

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 467**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)
C07K 14/75 (2006.01)
C07D 251/50 (2006.01)
B01J 20/286 (2006.01)
B01J 20/289 (2006.01)
C07D 251/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2006 E 06727057 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 1885487**

54 Título: **Adsorbentes de afinidad para el fibrinógeno**

30 Prioridad:

09.05.2005 GB 0509442

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

08.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BETLEY, JASON, RICHARD;
PEARSON, JAMES, CHRISTOPHER;
BEACOM, BEN, MARTIN;
PODGORSKI, TADEUSZ, ANTONI y
PANNELL, ROBERT, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 467 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 el fibrinógeno

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10

El fibrinógeno es una proteína dimérica, cada una de cuyas mitades está compuesta de cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro designadas α , β y γ . En el hígado, los genes para las cadenas α y β codifican productos individuales de 610 y 461 restos de aminoácidos, respectivamente. En contraste, el procesamiento alternativo de los transcritos del gen de la cadena γ da variantes de cadena γ de longitudes ligeramente diferentes (411 y 427 restos),

15

el más corto de ellos que constituye el ~90 % del producto final. La forma predominante del fibrinógeno se secreta a la circulación con una masa molecular de ~340 kDa. Después de su secreción desde el hígado, la proteína se encuentra no solo en el plasma, sino también en la linfa y en el líquido intersticial. En individuos sanos, la concentración de fibrinógeno en plasma es de entre 4 y 10 μ m. Es importante destacar que la concentración puede aumentar hasta en un 400 % durante momentos de estrés fisiológico.

20

El fibrinógeno se convierte en fibrina por la trombina, una proteinasa de serina de tipo tripsina. La trombina hidroliza al menos dos enlaces Arg-Gly específicos dentro del fibrinógeno. Este proceso conduce inicialmente a la formación de protofibrillas de fibrina que se pueden asociar lateralmente, formando fibras más gruesas que, a su vez, se pueden asociar para formar haces de fibrina incluso más gruesos y ramificados. Los haces de este tipo se estabilizan adicionalmente por enlaces cruzados formados entre restos de Lys y Gln situados dentro de las cadenas alfa de moléculas de fibrina vecinas, para formar una malla tridimensional capaz de prevenir o limitar el flujo de sangre. Este proceso de reticulación está catalizado por la enzima Factor XIIIa.

25

Existen dos tipos de anomalías congénitas del fibrinógeno, la afibrinogenemia y la disfibrinogenemia. La afibrinogenemia es una deficiencia cuantitativa que da lugar a diátesis hemorrágica. El término hipofibrinogenemia se refiere a una deficiencia menos severa del fibrinógeno. La disfibrinogenemia se caracteriza por anomalías funcionales del fibrinógeno que pueden resultar en hemorragia o trombosis. Los pacientes pueden ser tratados con concentrado o crioprecipitado de fibrinógeno. El fibrinógeno también se usa habitualmente durante cirugía como complemento de la hemostasia en forma de selladores de fibrina. Normalmente estos son sistemas de dos

35

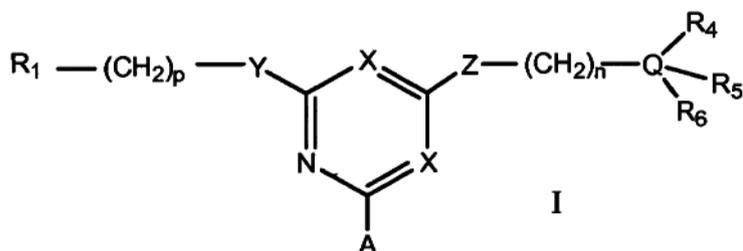
componentes que comprenden fibrinógeno (por ejemplo, en forma de concentrado de fibrinógeno) y trombina en composiciones farmacéuticas apropiadas.

Una preocupación en la administración de estas formas parcialmente purificadas de fibrinógeno es la presencia de proteínas contaminantes. Por tanto sería útil un método de purificación basado en la afinidad para el aislamiento de

40

El documento WO97/10887 desvela compuestos a base de triazina, útiles como adsorbentes de afinidad, de fórmula

45 I



en la que R_1 es H, alquilo, hidroxialquilo, ciclohexilo, NH_2 , fenilo, naftilo, 1-fenilpirazol, indazol, benzotiazol, benzoxazol o bencimidazol, cualquiera de dichos grupos aromáticos que pueden estar sustituidos con uno o más de

50

alquilo, alcoxi, aciloxi, acilamino, amino, NH_2 , OH, CO_2H , sulfonilo, carbamoilo, sulfamoilo, alquilsulfonilo y halógeno;

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;

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

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

5 R₄, R₅ y R₆ son cada uno 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, opcionalmente unida al anillo de triazina por un espaciador.

