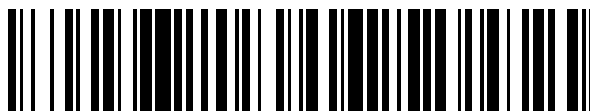


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 464**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)
C07D 251/50 (2006.01)
C07D 251/48 (2006.01)
B01J 20/286 (2006.01)
B01J 20/289 (2006.01)
C12Q 1/56 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2006 E 06727050 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 1885485**

54 Título: **Adsorbentes de afinidad para plasminógeno**

30 Prioridad:

09.05.2005 GB 0509438

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

08.06.2016

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
Freeport Ballasalla
Isle of Man IM9 2AP, GB**

72 Inventor/es:

**BETLEY, JASON, RICHARD;
PEARSON, JAMES, CHRISTOPHER;
KUHN, CLAUDIA, HILDEGARD y
BAINES, BALDEV, SINGH**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 464 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

Adsorbentes de afinidad para plasminógeno.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a compuestos y su uso como ligandos de afinidad.

Antecedentes de la invención

10

Un plasminógeno (como alternativa, conocido como microplasmina, PLG o angiostatina) es un zimógeno de glucoproteína de 91 kDa de cadena sencilla, y es el precursor de la plasmina de enzima fibrinolítica. La forma nativa del plasminógeno se compone de 791 aminoácidos con ácido glutámico situados en la porción N-terminal (Glu-plasminógeno). El plasminógeno tiene cinco regiones homólogas conocidas como kringles. Estas regiones son

15

específicas para los kringles complementarios situados en tPA, uPA y protrombina. Estos kringles tienen un sitio de unión a lisina de alta afinidad y cuatro de baja afinidad que median las interacciones de plasminógeno con fibrina y alfa-2-antiplasmina.

20

El plasminógeno se convierte en plasmina a través de una cascada de diversas reacciones que dan como resultado la hidrólisis del enlace peptídico Arg560-Val561 del plasminógeno, dando como resultado dos cadenas que permanecen asociadas covalentemente por un enlace disulfuro. La función principal de la proteasa plasmina tipo tripsina es la disolución de coágulos.

25

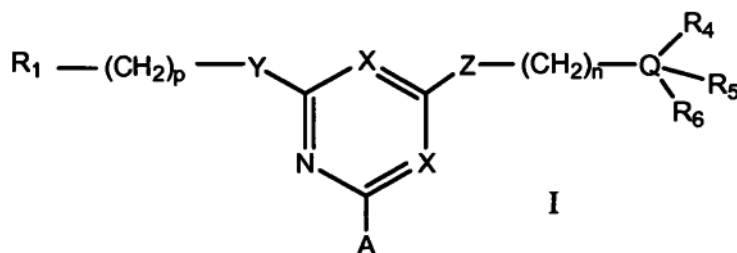
Las deficiencias del plasminógeno resultantes de mutaciones homo o heterocigotas en el ADN codificante se manifiestan en varias patologías, incluyendo conjuntivitis leñosas y trombosis.

30

El plasminógeno está presente en el plasma humano a una concentración de ~100 µg/ml. Es posible purificar el plasminógeno del plasma usando lisina inmovilizada sobre un soporte sólido, en un proceso de cromatografía de afinidad que está bien caracterizado. La cromatografía con lisina inmovilizada también se usa para la captura primaria de recolección de cultivo celular de proteínas, tal como el activador tisular del plasminógeno (tPA), usado comúnmente como un anticoagulante. Las capacidades de unión de las resinas disponibles en el mercado para el plasminógeno están típicamente en el intervalo de 0,6-1,0 mg de proteína/ml de adsorbente. La pureza del plasminógeno eluido de estos materiales es excelente, con una pureza habitual de >95 % desde la captura principal. Resultará útil tener un material que conserve estas características de excelente pureza de elución, pero que muestre una capacidad de unión en exceso de los disponibles actualmente.

