

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 350**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/12** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**B01J 20/286** (2006.01)

**B01J 20/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2015 PCT/EP2015/076493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2015 E 15797917 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 3083665**

54 Título: **Uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de proteína C-reactiva (PCR) mediante fosfocolina y sus derivados**

30 Prioridad:

**12.11.2014 EP 14192831**

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

**19.04.2018**

73 Titular/es:

**PENTRACOR GMBH (100.0%)  
Neuendorfstrasse 23B/D  
16761 Hennigsdorf, DE**

72 Inventor/es:

**SHERIFF, AHMED;  
VOGT, BIRGIT y  
MATTECKA, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 664 350 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).

## Uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de proteína C-reactiva (PCR) mediante fosfocolina y sus derivados

### Descripción

[0001] La presente invención se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de proteína C-reactiva (PCR) a partir de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante una unión (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonio-hidroxi-hidroxi-fosforiloxi.

### Antecedentes de la invención

[0002] Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 17,000 0,000 personas murieron de enfermedades cardiovasculares en 2008. Por lo tanto, las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte entre las enfermedades no infecciosas y son responsables de aproximadamente un tercio de todas las muertes en todo el mundo. Según las estimaciones, este número aumentará a alrededor de 23,000,000 de muertes por año para el año 2030.

[0003] Por lo tanto, las enfermedades cardiovasculares no sólo son la principal causa de muerte en el mundo, pero también causan enormes gastos médicos para los sistemas nacionales de salud y los seguros de enfermedad. Dos de las manifestaciones más comunes y más dañinas de las enfermedades cardiovasculares son la aparición de arteriosclerosis y trombosis, que a cambio son, entre otros, responsables de los ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares.

[0004] En los últimos años, se han realizado avances importantes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Este progreso ha sido posible no solo por el aumento de los conocimientos sobre los mecanismos inductores de la enfermedad, sino también por la identificación temprana de los pacientes de riesgo. De hecho, la identificación de los riesgos de enfermedad y su tratamiento precoz son características importantes de la práctica médica moderna. En los últimos 25 años, se han identificado una variedad de factores y parámetros clínicos que se correlacionan con el estado actual de la enfermedad o con la probabilidad de enfermedad cardiovascular en el futuro. Dichos factores de riesgo pueden ser parámetros bioquímicos o fisiológicos medibles, como los niveles de colesterol sérico, HDL, LDL y fibrinógeno, pero también patrones de comportamiento tales como sobrepeso y tabaquismo. En los casos en los que un factor de riesgo no es meramente indicativo de una enfermedad o su desarrollo, sino que en realidad está implicado causalmente en su desarrollo, una influencia terapéutica sobre este factor de riesgo puede influir en el curso de la enfermedad o reducir el riesgo de su desarrollo.

[0005] La proteína C-reactiva (PCR) como una proteína de fase aguda es parte del sistema inmune innato y se forma en el hígado en el curso de reacciones inflamatorias y se libera en la sangre. La formación de PCR es inducida principalmente por citocinas que se expresan en el contexto de una reacción inflamatoria aguda o crónica. El estímulo más poderoso para la formación de PCR es la interleucina-6 (IL-6). Por lo tanto, los niveles de PCR e IL-6 en la sangre son indicadores de una respuesta inflamatoria local o sistémica. Se presume que la inflamación crónica es una de las manifestaciones patológicas subyacentes y de apoyo de las enfermedades cardiovasculares. Se asume cada vez más que la PCR no solo es predictiva para las enfermedades cardiovasculares, sino que también se relaciona causalmente con su desarrollo o puede influir en su curso.

[0006] Yeh (*Clin Cardiol.*, 2005, 28, 408-412) muestra que el nivel de PCR puede usarse para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular, PCR es también un indicador de respuestas inflamatorias, y que la inflamación promueve todas las etapas de la aterosclerosis. Zoccali et al., (*Semin Nephrol.* 2005, 25, 358-362) muestran que el nivel de PCR es predictivo del riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal en la etapa terminal. Según Nurmohamed et al., (*Neth. J. Med.* 2005, 63, 376-381), el nivel de PCR es predictivo de riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes en hemodiálisis.

[0007] Sola et al. (*J. Card. Fail.* 2005, 11, 607-612) han demostrado que las terapias con estatinas se pueden usar para reducir la cantidad de PCR y, por lo tanto, reducir la mortalidad y la morbilidad causadas por la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, esta forma de terapia no reduce significativamente los altos niveles de PCR (hasta 1000 veces más que los valores normales) que resultan de un infarto de miocardio o los niveles altos de PCR en la sangre de los pacientes en diálisis.

[0008] El valor normal para la PCR en la sangre de los seres humanos varía de persona a persona, pero se encuentra en la mediana a aproximadamente 0,8 mg de PCR por litro de sangre, pero puede ser en el caso de reacciones inflamatorias agudas o crónicas (p.ej., infecciones, aterosclerosis, después de un ataque cardíaco) a niveles sustancialmente superiores a 100 mg de PCR por litro de sangre. Dado que la vida media de la PCR en la sangre (aproximadamente 19 horas) es constante y, por lo tanto, independiente del estado de salud del paciente, la tasa de síntesis de PCR solo es responsable de la regulación del nivel de PCR en la sangre (Pepys & Hirschfield, *J. Clin. Invest.* 2003, 11, 1805-1812). Por lo tanto, el gran aumento de la síntesis de PCR en condiciones patológicas agudas impone exigencias particulares a los enfoques terapéuticos para la retirada de pacientes con PCR (pacientes

de riesgo o pacientes agudos) ya que es necesario eliminar una cantidad significativa de PCR para reducir los niveles de PCR a niveles sanguíneos estándar.

5 **[0009]** En consecuencia, existe un interés creciente en procedimientos terapéuticos para la reducción de los niveles de PCR en la sangre de los pacientes. Debido a la importancia clínica de la PCR también hay un interés en métodos efectivos para la purificación de PCR, con el fin de utilizar la PCR purificada en experimentos posteriores, por ejemplo para la investigación de su función molecular posteriormente.

10 **[0010]** El documento WO 2004/076486 describe un método para inhibir respuestas inmunológicas, inflamatorias y/o fisiopatológicas mediante la administración de moléculas de unión a PCR a pacientes con un nivel de PCR aumentado. Sin embargo, no se describe el tratamiento extracorpóreo de fluidos biológicos para la eliminación de PCR de dichos fluidos biológicos.

15 **[0011]** Mortensen et al. (*Molecular Immunology* 1998, 25, 679-686) describe la unión de PCR en plasmafibronectina en el sitio de unión de fosforilo

20 **[0012]** El documento WO 90/12632 describe un método y dispositivo para el tratamiento extracorpóreo de fluidos biológicos con el objetivo de eliminar PCR así como anticuerpos anti-fosfocolina de estos fluidos biológicos para el tratamiento de cáncer. La matriz que contiene fosfocolina utilizada para este fin puede consistir, por ejemplo, en sílice, sefariosa, perlas acrílicas o agarosa, en donde tanto los anticuerpos PCR como los anticuerpos anti-fosfocolina están unidos por medio de la fosfocolina que los contiene.

25 **[0013]** US 2007/225226 A1 da a conocer péptidos específicos que se unen a PCR y por lo tanto se pueden utilizar como un material de la columna funcional en una aféresis PCR. Esta unión tiene lugar independientemente del calcio. También se describen algunos dispositivos de purificación de sangre extracorpórea que emplean este material de columna para la aféresis de PCR, que incluyen un sistema para eliminar endotoxinas usando citrato como anticoagulante. PCR es un pentámero cuyas subunidades están asociadas cada una con dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  que se unen a los ligandos usados en esta invención. Dado que el citrato se une a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad, hasta ahora se ha asumido que cuando se usan ligandos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , el citrato tiene un efecto negativo sobre la capacidad de las columnas para unirse a PCR. Sin embargo, los inventores de la presente solicitud han demostrado que la capacidad es mayor para los ligandos usados. PCR es una opsonina y puede activar el sistema de complemento a través de C1q en forma enlazada. Sorprendentemente, sin embargo, se ha demostrado que el citrato evita la activación del complemento, lo que aumenta aún más la capacidad de modo que el citrato aumenta aún más la capacidad de los ligandos usados. Este efecto que ocurre con ligandos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  también es completamente sorprendente a la luz de US 2007/225226 A1.

40 **[0014]** El documento WO 2007/076844 divulga un método por eliminación de PCR extracorpórea del plasma sanguíneo por medio de aféresis para reducir el riesgo para un paciente (causado por un nivel elevado de PCR en la sangre). De acuerdo con la invención, se usa una columna que contiene matriz a la que los derivados de fosfocolina se unen para unir PCR y eliminarla del plasma, tratando así y/o previniendo enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, diabetes e insuficiencia renal.

45 **[0015]** Slagman et al. (*Blood Purif.* 2011, 31, 9) demuestran en el modelo porcino la reducción exitosa de los niveles de PCR en la sangre por aféresis extracorpórea después de un ataque cardíaco.

50 **[0016]** Un problema que ocurre en el uso extracorpóreo de sangre y plasma sanguíneo, ya sea en aplicaciones analíticas o preparativas, pero también en diálisis o aféresis, es el comienzo de la coagulación de la sangre, que dificulta el uso en sí mismo o lo hace imposible, y también obstruye y contamina los dispositivos usados. Por esta razón, los agentes anticoagulantes (los denominados anticoagulantes) se añaden directamente a la sangre o al plasma sanguíneo después de retirarlos del cuerpo humano o animal.

55 **[0017]** Una posibilidad para inhibir la coagulación de la sangre es la administración de  $\text{Ca}^{2+}$  quelantes tales como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), oxalato y citratos. El calcio es necesario como un cofactor de algunos factores de la coagulación durante la coagulación de la sangre. Los queladores de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizan para eliminar el calcio de la sangre o del plasma sanguíneo, lo que inhibe la coagulación. Sin embargo, este es un problema significativo para los métodos cromatográficos de afinidad para la eliminación de PCR por medio de derivados de fosfocolina o fosfoetanolamina o fosfocolina o derivados de fosfoetanolamina. Dado que se requiere la unión de PCR a fosfocolina o sus derivados  $\text{Ca}^{2+}$  (Black et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 48487, Thompson y col., *Structure* 1999, 7 (2), 169-177), la opinión unánime en la técnica anterior era que una administración de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la unión de PCR a la fosfocolina debería evitarse absolutamente (véase, por ejemplo, el documento WO 90/12632). Por lo tanto, de acuerdo con la técnica anterior, el uso de tampones de unión que contienen citrato durante la unión cromatográfica por afinidad de PCR a fosfocolina es completamente inadecuado. Sin embargo, las soluciones que contienen citrato (similares a la administración de EDTA) eran adecuadas como tampones de elución, es decir, para eliminar la PCR unida de la fosfocolina.

