

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 348**

51 Int. Cl.:

B01J 20/286 (2006.01)

B01J 41/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2005** **PCT/EP2005/012397**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2006** **WO06058623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2005** **E 05807593 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 1817109**

54 Título: **Material de separación de tipo intercambio aniónico de modo mixto**

30 Prioridad:

04.12.2004 EP 04028798

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

11.11.2020

73 Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es:

LINDNER, WOLFGANG y
LAEMMERHOFER, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 792 348 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

Material de separación de tipo intercambio aniónico de modo mixto

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la ciencia de la separación y, en particular, a la invención de nuevos materiales de
sorción y separación que permiten el reconocimiento y la unión selectivos de compuestos como fármacos y otros
productos farmacéuticos, toxinas, metabolitos de fármacos y toxinas, compuestos agroquímicos, péptidos sintéticos,
biomoléculas tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, y su separación de impurezas,
interferencias o compuestos acompañantes molestos y no deseados. Los materiales van a usarse en separaciones a
10 escala preparativa y analítica. Procedimientos de purificación posteriores preparativos son otro foco primario de los
materiales inventados.

Antecedentes de la invención y técnica anterior

15 Los compuestos químicos producidos para el uso como sustancias farmacológicas, compuestos agroquímicos,
compuestos de diagnóstico, aditivos alimentarios, aromas, etc. se ven sometidos a exigencias de calidad rigurosas en
cuanto a pureza o presencia de impurezas químicas y estereoquímicas. Como nivel de pureza típico, se dice que un
compuesto con < 0,1% de impureza es puro en la química farmacéutica. Por motivos de seguridad, el umbral de
notificación de impurezas en sustancias farmacológicas se ha fijado por tanto en el 0,05%, lo que significa que los
procedimientos analíticos adoptados para el control de calidad necesitan ser capaces de detectar y cuantificar las
impurezas hasta este porcentaje o límite de cuantificación. Tales límites de cuantificación bajos son difíciles de alcanzar
20 y requieren ensayos con alta selectividad garantizando de ese modo su exactitud. Los métodos cromatográficos son a
menudo la metodología preferida para hacerlo, en particular conjuntamente con la detección por espectrometría de
masas altamente sensible y selectiva.

25 Las impurezas que generalmente son compuestos orgánicos relacionados con procesos y fármacos se originan a partir
de la fabricación o el almacenamiento y pueden provenir de materiales de partida, subproductos de reacciones,
productos de degradación, reactivos, ligandos, catalizadores, etc. Después de la síntesis, los productos se purifican
habitualmente por medios químicos comunes tales como extracción, cristalización, destilación. Sin embargo, para llegar
a la alta calidad farmacéutica (pureza) especificada anteriormente, a menudo se emplea actualmente una etapa final de
purificación cromatográfica. En la mayoría de los casos, se trata de cromatografía con superficies químicamente
modificadas. Los materiales que son el objeto de la presente invención cumplen con la aplicación tanto analítica como
preparativa y pueden emplearse para compuestos básicos, neutros, ácidos y anfóteros.

30 Un problema de purificación aún no resuelto satisfactoriamente surge en particular de péptidos sintéticos que son de
uso excepcionalmente amplio como fármacos, transportadores de fármacos, compuestos de diagnóstico, radiofármacos,
vacunas sintéticas, compuestos de investigación bioactivos, elementos estructurales, sondas estructurales, patrones
analíticos, y así sucesivamente.

35 En general, la síntesis de péptidos, ya sea mediante síntesis en fase sólida o estrategias de química en fase de
disolución, proporciona no solo el péptido objetivo, sino también impurezas que pueden resultar del acoplamiento
múltiple debido a desprotección, acoplamiento fallido (secuencias delecionadas), hidrólisis de cadenas laterales
protegidas (por ejemplo, éster *t*-butilico de Glu), formación de imida, desamidación (por ejemplo, de cadenas laterales
de Gln, Asn), racemización (que produce epímeros o diastereómeros), oxidación, intercambio de S-S, β -eliminación, y
así sucesivamente.

40 Después de los procedimientos de limpieza iniciales convencionales, estas impurezas todavía están presentes.

45 Por tanto, se exige una etapa final de purificación cromatográfica para llegar a la pureza requerida. Hoy en día, esta
purificación cromatográfica final se realiza normalmente mediante cromatografía de líquidos de fase inversa de elución
en gradiente (RP-HPLC) con acetonitrilo como modificador orgánico (que contiene ácido trifluoroacético al 0,1%) usando
habitualmente sílice modificada con octadecilo (ODS) como fase estacionaria. Aunque este método ofrece en principio
buena selectividad y alta eficiencia, desafortunadamente a menudo falla en particular para péptidos muy hidrófilos o
también muy hidrófobos, así como péptidos estrechamente relacionados de manera estructural que a menudo están
presentes como impurezas. Tales productos secundarios aparecen en los cromatogramas de RP-HPLC como picos
menores acompañantes en las proximidades cercanas al extremo frontal o trasero del pico del componente principal,
que no se resuelven suficientemente. Si se trata de separaciones preparativas donde la sobrecarga es obligatoria para
50 lograr una productividad suficiente, tienden a eluirse conjuntamente con el componente principal, lo que es
particularmente crítico y molesto cuando el péptido tiene que producirse con calidad de fármaco (menos del 0,1% de
impureza).

Problemas y consideraciones similares son válidos para oligopéptidos sintéticos de interés farmacéutico que también se
preparan mediante síntesis en fase sólida.

55 Otro campo de aplicación importante de la cromatografía ha sido el procesamiento posterior de biopolímeros, en
particular proteínas para su purificación. Las proteínas que se purifican cromatográficamente incluyen enzimas,

hormonas, receptores, transportadores, proteínas plasmáticas, anticuerpos monoclonales y policlonales, proteínas de membrana, proteínas recombinantes, y así sucesivamente. El procesamiento posterior, por ejemplo, de un caldo de fermentación, consiste en varias etapas en las que la cromatografía es una opción aceptada incluso en etapas de purificación tempranas. Por ejemplo, en la etapa de captura y/o la separación celular, puede emplearse cromatografía de lecho expandido, que es un método relativamente nuevo para la purificación del caldo celular. El medio de separación se empaqueta de manera suelta en la columna y se fluidifica durante la ejecución. Por tanto, las células pueden fluir a través de la columna, mientras que las proteínas pueden unirse al material de separación.

La fuerza iónica del medio tiene que ser lo suficientemente alta como para impedir que las células se unan. Alternativamente, también pueden utilizarse medios de intercambio iónico económicos para la adsorción discontinua para esta primera etapa de purificación. La etapa de purificación típica se realiza normalmente mediante cromatografía usando modos como intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad usando ligandos de afinidad como iones metálicos complejados, proteína A, proteína G, heparina o tintes. En lugar de lechos de sorbentes particulados, se conoce el uso de membranas derivatizadas como una alternativa interesante (M. Kastner, Ed., *Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library*, volumen 61, Elsevier, Ámsterdam, 2000). Además, se emplean frecuentemente cromatografía de fase inversa, cromatografía en gel e intercambio iónico para la purificación final (pulido) de productos proteicos o para la eliminación de virus y endotoxinas. A menudo se requieren condiciones biocompatibles o al menos preferidas. Este es un inconveniente considerable de los materiales y métodos de RP convencionales, que requieren condiciones de elución que pueden conducir a desnaturalización. Además, una capacidad de carga de muestra baja es típica de la cromatografía RP, como de varios otros modos de cromatografía de proteínas, tal como cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) o cromatografía de afinidad como proteína A/G como ligando cromatográfico. Si es necesario mantener la bioactividad, es necesario adoptar métodos como cromatografía de afinidad e intercambio iónico. Aunque esta última tiene una capacidad baja, la alta capacidad de carga de muestras es una de las fortalezas del intercambio iónico. Estas y otras ventajas y desventajas se analizan en detalle en libros de texto sobre la separación de proteínas (por ejemplo, en M. Kastner (Ed.), *Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library*, volumen 61, Elsevier, Ámsterdam, 2000).

En el presente documento se propone un concepto para medios de separación basados en diversos materiales de soporte modificados con ligandos que contienen tanto sitios de intercambio aniónico como sitios de unión basados en interacciones no iónicas. Los distintos dominios de unión se integran en la estructura del ligando en una combinación secuencial de los elementos estructurales respectivos, conduciendo así a un material de separación de tipo multimodal. Los sitios de intercambio aniónico de los materiales de separación según la presente invención contienen nitrógeno endocíclico en sistemas cíclicos con dos o más anillos como grupos de amina secundaria, terciaria o cuaternaria. Ejemplos de tales sistemas de anillo son el sistema de quinuclidina o tropano. Esto conduce a efectos sorprendentes tales como selectividades potenciadas en gran medida y capacidades de carga enormemente mejoradas en comparación con materiales que utilizan los grupos interactivos químicos individuales como modificaciones de superficie de los portadores. Los nuevos materiales de separación van a usarse para la separación y purificación de compuestos como fármacos, productos intermedios de fármacos, toxinas, metabolitos de fármacos y toxinas, productos químicos finos, productos farmacéuticos, péptidos sintéticos, compuestos biológicos tales como péptidos, proteínas, ARN, ADN e hidratos de carbono y muchos otros.

Tal como se indica tradicionalmente, el método de separación y purificación más frecuentemente utilizado para fármacos, productos farmacéuticos y péptidos es cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC). La separación se lleva a cabo sobre materiales que presentan zonas de superficie hidrófoba o capas de superficie formadas por cadenas de alquilo largas (fases C8 o C18) o polímeros hidrófobos (fases estacionarias de RP poliméricas) (para ejemplos típicos véase H. Schlüter en: M. Kastner (Ed.), *Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library*, volumen 61, Elsevier, Ámsterdam, 2000, p. 157, tabla 3.1, o V.R. Meyer, *Practice of high-performance liquid chromatography*, Salle + Sauerländer, 1990, apéndices, resumen de columnas comerciales). La selectividad se basa en diferencias de lipofilidad de los solutos que van a separarse que se traduce en una adsorción diferencial de los solutos. Algunas fases RP nuevas tienen una ocupación de extremos hidrófila o incorporan un grupo hidrófilo en la hebra de alquilo tal como una amida, carbamato o sulfonamida, que entonces se denominan fases RP incrustadas polares. Estas fases RP permiten su funcionamiento también con eluyentes puramente acuosos y en algunos casos los grupos polares proporcionan una contribución de retención adicional, por ejemplo, para solutos hidrófilos. Tales fases estacionarias de tipo RP están disponibles en una gran variedad de variantes de un gran número de proveedores. Difieren de los materiales de la presente invención en la falta del sitio de intercambio aniónico. Asimismo, materiales de separación moderadamente hidrófobos que portan normalmente ligandos de fenilo o alquilo C1 a C8 como restos interactivos que se usan para cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (para ejemplos véase L.R. Jacob en: M. Kastner (Ed.), *Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library*, volumen 61, Elsevier, Ámsterdam, 2000, p. 240, tabla 4.1) no presentan tampoco un sitio de interacción iónica para intercambio (an)iónico. Lo mismo se aplica también a muchas fases estacionarias para cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) que pierden este resto interactivo cargado positivamente (sitio de intercambio aniónico). Por el contrario, materiales de intercambio aniónico clásicos tal como se resumen por P.H. Roos en: M. Kastner (Ed.), *Protein Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library*, volumen 61, Elsevier, Ámsterdam, 2000, p. 18, tabla 1.4, pierden el ligando de cadena de alquilo larga hidrófoba y por tanto la contribución de interacción hidrófoba. Por otro lado, los intercambiadores aniónicos convencionales también carecen de los sitios de interacción hidrófila adicionales que son típicos para materiales de HILIC. Además, se indica que los intercambiadores aniónicos clásicos así como intercambiadores aniónicos adecuados

para HILIC se basan en aminas no cíclicas o, en otras palabras, se sintetizan a partir de aminas alifáticas, no cíclicas como elementos estructurales y por tanto pueden distinguirse claramente mediante este criterio de la presente invención.

Recientemente, la cromatografía de modo mixto que se basa en al menos dos modos de interacción, en la mayoría de los casos intercambio iónico e interacción hidrófoba, se ha vuelto más popular, porque parece que a menudo la resolución lograda supera la de separaciones cromatográficas de un solo modo individuales separadas correspondientes. Tal cromatografía de modo mixto puede llevarse a cabo en varias variantes diferentes, que se han revisado por L.W. McLaughlin (1989) en Chem. Rev. 89, páginas 309 - 319:

Categoría 1: Acoplamiento en línea de diferentes columnas empaquetadas con materiales de separación de un solo modo convencionales individuales que son más o menos ortogonales entre sí: por ejemplo, una columna de fase inversa puede acoplarse en línea a una columna de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio aniónico-cación/de interacción hidrófila de modo mixto se utilizó, por ejemplo, por Stregé *et al.* (Anal. Chem., 2000, 72, 4629-4633). El método compara las selectividades obtenidas por una combinación en línea secuencial de columnas distintas (empaquetadas con los sorbentes individuales, a saber, intercambiador aniónico, intercambiador catiónico y material de HILIC) con las selectividades proporcionadas por las columnas individuales solas.

Categoría 2: Cromatografía de modo mixto con columnas de lecho mixto: la combinación de distintos materiales de separación, tal como intercambiador de iones y partícula de fase inversa en una sola columna de HPLC conduce a columnas de lecho mixto que pueden proporcionar una selectividad complementaria en comparación con las columnas empaquetadas con partículas cromatográficas de un solo modo convencionales individuales. Por ejemplo, se ha sugerido la combinación de dos tipos de materiales diferentes, tales como partículas de RP e intercambiador aniónico (por ejemplo, partículas de intercambiador aniónico fuerte) en una sola columna como alternativa a combinar diferentes mecanismos de retención, y tales columnas están disponibles comercialmente, por ejemplo, con el nombre comercial Duet® de Hypersil.

Categoría 3: Las distintas funcionalidades interactivas, tal como el grupo intercambiador iónico y el resto hidrófobo, se ubican en diferentes componentes del material de separación, es decir, uno en el ligando cromatográfico dedicado y el otro en el soporte, y por tanto están separados espacialmente. A menudo, el sitio de interacción en el soporte, que es más un grupo interactivo residual no deseado en lugar de un grupo funcional dedicado o personalizado, no es muy accesible por los compuestos que se separan, perdiendo por tanto la selectividad correspondiente. Tales materiales se obtienen habitualmente, si un soporte que tiene una funcionalidad específica o un carácter fisicoquímico, tal como una naturaleza hidrófoba, se derivatiza con otra funcionalidad como un grupo iónico. En tales casos, las interacciones del soluto con el soporte se consideran interacciones secundarias que se evalúan habitualmente como perjudiciales y, por tanto, se evitan o al menos se minimizan (por ejemplo, mediante la elección de condiciones apropiadas de la fase móvil, procedimientos de ocupación de extremos, recubrimiento o protección). Materiales de poli(estireno-co-divinilbenceno) modificados con (alquil)amino van a clasificarse en esta categoría (C. G. Huber *et al.*, LC-GC, 14, 1996, 114).

Categoría 4: En otra variación, las dos funcionalidades interactivas complementarias pueden estar presentes en dos ligandos cromatográficos separados espacialmente distintos, pero inmovilizados aleatoriamente en la misma partícula de soporte conduciendo a una distribución espacial incontrolada de los dos ligandos distintos: tales adsorbentes a base de sílice podrían sintetizarse, por ejemplo, si para el procedimiento de inmovilización se usa una mezcla de dos silanos diferentes, portando cada uno uno de los restos interactivos. La combinación de dos mecanismos de interacción diferentes, tal como intercambio aniónico e interacción hidrófoba en una sola partícula cromatográfica, pero en dos ligandos interactivos distintos (por ejemplo, grupos trimetilamonio y alquilo C8 o C18 inmovilizados sobre sílice) se ha aprovechado previamente en extracción en fase sólida (C.F. Poole, Trends Anal. Chem., 2003, 22, 362-373; M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A, 856, 1999, 3-54). Tales materiales de SPE de modo mixto están disponibles comercialmente de varios proveedores, incluyendo Waters (Oasis® MAX) e International Sorbent Technology (Isolute® HAX). Este tipo de intercambiador aniónico/fase inversa de modo mixto se ha desarrollado específicamente para la electrocromatografía capilar (CEC) mediante copolimerización de dos tipos de monómeros, uno que porta el grupo alquilo C18 y el otro que porta grupos N-benciltrimetilamonio cuaternario sobre la superficie de partículas de sílice modificadas con vinilo, en donde el sitio de intercambio iónico cumple la función de generación de flujo electroosmótico, mientras que el ligando hidrófobo es el principal responsable de la selectividad y separación (Scherer *et al.*, J. Chromatogr., A 924, 2001, 197-209).

Categoría 5: El último tipo de material cromatográfico de modo mixto tiene los dos (o más) sitios de interacción distintos en un solo ligando cromatográfico.

La presente invención proporciona nuevos tipos de medios cromatográficos de modo mixto que pertenecen a la quinta categoría: sitios de interacción distintos tales como intercambio aniónico y restos hidrófobos o hidrófilos en un solo ligando cromatográfico. A continuación se resumen documentos de la técnica anterior en relación con la quinta categoría y productos comerciales.

El documento WO 96/09116 da a conocer sorbentes de modo mixto que comprenden bases heteroaromáticas que contienen nitrógeno. Se dan a conocer sorbentes de modo mixto similares en el documento WO 00/69872. El

documento WO 01/38228 da a conocer un método para la adsorción por intercambio aniónico e intercambiadores aniónicos que comprenden una matriz de base que porta una pluralidad de ligandos de intercambio aniónico de modo mixto que comprenden una estructura cargada positivamente y una estructura hidrófoba. Entre un gran número de estructuras de ligando alternativas dadas a conocer en este documento, se mencionan también algunas estructuras cíclicas. Lo mismo es válido para la divulgación del documento WO 97/29825.

El documento US 5.147.536 da a conocer materiales de intercambio aniónico, por los cuales el grupo aniónico consiste en dos grupos cargados positivamente a una distancia de dos átomos uno de otro. Estos grupos cargados positivamente pueden ser parte de una estructura lineal o de estructuras cíclicas. Entre estos están derivados de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO). Según la invención dada a conocer en este documento, el espaciador, que une el grupo aniónico al soporte insoluble, se supone que no interacciona con las moléculas de la muestra. En consecuencia, sorbentes que comprende derivados de 1,4-diaza-bicyclo[2.2.2]octano (DABCO) no son parte de la presente invención.

El documento WO 02/053252 da a conocer métodos de separación usando adsorbentes de modo mixto de diversos tipos, algunos de los cuales comprenden más de un tipo de ligando unido al soporte, mediante lo cual al menos uno de los ligandos puede estar cargado (por ejemplo, cargado positivamente) y es capaz de intercambio iónico.

A continuación se comentan documentos que dan a conocer sorbentes de modo mixto comercializados del tipo mencionado anteriormente o aplicaciones de los mismos: una columna de HPLC (nombre comercial BSC 17 de Cluzeau Info Labo, Saint Foy la Grande, 33220 Francia) está disponible comercialmente de Ehrenstorfer, que está empaquetada con un intercambiador aniónico cuaternario que contiene un sustituyente de alquilo hidrófobo; el ligando es un 3-(N-dodecil-N,N-dimetilamonio)-propilsilice (la aplicación de este tipo de material se ha descrito por J.-P. Steghens *et al.* (2003) *J. Chromatogr. B* 798, páginas 343 - 349). De manera similar, Allsep Technologies ofrece columnas que contienen grupos funcionales cargados positivamente derivatizados con grupos alquilo hidrófobos (nombres comerciales Primesep® B, Primesep® B2). Las estructuras exactas no se dan a conocer, pero según el esquema de la guía de solicitud el grupo básico es un ion de amonio cuaternario no cíclico. D.M. Lubman y colaboradores describen el uso de una fase estacionaria de modo mixto (fase inversa C18/intercambio aniónico) que se obtuvo de Alltech (Deerfield, IL) para el análisis de péptidos por CEC-espectrometría de masas (*Anal. Chem.*, 71, (1999), páginas 1786 y ss.). Según los autores, el material consiste en un sustrato de sílice esférico unido con un solo ligando que contiene tanto fase inversa (C18) como dialquilamina en una razón de 1:1 fija. De manera similar, Hayes y Malik notifican el desarrollo de monolitos de sílice con ligando de cloruro de N-octadecildimetil(3-trihidroxisilil-propil)amonio *in situ* incorporado en la matriz de sol-gel y su evaluación para CEC (*Anal. Chem.*, 72, (2000), páginas 4090 y ss.). J. Zhao *et al.* describieron una zircona de poliestireno trimetilaminada cuaternizada como material de intercambio aniónico fuerte para HPLC que tiene un mecanismo de retención de modo mixto con intercambio aniónico e interacción hidrófoba así como interacciones ácido/base de Lewis (*Anal. Chem.* 72, (2000), páginas 4413-4419). Burton *et al.* prepararon matrices de celulosa de perlas de Sepharose y Perloza de modo mixto que portan grupos hidrófobos e iónicos obtenidos uniendo ligandos de amina hidrófobos a epiclorohidrina (*Biotechnology & Bioengineering*, (1997), 56, páginas 45-55). B.-L. Johansson *et al.* notificaron la síntesis y evaluación de medios de separación de intercambio aniónico multimodales con ligandos basados en aminas primarias y secundarias aromáticas y no aromáticas (o ambas), y además grupos hidroxilo adyacentes al sitio de intercambiador aniónico para la captura de proteínas a alta concentración de sal a partir de caldo de fermentación (*J. Chromatogr. A*, 1016, (2003), páginas 21-33). Los productos BioSeptra® (de Ciphergen) tales como material MEP HiperCel® para cromatografía de inducción de carga hidrófoba y material MBI HiperCel® para cromatografía de modo mixto combinan también más de un mecanismo de separación en un solo ligando. El material MEP HiperCel® se obtiene inmovilizando 4-vinilpiridina sobre un soporte cromatográfico alquilado con mercapto mediante adición por radicales produciendo un ligando de 4-[2-(alquiltio)-etil]piridina sobre la superficie del material de separación. El grupo piridina es solo débilmente básico ($pK_a = 4,8$). El principio básico es aprovechar o bien interacciones hidrófobas entre el ligando (a alto pH, $pH > pK_a$, es decir, $pH > 5,8$) y el soluto que contiene tanto grupos hidrófobos como cargados positivamente (específicamente diseñados para biomoléculas tales como proteínas, en particular anticuerpos) o interacciones electrostáticas repulsivas entre el ligando cromatográfico cargado positivamente (a bajo pH, $pH < o$ alrededor del pK_a , es decir, pH entre 4-5,8) y el soluto ionizado positivamente. Los dos tipos diferentes de interacciones se aprovechan normalmente de manera secuencial, a saber, adsorción o unión, por ejemplo, de anticuerpos a "alto" pH (alrededor del neutro) y desorción o elución a bajo pH (alrededor de pK_a de piridina). El material MBI HiperCel® para cromatografía de modo mixto se basa de manera similar en un grupo que contiene nitrógeno aromático, que en contraposición al material MEP HiperCel®, sin embargo, porta además un grupo ácido sulfónico fuertemente ácido. El ligando es ácido 2-mercaptobencimidazol-5-sulfónico unido a través del grupo mercapto a un soporte funcionalizado con epoxi mediante sustitución nucleófila. El material resultante puede clasificarse como un intercambiador catiónico de modo mixto. Fases de modo mixto adicionales tales como RP de modo mixto/intercambiadores catiónicos (por ejemplo, columna de cromatografía de líquidos ABx que es un intercambiador catiónico débil: esta matriz de intercambio iónico de modo mixto basada en sílice se empleó para la purificación de anticuerpos monoclonales tal como describen Ross *et al.*, *J. Immunological Anatomy and Biology*, (1987), 102, páginas 227-231), o fases de cromatografía de membrana artificial inmovilizadas (fases IAM de C.Pidgeon), o materiales de HILIC zwitteriónicos de modo mixto (ZILIC, K. Irgum) se han dado a conocer en la bibliografía.