35

El documento WO97/10887 desvela compuestos basados en triazina, útiles como adsorbentes de afinidad, de fórmula I



40

donde R₁ es H, alquilo, hidroxialquilo, ciclohexilo, NH₂, fenilo, naftilo, 1-fenilpirazol, indazol, benzotiazol, benzoxazol o bencimidazol, cualquiera de cuyos grupos aromáticos puede estar sustituido con uno o más de alquilo, alcoxi, aciloxi, acilamino, amino, NH₂, OH, CO₂H, sulfonilo, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo y halógeno;

45

un X es N y el otro es N, C-Cl o C-CN;

Y es O, S o NR₂;

Z es O, S o NR₃;

cada uno de R₂ y R₃ es H, alquilo, hidroxialquilo, bencilo o β-feniletilo;

Q es benceno, naftaleno, benzotiazol, benzoxazol, 1-fenilpirazol, indazol o bencimidazol;

50

cada uno de R₄, R₅ y R₆ es H, OH, alquilo, alcoxi, amino, NH₂, aciloxi, acilamino, CO₂H, ácido sulfónico, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo o halógeno;

n es de 0 a 6;

p es de 0 a 20; y

A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo triazina por un espaciador.

- 5 Los compuestos de fórmula I se desvelan como poseedores de afinidad para proteínas tales como inmunoglobulinas, insulina, Factor VII u hormona de crecimiento humano.

Se desvelan compuestos de estructura relacionada en los documentos WO00/67900 y WO03/097112. Tienen afinidad para endotoxinas.

10

Resumen de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que ciertos compuestos, muchos de los cuales son novedosos, son útiles para el aislamiento basado en afinidad del plasminógeno. Estos compuestos se definen en las reivindicaciones 1, 3 y

15 4.

Descripción de la invención

- 20 Los documentos WO97/10887, WO00/67900 y WO003/097112 desvelan cómo pueden construirse bibliotecas combinatorias de ligandos sobre soporte sólido. Durante la exploración de un conjunto de estas bibliotecas combinatorias con plasma humano agrupado como materia prima, se identificaron varios ligandos como capaces de unir selectivamente y eluir plasminógeno humano.

- 25 Los compuestos de fórmula III, IV y V, para su uso en la invención, pueden prepararse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos se describen en las 3 publicaciones PCT que se han identificado anteriormente; pueden adaptarse fácilmente a la preparación de nuevos compuestos.

- 30 El documento WO97/10887 da ejemplos de A, que incluye espaciadores o enlazadores L a través de los cuales el anillo de triazina puede unirse a un soporte sólido M. Como se describe en el documento WO97/10887, dichos soportes incluyen agarosa, sílice, celulosa, dextrano, almidón, alginato, carragenano, polímeros sintéticos, vidrio y óxidos de metal. Dichos materiales pueden activarse antes de la reacción para formar un adsorbente de esta invención.

L puede ser, por ejemplo, $-T-(-V^1-V^2)_m-$, donde

T es O, S o $-NR^7-$;

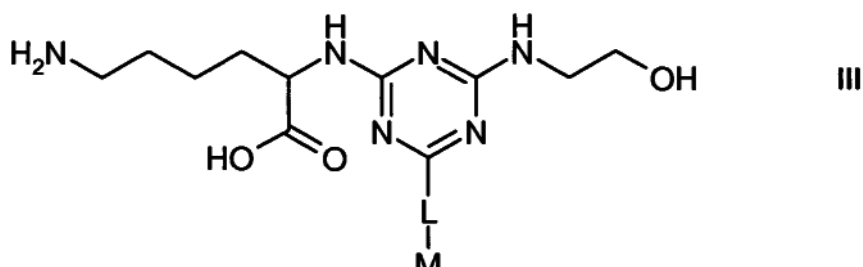
- 35 m es 0 o 1;

V^1 es un radical hidrocarburo opcionalmente sustituido de 2 a 20 átomos de C; y

V^2 es O, S, $-\text{COO}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{PO}_3\text{H}-$, $-\text{NH-arileno-SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{NR}_8-$; y

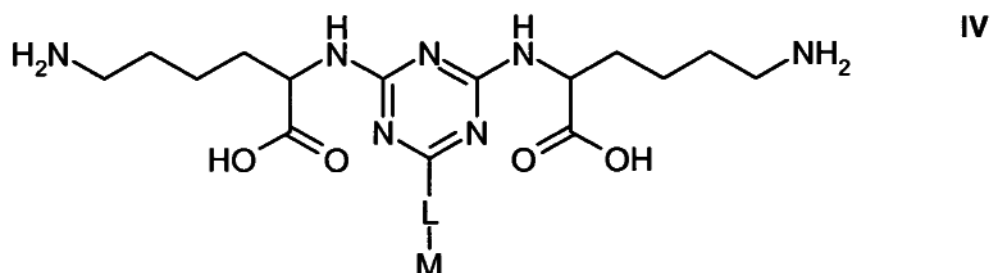
cada uno de R^7 y R^8 es independientemente H o alquilo C_{1-6} .