10

Los compuestos de fórmula I se describen como que tienen afinidad por proteínas tales como las inmunoglobulinas, la insulina, el factor VII o la hormona del crecimiento humano.

Se describen compuestos de estructura relacionada en los documentos WO00/67900 y WO03/097112. Tienen
15 afinidad por las endotoxinas.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que ciertos compuestos, muchos de los cuales son nuevos, son útiles para el
20 aislamiento del fibrinógeno basado en afinidad. Estos compuestos se definen en las reivindicaciones 1 y 3 a 7.

Descripción de la invención

Los documentos WO97/10887, WO00/67900 y WO03/097112 desvelan cómo se pueden construir bibliotecas
25 combinatorias de ligandos sobre un soporte sólido. Durante el cribado de un grupo de estas bibliotecas combinatorias con plasma humano como materia prima, se identificaron una serie de ligandos que eran capaces de unirse y eluir selectivamente el fibrinógeno humano.

Los compuestos de fórmula III, IV, V, VI, y VII, para su uso en la invención, se pueden preparar por procedimientos
30 conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos se describen en las 3 publicaciones PCT identificadas anteriormente; se pueden adaptar fácilmente a la preparación de nuevos compuestos.

El documento WO97/10887 da ejemplos de A, incluyendo espaciadores o enlazadores L a través de los cuales el
35 soportes incluyen agarosa, sílice, celulosa, dextrano, almidón, alginato, carragenano, polímeros sintéticos, vidrio y óxidos metálicos. Los materiales de este tipo se pueden activar antes de la reacción para formar un adsorbente de esta invención.

L puede ser, por ejemplo, -T-(-V¹-V²)_m-, en la que

T es O, S o -NR⁷-;

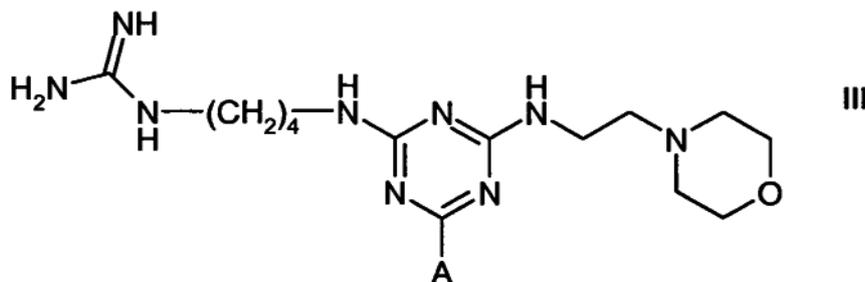
40 m es 0 o 1;

V¹ es un radical hidrocarbonado opcionalmente sustituido de 2 a 20 átomos de C; y

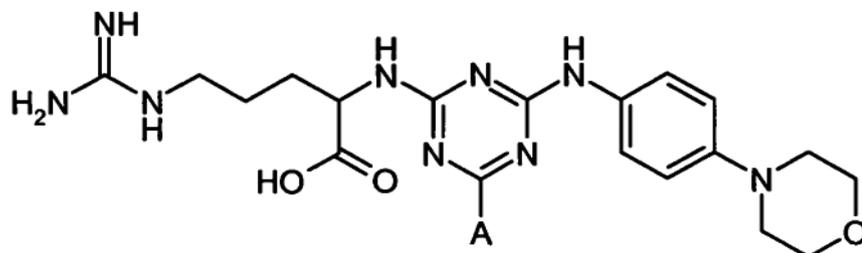
V² es O, S, -COO-, -CONH-, -NHCO-, -PO₃H-, -NH-arileno-SO₂-CH₂-CH₂- o -NR⁸-; y

R⁷ y R⁸ son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆.

45 El ligando o adsorbente de unión a fibrinógeno tiene la fórmula III (que se protona a pH fisiológico)



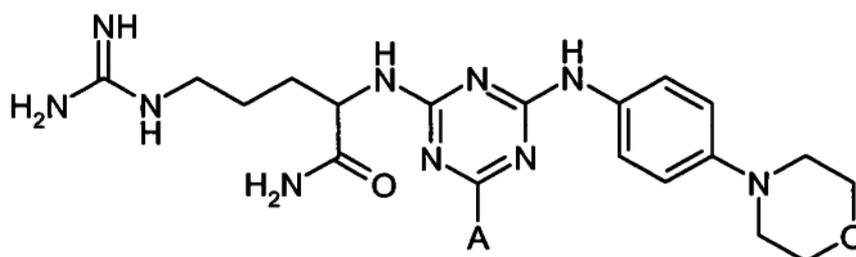
El ligando o adsorbente de unión a fibrinógeno también tiene la fórmula IV



