



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107106928 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201580070611.6

(22)申请日 2015.11.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107106928 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(30)优先权数据
14192831.7 2014.11.12 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/076493 2015.11.12

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/075269 DE 2016.05.19

(73)专利权人 彭特科尔有限公司
地址 德国亨尼希斯多夫

(72)发明人 A·谢里夫 B·沃格特
S·马特科卡

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 徐达

(51)Int.Cl.
B01D 15/12(2006.01)
B01D 15/38(2006.01)
B01J 20/286(2006.01)
B01J 20/32(2006.01)

(56)对比文件
US 2007/0225226 A1,2007.09.27,
JP 62-36399 A,1987.02.17,
CN 103288953 A,2013.09.11,
CN 101402671 A,2009.04.08,

审查员 王辉

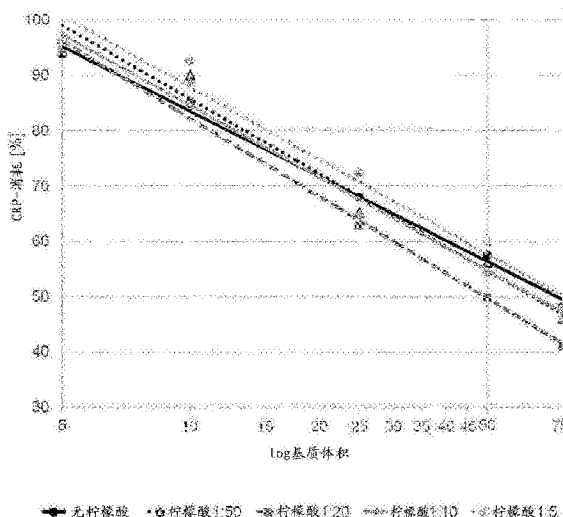
权利要求书2页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

柠檬酸溶液借助磷酸胆碱及其衍生物用于亲和色谱纯化CRP的用途

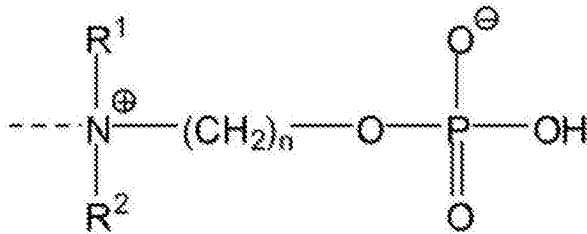
(57)摘要

本发明涉及使用柠檬酸溶液以进行从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质(CRP),其中CRP的亲和色谱式移除通过将CRP与用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行。



1. 柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途,所述亲和色谱式移除通过用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液在从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的情况下充当结合缓冲液。

2. 根据权利要求1的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途,其特征在于,所述 ω -膦酰基氧基烷基铵基具有下述通式(I)

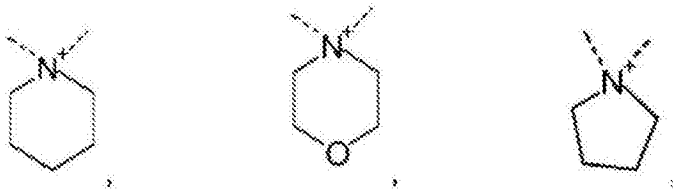


(I)

其中

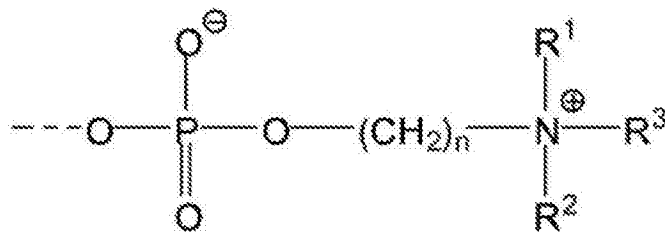
n选自2和3;

R¹和R²彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 或R¹和R²能够与它们与之结合的氮原子一起形成杂环,所述杂环选自:



其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

3. 根据权利要求1的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途,其特征在于,所述 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基具有下述通式(II)



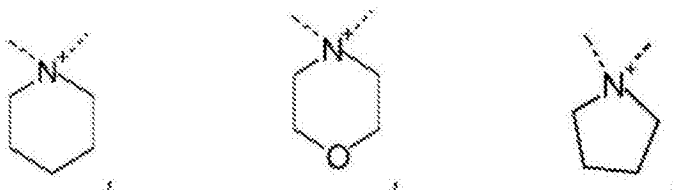
(II)

