y la disolución se calienta a 55°C durante 3 horas, a continuación a 70°C durante 15 horas. La disolución se enfría hasta temperatura ambiente, se transfiere a un matraz de recuperación y se evapora en rotavapor hasta un líquido viscoso. Este líquido se recoge en acetona/agua y se evapora de nuevo en un evaporador rotatorio, dando 122,7 g (rendimiento del 100%) de DBD en forma de un sólido marrón que es esencialmente puro por HPLC analítica. Este material es apropiado para su uso como compuesto desplazante en una fase estacionaria apropiada tal como un medio de intercambio catiónico.

Ejemplo 6 – Cromatografía de desplazamiento de una mezcla de proteínas

Materiales y equipo. El citocromo C bovino (Sigma, #c3131, p.m. 12.327) y el citocromo C equino (Sigma, #C7752, p.m. 12.384) se usan tal como se reciben. Por análisis de HPLC son de alrededor de 87% de pureza y alrededor de 86% de pureza, respectivamente, siendo el resto moléculas de citocromo dañadas o isoformas que absorben a 280 y 430 nm. Todos los demás productos químicos son de grado analítico de la ACS o mejores, y se usan tal como se reciben a menos que se advierta lo contrario. El disolvente tampón es agua destilada de grado HPLC. El tampón de carga/equilibrado contiene MOPSO (ácido 2-hidroxi-3-(N-morfolino)propanosulfónico) 25 mM, ajustado a pH=7,0 con NaOH. Se preparan disoluciones del desplazante diluyendo una disolución patrón concentrada con tampón de carga hasta la concentración deseada. Todas las disoluciones tampón se purgan con helio y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm antes del uso. Los experimentos de desplazamiento se realizan usando un sistema HPLC Knauer (bomba modelo K-1001, detector UV modelo K-2600, desgasificador de 4 canales, y organizador de disolvente). Los análisis de las fracciones se realizan usando un sistema HPLC de Waters (bomba y controlador modelo 600, PAD modelo 996, y automuestreador modelo 717 plus con bandeja de muestras refrigerada).

Preparación de la columna. La fase estacionaria, una resina de intercambio catiónico, Tosoh SP-5PW, cargada en una columna de 6,0x150 mm, se limpia y regenera usando el Método C (a continuación) y se almacenada a continuación en la forma sódica en el tampón de carga/equilibrado. La salida de la columna se pasa a través de una celda de flujo con detector de UV/Vis monitorizado a 264 nm, una celda de flujo con detector de conductividad y una celda de flujo con detector de pH. La columna se equilibra con tampón de carga a un caudal de 0,17 ml/min. Una vez de las tres señales (absorbancia UV, conductividad, pH) forman unas líneas base estables (alrededor de 25 min, 1 CV(volumen de la columna)) se inicia inmediatamente el experimento de desplazamiento. Se evita el excesivo tiempo de equilibrado para no convertir la parte superior de la columna de la forma de sodio a la forma de hidrógeno.

Experimentos de penetración. Usando disoluciones 4 mM de citocromo C bovino en el tampón de carga y el citocromo C equino en el tampón de carga, se realizan experimentos de penetración a varios caudales entre 0,1-0,5 ml/min. De estos experimentos, se encuentra que se pueden obtener datos satisfactorios y reproducibles a 0,17 ml/min. Se encuentra que la capacidad de saturación de la columna es 148 mg (34,7 mg/ml de matriz) para citocromo C bovino, y 150 mg (35,2 mg/ml de matriz) para citocromo C equino.

Experimento de desplazamiento. Se preparan disoluciones de citocromo C bovino (4,12 ml/ml, Sigma #3131, p.m.=12.327) y citocromo C equino (4,10 mg/ml, Sigma #7752, p.m.=12.384) en el tampón de carga. Las concentraciones de proteína se determinan usando los ensayos de BCA-Copper y Bradford. Se mezclan volúmenes iguales de las dos disoluciones de citocromo, se cargan en un bucle de muestra de 20 µl y a continuación se bombean sobre la columna de intercambio catiónico limpia y adecuadamente equilibrada con un caudal constante de 0,17 ml/min durante 120 minutos. El bucle se desconecta del camino de la entrada de flujo, y el tampón de carga se bombea a través de la columna durante 25 minutos a 0,17 ml/min. Finalmente, una disolución de desplazante DBQ 4,0 mM en el tampón de carga se bombea en la columna a 0,17 ml/min, y la salida de la columna se hace pasar a través de una celda de flujo con detector de UV/Vis (celda de flujo de 10 µl, monitorizado a 264, 280, 430 nm) hasta un colector de fracciones. La salida del detector de UV/Vis como función del tiempo se reproduce en la Figura 1.