IV

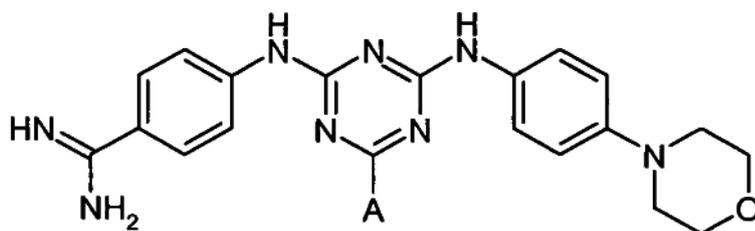
El ligando o adsorbente de unión a fibrinógeno también está representado por la estructura V

5



V

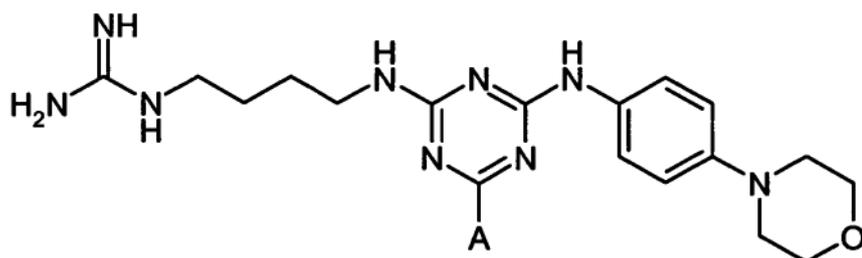
El ligando o adsorbente de unión a fibrinógeno también está representado por la estructura VI



VI

10

El ligando o adsorbente de unión a fibrinógeno también está representado por la estructura VII



VII

15

Los ligandos y adsorbentes de unión a fibrinógeno descritos en este documento son útiles para la purificación de fibrinógeno a partir de mezclas complejas, incluyendo, pero no limitado a, plasma humano y sobrenadantes de fermentación recombinantes. Esta utilidad se demuestra a continuación en el Ejemplo 7, por medio de experimentos de cromatografía usando plasma humano reunido.

20

El término "fibrinógeno" se utiliza en este documento para describir el fibrinógeno en sí y también análogos que tienen las características funcionales del fibrinógeno, por ejemplo, en términos de afinidad por un compuesto dado descrito en este documento. Por lo tanto, el analito puede ser una proteína que sea un fragmento funcional de fibrinógeno, o un análogo estructural que tiene uno o más de todos los mismos sitios de unión,

25

fusión.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1 - Síntesis de 4-(4-morfolino)anilindiclorotriazina

5 Se disolvió cloruro cianúrico (16,1 g) en tetrahidrofurano (130 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo/sal. Se añadió 4-(4-morfolino) anilina (29,61 g) en THF (400 ml) a la solución de cloruro cianúrico a una velocidad tal que la temperatura no excediera de 0 °C. Después de que la adición se hubo completado, la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos, antes de añadir la solución a una mezcla de hielo (700 g) y agua (1,5 l). El sólido resultante se separó
10 por filtración, se lavó con agua (1 l), antes de secar en un horno de vacío a 45 °C hasta peso constante (28,54 g).

Ejemplo 2 - Síntesis de adsorbente III

15 Se suspendió gel Purabead de agarosa reticulado al 6 % (1000 g sedimentados en agua de ósmosis inversa (OI)) con agua de OI (667 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (90 ml) y epiclorhidrina (127 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas. Después se tomó una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis para los grupos epoxi mostraba que el gel se había derivado con 19,2 µmol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.

20 El gel se drena antes de añadir el agua de OI (400 ml) y una solución acuosa de amoníaco con un peso específico de 0,88 (100 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 16 horas. Después se tomó una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (12 x 500 ml). El análisis TNBS para grupos amina mostraba que el gel se había derivado con 28,0 µmol de grupos amina por g de gel sedimentado.

25 El gel aminado sedimentado (500 g) se suspendió en fosfato de potasio 1 M a pH 7,0 (500 ml), y a continuación se dejó drenar. A este gel se le añadió a continuación fosfato de potasio 1 M a pH 7,0 (125 ml) y agua de OI (125 ml). La suspensión se agitó vigorosamente mientras se añadía acetona (250 ml). Después de enfriar en un baño de hielo/sal durante 30 minutos, se añadió cloruro cianúrico (12,5 g) en acetona fría (125 ml) en una porción. La mezcla
30 se agitó a 0 °C durante 1 hora, antes de lavar con acetona acuosa al 50 % (5 x 500 ml), agua de OI (5 x 500 ml), acetona acuosa al 50 % (5 x 500 ml), y agua de OI (10 x 500 ml). El gel se dejó sedimentar por gravedad, antes de tomar una muestra para su análisis. El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 26,1 µmol de diclorotriazina sustituida por g de gel sedimentado.