其中

n选自2和3;

R¹, R²和R³彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃,

或R¹和R²能够与它们与之结合的氮原子一起形成杂环,所述杂环选自:



和

R³选自：-H，-CH₃，-C₂H₅，-C₃H₇，-C₄H₉，-C₅H₁₁，-C₆H₁₃，和优选地-H；

其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

4. 根据权利要求1的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述柠檬酸溶液包含选自下组的柠檬酸化合物中的至少一种，所述组包含下述或由下述组成：柠檬酸，柠檬酸二氢钠，柠檬酸氢二钠，柠檬酸三钠，柠檬酸三钠二水合物，柠檬酸二氢钾，柠檬酸氢二钾，柠檬酸三钾，柠檬酸二氢锂，柠檬酸氢二锂，柠檬酸三锂，柠檬酸二氢铵，柠檬酸氢二铵，柠檬酸三铵，二柠檬酸三钙，二柠檬酸三镁和/或柠檬酸偏酯。

5. 根据权利要求4的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中至少一种柠檬酸化合物选自柠檬酸以及具有一价金属阳离子的柠檬酸盐。

6. 根据权利要求4或5的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述柠檬酸溶液除了柠檬酸化合物之外不包含额外的Ca²⁺-螯合剂。

7. 根据权利要求1至3中任一项的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述柠檬酸溶液由柠檬酸，柠檬酸三钠，D-葡萄糖和水组成。

8. 根据权利要求1至5中任一项的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述柠檬酸溶液具有50mM至200mM范围的柠檬酸盐总浓度。

9. 根据权利要求1至5中任一项的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述柠檬酸溶液具有pH4.0至pH 7.0范围的pH值。

10. 根据权利要求1至5中任一项的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，所述柠檬酸溶液是用生物液体以1:50至1:5的范围稀释的。

11. 根据权利要求1至5中任一项的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质的用途，其中所述生物液体是指血液或血浆。

柠檬酸溶液借助磷酸胆碱及其衍生物用于亲和色谱纯化CRP的用途

[0001] 本发明涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除C-反应性蛋白质(CRP)的用途,其中亲和色谱式移除CRP通过将CRP与用 ω -磷酸基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酸基氧基官能化的柱材料(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行。

[0002] 发明背景

[0003] 按照世界卫生组织(World Health Organization,WHO)的信息在2008年有约17,000,000人死于心血管疾病。由此,心血管疾病是非传染性疾病中最常见的死因并且导致全世界每年发生的死亡的大约三分之一。按照估计,该数字到2030年将增加到大约23,000,000例死亡/年。

[0004] 因此心血管疾病不仅是全世界的主要死亡原因,而且也导致国家卫生系统和疾病保险公司的巨额医疗成本。心血管疾病的两种最常见且最有害的现象是出现动脉硬化和血栓形成,其反过来又尤其导致心肌梗死和卒中。

[0005] 近年来,心血管疾病的治疗实现了长足的进展。这些进展不仅通过关于疾病引发机制的增加了的知识成为可能,而且还通过风险患者的早期识别成为可能。事实上,疾病风险的鉴定及其早期治疗是现代医学实践的重要特征。在近25年中,鉴定出多个因素和临床参数,它们与疾病的当前状况或与心血管疾病的未来可能性相关联。这样的风险因素能够是可测量的生化或生理学参数例如血清-胆固醇-,HDL-,LDL-,和纤维蛋白原-水平,但也包括行为模式例如超重和吸烟。在风险因素不仅指示疾病或其发生而且事实上参与引起疾病发生的情况下,对风险因素的治疗影响能够影响疾病进程或减少其发生风险。

[0006] C-反应性蛋白质(CRP)是先天免疫系统的急性-阶段-蛋白质部分并且在肝中与炎症反应相关联地形成并释放到血液中。在这方面,CRP的形成首先通过细胞因子诱导,其在急性或慢性炎症反应的范围中表达。在这方面,形成CRP的最强刺激物是白细胞介素-6(IL-6)。因此,血液中的CRP水平和IL-6水平都是局部或全身炎症反应的指标。慢性炎症据推测是心血管疾病的基本的和支持性的病理学现象之一。由此出发越来越清楚的是,CRP不仅断言了心血管疾病,而且也因果性地参与其发生或者能够影响其进程。

