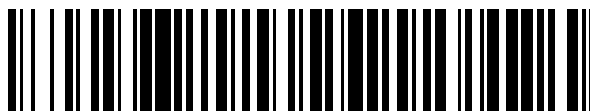


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 166**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/42** (2006.01)

**C07C 309/32** (2006.01)

**C07C 309/34** (2006.01)

**C07C 309/38** (2006.01)

**C07C 303/06** (2006.01)

**C07D 251/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 06844678 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1960078**

54 Título: **Procedimiento de cromatografía de desplazamiento de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

**02.12.2005 US 741863 P**

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

**14.04.2014**

73 Titular/es:

**SACHEM, INC. (100.0%)  
821 EAST WOODWARD  
AUSTIN, TEXAS 78704, US**

72 Inventor/es:

**LITTLE, CHARLES, B. y  
HAYMORE, BARRY, L.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 455 166 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 aniónico

**Campo Técnico**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para usar composiciones que comprenden sales múltiples de aniones orgánicos (aniones múltiples), como desplazadores en purificaciones cromatográficas por desplazamiento de intercambio aniónico.

**Fundamento**

10 El modo de desplazamiento de la cromatografía fue reconocido por vez primera en 1906 por Tswett, que observó que el desplazamiento de la muestra tenía lugar bajo condiciones de cromatografía de elución sobrecargada. En 1943, Tiselius propuso que el amplio tema de la cromatografía se podría organizar alrededor de tres "modos" distintos: modo frontal, modo de elución, y modo de desplazamiento. Desde entonces, la mayor parte de los desarrollos y aplicaciones, en particular los de la cromatografía analítica, han tenido lugar en el área de la cromatografía de elución. En realidad, el término "cromatografía" sin más cualificación suele referirse actualmente a la cromatografía en el modo de elución.

15 El modo de elución y el modo de desplazamiento son fáciles de distinguir tanto en la teoría como en la práctica. En la cromatografía de elución, se aplica una solución de la muestra a purificar a una fase estacionaria, por lo general en una columna. La fase móvil se elige de forma tal que la muestra ni se adsorbe irreversiblemente ni queda totalmente sin adsorber, sino que más bien se une de forma reversible. A medida que la fase móvil fluye sobre la fase estacionaria, se establece un equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria por el cual, dependiendo de la afinidad por la fase estacionaria, la muestra pasa a lo largo de la columna a una velocidad que refleja su afinidad en relación con otros componentes que pueden estar presentes en la muestra original. Es de un interés particular en la cromatografía de elución estándar el hecho de que el frente de disolvente eluyente, o volumen de columna cero en la elución isocrática, siempre precede a la muestra fuera 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 hace pasar una serie de eluyentes de composición variable sobre la fase estacionaria. En la cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, los cambios en etapa en la concentración salina de la fase móvil y/o el pH se emplean para eluir o desorber analitos sometidos a separación.

25 La cromatografía de desplazamiento emplea un compuesto desplazador para eliminar de la columna los componentes de una mezcla. El compuesto desplazador generalmente tiene una afinidad para la fase estacionaria mucho mayor que cualquiera de los componentes de la mezcla a separar. Esto contrasta con la cromatografía de elución, en el que el eluyente tiene una afinidad por la fase estacionaria más baja que los componentes que se han de separar. Una característica operativa clave que distingue la cromatografía de desplazamiento de la cromatografía de elución o de desorción es el uso de un compuesto desplazador. En la cromatografía de desplazamiento, la columna se equilibra primero con un disolvente portador en condiciones en las que los componentes a separar tienen todos ellos una afinidad relativamente alta para la fase estacionaria. Un volumen de mezcla de alimentación, que puede ser grande y bastante diluido, se carga en la columna y los componentes individuales de la mezcla de alimentación se adsorben a la fase estacionaria. Es decir, los componentes de la mezcla de alimentación se distribuyen y se adsorben en la fase estacionaria, y se mantienen allí. Si todos los componentes se han de resolver por desplazamiento, el disolvente portador emerge de la columna sin contener muestra. Los componentes de la mezcla de alimentación residen ahora en la fase estacionaria, y la posición de cada componente en la columna se correlaciona con su afinidad relativa para la fase estacionaria bajo las condiciones iniciales. En principio, una molécula de cualquier componente desplazará a una molécula de cualquier componente diferente que tiene una afinidad más baja en un sitio dado en la fase estacionaria. Como resultado, los componentes individuales se dispondrán finalmente en la columna en una secuencia de mayor a menor afinidad.

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

35 Una vez que la muestra se ha cargado en la columna, se introduce en la columna una solución que contiene un compuesto desplazador en un disolvente adecuado para hacerla pasar a través de la fase estacionaria. El compuesto desplazador se elige de manera que tenga una afinidad más alta por la fase estacionaria que cualquiera de los componentes de la mezcla de alimentación. Suponiendo que el desplazador y la fase móvil se han elegido de forma apropiada, los componentes individuales salen de la columna como zonas adyacentes de material relativamente puro altamente concentrado, por orden de afinidad de absorción creciente. Después de las zonas de los componentes individuales purificados, el desplazador emerge de la columna. Un cromatograma de desplazamiento se distingue fácilmente de un cromatograma de elución por el hecho de que el compuesto desplazador sigue a la muestra y que los componentes de la alimentación salen de la columna como zonas adyacentes de material relativamente puro de alta concentración.

La cromatografía de desplazamiento tiene algunas características particularmente ventajosas para la cromatografía a escala de proceso. En primer lugar, la cromatografía de desplazamiento puede lograr la separación del producto y la concentración en una sola etapa. A título comparativo, la cromatografía de elución isocrática tiene como resultado una dilución de producto significativa durante la separación. En segundo lugar, dado que el proceso de desplazamiento funciona en la región no lineal de la isoterma de equilibrio, son posibles cargas elevadas de la columna. Esto permite una utilización mucho mejor que la columna de cromatografía de elución. En tercer lugar, el desarrollo de la columna y la separación de los componentes requieren menos disolvente que un proceso de elución comparable. En cuarto lugar, la cromatografía de desplazamiento puede concentrar y purificar componentes de las mezclas que tienen factores de separación bajos, mientras que en la cromatografía de elución típica se requieren factores de separación relativamente grandes para una resolución satisfactoria.

Con todas estas ventajas, se podría suponer que la cromatografía de desplazamiento se utiliza ampliamente. Sin embargo, siguen existiendo problemas en la cromatografía de desplazamiento. Uno de tales problemas es la necesidad de regenerar la columna, ya que no sería económico desechar la fase estacionaria después de cada uso. Otro problema de estos es la obtención de compuestos desplazadores adecuados que sean compuestos relativamente simples, fáciles de sintetizar y/o disponibles en el mercado a un coste razonable (económico). Estos dos problemas han presentado inconvenientes significativos a la cromatografía de desplazamiento frente a la cromatografía de elución.

Con respecto a la regeneración, dado que el proceso de desplazamiento utiliza un compuesto desplazador que tiene una afinidad muy alta por la fase estacionaria, el tiempo que se necesita para regenerar y reequilibrar la columna puede ser largo en comparación con la cromatografía de elución. Además, a menudo se requieren cantidades de disolvente relativamente grandes durante la regeneración. Estos problemas han reducido efectivamente las ventajas de la cromatografía de desplazamiento sobre la cromatografía de elución.

El segundo problema, el de la obtención de compuestos desplazadores útiles que puedan ser sintetizados con relativa facilidad y/o que estén disponibles comercialmente a un coste razonable (económico), es debido a la necesidad de un compuesto desplazador que tenga una alta afinidad por la fase estacionaria pero que también pueda ser retirado de la columna durante la regeneración con relativa facilidad. Tales compuestos que han sido ofrecidos por la técnica anterior no cumplen con uno o con ninguno de estos dos importantes criterios. Varios compuestos han sido ofrecidos como desplazadores de bajo peso molecular, pero estos han sido muy difíciles de sintetizar y purificar, y no han estado comercialmente disponibles a un costo razonable, o simplemente no están disponibles comercialmente.

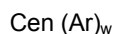
Para que la cromatografía de desplazamiento llegue a ser una técnica cromatográfica convencional, sigue existiendo una importante necesidad insatisfecha de desplazadores efectivos cuya síntesis y purificación sean sencillos y que sean susceptibles de ser producidos a gran escala, y/o que estén disponibles comercialmente, y que permitan la regeneración eficiente de la fase estacionaria de modo que la fase estacionaria pueda ser reutilizada posteriormente en los procesos de cromatografía de desplazamiento.

El documento WO 03/074148 describe un método para separar uno o más componentes de una mezcla de biomoléculas por medio de un sistema cromatográfico de intercambio iónico que funciona en el modo de desplazamiento que incluye profundir secuencialmente el sistema con una primera solución que incluye la mezcla de biomoléculas, y una segunda solución que incluye un desplazador que tiene un estructura elegida entre la fórmula I y la fórmula II como se especifica en el presente texto. El documento WO 01/00642 describe un método para purificar oligonucleótidos por cromatografía de desplazamiento en medios de intercambio aniónico, usando desplazadores de alta afinidad de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10000Da).

## Sumario

Se ha encontrado ahora que ciertos compuestos orgánicos cargados negativamente de bajo peso molecular pueden funcionar muy eficientemente como compuestos desplazadores en un proceso de cromatografía de desplazamiento. Así pues, la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de desplazamiento como se define en la reivindicación 1. Los compuestos desplazadores aniónicos usados de acuerdo con la presente invención pueden ser eficientemente eliminados de la fase estacionaria después de haber sido usados como compuesto desplazador en un proceso de cromatografía de desplazamiento, permitiendo la regeneración y la reutilización de la fase estacionaria en subsiguientes procesos de cromatografía de desplazamiento. Además, estos compuestos desplazadores aniónicos se pueden obtener con un buen rendimiento y con alta pureza, por métodos de síntesis relativamente sencillos y baratos. Por tanto, la presente invención aborda los problemas mencionados anteriormente en los procesos de cromatografía de desplazamiento de la técnica anterior.