Ninguno de los documentos anteriores de la técnica anterior da a conocer sorbentes de modo mixto con grupos de intercambio aniónico basados en sistemas cíclicos monobásicos con nitrógeno endocíclico y con dos o más anillos como grupos amina secundaria, terciaria o cuaternaria como quinuclidina y tropano, así como sus isómeros o las estructuras más complejas de fórmulas Ic a Si. PÉTER A: "Direct high-performance liquid chromatographic

5 enantioseparation of apolar beta-amino acids on a quinine-derived chiral anion-exchanger stationary phase", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, ÁMSTERDAM, PB, vol. 955, n.º 1, 26 de abril de 2002 (26-04-2002), páginas 141-150 da a conocer una fase estacionaria de intercambio aniónico quiral derivada de quinina para la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución directa de enantiómeros de beta-aminoácidos protegidos con N. El documento WO9746557 da a conocer selectores quirales basados en cinconano inmovilizados sobre materiales de soporte para la separación de estereoisómeros.

10 La quinina y sus isómeros y derivados como, por ejemplo, quinidina, 10,11-dihidroquinina o 10,11-dihidroquinidina se han usado como efectores quirales (J. Chromat. A. 741 (1996) páginas 33-48 y Tetrahedron Asymmetry 14 (2003) páginas 2557 - 2565). Con el fin de lograr buenas separaciones quirales, se optimizan sorbentes para cromatografía quiral de un modo que las interacciones quirales son de lejos las más relevantes y los otros tipos de interacciones no quirales (por ejemplo, iónicas o hidrófobas) se evitan en lo posible. Estos alcaloides se resumen como alcaloides de cinchona. Los sorbentes que comprenden tales alcaloides de cinchona no son parte de la presente invención.

Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere a materiales de separación de tipo intercambio aniónico multimodales y al uso de los mismos para separar al menos dos solutos tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Los materiales de separación de tipo intercambio aniónico multimodales se construyen de dominios de unión/interacción modulares en un solo ligando interactivo funcional.

20 Según la presente invención, el sitio de intercambio aniónico se basa en estructuras con nitrógeno endocíclico en sistemas cíclicos con dos anillos como grupos amina terciaria o cuaternaria obtenidos a través de la incorporación de un sistema de anillos de quinuclidina.

La disposición (secuencia) química y espacial de los dominios de interacción individuales en el ligando interactivo permite la modulación del efecto de unión. A través de la combinación y la secuencia de estos múltiples sitios de unión (intercambio aniónico más grupos hidrófobos y/o hidrófilos, es decir, enlaces de hidrógeno) los materiales son capaces de unirse a y separar compuestos químicos mediante más de un mecanismo de interacción y adsorción.

25 Objetivos de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar materiales de intercambio aniónico de modo mixto novedosos con el fin de mejorar el rendimiento de materiales de intercambio aniónico de modo mixto de la técnica anterior. En particular las mejoras se refieren a:

30 a) los intercambiadores aniónicos de modo mixto mejorados deben permitir la separación simultánea de solutos hidrófilos así como hidrófobos básicos, ácidos, neutros y anfóteros (analitos o compuestos que se separan) en un único proceso, ejecución cromatográfica preparativa o analítica.

35 b) Deben poder usarse para la separación y purificación de compuestos como fármacos, productos intermedios de fármacos, toxinas, metabolitos de fármacos y toxinas, pesticidas, productos químicos finos, productos intermedios, péptidos, proteínas, nucleótidos, nucleósidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, y mezclas de tales especies a partir de impurezas o compuestos relacionados.

c) Deben proporcionar selectividad complementaria y/o mejorada para las separaciones de compuestos mencionados en a) y b) en comparación con la técnica de cromatografía de un solo modo original tal como HPLC de fase inversa o cromatografía de intercambio aniónico, así como en comparación con sorbentes de modo mixto de la técnica anterior.

40 d) Tales materiales mejorados deben proporcionar una capacidad de carga de muestras potenciada que surge de la resolución mejorada y debido a la existencia del mecanismo de intercambio iónico.

e) La resolución mejorada y la capacidad de carga de muestras potenciada deben conducir a una ganancia significativa de productividad en separaciones o purificaciones a escala de proceso o preparativa.

45 f) Los adsorbentes de modo mixto deben diseñarse para que puedan usarse con eluyentes puramente acuosos sin ningún modificador orgánico o al menos con menor contenido de modificador orgánico en comparación con medios de separación de fase inversa típicos que son materiales de separación del estado de la técnica para compuestos mencionados en a) y b), y en particular de compuestos de bajo peso molecular, fármacos y péptidos.

50 g) El mecanismo cromatográfico de modo mixto proporciona más parámetros y variables de fase móvil para la optimización y el ajuste fino de la separación. Esto genera la posibilidad de que mezclas de compuestos que son difíciles de separar puedan resolverse así como que más picos de compuestos puedan aislarse unos de otros.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Separaciones por HPLC de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida y subproductos de su síntesis en fases estacionarias (a) basadas en N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina (ejemplo A1) y (b) de RP disponibles comercialmente. Para detalles experimentales véase el ejemplo B1.

Figura 2: Separación simultánea de clorpirifos (2A) y sus metabolitos (2B, 2C, 2E), así como un patrón interno (2D) en RP/WAX de modo mixto basada en N-undecenoil-3-aminoquinuclidina (RP/WAX del ejemplo A1). (2B) Fosfato de dietilo, (2C) tiofosfato de dietilo, (2D) fosfato de dibutilo (patrón interno), (2E) 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Para detalles experimentales véase el ejemplo B2.

Figura 3: Separaciones por HPLC de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida y subproductos de su síntesis en fases estacionarias de RP/WAX (a) basadas en N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina (ejemplo A1) y (b) basadas en N, N-dimetil-N-10-undecenoil-1,2-etanodiamina no cíclica. Para detalles experimentales véase el ejemplo C1.

Figura 4: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de sus productos secundarios usando un material de intercambio aniónico de modo mixto basado en 3- α -aminotropano. No según la presente invención. Para detalles experimentales véase el ejemplo B3.

Figuras 5 y 6: Comparación de las separaciones de péptidos mediante los modos de HILIC/WAX (figura 5) y RP (figura 6). Para detalles experimentales véase el ejemplo B4.

Figura 7: Separación de péptidos ácidos en una columna de monolito de sílice de RP/WAX. Para detalles experimentales véase el ejemplo B6.

Figuras 8, 9, 10 y 11: Comparación de separaciones mediante materiales de RP/WAX según la presente invención y materiales de la técnica anterior basados en el sintón de DABCO. Para detalles experimentales véase el ejemplo C2.

Figura 8: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de uracilo; para detalles experimentales véase el ejemplo C2 c).

Figura 9: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de uracilo; para detalles experimentales véase el ejemplo C2 d).

Figura 10: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de sus productos secundarios, (10A): producto secundario principal; (10B): N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida; para detalles experimentales véase el ejemplo C2 e).

Figura 11: Separación de una mezcla que consiste en butilbenceno (BuB), pentilbenceno (PeB), O,O-dietilfosforotioato (DETP) y N- (terc-butoxicarbonil)-prolil-fenilalanina (Boc-Pro-Phe); para detalles experimentales véase el ejemplo C2 f).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a materiales de separación de tipo intercambio aniónico multimodales y al uso de los mismos para separar al menos dos solutos tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Además, se describen en el presente documento materiales de separación de tipo intercambio aniónico multimodales contruidos de dominios de interacción/unión modulares en un solo ligando interactivo funcional (véase la fórmula I).

(SUP) - (L) - (NI) - (L) - (AX)	(I a)
(SUP) - (L) - (AX) - (L) - (NI)	(I b)
(SUP) - (L) - (NI) - (L) - (AX) - (L) - (NI)	(I c)
(SUP) - (L) - (AX) - (L) - (NI) - (L) - (AX)	(I d)
(SUP) - (L) - (NI) - (L) - (AX) - (L) - (AX)	(I e)
(SUP) - (L) - (AX) - (L) - (AX) - (L) - (NI)	(I f)

Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto de fórmula I comprenden los siguientes módulos: al menos un soporte ((SUP); portador, matriz) y un ligando que comprende una funcionalidad débilmente (WAX) o fuertemente (SAX) básica (AX) que se ioniza en las condiciones de uso y que representa por tanto un sitio de intercambio aniónico, un sitio que es adecuado para interacción no iónica (NI), y ligadores (L) entre estos módulos. El sitio de interacción no iónica y que depende de su estructura junto con el ligador permiten el ajuste de la hidrofobicidad/hidrofiliidad global del sorbente.

Los sitios de ligador (L) en la fórmula I pueden tener independientemente entre sí cualquier significado detallado a continuación. Según la presente invención, los grupos de intercambio aniónico se basan en sistemas cíclicos monobásicos con nitrógeno endocíclico y con dos anillos como grupos amina terciaria o cuaternaria obtenidos a través

de la incorporación de un sistema de anillos de quinuclidina. Los sitios de intercambio aniónico se describen en más detalle en un capítulo dedicado ("El sitio de intercambio aniónico (AX)").

A continuación se proporcionan detalles referentes a la selección del soporte (SUP), la funcionalidad básica ((AX), (WAX), (SAX)), el sitio de interacción no iónica (NI) y el ligador (L).

5 El soporte (SUP):

Para la mayoría de las aplicaciones, es necesario que los ligandos según la invención se inmovilicen sobre sistemas sólidos u, ocasionalmente, en sistemas de fase líquido-líquido, también matrices líquidas denominadas soporte. En todos los casos, el soporte forma una fase separada y permite que los ligandos se expongan apropiadamente a la disolución circundante, que contiene los compuestos objetivo que van a reconocerse selectivamente, permitiendo su unión. Por tanto, la naturaleza química y física del portador es variable, y la inmovilización puede ser o bien adsorbente o bien covalente, prefiriéndose en gran medida esta última. El soporte debe ser inactivo (inerte) con respecto a la unión del compuesto objetivo, pero tiene la función de garantizar la estabilidad química y física del sorbente. En aplicaciones de flujo continuo como la cromatografía, el soporte y, de ese modo, sus propiedades físicas, determinan las propiedades cinéticas de los materiales de sorción. El soporte puede ser un material poroso o no poroso de tipo híbrido inorgánico, orgánico o inorgánico-orgánico mixto. Tales materiales de soporte incluyen perlas comercialmente disponibles y personalizadas (hechas por uno mismo), materiales monolíticos o continuos, nanopartículas, membranas, resinas, capas confinadas en la superficie, superficies heterogéneas, perlas magnéticas. Después de la modificación apropiada del soporte con los ligandos, estos materiales se cargarán, empaquetarán o depositarán en cualquier forma, recipiente o molde tal como una columna, capilar, microchip, discos, capas apiladas y formatos similares, medios de envoltura o soporte (sustrato) como soluciones técnicas que permiten la aplicación de los materiales.

Químicamente, los soportes (matrices) se toman del grupo que comprende sílice (SiO_2), alúmina (Al_2O_3), zircona (ZrO_2), titanía (TiO_2), grafito, materiales cerámicos, materiales derivados de sol-gel, materiales híbridos silíceos orgánicos-inorgánicos, polisiloxanos reticulados y no reticulados opcionalmente sustituidos, cualquiera de los polímeros obtenidos a partir de monómeros de vinilo, reticulados y no reticulados opcionalmente sustituidos, tales como poli(met)acrilatos, poli(hidroxialquil(met)acrilatos), poli(met)acrilamidas, poliestirenos, polímeros mixtos de estireno-(met)acrilato, polímeros de metátesis (de apertura de anillo), polisacáridos tales como agarosa, dextrano, celulosa, almidón, poli(alcohol vinílico), y cualquiera de estos materiales funcionalizados específicamente para permitir la inmovilización del selector. Entre los soportes se encuentran perlas de sílice porosas, perlas de vidrio, perlas de polímero de poli(met)acrilato, tales como poli(metacrilato de glicidilo-co-metacrilato de etileno) poli(metacrilato de hidroxietilo-co-metacrilato de etileno), perlas de poli(met)acrilamida, monolitos de sílice, monolitos de poli(met)acrilato y poliestireno, monolitos de poli(met)acrilamida, resinas de poliestireno, que opcionalmente se modifican con grupos reactivos colgantes para la inmovilización del selector. Como soporte puede considerarse también una estructura principal de polímero lineal sintético o natural o una matriz de polímero enmarañada, de modo que el espaciador y el ligando representen realmente grupos colgantes del polímero responsables del reconocimiento molecular selectivo de los compuestos objetivo. Los polímeros de injerto son otra clase de soportes útiles.

Los soportes de las categorías mencionadas anteriormente se conocen bien en la técnica. Muchos de estos soportes están disponibles comercialmente. El soporte según la presente invención es sílice.

El sitio de intercambio aniónico (AX):

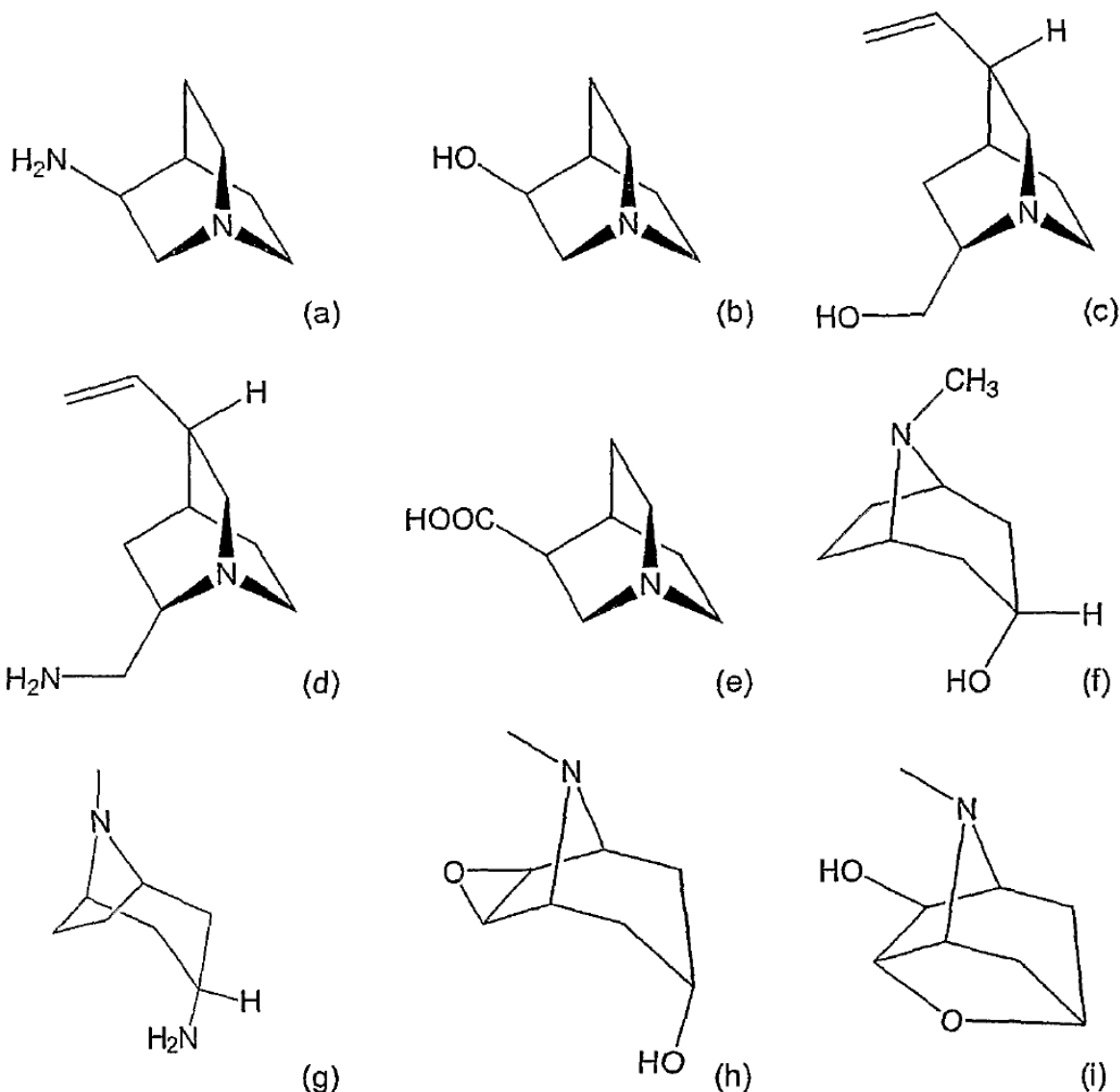
Uno de los sitios de interacción y dominios de unión del ligando es el sitio de intercambio aniónico (AX). El sitio de intercambio aniónico es el resultado de la incorporación de un sintón con una funcionalidad amino secundaria, terciaria y/o cuaternaria o una funcionalidad amidina o guanidina. Por tanto, el sitio de intercambio aniónico es un derivado de aza de un compuesto cíclico con dos o más estructuras de anillo que comprenden un grupo básico seleccionado de grupos amina secundaria, terciaria y/o cuaternaria, o grupos amidina o guanidina. El compuesto cíclico podría estar saturado o (parcialmente) insaturado, sin embargo, no es heteroaromático.

Ejemplos de tales sistemas de anillo son 1-azabicyclo[2.2.2]octano (quinuclidina), 8-azabicyclo[3.2.1]octano, 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]nonano, 9-azabicyclo-[3.3.1]nonano, 1-azabicyclo[4.4.0]decano tal como se obtienen mediante la incorporación de un anillo de quinuclidina y tropano. Sistemas de anillo similares más complejos como los sistemas de anillos tricíclicos pueden derivarse de 1-aza-adamantano. Por tanto, el término compuestos aza oligocíclicos se usa como término genérico para sistemas de anillos que contienen nitrógeno endocíclico en sistemas cíclicos con dos o más anillos como grupos amina secundaria, terciaria y/o cuaternaria. Ejemplos de sintones bicíclicos y tricíclicos como los ejemplificados anteriormente se representan en la fórmula II. Estos grupos funcionales están protonados en las condiciones en que se usan los materiales y, por tanto, ionizados. Por tanto, grupos cargados positivamente pueden interaccionar con grupos complementarios cargados negativamente de los solutos en la mezcla de solutos en contacto por interacción iónica (electrostática) como con los materiales convencionales de intercambio iónico. Se dan a conocer ejemplos de sistemas de anillos tricíclicos derivados de 1-aza-adamantano o 1,3-diaza-adamantano en Angew. Chemie (1962) 74, páginas 361-374. Otros sintones tricíclicos están disponibles comercialmente: por ejemplo, 3,5,7-trimetil-1-aza-adamantan-4,6,10-triona o 1,3,5-triaza-adamantan-7-ilamina.

El sitio de intercambio aniónico proviene de compuestos aza heterocíclicos con dos o más anillos y con al menos uno de los grupos amino secundario, terciario y/o cuaternario. Los ligandos con aminas secundarias y terciarias forman estructuras básicas débiles. El grupo amino secundario y terciario de estos sintones puede cuaternizarse fácilmente como última etapa de la síntesis del selector produciendo aminas cuaternarias y selectores básicos fuertes.