65 **[0018]** Una posibilidad para la anticoagulación independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  consiste en la administración de heparina. La

heparina es una sustancia endógena que es producida por los mastocitos y tiene un efecto inhibitor sobre la cascada de la coagulación. Al unir heparina a antitrombina II, un inhibidor de proteasa que circula en la sangre, que puede inactivar factores de coagulación activados como la trombina y el factor Xa, se desencadena un cambio conformacional de la antitrombina II. Esto acelera la inactivación mediada por antitrombina II de los factores de coagulación en 2.000 veces. La coagulación de la sangre se detiene. Por consiguiente, en métodos para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de sangre o plasma sanguíneo por medio de derivados de fosfocolina y fosfocolina o derivados de fosfoetanolamina y fosfoetanolamina, hasta ahora la heparina se ha usado exclusivamente como anticoagulante.

[0019] Sin embargo, esto tiene algunas desventajas, ya que la heparina, especialmente en el caso de la heparina no fraccionada, puede conducir a una reacción inmune, la trombocitopenia inducida por eparina (HIT), además de la hemorragia. De este modo, la heparina induce trombosis venosa y arterial. En pacientes con accidente cerebrovascular en los que también es posible el uso de la aféresis de PCR, el riesgo de HIT cuando se recibe heparina no fraccionada es de aprox. 3%. Además, la heparina no está aprobada para el uso con separadores de células centrifugas que a menudo se utilizan para separar la sangre en los componentes celulares y el plasma sanguíneo.

[0020] Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un anticoagulante para una eliminación de cromatografía de afinidad de la PCR, lo que evita los problemas relacionados con la heparina del estado de la técnica y, además, no perjudica la unión del  $Ca^{2+}$  dependiente de PCR a fosfocolina o fosfoetanolamina y sus derivados.

[0021] Este objetivo se logra mediante las enseñanzas de las reivindicaciones independientes. Otras realizaciones ventajosas son evidentes a partir de la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones dependientes.

[0022] Sorprendentemente, podría encontrarse que el uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos usando un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi no solo sorprendentemente logra una eliminación eficiente de PCR de fluidos biológicos sino que también resuelve los problemas de la técnica anterior.

#### Descripción de la invención

[0023] La presente invención se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos utilizando un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonio-hidroxi-hidroxi-fosforiloxi.

[0024] El término "PCR" como se usa en el presente documento es equivalente a "proteína C-reactiva". Aquí, preferiblemente se refiere a la proteína C-reactiva humana.

[0025] El término "eliminación cromatográfica de afinidad de PCR" como se usa en el presente documento significa que la eliminación de la PCR se produce a través de una unión específica entre la PCR y los componentes de los medios para la eliminación de PCR. En este contexto, también es posible hacer referencia a una "eliminación cromatográfica de afinidad de PCR" o una "eliminación selectiva de PCR". Dicha unión específica entre PCR y un material de columna adecuadamente funcionalizado se basa en las propiedades estructurales de la proteína PCR y puede incluir, por ejemplo, la unión característica de PCR a la fosfocolina o la unión de PCR a anticuerpos dirigidos contra un epítipo de la PCR. La eliminación selectiva o molecular específica de PCR implica que PCR se une con mayor afinidad al material de la columna funcionalizada que a otros componentes de los fluidos biológicos. El término "selectivo" con respecto a la eliminación de PCR como se usa en la presente solicitud significa, por lo tanto, que la relación de PCR extraída a la cantidad de PCR contenida en el fluido biológico es al menos tres veces mayor que la relación respectiva de otras sustancias a la cantidad de la sustancia contenida en el fluido biológico. Sin embargo, el término "selectivo" con respecto a la eliminación de PCR tal como se usa en la presente solicitud no significa que solo se elimina el PCR. Aquí, es obvio para los expertos en la materia que con tal eliminación por cromatografía de afinidad de PCR hasta cierto punto, otras sustancias (involuntariamente) pueden unirse inevitablemente al material de la columna y, por lo tanto, también se eliminan en cierta medida. Si existe una congruencia estructural con la estructura del PCR responsable de la unión específica a los grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilamónicos y/o con grupos  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, como en una proteína, esta proteína estructuralmente similar también está ligada a un cierto grado. Un ejemplo podría ser anticuerpos dirigidos contra la fosfocolina y, por lo tanto, también se puede unir a un material de columna que se ha funcionalizado con fosfocolina. Otra posibilidad es la unión inespecífica nunca evitable por completo de los componentes del fluido biológico a, por ejemplo, materiales de sustrato de matriz.

[0026] Como ya se ha mencionado, la unión de PCR a fosfocolina o sus derivados o a fosfoetanolamina o sus derivados depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  y por lo tanto también la unión de PCR a grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi que se inmovilizaron en o sobre un material de columna también dependen de la presencia de  $Ca^{2+}$ .

5 [0027] Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonio-alcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

10 [0028] Por supuesto, el uso según la invención de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en el que la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, significa que la solución de citrato se mezcla con el fluido biológico del cual el PCR debe eliminarse antes de la eliminación de PCR. La solución de citrato está así presente durante la unión deseada de PCR a los grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o los grupos  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi del material de la columna. Por lo tanto, también podría decirse de acuerdo con términos técnicos del campo de la cromatografía de afinidad que la solución de citrato se usa como "un tampón de unión".

15 [0029] Sin embargo, esto no significa que la solución de citrato se use como "solución de elución" (o como "tampón de elución") y por lo tanto se usa para la eliminación de PCR del material de la columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilamónicos y/o grupos  $\omega$ -amonio-hidroxi-hidroxi-fosforiloxi, es decir, para la regeneración del material de la columna.

20 [0030] El término "**tampón de unión**" (también denominado "solución de unión"), como se usa en el presente documento, se refiere en el caso de un método de cromatografía de afinidad para la eliminación de una sustancia (en este documento la eliminación de PCR selectiva y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de una muestra (aquí fluidos biológicos como sangre o plasma sanguíneo) a una solución que se agrega a la muestra y luego se aplica junto con la muestra sobre el material de la columna (aquí material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi) para la eliminación de la sustancia. El tampón de unión debería proporcionar las condiciones adecuadas para que la unión específica de la sustancia se elimine del material de la columna.

25 [0031] El término "**tampón de elución**" (también denominado "solución de elución"), como se usa en este documento, se refiere en el caso de un método de cromatografía de afinidad para la eliminación de una sustancia (aquí la eliminación de PCR selectiva y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de una muestra (aquí fluidos biológicos como sangre o plasma sanguíneo) a una solución que se aplica después de aplicar la muestra sobre el material de la columna y se produce la unión específica de la sustancia a eliminar al material de la columna para romper la unión específica nuevamente y así separar la sustancia que se va a eliminar del material de la columna (o eluir). En contraste con el tampón de unión, las condiciones deben, por lo tanto, crearse en el material de la columna mediante el tampón de elución que no permita que se elimine la unión de la sustancia, sino que, por el contrario, la evite.

30 [0032] La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, donde la solución de citrato sirve como un tampón de unión (o ion de unión) para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR de fluidos biológicos.

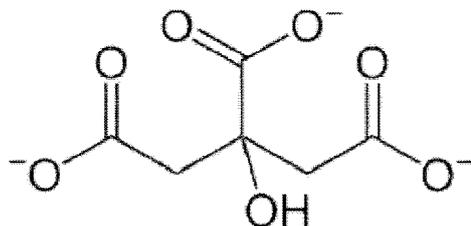
35 [0033] El término "**fluido biológico**" como se usa en el presente documento se refiere a soluciones acuosas que se producen en mamíferos y preferiblemente seres humanos tales como fluido cerebroespinal, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido de ascitis, sangre, plasma sanguíneo, extractos de hígado y fluido intersticial. La presente invención, por supuesto, se refiere a fluidos biológicos que contienen PCR.

40 [0034] La presente invención está por lo tanto dirigida también al uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos de  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde los fluidos biológicos son sangre o plasma de sangre.

45 [0035] En otras palabras, la presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de sangre y/o plasma sanguíneo por medio de un material de columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos de  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

#### 60 **Soluciones de citrato**

[0036] El término "**citrato**" como se usa en el presente documento se refiere al anión de citrato, o la sal de ácido cítrico, o, en otras palabras, a un tricarboxilato orgánico de la siguiente fórmula química:



**[0037]** El citrato puede presentarse en diversas formas (o compuestos), por ejemplo, como ácido cítrico (de una a tres veces en forma protonada), como una sal de ácido cítrico en combinación con otros cationes inorgánicos (distintos de  $H^+$ ) (por ejemplo, como una sal de metal junto con cationes metálicos o como una sal de amonio junto con iones de amonio), pero también como un éster de citrato parcial. En este contexto, el término "compuesto de citrato" también se usa en el presente documento.

**[0038]** Si la sal de ácido cítrico, es decir, el anión citrato, forma un complejo con un catión inorgánico, el término "sal de citrato" también se denomina en el presente documento como una forma específica del compuesto de citrato.

**[0039]** Como se usa en este documento, el término "solución de citrato" comprende así soluciones acuosas que contienen al menos un compuesto de citrato. Más información detallada sobre la composición de la solución de citrato se da a continuación.

**[0040]** De acuerdo con la invención, sin embargo, se prefiere que la concentración de citrato en la solución de citrato no sea inferior a 1 mM, preferiblemente no menos de 1,1 mM, preferiblemente no menos de 1,2 mM, más preferiblemente no menos de 1,3 mM, aún más preferiblemente no menos de 1,4 mM y lo más preferiblemente no menos de 1,5 mM.

**[0041]** Además, de acuerdo con la invención, se prefiere que el (los) compuesto(s) de citrato sea(n) un componente esencial de la solución de citrato según la invención. Aquí, "componente esencial" significa que la suma de las concentraciones molares de todos los compuestos de citrato en la solución de citrato, en comparación con los otros compuestos dentro de la solución de citrato, pero excluyendo el agua, se encuentra entre las tres concentraciones más altas en la solución de citrato.

**[0042]** La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación de cromatografía de afinidad de la PCR a partir de fluidos biológicos por medio de un material de la columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato sódico, hidrogenocitrato disódico, citrato trisódico, citrato trisódico dihidrato, dihidrogeno de citrato potásico, hidrogeno de citrato dipotásico, citrato tripotásico, citrato de dihidrogeno de litio, citrato de hidrogeno de dilitio, citrato de trilitio, citrato de dihidrogeno de amonio, citrato de hidrogeno de diamonio, citrato de triamonio, dicitrato tricálcico (citrato de calcio), dicitrato de trimagnesio (citrato de magnesio) y/o ésteres de citrato parciales.

**[0043]** De acuerdo con la presente invención, también es posible que la solución de citrato contenga una mezcla de varios de los compuestos de citrato enumerados anteriormente.