En consecuencia, la presente invención emplea un compuesto desplazador polianiónico poliaromático que tiene la fórmula general:



en la que Cen = un anillo de benceno, un bifenileno, un naftileno, o

en la que :

w = 2 al mayor número de posiciones sustituibles en Cen; y

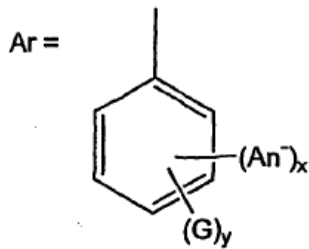
Ar = (a), (b) y/o (c); y en donde, en los siguientes (a), (b) y (c):

5 An<sup>-</sup> = independientemente, sulfonato, carboxilato, fosfonato, fosfinato, fosfato, un fosfato mono-o di-éster, sulfato, un sulfato mono-éster; o boronato;

G = independientemente H, alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub>, halógeno, nitro, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, ciano, -NH<sub>2</sub>, -NRH, -NR<sub>2</sub>, -NHC(O)R, -CHO, -C(O)R; y

(a), (b) y (c) son:

(a)



10

en donde en (a)

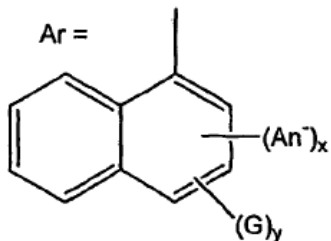
x = 2 o 3

y = 3 o 2

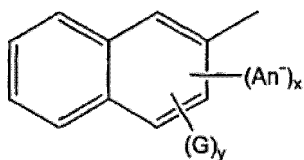
x + y = 5; y/o

15

(b)



o



en donde en cualquier (b)

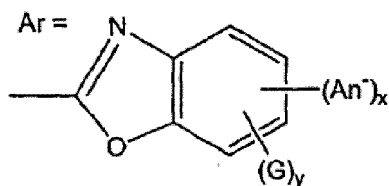
20

x = 2 o 3

y = 5 o 4

x + y = 7; y/o

(c)



en donde en (c)

$$x = 1 - 3$$

$$y = 1 - 3$$

$$5 \quad x + y = 4.$$

En una realización, dos o más cualquiera de los grupos Ar pueden estar unidos entre sí, además de la unión a Cen. En tal realización, G constituye un enlace con otro grupo Ar.

En una realización, el compuesto desplazador polianiónico poliaromático incluye una combinación de dos o más de (a), (b) o (c) como grupos Ar unidos a Cen. Como se definió antes, cada  $An^-$ , cada G, cada R y cada Z pueden elegirse independientemente de cada otro  $An^-$ , G, R y Z en cualquier compuesto dado. La línea o el enlace que se extiende desde los diversos restos Cen y Ar representa el enlace entre cada Ar y el Cen al que está unido.

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

15 cargar en una fase estacionaria adecuada una mezcla que comprende al menos un componente que ha de ser separado;

desplazar dicho al menos un componente de la fase estacionaria aplicando a la fase estacionaria una mezcla que comprende un compuesto desplazador aniónico que comprende un compuesto polianiónico poliaromático que tiene la fórmula general  $Cen (Ar)_w$ , en la que Cen, Ar, w y los sustituyentes en el mismo y otras variables se definen como antes para los compuestos polianiónicos poliaromáticos descritos anteriormente.

20 Por tanto, la presente invención proporciona procedimientos para la cromatografía de desplazamiento que se dirigen a la necesidad de compuestos desplazadores aniónicos eficaces cuya síntesis y purificación son sencillas y susceptibles de producción a gran escala, que permiten la regeneración eficiente de la fase estacionaria de modo que la fase estacionaria puede ser reutilizada de manera eficiente.

### Breve descripción de los dibujos

25 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  $\beta$ -lactoglobulina bovina A y  $\beta$ -lactoglobulina bovina B, de acuerdo con una realización indicada como ejemplo de referencia.

30 La FIG. 2 es un gráfico que representa la concentración de las fracciones recogidas durante la cromatografía de desplazamiento de una mezcla de  $\beta$ -lactoglobulina bovina A y  $\beta$ -lactoglobulina bovina B, de acuerdo con una realización indicada como ejemplo de referencia.

35 Se ha de apreciar que las etapas de proceso y las composiciones que se describen en el presente texto pueden no formar un sistema completo o flujo de proceso para llevar a cabo un proceso de cromatografía de desplazamiento, tal como se usaría en la práctica real. La presente invención puede ser puesta en práctica en conjunción con técnicas de síntesis orgánica y cromatografía de desplazamiento y aparatos usados actualmente en la técnica, y sólo en la medida de los materiales comúnmente practicados, aparatos y etapas del procedimiento y solamente se incluyen tantos materiales, aparatos y etapas de proceso comúnmente practicados como sean necesarios para la comprensión de la presente invención.

### Descripción detallada

40 Como se usa en el presente texto, "halo" se refiere a un grupo que comprende un halógeno, tal como cloro, bromo, flúor o yodo.

45 Como se usa en el presente texto, "alquilo" y "alquileno" se refieren a un grupo de átomos de carbono y de hidrógeno derivado de una molécula de alcano eliminando uno o dos átomos de hidrógeno, según sea apropiado. "Alquilo" y "alquileno" pueden incluir radicales hidrocarburo saturados monovalentes y divalentes que tienen restos lineales, cíclicos o ramificados. Los grupos "alquilo" o "alquileno" pueden incluir un doble o triple enlace carbono-carbono opcional donde dicho grupo alquilo comprende al menos dos átomos de carbono. Se entiende que para

restos cíclicos se requieren al menos tres átomos de carbono en dicho grupo alquilo. En la presente invención, los grupos alquilo y alquilenos pueden incluir cualquier número de átomos de carbono. En una realización de la presente invención, se pueden usar aproximadamente 20 o menos átomos de carbono. Por ejemplo, en una realización, pueden emplearse en la presente invención los grupos alquilo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 carbonos. Desde luego, en la presente invención pueden ser empleados grupos alquilo de longitud más larga o ramificados. Pueden usarse grupos alquilenos, por ejemplo, en una realización en la que se ha de formar un anillo a partir de dos grupos que, de otra manera, serían grupos alquilo.

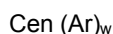
Como se usa en el presente texto, "arilo" se refiere a una estructura aromática no sustituida o sustituida tal como fenilo, naftilo, fluorenilo, fenantrilo, etc. El grupo arilo, cuando está sustituido, puede estar sustituido con un grupo halo, un grupo alquilo, otro grupo arilo o un grupo aralquilo, tal como se define en el presente texto.

Como se usa en el presente texto, "aralquilo" se refiere a un radical en el que un grupo arilo sustituye 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 átomos de carbono o menos. Por ejemplo, en una realización, se pueden emplear en la presente invención grupos aralquilo de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 átomos de carbono. Desde luego, se pueden emplear en la presente invención grupos aralquilo de más átomos de carbono.

Cualquiera de los valores numéricos mencionados en el presente texto incluye todos los valores desde el más bajo hasta el más alto en incrementos de una unidad, siempre y cuando haya una separación de al menos 2 unidades entre cualquier valor más bajo y cualquier valor más alto. Como ejemplo, si se establece 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, preferiblemente de 20 a 80, más preferiblemente de 30 a 70, se entiende que valores tales como de 15 a 85, de 22 a 68, de 43 a 51, de 30 a 32 y similares, se enumeran expresamente en esta especificación. Para valores que son menores que uno, una unidad se considera ser 0,0001, 0,001, 0,01 o 0,1 según sea apropiado. Estos son solamente ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados se considera que están establecidos expresamente en esta solicitud de una manera similar.

Compuestos desplazadores aniónicos aromáticos.

La presente invención emplea un compuesto desplazador polianiónico poliaromático tiene la fórmula general :



en la que Cen = un anillo de benceno, un bifenileno, un naftileno,

en donde:

w = 2 para el mayor número de posiciones sustituibles en Cen, y

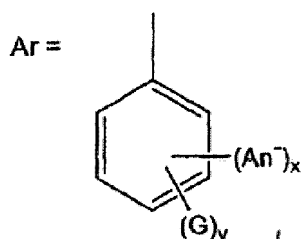
Ar = (a), (b) y/o (c); y en donde, en los siguientes (a), (b) y (c):

An<sup>-</sup> = independientemente, sulfonato, carboxilato, fosfonato, fosfinato, fosfato, un fosfato mono- o di-éster, sulfato, un sulfato mono-éster; o boronato;

G = independientemente H, alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub>, halógeno, nitro, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, ciano, -NH<sub>2</sub>, -NRH, -NR<sub>2</sub>, -NHC(O)R, -CHO, -C(O)R, y

(a), (b) y (c) son:

(a)



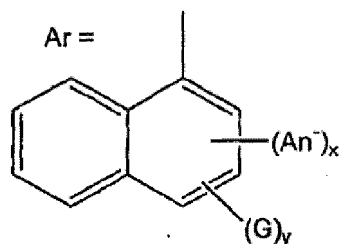
en donde en (a):

x = 2 o 3

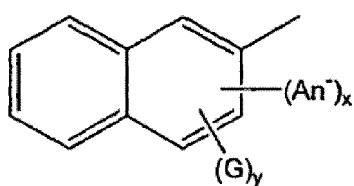
y = 3 o 2

$x + y = 5$ ; y/o

(b)



o



5

en donde en cualquier (b):

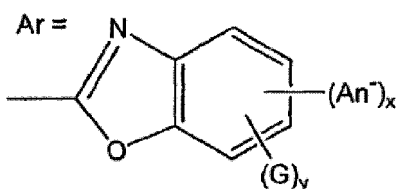
$x = 2$  o  $3$

$y = 5$  o  $4$

$x + y = 7$ ; y/o

10

(c)



en donde en (c):

$x = 1 - 3$

$y = 1 - 3$

15

$x + y = 4$

En una realización, cualquiera de dos o más de los grupos Ar pueden unirse entre ellos además de la unión a Cen. En tal realización, G constituye un enlace con otro grupo Ar.