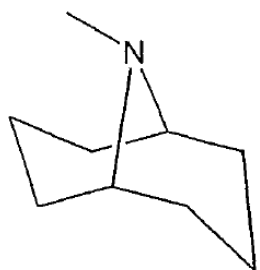
- 5 Normalmente, el nitrógeno endocíclico en los compuestos aza oligocíclicos alifáticos proporciona el sitio de intercambiador aniónico. En particular, un átomo de nitrógeno del sitio de AX es parte de dos estructuras de anillo. Los siguientes sistemas de anillos son ejemplos de una estructura de este tipo: la quinuclidina, el tropano, el 1-aza-adamantano, la pirrolizidina y la quinolizidina, así como el sistema de anillos de 1-aza-adamantano. Los átomos de hidrógeno del sistema de anillos pueden reemplazarse por uno o más residuos seleccionados de R, X, N (R')₂, SR', OR', COOR', en los que R puede ser alquilo C₁ - C₅, alqueno C₂ - C₄, X es halógeno, en particular Cl o Br, R' es H o alquilo C₁ - C₅. Si R es alquilo C₁ - C₅, R puede sustituirse por X, N (R')₂, SH, OH, COOH, en los que X y R' tienen el mismo significado que anteriormente. Si hay más de una sustitución, los grupos sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Si está presente un centro estereogénico o cualquier otro elemento quiral en el ligando, esto abarca todos los estereoisómeros individuales, y cualquier mezcla racémica o no racémica, y mezclas de estereoisómeros individuales en cualquier razón.

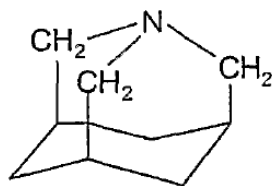


Fórmula II

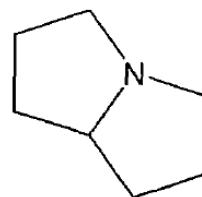
(Continúa en la siguiente página)



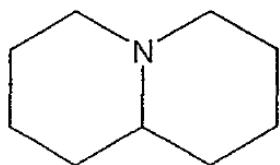
(k)



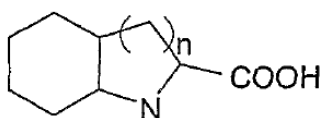
(l)



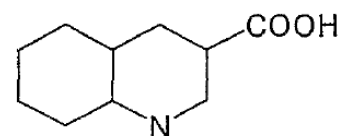
(m)



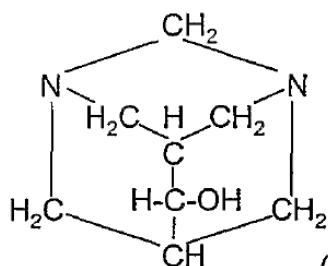
(n)



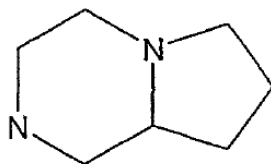
(o)



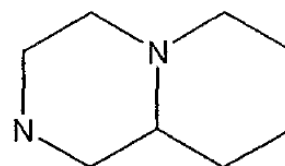
(p)



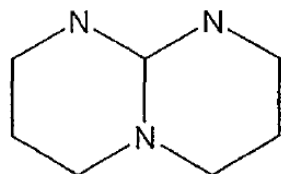
(q)



(r)



(s)



(t)

Fórmula II (continuación)

La fórmula II proporciona ejemplos de sintones para la generación del sitio de intercambio aniónico en los ligandos (selectores) de los materiales:

- 5 Fórmulas II (a) a (e): derivados de quinuclidina con diferente sustitución; (f): tropanol; (g): aminotropano; (h): escopina; (i): escopolina; (k): pseudopelletierina; (l): 1-aza-adamantano; (m): 1-azabicyclo[3.3.0]octano (pirrolizidina); (n): quinuclidina; (o): ácido 2-azabicyclo[4.3.0]nonano-2-carboxílico ($n = 1$), respectivamente ácido 1-azabicyclo[4.4.0]decano-2-carboxílico ($n = 2$); (p): ácido 1-azabicyclo[4.4.0]decano-3-carboxílico; (q): 1,3-diaza-adamantan-6-ol; (r): 1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonano; (s): 1,4-diazabicyclo[4.4.0]decano; (t): 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]decano.
- 10 Las fórmulas II (a) y II (d) son ejemplos de sintones para la generación del sitio de intercambio aniónico en los ligandos (selectores) de los materiales según la presente invención.

- El ligando comprende un compuesto mono aza oligocíclico con un átomo de nitrógeno endocíclico tal como se ejemplifica en la figura II (a) a (p). Especialmente ligandos que comprenden un compuesto mono aza oligocíclico, en el que el átomo de nitrógeno endocíclico es parte de al menos dos sistemas de anillos, se ejemplifican en las figuras II (a) a (n). En el presente documento se describen ligandos que comprenden un compuesto aza oligocíclico con nitrógeno endocíclico, que se selecciona de 1-azabicyclo[2.2.2]octano (quinuclidina), 8-azabicyclo[3.2.1]octano, 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]nonano (tropano), 9-azabicyclo[3.3.1]nonano, 1-azabicyclo[4.4.0]decano y 1-aza-adamantano. Los ligandos según la presente invención comprenden 1-azabicyclo[2.2.2]octano (quinuclidina).
- 15

- Tal como muestran los experimentos de comparación, el sitio de intercambiador aniónico con sus compuestos aza oligocíclicos alifáticos provoca evidentemente la superioridad sorprendente de los ligandos según la presente invención en comparación con análogos alifáticos no cíclicos de la técnica anterior. Esto se demuestra mediante el ejemplo C1.
- 20

Tal como se demuestra en el ejemplo C2, el sitio de intercambiador aniónico según la presente invención provoca evidentemente también una superioridad sorprendente en comparación con ligandos que comprenden el sintón de 1,4-diazabicio[2.2.2]octano (DABCO).

El sitio de interacción no iónica (NI):

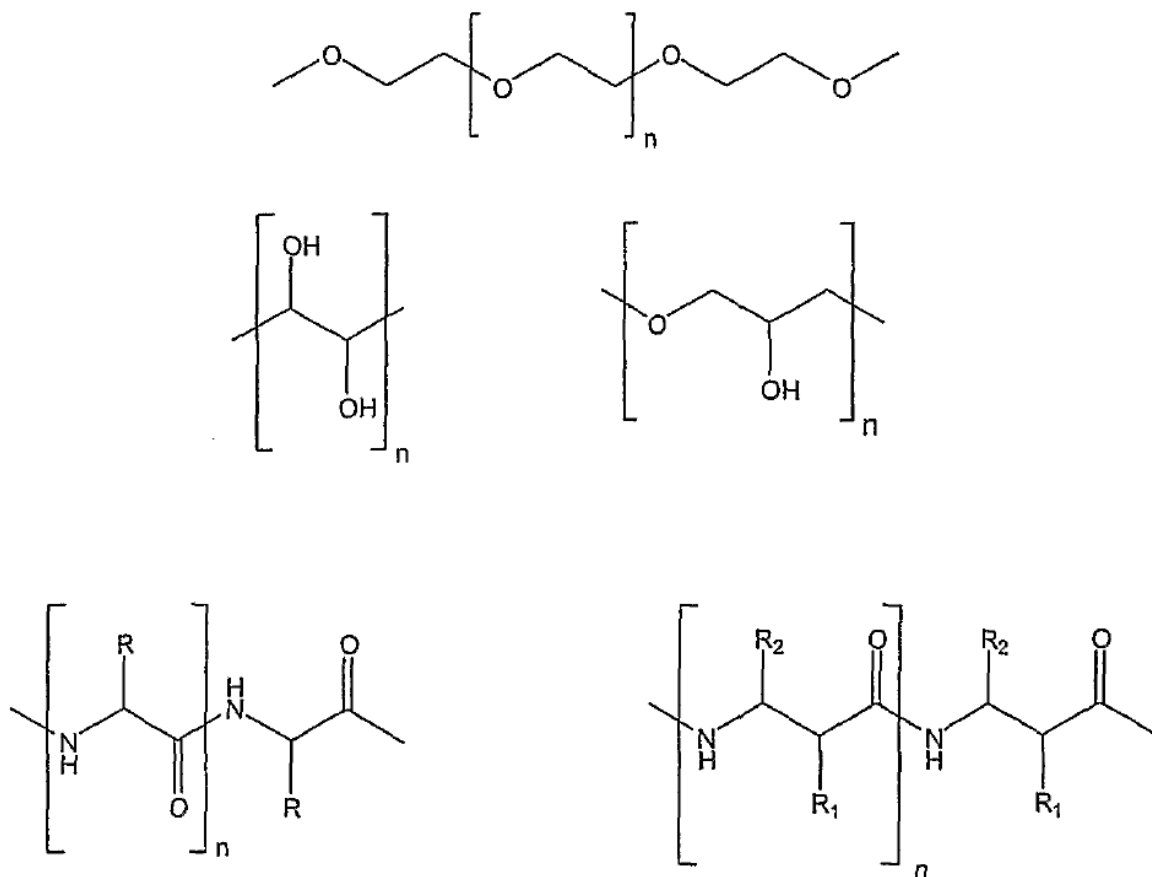
5 El sitio de interacción no iónica (sitio NI; véase la fórmula I) permite introducir un segundo modo de interacción. Dependiendo del soluto que va a separarse, este sitio podría actuar en modo de fase inversa (RP), en modo de interacción hidrófoba (HIC) o por medio de interacción hidrófila (HILIC). En más detalle, los materiales se componen de selectores de fase inversa/intercambio aniónico de modo mixto (RP/AX), interacción hidrófoba/intercambio aniónico de modo mixto (HIC/AX), interacción hidrófila/intercambio aniónico de modo mixto (HILIC/AX), o cualquier selector de AX con propiedades de hidrofobicidad que se encuentran en algún lugar entre los dos extremos de la escala de lipofilidad de HILIC y RP, y un soporte sólido o líquido (polimérico) (en este documento también denominado portador o matriz). La estructura del ligando representa el resto interactivo en la superficie de los materiales que proporciona unión selectiva y, por tanto, separación de solutos en una mezcla, cuando se ponen en contacto con el material en un entorno de fase líquida, mientras que el portador es, por definición, habitualmente inerte o ineficaz en cuanto a interacción con los solutos que van a separarse. Por tanto, es de importancia central la estructura química del ligando que contiene todos los sitios de unión modulares distintos en un solo resto de ligando, mediante lo cual la disposición posicional, geométrica y espacial de los dominios de unión individuales en el ligando es variable y puede adoptar cualquier combinación viable. Esta variabilidad es incluso más avanzada en las estructuras más complejas en las que el sitio (AX) y/o el (NI) está presente en más de un resto. Ejemplos de tales estructuras de ligando se representan en las fórmulas Ic a If.

20 El módulo de interacción no iónica permite el ajuste de la hidrofobicidad e hidrofiliidad global del selector, respectivamente, y por tanto también del material final. Los sitios de ligador contribuirán principalmente a sitios donadores/aceptores de hidrógeno y/o electrones. Si el sintón químico introducido como sitio de interacción no iónica es un grupo altamente hidrófobo, tal como una cadena de alquilo alifática lineal o ramificada, se obtendrá un material de RP/AX de modo mixto. Por otro lado, si el sitio de interacción no iónica es un grupo muy hidrófilo, tal como poliéter, cadena de alquilo polihidroxilada, poliamida o cadena de oligopéptido, resultará un material de HILIC/AX de modo mixto. Si el/los sitio(s) NI de los intercambiadores aniónicos de modo mixto está apropiadamente equilibrado, puede usarse un solo material de intercambio aniónico de modo mixto en los modos de RP-AX, HIC-AX, así como de HILIC-AX. Esto es válido para el material de la presente invención según el ejemplo A1, tal como muestran los ejemplos de uso B1, B4 y B5. En cualquier caso, el mecanismo de unión y separación será el resultado de un efecto de cooperación de los dominios individuales unidos secuencialmente, mucho más allá del rendimiento de los dominios individuales solos. Para la preparación de los materiales de fase inversa/intercambio aniónico (RP/AX) de modo mixto, el sitio de interacción no iónica está representado por una cadena de alquilo C₃-C₃₀ lineal o ramificada alifática hidrófoba opcionalmente sustituida larga, mediante lo cual uno o más grupos no adyacentes (-CH₂-) pueden reemplazarse por azufre (-S-). La hebra de alquilo o bien está ubicada entre el grupo de intercambio aniónico y el soporte (por ejemplo, fórmula Ia) de modo que el material de RP/AX tiene un sitio de intercambio aniónico terminal en la superficie de contacto o bien está directamente expuesta a la superficie de modo que el sitio de intercambio aniónico está en el interior (por ejemplo, fórmula Ib).

40 En el caso del material de interacción hidrófoba/intercambio aniónico (HIC/AX), el sitio de interacción no iónica está representado por un C₁ - C₆ alifático moderadamente hidrófobo, preferiblemente C₃-C₄, o grupo aromático o heteroaromático, mediante lo cual todas las demás definiciones son las mismas que para los materiales de RP/AX.

En el caso del material de interacción hidrófila/intercambio aniónico (HILIC/AX), el sitio de interacción no iónica está representado por un grupo hidrófilo. Se muestran ejemplos de sintones adecuados en la fórmula III.

45 En la fórmula III, se representan ejemplos de sintones para los grupos hidrófilos que van a usarse como elementos estructurales para los dominios de HILIC de los materiales de HILIC/AX (n representa un número entero entre 0 y 100, preferiblemente entre 0 y 20):

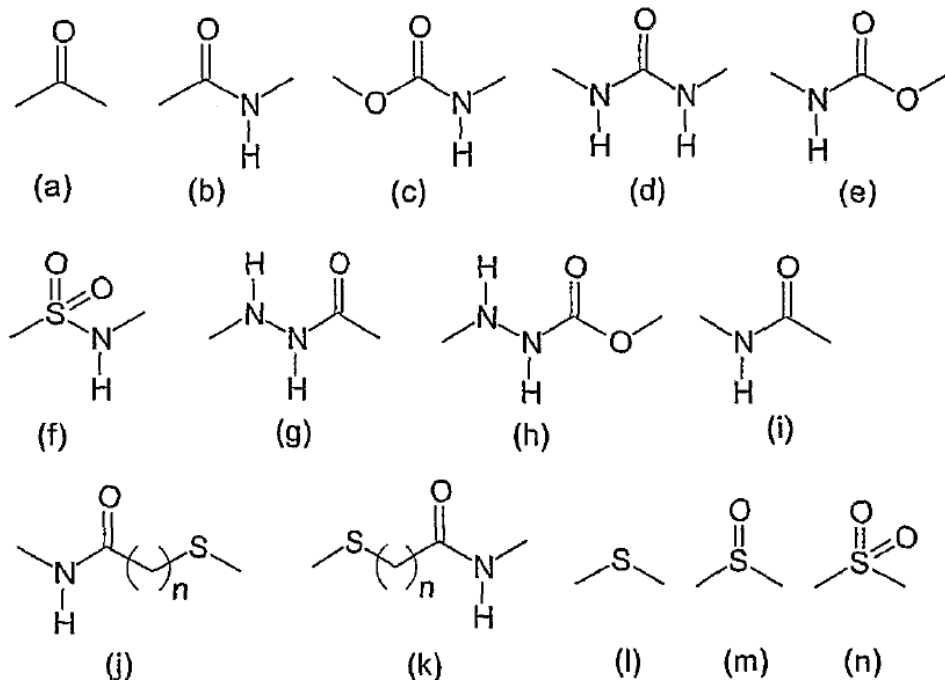


El ligador (L):

Los sintones de intercambio aniónico mostrados en la fórmula II pueden conectarse con la cadena de alquilo a través de un grupo funcional polar tal como se representa en la fórmula IV. Este grupo de ligador funcional hidrófilo representa un dominio de unión incrustado polar, que facilita el uso de los presentes materiales de la invención sin modificador orgánico o con bajo contenido de disolvente orgánico. Junto con el sitio de intercambio iónico, estabiliza el grosor de la capa lipófila en sistemas de fase móvil dominados acuosos (las cadenas de alquilo laterales colgantes no colapsan incluso en medio acuoso al 100%), pero introduce como dominio interactivo polar también nuevas selectividades que surgen a través de interacciones de enlaces de hidrógeno o dipolo-dipolo con sitios complementarios de los solutos.

En la fórmula IV se representan sintones para elementos de ligador polar (L) que conectan la cadena hidrófoba con el sintón de intercambio aniónico (n representa un número entero entre 0 y 20); véase también la fórmula I.

Fórmula IV



- 5 Para la inmovilización de los ligandos (selectores funcionales) sobre diversos soportes, pueden usarse todos los conceptos y enfoques de ligadores de fase sólida comunes para preparar fases estacionarias cromatográficas. Para ese fin, pueden utilizarse diversos soportes reactivos funcionalizados, incluyendo en particular tiol, amino, hidroxilo, hidroxilo activado, ácido carboxílico, ácido carboxílico activado, aldehído, epoxi, vinilo y matrices modificadas con halógeno. A continuación se describen algunas estrategias de inmovilización que se prefieren para la síntesis de los materiales:
- 10 i) sobre soporte modificado con tiol, incluyendo en particular sílice modificada con tiolpropilo y Fractogel® modificado con tiol:
- por reacción con un selector modificado con vinilo (a través de reacción de adición por radicales, copolimerización o reacción de adición de Michael)
 - por reacción con halógeno, en particular selector modificado con cloro, bromo y yodo por sustitución nucleófila
- 15 ii) sobre un soporte que contiene un grupo epoxi, tal como epoxi Fractogel®, monolitos de poli(metacrilato de glicidilo-co-dimetacrilato de etileno), sílice modificada con epoxi
- por reacción con espaciador reactivo o ligando que contiene grupos tiol, amino, hidroxilo que permite la inmovilización del selector (ligando) en una etapa posterior
- iii) sobre soporte modificado con amino tal como amino-propilsílice o Fractogel® modificado con amino
- 20 - por reacción de sustitución nucleófila con ligando o selector que contiene grupos epoxi, halógeno, hidroxilo activado
- mediante reacción de acoplamiento con ácido carboxílico del ligando o ligando modificado, o ácido carboxílico activado del ligando tal como acoplamiento de carbodiimida que forma unión por enlace peptídico
 - con grupos aldehído del ligando seguido por reducción del producto intermedio de base de Schiff
- 25 iv) sobre un soporte modificado con ácido carboxílico o soporte modificado con ácido carboxílico activado
- mediante reacción de acoplamiento con grupo amino del ligando o ligando modificado, tal como acoplamiento de carbodiimida que forma una unión por enlace peptídico
- v) sobre matrices que contienen grupos hidroxilo

- por activación de grupos hidroxilo con carbonato de O,O'-disuccinimidilo (DSC) o bis-imidazolilcarbonilo (BIC) seguido por reacción con grupo amino del ligando
- por reacción con grupos isocianato del ligando o ligando modificado

vi) sobre matrices activadas que contienen grupos hidroxilo tales como perlas activadas con tresilo

- 5 - por sustitución nucleófila con ligando que contiene grupos amino o tiol

vii) sobre soportes modificados con vinilo

- por copolimerización con ligando modificado con vinilo
- por adición por radicales del grupo tiol del ligando

Otros conceptos de inmovilización que pueden utilizarse incluyen

- 10 viii) monorreacción de un ligador de diisocianato asimétricamente con un resto selector modificado con amino o hidroxilo seguido por reacción con soporte modificado con amino o hidroxilo

ix) reacción de silanos bifuncionales, tales como 3-isocianatopropiltrióxosilano con un grupo amino o hidroxilo reactivo terminal del selector seguido por reacción de sililación con sílice que une el selector activado a la matriz de sílice,

- 15 x) reacción de hidrosililación de alcoxi o clorohidrosilano con un selector que contiene grupos vinilo, seguido por reacción de sililación con sílice que une el selector activado a la matriz de sílice,

xi) acoplamiento del soporte modificado con amino y el selector modificado con amino mediante reacción de cualquiera de los dos componentes con el componente de espaciador de anhídrido dicarboxílico, y activación posterior de la función ácido carboxílico resultante y reacción con el segundo componente de amino.

- 20 xii) otras estrategias de inmovilización comúnmente utilizadas para inmovilizar selectores, proteínas y péptidos en soportes y superficies sólidas.

xiii) Alternativamente, el ligando cromatográfico puede incorporarse en la matriz polimérica también mediante copolimerización directa *in situ* del ligando que porta las funcionalidades apropiadas. Esta estrategia puede llevarse a cabo en la polimerización en suspensión obteniendo perlas o en la polimerización en masa o polimerización en masa con separación de fases tal como en la preparación de monolitos.

- 25 La fórmula V (página siguiente) proporciona una visión general de los materiales de RP/AX y HILIC/AX de modo mixto.

La síntesis de los ligandos según la presente invención, así como la unión de dichos ligandos se ha descrito en los ejemplos. Otros protocolos para protocolos de síntesis similares se describen en manuales convencionales y los conoce el experto en la técnica.

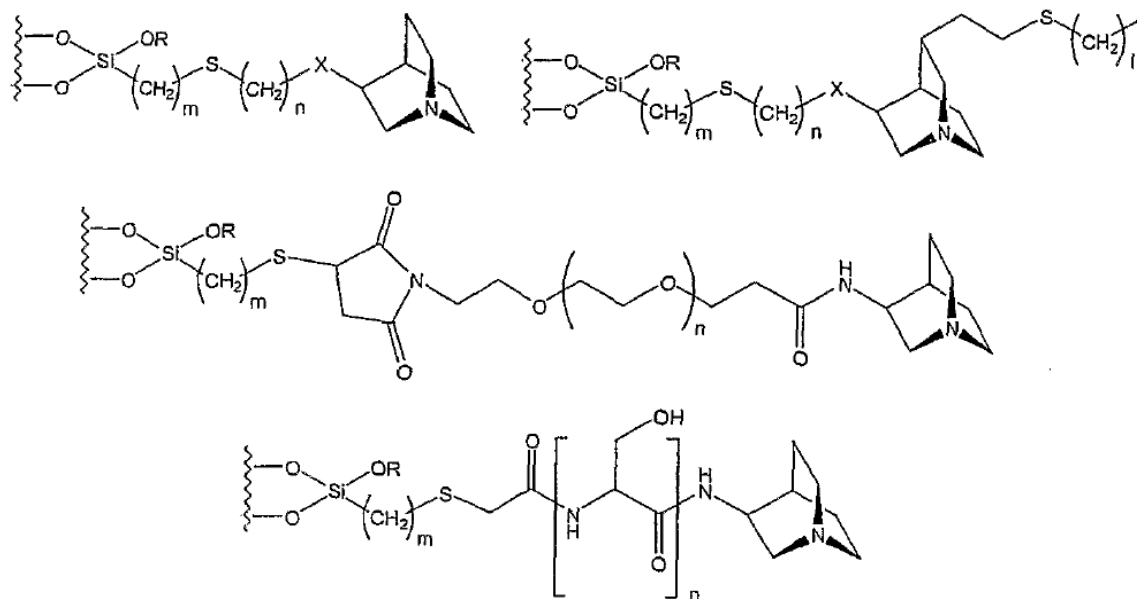
- 30 Al implementar la combinación de grupos de intercambio aniónico y módulos de interacción no iónica según la presente invención, pueden lograrse nuevas capacidades de reconocimiento molecular sorprendentes y selectividades enormemente potenciadas o complementarias. Por tanto, es posible la separación de compuestos estructuralmente relacionados, que no se han observado anteriormente.