**[0044]** El término "compuesto de citrato" como se usa en este documento comprende tanto ácido cítrico como sus sales.

**[0045]** Si se usa el término general "citrato de sodio" en esta solicitud, este término abarca las diversas formas protonadas del citrato de sodio, es decir, (citrato trisódico) no protonado, (citrato de hidrógeno disódico) protonado simple o la forma doble protonada (dihidrogeno citrato de sodio).

**[0046]** Si se usa el término general "citrato de potasio" en esta solicitud, este término abarca las formas protonadas del citrato de potasio, es decir, el citrato de tripotasio no protonado, (citrato de hidrógeno dipotásico) protonado simple o la forma doble protonada (dihidrogeno citrato de potasio).

**[0047]** Si se usa el término general "citrato de litio" en esta solicitud, este término abarca las diversas formas protonadas del citrato de litio, es decir, (citrato de trilitio) no protonado, (citrato de hidrógeno y dilitio) protonado simple o la forma protonada doble (citrato de dihidrógeno de litio).

**[0048]** Si se utiliza el término general "citrato de amonio" en esta solicitud, este término abarca las diversas formas protonadas de la citrato de amonio, es decir, (citrato de triamonio) no protonado, (diamónico citrato de hidrógeno) simple protonado o la forma protonada doble (dihidrogeno citrato de amonio).

**[0049]** El término “éster de citrato parcial” tal como se utiliza aquí se refiere a éster de ácido cítrico, sin embargo, no todos los tres grupos carboxilo (es decir,  $-\text{COO}^-$ ) del citrato están esterificados (es decir,  $-\text{COOR}$ , donde R es un residuo orgánico debido) pero a lo sumo se esterifican dos de los tres grupos carboxilo del citrato, pero preferiblemente a lo sumo uno de los tres grupos de carboxilo del citrato. Además de uno o dos grupos éster, el éster parcial de citrato también contiene uno o dos cationes inorgánicos fisiológicamente aceptables (por ejemplo, cationes metálicos, tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), que complejan uno o dos grupos carboxilo no esterificado(s) del citrato.

**[0050]** Una forma de realización preferida de la presente invención por lo tanto se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación de cromatografía de afinidad de la PCR a partir de fluidos biológicos por medio de un material de la columna funcionalizados con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxifosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, citrato de hidrogeno disódico, citrato de trisodio, citrato de dihidrato trisódico, citrato de dihidrogeno de potasio, citrato de hidrogeno de dipotasio, citrato de tripotasio, citrato de dihidrógeno de litio, citrato de hidrógeno de dilitio, citrato de trilitio, citrato de dihidrógeno de amonio, citrato de hidrogeno de diamonio, citrato de triammonio, dicitrato de tricalcio (citrato de calcio), dicitrato de trimagnesio (citrato de magnesio) y/o ésteres de citrato parciales, donde al menos un compuesto de citrato se selecciona de ácido cítrico y sales de citrato con cationes metálicos monovalentes.

**[0051]** Se prefiere según la invención, si la solución de citrato no contiene citrato de hierro (II). Más preferiblemente, la solución de citrato no contiene citrato de hierro (III). Además, se prefiere de acuerdo con la invención, si la solución de citrato no contiene citrato de cobre (II) (dicitrato de tricobre) y no citrato de aluminio.

**[0052]** En otras realizaciones preferidas de la presente invención, la solución de citrato no contiene citrato de calcio (también conocido como dicitrato de tricalcio).

**[0053]** En una realización preferida adicional de la presente invención, la solución de citrato no contiene citrato de magnesio (también conocido como dicitrato de trimagnesio) o citrato de magnesio en una concentración de como máximo 1 mM.

**[0054]** En una realización preferida adicional de la presente invención, la solución de citrato **no contiene citrato de calcio ni citrato de magnesio** o citrato de magnesio en una concentración de como máximo 1 mM.

**[0055]** Cuando se menciona en la presente solicitud que una solución no contiene una determinada sustancia, esto significa que esta solución no contiene la sustancia en absoluto o al menos no contiene más de 0,01% en peso de esta sustancia para tener en cuenta posibles impurezas inevitables.

**[0056]** Una realización particularmente preferida de la presente invención, por lo tanto, se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxifosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, hidrogenocitrato de disodio, citrato de trisodio, citrato de trisodio dihidrato, citrato de dihidrogeno potásico, citrato de hidrogeno dipotásico, citrato de tripotasio, dihidrogenocitrato de litio, citrato de hidrogeno de dilitio y/o citrato de trilitio. Aún más preferido, sin embargo, son ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, hidrogencitrato de disodio, citrato de trisodio, dihidrato de citrato de trisodio, dihidrogenocitrato de potasio, hidrogenocitrato de dipotasio y/o citrato de tripotasio. Sin embargo, los más preferidos son ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, hidrogenocitrato de disodio, citrato de trisodio y citrato de trisodio dihidratado.

**[0057]** De acuerdo con la invención, se prefiere adicionalmente que la solución de citrato contenga, además de dicho compuesto de citrato o dichos compuestos de citrato, adicionales, es decir, sustancias adicionales no basadas en citrato que quelan  $\text{Ca}^{2+}$  (denominado quelantes  $\text{Ca}^{2+}$ ).

**[0058]** Una realización preferida de la presente invención se refiere, por lo tanto, al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxifosforiloxi, en donde la solución de citrato no contiene quelantes  $\text{Ca}^{2+}$ , que no se basan químicamente en compuestos de citrato. Posibles ejemplos de quelantes  $\text{Ca}^{2+}$  que no están químicamente basados en compuestos de citrato y por lo tanto no son preferidos son EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (etilenglicol-bis(aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético), BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético) y oxalatos.

**[0059]** Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxifosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato sódico, hidrogenocitrato disódico, citrato trisódico, citrato de

dihidrato trisódico, citrato de dihidrogeno potásico, citrato de hidrógeno dipotásico, citrato de tripotasio, citrato de dihidrógeno de litio, citrato de hidrógeno de dilitio, citrato de trilitio, citrato de dihidrógeno de amonio, citrato de hidrogeno de diamonio, citrato de triamonio, dicitrato de tricalcio (citrato de calcio), dicitrato de trimagnesio (citrato de magnesio) y/o ésteres de citrato parciales, en donde la solución de citrato no contiene otros quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  aparte del (de los) compuesto(s) de citrato.

**[0060]** Por lo tanto, según la invención, se prefiere, además, si la solución de citrato no contiene EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (etilenglicol-bis(aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético), BAPTA (1,2-Bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético) u oxalato.

**[0061]** Además de los compuestos de citrato enumerados anteriormente, la solución de citrato puede contener sustancias adicionales que, sin embargo, no tienen propiedades quelantes. Por ejemplo, son posibles otras sustancias como aditivos que contribuyen a la osmolaridad de la solución de citrato que es aproximadamente igual a la osmolaridad del fluido biológico, es decir, por ejemplo, de la sangre o el plasma sanguíneo. Tales sustancias para ajustar la osmolaridad comprenden sales inorgánicas tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, pero también azúcares tales como glucosa, dextrosa (D-glucosa), fructosa y sacarosa o heparina. Los términos dextrosa y D-glucosa son equivalentes, y por lo tanto se pueden usar como sinónimos en este documento.

**[0062]** Del mismo modo, sustancias adicionales son posibles como aditivos que sirven para ajustar el valor pH de la solución de citrato a un valor predeterminado, por ejemplo el valor de pH del fluido biológico (por lo tanto, por ejemplo, de la sangre o plasma sanguíneo). Aquí, es posible, por ejemplo, que la sustancia adicional contenida junto con el compuesto de citrato forme un sistema tampón, por medio del cual se puede ajustar el valor de pH de la solución de citrato y se pueden compensar ligeras fluctuaciones en el valor de pH. Si la solución de citrato contiene un sistema tampón de compuesto de citrato y una sustancia tampón que no es citrato, también se usa la expresión "**tampón que contiene citrato**". Posibles ejemplos de sustancias amortiguadoras añadidas que no son compuestos de citrato (es decir, sustancias tampón distintas de citrato), incluyen hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, lactato y acetato.

**[0063]** Ejemplos posibles de sistemas de tampón a partir de un compuesto de citrato y una sustancia tampón que no es citrato, es decir, una solución de citrato según la invención en forma de un tampón que contiene citrato, es la combinación de ácido cítrico con hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de dipotasio o dihidrogenofosfato de potasio. Sin embargo, la combinación de ácido cítrico con hidrogenofosfato disódico es particularmente preferida.

**[0064]** Sin embargo, si las soluciones de citrato contienen dos compuestos de citrato diferentes, que juntos también forman un sistema tampón, también se utiliza el término "**tampón citrato**".

**[0065]** Ejemplos posibles de sistemas tampón a partir de dos compuestos de citrato diferentes, es decir, una disolución de citrato según la invención en forma de tampón de citrato, es la combinación de ácido cítrico con hidrogenocitrato de sodio, hidrogenocitrato de disodio, citrato de trisodio, citrato de dihidrógeno potásico, citrato de hidrógeno dipotásico o citrato de tripotasio; la combinación de dihidrogenocitrato de sodio con citrato de hidrogeno de disodio, citrato de trisodio, citrato de hidrogeno dipotásico o citrato de tripotasio; la combinación de citrato de dihidrogeno de potasio con citrato de hidrogeno de disodio, citrato de trisodio, citrato de hidrogeno de dipotasio o citrato de tripotasio; la combinación de citrato de hidrogeno disódico con citrato trisódico o citrato tripotásico; la combinación de citrato de hidrogeno de dipotasio con citrato de trisodio o citrato de tripotasio.

**[0066]** Sin embargo, la combinación de ácido cítrico con citrato trisódico como solución de citrato en forma de un tampón de citrato es particularmente preferida.

**[0067]** Por supuesto, también es concebible añadir otras sustancias a la solución de citrato que contiene dos compuestos diferentes de citrato (es decir, un tampón de citrato) para ajustar la osmolaridad.

**[0068]** De acuerdo con la invención, se prefiere si la solución de citrato consiste simplemente en agua, uno o más de los compuestos de citrato mencionados anteriormente, así como opcionalmente uno o más de los compuestos mencionados anteriormente para ajustar la osmolaridad (también denominados "osmolíticos") y/u opcionalmente de una o más de las sustancias tampón no de citrato mencionadas anteriormente.