20 En una realización, el compuesto desplazador polianiónico poliaromático incluye una combinación de dos o más de (a), (b) o (c) como grupos Ar unidos a Cen. Como se definió anteriormente, cada  $An^-$ , cada G, cada R y cada Z pueden ser elegidos independientemente de cada uno de los otros  $An^-$ , G, R y Z en cualquier compuesto dado. La línea o el enlace que se extiende desde los diversos restos Cen y Ar representa el enlace entre cada Ar y el Cen al que está unido.

25 Los compuestos desplazadores polianiónicos poliaromáticos usados de acuerdo con la presente invención pertenecen a una clase de compuestos conocidos como polianiones aromáticos, que pueden ser ácidos o sales o compuestos polianiónicos aromáticos, en los que los compuestos tienen dos o más núcleos aromáticos en los que son transportados una diversidad de restos aniónicos. Los compuestos poliaromáticos polianiónicos usados en la presente invención son generalmente poliácidos que cuando se disocian forman una diversidad de grupos cargados negativamente (polianiones). En la presente descripción, las estructuras se muestran generalmente en sus correspondientes formas ácidas. Como se entenderá, en el margen de pH en el que se utilizan los compuestos desplazadores polianiónicos poliaromáticos usados en la presente invención, estos compuestos se pueden disociar  
30 en la forma aniónica en cierto grado. Es decir, en general, los grupos que relativamente son fuertemente ácidos tales

como sulfonatos se disocian generalmente de un modo completo, mientras que los grupos menos fuertemente ácidos tales como los carboxilatos pueden no disociarse completamente. Como es sabido en la técnica, el grado de disociación a un pH dado depende del pKa del compuesto. Las formas ácidas de los compuestos se muestran en el presente texto para uniformidad y comodidad, y no se pretende que tales compuestos estén necesariamente en forma ácida.

En una realización, los compuestos polianiónicos poliaromáticos usados de acuerdo con la presente invención comprenden una diversidad de átomos cargados negativamente. En una realización, el compuesto orgánico aniónico puede comprender más de un tipo de resto aniónico. En una realización, el resto aniónico puede ser uno o más de los restos carboxilato, sulfonato, fosfonato, sulfato y fosfato, y está representado de un modo general por  $An^-$ . En cualquier realización dada del compuesto aniónico aromático, puede estar presente una diversidad de cualquiera de estos restos  $An^-$ , o puede estar presente una mezcla de uno o más de cada uno de cualquiera de dos o más de estos restos  $An^-$ . En muchas realizaciones, los restos aniónicos  $An^-$  en un compuesto aniónico aromático dado son todos iguales, pero en otras realizaciones, hay una mezcla o combinación de dos o más de tales restos aniónicos  $An^-$ . Así, por ejemplo, puede haber una combinación de grupos sulfonato y carboxilato.

En una realización, los compuestos polianiónicos poliaromáticos de acuerdo con la presente invención llevan una diversidad de restos aniónicos en una diversidad de núcleos aromáticos. Es decir, en una realización en la que hay múltiples núcleos aromáticos, cada uno de la diversidad de núcleos aromáticos lleva una diversidad de restos aniónicos. En una realización, uno o más núcleos aromáticos no llevan resto aniónico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un núcleo aromático es el grupo central de enlace al cual están unidos una diversidad de núcleos aromáticos que llevan un resto aniónico.

En una realización, los compuestos orgánicos aniónicos comprenden una diversidad de núcleos aromáticos sobre cada uno de los cuales una diversidad de grupos aniónicos se distribuyen de forma idéntica en cada uno de la diversidad de núcleos aromáticos. Es decir, en una realización en la que hay múltiples núcleos aromáticos, en los que están sustituidos una diversidad de los núcleos aromáticos, los restos aniónicos están unidos en la misma posición de cada núcleo aromático. Por ejemplo, dos núcleos de benceno (grupos fenilo) se pueden unir cada uno de ellos al resto del compuesto orgánico aniónico en la posición 1 de cada anillo, y dos grupos sulfonato están unidos a cada anillo en la posición 3 y 5.

En una realización, los compuestos orgánicos aniónicos comprenden una diversidad de núcleos aromáticos sobre cada uno de los cuales se distribuyen de forma idéntica una diversidad de grupos aniónicos en cada uno de la diversidad de núcleos aromáticos, y en el que el compuesto orgánico aniónico en su conjunto muestra al menos un eje de simetría. Es decir, en una realización en la que hay múltiples núcleos aromáticos, en los que están sustituidos una diversidad de los núcleos aromáticos, los restos aniónicos están unidos en la misma posición de cada núcleo aromático y la molécula en su conjunto muestra al menos un eje de simetría. Por ejemplo, dos núcleos de benceno pueden estar unidos cada uno al otro en la posición 1 de cada anillo, y dos grupos sulfonato están unidos a cada anillo en la posición 3 y 5, esta molécula tiene simetría bilateral, siendo cada lado de la molécula una imagen espejo de la otra.

En una realización, los núcleos aromáticos  $Ar$ , que pueden estar sustituidos o no sustituidos, incluyen además de los grupos descritos anteriormente, varios aromáticos heterocíclicos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, benzofurano, isobenzofurano, benzotriazol, benzotiazol, benzo[b]tiofeno, benzo[c]tiofeno, indol, bencimidazol, cinolina, quinazolina, naftiridina, pirido [3,4-b]-piridina, pirido [3,2-b]-piridina, pirido [4,3 -b]-piridina, quinoleína, isoquinoleína, fenotiazina, acridina, benzisooxazol, antranilo y grupos poliaromáticos tales como antraceno y fenantreno.

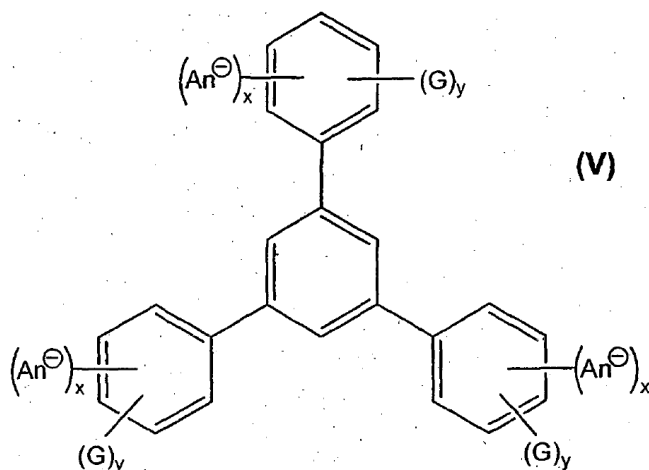
Cuando están sustituidos, los núcleos aromáticos  $Ar$  pueden estar sustituidos con cualquiera de los grupos  $G$  como se definió anteriormente, en consonancia con los sustituyentes  $An^-$  también presentes.

En una realización, los compuestos orgánicos aniónicos son solubles en agua. Cuando son solubles en agua, estos compuestos muestran la útil propiedad de tener una diversidad de cargas negativas que están diseminadas, con frecuencia en un patrón uniforme.

En lo que sigue, se proporcionan varios ejemplos de compuestos que tienen la fórmula general  $Cen(Ar)_w$ , como se ha definido anteriormente. Estos ejemplos no quiere decir que sean limitantes, pero se proporcionan para ilustrar algunas de las posibles realizaciones de la presente invención.

En una realización, el compuesto polianiónico poliaromático tiene la estructura general (V) que sigue:

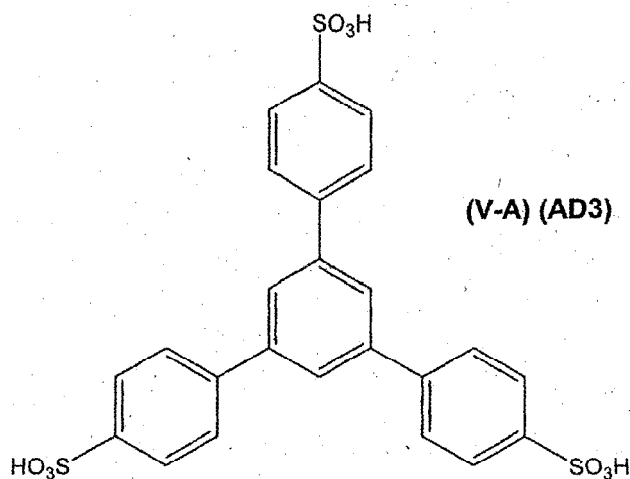




5 en la que, en (V), cada  $An^{\ominus}$ , cada G, cada x y cada y se pueden elegir independientemente entre las definiciones anteriores. En una realización, en cada molécula (V), cada  $An^{\ominus}$  es el mismo en cada núcleo de Ar, y en otra realización, uno o más  $An^{\ominus}$  difieren de otros grupos  $An^{\ominus}$ . En una realización, en cada molécula (V), cada valor de x es el mismo en cada núcleo de Ar como el valor de x en cada otro núcleo de Ar, y en otra realización, uno o más valores de x difieren de otros valores de x. En una realización, en cada molécula (V), cada G es el mismo en cada núcleo de Ar, y en otra realización, uno o más G difieren de otro G. En una realización, en cada molécula (V), cada valor de y es el mismo en cada núcleo Ar como el valor de y en cada otro núcleo de Ar, y en otra realización, uno o más valores de y son diferentes de otros valores de y. En una realización, los grupos  $An^{\ominus}$  están dispuestos simétricamente en los núcleos de Ar. En una realización, los grupos G están dispuestos simétricamente en los núcleos Ar. En una realización, la molécula en su conjunto tiene al menos un eje de simetría.