- 35 Los materiales de intercambio aniónico de modo mixto según la presente invención se aprovechan de la alta capacidad de carga de los materiales de intercambio iónico mientras que todavía presentan la capacidad de distinción de especies igualmente cargadas debido a la capacidad de reconocimiento diferencial del módulo de "interacción no iónica" y/o la existencia de interacción ion-ion electrostática repulsiva (exclusión iónica).

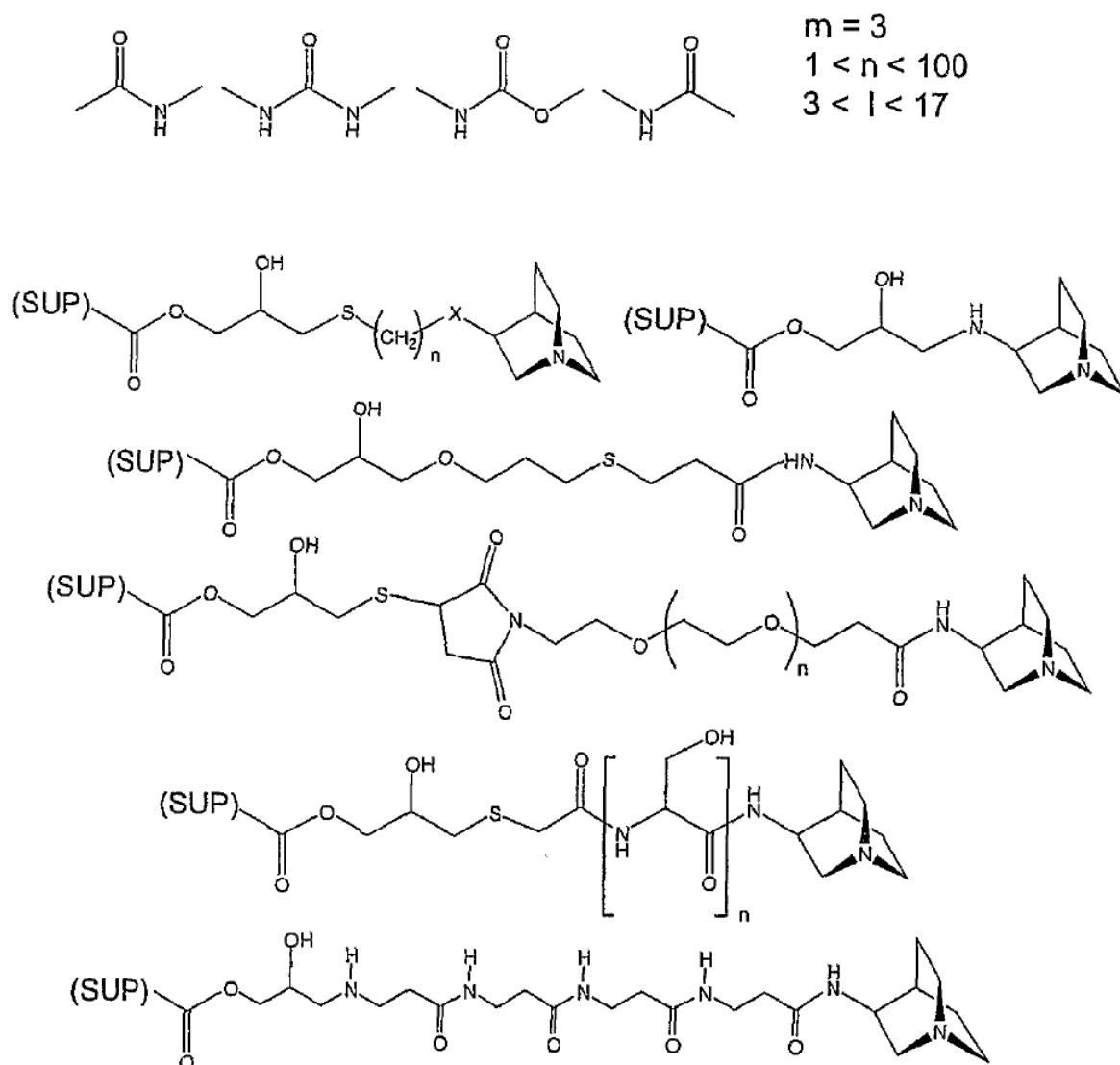
El diseño de ligando (selector) dedicado según la presente invención también permite el uso de medios puramente acuosos, condiciones que son particularmente favorables para separaciones de biopolímeros (proteínas) en condiciones no desnaturalizantes.

40

Fórmula V



en la que X =:



5 Los materiales de modo mixto de la presente invención pueden ser capaces de usarse en varios modos cromatográficos distintos o varios modos de separación cromatográfica de modo mixto en una sola columna, por ejemplo, modos de fase inversa/intercambio aniónico (RP/AX), cromatografía de interacción hidrófoba/intercambio aniónico (HIC/AX) (o más precisamente cromatografía de interacción hidrófoba/cromatografía de exclusión iónica) y cromatografía de interacción hidrófila/intercambio aniónico (HILIC/AX).

10 En otras palabras, una sola columna cargada con uno de los materiales de intercambio aniónico de modo mixto de la presente invención puede ejecutarse en varios modos operativos distintos, es decir, RP/AX, HIC/AX, HILIC/AX, en los que las selectividades logradas pueden ser diferentes. Esto es una característica favorable de los materiales de la presente invención y no se ha mostrado para los materiales de la técnica anterior. Está claramente documentado por los ejemplos de uso B1 (RP/AX), B4 (HILIC/AX) y B5 (HIC/AX).

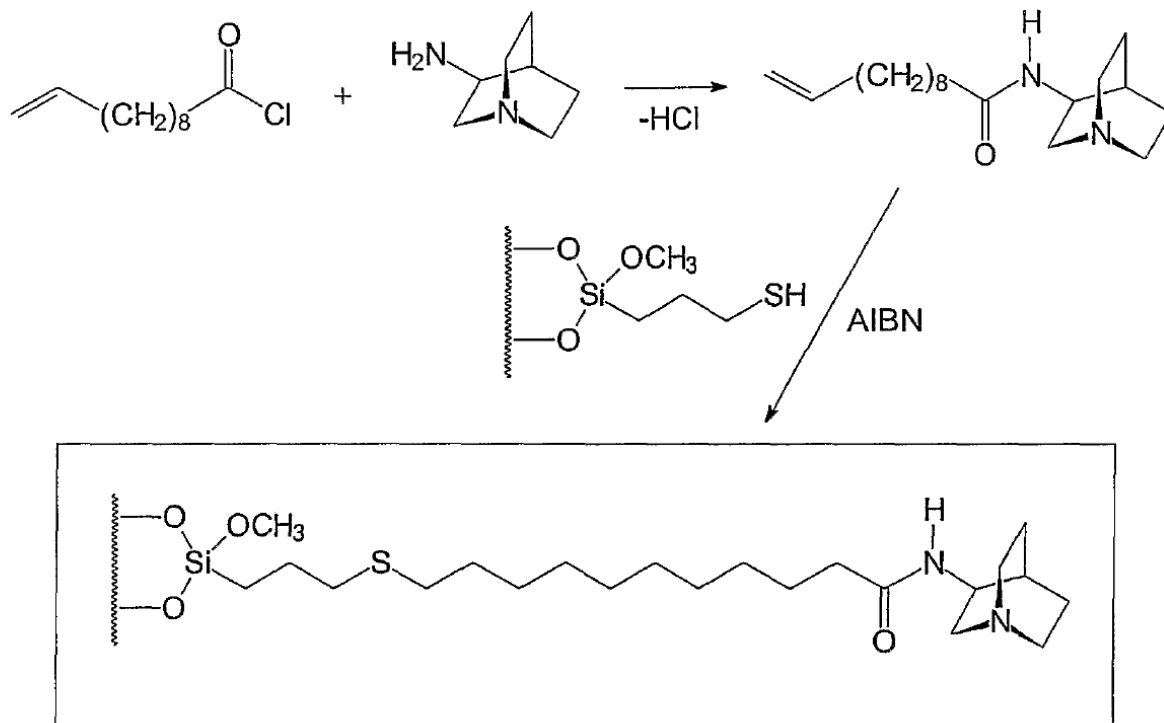
Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las realizaciones específicas preferidas y los ejemplos, por tanto, han de interpretarse como meramente ilustrativos, y no limitativos del resto de la divulgación de ninguna manera.

15 Ejemplos

A ejemplos de síntesis

Ejemplo A1: RP/WAX basada en sílice modificada con tiol

La síntesis se explica resumidamente en la fórmula VI, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:



a) Síntesis del selector

Se trata diclorhidrato de 3-aminoquinuclidina (26 mmol) durante 3 horas con un exceso molar de dos veces de una disolución de metóxido de sodio recién preparada en metanol para liberar la base libre. El cloruro de sodio precipitado se elimina mediante filtración y se evapora el filtrado hasta sequedad. Se añade cloroformo y a la suspensión mezclada y enfriada se le añade lentamente una disolución de cloruro de ácido 10-undecenoico (22 mmol en cloroformo) mediante adición gota a gota. Se permite que la reacción avance durante 18 h a temperatura ambiente.

A partir de la mezcla de reacción, se extrae el selector de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina con hidróxido de sodio 2 M acuoso y cloroformo (3 x). Se secan las fases orgánicas combinadas con sulfato de sodio anhidro y luego se evaporan hasta sequedad. Tras secar a vacío se produce un producto amarillento oleoso con un rendimiento del 73%.

ESI-EM (modo positivo): 293,4 amu $[M+H]^+$. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 5,80 (m, 1H); 5,55 (d, 1 H), 4,98 (d, 1 H), 4,93 (d, 1 H), 3,95 (m, 1 H), 3,35 (q, 1 H), 2,80 (m, 4 H), 2,43 (m, 1 H), 2,20 (t, 2 H), 2,05 (m, 2 H), 1,90 (m, 1 H), 1,65 (m, 5 H), 1,47 (m, 1 H), 1,30 (s, 10 H) ppm.

b) Inmovilización del ligando de RP-WAX sobre sílice modificada con tiol

6 g de gel de 3-mercaptopropilsílice obtenido sometiendo a reflujo Kromasil® 100-5 μm y 3-mercaptopropiltrimetoxisilano en tolueno (4,27% de C, 0,89% de H, <0,05% de N y 2,62% de S, correspondiente a una cobertura calculada de grupos tiol de 0,85 mmol de S/g) se suspenden en una disolución que contiene 3,0 g de selector de la etapa a) anterior en metanol. Se añaden 50 mg de AIBN como iniciador de radicales y se permite que la reacción avance durante 6 horas bajo corriente continua de nitrógeno a reflujo. Se lava el gel de sílice modificado varias veces con metanol y se seca durante 72 horas. El análisis elemental produce los siguientes resultados: 14,50% de C, 2,40% de H y 1,32% de N, correspondiente a una cobertura de selector promedio de 0,46 mmol/g de sílice modificada.

Los grupos tiol restantes se ocupan mediante adición por radicales de n-hexeno (3,2 ml) en condiciones por lo demás idénticas tal como se describió anteriormente para la adición del selector. Se lava el gel con metanol, ácido acético al 3% en metanol y dietil éter, se seca durante 72 horas y se empaqueta en columnas de HPLC de acero inoxidable.

El análisis elemental de la fase estacionaria de RP/WAX tras la ocupación de extremos proporciona los siguientes resultados: 14,26% de C, 2,32% de H, 1,23% de N y 2,12% de S.

Ejemplo A2 (no según la presente invención): Inmovilización de RP-WAX sobre perlas de poli(metacrilato de glicidilo) modificadas con tiol

- 5 g de perlas de poli(metacrilato de glicidilo) Fractogel® EMD epoxi (M) (Merck, Darmstadt, Alemania) (1,5 mmol de grupos epoxi/g de perlas) o Suprema® 1000 (Polymer Standard Services, Mainz, Alemania) se suspenden en 160 ml de una disolución de reactivos que contiene 8,2 g de hidrogenosulfuro de sodio disuelto en una mezcla de tampón fosfato 50 mM, pH 8 y 2-propanol (4:1, v/v). Se sonica la suspensión y se purga con N₂ (cada 5 min). Se agita mecánicamente la suspensión durante 20 h a 60°C. Tras la filtración, se lavan las perlas derivatizadas con HCl 0,1 M, agua y luego MeOH. Se secan las partículas modificadas con tiol durante la noche a vacío y se someten a análisis elemental, que produce los siguientes resultados:

Sorbente	% de C	% de H	% de N	% de S
Suprema®	51,84	6,68	0,07	7,40
Fractogel®	51,05	7,14	0,05	4,00

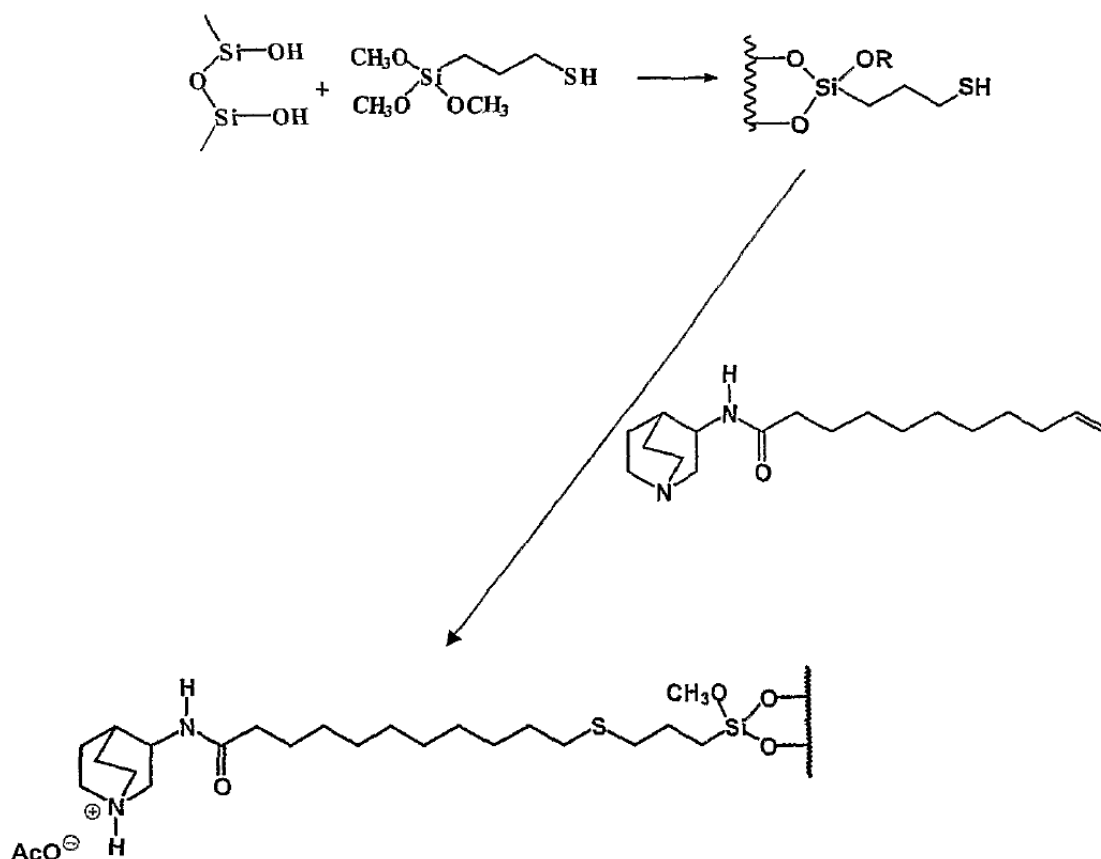
Esto corresponde a una carga de tiol de 1,25 mmol de grupos sulfhidrilo/g de perlas modificadas para el material Fractogel® y 2,31 mmol de grupos sulfhidrilo/g de perlas modificadas para el material Suprema®.

- 10 La inmovilización del selector de RP/WAX (N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina) se lleva a cabo mediante el mismo protocolo descrito en el ejemplo A1.

Ejemplo A3: Inmovilización de RP-WAX sobre sílice monolítica

- 15 El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula VII. La estructura de sílice en la parte superior izquierda muestra los grupos silanol del soporte basado en sílice. Las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:

Fórmula VII



a) Preparación de monolito de sílice modificada con tiol (silanización en columna)

- 20 Una columna Chromolith® Si Performance 100-4,6 mm (10 cm de longitud y 4,6 mm de d.i. que contiene aproximadamente 0,5 g de gel de sílice) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), encerrada en una cubierta de plástico de PEEK, se seca durante cinco horas a vacío a 100°C. 10 ml de una disolución de 0,7 ml de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (ABCR-GmbH Karlsruhe, Alemania) en tolueno seco que contiene 0,2 ml de piridina seca se bombean a través de la columna Chromolith® Si secada una velocidad de flujo volumétrica de 0,2 ml/min. Durante la

reacción (1 h), la columna de sílice monolítica se almacena dentro de un horno de columna de HPLC a 80°C. El monolito de sílice modificada con mercaptopropilo se lava con tolueno durante 1 hora a 80°C a una velocidad de flujo volumétrica de 0,5 ml/min y una hora adicional a una velocidad de flujo volumétrica de 0,5 ml/min a temperatura ambiental. Se repite el procedimiento con otra columna Chromolith®, que se retira de la carcasa de PEEK tras la modificación, se seca a vacío y se somete a análisis elemental. El análisis elemental produce un contenido de carbono del 4,3% correspondiente a una cobertura de superficie de 4,54 μmol de grupos tiol/ m^2 .

b) Inmovilización del ligando de RP-WAX sobre monolito de sílice modificada con tiol (derivatización en columna)

El selector de RP/WAX (N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina; véase el ejemplo A1) se inmoviliza sobre la columna de sílice monolítica modificada con tiol descrita anteriormente (100 x 4,6 mm de d.i.) mediante modificación en columna usando una reacción de adición por radicales en analogía al protocolo descrito en el ejemplo 1 para las partículas. Por tanto, se disuelven 0,07 g de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina y 10 mg de AIBN en 6 ml de etanol. Se bombea esta disolución lentamente a través de la columna de sílice monolítica modificada con tiol, que se acondiciona previamente con etanol, a 80°C a lo largo de un periodo de 100 min. Con el fin de eliminar los reactivos sin reaccionar, se lava la columna después de eso con etanol a una velocidad de flujo volumétrica de 0,5 ml/min durante 60 minutos adicionales. El análisis elemental, que se realiza después de que hayan terminado las pruebas en la columna, proporciona una cobertura de superficie de 0,7 μmol de selector de RP/WAX/ m^2 .

Ejemplo A4 (no según la presente invención): Inmovilización de RP-WAX sobre soporte monolítico basado en polímero orgánico

a) Preparación *in situ* de capilares monolíticos de tipo poli(GMA-co-EDMA)

Se prepara una mezcla de polimerización a partir del 30% en peso de ciclohexanol y el 30% en peso de 1-dodecanol como disolventes porogénicos, el 24% en peso de metacrilato de glicidilo (GMA) como monómero funcional y el 16% en peso de dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como agente de reticulación que contiene el 1% en peso de α,α' -azoisobutironitrilo (AIBN) como iniciador de radicales (con respecto al contenido de monómeros total) (todos obtenidos de Sigma-Aldrich). Se sonica la mezcla y se purga con nitrógeno (cada 10 min). Se llenan capilares de sílice pirogénica vinilizados (es decir, modificados con 3-metacrililoiloxipropiltrimetoxisililo) de una longitud total de aproximadamente 40 cm hasta una longitud de 30 cm con la mezcla de polimerización empleando una jeringa Hamilton y se sella con tabiques de caucho GC en ambos extremos. La polimerización se lleva a cabo en un baño de agua a una temperatura de 60°C durante 20 horas. Posteriormente, se enjuagan los capilares con acetonitrilo para eliminar los disolventes porogénicos y monómeros sin reaccionar usando una bomba de HPLC.

b) Procedimiento para la preparación de monolitos de polimetacrilato con grupos sulfhidrilo reactivos

Se prepara de manera reciente una disolución 2 M de hidrogenosulfuro de sodio (Sigma-Aldrich) en una mezcla de metanol y dihidrogenofosfato de sodio acuoso 0,1 M (20:80, v/v). Se ajusta el pH a 8,15, se sonica la disolución de reactivos durante 5 min y se filtra a través de una membrana de nailon (filtro Iso-Disc™, N-13-2; 13 mm x 0,2 μm ; Supelco).