No se detecta material proteínico en el efluente de la columna durante aproximadamente 70 minutos después de que la disolución de desplazante comienza a fluir dentro de la columna, de modo que no se recogen fracciones durante este tiempo. La fracción 1 se recoge alrededor de 70 minutos después de que comienza el flujo de desplazante, y la fracciones subsiguientes se recogen a intervalos de 1 minuto. Las celdas de flujo con detector de conductividad y pH (véase anteriormente) están usualmente en el camino de salida detrás del detector de UV/Vis para monitorizar la evolución del experimento de desplazamiento; sin embargo, cuando se recogen fracciones, estas dos celdas se desconectan del camino de flujo para no ensanchar la transición entre picos de desplazamiento. Se recogen un total de 108 fracciones. Una vez recogidas, las fracciones se sellan y refrigeran para el subsecuente análisis de HPLC. El experimento de desplazamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, 22°C.

Análisis de HPLC de las fracciones del experimento de desplazamiento. Todas las 108 fracciones recogidas en el experimento de desplazamiento se someten a análisis por HPLC para determinar el contenido de cada una. Las condiciones de este análisis son:

Columna: Acero inoxidable, 4,6 (D.I.) x 200 mm, matriz basada en sílice de intercambio catiónico fuerte polySULFOETHYL A, 5 µm de tamaño de partícula, 300 angstrom de tamaño de poro, fabricada por PolyLC (Columbia, MD).

Disolvente tampón:	Agua destilada de grado HPLC
Tampones de elución:	A- NaH ₂ PO ₄ 25 mM, pH=6,8 con NaOH B – NaCl 500 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM, pH=6,8 con NaOH

Los tampones de elución se filtraron a través de filtros de 0,2 µm para retirar partículas.

5	Caudal:	Constante a 1,0 ml/min
	Método de gradiente:	0-2 min 100% A, isocrático 2-62 min de 100% A a 100% B, lineal 62-72 min 100% B, isocrático

10	Detector UV:	264 nm-DBQ+ proteínas totales, 280 nm- proteínas totales, 430 nm- solo proteínas citocromo
----	---------------------	--

Preparación de la muestra: Se mezclan 30 µl de la muestra de la fracción y 30 µl de 1,4-ditiotreitol (DTT) 10 mM recién preparado. Se inyectan 50 µl de esta mezcla en la columna.

15 Las concentraciones de los componentes en cada fracción se determinan por integración de los picos de HPLC analítico. Los resultados se recopilan en el histograma mostrado gráficamente en la Figura 2. Las fracciones puras se mezclan para obtener los datos recopilados en la Tabla 1. La recuperación de proteína total de la columna es 98%.

TABLA 1. Resultados de cromatografía de desplazamiento usando desplazante DBQ

Proteína purificada	Citocromo C bovino	Citocromo C equino
Mezcla de muestras	20-39	55+95 (temprana+posterior)
Pureza por HPLC	>99,9%	>99,9%
Recuperación	63,4%	78,3%
DBQ* medido	ND (<6 ppm)	ND (<6 ppm)
DBQ* estimado	<0,5 ppm	2,5 ppm

ND = no detectado, * antes de diálisis.

Ejemplo 7 – Cromatografía de desplazamiento de una mezcla de proteínas

20 **Materiales y equipo.** El Citocromo C bovino (Sigma, #C3131, análisis aproximado = 89%) y el α-Quimotripsinógeno A (Sigma, #C4879, análisis aproximado = 65%) se usan tal como se reciben. Todos los demás productos químicos son de grado analítico de la ACS o mejores, y se usan tal como se reciben a menos que se advierta lo contrario. El disolvente tampón es agua destilada de grado HPLC. El tampón de carga/equilibrado contiene MOPSO 25 mM (ácido 2-hidroxi-3-(N-morfolino)propanosulfónico), ajustado a pH=7,0 con NaOH. Se preparan disoluciones del desplazante diluyendo una disolución patrón concentrada con tampón de carga hasta la concentración deseada. 25 Todas las disoluciones tampón se purgan con helio y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm antes del uso. Los experimentos de desplazamiento se realizan usando un sistema HPLC de Knauer (bomba modelo K-1001, detector UV modelo K-2600, desgasificador de 4 canales, y organizador de disolvente). Los análisis de las fracciones se realizan usando un sistema HPLC de Waters (bomba y controlador modelo 600, PAD modelo 996, y 30 automuestreador modelo 717 plus con bandeja de muestras refrigerada).

Preparación de la columna. La columna (Amersham Mono S, 5,0x200 mm) se limpia y regenera usando el Método C (a continuación) y se almacena después como la forma sódica en un tampón de cloruro de sodio, NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH=7,0 con NaOH. La salida de la columna se pasa a través de una celda de flujo con detector de UV/Vis monitorizado a 264 nm, una celda de flujo con detector de conductividad y una celda de flujo con detector de pH. La columna se equilibra con un tampón de carga (véase anteriormente) a un caudal de 0,20 ml/min. Una vez de las tres señales (absorbancia UV, conductividad, pH) forman líneas base estables (alrededor de 25 min, 1 CV) se inicia inmediatamente el experimento de desplazamiento. Se evita el excesivo tiempo de equilibrado para no convertir la parte superior de la columna de la forma de sodio a la forma de hidrógeno. 35

Experimentos de penetración. Usando disoluciones de 4 mg/ml de citocromo C bovino en el tampón de carga y de α -quimotripsinógeno A bovino en el tampón de carga, se realizan experimentos de penetración a varios caudales entre 0,1-0,5 ml/min. El tampón de carga se prepara de MOPSO 25 mM (ácido 2-hidroxi-3-(N-morfolino)propanosulfónico) y se ajusta a pH=7,0 con NaOH. Se obtienen buenos datos reproducibles a 0,20 ml/min. Se encuentra que la capacidad de saturación de la columna es alrededor de 198 mg (50,4 mg/ml de matriz) para citocromo C bovino, y alrededor de 376 mg (95,7 mg/ml de matriz) para quimotripsinógeno. En estos experimentos, las proteínas sin purificar se usan tal como salen del envase.