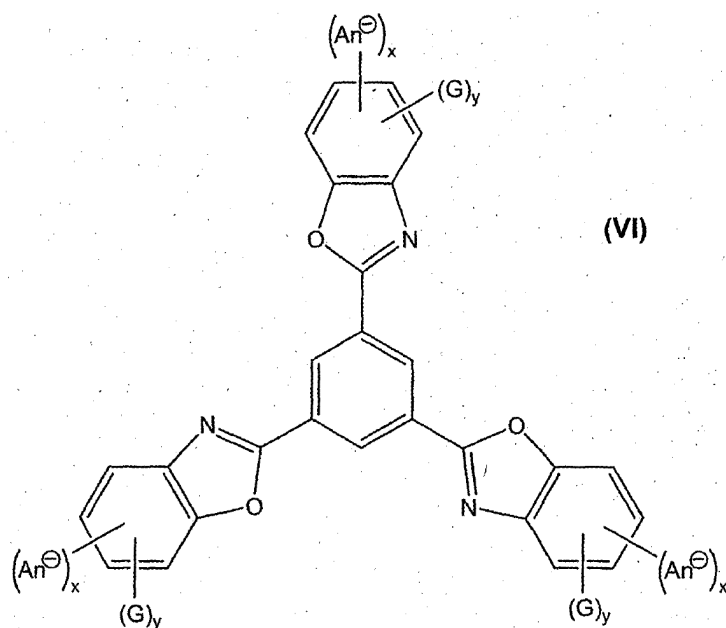
10

En una realización, el compuesto polianiónico aromático que tiene la estructura general (V) es un compuesto tal como el compuesto polianiónico aromático siguiente que tiene la fórmula general (V-A) que se puede denominar convenientemente como AD3, y tiene la estructura siguiente:



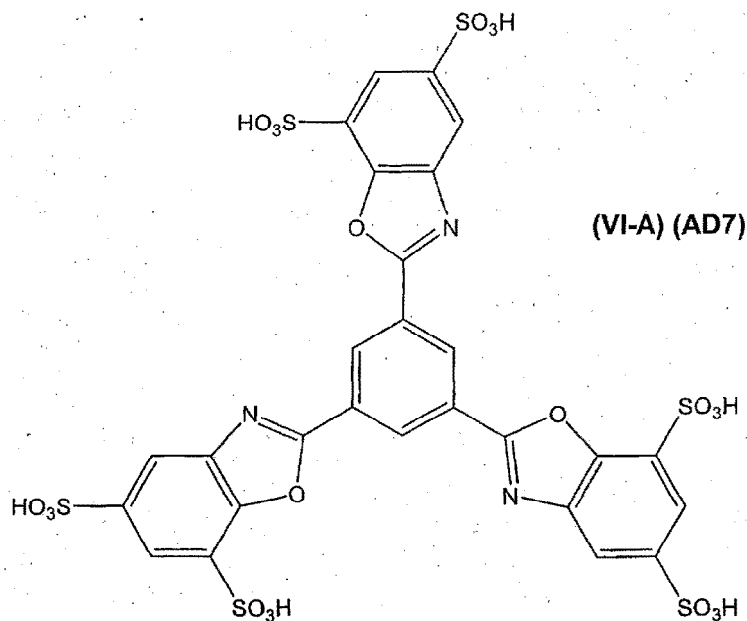
15

En una realización, el compuesto polianiónico poliaromático tiene la estructura general (VI) siguiente:



5 en la que en (VI), cada  $An^{\ominus}$ , cada G, cada x y cada y se pueden elegir independientemente entre las definiciones anteriores. En una realización, en cada molécula de (VI), cada  $An^{\ominus}$  es el mismo en cada núcleo de Ar, y en otra realización uno o más  $An^{\ominus}$  difiere de otros grupos  $An^{\ominus}$ . En una realización, en cada molécula de (VI) cada valor de x es el mismo en cada núcleo Ar que el valor de x en cada otro núcleo Ar, y en otra realización, uno o más valores de x difieren de otros valores de x. En una realización, en cada molécula (VI), cada G es el mismo en cada núcleo Ar, y en otra realización, uno o más G difieren de otro G. En una realización, en cada molécula (VI), cada valor de y es el mismo en cada núcleo Ar que el valor de y en cada otro núcleo Ar, y en otra realización, uno o más valores de y son diferentes de otros valores de y. En una realización, los grupos  $An^{\ominus}$  están dispuestos simétricamente sobre los núcleos Ar. En una realización, los grupos G están dispuestos simétricamente sobre los núcleos Ar. En una realización, la molécula en su conjunto tiene al menos un eje de simetría.

10 En una realización, el compuesto polianiónico aromático que tiene la estructura general (VI) es un compuesto tal como el compuesto polianiónico aromático siguiente que tiene la fórmula general (VI-A), que puede ser denominado convenientemente como AD7, y tiene la estructura siguiente:



15 En una realización, el compuesto desplazador polianiónico poliaromático de cualquiera de las fórmulas anteriores comprende en la estructura un sustituyente adicional que hace que sea fácilmente detectado mediante espectroscopia UV/Vis, mediante fluorescencia, o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. Tal

sustituyente podría también influir en la afinidad del compuesto por cromatografía de intercambio aniónico, haciéndolo menos fuertemente unido o bien más fuertemente unido a la fase estacionaria. En algunos casos, sería ventajoso no tener ningún sustituyente que interfiriese con los medios normales de detectar los compuestos que se están purificando por cromatografía de desplazamiento. Un ejemplo de este último caso sería un compuesto desplazador de fórmula I que no absorbe la luz UV a 280 nm, una longitud de onda a la que ciertos biopolímeros (proteínas, oligopéptidos, anticuerpos, etc.) absorben de forma característica. Los agentes de derivatización adecuados para mejorar la detectabilidad son conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser seleccionados adecuadamente por dichos expertos.

En una realización, uno o más sustituyentes en el compuesto desplazador usado de acuerdo con la presente invención puede ser un grupo detectable por uno o más métodos de detección electromagnéticos o radiactivos. Tales métodos electromagnéticos incluyen, por ejemplo, espectrofotometría UV/visible y espectrofotometría de fluorescencia. Se conocen en la técnica métodos adecuados de detección radiactiva. Grupos sustituyentes adecuados y métodos adecuados para la detección de tales grupos son conocidos por los expertos en la técnica para su uso con tales métodos.

Los compuestos desplazadores aniónicos ejemplares adecuados incluyen, por ejemplo, los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan para mostrar ejemplos de compuestos desplazadores. No se pretende que estos ejemplos sean limitantes, sino que en cambio proporcionen ejemplos específicos que ilustran compuestos desplazadores aniónicos de acuerdo con varias realizaciones de la invención.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la fase estacionaria adecuada es una resina de intercambio aniónico. Son conocidas en la técnica resinas de intercambio aniónico adecuadas, y generalmente incluyen resinas tales como metacrilato, sílice, poliestireno o poliestireno - divinilbenceno, que han sido derivatizadas con un resto catiónico, tal como un grupo amonio secundario, terciario o cuaternario, al que los aniones son atraídos. Los materiales de intercambio aniónico adecuados pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica basándose en el tipo de materiales que se han de separar. En una realización, las resinas de intercambio aniónico adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, por ejemplo, Mono Q, Source 15Q, Q Sepharose® PP y Q Sepharose® FF (Amersham Biosciences); TOYOPEARL® Super Q - 5PW, DEAE - 650, TSK -GEL Super Q - 5PW, y Super Q-650 M (Tosoh Biosep); Unosphere Q, Macrorep High Q (Bio - Rad); PL- SAX (Polymer Labs); Showdex® IEC QA-825 y IEC DEAE - 825 (Showa Denko); Q-8HR y DEAE-15HR (Waters); y Fractogel® TMAE y DEAE (EMD Chem.). También pueden usarse otras resinas de intercambio aniónico adecuadas conocidas en la técnica.

La resina se equilibra generalmente con varios volúmenes de tampón de carga de anión.

Proceso de cromatografía de desplazamiento

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

cargar en una fase estacionaria adecuada una mezcla que comprende al menos un componente a separar;

desplazar dicho al menos un componente de la fase estacionaria aplicando a la fase estacionaria una mezcla que comprende un compuesto desplazador aniónico que comprende una diversidad de grupos aniónicos sobre uno o más núcleos aromáticos.

En general, los procesos de cromatografía de desplazamiento son conocidos por los expertos en la técnica, como se describe en la sección anterior de fundamentos. En consecuencia, para la comprensión de la presente invención por profesionales con una experiencia normal no es necesario describir tal proceso con detalle en el presente texto, excepto en los ejemplos que siguen a continuación.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el proceso de cromatografía de desplazamiento se puede usar para separar y purificar DNA, RNA, ácidos nucleicos, nucleótidos, oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, proteínas y polipéptidos. Como se usa en el presente texto, el DNA es ácido desoxirribonucleico obtenido de cualquier fuente, natural o recombinante. Como se usa en el presente texto el RNA es ácido ribonucleico obtenido de cualquier fuente, natural o recombinante, e incluye, pero sin limitarse a ellos, RNA, mRNA, cRNA, tRNA, nRNA, rRNA y cualquier otro RNA conocido, o preparado o descubierto posteriormente. Tal como se usa en el presente texto, un nucleótido es un monómero o la unidad estructural de cadenas de nucleótidos que forman ácidos nucleicos como el RNA y el DNA. Un nucleótido consiste en una base nucleica heterocíclica, un azúcar pentosa (ribosa o desoxirribosa), y un grupo fosfato o polifosfato. Un oligonucleótido incluye dos o más nucleótidos, hasta aproximadamente 50 nucleótidos, y es considerablemente más pequeño que una molécula de RNA o DNA. Los oligonucleótidos se utilizan a menudo como sondas de DNA o RNA, y pueden usarse en el proceso de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los oligonucleótidos antisentido se diseñan y se usan para hibridarse con un RNA diana en particular para afectar a la función del RNA diana. El uso de una secuencia antisentido que es complementaria en virtud de la hibridación de pares de bases de Watson - Crick con un mRNA específico, puede usarse para inhibir la expresión del mRNA y con ellos dar por resultado el bloqueo de la transferencia de información genética del DNA en proteínas. Las moléculas antisentido están diseñadas para interactuar, por ejemplo, con el

mRNA antes de que pueda ser traducido en los aminoácidos que constituyen las proteínas. De esta manera, se puede evitar que se formen las proteínas asociadas a una enfermedad. Estas moléculas de oligonucleótidos se denominan antisentido porque que son el complemento de Watson-Crick con el RNA diana.