Los capilares de monolito de poli(GMA-co-EDMA) reactivos, acondicionados previamente con metanol/agua (20:80, v/v), se lavan entonces con 60 μl de la disolución de hidrogenosulfuro de sodio usando una jeringa Hamilton y una bomba de jeringa a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{h}$. Tras la reacción, los capilares se unen a una bomba de HPLC y se enjuagan con metanol/agua (20:80, v/v) y luego con acetonitrilo.

c) Inmovilización en columna del ligando de RP-WAX mediante reacción de adición por radicales

Se prepara de manera reciente una disolución 0,25 M del selector de RP/WAX (N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina; véase el ejemplo A1) en etanol que contiene α,α' -azoisobutironitrilo (AIBN) (0,025 M) como iniciador de radicales. Se sonica la mezcla (5 min) y luego se filtra a través de una membrana de nailon. Tras purgar con nitrógeno durante 10 min, se lavan los capilares funcionalizados con tiol con 30 μl de la disolución de selector usando una jeringa Hamilton y una bomba de jeringa. Se sellan los capilares con tabiques de GC y se transfieren a un baño de agua, donde la adición por radicales del ligando cromatográfico se produce a 60°C durante la noche. Después de 24 horas, se retiran los capilares del baño de agua, se enjuagan con metanol y luego se equilibran con fase móvil usando una bomba de HPLC para la prueba cromatográfica.

Ejemplo A5 (no según la presente invención): RP-WAX sobre discos monolíticos basados en polímero orgánico

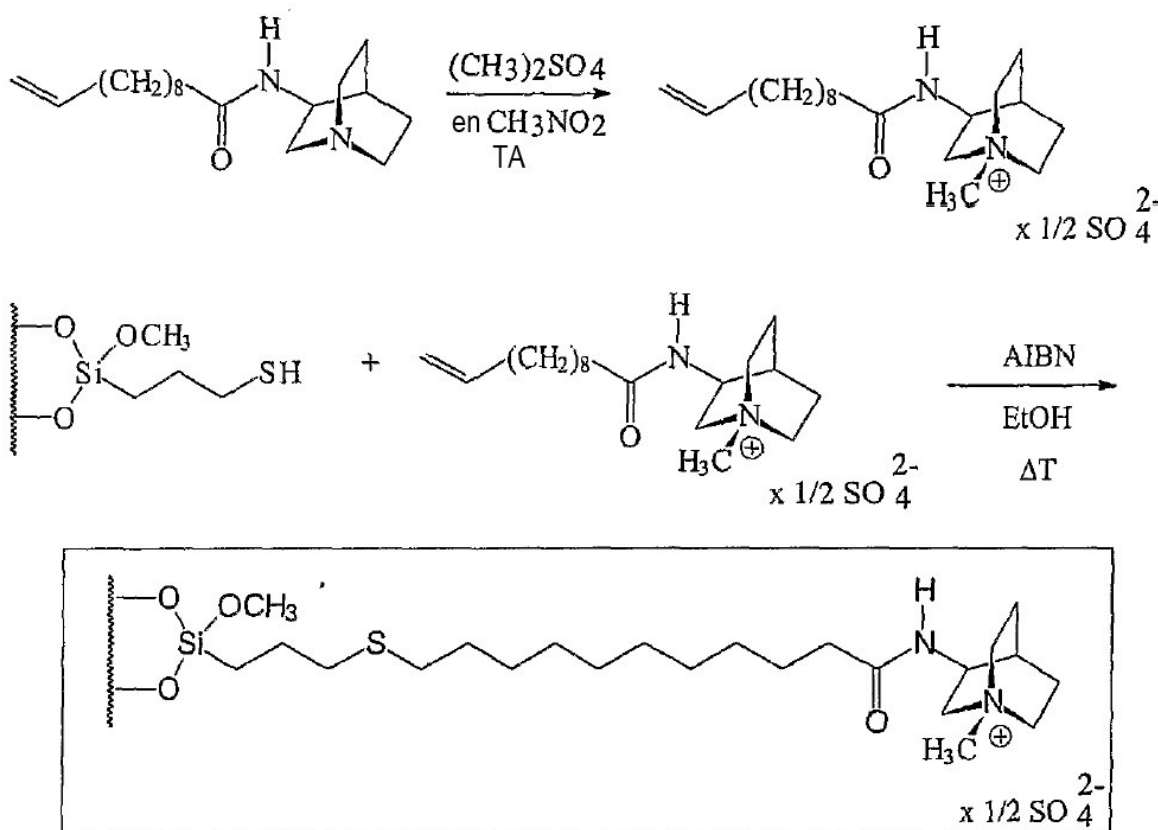
Se prepara de manera reciente una disolución de hidrogenosulfuro de sodio 2 M en una mezcla de 2-propanol y dihidrogenofosfato de sodio acuoso 0,1 M (20:80, v/v). Se ajusta el pH a 8,15, se sonica la disolución de reactivos durante 5 min y se filtra a través de una membrana de nailon. En esta disolución, se sumerge un disco monolítico de tipo polimetacrilato que contiene grupo epoxi (CIM® Epoxi, BIA Separations, Liubliana, Eslovenia), que se acondiciona previamente con 2-propanol/agua (20:80, v/v), y se permite que avance la reacción de apertura de anillo de epóxido mediante sulfuro de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 h. Posteriormente, se lavan los discos varias veces con metanol/agua (20:80, v/v).

Se prepara de manera reciente una disolución 0,25 M del selector de RP/WAX (N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina; véase el ejemplo A1) en 2-propanol que contiene α, α' -azoisobutironitrilo (AIBN) (0,025 M) como iniciador de radicales. Se sonica la mezcla (5 min) y luego se filtra a través de una membrana de nailon. Tras purgar con nitrógeno durante 10 min, se sumerge el disco monolítico de tipo polimetacrilato funcionalizado con tiol en esta disolución de selector y se calienta hasta 60°C. La adición por radicales del selector de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina a los grupos tiol se produjo durante la noche manteniendo la mezcla de reacción a 60°C y bajo nitrógeno. Tras la retirada del disco de la mezcla de reacción, se lava posteriormente con 2-propanol, 2-propanol/agua (20:80, v/v) y metanol, y luego se seca a vacío.

Ejemplo A6 (no según la presente invención): Material basado en sílice modificada con tiol de fase inversa (RP)/intercambio aniónico fuerte (SAX) de modo mixto

El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula VIII, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:

Fórmula VIII

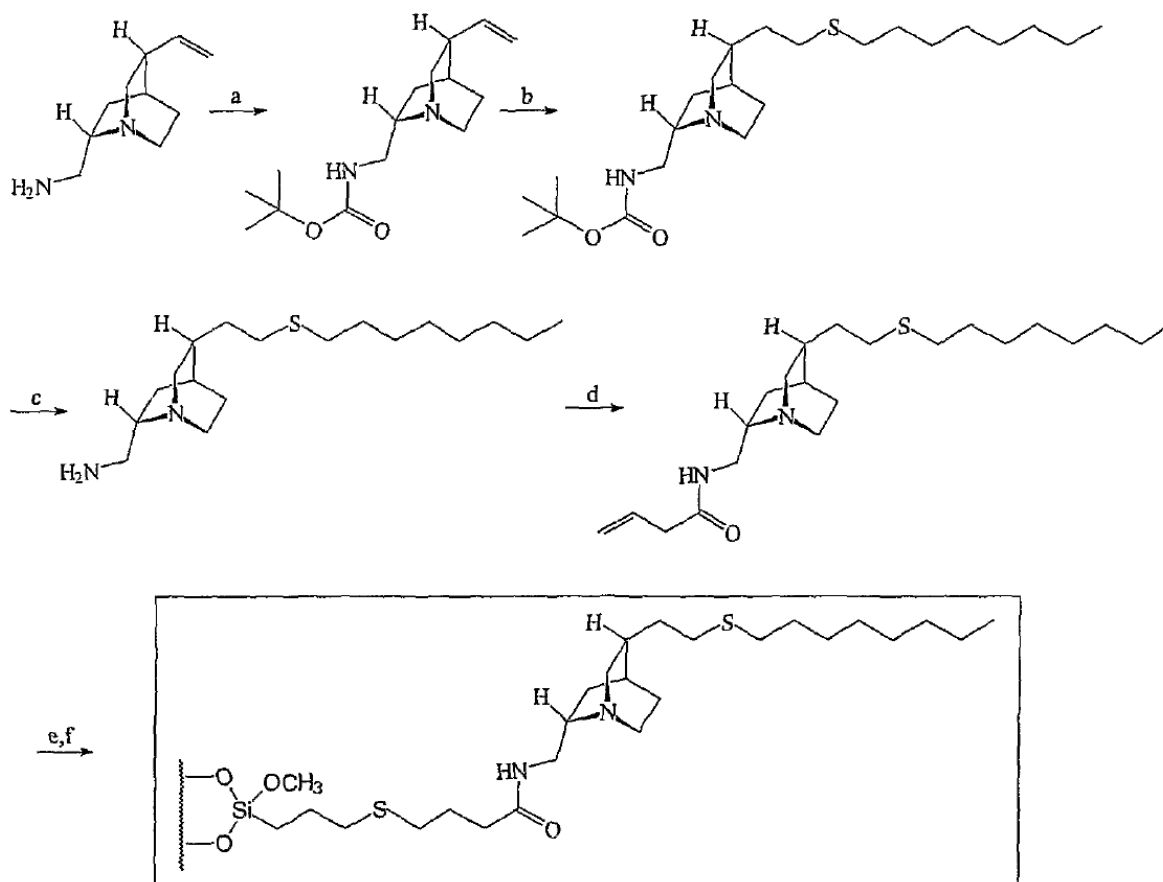


- 15 Se disuelven 5 mmol del selector de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina (véase el ejemplo 1) en 50 ml de nitrometano. Se añaden 2,5 mmol de sulfato de dimetilo y se permite que la mezcla de reacción repose a temperatura ambiente durante la noche. Se evapora la mezcla de reacción hasta sequedad y se lava el residuo con éter de petróleo.

Se disuelve el producto en bruto en etanol/agua y se inmoviliza sobre sílice modificada con tiol tal como se describió en el ejemplo A1.

- 20 **Ejemplo A7: Preparación de material de RP/WAX con dominio hidrófobo terminal y sitio de intercambio iónico interno**

El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula IX, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:



a) Derivado de t-BOC de (2S,4S,5R)-2-aminometil-5-vinil-quinuclidina

Se disuelven 6,62 g (40 mmol) de (2S,4S,5R)-2-aminometil-5-vinil-quinuclidina en 55 ml de diclorometano. Se añaden adicionalmente 55 ml de una disolución acuosa de carbonato de sodio (8,06 g en 100 ml de agua destilada) así como 9,79 g (45 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo, (Boc)₂O. Se permite que la reacción avance durante la noche a temperatura ambiente con agitación.

La mezcla de reacción se transfiere a un embudo de separación y se desecha la fase acuosa superior. La fase orgánica inferior se extrae repetidamente con disolución de carbonato de sodio. Las fracciones orgánicas combinadas se secan con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente.

Rendimiento: 67%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 5,8 (m, 1H), 5,2 (s, 1H), 4,97 (d, 2H), 3,27 (m, 1H), 3,13 (q, 1H), 2,9 (m, 2H), 2,82 (m, 1H), 2,60 (m, 2H), 2,26 (m, 1H), 1,85 (t, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,47 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 0,85 (m, 1H)

b) Derivado de t-BOC de (2S,4S,5R)-2-aminometil-5-[(2-octiltio)etil]-quinuclidina

Se disuelven 7 g (26,5 mmol) de (2S,4S,5R)-N-t-Boc-2-aminometil-5-vinil-quinuclidina en cloroformo. Se añaden un exceso molar de 5 veces de octanotiol y AIBN (10% en moles en relación con el derivado de quinuclidina). Se permite que la reacción avance durante la noche durante 24 h bajo reflujo. La mezcla de reacción se condensa hasta sequedad y el producto en bruto se purifica mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, en primer lugar cloroformo, luego cloroformo-metanol (5:1, v/v), finalmente cloroformo-metanol (20:1, v/v). Los eluatos combinados que contienen el producto se evaporan hasta sequedad y se usan directamente para la siguiente etapa.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 5,5 (s, 1H), 3,4 (s, 1H), 3,25 (t, 1H), 3,1 (t,s, 3H), 2,73 (s, 1H), 2,50 (m, 5H), 1,91 (t, 1H), 1,80 (s,s, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,58 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,38 (t, 2H), 1,28 (s, 9H), 1,02 (m, 1H), 0,90 (t, 3H)

c) Escisión del grupo de protección

Se disuelven 8,2 g (20 mmol) de (2S,4S,5R)-N-t-Boc-2-aminometil-5-[(2-octiltio)etil]-quinuclidina tal como se obtiene mediante cromatografía ultrarrápida en 100 ml de diclorometano y se añaden 15 ml de ácido trifluoroacético (TFA) bajo agitación magnética. Se permite que la reacción avance durante 3 h a temperatura ambiente.

- 5 Se evapora la mezcla de reacción hasta sequedad y se extrae con NaOH 1 M/diclorometano. Las fracciones orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporan. Se obtiene un aceite amarillo, que se usa sin purificación adicional en la siguiente etapa.

ESI-EM (modo positivo): 313,3 amu [M+H]⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 3,04 (q, 1H), 2,77 (m, 1H), 2,60 (d, 2H), 2,47 (m, 2H), 2,34 (m, 4H), 2,25 (dd, 1H), 1,67 (m, 1H), 1,53 (m, 4H), 1,40 (m, 2H), 1,32 (m, 2H), 1,20 (t, 2H), 1,10 (s, 10H), 0,71 (t, 4H)

- 10 d) Acoplamiento de ácido vinilacético y (2S,4S,5R)-2-aminometil-5-[(2-octiltio)etil]-quinuclidina

Se disuelven 3,99 g (12,79 mmol) de (2S,4S,5R)-2-aminometil-5-[(2-octiltio)etil]-quinuclidina en diclorometano. Se añaden gota a gota una cantidad equimolar de ácido vinilacético (12,79 mmol) y 14,7 mmol N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), mientras que la mezcla de reacción se mantiene bajo enfriamiento con hielo. Se permite que la reacción avance durante la noche (12 h) a temperatura ambiente. Se forma una suspensión.

- 15 La precipitación se elimina mediante filtración y la mezcla de reacción se condensa hasta sequedad a presión reducida.

El producto en bruto se purifica mediante extracción con diclorometano y NaOH 1 M.

Las fases orgánicas recogidas se secan con sulfato de sodio anhidro y se evaporan hasta sequedad. El producto sin procesar se purifica finalmente mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, en primer lugar cloroformo, luego cloroformo/metanol, 5:1).

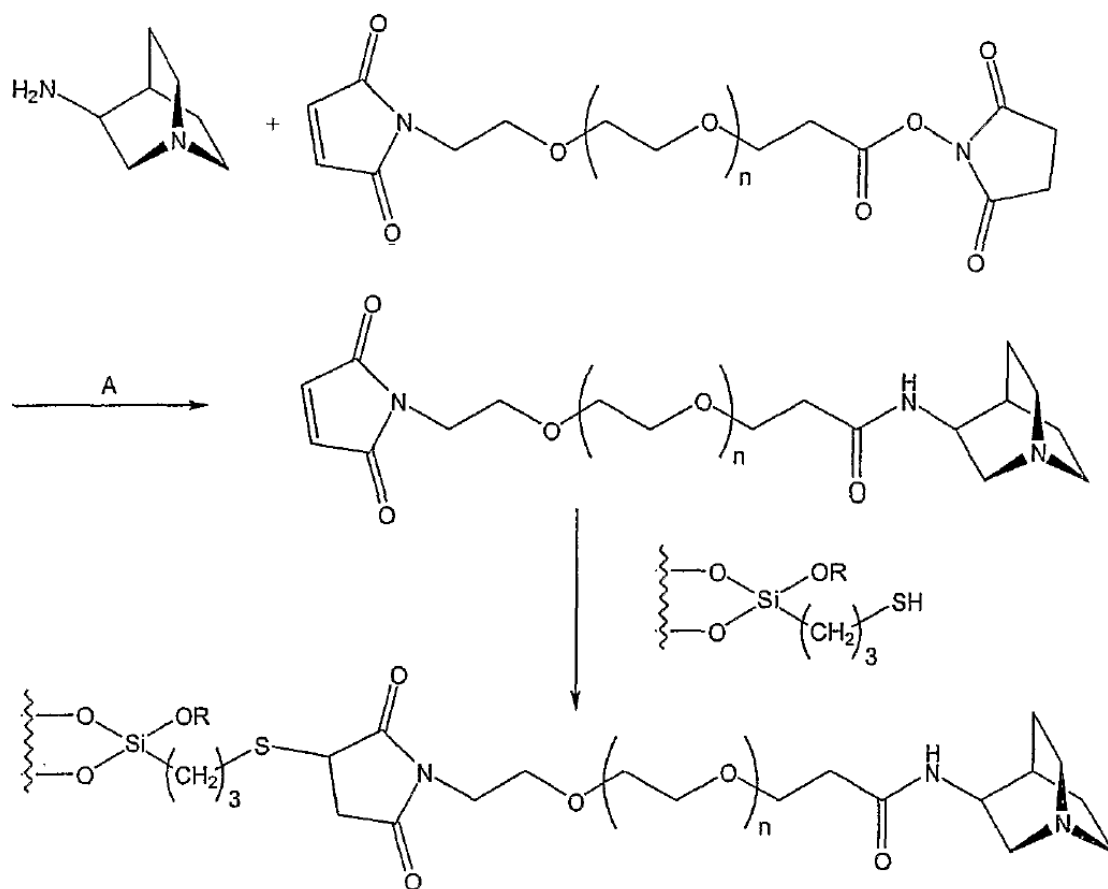
- 20 ESI-EM (modo positivo): 381,5 amu [M+H]⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 6,29 ppm (s, 1H), 5,94 ppm (m, 1H), 5,20 (s, 1H), 5,16 (d, 1H), 3,55 (m, 1H), 3,17 (q, 1H), 2,98 (d, 2H), 2,87 (m, 3H), 2,60 (m, 1H), 2,49 (q, 4H), 2,37 (d, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,71 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,37 (t, 2H), 1,28 (s, 9H), 0,93 (m, 1H), 0,88 (t, 3H).

e) Inmovilización del selector de RP/WAX sobre sílice modificada con tiol

- 25 La unión covalente del selector de RP/WAX así como la etapa de ocupación de extremos posterior se llevan a cabo siguiendo exactamente el mismo protocolo que se describió en el ejemplo A1 para el selector de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina.

Ejemplo A8 (no según la presente invención): Síntesis de la fase estacionaria de HILIC/WAX basada en sintón de PEG

- 30 El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula X, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice, y en la que n = 3:

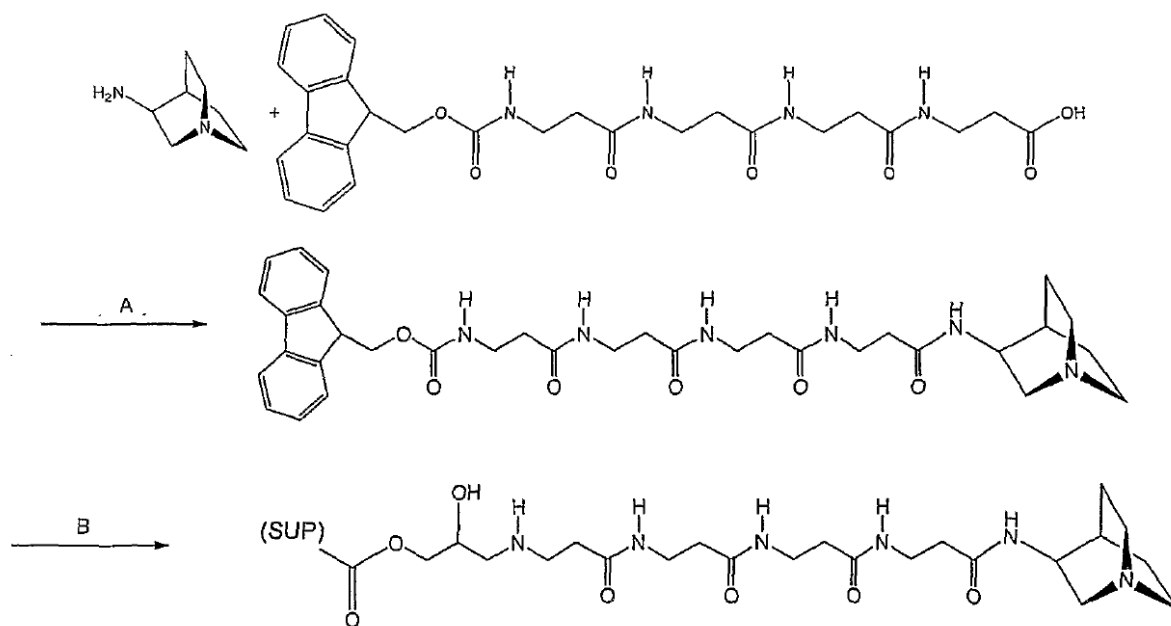


Se trata diclorhidrato de 3-aminoquinuclidina (3 mmol) durante 3 horas con un exceso molar de dos veces de una disolución de metóxido de sodio recién preparada en metanol para liberar la base libre. El cloruro de sodio precipitado se elimina mediante filtración y se evapora el filtrado hasta sequedad. Se disuelve el residuo en dimetilformamida (DMF) y se añade una cantidad equimolar de base de Hünig. A la disolución mezclada y enfriada se le añade una cantidad equimolar de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-[2-(N-maleimido)etil-trietilenglicol]-propiónico (éster de MAL-dPEG₄-NHS) disuelto en DMF y la mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evapora hasta sequedad y se purifica sobre un intercambiador catiónico débil DOWEX®. Entonces se disuelve la aminoquinuclidina derivatizada con PEG (1 mmol) en una mezcla de DMF - tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 (20:80; v/v). Se suspenden 2 g de sílice modificada con mercaptopropilo en esta disolución y se permite que reaccionen a temperatura ambiente durante la noche produciendo la fase estacionaria de HILIC/WAX de modo mixto representada en la fórmula X.