Experimento de desplazamiento. Se preparan disoluciones de citocromo C bovino (5,04 mg/ml, Sigma #C3131) y α -quimotripsinógeno A bovino (9,96 mg/ml, Sigma #C4879) en el tampón de carga (véase anteriormente). Las concentraciones de proteína se determinan usando los ensayos de BCA-Copper y Bradford. Se mezclan volúmenes iguales de las dos disoluciones de citocromo, se cargan en un bucle de muestra de 20 μ l y a continuación se bombean a la columna de intercambio catiónico limpia y adecuadamente equilibrada (véase anteriormente) con un caudal constante de 0,40 ml/min durante 60 minutos. El bucle se desconecta del camino de la entrada de flujo, y el tampón de carga se bombea a través de la columna durante 20 minutos a 0,20 ml/min. Finalmente, una disolución de desplazante DBQ 4,0 mM en el tampón de carga se bombea a la columna a 0,20 ml/min, y la salida de la columna se hace pasar a través de una celda de flujo con detector de UV/Vis (celda de flujo de 10 μ l, monitorizado a 264, 280 nm) hasta un colector de fracciones. Las fracciones se recogen cada 1,00 min. Las celdas de flujo con detector de conductividad y pH (véase anteriormente) están usualmente en el camino de salida detrás del detector de UV/Vis para monitorizar la evolución del experimento de desplazamiento; sin embargo, cuando se recogen fracciones, estas dos celdas se desconectan del camino de flujo para no ensanchar la transición entre picos de desplazamiento. Una vez recogidas, las fracciones se sellan y refrigeran para el subsecuente análisis por HPLC. El trazo del desplazamiento se muestra en la Figura 3.

Análisis por HPLC de proteínas. Los detalles del análisis de la fracción por HPLC se dan a continuación.

Columna: Acero inoxidable, 4,6x200 mm de dimensiones internas, fabricada por PolyLC (Columbia, MD), matriz basada en sílice de intercambio catiónico fuerte polySULFOETHYL A, 5 μ m de tamaño de partícula, 300 angstrom de tamaño de poro.

Disolvente tampón: Agua destilada de grado HPLC

Tampones de elución: A- NaH_2PO_4 25 mM, pH=6,8 con NaOH

B – NaCl 0,5 M + NaH_2PO_4 25 mM, pH=6,8 con NaOH

Los tampones de elución se filtran a través de filtros de 0,2 μ m para retirar partículas.

Caudal: El caudal constante era de 1,0 ml/min

Método de gradiente:

0-2 min	100% A, isocrático
2-62 min	100% A a 100% B, gradiente lineal
62-72 min	100% B, isocrático

Longitudes de onda del Detector UV: 264 nm -DBQ+ proteínas,
280 nm - proteínas, 430 nm - citocromo

Preparación de la muestra: Se inyectan 50 μ l de la mezcla de muestra en la columna.

Todas las 125 muestras recogidas se analizan por el método descrito anteriormente, y los datos combinados de 264 nm, 280 nm y 430 nm se muestran en la Figura 4 y la tabla a continuación. La recuperación de proteína de la columna es casi cuantitativa (>97%).

TABLA 2

Proteína purificada	Citocromo C bovino	Citocromo C equino
Mezcla de muestras	30-50	63+69, 80-93
Pureza de HPLC	>99,9%	>99,9%
Recuperación	43,6 mg	23,6 mg
	66% del pico principal	52% del pico principal
	44% de proteína total	52% de proteína total

DBQ* medido	ND (<6 ppm)	ND (<6 ppm)
DBQ* estimado	<0,5 ppm	<0,5 ppm

ND = no detectado, * antes de diálisis.

Procedimientos de limpieza y regeneración de la columna

5 Se puede usar uno o más de los siguientes métodos para limpiar y/o regenerar las columnas de intercambio catiónico usadas en procedimientos de desplazamiento con compuestos desplazantes tales como DBQ. La "eficiencia de regeneración" se expresa como porcentaje de la capacidad de penetración de la columna original que se recupera después de la finalización del procedimiento. En cada método, las etapas se realizan en el orden listado y el caudal es aproximadamente 0,64 ml/min.

Método A: Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 98%)

KCl 2,0 M + KOH 0,1 M	180 min	27 CV*
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
Ácido acético glacial al 15%	27 min	4 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

*CV = volumen de columna

Método B: Regeneración solo (eficiencia de regeneración 95%)

KCl 2,0 M + KH ₂ PO ₄ , pH=6,5	200 min	30 CV*
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

*Se puede requerir entre 100 CV y 150 CV (regeneración durante la noche) para obtener el 100% de eficiencia de regeneración.