35 El gel sedimentado de la etapa anterior (238 g) se suspendió con agua de OI (138 ml) con enfriamiento en hielo/sal, antes de añadir 2-(4-morfolino) etilamina (4,39 g) en agua de OI fría (8 °C) (95 ml), de manera que la temperatura de reacción no excediese de 8 °C. A continuación la mezcla se agitó a 8 °C durante 1 hora. Después se tomó una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (10 x 250 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 23,8 µmol de monoclorotriazina sustituida por
40 g de gel sedimentado.

A 238 g (sedimentados) del gel se le añadió sulfato de agmatina (15,42 g) disuelto en agua de OI (200 ml - pH ajustado a pH 10, y a continuación, se completó hasta un volumen final de 238 ml con agua de OI). La mezcla se agitó a 60 °C durante toda la noche, mientras el pH se mantiene a 10. Después de tomar una muestra del
45 sobrenadante para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (15 x 250 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 17,0 µmol de agmatina por g de gel sedimentado.

El gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v durante toda la noche a
50 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 250 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (250 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M/etanol al 25 % (5 x 250 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 250 ml). A continuación, el gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M durante toda la noche a 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 250 ml). Después del lavado final se dejó drenar por
55 gravedad, se añadió NaOH 0,5 M (250 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 250 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 250 ml). Después de lavar con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 250 ml), el gel se lavó una vez más con agua de OI (10 x 250 ml), antes de almacenar en una cámara frigorífica a 4 °C en etanol acuoso al 20 % en v/v.

Ejemplo 3 - Síntesis de adsorbente IV

Se suspendió gel Purabead de agarosa reticulado al 6 % (650 g sedimentados en agua de OI) con agua de OI (438 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (59 ml) y epíclorhidrina (83 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas.
5 Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis de los grupos epoxi mostraba que el gel se había derivado con 16,5 μmol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.

El gel se drenó, antes de añadir agua de OI (520 ml) y una solución de amoníaco con un peso específico de 0,88 (130 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 16 horas.
10 Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis TNBS para grupos amina mostraba que el gel se había derivado con 22,9 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado.

Una porción de 500 g del gel aminado sedimentado se suspendió con DMF (500 ml), y a continuación se deja drenar. A continuación, este gel se suspendió con DMF (250 ml), y diisopropiltilamina (DIPEA) (11,0 ml) con agitación. La mezcla se agitó durante 10 minutos, y a continuación se añadió 4-(4-morfolino)anilindiclorotriazina (20,6 g) en DMF (250 ml) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con DMF acuoso al 70 % en v/v (4 x 150 ml), DMF al 50 % (2 x 150 ml), y agua de OI (10 x 150 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 20,2 μmol de monoclorotriazina sustituida por g de gel sedimentado. La amina residual era indetectable por el ensayo de TNBS después de la derivación.
15
20

Se suspendió una porción de 150 g (sedimentado) del gel en tampón de borato sódico 1 M (150 ml) y el pH se ajustó a 10 con hidróxido de sodio 10 M. Se añadió arginina (5,50 g) en una porción. La mezcla se agitó a 60 °C durante toda la noche, mientras el pH se mantiene a 10. Después de tomar una muestra del sobrenadante para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 150 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 22,4 μmol de arginina por g de gel sedimentado.
25

El gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v durante toda la noche a 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M/etanol al 25 % (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). A continuación, el gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M durante toda la noche a 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). Después de lavar con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 150 ml), el gel se lavó una vez más con agua de OI (10 x 150 ml), antes de almacenar en una cámara frigorífica en etanol acuoso al 20 % en v/v.
30
35

40 Ejemplo 4 - Síntesis de adsorbente V

Se suspendió gel Purabead de agarosa reticulado al 6 % (650 g sedimentados en agua de OI) con agua de OI (438 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (59 ml) y epíclorhidrina (83 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis de los grupos epoxi mostraba que el gel se había derivado con 16,5 μmol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.
45

El gel se drenó antes de añadir el agua de OI (520 ml) y una solución acuosa de amoníaco con un peso específico de 0,88 (130 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 16 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis TNBS para grupos amina mostraba que el gel se había derivado con 22,9 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado.
50

Una porción de 500 g del gel aminado sedimentado se suspendió con DMF (500 ml), y a continuación se dejó drenar. A continuación, este gel se suspendió con DMF (250 ml) y DIPEA (11,0 ml) con agitación. La mezcla se agitó durante 10 minutos, y a continuación se añadió 4-(4-morfolino)anilindiclorotriazina (20,6 g) en DMF (250 ml) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con DMF acuosa al 70 % en v/v (4 x 150 ml), DMF acuosa al 50 % en v/v (2 x 150 ml), y agua de OI (10 x 150 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado
55

con 20,2 μmol de monoclorotriazina sustituida por g de gel sedimentado. La amina residual era indetectable por el ensayo de TNBS después de la derivación.