Este ejemplo puede repetirse usando derivados de PEG de longitud de cadena diferente: $1 \leq n < 100$ (en particular $1 \leq n < 20$)

Ejemplo A9 (no según la presente invención): Síntesis de gel de polímero de HILIC/WAX basado en síntón peptídico

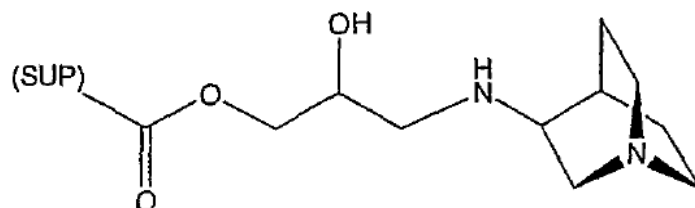
El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula XI, en la que (SUP) representa el soporte:



Se trata diclorhidrato de 3-aminoquinuclidina (3 mmol) durante 3 horas con un exceso molar de dos veces de una disolución de metóxido de sodio recién preparada en metanol para liberar la base libre. El cloruro de sodio precipitado se elimina mediante filtración y se evapora el filtrado hasta sequedad. Se disuelve el residuo en dimetilformamida (DMF) y se añaden una cantidad equimolar de (β-alanil)₃-β-alanina protegida con Fmoc (sintetizada mediante química de Fmoc convencional) así como DIC y HOBt disueltos en DMF. Se permite que la reacción avance a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se escinde el grupo FMOC con piperidina al 20%. El tetrapéptido resultante con 3-quinuclidinilamida C-terminal y extremo N-terminal libre se purifica mediante RP-HPLC en gradiente usando agua y acetonitrilo (que contienen ambos TFA al 0,1%) sobre una columna LiChrospher® C18, 15 μm (250 x 20 mm de DI) como fase estacionaria. Las fracciones recogidas y combinadas que contienen el tetrapéptido puro se evaporan hasta sequedad y se disuelven en tampón Tris 100 mM (pH 9). Se suspende Fractogel® epoxi en esta disolución y se agita la suspensión a 40°C durante la noche.

Ejemplo A10 (no según la presente invención): Material de polímero orgánico de RP-WAX con separación corta

El producto de reacción se representa en la fórmula XII, en la que (SUP) representa el soporte:

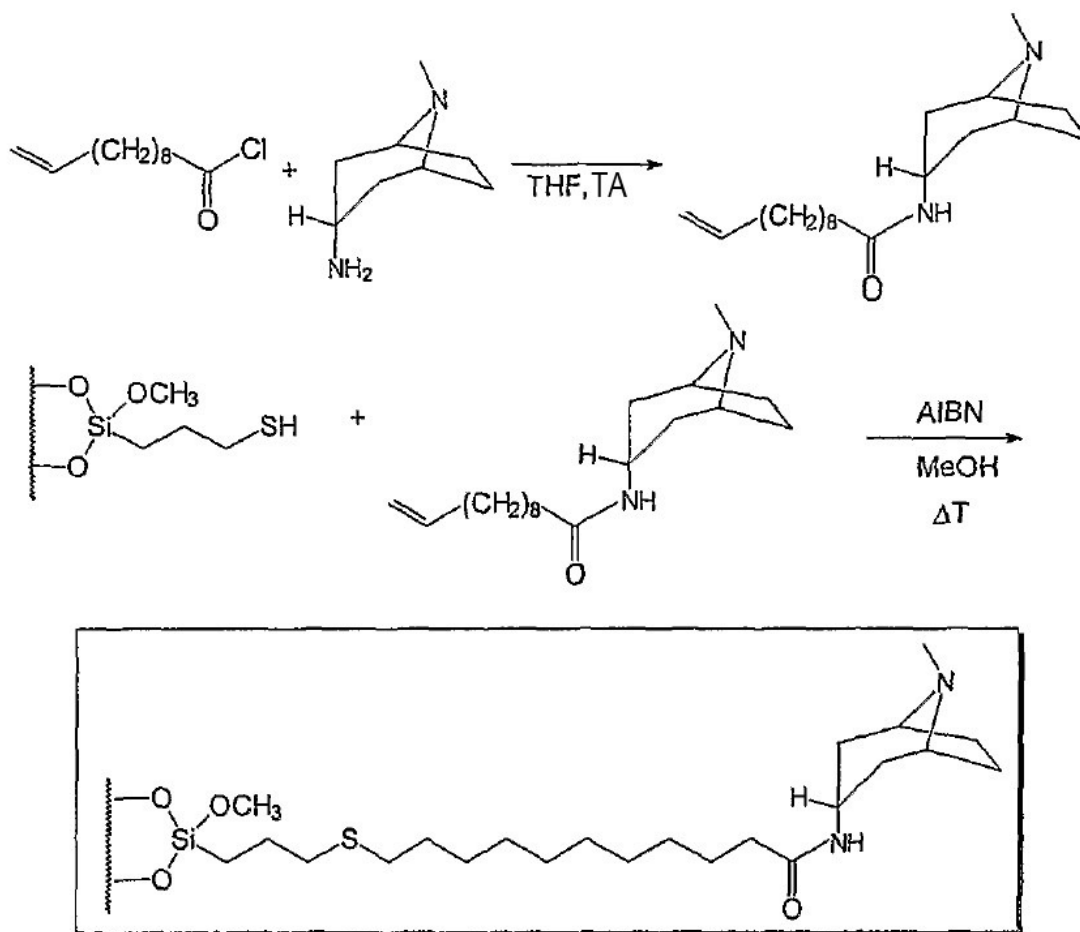


Se trata diclorhidrato de 3-aminoquinuclidina (3 mmol) durante 3 horas con un exceso molar de dos veces de una disolución de metóxido de sodio recién preparada en metanol para liberar la base libre. El cloruro de sodio precipitado se elimina mediante filtración y se evapora el filtrado hasta sequedad. La base de 3-aminoquinuclidina se disuelve en metanol y se añade una suspensión de Fractogel® EMD epoxi en metanol (1 g/20 ml). La mezcla de reacción se agita durante la noche a 60°C. Se filtran las perlas de Fractogel® modificadas con aminoquinuclidina y se lavan varias veces con metanol y acetona (cobertura 0,68 mmol de restos quinuclidina por gramo).

Ejemplo A11 (no según la presente invención): RP/WAX basado en 3-α-aminotropano y sílice modificada con tiol

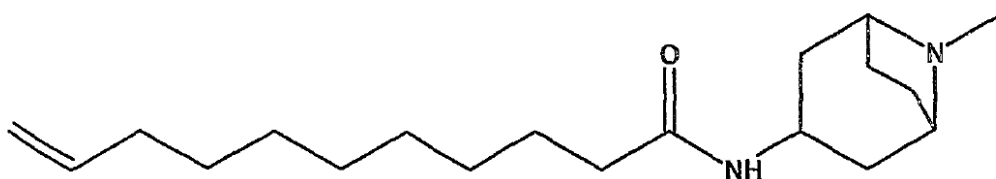
El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula XIV, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:

Fórmula XIV



a) Síntesis del selector de RP/WAX

Fórmula XV



- 5 Se suspende diclorhidrato de 3- α -aminotropano seco (1 *equivalente*) en tetrahidrofurano seco (5 ml por mmol de amina) en un matraz de fondo redondo de 3 bocas con agitación mecánica. Se barre el matraz con nitrógeno durante 10 min y se enfría en un baño de hielo. En condiciones estrictamente anhidras (uso de un capilar de transferencia de acero inoxidable), se añade lentamente una disolución 1,6 M de butil-litio (en hexanos; 3,15 *equivalentes*) a la mezcla de reacción (para 50 mmol de adición de amina debe producirse a lo largo de 5 min). Después de eso, se añade gota a gota cloruro de 10-undecenol (0,9 *equivalentes*) diluido con tetrahidrofurano seco (0,5 ml por mmol de cloruro de ácido). Se retira el baño de hielo y se agita la mezcla durante 30 min adicionales.

El producto en bruto obtenido evaporando la fracción volátil de la mezcla de reacción (40°C, 20 mbar) se redisuelve en una mezcla de acetato de etilo (5 ml por mmol de amina) y disolución de hidróxido de sodio acuosa 1 M (2 ml por mmol de amina) y se transfiere a un embudo de separación. Tras la eliminación de la fase acuosa, se extrae la fase orgánica residual una vez más con disolución de hidróxido de sodio acuosa 1 M (2 ml por mmol de amina) y dos veces con agua (cada una 2 ml por mmol de amina).

Se seca la fase orgánica sobre carbonato de potasio, se evapora y se seca a alto vacío. Los rendimientos están en el intervalo del 95%.

CARACTERIZACIÓN

ESI-EM (modo positivo): 307,4 amu $[M+H]^+$.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): 5,80 (m, 2 H), 4,99 (dd, 1 H), 4,93 (dd, 1 H), 4,07 (q, 1 H), 3,14 (m, 2 H), 2,28 (s, 3 H), 2,20 (m, 2 H), 2,14 (m, 4 H), 2,04 (m, 2 H), 1,71 (m, 2 H), 1,61 (m, 4 H), 1,41-1,25 (m, 10 H) ppm.

- 5 b) Inmovilización del ligando de RP-WAX basado en N-(10-undecenoil)-3- α -aminotropano sobre sílice modificada con tiol

10 Se suspenden 6 g de gel de 3-mercaptopropilsílice obtenido sometiendo a reflujo Prontosil® 120-5 μm y 3-mercaptopropiltrimetoxisilano en tolueno (4,62% de C, 1,10% de H, <0,05% de N y 2,88% de S, correspondiente a aproximadamente 0,9 mmol de S/g) en una disolución que contiene 3,0 g de selector de la etapa a) anterior en metanol. Se añaden 50 mg de AIBN como iniciador de radicales y se permite que la reacción avance durante 6 horas bajo corriente continua de nitrógeno a reflujo. El gel de sílice modificado se lava varias veces con metanol y se seca durante 72 horas. El análisis elemental produce los siguientes resultados: 11,57% de C, 2,13% de H, 0,99% de N y 2,48% de S, correspondiente a una cobertura de selector promedio de 0,36 mmol/g de sílice modificada.

15 Los grupos tiol restantes se ocupan mediante adición por radicales de 1-hexeno (3,2 ml) en condiciones por lo demás idénticas tal como se describió anteriormente para la adición del selector. Se lava el gel con metanol, ácido acético al 3% en metanol y dietil éter, se seca durante 72 horas y se empaqueta en columnas de HPLC de acero inoxidable.

El análisis elemental de la fase estacionaria de RP/WAX tras la ocupación de extremos proporciona los siguientes resultados: 11,55% de C, 2,11% de H, 0,96% de N y 2,40% de S.

B Ejemplos de uso

20 **Ejemplo B1: Aplicación de RP-WAX para la purificación de un péptido sintético**

La fase estacionaria de RP/WAX del ejemplo A1 que se basa en un selector de N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina inmovilizado covalentemente sobre sílice modificada con partículas de tiol (5 μm , diámetro de poro de 100 Å) mediante reacción de adición por radicales, se somete a prueba para determinar la separación y purificación de un tetrapéptido sintético N- y C-protégido (1A) de sus productos secundarios (1B). El efecto beneficioso del material de separación según la presente invención se ejemplifica mediante la purificación del tetrapéptido protegido de manera N- y C-terminal N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de los productos secundarios. El cromatograma resultante se muestra en la figura 1 (curva (a)). La curva (b) muestra la separación usando un sorbente de RP comercial. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas:

30 (a) RP/WAX (del ejemplo 1), partículas de 5 μm , dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (sin modificador orgánico), pH 4,5 ajustado con amoníaco.

(b) C18 Beckman Ultrasphere®, partículas de 5 μm , dimensiones de la columna, 150 x 4,6 mm de D.I.; fase móvil, TFA al 0,1% en agua (A) y TFA al 0,1% en ACN (B), gradiente lineal desde el 5% hasta el 60% de B en 20 min. Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 316 nm.

35 Se observa que la resolución en el material de RP/WAX se potencia enormemente ($R_s = 10,0$) en comparación con la separación de la mezcla de prueba mediante HPLC de fase inversa en gradiente convencional ($R_s = 1,9$). En estudios de capacidad de carga usando acetato, pudieron inyectarse masas de péptidos de hasta 200 mg sobre una columna de RP/WAX analítica de 250 x 4 mm de DI (partículas de 5 μm) sin tocar las bandas de impurezas principales y picos de péptido diana, mientras que las pruebas con formiato todavía permitían la inyección de 50 mg de péptido sin procesar. El análisis del péptido purificado mediante RP-HPLC con detección por UV y ESI-EM empleando columnas RP18 reveló que las impurezas principales conocidas se eliminan mediante una sola etapa cromatográfica empleando la fase estacionaria de RP/WAX. Tanto una mejor selectividad así como una capacidad de carga de muestras potenciada en comparación con RP-HPLC dieron como resultado una productividad mejorada del nuevo protocolo de purificación. Por ejemplo, para el péptido dado el rendimiento es superior en un factor de aproximadamente 15 para el método de purificación por RP/WAX en comparación con un protocolo de purificación por RP convencional.

45 **Ejemplo B2: Separación simultánea de compuestos ácidos y débilmente básicos o neutros (clorpirifos y sus metabolitos) en una única ejecución**

50 Clorpirifos es un pesticida de organofosforotioato débilmente básico, ampliamente usado que no está ionizado y por tanto es esencialmente neutro en condiciones cromatográficas típicas cuando se aloja sobre fases estacionarias basadas en sílice. La intoxicación por ingesta accidental no es rara. En seres humanos y otros mamíferos, se detoxifica rápidamente por hidrólisis metabólica del enlace éster aromático y desulfuración oxidativa produciendo tiofosfato de dietilo, fosfato de dietilo, 3,5,6-tricloro-2-piridinol como metabolitos principales. La acidez de los metabolitos, en cambio, varía entre fuertemente ácidos (el pK_a de tiofosfato de dietilo y fosfato de dietilo es de alrededor de 1,4) y débilmente ácidos (el pK_a de 3,5,6-tricloro-2-piridinol es de alrededor de 5,9).

Los valores de pKa bajos y la fuerte hidrofiliidad de los metabolitos de fósforo impiden una retención razonable y por tanto la separación por HPLC de fase inversa con condiciones ácidas típicas que pueden emplearse en materiales basados en sílice. Por otro lado, en la presente fase estacionaria de RP/WAX de modo mixto (del ejemplo A1), el clorpirifos original y todos sus metabolitos principales así como un patrón interno (fosfato de dibutilo) pueden retenerse fácilmente y separarse del nivel inicial con separación de bandas más o menos igual mediante HPLC. Esto se ejemplifica mediante la separación representada en la figura 2, que muestra la ejecución de CL-EM de una mezcla convencional de los 5 componentes. Los detalles experimentales son los siguientes: Separación simultánea de clorpirifos (2A) y sus metabolitos (2B, 2C, 2E) así como un patrón interno (2D) sobre RP/WAX de modo mixto basada en N-undecenoil-3-aminoquinuclidina (RP/WAX del ejemplo A1). (2B) Fosfato de dietilo, (2C) tiofosfato de dietilo, (2D) fosfato de dibutilo (patrón interno), (2E) 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Condiciones experimentales: sistema de HPLC, Agilent® 1100; sistema de EM, API 365 cuádrupolo triple con ESI, análisis en modo de MRM; condiciones de HPLC, dimensiones de la columna, 100 x 4 mm de D.I.; selector de RP/WAX de modo mixto inmovilizado sobre sílice (5 µm, 120 Å); velocidad de flujo, 1,00 ml.min⁻¹; temperatura, 25°C; inyección, 15 µl; fase móvil, A: ACN/agua = 30/70 (v/v) que contiene ácido acético 20 mM, pH ajustado a 6,35 (con amoniaco), B: ACN/agua = 80/20 (v/v) que contiene ácido acético 20 mM, pH ajustado a 7,45 (con amoniaco); elución en gradiente, gradiente lineal desde el 0 hasta el 100% de B en 10 min, luego el 100% de B durante 12 min, luego reequilibración de 8 min con el 0% de B.

En conclusión, el nuevo método de HPLC con RP/WAX con el intercambiador aniónico bicíclico de modo mixto recién inventado supera en gran medida a la RP-HPLC convencional sobre fases C₁₈. El diagrama de elución se representa en la figura 2.

20 **Ejemplo B3 (no según la presente invención): Aplicación de RP-WAX basada en N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano para la purificación de un péptido sintético**

La fase estacionaria de RP/WAX del ejemplo A11 basada en N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano inmovilizada covalentemente sobre sílice modificada con partículas de tiol (5 µm, diámetro de poro de 120Å) mediante reacción de adición por radicales, se somete a prueba para determinar la separación y purificación de un tetrapéptido sintético N- y C-protégido de sus productos secundarios. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas: Fase estacionaria: material de RP/WAX del ejemplo A11, partículas de 5 µm; dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 316 nm; descripción de picos: (1) impureza de péptido principal desconocido, (2) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida.

30 El cromatograma resultante se muestra en la figura 4.

Detalles experimentales: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de sus productos secundarios usando un material de intercambio aniónico de modo mixto basado en 3-α-aminotropano (material del ejemplo A11). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 316 nm; descripción de picos: (4A) impureza de péptido principal desconocido, (4B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida.

35 **Ejemplo B4: Aplicación de fase estacionaria de modo mixto basada en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina en modo de HILIC/WAX**

El ejemplo B4 demuestra la aplicabilidad y utilidad del material de intercambio aniónico de modo mixto del ejemplo A1 en el modo de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC). En el modo de HILIC, se emplean eluyentes con altas proporciones de modificador orgánico, en particular acetonitrilo o metanol, y las interacciones polares son las fuerzas dominantes para la retención en estas condiciones. La elución de los analitos polares se produce debido a la fracción acuosa en el eluyente o tras aumentar el contenido en agua del eluyente (gradiente de modificador orgánico decreciente o gradiente de agua y tampón creciente, respectivamente). Los analitos se eluyen según su polaridad creciente, es decir, cuanto más polares son los solutos más fuerte es su retención. La figura 5) muestra la separación de los cuatro péptidos Gly-Leu, Gly-Asp, Arg-Leu y Arg-Asp. Se usa acetonitrilo (ACN) como modificador orgánico y la separación se ejecuta en modo de elución en gradiente con un gradiente lineal decreciente de acetonitrilo. Se observa que el péptido más lipófilo Gly-Leu se eluye en primer lugar, mientras que el péptido más hidrófilo se eluye como el último de los cuatro solutos. En un sistema de RP, el orden de elución es diferente (véase la figura 6). Este comportamiento cromatográfico es típico de la cromatografía de interacción hidrófila y por tanto puede concluirse que los presentes materiales de intercambio aniónico de modo mixto son útiles para cromatografía de interacción hidrófila o, con más precisión, para cromatografía de HILIC/WAX de modo mixto.

Detalles experimentales: Comparación de separaciones de péptidos mediante modos de HILIC/WAX (figura 5) y RP (figura 6). Fases estacionarias: (a) Material del ejemplo A1 (véase también B1). (b) Beckman ODS (véase el ejemplo B1). Condiciones experimentales: (a) fase móvil, agua (A), ACN (B), ácido fosfórico 200 mM pH 3,0 (ajustado con trietilamina) (C); gradiente, C constante al 5%, B constante al 90% desde 0-5 min, luego gradiente lineal descendente desde el 90 hasta el 50% de B en 60 min; (b) fase móvil, agua que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (A), ACN que contiene TFA al 0,1% (B); gradiente, B constante al 5% desde 0-5 min, luego gradiente lineal ascendente desde el 5 hasta el 90% de B en 60 min. Otras condiciones idénticas: velocidad de flujo 1 ml/min; temperatura, 25°C; longitud de onda de detección, 215 nm.

Ejemplo B5: Aplicación de fase estacionaria de modo mixto basada en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina en modo de HIC/WAX

El ejemplo B5 ilustra la aplicabilidad del material del ejemplo A1 que va a usarse en modo de cromatografía de interacción hidrófoba/intercambio aniónico (HIC/WAX) de modo mixto.