Método C: Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 100%)

KCl 2,0 M + KOH 0,1 M	80 min	12 CV*
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
BaCl ₂ 1,5 M	20 min	3 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
Ácido acético al 15% + 18-corona-6 25 mM	27 min	4 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

10 **Método D:** Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 100%)

KCl 2,0 M + KOH 0,1 M	80 min	12 CV*
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
CaCl ₂ 1,5 M	27 min	4 CV
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
Na ₂ H ₂ EDTA 0,1 M, pH=8,0 con NaOH	20 min	3 CV

MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
Ácido acético glacial al 15%	27 min	4 CV
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

Método E: Regeneración solo (eficiencia de regeneración 100%)

KCl 2,1 M	80 min	12 CV*
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
CaCl ₂ 1,5 M	27 min	4 CV
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
Na ₂ H ₂ EDTA 0,1 M, pH=8,0 con NaOH	20 min	3 CV
MOPS 0,1 M, pH=7,2 con NaOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

*Se puede usar en esta etapa K₃-citrato 0,1 M, pH=7,0

Método F: Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 100%)

KCl 2,0 M + KOH 0,1 M	80 min	12 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
BDAP* 2,0 M + ácido acético 50 mM, pH=4,6 con HCl	34 min	4 CV
KH ₂ PO ₄ 1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
KCl 2,0 M + KOH 0,1 M	20 min	3 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con NaOH	20 min	3 CV
Ácido acético glacial al 15%	27 min	4 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

*BDAP es 1,3-bis(dimetilamino)-2-hidroxiopropano. Además de BDAP, las siguientes aminas pueden ser substituidas según se necesite, basado en consideraciones de coste y/o disponibilidad: 1,3-diamino-2-hidroxiopropano; 1,3-bis(dimetilamino)propano; bis(3-aminopropil)amina; [bis(3-(dimetilamino)propil)]aminometano; 1-[bis(3-(dimetilamino)propil)]amino-2-hidroxiopropano; y 1,3-diaminopropano.

Método G: Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 100%)

[(Me ₃ NCH ₂) ₂ CHOH]Cl ₂ 2,0 M + [Me ₄ N]OH 0,1 M	80 min	12 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
BaCl ₂ 1,5 M	20 min	3 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
Ácido acético al 15% + 18-corona-6 25 mM	27 min	4 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

Método H: Regeneración solo (eficiencia de regeneración 99%)

[(Me ₃ NCH ₂) ₂ CHOH]Cl ₂ 2,0 M + H ₃ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con [Me ₄ N]OH	160 min	24 CV
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

Método I: Regeneración solo (eficiencia de regeneración 99%)

KBr 2,0 M + KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	180 min	27 CV
Disolvente = agua/acetonitrilo 80/20 v/v		
KH ₂ PO ₄ 0,1 M, pH=6,5 con KOH	20 min	3 CV
NaCl 2,0 M + MOPSO 25 mM, pH= 7,0	34 min	5 CV

Todas las composiciones y procedimientos descritos y reivindicados aquí pueden ser realizados y ejecutados por aquellos de experiencia media en la técnica sin excesiva experimentación a la luz de la presente descripción y basado en el conocimiento de tales personas.

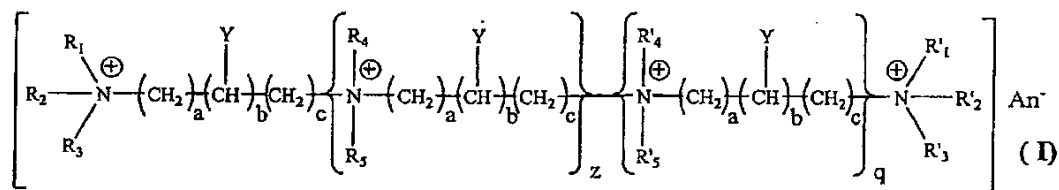
5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cromatografía de desplazamiento, que comprende:

5 cargar en una fase estacionaria apropiada una mezcla que comprende uno o más componentes que se van a separar;

desplazar por lo menos uno, del uno o más componentes de la fase estacionaria aplicando a la fase estacionaria una mezcla que comprende un compuesto desplazante que tiene la fórmula general (I):



en la que:

10 cada grupo R_1 , R_2 , R_3 , R'_1 , R'_2 , y R'_3 , independientemente se puede seleccionar de alquilo, arilo, y aralquilo, y en el que se puede formar un anillo que contiene uno o más nitrógenos cuaternarios con uno o más de R_1 y R_2 , R_1 y R'_1 , R_1 y R_4 , R_4 y R'_4 , o R_4 y R_5 ;

cada R_4 , R'_4 , R_5 y R'_5 independientemente se puede seleccionar de alquilo, arilo, aralquilo y $-(CH_2)_a-(CHY)_b-(CH_2)_c-N^{\oplus}R_1R_2R_3An^-$, en la que R_1 , R_2 y R_3 son como se define anteriormente;