- 40 El adsorbente de unión al plasminógeno se representa por la estructura III

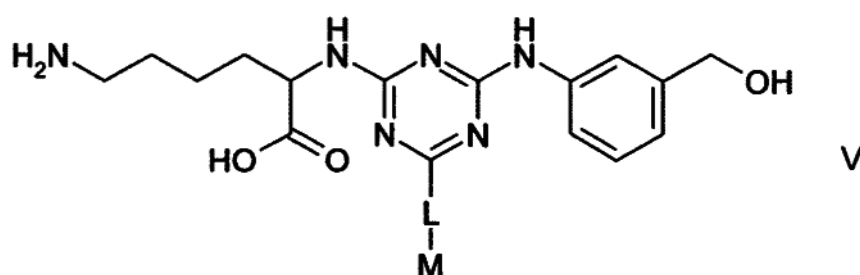


El adsorbente de unión al plasminógeno para su uso en la invención también se representa por la estructura IV

45



El adsorbente de unión al plasminógeno se representa por la estructura V



5

Los ligandos y adsorbentes de unión al plasminógeno descritos en el presente documento son útiles para el aislamiento y purificación por afinidad del plasminógeno de diversos fluidos y mezclas complejas, incluyendo, pero sin limitación, plasma humano, plasma humano empobrecido de una o más proteínas diferentes y sobrenadantes de fermentación recombinantes. Esta utilidad se demuestra a continuación en el Ejemplo 4, por experimentos de cromatografía usando plasma humano agrupado.

El término "plasminógeno" se usa en el presente documento para describir el propio plasminogeno y también análogos que tienen las características funcionales del plasminógeno, por ejemplo en cuanto a afinidad a un compuesto dado descrito en el presente documento. Por lo tanto, el analito puede ser una proteína que es un fragmento funcional de plasminógeno, o un análogo estructural que tiene uno, más de cada uno de los mismos sitios de unión, o una proteína de fusión.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

20

Ejemplo 1 - Síntesis del Adsorbente III

Se suspendió gel de agarosa Purabead reticulado al 6 % (1000 g sedimentado en agua de osmosis inversa (RO)) con agua RO (670 ml), hidróxido sódico 10 M (NaOH) (90 ml) y epíclorhidrina (127 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, después se lavó con agua RO (12 x 1 l). Al análisis para grupos epoxi mostró que el gel se derivó con 17,3 μ mol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.

El gel se drenó antes de añadir agua RO (800 ml) y una solución acuosa de amoníaco de 0,88 de gravedad específica (200 ml). La mezcla se agitó, se calentó a 40 °C y después se agitó a esta temperatura durante 16 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y después se lavó con agua RO (12 x 1000 ml). El análisis de TNBS para grupos amina mostró que el gel se derivó con 25,6 μ mol de grupos amina por g de gel sedimentado.

El gel aminado y sedimentado (1000 g) se suspendió en fosfato potásico 1 M a pH 7,0 (1 l) y después se dejó drenar. Después, a este gel se le añadieron fosfato potásico 1 M a pH 7,0 (250 ml) y agua RO (250 ml). La suspensión se agitó vigorosamente mientras se añadía acetona (500 ml). Después de enfriar en un baño de hielo/sal durante 30 minutos, se añadió en una porción cloruro cianúrico (25 g) en acetona fría (250 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, antes de lavarse con acetona acuosa al 50 % (5 x 1 l), agua RO (5 x 1 l), acetona acuosa al 50 % (5 x 1 l) y agua RO (10 x 1 l). Se dejó sedimentar el gel por gravedad, antes de tomar una muestra para su análisis. El análisis para la liberación de cloruro indicó que el gel se derivó con 16,8 μ mol de diclorotriazina

40

sustituida por g de gel sedimentado.