- 5 hVIP, un péptido que consiste en 28 aminoácidos con un peso molecular de 3325,8 y un pI de aproximadamente 10, se aplicó a cromatografía en el modo de RP/WAX. En las condiciones experimentales (eluyente pH 3) tanto el péptido como la fase estacionaria portan una carga positiva neta y se producen interacciones electrostáticas repulsivas. Por tanto, el péptido ($t_R = 6,00$ min) que es relativamente hidrófobo eluye cerca del tiempo muerto o incluso antes ($t_0 = 7,38$ min). Se observan dos picos principales adicionales en el cromatograma a tiempos de elución superiores que se cree que se originan a partir de agregados micelares de hVIP. Si el porcentaje de acetonitrilo se aumenta hasta el 3% y el tampón fosfato de trietilamonio (TEAP) se reduce hasta una concentración total de 1 mM, los agregados se rompen parcialmente y estas condiciones también presentan una alta concentración de elución de modo que hVIP ($t_R = 6,40$ min) se eluye de nuevo antes del tiempo muerto ($t_0 = 9,03$ min). Por consiguiente, ambos de estos modos de separación cromatográfica pueden clasificarse como cromatografía de modo mixto de RP/WAX.
- 10
- 15 En cambio, diferentes condiciones de separación pueden explicarse mediante un mecanismo de HIC/WAX de modo mixto. El aumento de la concentración de tampón TEAP en el eluyente hasta 50 y 100 mM, respectivamente, da como resultado una disminución del potencial real de los sitios de intercambio aniónico, lo que allana el camino para interacciones hidrófobas. La concentración de tampón aumentada provoca también una clase de efecto de desalación, que conduce a una fuerte adsorción de hVIP. El péptido no se eluye siempre que la concentración de tampón se mantenga por encima de aprox. 25 mM. Sin embargo, cuando se ejecuta un gradiente negativo pronunciado de TEAP desde 100 mM hasta 10 mM en el plazo de 2 min, hVIP se eluye como una banda nítida una vez que la concentración de TEAP total alcanza un nivel de aproximadamente 10 mM. Se encuentra un comportamiento similar en condiciones similares: Se ejecuta un gradiente lineal negativo desde TEAP 100 mM hasta 0 mM según experimentos de HIC típicos. De nuevo, hVIP se eluye cuando la concentración de TEAP cae por debajo de 20 mM. Ambos cromatogramas demuestran claramente la existencia de un mecanismo de HIC.
- 20
- 25

Ejemplo B6: Aplicación de sílice monolítica de RP-WAX de modo mixto basada en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina

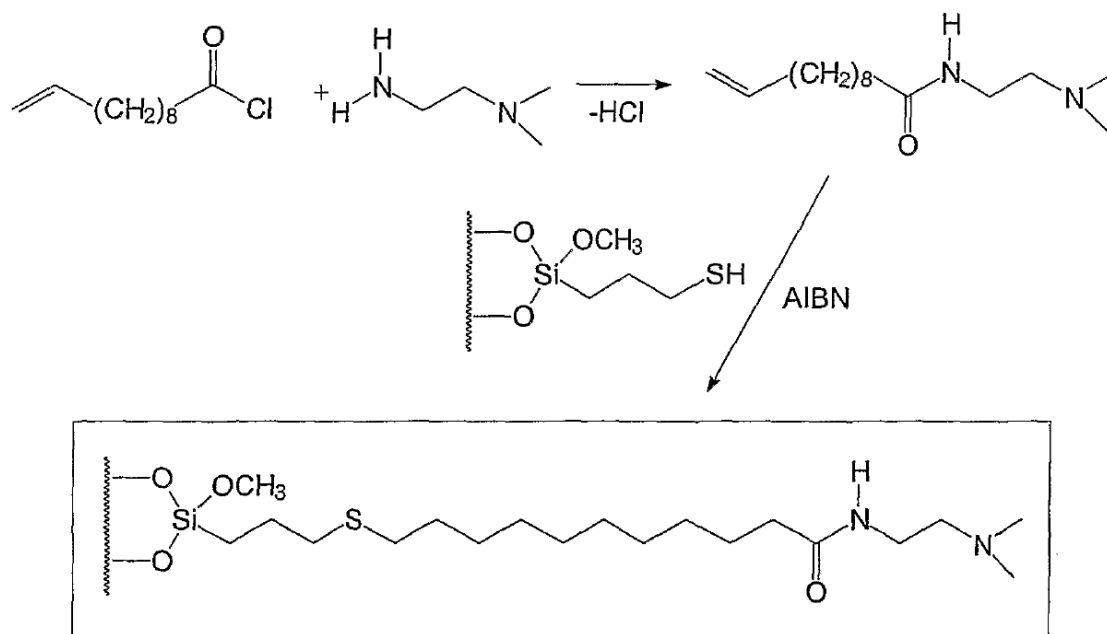
- La figura 7 muestra la separación de péptidos ácidos que difieren en el número de grupos ácidos sobre una columna de sílice monolítica de RP/WAX de modo mixto basada en un selector de N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A3). La columna de sílice monolítica de RP/WAX de modo mixto proporciona una buena separación de los 5 péptidos debido a sus diferencias de carga (figura 7). Este ejemplo muestra que la eficacia de los selectores de RP/WAX no se restringe a materiales de sílice particulados, sino que está disponible para otros soportes también.
- 30

- El cromatograma obtenido para péptidos ácidos sobre una columna de monolito de sílice de RP/WAX del ejemplo A3. Condiciones experimentales: fase móvil, agua (A), ACN (B), ácido fosfórico 200 mM pH 3,0 (ajustado con trietilamina) (C); gradiente, B constante al 10%, gradiente lineal desde el 0 hasta el 30% C desde 5-60 min; otras condiciones: velocidad de flujo 1 ml/min; temperatura, 25°C; longitud de onda de detección, 215 nm. Muestra: (7A) Gly-Asp, (7B) Glu-Glu, (7C) Asp-Asp, (7D) Asp-Asp-Asp, (7E) Asp-Asp-Asp-Asp.
- 35

C Ejemplos de comparación

- Ejemplo C1: Comparación de análogos de fase estacionaria de RP/WAX basados en sintones de intercambio aniónico cíclicos y no cíclicos**
- 40

El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula XIII, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:



a) Síntesis del ligando

Se disuelve 2-dimetilaminoetilamina (26 mmol) en cloroformo y a la disolución agitada y enfriada se le añade lentamente cloruro de ácido 10-undecenoico (22 mmol en cloroformo) mediante adición gota a gota. Se permite que la reacción avance durante 18 h a temperatura ambiente.

A partir de la mezcla de reacción se extrae el selector de N,N-dimetil-N-10-undecenoil-1,2-etanodiamina con hidróxido de sodio 2 M acuoso y cloroformo (3 x). Se secan las fases orgánicas combinadas con sulfato de sodio anhidro y luego se evaporan hasta sequedad. Tras secar a vacío, se produce un producto amarillento oleoso con un rendimiento del 94%.

ESI-EM (modo positivo): 255,4 amu $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): 6,11 (s, 1 H), 5,80 (m, 1H), 4,96 (dd, 2 H), 2,32 (q, 2 H), 2,23 (s, 6 H), 2,17 (t, 2 H), 2,14 (t, 2H), 2,03 (q, 2 H), 1,61 (t, 2 H), 1,37 (t, 2 H), 1,30 (s, 8 H) ppm.

b) Inmovilización del ligando de RP/WAX sobre sílice modificada con tiol

La inmovilización del selector de N,N-dimetil-N-10-undecenoil-1,2-etanodiamina selector sobre sílice modificada con 3-mercaptopropilo (Kromasil @ 100-5 μm ; 4,02% de C, 0,90% de H, 0,03% de N, 2,35% de S) sigue el protocolo descrito en el ejemplo A1. El análisis elemental de la fase estacionaria de RP/WAX antes y después de la ocupación de extremos proporciona los siguientes resultados: 11,57% de C, 2,16% de H, 1,36% de N, 1,98% de S (antes de la ocupación de extremos) y 12,62% de C, 2,21% de H, 1,27% de N, 1,86% de S (después de la ocupación de extremos).

c) Evaluación cromatográfica comparativa de RP/WAX cíclica y no cíclica

Tanto la fase estacionaria de RP/WAX basada en el selector de N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina cíclica del ejemplo A1 como la fase estacionaria de RP/WAX basada en la N,N-dimetil-N-10-undecenoil-1,2-etanodiamina no cíclica del ejemplo C1, a) se someten a prueba cromatográficamente usando un tetrapéptido sintético protegido de manera N- y C-terminal (N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida), que contiene una impureza desconocida que es difícil de separar del péptido diana mediante RP-HPLC en gradiente. Para las separaciones por HPLC, se comparó un sorbente según la presente invención (basado en N-10-undecenoil-3-aminoquinuclidina cíclica (ejemplo A1); (a)) con un sorbente de RP-WAX no cíclico (N,N-dimetil-N-10-undecenoil-1,2-etanodiamina no cíclica (véanse las etapas a) y b) anteriores); (b)). Las otras condiciones experimentales son las siguientes: Dimensiones de la columna, 250 x 4 mm de DI; fase móvil, formiato de amonio 1 M pH 4,5 - agua - acetonitrilo (1,8:88,2:10; v/v/v) ($C_{\text{tot}} = 18 \text{ mM}$); velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; longitud de onda de detección, 316 nm.

Puede observarse a partir de los cromatogramas de la figura 3 que la fase de RP/WAX basada en la amina terciaria cíclica presenta sorprendentemente capacidades de separación mucho más altas que su análogo basado en la amina terciaria no cíclica. El factor de separación es de 5,2 en la fase de RP/WAX cíclica (figura 3a), mientras que es de solo 3,5 en el análogo no cíclico (figura 3b). Esta pérdida drástica de selectividad es responsable principalmente de la caída de resolución desde 32 en la RP/WAX cíclica hasta solo 19 en la no cíclica. La resolución significativamente superior en

la RP/WAX cíclica también se traduce en una capacidad de carga de muestras mucho mejor y por tanto productividad en comparación con el análogo no cíclico cuando se usa para la purificación cromatográfica del péptido diana sintético de su impureza.

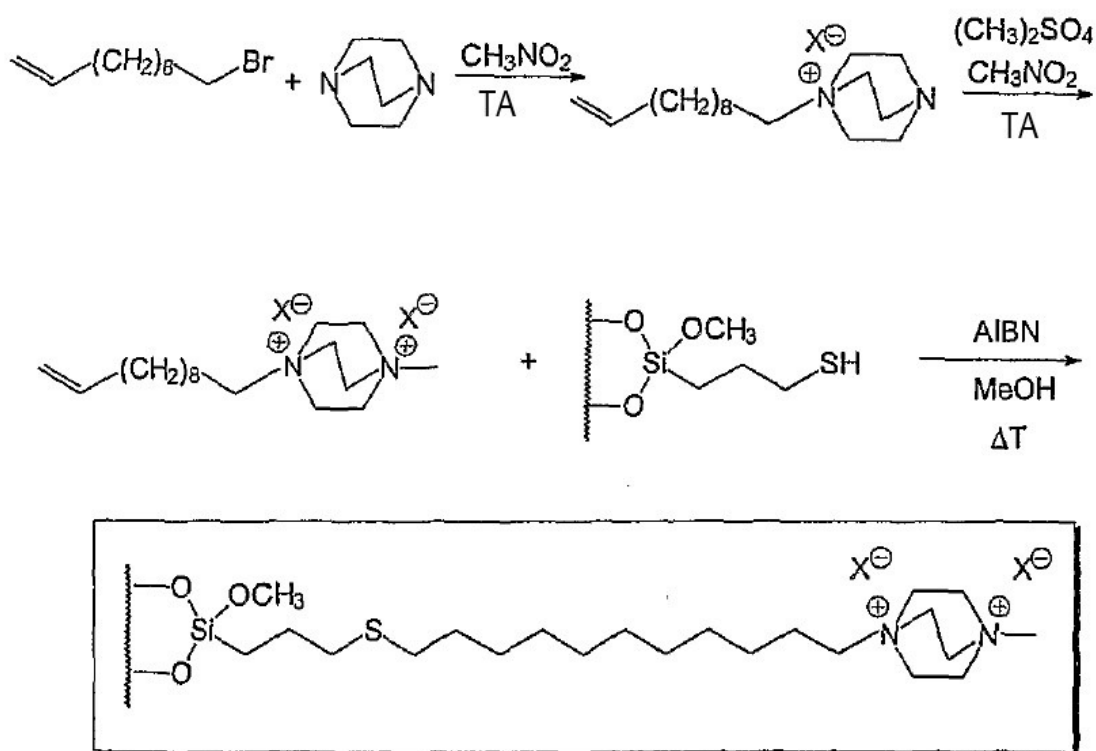
Por tanto, la fase estacionaria de RP/WAX según la presente invención presenta sorprendentemente una selectividad superior en comparación con su análogo no cíclico de la técnica anterior.

Se observaron hallazgos similares para otros solutos de prueba.

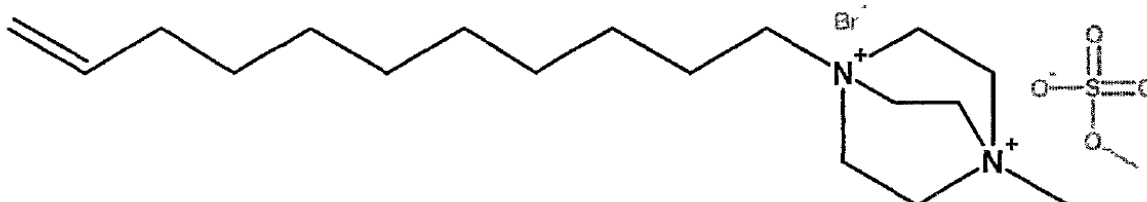
Ejemplo C2: Experimentos de comparación usando una fase estacionaria de RP/WAX con un resto de intercambio aniónico basado en el síntón de DABCO

El esquema de reacción se explica resumidamente en la fórmula XVI, en la que las líneas onduladas representan el soporte basado en sílice:

Fórmula XVI



a) Síntesis del selector de intercambio aniónico basado en DABCO bis-cuaternario



Fórmula XVII

A una disolución bien agitada de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) (1 equivalente) en nitrometano (0,5 ml por mmol de amina) se le añade 11-bromo-1-undeceno (0,98 equivalentes) manteniendo el matraz de reacción en un baño de agua a ~ 25°C. Se continúa agitando 16 h y después de eso se evapora la fracción volátil de la mezcla de reacción. Se obtiene la cristalización del aceite residual tras agitar con éter de petróleo (producto intermedio: bromuro de 10-undecen-1-il-4-aza-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano; rendimiento del 87%). Tras secar a vacío durante 12 h, se agita este producto intermedio (1 equivalente) con sulfato de dimetilo (2 equivalentes) en nitrometano (0,25 ml por mmol de sulfato

de dimetilo) a 25°C durante 16 h. La fracción volátil se elimina mediante evaporación. La agitación del producto en bruto residual con éter de petróleo proporciona un sólido blanco que se seca a vacío; rendimiento del 82%.

CARACTERIZACIÓN

Bromuro de 10-undecen-1-il-4-aza-1-azoniabicciclo[2.2.2]octano (producto intermedio)

- 5 ¹H-RMN (400 MHz, MeOD): 5,80 (m, 1 H), 4,97 (dd, 1 H), 4,91 (dd, 1 H), 3,37 (m, 6 H), 3,21 (m, 8 H), 2,05 (q, 2 H), 1,82-1,71 (m, 2 H), 1,45-1,30 (m, 12 H) ppm.

Selector basado en DABCO bis-cuaternario

¹H-RMN (400 MHz, MeOD): 5,80 (m, 1 H), 4,97 (dd, 1 H), 4,91 (dd, 1 H), 4,00 (m, 12 H), 3,55 (m, 2 H), 3,37 (s, 3 H), 2,04 (m, 2 H), 1,89-1,78 (m, 2 H), 1,47-1,29 (m, 12 H) ppm.

- 10 b) Inmovilización del selector basado en DABCO bis-cuaternario sobre sílice modificada con tiol

El selector basado en DABCO bis-cuaternario del ejemplo C2, etapa a) se inmoviliza sobre la misma sílice modificada con tiol siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo A11, b).

- 15 El gel de sílice modificado se lava varias veces con metanol y se seca durante 72 horas. El análisis elemental de las partículas modificadas químicamente antes de la ocupación de extremos proporciona los siguientes resultados: 11,27% de C, 2,25% de H, 0,94% de N y 4,29% de S.

Los grupos tiol restantes se ocupan mediante adición por radicales de 1-hexeno (3,2 ml) en condiciones por lo demás idénticas tal como se describió anteriormente para la adición del selector. Se lava el gel con metanol, ácido acético al 3% en metanol y dietil éter, se seca durante 72 horas y se empaqueta en columnas de HPLC de acero inoxidable.

- 20 El análisis elemental de la fase estacionaria de RP/SAX tras la ocupación de extremos proporciona los siguientes resultados: 11,80% de C, 2,33% de H, 0,88% de N y 4,01% de S.

c) Evaluación cromatográfica comparativa de fases estacionarias de intercambio aniónico basadas en el síntón de DABCO y fases según la presente invención

- 25 El material basado en DABCO anterior se evalúa con respecto a su capacidad de adsorción para el tetrapéptido N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida en comparación con el material de intercambio aniónico de modo mixto de RP/WAX del ejemplo A11 según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3- α -aminotropano y del ejemplo A1 según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas: Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (70:30; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 230 nm; descripción de picos: (8A) uracilo, (8B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida. Los cromatogramas resultantes se muestran en la figura 8.

- 30 Condiciones experimentales: Cromatogramas obtenidos para la separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de uracilo usando (a) un material de intercambio aniónico de la técnica anterior basado en DABCO bis-cuaternario (material descrito anteriormente basado en partículas de 5 μ m) y (b, c) materiales de RP/WAX de modo mixto basados en (b) selector de N-(10-undecenoil)-3- α -aminotropano (material del ejemplo A11 no según la presente invención basado en partículas de 5 μ m) y (c) N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A1 según la presente invención basado en partículas de 10 μ m). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (70:30; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 230 nm; descripción de picos: (8A) uracilo, (8B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida. Los cromatogramas resultantes se muestran en la figura 8.

- 40 d) Evaluación cromatográfica comparativa de fases estacionarias de intercambio aniónico basadas en sintones mono-catiónicos (3-aminoquinuclidina y 3- α -aminotropano) y bis-catiónicos (DABCO bis-cuaternario)

- 45 El material basado en DABCO anterior se evalúa con respecto a su capacidad de adsorción para el tetrapéptido N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida en comparación con el material de intercambio aniónico de modo mixto de RP/WAX del ejemplo A11 no según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3- α -aminotropano y del ejemplo A1 según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina.

- 50 Cromatogramas obtenidos para la separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de uracilo usando (a) un material de intercambio aniónico de la técnica anterior basado en DABCO bis-cuaternario (material descrito anteriormente basado en partículas de 5 μ m) y (b, c) materiales de RP/WAX de modo mixto según la presente invención basados en (b) selector de N-(10-undecenoil)-3- α -aminotropano (material del ejemplo A11 no según la presente invención basado en partículas de 5 μ m) y (c) N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A1 según la presente invención basado en partículas de 10 μ m). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min;

temperatura, 25°C; detección, UV 230 nm; descripción de picos: (1) uracilo, (2) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida-aminotropano y del ejemplo A1 basado en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas: Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 230 nm; descripción de picos: (9A) uracilo, (9B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida. Los cromatogramas resultantes se muestran en la figura 9.

Detalles experimentales: Cromatogramas obtenidos para la separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de uracilo usando (a) un material de intercambio aniónico de la técnica anterior basado en DABCO bis-cuaternario (material descrito anteriormente basado en partículas de 5 µm) y (b, c) materiales de RP/WAX de modo mixto basados en (b) selector de N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano (material del ejemplo A11 no según la presente invención basado en partículas de 5 µm) y (c) N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A1 según la presente invención basado en partículas de 10 µm). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 230 nm; descripción de picos: (9A) uracilo, (9B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida.

e) Evaluación cromatográfica comparativa de fases estacionarias de intercambio aniónico basadas en sintones monocatiónicos (3-aminoquinuclidina y 3-α-aminotropano) y bis-catiónicos (DABCO bis-cuaternario)

El material basado en DABCO anterior (es decir, el material de la técnica anterior más cercana) se evalúa con respecto a su capacidad de adsorción para el tetrapéptido N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida en comparación con el material de intercambio aniónico de modo mixto de RP/WAX del ejemplo A11 no según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano y del ejemplo A1 según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas: Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 316 nm; descripción de picos: (10A) impureza de péptido principal desconocido, (10B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida. Los cromatogramas resultantes se muestran en la figura 10.

Detalles experimentales: Separación de N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida de sus productos secundarios usando (a) un material de intercambio aniónico de la técnica anterior más cercana basado en DABCO bis-cuaternario (material descrito anteriormente basado en partículas de 5 µm) y (b, c) materiales de RP/WAX de modo mixto basados en (b) selector de N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano (material del ejemplo A11 no según la presente invención basado en partículas de 5 µm) y (c) N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A1 según la presente invención basado en partículas de 10 µm). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético acuoso al 1% (v/v) (pH 4,5, ajustado con amoniaco) - acetonitrilo (80:20; v/v). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 316 nm; descripción de picos: (10A) impureza de péptido principal desconocido, (10B) N-acetil-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilida.

f) Evaluación cromatográfica comparativa de fases estacionarias de intercambio aniónico basadas en sintones monocatiónicos (3-aminoquinuclidina y 3-α-aminotropano) y bis-catiónicos (DABCO bis-cuaternario)

El material basado en DABCO anterior (es decir, el material de la técnica anterior) se evalúa con respecto a su potencia de separación para una mezcla de prueba que consiste en butilbenceno, pentilbenceno, O,O-dietilfosforotioato y N-(terc-butoxicarbonil)-prolil-fenilalanina en comparación con el material de intercambio aniónico de modo mixto de RP/WAX del ejemplo A11 no según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano y del ejemplo A1 según la presente invención basado en N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina. Se usan las siguientes condiciones cromatográficas: Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético 50 mM en una mezcla de acetonitrilo-agua (40:60; v/v), pH 6,0 (amoniaco). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 250 nm. Los cromatogramas resultantes se muestran en la figura 11.

Detalles experimentales: Separación de una mezcla que consiste en butilbenceno (BuB), pentilbenceno (PeB), O,O-dietilfosforotioato (DETP) y N-(terc-butoxicarbonil)-prolil-fenilalanina (Boc-Pro-Phe) usando (a) un material de intercambio aniónico de la técnica anterior basado en DABCO bis-cuaternario (material descrito anteriormente basado en partículas de 5 µm) y (b, c) materiales de RP/WAX de modo mixto según la presente invención basados en (b) selector de N-(10-undecenoil)-3-α-aminotropano (material del ejemplo A11 no según la presente invención basado en partículas de 5 µm) y (c) N-(10-undecenoil)-3-aminoquinuclidina (material del ejemplo A1 según la presente invención basado en partículas de 10 µm). Dimensiones de la columna, 150 x 4,0 mm de D.I.; fase móvil, ácido acético 50 mM en una mezcla de acetonitrilo-agua (40:60; v/v), pH 6,0 (amoniaco). Otras condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; temperatura, 25°C; detección, UV 250 nm.

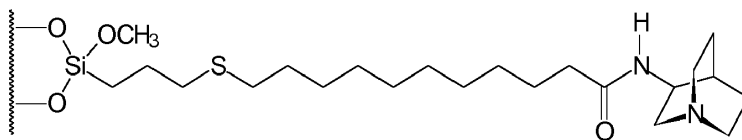
REIVINDICACIONES

1. Materiales de intercambio aniónico de modo mixto que comprenden

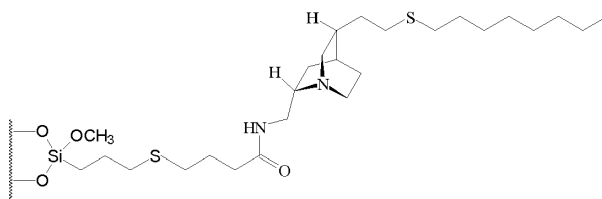
un soporte

y

5 un resto de ligando interactivo, caracterizados por la siguiente fórmula V que tiene el siguiente significado y en la que las líneas onduladas representan el soporte, estando dicho soporte basado en sílice



o



10 2. Uso de un material de intercambio aniónico de modo mixto según la reivindicación 1 para separar al menos dos solutos.