Una porción de 150 g (sedimentado) del gel se suspendió en tampón de borato sódico 1 M (150 ml) y el pH se ajustó a 10 con hidróxido de sodio 10 M. Se añadió diclorhidrato de argininamida (7,75 g) en una porción. La mezcla se agitó a 60 °C durante toda la noche, mientras el pH se mantiene a 10. La suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (15 x 150 ml). El análisis del gel lavado y sedimentado para el cloruro residual indicaba que el gel se había derivado hasta la finalización de la argininamida.

10 El gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v durante toda la noche a 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). A continuación, el gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M durante toda la noche a 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). Después de lavar con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 150 ml), el gel se lavó una vez más con agua de OI (10 x 150 ml), antes de almacenar en una cámara frigorífica en etanol acuoso al 20 % en v/v.

20

Ejemplo 5 - Síntesis de adsorbente VI

Se suspendió gel Purabead de agarosa reticulado al 6 % (650 g sedimentados en agua de OI) con agua de OI (438 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (59 ml) y epiclorhidrina (83 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis de los grupos epoxi mostraba que el gel se había derivado con 16,5 μmol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.

El gel se drenó antes de añadir agua de OI (520 ml) y una solución de amoniaco con un peso específico de 0,88 (130 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 16 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con 12 x 1 l de agua de OI (12 x 1 l). El análisis TNBS para grupos amina mostraba que el gel se había derivado con 22,9 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado.

Se suspendió gel aminado sedimentado (70 g) en fosfato de potasio 1 M (70 ml) y se dejó sedimentar. A continuación se añadió fosfato de potasio 1 M (20 ml), la mezcla se agitó vigorosamente, y se añadió acetona (10 ml). La mezcla se enfrió a 0 °C en un baño de hielo con sal, antes de añadir cloruro cianúrico (1,75 g) en acetona fría (17,5 ml) en una porción. La suspensión se agitó durante 1 hora a 0-4 °C, antes de drenar, y a continuación se lavó con acetona acuosa al 50 % en v/v (5 x 70 ml), agua de OI (5 x 70 ml), con acetona acuosa al 50 % en v/v (5 x 70 ml), y agua de OI (10 x 70 ml). El análisis reveló la unión de 18,0 μmol de grupos diclorotriazina por g de gel sedimentado.

La diclorotriazinilagarosa (55 g) se lavó con DMF acuosa al 50 % en v/v, y a continuación se suspendió en DMF acuosa al 50 % en v/v (55 ml). Se disolvió 4-(4-morfolino) anilina (1,23 g) en DMF acuosa al 75 % en v/v (15 ml) y se enfrió en hielo, antes de la adición a la diclorotriazinilagarosa. La mezcla se hizo reaccionar a 4 °C durante 60 minutos. Después de este tiempo se tomó una muestra de sobrenadante, antes de lavar el gel con DMF al 50 % (5 x 100 ml) y agua de OI (10 x 100 ml). El análisis del ion cloruro liberado en la reacción indicaba una carga de la amina de 20,6 μmol por g de gel sedimentado.

Una porción de 37 g (sedimentado) del gel se suspendió en tampón de borato sódico 1 M (37 ml) y el pH se ajustó a 9 con hidróxido de sodio 10 M. Se añadió diclorhidrato de 4-aminobenzamidina (1,93 g) en una porción. La mezcla se agitó a 60 °C durante toda la noche, mientras el pH se mantiene a 10. La suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (15 x 150 ml). El gel se lavó con agua de OI (10 x 150 ml), antes de almacenar en una cámara frigorífica a 4 °C en etanol acuoso al 20 % en v/v.

55 Ejemplo 6 - Síntesis de adsorbente VII

Se suspendió gel Purabead de agarosa reticulado al 6 % (650 g sedimentados en agua de OI) con agua de OI (438 ml), hidróxido de sodio 10 M (NaOH) (59 ml) y epiclorhidrina (83 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis

de los grupos epoxi mostraba que el gel se había derivado con 16,5 μmol de grupos epoxi por g de gel sedimentado.