5 En una realización, la presente invención se puede usar para separar y aislar bases nucleicas, tales como adenina, timina, uracilo, guanina, citosina, y purinas y pirimidinas en general. En una realización, la presente invención se puede usar para nucleósidos separados, tales como adenosina, uridina, guanosina, citidina, desoxiadenosina, timidina, desoxiguanosina y desoxicitidina. En una realización, la presente invención se puede usar para separar y aislar los nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, AMP, UMP, GMP, CMP, ADP, UDP, PIB, CDP, ATP, UTP, GTP, CTP, cAMP y cGMP. En una realización, la presente invención se puede usar para separar y aislar desoxinucleótidos, incluyendo dAMP, dTMP, dUMP, dGMP, dCMP, dADP, dTDP, dUDP, DGDP, dCDP, dATP, dTTP, dUTP, dGTP y dCTP. En una realización, la presente invención se puede usar para separar y aislar ácidos nucleicos, tales como DNA, RNA, LNA, PNA, mRNA, ncRNA, miRNA, rRNA, siRNA, tRNA, y mtDNA.

15 Como se usa en el presente texto, una proteína se define de un modo amplio como un poliaminoácido que tiene un peso molecular mayor que aproximadamente 5 kDa (kiloDaltons), y un polipéptido es un poliaminoácido que tiene un peso molecular menor que aproximadamente 5 kDa. Como entenderán los expertos en la técnica, la diferencia entre una proteína y un polipéptido es más cuestión de grado. En general, una proteína muestra la estructura terciaria, mientras que un polipéptido generalmente no lo hace.

20 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 de la mezcla comprenden uno o más polipéptidos, una o más proteínas o una mezcla de cualquiera de dos o más de tales proteínas y/o polipéptidos. Es decir, el procedimiento de la presente invención es aplicable para la separación de mezclas de proteínas, mezclas de polipéptidos y mezclas de ambos, una proteína y un polipéptido. En una realización, la una o más proteínas comprenden un peso molecular de aproximadamente 5 kD o superior. En una realización, la mezcla comprende dos o más proteínas, dos o más polipéptidos o una mezcla de los mismos.

25 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 el polipéptido está substancialmente enriquecido y/o en la que la proteína y/o polipéptido están substancialmente separados de otras proteínas y/o componentes polipeptídicos. 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 desde la fase estacionaria y se recoge en una o más fracciones, la proteína y/o el polipéptido se obtiene en la fracción en uno o ambos de una forma enriquecida, es decir, más concentrada, o es obtenible substancialmente separado de otras, diferentes proteínas y/o componentes polipeptídicos de la mezcla original. Por tanto, la mezcla puede incluir claramente dos o más componentes a separar. Como se discute a continuación, en algunas realizaciones, la mezcla sometida a cromatografía de desplazamiento de acuerdo con la presente invención puede incluir una combinación de muchos materiales diferentes de una variedad de fuentes distintas, y el proceso de la presente invención puede ser aplicado con utilidad a tales mezclas complejas para separar los diversos componentes de las mismas.

30 En otra realización, la presente invención es aplicable a una mezcla que contiene al menos un componente (tal como DNA, RNA, nucleótidos, oligonucleótidos, proteína, polipéptido, fármaco, producto intermedio de fármaco, etc) y al menos una impureza. En esta realización, el procedimiento de la presente invención se puede usar para purificar el componente de una o más impurezas con las que se puede mezclar el componente deseado. Tal eliminación 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 bien (2) siendo eliminado por lavado o eluido de la fase estacionaria, donde se elimina la impureza por un medio más similar a la cromatografía de elución "tradicional". En esta realización, cuando la impureza ha sido inmovilizada o eliminada de la columna, el componente deseado puede ser entonces eliminado de la columna por cromatografía de desplazamiento tal como se describe en el presente texto.

35 La presente invención es aplicable a una amplia variedad de componentes, incluyendo no sólo el DNA, RNA, nucleótidos, oligonucleótidos, mezclas de los mismos anteriormente mencionados y las impurezas mezcladas con ellos, sino muchos otros componentes.

40 En una realización, la mezcla puede incluir uno o más anticuerpos, naturales o recombinantes, o una mezcla de dos cualquiera o más de tales anticuerpos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más enzimas, naturales o recombinantes, o una mezcla de dos cualquiera o más de tales enzimas. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos, naturales o recombinantes, para uso en diagnóstico, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir 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. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más plasma de sangre animal o humana, natural o recombinante, o mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, material vegetal natural o recombinante, o mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos

derivados de uno o más leche animal o humana o leche derivada de un animal recombinante, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, huevo aviar, natural o recombinante, o mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos. En una realización, la mezcla puede incluir una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, bacterias, levaduras, hongos, virus o insectos, o mezcla de dos o más cualquiera 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 de células o tejido animal, natural o recombinante, de mamífero, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos.

En una realización, la mezcla puede incluir uno o más compuestos orgánicos, fármacos o productos intermedios de fármacos, o una mezcla de dos o más cualquiera de los mismos. En una realización, uno o más de los uno o más compuestos orgánicos, fármacos o productos intermedios de fármacos, son quirales. En una realización, la mezcla puede comprender una mezcla o combinación de cualquiera de los precedentes, tal como una mezcla de un anticuerpo y una enzima, o una mezcla de proteínas y/o polipéptidos obtenidos a partir de material vegetal y de huevo aviar, o cualquier mezcla de cualquiera de los componentes ejemplares anteriores a los que puede ser aplicable el procedimiento de la presente invención.

En una realización, el procedimiento de la presente invención incluye además una etapa de detectar el compuesto desplazador aniónico a medida que emerge de la fase estacionaria, en donde la detección es por uno o más procedimientos de espectroscopia de absorción UV/visible, espectroscopía de emisión de fluorescencia, espectrometría de masas, pH, conductividad y uno o más métodos electroquímicos. Los anteriores son los métodos más comunes aplicables para detectar los compuestos desplazadores; pueden usarse otros métodos adecuados que se conocen en la técnica. Tal detección puede ser de uno o más sustituyentes detectables como se discutió anteriormente.

En una realización, el método utilizado para detectar el componente o los componentes que son desplazados de la fase estacionaria puede ser determinado adecuadamente basándose en el componente específico buscado. Así, por ejemplo, las proteínas y los polipéptidos se pueden determinar basándose en su espectro de absorción UV/visible o longitudes de onda de absorción característica, o derivatizándolos con un agente de visualización. Del mismo modo, los fármacos y productos intermedios de fármacos pueden determinarse basándose en sus espectros de absorción UV/visible o longitudes de onda de absorción característica.

En una realización, el procedimiento de la presente invención incluye además uno o más pasos de regeneración de la fase estacionaria. En una realización, la regeneración puede incluir, por ejemplo, el tratamiento de la fase estacionaria con una solución de uno o más compuestos entre un hidróxido de metal alcalino, una sal de metal alcalino, un hidróxido alcalino térreo, una sal alcalino térrea, un ácido orgánico, un ácido alquilsulfónico, un hidróxido de amonio cuaternario, una sal de amonio cuaternario, una alquilamina, en donde la solución puede comprender además un tampón de pH adecuado. Pueden añadirse otras etapas de regeneración adecuadas, incluyendo un simple lavado con agua purificada, según sea necesario y según proceda. En una realización, la regeneración incluye el uso de un co-disolvente orgánico junto con el agua.

En los ejemplos que siguen, se proporcionan procedimientos de síntesis ejemplares por los que se pueden sintetizar estos compuestos desplazadores aniónicos ejemplares. Otros compuestos desplazadores aniónicos adecuados dentro del alcance de la invención se pueden sintetizar por métodos conocidos y/o adaptados a partir de lo que antecede tal como entenderán los expertos en la técnica.

En una realización, la composición de desplazador está libre de sulfato de dextrano añadido, y en una realización la composición de desplazador está sustancialmente libre de sulfato de dextrano procedente de cualquier fuente. En una realización, los compuestos desplazadores están libres de hidratos de carbono sulfatado.

En una realización, el compuesto desplazador usado en la presente invención está libre de grupos éter en la molécula. En una realización, los compuestos desplazadores usados en la presente invención comprenden grupos polianiónicos en los que los grupos polianiónicos adyacentes no están conectados mediante restos que contienen éter. En una realización, los compuestos desplazadores usados en la presente invención están libres de un poliéter dendrítico.

En una realización, los compuestos desplazadores y composiciones usadas en la presente invención están sustancialmente libres de compuestos que contienen el grupo azo (el grupo azo es  $-N=N-$ ). En una realización, los compuestos desplazadores y composiciones usados en la presente invención están sustancialmente libres de compuestos que contienen antraquinona. En una realización, la composición del desplazador está sustancialmente libre de tetrasulfonato de índigo.

Los siguientes ejemplos de referencia se incluyen con fines demostrativos. Debe apreciarse por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos de referencia que siguen representan técnicas descubiertas por los autores de la presente invención para funcionar similarmente a la invención.