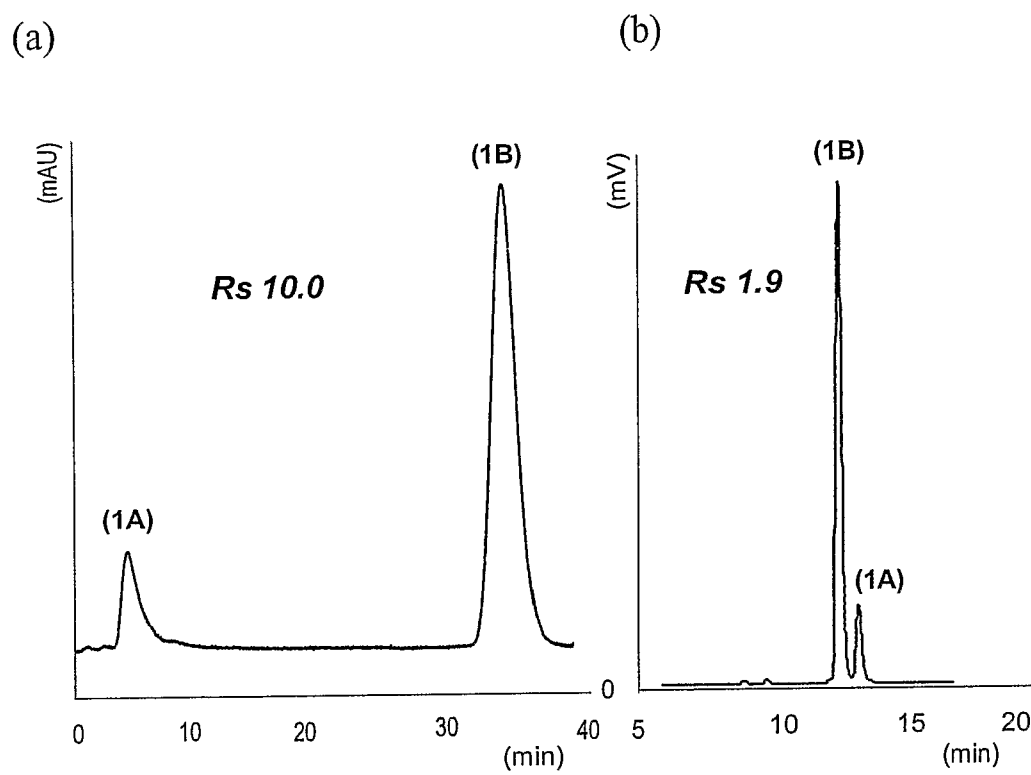
Fig. 1

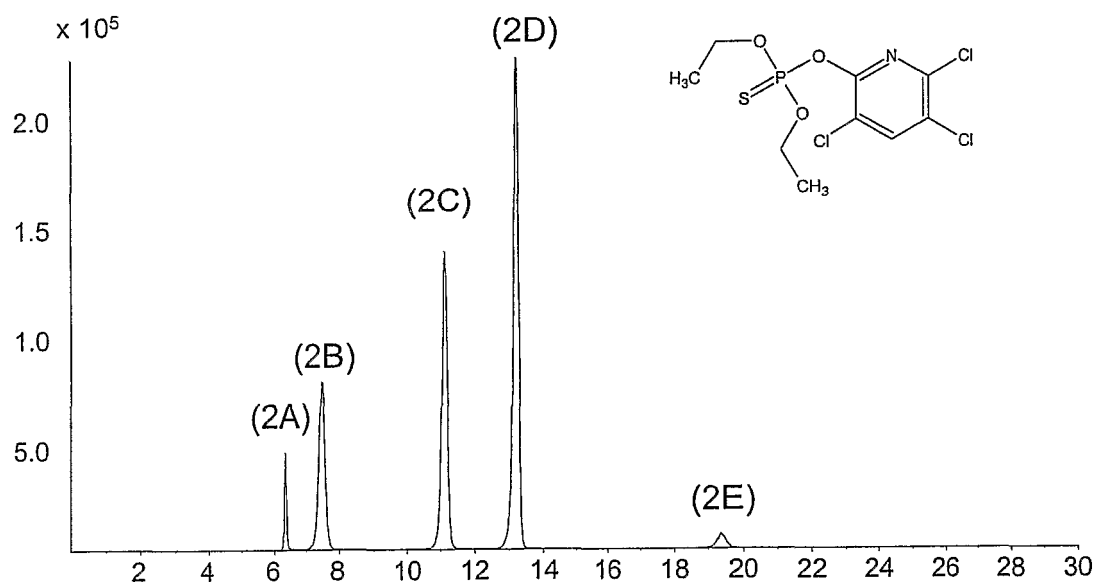
Fig. 2

Fig. 3

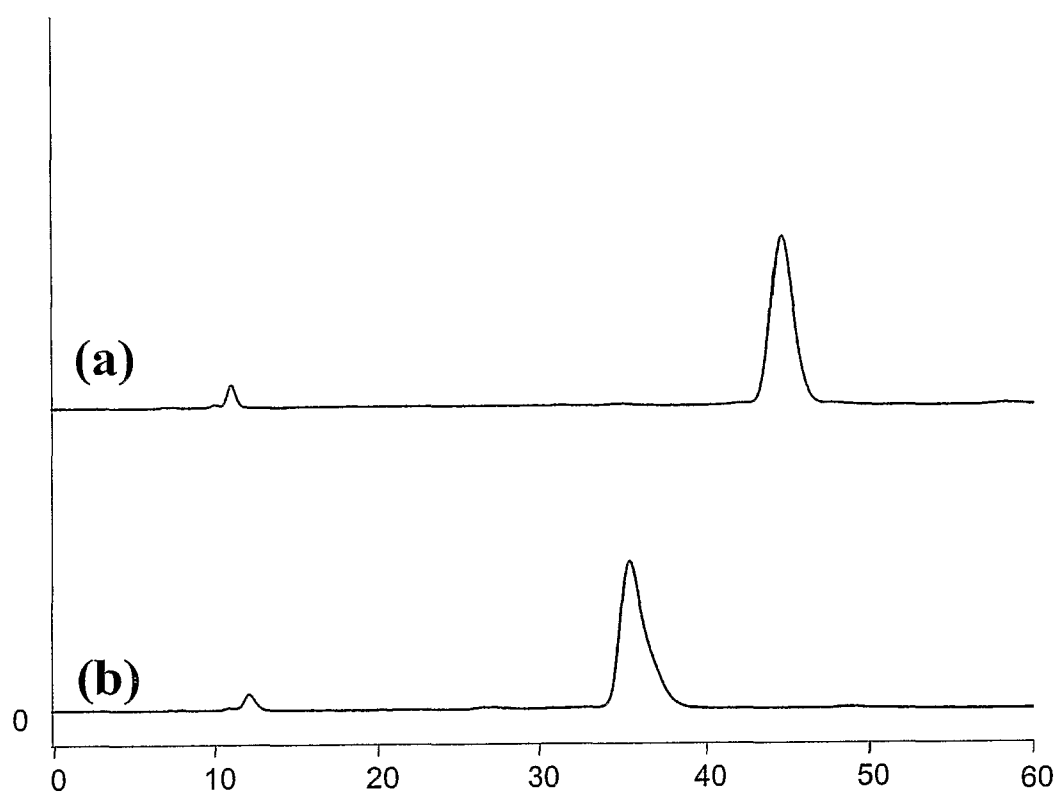


Fig. 4

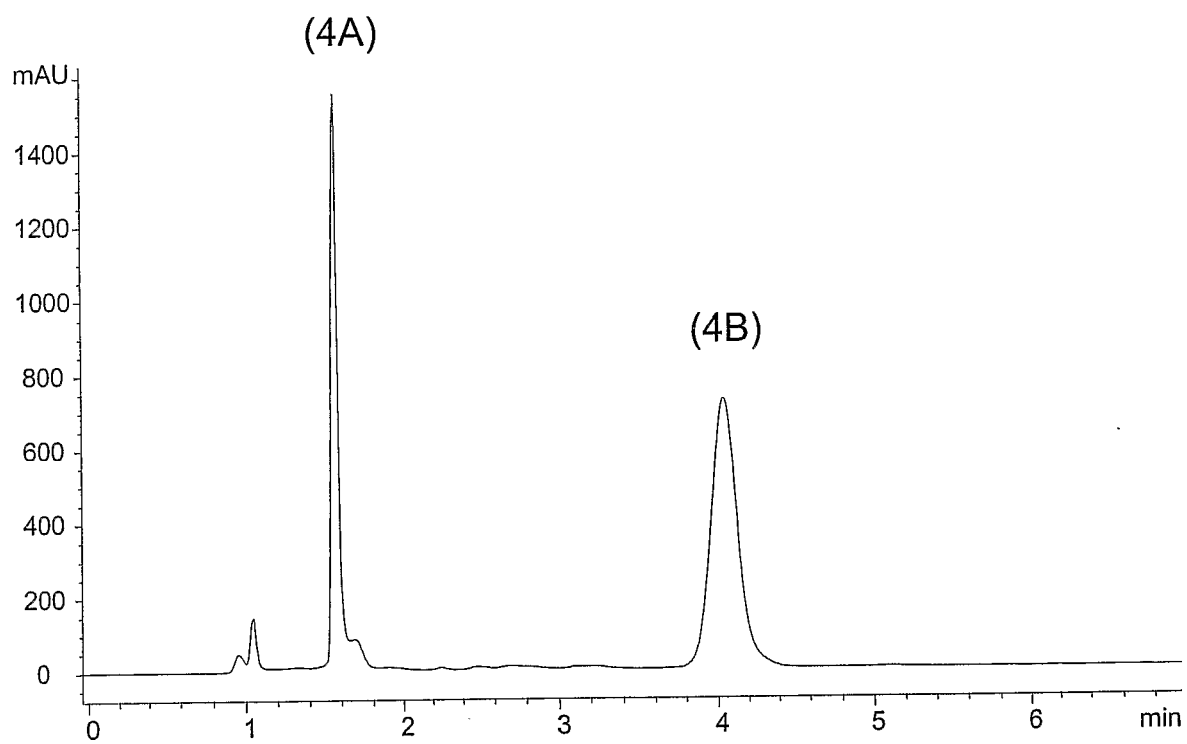


Fig. 5

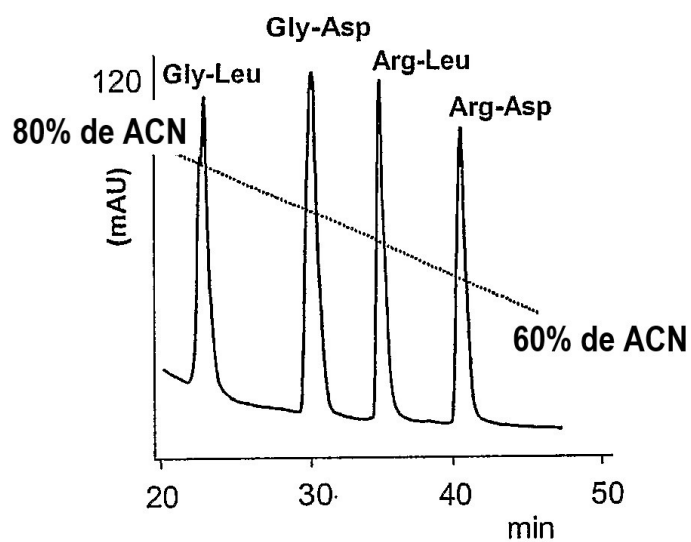


Fig. 6

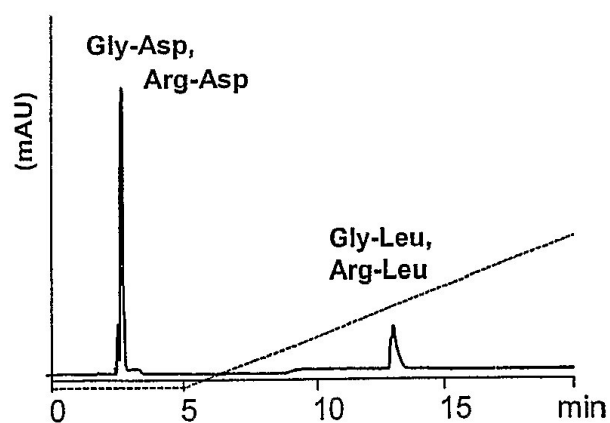


Fig. 7

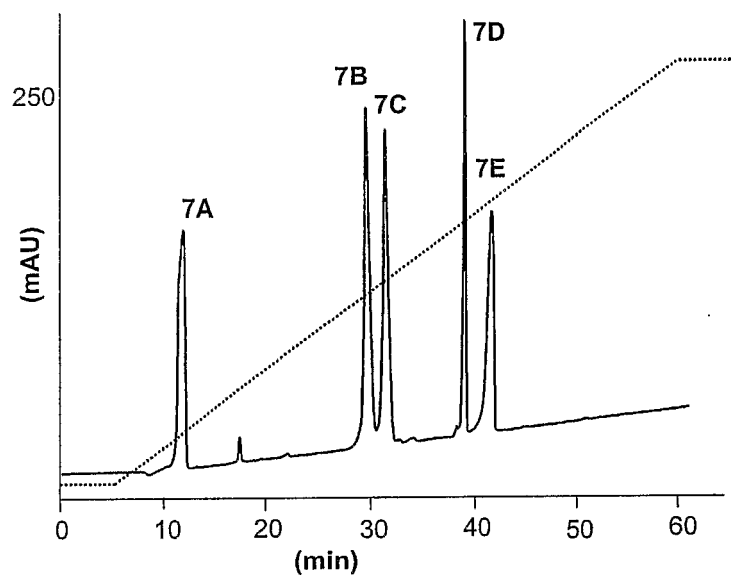


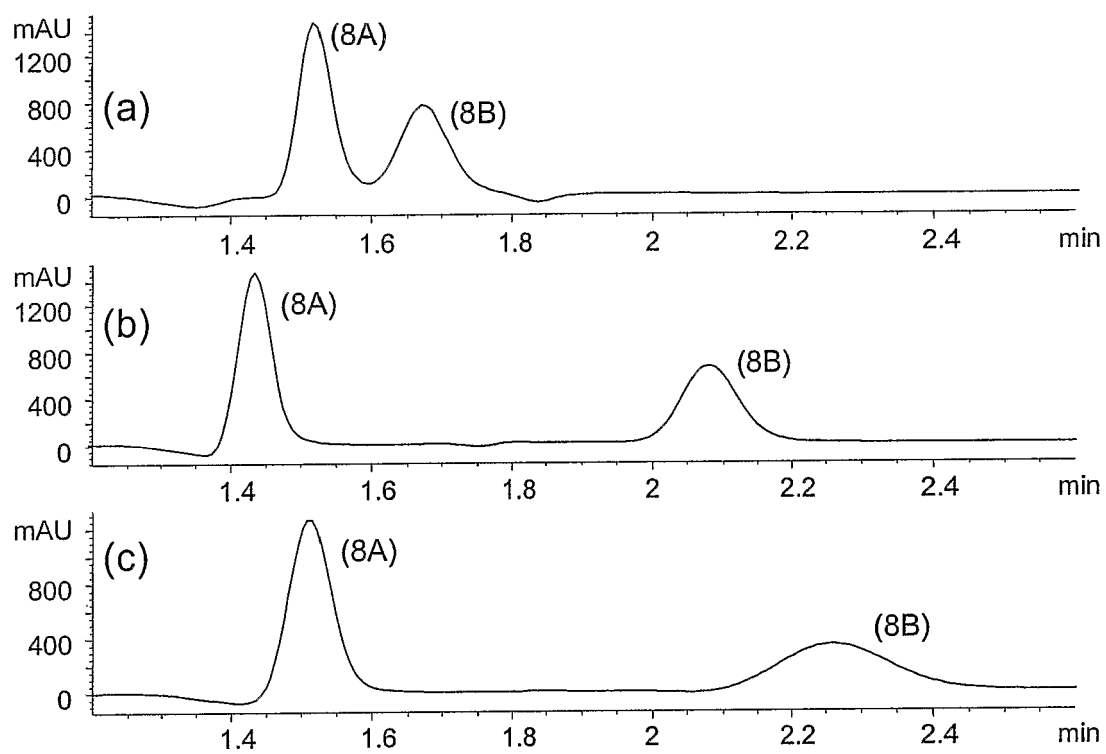
Fig. 8

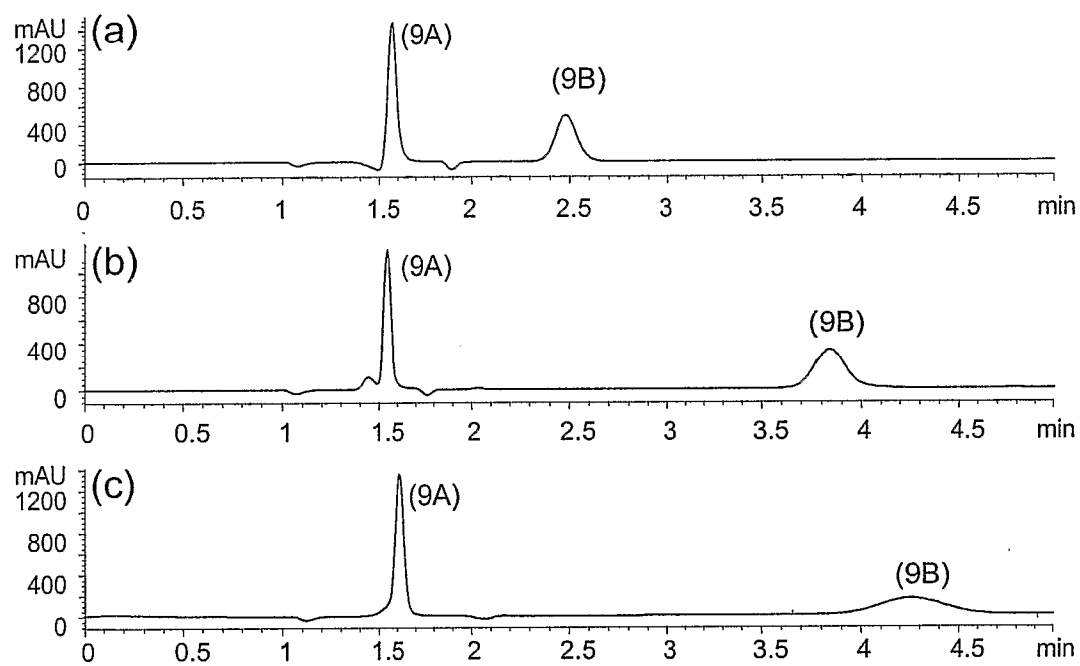
Fig. 9

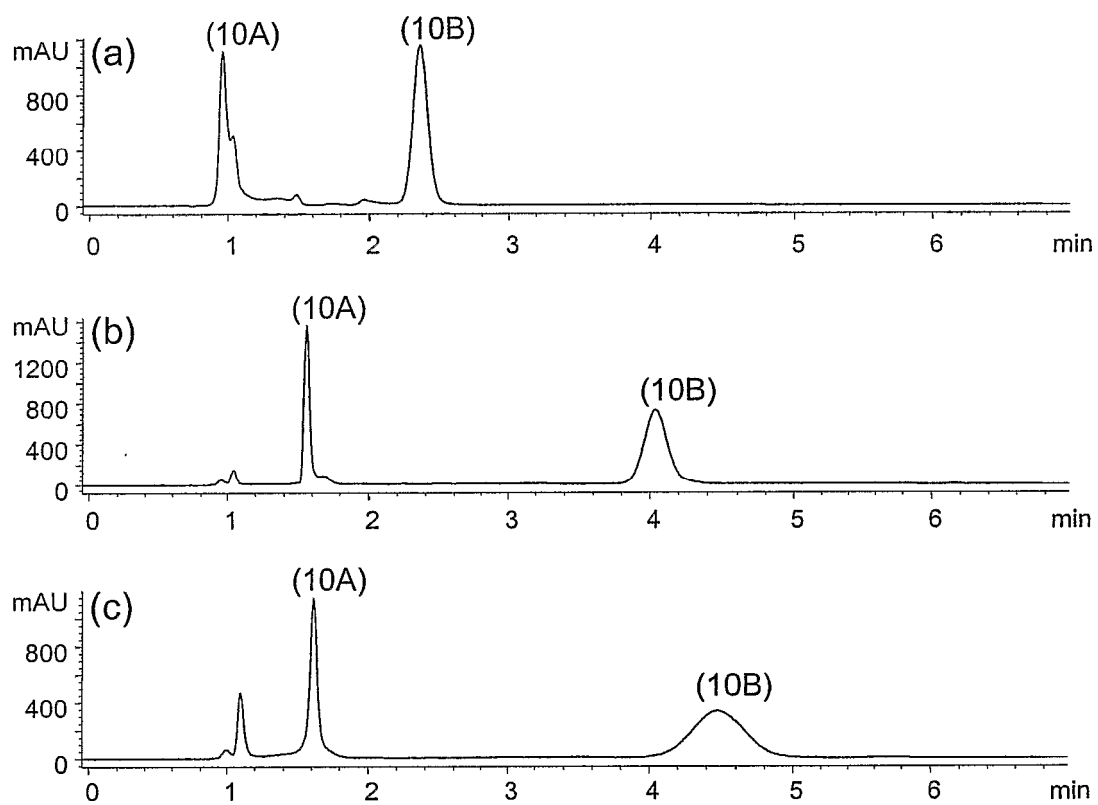
Fig. 10

Fig. 11