[0007] Yeh(Clin Cardiol.,2005,28:408-412)显示,能够用CRP-水平来预测心血管疾病风险,CRP额外是炎症反应的指征,而炎症则促进动脉粥样硬化的全部阶段。Zoccali等人,(Semin.Nephrol.,2005,25:358-362)显示,CRP-水平断言了肾脏疾病终末期患者的心血管死亡风险。按照Nurmohamed等人,(Neth.J.Med.,2005,63:376-381)CRP-水平断言了血液透析患者的心血管死亡风险。

[0008] Sola等人,(J.Card.Fail.,2005,11:607-612)能够显示为此能够利用他汀类药物治疗,其降低CRP的量并因此借此降低心血管疾病造成的死亡率和发病率。但是,这些治疗形式并不足以显著减少在心肌梗死后出现的高CRP-量(直至正常值的1000倍)或透析患者血液中的高CRP-量。

[0009] 人血液中的CRP正常值变化因人而异但平均为大约0.8mg CRP/升血液,但在急性或慢性炎症反应(例如细菌感染,动脉粥样硬化,心肌梗死后)的情况下能够升高至明显高

于100mg CRP/升血液。因为CRP在血液中的半衰期(约19小时)恒定并且因此独立于患者的健康状况,CRP的合成速率单独负责调节血液CRP-水平(Pepys&Hirschfield, J.Clin.Invest.,2003,111:1805-1812)。在急性病理条件下剧烈升高的CRP合成因此对患者(高危患者或急性患者)CRP-移除的治疗手段提出特别的要求,原因在于必须清除显著量的CRP以将血液CRP-水平降低至正常值。

[0010] 因此存在对治疗方法的增加的兴趣,其减少患者的血液CRP-水平。此外,基于CRP的临床意义存在对纯化CRP的有效方法的兴趣,以随后将经纯化CRP用于其他实验中,例如研究其分子功能。

[0011] WO 2004/076486公开抑制免疫学、炎性和/或病理生理学应答的方法,其通过向具有增加CRP-水平的患者给药CRP-结合性分子进行。然而其中并未公开的是,体外处理生物液体以从所述生物液体移除CRP。

[0012] WO 90/12632公开体外处理生物液体的方法和设备,其目标是从这些生物液体移除CRP以及抗-磷酸胆碱-抗体,以治疗癌症。为此使用的含磷酸胆碱基质能够例如由硅土,琼脂糖,乙酰基珠(Acrylbeads)或琼脂糖组成,其中通过所含的磷酸胆碱不仅结合CRP而且结合抗-磷酸胆碱-抗体。

[0013] US 2007/225226 A1公开特定的肽,其结合CRP并因此能够在CRP-单采血液成分术中用作功能柱材料。所述结合独立于钙地发生。还描述了一些体外血液净化装置,其在使用这些柱材料的情况下适于CRP-单采血液成分术,包括移除内毒素的系统,柠檬酸盐在其中用作抗凝血剂。CRP是五聚体,其亚单位各自结合两个 Ca^{2+} -离子,在它们的帮助下发生与本发明中使用的配体的结合。因为柠檬酸盐与高亲和力的 Ca^{2+} -离子结合,至今的推论是,在使用 Ca^{2+} -依赖性配体的情况下,柠檬酸盐对结合CRP的柱容量具有负面效果。当然本申请的发明人能够显示,在使用配体的情况下容量更高。CRP是调理素并且能够以结合形式在C1q上激活补体系统。然而能够出人意料地显示的是,柠檬酸盐防止补体激活,这又进一步提高容量,从而柠檬酸盐在使用配体的情况下导致进一步增容。在 Ca^{2+} -依赖性配体的情况下发生的这些效果在US 2007/225226A1的背景下是完全出人意料的。

[0014] WO 2007/076844公开方法,其通过从血浆通过单采血液成分术进行体外CRP-移除降低患者(通过增加的血液CRP-水平造成的)风险。根据该发明,为此使用包含基质的柱,其上结合磷酸胆碱-衍生物用于结合CRP并从血浆清除,并且因此治疗和/或预防自身免疫疾病,心血管疾病,糖尿病以及肾功能不全。