El gel sedimentado de la fase previa (1000 g) se suspendió con tampón fosfato potásico 1 M (1 l) que contenía clorhidrato de lisina (45 g), pH 8,5, a temperatura ambiente durante 16 horas. La suspensión se filtró y después se lavó con agua RO (15 x 1 l). A 950 g (sedimentados) del gel suspendido en agua RO (950 ml) se le añadió etanolamina (14,82 g). La mezcla se agitó a 60 °C durante una noche. Después de tomar una muestra del sobrenadante para su análisis, la suspensión se filtró y después se lavó con agua RO (12 x 1 l). El análisis de liberación de cloruro indicó que el gel se había derivado con 22,7 µmol de etanolamina por g de gel sedimentado.

- 10 El gel se incubó a una concentración final de NaOH 0,5 M durante una noche a 40 °C y después se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 1 l). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M (1 l) y la mezcla se incubó a 40 °C durante una noche. Después, el gel se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 1 l) y después agua RO (10 x 1 l). Después del lavado con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 1 l), el gel se lavó durante más tiempo con agua RO (10 x 1 l), antes de almacenarse en la cámara a 4 °C en etanol acuoso al 20 % v/v.

15

Ejemplo 2 - Síntesis del Adsorbente IV

Se preparó agarosa activada por diclorotriazina de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 1. El gel sedimentado (41,5 g, 22 µmol DCT/g sedimentados) se hizo reaccionar durante una noche a 60 °C con una solución acuosa de clorhidrato de lisina (1,67 g, 10 equivalentes molares) en agua (40 ml) mientras se mantenía el pH a 9,0 con NaOH 10 M. En este momento, el gel se lavó con dimetilformamida acuosa al 50 % (5 x 80 ml), agua RO (5 x 80 ml), HCl 0,1 M (5 x 80 ml), isopropanol al 30 %/NaOH 0,2 M (5 x 80 ml) y agua RO (5 x 80 ml), antes de almacenarse en la cámara a 4 °C en etanol acuoso al 20 % v/v.

Ejemplo 3 - Síntesis del Adsorbente V

Se preparó agarosa activada con diclorotriazina de acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo 1. El gel sedimentado (43 g, 21,1 µmol DCT/g sedimentados) se hizo reaccionar durante 30 minutos a 5 °C con una solución de 2-(hidroximetil)anilina (0,56 g, 5 equivalentes molares) en DMF al 50 %/agua (40 ml). En este momento, el gel se lavó con dimetilformamida acuosa al 50 % (5 x 80 ml) y agua RO (5 x 80 ml). Después, el gel se hizo reaccionar durante una noche a 60 °C con una solución acuosa de clorhidrato de lisina (1,71 g, 10 equivalentes molares) en agua (40 ml) mientras se mantenía el pH a 9,0 con NaOH 10 M. En este momento, el gel se lavó con dimetilformamida acuosa al 50 % (5 x 80 ml), agua RO (5 x 80 ml), HCl 0,1 M (5 x 80 ml), isopropanol al 30 %/NaOH 0,2 M (5 x 80 ml) y agua RO (5 x 80 ml), antes de almacenarse en la cámara a 4 °C en etanol acuoso al 20 % v/v.

35

Ejemplo 4 - Cromatografía con los Adsorbentes III, IV y V usando plasma humano

Se realizaron experimentos de cromatografía usando una columna cromatográfica de 1,6 cm de diámetro interno y 10 cm de altura de lecho usando un sistema de cromatografía Akta Explorer. La columna se equilibró con cloruro sódico 140 mM/citrato sódico 20 mM/Tris 20 mM pH 7,5 a 100 cm/h. Después, se cargó plasma humano (ajustado a Tris 20 mM/pH 7,5 filtrado a través de filtros de 3, 0,8, 0,45, y 0,2 µm, 1,3 l) a 50 cm/h. El lavado posterior a la carga fue con cloruro sódico 140 mM/citrato sódico 20 mM/Tris 20 mM pH 7,5 a 50 cm/h con respecto a la absorbancia inicial. Después, la columna se eluyó con cloruro sódico 140 mM/citrato sódico 20 mM/Tris 20 mM/ácido ε-aminocaproico 500 mM, pH 7,5 a 100 cm/h, y se regeneró con hidróxido sódico 0,5 M. Las fracciones de carga, no unidas y de elución se analizaron por nefelometría para determinar las capacidades de unión. Se realizó SDS PAGE para determinar la pureza.