**[0069]** Una realización adicional de la presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, cuando la solución de citrato consiste en agua y

al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, hidrogenocitrato de disodio, citrato de trisodio, citrato de dihidrato trisódico, citrato de

- hidrogeno de potasio, citrato de hidrogeno de dipotasio, citrato de tripotasio, citrato de dihidrogeno de litio, citrato de hidrogeno de dilitio, citrato de trilitio, citrato de dihidrogeno de amonio, citrato de hidrogeno de diamonio, citrato de triammonio, dicitrato tricálcico (citrato de calcio), citrato de trimagnesio (citrato de magnesio) y/o éster parcial de citrato; y
- 5 (opcionalmente) al menos uno de los compuestos del grupo que comprende o está constituido por cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, fructosa y sacarosa, y/o (opcionalmente) al menos uno de los compuestos del grupo que comprende o que consiste en hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato dipotásico, dihidrogenofosfato potásico, lactato y acetato.
- 10 **[0070]** Una realización más preferida de la presente invención se refiere, por lo tanto, al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato consiste en ácido cítrico, citrato trisódico y agua.
- 15 **[0071]** Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene 38 mM de ácido cítrico, 74,8 mM de citrato trisódico y agua.
- 20 **[0072]** Una realización preferida de la presente invención se refiere por lo tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado asociado con un grupo  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, D-glucosa y agua.
- 25 **[0073]** Una solución de citrato que consiste en ácido cítrico, citrato de sodio, D-glucosa y agua también se denomina "**solución de ácido-citrato-dextrosa (solución de ACD)**".
- [0074]** Las variantes preferidas de la solución de citrato utilizada según la invención se refieren a soluciones de ACD que contienen entre 22,9 mM y 38,0 mM de ácido cítrico, entre 44,9 mM y 74,8 mM de citrato trisódico, entre 74,2 mM y 123,6 mM de D-glucosa y agua.
- 30 **[0075]** Una variante particularmente preferida de la solución de citrato utilizada de acuerdo con la invención se refiere a una solución de ACD que contiene 38 mM de ácido cítrico, 74,8 mM de citrato trisódico, 123,6 mM de D-glucosa y agua. Esto también se conoce como "solución ACD-A".
- 35 **[0076]** Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la cromatografía de afinidad por la eliminación de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene 38 mM de ácido cítrico, 74,8 mM de citrato de trisodio, 123,6 mM de D-glucosa y agua.
- 40 **[0077]** Una realización preferida adicional de la presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, hidrogenofosfato sódico, D-glucosa y agua.
- 45 **[0078]** Una solución de citrato que consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, hidrogenofosfato sódico, D-glucosa y agua también se denomina "**solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD)**".
- 50 **[0079]** Una variante preferida de la solución de citrato utilizada según la invención se refiere a una solución de CPD que contiene 15,6 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, 128,7 mM de D-glucosa, 16,1 mM hidrogenofosfato de sodio y agua.
- 55 **[0080]** Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere así al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene 5,5 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, 128,7 mM de D-glucosa, 16,1 mM de hidrogenofosfato sódico y agua.
- 60 **[0081]** Una realización preferida adicional de la presente invención se refiere así al uso de una solución de citrato para eliminación cromatográfica de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniolalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, fosfato ácido de sodio, D-glucosa, adenina y agua.
- 65 **[0082]** Una solución de citrato que consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, hidrogenofosfato sódico, D-glucosa,

adenina y agua también se denomina "**solución de citrato-fosfato-dextrosa con adenina (CPDA)**".

**[0083]** Una variante preferida de la solución de citrato utilizada según la invención se refiere así a una solución de CPDA que contiene 15,6 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, entre 128,7 mM y 160,9 mM de D-glucosa, 16,1 mM de fosfato de hidrógeno de sodio, 2 mM de adenina y agua. Otra variante preferida de la solución de citrato utilizada según la invención se refiere a una solución de CPDA que contiene 15,6 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, 128,7 mM de D-glucosa, 16,1 mM de hidrogenofosfato de sodio, 2 mM de adenina y agua. Una variante particularmente preferida de la solución de citrato utilizada según la invención se refiere a una solución de CPDA que contiene 15,6 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, 160,9 mM de D-glucosa, 16,1 mM de hidrogenofosfato de sodio, 2 mM de adenina y agua.

**[0084]** Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere, por lo tanto, al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato contiene 15,6 mM de ácido cítrico, 89,4 mM de citrato trisódico, entre 128,7 mM y 160,9 mM de D-glucosa, 16,1 mM de hidrogenofosfato de sodio, 2 mM de adenina y agua.

**[0085]** De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se prefiere, si la solución de citrato no contiene sales metálicas con cationes multivalentes, es decir, divalentes o trivalentes. Por lo tanto, en una realización preferida adicional de la presente invención, la solución de citrato no contiene sales de calcio. En una realización preferida adicional de la presente invención, la solución de citrato no contiene sales de magnesio o al menos una sal de magnesio en una concentración de como máximo 1 mM.

**[0086]** En otras palabras, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se prefiere que la solución de citrato contenga **solo sales metálicas con cationes monovalentes**.

#### **Concentración de citrato y dilución con fluido biológico**

**[0087]** Una realización preferida de la presente invención se refiere así al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato tiene una concentración total de citrato en un intervalo de 50 mM a 200 mM, preferido de 60 mM a 150 mM, más preferido de 70 mM a 120 mM, más preferido de 75 mM a 115 mM, y lo más preferido desde 74,8 mM a 113 mM.

**[0088]** Una forma de realización preferida de la presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación de cromatografía de afinidad de la PCR a partir de fluidos biológicos por medio de un material de la columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato tiene una concentración total de citrato de preferiblemente 50 mM, de 150 mM, de 200 mM, más preferido de 60 mM, más preferido de 120 mM, más preferido de 115 mM, más preferido de 70 mM, más preferido de 75 mM, más preferido de 74,8 mM, y el más preferido de 113 mM.

**[0089]** Por supuesto, no solo la concentración de citrato en la solución de citrato real es importante sino, sobre todo, la concentración final en la mezcla de solución de citrato y fluido biológico, es decir, por ejemplo, sangre o plasma sanguíneo. Por lo tanto, la dilución de la solución de citrato utilizada también es importante.

**[0090]** Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con un grupo  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde el fluido biológico se mezcla con la solución de citrato antes de la eliminación de PCR.

**[0091]** La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de una solución de citrato como tampón de unión (o solución de unión) para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde el fluido biológico se mezcla con la solución de citrato antes de la eliminación de PCR.

**[0092]** La presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, y en donde el fluido biológico se mezcla con la solución de citrato antes de la eliminación de PCR.

**[0093]** Después de mezclar la solución de citrato con el fluido biológico (es decir, por ejemplo, sangre o plasma sanguíneo), la mezcla de solución de citrato y fluido biológico se aplica sobre el material de columna que se ha funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, de forma que se produce una unión (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) de PCR en el material de la columna funcionalizado.

[0094] La presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato se diluye en un intervalo de 1:50 a 1:5, preferiblemente de 1:40 a 1:10, preferiblemente de 1:30 a 1:20, preferiblemente de 1:20 a 1:15, preferiblemente de 1:15 a 1:10 con el fluido biológico.

[0095] La presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato se diluye 1:50, preferiblemente 1:45, más preferiblemente 1:40, preferiblemente 1:35, preferiblemente 1:30, preferiblemente 1:25, más preferiblemente 1:20, más preferiblemente 1:15, más preferiblemente 1:10, preferiblemente 1:5 con el fluido biológico.

[0096] Una realización preferida de la presente invención se refiere por tanto al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxifosforiloxi en una dilución en un rango de 1:50 a 1:5 con el fluido biológico.

[0097] Una realización preferida de la presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato tiene una concentración total de citrato en un intervalo de 50 mM a 200 mM, preferido de 60 mM a 150 mM, más preferido de 70 mM a 120 mM, más preferido de 75 mM a 115 mM, y lo más preferido de 74,8 mM a 113 mM; y en donde la solución de citrato se diluye en un intervalo de 1:50 a 1:5, preferiblemente de 1:40 a 1:10, preferiblemente de 1:30 a 1:20, preferiblemente de 1:20 a 1:15, preferiblemente de 1:15 a 1:10 con el fluido biológico.

[0098] Una realización preferida adicional de la presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación de cromatografía de afinidad de la PCR a partir de fluidos biológicos por medio de un material de la columna funcionalizado con grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -monioaminoxihidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato tiene una concentración total de citrato en un intervalo de 70 mM a 120 mM; y en donde la solución de citrato se diluye en un intervalo de 1:50 a 1:5 con el flujo biológico.

[0099] Por supuesto, también es concebible que se usen soluciones de citrato que contienen una concentración de citrato inferior o superior a las descritas en los párrafos anteriores. Por consiguiente, por supuesto, el grado de dilución con el fluido biológico debería reducirse de forma correspondiente (a concentraciones de citrato inferiores) o aumentarse (a concentraciones de citrato más elevadas). Sin embargo, las concentraciones y diluciones de citrato descritas en los párrafos anteriores han demostrado ser particularmente ventajosas junto con el uso según la invención de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos.

[0100] Dado que el pH de una solución tiene una influencia sustancial en la disociación de ácidos y bases (así también, por ejemplo, de ácido cítrico), y por lo tanto también influye en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el presente caso, el valor de pH de la solución de citrato usada es un aspecto importante de la presente invención.

[0101] La presente invención también se refiere al uso de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde la solución de citrato tiene un valor de pH en el rango de pH 4,0 a pH 7,0, preferido de pH 4,5 a pH 6,5, más preferido de pH 4,7 a pH 6,0, más preferido de pH 4,9 a pH 5,8, más preferido de pH 5,0 a pH 5,6, y lo más preferido de pH 5,0 a pH 5,5.

#### **Ligandos dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ para PCR**

[0102] Como ya se ha mencionado varias veces, para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, por ejemplo de sangre o plasma blando, se usa un material de columna que contiene fosfocolina y/o fosfoetanolamina o sus derivados, por lo que una unión de PCR dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a dicho material de columna funcionalizado es posible.

[0103] Para este fin, la fosfocolina, la fosfoetanolamina o sus derivados se inmovilizan en un material de columna. Esto generalmente tiene lugar a través de un grupo enlazador orgánico, a través del cual la fosfocolina, la fosfoetanolamina o sus derivados se unen de forma adsorbente o incluso más preferiblemente de forma covalente al material de la columna. Esto da como resultado un denominado "**material de columna funcionalizado**", en el que el grupo químico responsable de la unión de PCR dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está expuesto al exterior, de modo que la PCR que se encuentra en un fluido biológico también tiene acceso a dicho grupo químico.

[0104] En otras palabras, el término "**material de columna funcionalizado**" como se usa en el presente documento se refiere a un material de columna para cromatografía de afinidad que está provisto de un grupo químico funcional.