[0015] Slagman等人(Blood Purif.,2011,31:9)展示猪模型,其在心肌梗死后通过体外单采血液成分术成功降低血液CRP-水平。

[0016] 在体外使用血液和血浆发生的问题是,无论是分析或制备应用的情况下还是在透析或单采血液成分术的情况下,发生的凝血不仅阻碍使用本身或使其变得不可能,而且同样能够阻塞或污染所用的设备。出于该原因,在从人或动物体移除后向血液或血浆直接添加凝血抑制剂(所谓的抗凝剂)。

[0017] 抑制凝血的一种可能是给予 Ca^{2+} -螯合剂例如EDTA(乙二胺四乙酸),草酸盐和柠檬酸盐。在凝血期间作为一些凝血因子的辅因子需要钙。借助 Ca^{2+} -螯合剂从血液或血浆抽取钙,并因此抑制凝结。然而,此处对于通过磷酸胆碱或磷酸乙醇胺或磷酸胆碱-衍生物或磷酸乙醇胺-衍生物移除CRP的亲色方法存在一个重要问题。因为CRP与磷酸胆碱或与其

衍生物的结合需要 Ca^{2+} (Black et al., Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 48487; Thompson et al., Structure, 1999, 7 (2): 169-177), 现有技术中的一致意见是, 在CRP与磷酸胆碱结合期间绝对避免提供 Ca^{2+} -螯合剂(参见例如WO 90/12632)。因此, 在CRP与磷酸胆碱的亲色谱结合期间使用含柠檬酸的结合缓冲液按照现有技术是完全不合适的。然而含柠檬酸的溶液适于(类似于提供EDTA)作为洗脱缓冲液, 亦即用于使所结合的CRP再次从磷酸胆碱脱落。

[0018] Ca^{2+} -独立的抗凝作用的一种可能在于给予肝素。肝素是内源性物质, 其通过肥大细胞生产并且抑制性地作用于凝血级联。通过肝素与抗凝血酶II (在血液循环中的蛋白酶抑制剂, 其能够灭活已活化的凝血因子如凝血酶和因子Xa) 的结合, 触发抗凝血酶II的构象变化。由此, 抗凝血酶II-介导的凝血因子失活被加速2000-倍, 从而停止凝血。因此, 在从血液或血浆通过磷酸胆碱和磷酸胆碱-衍生物或磷酸乙醇胺和磷酸乙醇胺-衍生物亲和色谱式移除CRP的方法中至今仅将肝素用作抗凝剂。

[0019] 然而这具有一些缺点, 原因是在使用肝素的情况下, 尤其是在未分级的肝素的情况下, 除了出血还能够发生免疫反应即肝素诱导的血小板减少症(HIT)。在此肝素诱导静脉和动脉血栓形成。在同样可能应用CRP-单采血液成分术的卒中患者中, 接受未分级的肝素的HIT风险是约3%。此外肝素不允许与离心细胞分离器一起使用, 后者经常用来将血液分离为细胞成分和血浆。

[0020] 本发明的任务是, 为亲和色谱式移除CRP提供抗凝剂, 其避免现有技术中与肝素-有关的问题, 并且此外不妨碍CRP与磷酸胆碱或磷酸乙醇胺及其衍生物的 Ca^{2+} -依赖性结合。

[0021] 该任务通过独立权利要求的教导解决。从说明书、实例和未决专利权利要求产生其他有利设计。

[0022] 出人意料地发现, 通过采用柠檬酸溶液从生物液体借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料亲和色谱式移除CRP, 不仅出人意料地使得从生物液体有效移除CRP成为可能, 并且因此也消除了现有技术中的问题。

发明内容

[0023] 本发明涉及柠檬酸溶液的用途, 其用于从生物液体通过用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料亲和色谱式移除CRP。

[0024] 术语“CRP”如本文所用与“C-反应性蛋白质”同义。其在本文中优选指人C-反应性蛋白质。

[0025] 术语“亲和色谱式移除CRP”如本文所用意指, 移除CRP通过CRP与用于移除CRP的试剂成分之间的特异性结合而发生。就此而言也能够表述为“亲和色谱移除CRP”或“选择性移除CRP”。在CRP和相应官能化的柱材料之间的这种特异性结合基于CRP-蛋白质的结构特性, 并且能够包括例如CRP与磷酸胆碱的特征结合或者CRP与指向CRP表位的抗体的结合。选择性或分子特异性移除CRP意味着, CRP与生物液体的其它成分相比以更高的亲和力与官能化的柱材料结合。因此, 与移除CRP有关的术语“选择性”如本申请所用意指, 经移除的CRP与在生物液体中包含的CRP量的比例是其它经移除的物质与在生物液体中包含的物质的各自比例的至少三倍。然而, 与移除CRP有关的术语“选择性”如本申请所用不仅意指CRP移除。此处对技术人员明显的是, 在这种亲和色谱式移除CRP的情况下在一定程度上必然也能够使其