Ejemplo de Referencia 1 - Síntesis de AD-1 (no de acuerdo con la invención):

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 1000 mL dotado de un termopar revestido con teflón se cargan 500 mL de ácido sulfúrico concentrado y una barra de agitación magnética. El matraz se purga con nitrógeno seco mientras se carga un embudo de adición de polvo con 35 g de tetrafeniletieno. El embudo de adición de polvo se pone en el matraz de fondo redondo y el matraz se sella bajo una atmósfera de nitrógeno seco bajo una presión ligeramente superior a la ambiente. El ácido sulfúrico se calienta con agitación a aproximadamente 115 °C, y entonces se añade el tetrafeniletieno al ácido sulfúrico en pequeñas porciones a lo largo de aproximadamente una hora. Cada porción de tetrafeniletieno se añade sólo después de que la parte anterior se haya disuelto en la mezcla de reacción líquida. Cuando la adición es completa, la mezcla de reacción de color oscuro se mantiene a 115 °C durante una hora, y luego se deja enfriar a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción enfriada se pasa a un embudo de adición y se añade gota a gota, a lo largo de aproximadamente 4 horas, a aproximadamente 5 litros de éter etílico libre de etanol enfriado a aproximadamente 5 °C para precipitar el producto en forma de un sólido blanco. Cuando esta adición es completa, la agitación se detiene y se deja que sedimente el producto sólido. Aproximadamente 4,5 litros del sobrenadante se decantan cuidadosamente y el producto se suspende en el disolvente restante, después se recoge en una fritada de vidrio sinterizado bajo nitrógeno seco, se lava dos veces con éter fresco (sin etanol) y se seca bajo un flujo de nitrógeno seco. Se recuperan aproximadamente 64 g de AD1 en forma de un polvo fino, desapelmazado, de color blanquecino, que es de una pureza del 99,5 % por HPLC. Si el producto retiene una traza de ácido sulfúrico después de los lavados con éter, el producto se puede disolver en agua y tratarse con carbonato de bario hasta que todo el ácido sulfúrico se ha eliminado como sulfato de bario. La filtración y la evaporación darían entonces el ácido tetrasulfónico puro adecuado para ser usado como compuesto desplazador en medios de intercambio aniónico.

Ejemplo de Referencia 2 - Síntesis de AD-2 (no de acuerdo con la invención):

La síntesis de AD-2 puede llevarse a cabo en el siguiente procedimiento en dos etapas.

Etapa 1: Síntesis de 2-cloro-4,6-bis (3-carboxi-4-hidroxi-5-sulfoanilino)-1,3,5-triazina, sal disódica (peso fórmula o f. w. = 621,85):

Se ponen en un matraz 23 g de agua destilada y 56 g de hielo (de agua destilada) y se agitan magnéticamente. El pH y la temperatura de las reacciones resultantes se controlan usando una sonda de pH de vidrio y una sonda de temperatura. Se añaden 100 mg de detergente Triton-X100 a la mezcla en agitación y a continuación 1,90 g (10,3 mmol, f. w. = 184,4) de tricloruro de cianurilo (Aldrich), que se añade en una sola vez. Para la primera parte de esta reacción, la temperatura se mantiene en el intervalo de 0 a 5 °C mediante enfriamiento externo si es necesario, y el pH se mantiene en el intervalo de 3,5 a 4,0 mediante la adición de pequeñas cantidades de LiOH·H<sub>2</sub>O según se precise. En porciones a lo largo de un período de 2 horas, se añaden pequeñas cantidades de ácido 5-amino-3-sulfosalicílico sólido (4,80 g, 20,6 mmoles, Aldrich) a la mezcla de reacción en agitación. La temperatura y el pH se mantienen como se ha manifestado antes. La mezcla de reacción se agita a continuación durante 4 horas más manteniendo de nuevo la temperatura y el pH como se indicó anteriormente. La mezcla de reacción se calienta lentamente a temperatura ambiente. En este punto, el pH es estable en 3,6 y se observan pocos cambios. La mezcla se agita durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente, tiempo durante el cual el pH puede desviarse a 3,5 sin añadir ningún ácido ni base. En este punto y a lo largo de la secuencia de reacción, el progreso de la reacción se sigue mediante HPLC de intercambio aniónico para asegurar que se consume el producto mono-anilino y que no se forma el producto tris-anilino (melamina). Se añade suficiente HCl 2 M gota a gota para reducir el pH a 1,5, y después se filtra la solución de reacción. Se añade al filtrado una disolución saturada de NaCl (salmuera) gota a gota con agitación a temperatura ambiente hasta que el producto se separa completamente de la solución por cristalización (aproximadamente 20 mL de salmuera). La mezcla de reacción se filtra, y el producto sólido se lava repetidamente con etanol al 95 % y después se seca bajo vacío. Este procedimiento da 5,58 g (rendimiento 87 %) del producto deseado que ha demostrado ser de aproximadamente el 96 % de pureza por HPLC.

Etapa 2: 2-(tris(hidroximetil)metilamino)-4,6-bis (3-carboxi-4-hidroxi-5-sulfoanilino)-1,3,5-triazina, sal sódica, (AD2, f. w. = 684,55).

Se suspenden 15,75 g (130 mmol, f. w. = 121,1) de tris (hidroximetil) metilamina (Aldrich) y 4,04 g (6,5 mmol, f. w. = 621,85) de 2-cloro-4,6-bis (3-carboxi-4-hidroxi-5-sulfoanilino)-1,3,5-triazina, sal disódica (preparación anterior) en 40 mL de dimetilsulfóxido seco de calidad reactivo. Con agitación, la mezcla se calienta a 110 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se deja reposar durante la noche. Los cristales de la amina de partida cristalizan de la solución, y se separan por filtración. Se añaden al filtrado 60 mL de agua destilada, después se añade HCl 6 M gota a gota hasta que el pH es de aproximadamente 1,5, y, finalmente, se añade una solución saturada de NaCl (salmuera) gota a gota a temperatura ambiente hasta que el producto se separa de la solución por cristalización (unos 30 mL de salmuera). Esta mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y después se filtra. El producto sólido se lava repetidamente con etanol al 95 % y después se seca bajo vacío para dar 3,66 g (rendimiento 82 %) del producto deseado que es de aproximadamente 96 % de pureza por HPLC.

Ejemplo de referencia 3 - Cromatografía de desplazamiento de una mezcla de proteínas.

5 Experimentos de avance. Usando soluciones 5 mM de  $\beta$ -lactoglobulina A bovina en el tampón de carga y de  $\beta$ -lactoglobulina B bovina en el tampón de carga, se llevan a cabo experimentos de avance a diversos caudales entre 0,1 y 0,5 mL/min. El tampón de carga se prepara a partir BHEP 25 mM (1,4 -bis(hidroxi)etil)piperazina) y se ajusta a pH = 7,7 con HCl. Se obtienen resultados reproducibles a una velocidad de flujo de 0,18 mL/min. La capacidad de saturación de la columna para  $\beta$ -lactoglobulina B bovina es 459 mg (108,2 mg/ml), y para  $\beta$ -lactoglobulina A bovina es 463 mg (109,2 mg/mL). Se utilizan lactoglobulinas no purificadas (Sigma) directamente de la botella en estos experimentos.

10 Preparación de la columna. La columna (Tosoh Super Q-5PW, 6,0 x 150 mm) se limpia y se regenera usando el Método A (más adelante) y luego se almacena en forma de cloruro en un tampón de cloruro sódico, NaCl 2,0 M + BHEP 25 mM, pH = 7,7 con HCl. La salida de la columna se hace pasar a través de un detector de flujo de UV/Vis ajustado a 280 nm y 312 nm, una célula de flujo de conductividad y una célula de flujo de pH. La columna se equilibra con tampón de carga (véase más arriba) a una velocidad de flujo de 0,18 mL/min. Una vez que las tres señales (absorbancia UV, conductividad, pH) formaron líneas de base de nivel estables (aproximadamente 24 min, 1 CV), se inicia inmediatamente el experimento de desplazamiento.

15 Experimento de desplazamiento (Ejemplo de Referencia). Se preparan soluciones de  $\beta$ -lactoglobulina B bovina (12,6 mg/ml, Sigma nº L8005) y  $\beta$ -lactoglobulina A bovina (13,4 mg/mL, Sigma nº L7880) en el tampón de carga (véase más arriba). Las concentraciones de proteína se determinan usando ensayos de BCA-Copper y Bradford. Volúmenes iguales de las dos soluciones de citocromo se mezclan, se cargan en un bucle de muestra de 20,0 mL y después se bombean en una columna de intercambio aniónico limpiada y adecuadamente equilibrada (véase más arriba) a una velocidad de flujo constante de 0,36 mL/min durante 57 minutos. El bucle se desconecta de la ruta de flujo de entrada, y el tampón de carga se bombea a través de la columna durante 12 minutos a 0,36 mL/min. Finalmente, se bombea en la columna una solución de desplazador AD1 5,0 mM en el tampón de carga a 0,18 mL/min, y la salida de la columna se hace pasar a través de un detector de flujo de UV/Vis (celda de flujo 10  $\mu$ L, ajustado en 280, 312, 380 nm) a un colector de fracciones. Las fracciones se recogieron cada 1,00 min; por la experiencia previa, se desechan las fracciones iniciales sin proteínas. Las células de flujo de conductividad y pH (véase más arriba) están normalmente en la ruta de salida detrás del detector de UV/Vis con el fin de controlar el curso del experimento de desplazamiento; sin embargo, cuando se recogen fracciones, estas dos células se desconectan de la trayectoria de flujo con el fin de no ampliar la transición entre los picos de desplazamiento. Una vez recogidas, las fracciones se sellan y se refrigeran para el posterior análisis por HPLC. El experimento de desplazamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, 22 °C. La traza de desplazamiento se muestra en la Figura 1.