El gel se drenó antes de añadir agua de OI (520 ml) y una solución de amoníaco con un peso específico de 0,88 (130 ml). La mezcla se agitó y se calentó a 40 °C, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 16 horas.

- 5 Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con agua de OI (12 x 1 l). El análisis TNBS para grupos amina mostraba que el gel se había derivado con 22,9 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado.

- 10 Una porción de 150 g del gel aminado sedimentado se suspendió con DMF (150 ml), y a continuación se dejó drenar. A continuación, este gel se suspendió con DMF (75 ml) y DIPEA (1,38 ml) con agitación. La mezcla se agitó durante 10 minutos, y a continuación se añadió 4-(4-morfolino) anilindiclorotriazina (2,58 g) en DMF (75 ml) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de tomar una muestra para su análisis, la suspensión se filtró y se lavó con DMF acuosa al 70 % en v/v (4 x 150 ml), DMF acuosa al 50 % en v/v (2 x 150 ml), y agua de OI (12 x 150 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado
- 15 con 21,4 μmol de monoclorotriazina sustituida por g de gel sedimentado. El análisis de la amina residual indicaba que se mantenían 0,8 μmol de grupos amina por g de gel sedimentado después de la derivación.

- Una porción de 132 g (sedimentado) del gel se suspendió en tampón de borato sódico 1 M (132 ml) y el pH se ajustó a 10 con hidróxido de sodio 10 M. Se añadió sulfato de agmatina (3,73 g) en una porción. La mezcla se agitó a 60 °C
- 20 durante toda la noche, mientras el pH se mantiene a 10. Después de tomar una muestra del sobrenadante para su análisis, la suspensión se filtró, y a continuación se lavó con agua de OI (15 x 150 ml). El análisis para la liberación de cloruro indicaba que el gel se había derivado con 19,9 μmol de agmatina por g de gel sedimentado.

- El gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v durante toda la noche a
- 25 40 °C, y a continuación se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M/etanol acuoso al 25 % en v/v (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). A continuación, el gel se incubó en una concentración final de NaOH 0,5 M durante toda la noche a 40 °C, y se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml). Después del lavado final se dejó drenar
- 30 por gravedad, se añadió NaOH 0,5 M (150 ml) y la mezcla se incubó a 40 °C durante toda la noche. El gel se lavó con NaOH 0,5 M (5 x 150 ml), y a continuación con agua de OI (10 x 150 ml). Después de lavar con PBS 0,1 M a pH 7,0 (3 x 150 ml), el gel se lavó una vez más con agua de OI (10 x 150 ml), antes de almacenar en una cámara frigorífica a 4 °C en etanol acuoso al 20 % en v/v.

35 Ejemplo 7 - Cromatografía en plasma humano

- Se llevaron a cabo experimentos de cromatografía con cada uno de los adsorbentes III, IV, V, VI, y VII, utilizando una columna Omnitfit con un volumen de columna de 10 ml y 1 cm de diámetro con un sistema de cromatografía Biologic LP. La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de citrato de sodio 13 mM, cloruro de sodio 140
- 40 mM a pH 7,0 y 100 cm/h. A continuación se cargó plasma humano (0,45 μm filtrado, 100 ml) a 50 cm/h. El lavado posterior a la carga se realizó con citrato de sodio 13 mM, cloruro sódico 140 mM a pH 7,0, hasta un valor de absorbancia basal. A continuación, la columna se eluyó con glicina 0,3 M, cloruro de sodio 0,5 M y colato de sodio al 1 % en p/v a pH 9,0, y se desinfectó con clorhidrato de guanidina 2 M a pH 7,0. La fracción de elución se neutralizó inmediatamente con HCl 0,4 M antes del análisis. Las fracciones de carga, no unida, y de elución se analizaron por
- 45 nefelometría para determinar las capacidades de unión y de elución. Se llevó a cabo una SDS PAGE para determinar su pureza.

La pureza de fibrinógeno en cada eluato era superior al 85 %. Las capacidades de unión y de elución se presentan en la Tabla 1.