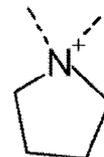
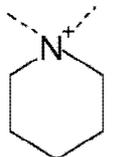




n es 2;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, y particularmente preferido de -CH<sub>3</sub>, y -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos puede formar un heterociclo seleccionado de:

5

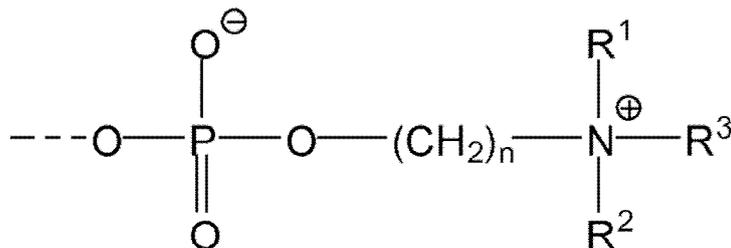


10

15 **[0111]** Los compuestos preferidos que contienen un grupo ω-fosfonoalquilo de amonio como se describió anteriormente y adecuados para la funcionalización de un material de columna correspondiente comprenden, por ejemplo: 2-[2-(2-aminoetoxi)etilo-dietilo-amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[4-[2-(2-aminoetoxi)etilo]morfolina-4-ium-4-ilo]etilo-hidrógenofosfato, 2-[1-[2-(2-aminoetoxi)etilo]piperidina-1-io-1-ilo]hidrogenofosfato de etilo, 2-[2-(2-aminoetoxi)etilo-dimetilo-amonio]hidrogenofosfato de etilo, 2-[3-aminopropilo-(dimetilo)amonio]hidrogenofosfato de etilo, 2-[dimetilo(4-sulfanilbutilo)amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[4-azidobutilo(dimetilo)amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[dimetilo(pent-4-inilo)amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[3-(6-aminohexanoilo-amino)propilo-dietilo-amonio]etilhidrogenofosfato, 2-[1-[2-[2-(6-aminohexanoilo-amino) etoxi]etilo]piperidina-1-io-1-ilo]hidrogenofosfato de etilo, 2-[4-[2-[2-[3-(6-aminohexanoilamino)propanoilamino]etoxi]etilo]morfolina-4-io-4-ilo]etilo-hidrógenofosfato, 2-[1-[2-[6-(6-aminohexanoilamino)-hexanoilamino]etoxi]etilo]pirrolidina-1-io-1-ilo]etilo-hidrógenofosfato, 2-[2-aliloxietilo(dimetilo)amonio]hidrogenofosfato de etilo, 2-[2-aliloxietilo(dietil)amonio]hidrogenofosfato de etilo, 2-[4-(2-aliloxietilo)morfolina-4-ilo-4-ilo]etilo-hidrógenofosfato, 2-[1-(2-aliloxietilo)piperidina-1-io-1-ilo]etilo-hidrógenofosfato, 2-[2-[2-(6-aminohexanoilamino)etoxi]etilo-dimetilo-amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[2-[2-[3-(6-aminohexanoilamino)propanoilamino]etoxi]etilo-dimetilo-amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[3-azidopropilo(dimetilo)amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[dimetilo-2-[2-(prop-2-ioxycarbonilamino)etoxi]etilo]amonio]hidrogenofosfato de etilo, 2-[2-[2-(aliloxycarbonilamino)etoxi]etilo-dimetilo-amonio]etilhidrogenofosfato, 2-[2-[2-[6-(aliloxycarbonilamino)hexanoilamino]etoxi]etilo-dimetilo-amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[2-(6-aminohexanoilamino)etilo-dimetilo-amonio]etilo-hidrógenofosfato, 2-[dimetilo-3-[6-(prop-2-inoxycarbonilamino)-hexanoilamino]propilo]amonio]hidrogenofosfato de etilo, y 2-[3-(6-aminohexanoilamino)propilo-dimetilo-amonio]hidrogenofosfato de etilo.

35 **[0112]** El término “grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi” como se usa en el presente documento se puede utilizar de manera similar como “grupos omega-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi” y describe compuestos de la siguiente fórmula general (II)

40



45

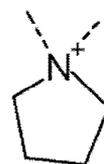
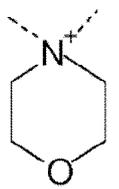
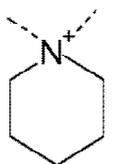
50

(II)

en donde

55 n se selecciona de 2 y 3;  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el nitrógeno átomo al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

60



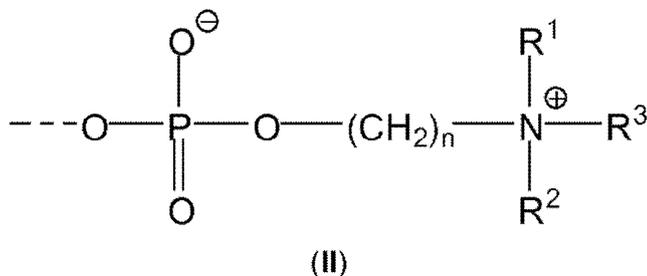
65

y  
 R<sup>3</sup> se selecciona entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y preferiblemente -H;  
 en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por átomo(s) de flúor.

5 **[0113]** Los "grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi" preferidos comprenden compuestos de fórmula general (II)

10

15



20 en donde

n se selecciona de 2 y 3;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el nitrógeno átomo al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

25

30



y R<sup>3</sup> es -H.

35

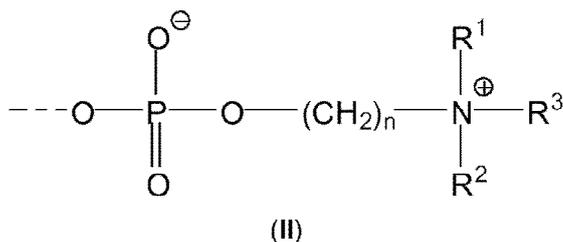
**[0114]** Dentro del alcance de la presente invención, se prefiere particularmente si el grupo ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi es un grupo ω-trialquilamonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

40

**[0115]** Por lo tanto, los grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi particularmente preferidos comprenden los compuestos de la fórmula general (II)

45

50



55 en donde

55

n = 2;

y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> y se prefiere particularmente de -CH<sub>3</sub> y -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

60

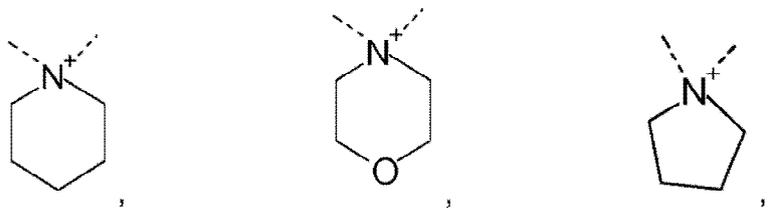
**[0116]** □ También se prefiere particularmente si los grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi son grupos ω-trimetilamonio-etoxi-hidroxi-fosforiloxi o grupos ω-trimetilamonio/hidroxi-fosforiloxi.

65

**[0117]** □ Los compuestos preferidos que contienen un grupo ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi como se describió anteriormente y adecuados para la funcionalización de un material de columna correspondiente comprenden, por ejemplo: p-aminofenilfosfocolina (APPC), 4-[[hidroxi[2-(trimetilamonio)etoxi]fosfinilo]oxi]-bencenodiazonio (p-diazonio-fenilfosfocolina) o p-nitrofenilo-6-(O-fosfocolina)hidroxihexanoato.



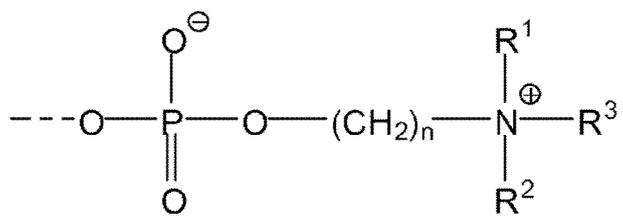
5



10

en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor, y caracterizado porque los grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi tienen la siguiente fórmula general (II)

15



20

(II)

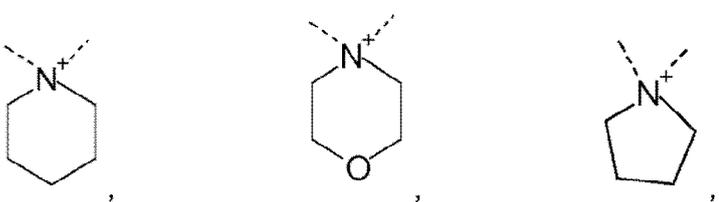
25

en donde

30

n se selecciona de 2 y 3;  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

35



40

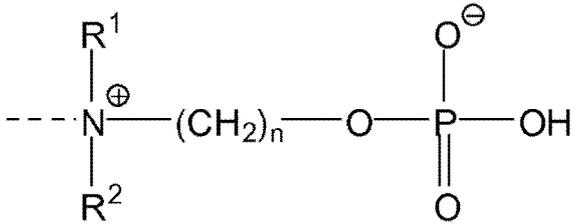
45

y R<sup>3</sup> se selecciona de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y preferiblemente -H; en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor.

50

**[0120]** Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de Ca<sup>2+</sup>) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos ω-amonio lcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde los grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio tienen la siguiente fórmula general (I)

55



60

(I)

65

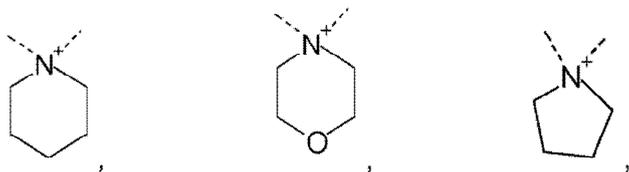
en donde

n se selecciona de 2 y 3;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un heterociclo seleccionado de:

5

10



15

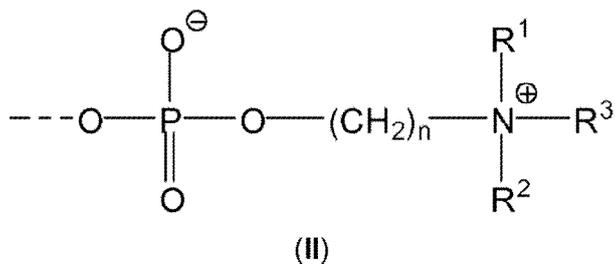
en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor.

20

**[0121]** La presente invención también se refiere al uso de solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en donde la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de Ca<sup>2+</sup>) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos ω-amoniumalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde los grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi tienen la siguiente fórmula general (II)

25

30



35

en donde

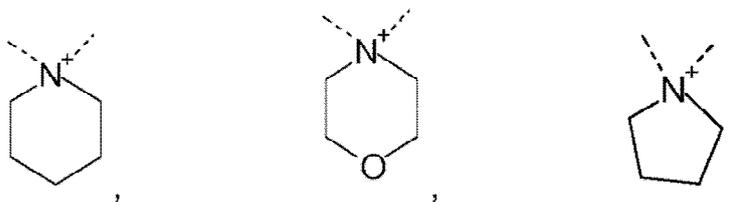
n se selecciona de 2 y 3;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

40

45

50



55

y R<sup>3</sup> se selecciona entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y preferiblemente -H;

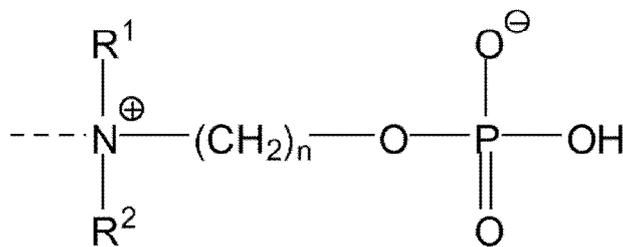
en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor.