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

Columna: columna de acero inoxidable de 4,6 x 200 mm de dimensiones internas  
Fabricado por PolyLC (Columbia, MD) PolyWAX LP, matriz basada en sílice de intercambio aniónico débil 5  $\mu$ , 300 Angstrom de tamaño de poro

Disolvente tampón: agua destilada de calidad para HPLC

Tampones de elución:

A ~ N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> 50 mM, pH = 7,8 con HCl, disolvente acetonitrilo/agua 10/90 (v/v)

B ~ NaCl 0,50 M + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> 50 mM, pH = 7,8 con HCl, disolvente acetonitrilo/agua 10/90 (v/v)

Los tampones de elución se filtran a través de un filtro de 0,2  $\mu$  para eliminar las partículas.

Velocidad de flujo: La velocidad de flujo constante es 1,0 mL/min.

Método de gradiente	0 - 2 min	100 % A, isocrático
	2 - 52 min	100 % A a 100 % B, gradiente lineal
	52 - 56 min	100 % B, isocrático

Longitud de onda detector UV  
312 nm y 380 nm - AD1 sólo  
280 nm - proteínas + AD1

Preparación de la muestra: Se mezclan 10  $\mu$ L de la muestra de fracción y 140  $\mu$ L de tampón de dilución, y se inyectan en la columna 50  $\mu$ L de esta mezcla. Los factores de dilución exactos se determinan por pesada.

5 Bajo este análisis, cada lactoglobulina Sigma mostró un pico principal, un pico de isoforma principal, varios (3 - 4) picos pequeños de isoformas y varios (4 - 5) picos pequeños debidos a proteínas de impureza. Fuera de la botella, la  $\beta$ -lactoglobulina B bovina es aproximadamente del 95 % de pureza (basada en impurezas de proteínas) y la  $\beta$ -lactoglobulina A bovina es aproximadamente del 97 % de pureza. A diferencia de la  $\beta$ -lactoglobulina A, la  $\beta$ -lactoglobulina B contenía niveles significativos de sales y tampones inorgánicos. Así pues, se analizaron las 151 muestras recogidas, y los datos de 280 nm se exponen en la Figura 2 y la tabla que sigue. La recuperación de la proteína total de la columna es del 97 %.

Proteína purificada:	Lacto B	Lacto A
Agrupación de muestras:	12 - 61	77 - 137
Pureza por HPLC:	> 99,9 %	> 99,9 %
Recuperación:	103,2 mg	112,0 mg
% de recuperación: <sup>1</sup>	84,6 %	86,2 %
% de recuperación: <sup>2</sup>	81,9 %	83,6 %
AD1 medido: <sup>*</sup>	ND (< 0,5 ppm)	1,3 ppm
AD1 estimado: <sup>*</sup>	< 50 ppb	1,1 ppm

ND = no detectado

<sup>\*</sup> antes de la concentración o la diálisis en fracciones agrupadas.

1. del pico principal.

2. de la proteína total.

10 Limpieza de la columna y protocolos de regeneración. Debido a la fuerte unión de AD1 a la mayoría de las matrices de intercambio aniónico, los autores de la presente invención encuentran que el bromuro sódico es más útil que el cloruro sódico para la mayoría de las matrices. De forma ocasional se utiliza succinato sódico o citrato sódico.

Método A: Limpieza + regeneración (eficiencia de regeneración del 99 %) (todos los flujos son a 0,64 mL/min)

NaBr 2,0 M + glicina 0,1 M, pH = 2,5 w/HBr, agua/acetonitrilo 80/20 (v/v)	133 min	20 CV
trietanolamina 0,1 M, pH = 7,8 w/HBr	17 min	2,5 CV
NaOH 0,1 M	30 min	4,5 CV
trietanolamina 0,1 M, pH = 7,8 w/HBr	17 min	2,5 CV
NaCl 2,0 M + BHEP 25 mM, pH = 7,7	34 min	5 CV

Método B : Limpieza + Regeneración (eficiencia de regeneración 100 %) (todos los flujos son a 0,64 mL / min)

(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NBr 2,0 M + glicina 0,1 M, pH = 2,5 w/HBr, agua/acetonitrilo 80/20 (v / v)	100 min	15 CV
trietanolamina 0,1 M, pH = 7,8 w/HBr	17 min	2,5 CV
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NOH 0,1 M	30 min	4,5 CV
trietanolamina 0,1 M, pH = 7,8 w/HBr	17 min	2,5 CV
NaCl 2,0 M + BHEP 25 mM, pH = 7,7	34 min	5 CV

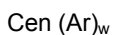


**REIVINDICACIONES**

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

cargar en una fase estacionaria que comprende un material de intercambio aniónico una mezcla que comprende uno o más componentes a separar;

5 desplazar al menos uno del uno o más componentes de la fase estacionaria aplicando a la fase estacionaria una mezcla que comprende un compuesto desplazador polianiónico poliaromático que tiene la fórmula general:



en la que Cen = un anillo de benceno, un bifenileno, un naftileno,

en la que :

10  $w = 2$  al mayor número de posiciones sustituibles en Cen; y

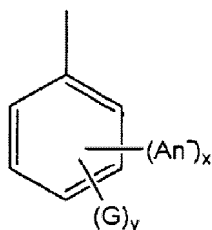
Ar = (a), (b) y/o (c); y en donde, en los siguientes (a), (b) y (c):

An<sup>-</sup> = independientemente, sulfonato, carboxilato, fosfonato, fosfinato, fosfato, un fosfato mono- o di-éster, sulfato, un sulfato mono-éster; o boronato;

15 G = independientemente H, alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub> - C<sub>10</sub>, halógeno, nitro, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>, ciano, -NH<sub>2</sub>, -NRH, -NR<sub>2</sub>, -NHC(O)R, -CHO, -C(O)R; y

(a), (b) y (c) son:

(a)



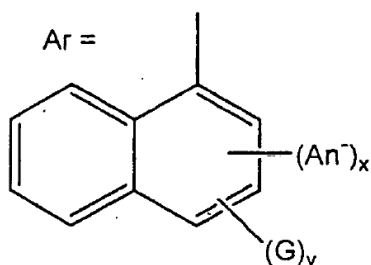
en donde en (a)

20  $x = 2$  o  $3$

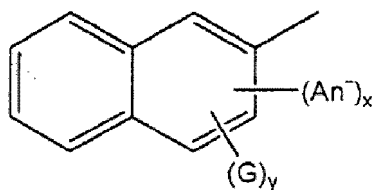
$y = 3$  o  $2$

$x + y = 5$ ; y/o

(b)



25 o



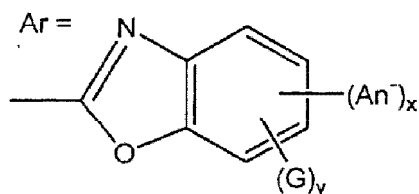
en donde en cualquier (b)

$$x = 2 \text{ o } 3$$

$$y = 5 \text{ o } 4$$

5  $x + y = 7; y/o$

(c)



en donde en (c)

$$x = 1 - 3$$

10  $y = 1 - 3$

$$x + y = 4.$$

15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el uno o más componentes comprenden uno o más polipéptidos naturales o recombinantes, una o más proteínas naturales o recombinantes, uno o más oligonucleótidos naturales o recombinantes, uno o más DNA naturales o recombinantes, uno o más RNA naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de los mismos.

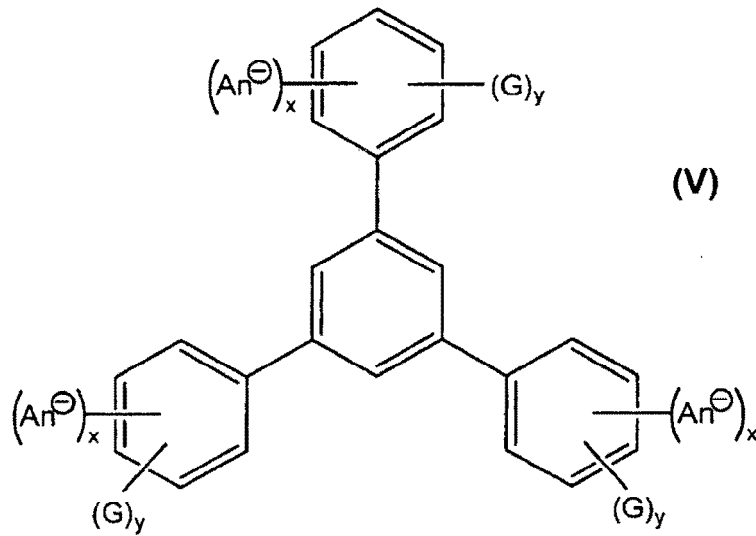
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el componente de la mezcla es desplazado de la fase estacionaria en una fracción en la cual el componente está sustancialmente enriquecido y/o en la cual el componente es sustancialmente separado de los otros componentes de la mezcla.

20 4. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la mezcla comprende al menos dos componentes a separar o el al menos un componente y al menos una impureza.

5. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende además detectar uno o más del componente y el compuesto desplazador a medida que emerge de la fase estacionaria, en donde la detección es por uno o más procedimientos entre espectroscopia de absorción en UV/visible, espectroscopia de emisión de fluorescencia, espectrometría de masas, pH, conductividad y uno o más métodos electroquímicos.