15 cada Y independientemente se puede seleccionar de $-H$, $-OH$, $-OR_6$, halo, alquilo, arilo y aralquilo, en la que $-R_6$ puede ser alquilo o $-(CH_2)_a-(CHOH)_b-(CH_2)_c-N^{\oplus}R_1R_2R_3An^-$, en la que R_1 , R_2 y R_3 son como se define anteriormente, y uno o más Y puede ser un grupo detectable por uno o más métodos electromagnéticos;

cada q y z independientemente puede ser cualquier número entero de 0 a 6, con la condición de que $q+z$ sea igual o menor de 6;

20 cada a , b y c independientemente puede ser cualquier número entero de 0 a 2, con la condición de que la suma de $a+b+c$ en cualquier fragmento sea por lo menos 1; y

cada An^- independientemente puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos según sea necesario para obtener un compuesto neutro.

25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fase estacionaria es un material de intercambio catiónico.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el uno o más componentes comprenden uno o más polipéptidos, una o más proteínas o una mezcla de dos o más cualquiera de ellos.

30 4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que una proteína y/o polipéptido de la mezcla es desplazado de la fase estacionaria en una fracción en la que la proteína y/o polipéptido se enriquece y/o en la que la proteína y/o polipéptido se separa de otros componentes de proteína y/o polipéptido.

5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la mezcla comprende por lo menos dos componentes que se van a separar o la mezcla comprende por lo menos un componente y por lo menos una impureza.

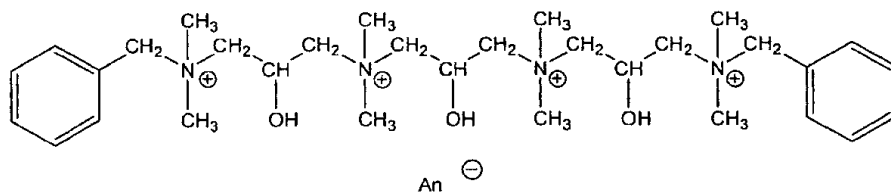
35 6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente detectar el compuesto desplazante según emerge de la fase estacionaria, en el que la detección es por uno o más de, espectroscopía de absorción UV/Visible, espectroscopía de emisión fluorescente, espectrometría de masas, pH, conductividad y uno o más métodos electroquímicos.

7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que comprende adicionalmente regenerar la fase estacionaria.

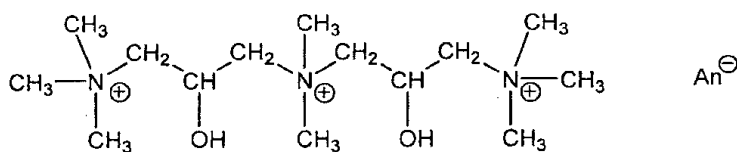
40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la regeneración comprende tratar la fase estacionaria con una disolución de uno o más de, un hidróxido de metal alcalino, una sal de metal alcalino, un hidróxido alcalinotérreo, una sal alcalinotérrica, un ácido orgánico, un ácido alquilsulfónico, un hidróxido de amonio cuaternario, una sal de amonio cuaternario, una alquilamina, en el que la disolución puede comprender adicionalmente un

tampón de pH apropiado o la regeneración comprende tratar la fase estacionaria con una disolución que comprende agua y un co-disolvente orgánico.

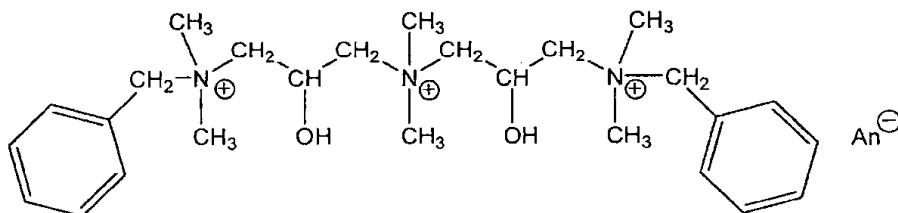
9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que: el compuesto desplazante es DBQ, que tiene una estructura:



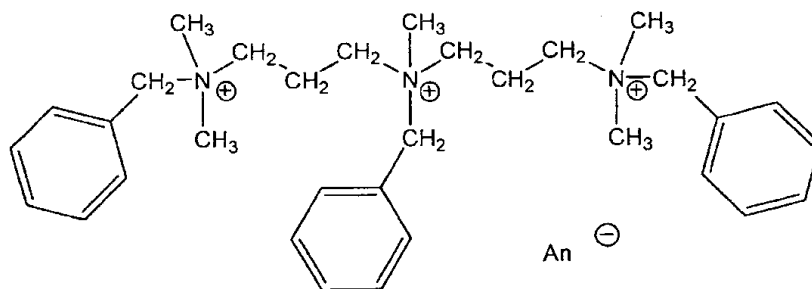
o el compuesto desplazante es DMTQ, que tiene una estructura:



o el compuesto desplazante es DBTQ, que tiene una estructura:

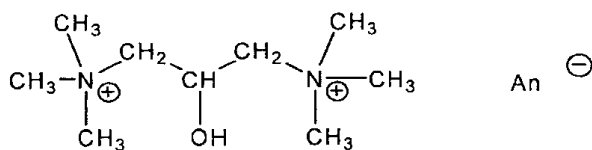


o el compuesto desplazante es TBTQ-A, que tiene una estructura:

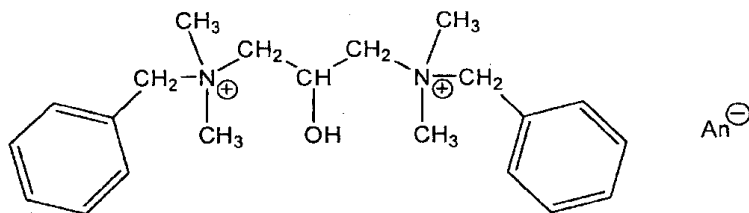


5

o el compuesto desplazante es BTA, que tiene una estructura:

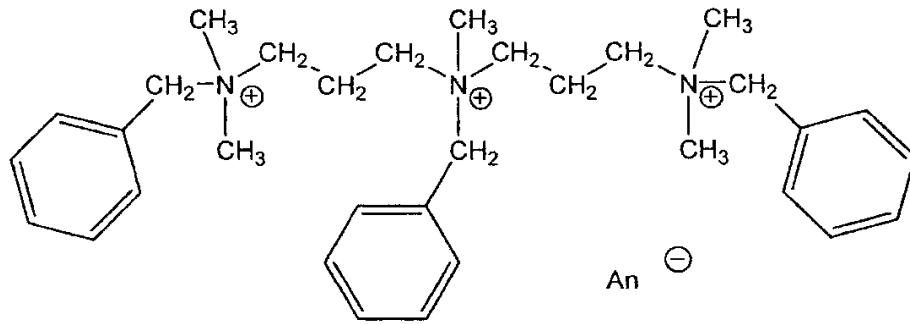