60

**[0122]** Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de la solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos, en donde el retiro cromatográfico de afinidad de PCR se realiza mediante (una unión dependiente de Ca<sup>2+</sup>) de PCR a un material de columna funcionalizado con grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en donde los grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio tienen la siguiente fórmula general (I)

5

10



(I)

15

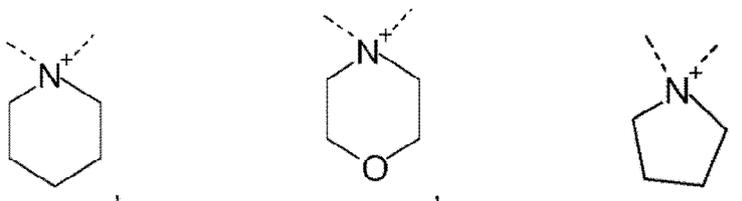
en donde

n se selecciona de 2 y 3;

20

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se selecciona independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

25

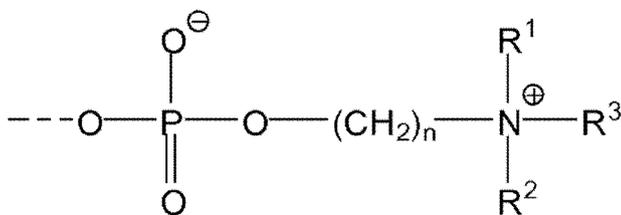


30

en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor; y en donde los grupos ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi tienen la siguiente fórmula general (II)

35

40



(II)

45

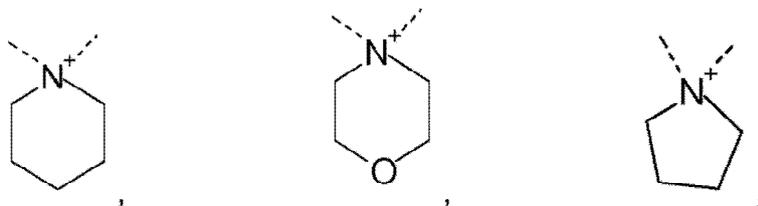
en donde

n se selecciona de 2 y 3;

50

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un heterociclo seleccionado de:

55



60

y

R<sup>3</sup> se selecciona entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y preferiblemente -H; en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor.

65

**[0123]** En una posible realización de la presente invención, el grupo ω-amonioalcoxi-hidroxi-fosforilo está unido a

través de un enlace fosfoéster a un grupo hidroxilo de una molécula de glicerol (como un enlazador orgánico), donde el éster de glicerol resultante se une a continuación al material de la columna a través de un segundo grupo hidroxilo del glicerol. En tal realización, también es posible que el tercer grupo hidroxilo del glicerol esté esterificado con un ácido graso o esterificado con un segundo grupo  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi. Además, la posición de la esterificación respectiva en la molécula de glicerol puede variar. Los ácidos grasos adecuados son ácidos grasos saturados, monoolefinicos, poliolefinicos, monoacetilénicos, insaturados, lineales y/o ramificados, que tienen de 8 a 28 átomos de carbono. Los residuos de ácidos grasos preferidos son ácido palmítico, ácido araquidónico, ácido oxovalérico, ácido glutárico, epoxiisopropano y ácido esteárico.

## 10 **Material de columna**

15 **[0124]** Para la preparación del material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, en principio, todos los materiales de columna o cromatografía inertes son adecuados como materiales que, en particular, no reaccionan con sangre o plasma sanguíneo, ni cambian, ni contaminan la sangre o el plasma sanguíneo de manera que la sangre o el plasma sanguíneo después del contacto con el material de la columna ya no puedan inyectarse en el paciente. Los materiales de columna de la presente invención comprenden, pero no se limitan a: Eupergite®, polivinilpirrolidona (PVP), polisulfona (PS), polietersulfona (PES), poliariletersulfona (PAES), poliacrilato, metacrilato, resinas de metacrilato tales como poli(metacrilato de metilo) (PMMA) y poli(metacrilato de glicidilo) (PGMA), poli(hidroxi metacrilato), poliestireno (PS), politetrafluoroetileno (PTFE), poli(acrilamida, poli(acroleína, acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), poli(acrilonitrilo (PAN), poliuretano (PU), Sepharose®, perlas acrílicas, agarosa, matrices celulósicas, polietilenglicol (PEG), alginato, carragenano, quitina, almidón, nitrocelulosa, matrices cerámicas, perlas de vidrio y/o sílices en fase sólida o mezclas y/o derivados de estas sustancias. La matriz de sílice en fase sólida puede comprender casi cualquier forma de sílice particulada, que incluye sílice amorfa, tal como sílice coloidal, gel de sílice, sílice precipitada y sílice ahumada o pirogénica; sílices microcristalinas tales como tierra de diatomeas; y sílices cristalinas tales como cuarzo. La sílice tiene un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 45 a 120 mesh (aproximadamente 345  $\mu\text{m}$  a 125  $\mu\text{m}$ ), preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 45 a 60 mesh (aproximadamente 345  $\mu\text{m}$  a 212  $\mu\text{m}$ ).

30 **[0125]** A menudo, para la funcionalización con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, se usa un material de columna que ya ha sido "pre-funcionalizado", es decir, se ha proporcionado un grupo químico que a su vez permite la unión covalente de los grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o los grupos  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

35 **[0126]** Tal "pre-funcionalización" de un material de columna se logra por métodos bien conocidos por un experto en la técnica (Chin. J Chem. 2012, 30, 2473, Polym. Int. 2013, 62, 991). Además, algunos materiales de columnas ya "pre-funcionalizados" están disponibles en el mercado, como Toyopearl® AF-epoxi, Toyopearl® AF-amino, Toyopearl® AFtresilo, TSKgel® tresilo, Sepharose® 6B epoxi-activado (GE Healthcare Life Sciences), Sepharose® 4 fast flow activado por CNBr (GE Healthcare Life Sciences), ECH Sepharose® 4B (GE Healthcare Life Sciences), Sepharose® 4 fast flow activado por NHS (GE Healthcare Life Sciences), Sepharose® 4 fast flow activado por vinilsulfona terminal (Affiland), Separopore® de aldehído (Agarosa) 4B, ECH Separopore® (Agarosa) 4B (Separopore), agarosas de Sterogene Bioseparations, Inc., por ejemplo, Agarosa de Epoxi-Ultraflow-4 (Sterogene Bioseparations, Inc.), Agarosa de Epoxi-Ultraflow-6 (Sterogene Bioseparations, Inc.), agarosas de emp Biotech GmbH, Agarosa de Epoxi-Ultraflow-4 (emp Biotech GmbH), Agarosa de Epoxi-Ultraflow-6 (emp Biotech GmbH), agarosas activadas con cualquier grado de reticulación.

45 **[0127]** El uso de acuerdo con la invención de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi es particularmente adecuado para la eliminación extracorpórea de PCR de sangre o plasma sanguíneo para la reanimación después de un paro cardíaco, así como para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en donde las enfermedades cardiovasculares son, en particular, ataque cardíaco (infarto de miocardio), accidente cerebrovascular y embolia pulmonar. También es adecuado el uso según la invención de una solución de citrato para la eliminación por cromatografía de afinidad de PCR de fluidos biológicos por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -aminoalcoxi-hidroxi-fosforiloxi para la eliminación extracorpórea de PCR de sangre o plasma sanguíneo para la profilaxis y/o tratamiento de reacciones exageradas del sistema inmune, en donde las reacciones exageradas del sistema inmune se seleccionan del grupo de inflamaciones crónicas, reacciones de rechazo durante trasplantes y reacciones alérgicas. El uso de una solución de citrato de acuerdo con la presente invención es por lo tanto particularmente adecuado para la eliminación extracorpórea de PCR de sangre o plasma sanguíneo para la profilaxis y/o tratamiento de inflamaciones crónicas seleccionadas del grupo: gota, osteoartritis, esclerosis múltiple, enfermedades intestinales de inflamación crónica como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miastenia gravis, enfermedad de Graves, tiroiditis autoinmune como tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis de Ord, psoriasis vulgar, espondilitis anquilosante (enfermedad de Bechterew), síndrome de Goodpasture y púrpura trombocitopénica inmunológica (PTI), lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjögren, granulomatosis de Wegener (enfermedad de Wegener), polimiositis y dermatomiositis. Entre las inflamaciones crónicas antes mencionadas hay algunas enfermedades que se clasifican bajo el término genérico de enfermedades reumatoides, tales como artritis reumatoide, artritis

psoriásica, miastenia gravis, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis de Ord, psoriasis vulgar, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), lupus eritematoso, esclerodermia, síndrome de Sjögren, granulomatosis de Wegener (enfermedad de Wegener), vasculitis, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis.

**[0128]** El citrato es un buen anticoagulante ya que evita la agregación de las plaquetas sanguíneas así como la activación del complemento. En particular, esto es importante cuando se usan centrifugas de plasma. Estos requieren citrato ya que de lo contrario se produce la coagulación. Esto no es posible por anticoagulación pura con heparina. Además, el citrato se metaboliza rápidamente en el hígado en el ciclo del citrato. Por lo tanto, los pacientes no están adicionalmente anticoagulados sistémicamente. Esto es de gran interés, especialmente en pacientes con infarto, ya que ya están fuertemente anticoagulados en el curso de su terapia estándar de infarto (p. ej., por ácido acetilsalicílico, clopidogrel). La anticoagulación adicional aumenta el riesgo de hemorragia, que es crítico. Además, la centrifuga de plasma permite que se logre un flujo de sangre mucho menor que un sistema de separación primaria basado en membrana (filtro). El flujo de plasma habitual o deseado es de aproximadamente 30 ml/minuto. Un sistema de separación primaria de membrana requiere un flujo sanguíneo de aproximadamente 150 a 200 ml/minuto (la eficiencia es aproximadamente del 17%). Una centrifuga de plasma es suficiente  $\approx$  60 ml/minuto de flujo sanguíneo (eficacia de aproximadamente 87%). Las tasas de flujo sanguíneo más pequeñas son mucho más fáciles de realizar, especialmente en pacientes ancianos o con poco potencial. Además, para un sistema de separación primaria basado en membrana, se requiere un acceso central (por ejemplo, catéter) que es muy invasivo y es peligroso en pacientes anticoagulados debido al riesgo de hemorragia, mientras que cuando se usa una centrifuga de plasma, generalmente un acceso periférico a través de, por ejemplo, una cánula de inyección más grande es suficiente, lo que no presenta un problema de sangrado.