La pureza de las fracciones de elución de todos los adsorbentes fue >85 %. Las capacidades de unión dinámica (a una ruptura del 10 %) se muestran en la Tabla 1.

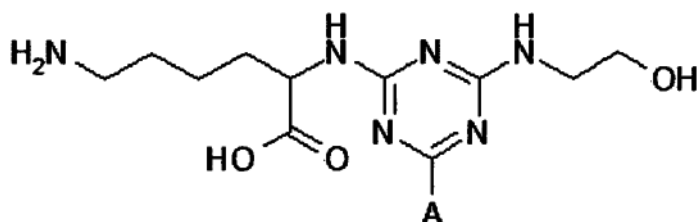
50

Tabla 1

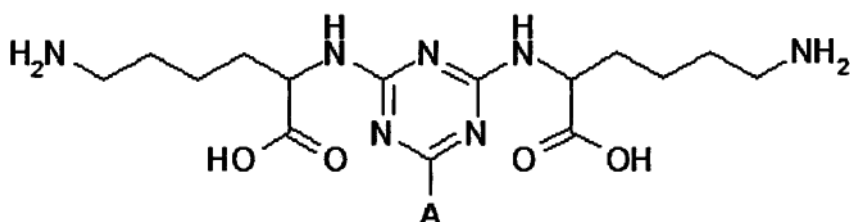
Adsorbente	Capacidad de Unión Dinámica (mg/ml)
III	4,75
IV	4,0
V	17,0

REIVINDICACIONES

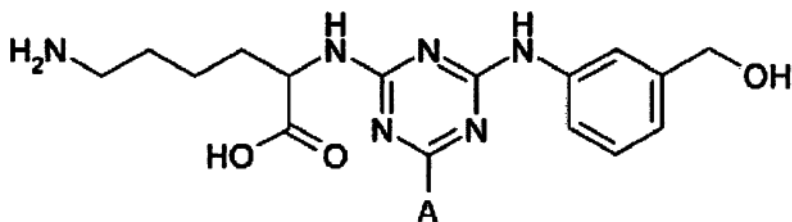
1. Uso de un adsorbente de afinidad para la separación, eliminación, aislamiento, purificación, caracterización, identificación o cuantificación de un plasminógeno o una proteína que es un análogo del plasminógeno, donde el adsorbente de afinidad es un compuesto de fórmula III, IV o V:



III



IV



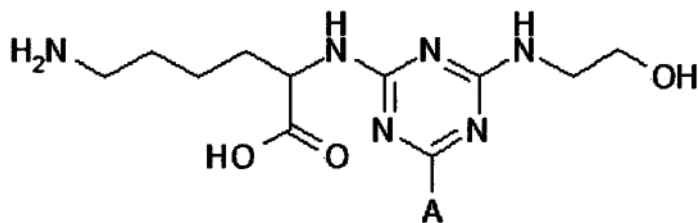
V

10 donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo triazina por un espaciador.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el plasminógeno está en una muestra de plasma.

3. Un compuesto de fórmula III

15



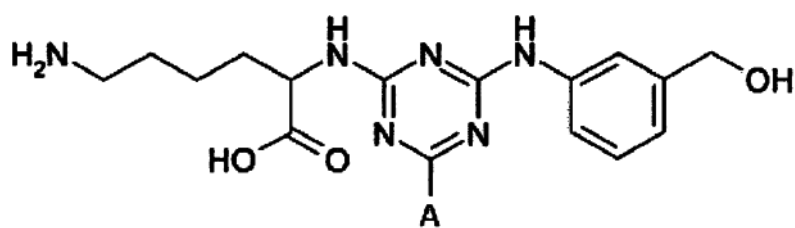
III

donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo triazina por un espaciador.

donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo triazina por un espaciador.

20

4. Un compuesto de fórmula V



V

donde A es una matriz de soporte, unida opcionalmente al anillo triazina por un espaciador.

5

5. Un compuesto que es un precursor de un compuesto según la reivindicación 3 o 4, donde A se reemplaza por un grupo funcional, unido directa o indirectamente al anillo triazina, que permite la inmovilización del precursor sobre un soporte sólido.