o el compuesto desplazante es DBD, que tiene una estructura

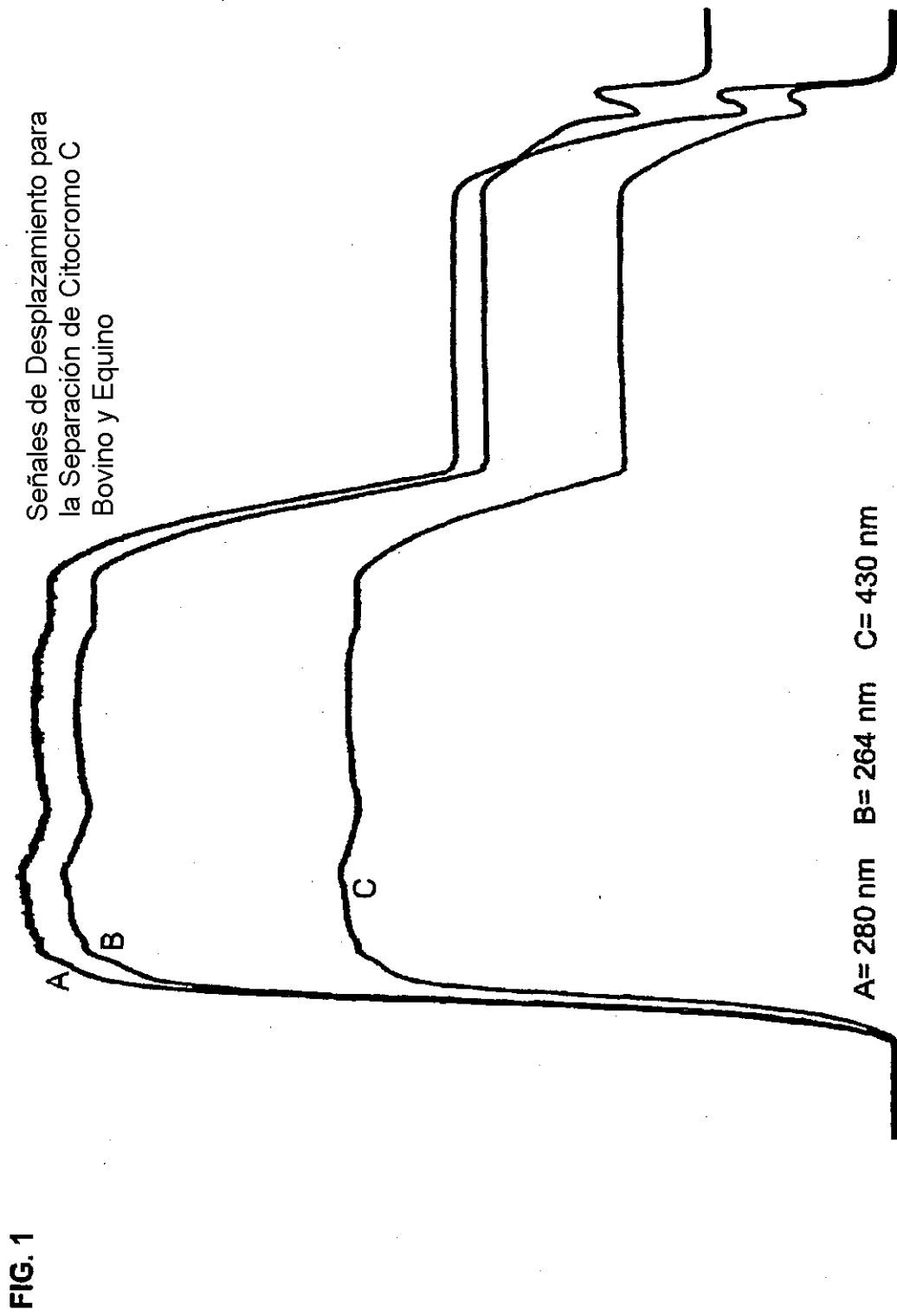


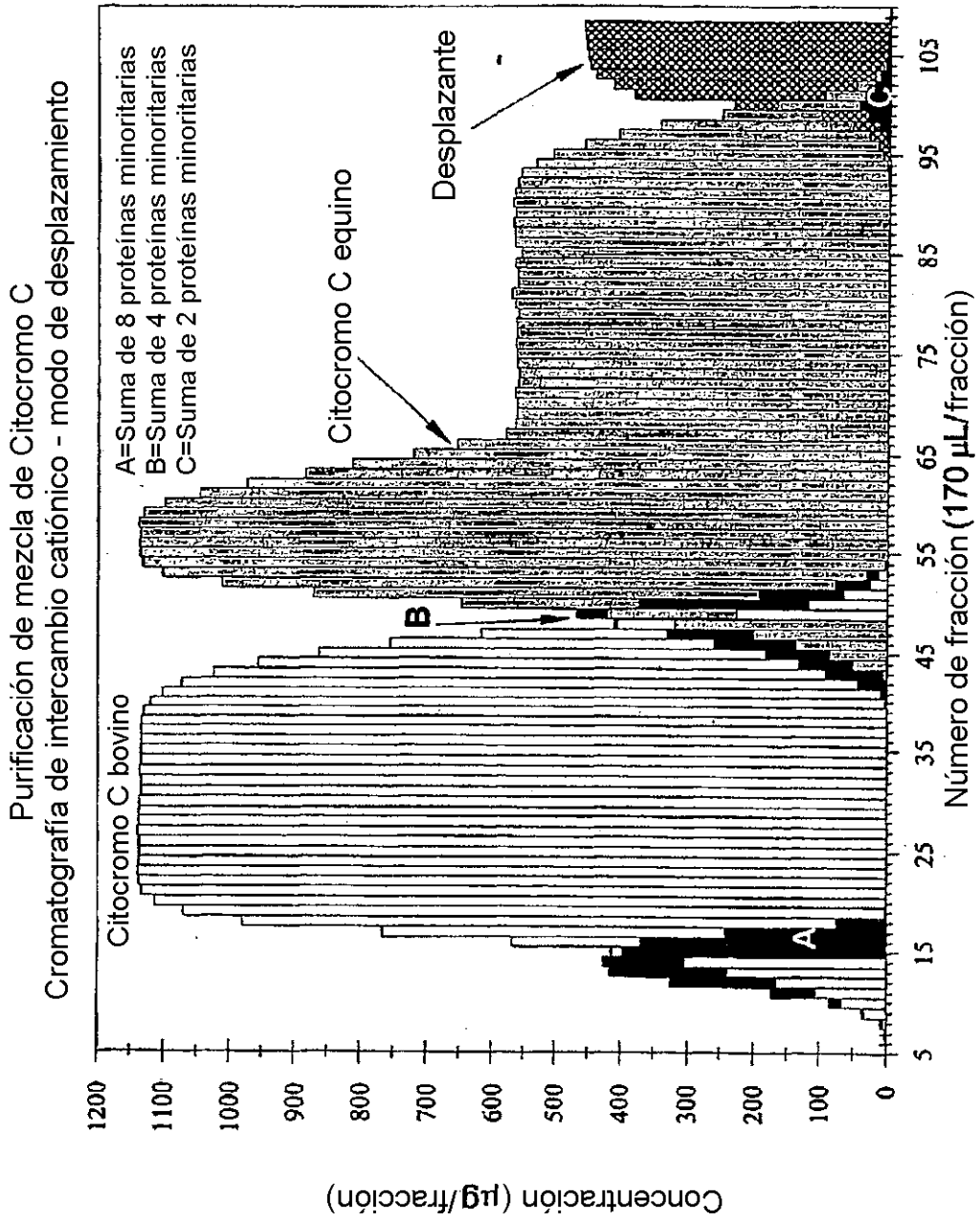
en los que cada An^- independientemente puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos según sea necesario para obtener un compuesto neutro.