### Descripción de las figuras

#### [0129]

**Fig. 1:** Se muestran los resultados de varias ejecuciones de cromatografía para la purificación de PCR, la reducción de PCR en % se representa frente al volumen de la matriz en una representación semilogarítmica. Se añadió una solución de citrato al plasma sanguíneo humano con una concentración de PCR de 50 mg/L, 1:5, 1:10, 1:20 o 1:50, y se aplicó a una columna de cromatografía que contenía 0,5 g de Agarosa de Epoxi-Ultraflow-4 acoplado a APPC. (Esterogeno) como matriz. Una muestra sin adición de citrato sirvió como control. El recorrido de la columna se recolectó a una velocidad de flujo de 5, 10, 25, 50 y 75 volúmenes de matriz en fracciones de 1 mL. Luego se determinó la concentración de PCR en las fracciones y se determinó la reducción de PCR en % sobre la base de la concentración inicial de PCR (antes de la aplicación). Los archivos de datos representan los valores medios de al menos dos experimentos independientes.

**Fig. 2:** El gráfico de barras muestra la cantidad reducida de PCR en plasma sanguíneo purificado por cromatografía de afinidad con y sin adición de citrato por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

**Fig. 3:** muestra un gel SDS aplicado al plasma sanguíneo que se purificó en tres días diferentes con y sin la adición de citrina por medio de un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, por cromatografía de afinidad. La flecha marca la banda C1q. Esta banda contiene menos proteína en el eluato del plasma sanguíneo, que se mezcló con ACD-A.

### Ejemplos

**[0130]** El término "**volumen de matriz**" (también abreviado como MV) como se usa en la presente memoria se refiere al volumen de material de columna utilizado en la cromatografía de afinidad respectiva.

#### **Ejemplo 1: Estudio comparativo sobre el efecto de la adición de solución de citrato en la purificación por cromatografía de afinidad de PCR a partir de plasma sanguíneo**

**[0131]** Como material de partida, se filtró plasma de sangre humana con una concentración de PCR de aproximadamente 50 mg/l usando un filtro de 35  $\mu$ m, y opcionalmente se añadió una solución de citrato (véase a continuación).

#### Procedimiento general de cromatografía de afinidad

**[0132]** Para cromatografía, se utilizó un sistema de cromatografía de baja presión (BioLogic™ LP System, Bio-Rad, Munich Alemania, número de catálogo 731-8300), junto con una columna (Mobicol "Classic", MoBiTec GmbH, Göttingen, Alemania, número de producto M1002) con un filtro de 35  $\mu$ m (MoBiTec GmbH, número de producto M523515) que se equipó con 0,5 g de agarosa acoplada a APPC (epoxi-Ultraflow-4 agarosa, Sterogene) como material de columna (1,6 mg APPC/ml), es decir, un material de columna con una matriz de sefarosa a la que se acopló el derivado de fosfocolina p-aminofenilfosfocolina (APPC). La columna se equilibró con tampón de 3

volúmenes de matriz (MV) de lavado (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) y se descartó el flujo.

5 **[0133]** La muestra se aplicó a la columna. El flujo de la columna se dividió en fracciones de 1 ml cada una por medio de un colector de fracciones (BioFrac™ Fraction Collector, Bio-Rad, número de catálogo 741-0002) conectado aguas abajo de la columna. Las fracciones de 1 ml (también denominadas fracciones de flujo) con un flujo de 5 MV, 10 MV, 25 MV, 50 MV, 75 MV y 100 MV se recolectaron mientras que las fracciones restantes se combinaron para formar el llamado "grupo de flujo".

10 **[0134]** La columna se lavó luego con 25 MV de tampón de lavado después de la aplicación de la muestra. Esto fue seguido por la elución de la PCR unida a la columna mediante la aplicación de 7,5 MV de tampón de elución 1 (0,1 M Tris 0,2 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,0). Aquí el eluato se fraccionó y se recogió solo cuando la absorción UV fue superior a 0,01.

15 **[0135]** Posteriormente, se usó 5 MV de tampón de elución 2 (tampón de glicina pH 2,8) para regenerar la columna. Si la elución por el tampón de elución 1 no es completa, las proteínas y, en particular, la PCR también pueden estar presentes en esta fracción. Se añade tampón de neutralización (Tris 3,5 M, pH 9,0) a este eluato, de modo que el PCR no se desnatura al pH ácido del tampón de elución 2 de 2,8. Finalmente, la columna se lava nuevamente con 20 MV del tampón de lavado.

20 **[0136]** El contenido de PCR del material de partida filtrado, del conjunto de flujos y de las fracciones recogidas se determinó por medio de un inmunoensayo competitivo y específico para humanos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2).

25 **[0137]** Partiendo de la concentración media de PCR (también referida como media [PCR]) en el material de partida, se determinó entonces el porcentaje de producción de PCR para cada fracción de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$PCR - Reducción (en \%) = 100 - \left( \frac{[PCR] \text{ medio en fracción } X}{[PCR] \text{ medio en la materia prima}} \times 100 \right)$$

30 **[0138]** Así, se extrajeron conclusiones sobre la retención de PCR a través de la columna por medio de la concentración de PCR en una fracción, es decir, el flujo desde la columna, teniendo en cuenta la concentración de PCR igualmente determinada en el material de partida.

35 **[0139]** La cantidad total de PCR restante en la columna se puede calcular restando la cantidad de PCR total de la corriente del depósito y las fracciones individuales de la cantidad total de PCR en el material de partida.

#### Influencia del citrato

40 **[0140]** Para investigar el efecto del citrato sobre la purificación por cromatografía de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos, por ejemplo, plasma sanguíneo, mediante un material de columna funcionalizado con grupos ω-fosfonooxialquilo de amonio y/o con grupos ω-amoniocalcoxi-hidroxi-fosforiloxi, el plasma sanguíneo humano se mezcló con la solución de citrato en diferentes proporciones de mezcla. La solución de citrato usada fue la siguiente: 7,3 g de ácido cítrico (anhidro) por litro (es decir, 38 mM de ácido cítrico), 22,0 g de citrato trisódico dihidrato por litro (es decir, 74,8 mM de citrato de dihidrato trisódico) y 1 L con agua. Los experimentos en los que la solución de citrato contenía adicionalmente 24,5 g de dextrosa (monohidrato) por litro (es decir, 123,6 mM de monohidrato de dextrosa) produjeron resultados idénticos. Se investigaron las siguientes relaciones de mezcla:

50 **[0141]** Se investigaron las siguientes relaciones de mezcla:

- 1:50 es decir, 1 parte de solución de citrato + 49 partes de plasma sanguíneo
- 1:20 es decir, 1 parte de solución de citrato + 19 partes de plasma sanguíneo
- 1:10 es decir, 1 parte de solución de citrato + 9 partes de plasma sanguíneo
- 1:5 es decir, 1 parte de solución de citrato + 4 partes de plasma sanguíneo

55 **[0142]** El plasma sanguíneo humano sin adición de citrato sirvió como muestra de referencia. La solución de citrato se añadió al plasma sanguíneo humano antes de la columna usando un mezclador de gradiente.

60 **[0143]** Para la muestra de referencia (sin adición de citrato) y para cada concentración de citrato, se realizaron dos análisis de cromatografía de afinidad independientes.

#### Resultados

**[0144]** Se puede ver en la Figura 1 que ha tenido lugar una reducción eficiente de la PCR de la sangre durante la

medición de referencia (es decir, sin citrato). El agotamiento porcentual al comienzo de la aplicación de muestra a la columna fue superior al 90% (véase 5 GV) y luego se disminuyó a un valor marginalmente inferior al 50% en el curso posterior de la aplicación de muestra. Tal caída puede explicarse por el hecho de que la columna utilizada ha unido cada vez más PCR con la aplicación de muestras persistentes y, por lo tanto, se satura cada vez más.

**[0145]** Sorprendentemente, sin embargo, se ha encontrado en una proporción de mezcla de 1:50 a 1:5 una reducción de PCR correspondiente al rendimiento de reducción bajo condiciones de referencia (véase también la Fig. 1). Contrariamente a todas las expectativas, una eliminación eficiente de PCR del plasma sanguíneo bajo el uso según la invención de una solución de citrato para la eliminación cromatográfica de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos podría efectuarse mediante un material de columna funcionalizado con grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo amonio y/o con grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi.

### Ejemplo 2 hu-PCR-ELISA para la determinación de la concentración de PCR en muestras

**[0146]** Para determinar la eficacia de una purificación por cromatografía de afinidad de PCR a partir de fluidos biológicos, por ejemplo, plasma sanguíneo, se determinó la concentración de PCR humana (hu-PCR) en las muestras apropiadas mediante un inmunoensayo (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

**[0147]** Para este fin, los pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron primero con un anticuerpo dirigido contra PCR humana añadiendo 100  $\mu$ l de una solución de anticuerpo policlonal anti-PCR de conejo (Dako, Hamburgo, Alemania, número de producto Q0329), diluido 1:500 en tampón de recubrimiento (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>), se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavó cuatro veces con al menos 250  $\mu$ l de PBST (Tween 20 al 0,1% en PBS).

**[0148]** Para la determinación de la concentración, el tampón de muestra (5 mM de EDTA en PBST) se utilizó como calibración cero y una serie estándar con concentraciones de 300, 200, 100, 50, 30, 15 y 8,3 ng de PCR/mL (en tampón de muestra). Para la serie estándar, se diluyó un patrón de PCR comercialmente disponible (Calibrador de proteína reactiva de suero humano C, 162 mg de PCR/L, Dako, número de producto X0923) de acuerdo con el tampón de muestra.

**[0149]** Además, una muestra de referencia con una concentración elevada de PCR (*Human Serum C-Reactive Protein High Control*; Dako, número de producto X0926) se diluyó 1:600 y 1:1500 con tampón de muestra y una muestra de referencia con baja concentración de PCR (*Human Serum C-Reactive Protein High Control*; Dako, número de producto X0925) diluido 1:250 y 1:1000 con tampón de muestra y utilizado como muestras de referencia adicionales para ELISA. Las muestras reales a medir (es decir, material de partida, conjunto de flujos, fracciones de flujo) se aplicaron a la placa de microtitulación en tres diluciones (en tampón de muestra).

**[0150]** Se aplicaron 100  $\mu$ l de cada pocillo de la placa de microtitulación, se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente y se agitaron en un agitador (600 revoluciones por minuto) y luego se lavaron cuatro veces con al menos 250  $\mu$ l de PBST.