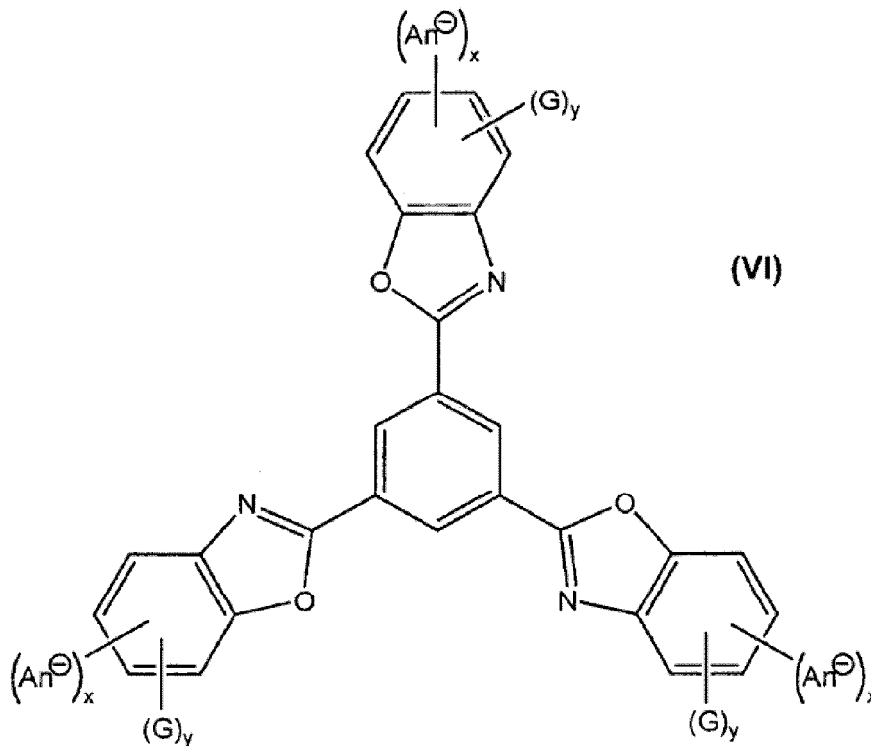
25 6. El procedimiento según la reivindicación 1 que comprende además regenerar la fase estacionaria, en donde la regeneración comprende (a) tratar la fase estacionaria con una solución de uno o más compuestos entre un hidróxido de metal alcalino, una sal de metal alcalino, un hidróxido alcalino térreo, una sal alcalino térrea, un ácido orgánico, un ácido alquilsulfónico, un hidróxido de amonio cuaternario, una sal de amonio cuaternario, una sal de alquilamina, en donde la solución puede comprender además un tampón de pH adecuado o (b) tratar la fase estacionaria con una solución que comprende agua y un co-disolvente orgánico.

30 7. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el compuesto desplazador polianiónico poliaromático tiene la fórmula (V):



en la que en (V), cada  $An^-$ , cada G, cada x y cada y se pueden elegir independientemente y se definen como en la reivindicación 1.

8. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el compuesto desplazador polianiónico poliaromático  
5 tiene la fórmula (VI):

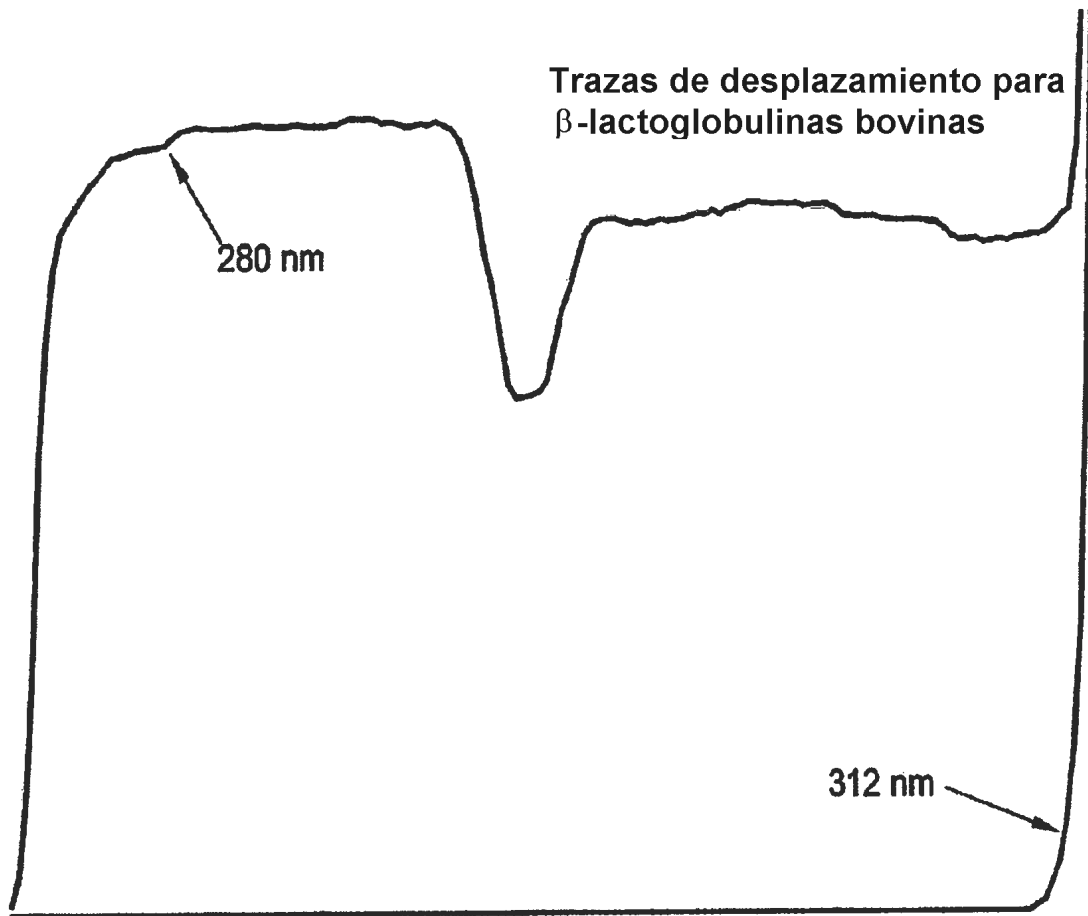


en la que en (VI), cada  $An^-$ , cada G, cada x y cada y se pueden elegir independientemente y se definen como en la reivindicación 1.

9. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que la mezcla comprende:

- 10 (a) uno o más anticuerpos, naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales anticuerpos;  
 (b) una o más enzimas, naturales o recombinantes, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales enzimas;  
 (c) una o más proteínas y/o polipéptidos, naturales o recombinantes, para uso diagnóstico, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos;

- (d) una o más proteínas y/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;
- (e) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, plasma sanguíneo animal o humano, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos;
- 5 (f) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, material vegetal o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos;
- (g) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más de leche animal o humana o leche derivada de un animal recombinante, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos;
- 10 (h) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, huevos aviares, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos;
- (i) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, bacterias, levaduras, hongos, virus o insectos, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos.
- (j) una o más proteínas o polipéptidos derivados de uno o más, natural o recombinante, cultivos de células de mamíferos o tejido animal, o una mezcla de dos o más cualquiera de tales proteínas y/o polipéptidos; o
- 15 (k) uno o más compuestos orgánicos, fármacos o productos intermedios de fármacos, o una mezcla de dos o más cualquiera de los mismos.
10. El procedimiento según la reivindicación 9 en el que en (k) uno o más del uno o más compuestos orgánicos, fármacos o productos intermedios de fármacos, son quirales.



**FIG. 1**

Purificación de mezcla de  $\beta$ -lactoglobulinas bovinas  
 Cromatografía de intercambio aniónico. Modo desplazamiento

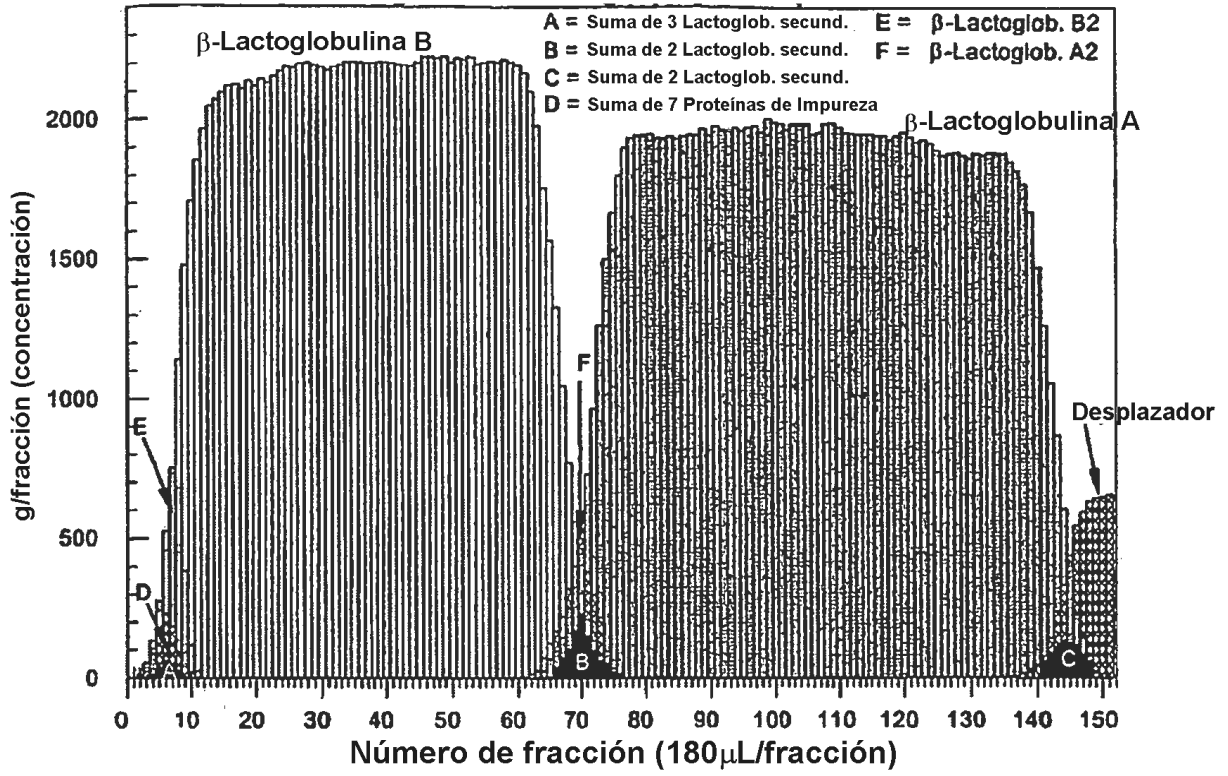


FIG. 2