10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la mezcla comprende:
- 5 uno o más anticuerpos naturales o recombinantes o una mezcla de dos o más cualquiera de tales anticuerpos; o una o más enzimas naturales o recombinantes o una mezcla de dos o más cualquiera de tales enzimas; o una o más proteínas y/o polipéptidos naturales o recombinantes para uso en diagnóstico, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o
- 10 una o más proteínas o polipéptidos naturales o recombinantes para uso terapéutico humano o veterinario, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más plasmas de sangre humana o animal natural o recombinante o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más materiales vegetales naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o
- 15 una o más proteínas o polipéptidos derivados de una o más leches humanas o animales o leche derivada de un animal recombinante, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más huevos aviares naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o
- 20 una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más bacterias, levaduras, hongos, virus o insectos naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más cultivos celulares o tejidos animales de mamíferos naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o uno o más compuestos orgánicos, fármacos o intermedios de fármacos, o una mezcla de dos o más cualquiera de ellos.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que uno o más de los uno o más compuestos orgánicos, fármacos o intermedios de fármacos es quirál.
12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la mezcla comprende uno o más componentes traza, y el procedimiento comprende adicionalmente una o más de detección, recogida o cuantificación de los componentes traza en la mezcla.
- 30 13. Una composición desplazante útil en cromatografía de desplazamiento, que comprende, en una disolución acuosa apropiada, un compuesto que tiene la estructura:



en la An⁻ independientemente puede ser uno o más aniones monovalentes o polivalentes, orgánicos o inorgánicos según se necesite para obtener un compuesto neutro.





Señales de desplazamiento para la separación de
a-Quimotripsinógeno A y Citocromo C

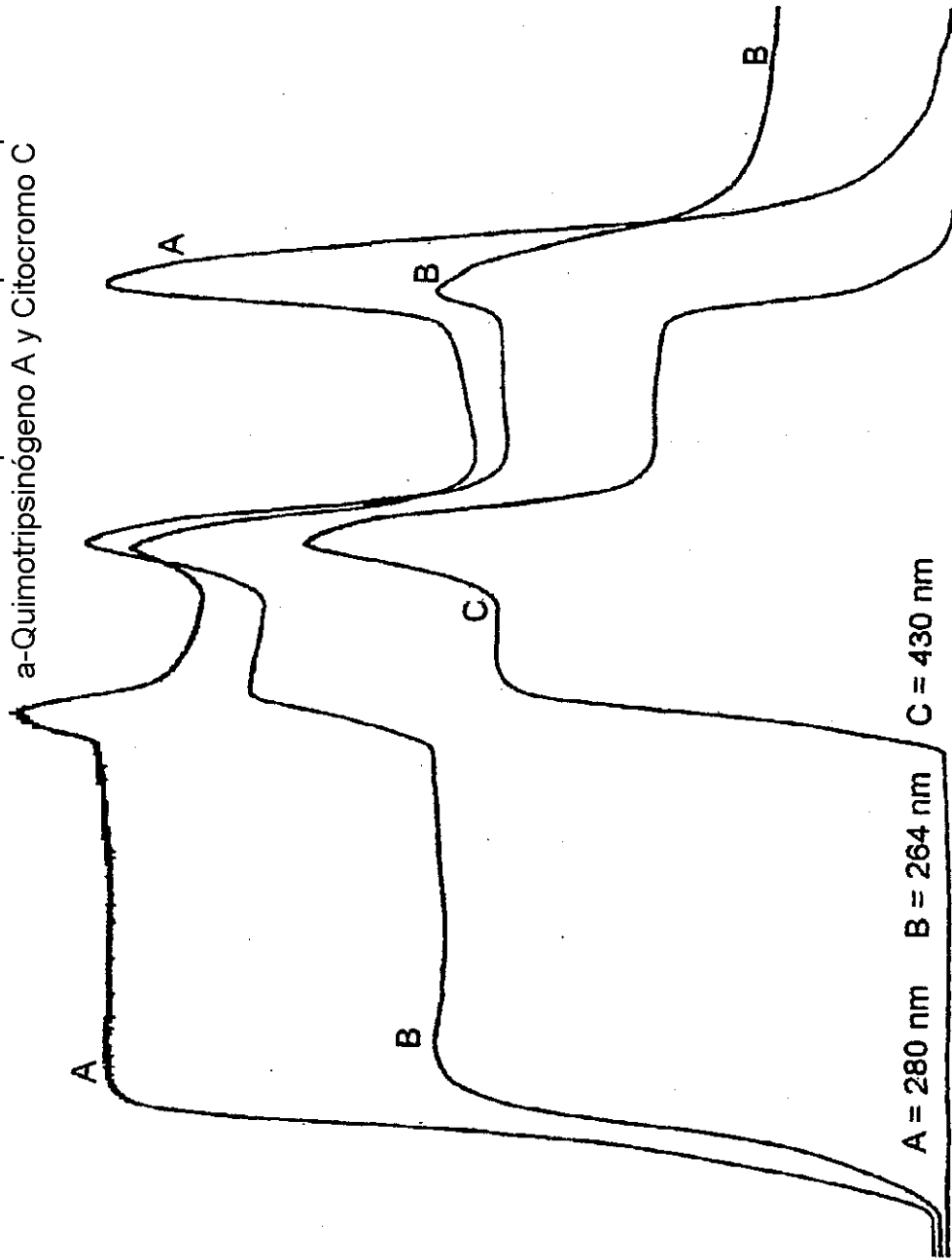


FIG. 3