**[0151]** Para la detección, un anticuerpo marcado con peroxidasa (POD) (conjugado de conejo-anti-huCRP-POD, 20  $\mu$ g/ml de solución madre, diluido 1:1000) y un anticuerpo policlonal competitivo PCR de conejos (Dako, Número de producto Q0329, diluido 1:2000) en solución de bloqueo (1% de caseína, 0,9% de NaCl, 0,001% de tiomersal) se añadieron posteriormente. Se aplicaron de nuevo 100  $\mu$ l por pocillo, se incubaron durante 1,5 h a temperatura ambiente y se agitaron en un agitador (600 revoluciones por minuto) y luego se lavaron de nuevo cuatro veces con al menos 250  $\mu$ l de PBST.

**[0152]** Posteriormente, se añadió el sustrato para la reacción de detección. Se diluyó una solución de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 25 mg/ml en DMSO y EtOH) en tampón de sustrato (0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 0,2 M de ácido cítrico, pH 3,95) y 100  $\mu$ l se echó una pipeta en cada pocillo. Después de una incubación de 10 a 15 minutos en la oscuridad, la reacción de detección se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l de solución de parada por pocillo. La detección fotométrica se llevó a cabo a continuación por medio de un lector de placas de microtitulación (BioRad 680 XR, BioRad, Munich, Alemania) determinando la extinción a 450 nm (referencia 655 nm).

**[0153]** Se llevó a cabo una determinación doble de cada placa de microtitulación en cada caso con el fin de eliminar las imprecisiones de medición causadas por el dispositivo. Además, cada experimento se repitió tres veces para aumentar la reproducibilidad de los resultados.

**[0154]** En experimentos preliminares, se excluyó una influencia de las concentraciones de citrato usadas en la fiabilidad del hu-PCR-ELISA.

**[0155]** Debe señalarse aquí que, por supuesto, también pueden usarse otros métodos para la determinación de PCR para determinar la concentración de PCR en las muestras a examinar.

### Ejemplo 3 Depleción de PCR bajo citrato

5 **[0156]** Se dividió un plasma sanguíneo con una concentración de PCR definida (38,8 mg/L) en 12,5 mL cada uno. La mitad se diluyó con la adición de citrato (solución de dextrosa de ácido de citrato A solución (ACDA) 1:15) sobre la columna de cromatografía de afinidad (0,5 ml de volumen de matriz de agarosa acoplado con 4-aminofenilfosfocolina), la otra mitad fue aprobada sin ACDA en una columna idéntica. El contenido de PCR se determinó antes y después de la aféresis. A partir de esto, se calculó la cantidad distante de PCR. Se encontró que después de la adición de citrato, más PCR se une a la columna y se elimina. Los resultados se muestran en la Figura 2.

10 **[0157]** Los eluatos también se aplicaron a un gel de SDS, cuya foto se muestra en la Figura 3. Se demuestra que en la aféresis con citrato (ACDA) se elimina menos complemento (C1q) que en aféresis sin solución de citrato.

15 **[0158]** El aumento de la capacidad de la columna debida al citrato se explica por los presentes inventores, sin pretensión de corrección, de la siguiente manera. El complemento se une a PCR unido a grupos  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi. Parece que en presencia de citrato, se activa menos complemento y se unen menos complejos C1q/C1r/C1s. Si los complejos C1-4/C1r/C1s se unen directa o indirectamente al material de la columna, también se produce menos impedimento estérico del enlace PCR debido a estos complejos bastante grandes.

20 **[0159]** En general, la adición de una solución de citrato para el fluido biológico que va a purificarse conduce a un aumento en la capacidad del material de la columna funcionalizada por medio de grupos de  $\omega$ -fosfonooxialquilo de amonio y/o grupos  $\omega$ -amonioalcoxi-hidroxi-fosforiloxi. Además, se activa menos complemento. En una comparación con ligandos peptídicos, este incremento en la capacidad no fue observado por el citrato.

25

30

35

40

45

50

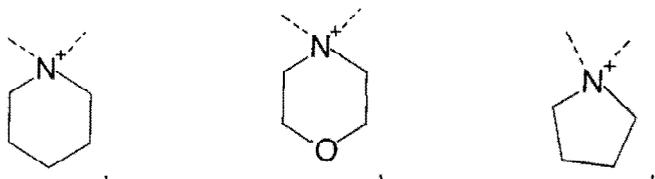
55

60

65



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



y  
R<sup>3</sup> se selecciona entre: -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, y preferiblemente -H; en donde uno o más átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por (un) átomo(s) de flúor.

**4.** Uso de una solución de citrato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la solución de citrato contiene al menos uno de los compuestos de citrato del grupo que comprende o está constituido por ácido cítrico, dihidrogenocitrato de sodio, citrato de hidrogeno de disodio, citrato de trisodio, dihidrato de citrato de trisodio, dihidrogeno de citrato de potasio, citrato de hidrogeno de dipotasio, citrato de tripotasio, dihidrogeno de citrato de litio, hidrogeno de citrato de dilitio, citrato de trilitio, citrato de dihidrogeno de amonio, citrato de hidrogeno de diamonio, citrato de triamonio, dicitrato de tricalcio (citrato de calcio), dicitrato de trimagnesio (citrato de magnesio) y/o ésteres de citrato parciales.

**5.** Uso de una solución de citrato según la reivindicación 4, en donde al menos un compuesto de citrato se selecciona de ácido cítrico y sales de citrato con cationes de metal monovalente.

**6.** Uso de una solución de citrato según la reivindicación 4 o 5, en la que la solución de citrato no contiene quelantes de Ca<sup>2+</sup> adicionales aparte del (de los) compuesto(s) de citrato.

**7.** Uso de una solución de citrato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la solución de citrato consiste en ácido cítrico, citrato trisódico, D-glucosa y agua.

**8.** Uso de una solución de citrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la solución de citrato tiene una concentración total de citrato en un intervalo de 50 mM a 200 mM.

**9.** Uso de una solución de citrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la solución de citrato tiene un valor de pH en un intervalo de pH 4,0 a pH 7,0.

**10.** Uso de una solución de citrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una dilución en un intervalo de 1:50 a 1:5 con el fluido biológico.

**11.** Uso de una solución de citrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que los fluidos biológicos son sangre o plasma sanguíneo.

Fig. 1

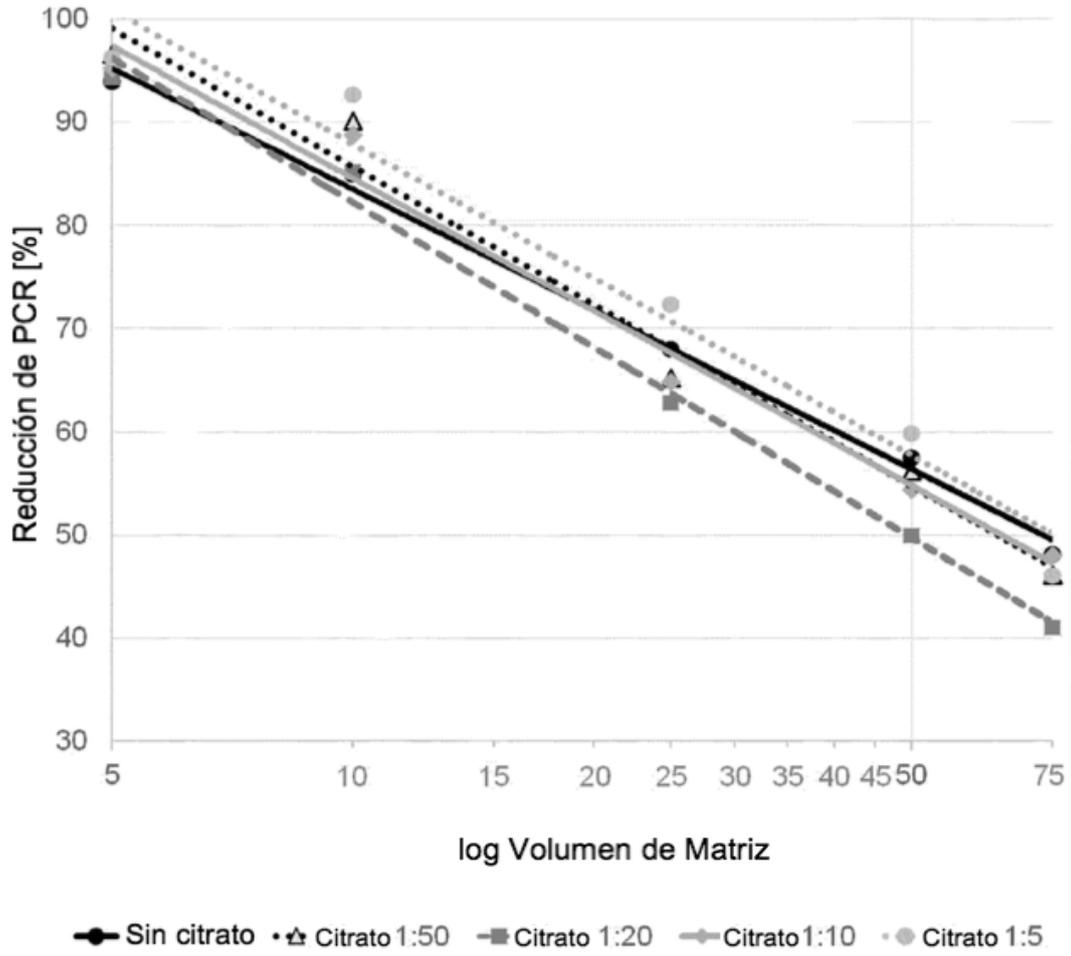


Fig. 2

**Comparación de rendimiento de reducción con (ACDA) y sin (control) citrato**

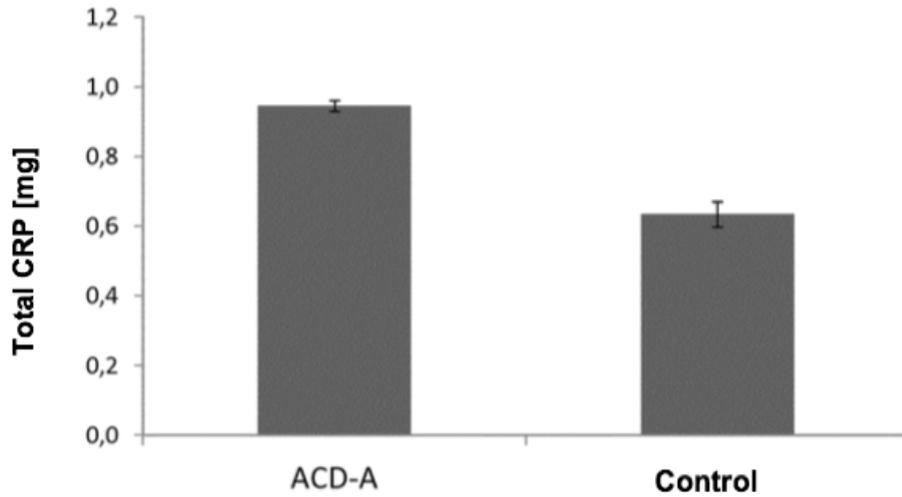


Fig. 3