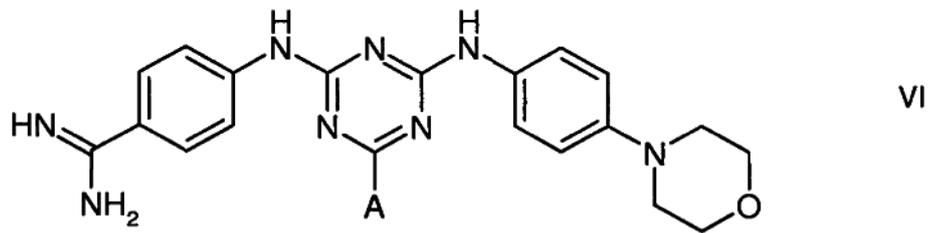
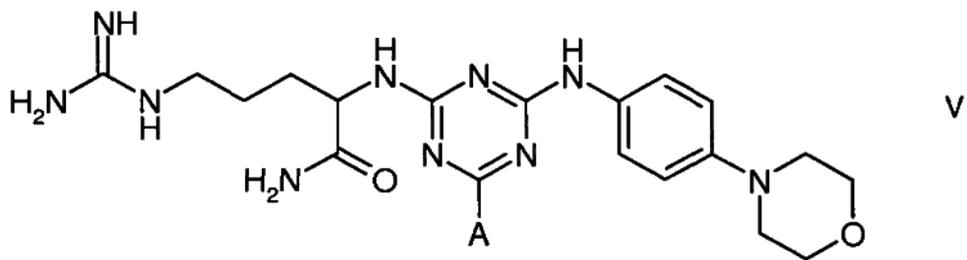
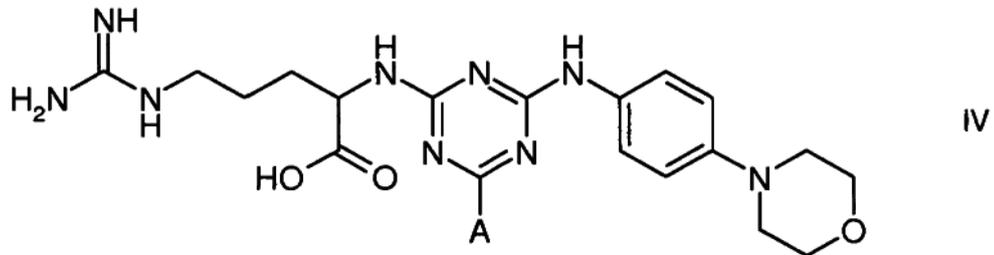
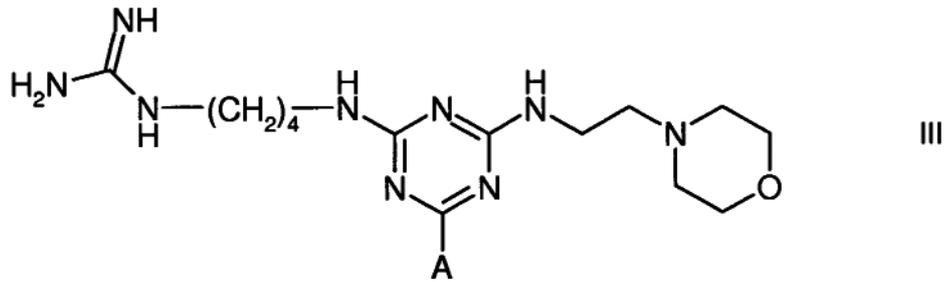
50

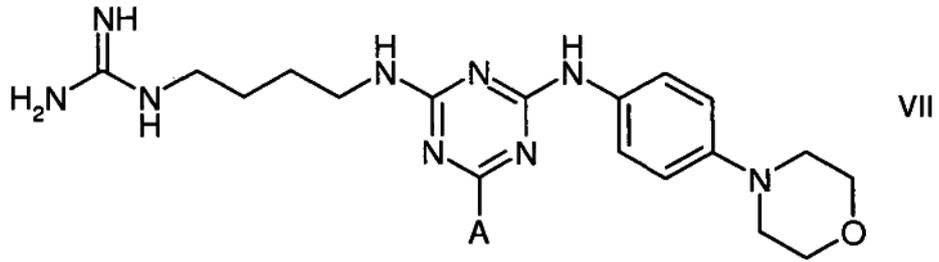
Tabla 1

Adsorbente	Capacidad de unión (mg/ml)	Capacidad de elución (mg/ml)
III	3,23	3,04
IV	2,76	0,28
V	6,43	3,77
VI	8,36	3,99
VII	17,97	15,04

REIVINDICACIONES

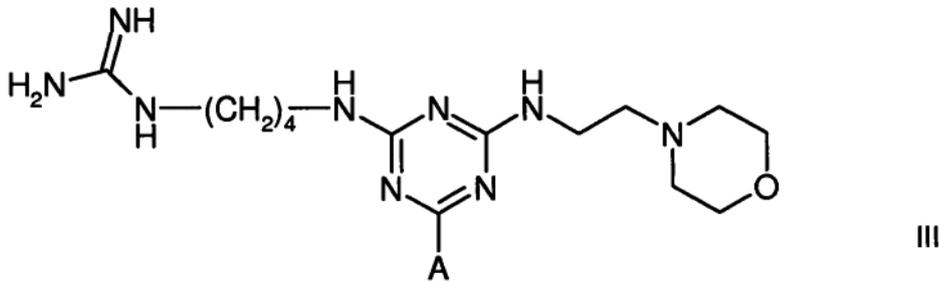
1. El uso de un adsorbente de afinidad para la separación, extracción, aislamiento, purificación, caracterización, identificación o cuantificación de fibrinógeno o de una proteína que es un análogo del fibrinógeno, en el que el adsorbente de afinidad es un compuesto de seleccionado entre:





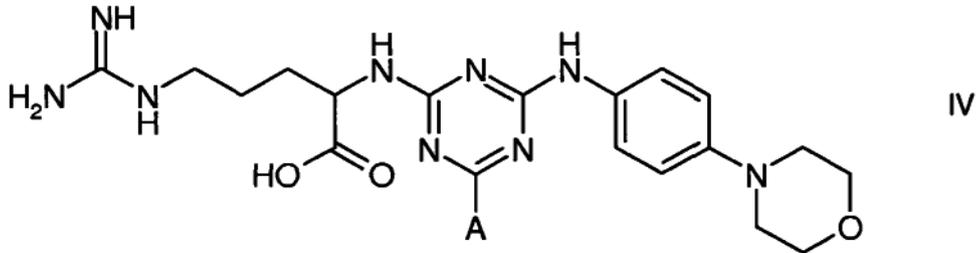
en las que A es una matriz de soporte, opcionalmente unida al anillo de triazina por un espaciador.

- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el fibrinógeno se encuentra en una muestra de plasma.
3. Un compuesto de fórmula III



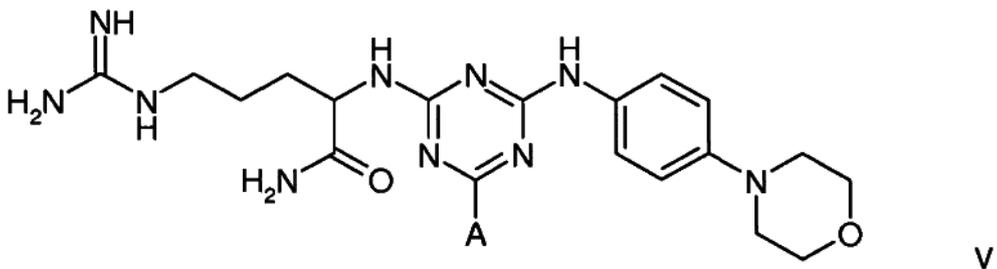
10 en la que A es una matriz de soporte, opcionalmente unida al anillo de triazina por un espaciador.

4. Un compuesto de fórmula IV



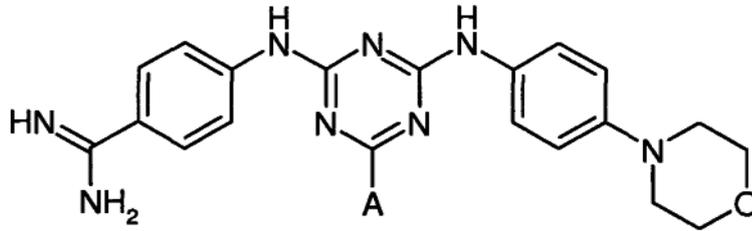
15 en la que A es una matriz de soporte, opcionalmente unida al anillo de triazina por un espaciador.

5. Un compuesto de fórmula V
- 20



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

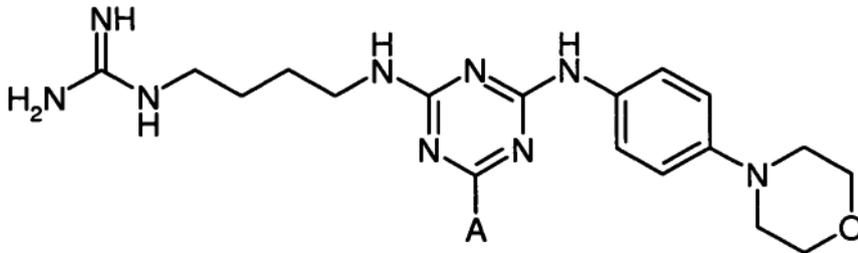
6. Un compuesto de fórmula VI



VI

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

7. Un compuesto de fórmula VII



VII

10

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

8. Un compuesto que es un precursor de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las 15 reivindicaciones 3 a 7, en el que A se sustituye por un grupo funcional, unido directa o indirectamente al anillo de triazina, que permite la inmovilización del precursor sobre un soporte sólido.