它物质(无意)与柱材料结合,并因此也在一定程度上随之移除。例如,蛋白质中在一定程度上存在与CRP结构一致的结构,其负责与 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或与 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基的特异性结合,因此这些结构相似的蛋白质也在一定程度上被结合。一种实例是例如抗体,其指向磷酸胆碱并因此在用磷酸胆碱官能化的柱材料的情况下能够同样结合。又一可能性则在于,从未完全避免的生物液体成分与例如基质衬底材料的非特异性结合。

[0026] 如上所述,CRP与磷酸胆碱或其衍生物或者磷酸乙醇胺或其衍生物的结合取决于 Ca^{2+} 的存在,并且因此CRP与在柱材料之中或之上固定化的 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或与 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基的结合也同样取决于 Ca^{2+} 的存在。

[0027] 因此本发明同样涉及柠檬酸溶液从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其中所述亲和色谱式移除CRP借助CRP与用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料的(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行。

[0028] 根据本发明的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其中所述亲和色谱式移除CRP借助CRP与用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料的(Ca^{2+} -依赖性)结合来进行,自然意指在CRP-移除之前将柠檬酸溶液与应从其移除CRP的生物液体混合。柠檬酸溶液因此在CRP与柱材料的 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基的希望结合期间存在。因此能够根据亲和色谱领域以外的术语提及的是,柠檬酸溶液用作“结合缓冲液”。

[0029] 然而这并不意味着,柠檬酸溶液用作“洗脱溶液”(或用作“洗脱缓冲液”)和因此用于从用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料移除CRP,并因此再生柱材料。

[0030] 术语“结合缓冲液”(也称为“结合溶液”)如本文所用在从试样(本文的生物液体例如血液或血浆)通过亲和色谱方法移除物质(本文中选择性和 Ca^{2+} -依赖性移除CRP)的情况下表示一种溶液,其被添加至试样并且然后随试样一起施用至用于移除物质的柱材料上(本文中的用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料)。借助结合缓冲液应该保证用于待移除物质与柱材料的特异性结合的充足条件。

[0031] 术语“洗脱缓冲液”(也称为“洗脱溶液”)如本文所用在从试样(本文的生物液体例如血液或血浆)通过亲和色谱方法移除物质(本文的选择性和 Ca^{2+} -依赖性移除CRP)的情况下表示一种溶液,其在将试样施用至柱材料并且待移除物质与柱材料特异性结合发生之后应用,以再次解开特异性结合并因此将待移除物质再次从柱材料解开(或洗脱)。不同于结合缓冲液,因此应该借助洗脱缓冲液在柱材料中形成条件,所述条件并不使待移除物质的结合成为可能,而是甚至相反地防止所述结合。

[0032] 本发明因此也涉及柠檬酸溶液从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其中所述亲和色谱式移除CRP借助CRP与用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行,其中所述柠檬酸溶液在从生物液体亲和色谱式移除CRP的情况下充当结合缓冲液(或结合溶液)。

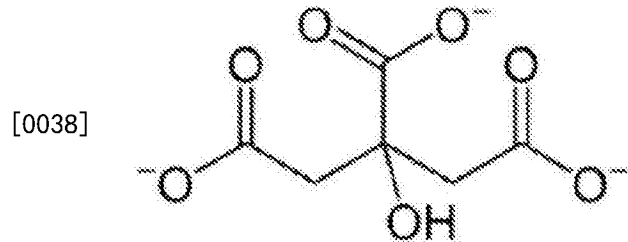
[0033] 术语“生物液体”如本文所用是指出现在哺乳动物和优选人当中的水性溶液,例如脑脊液,腹腔液,胸膜液,腹水,血液,血浆,肝提取物和组织间液。本发明自然是指包含CRP的生物液体。

[0034] 本发明因此同样指向柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料来进行,其中所述生物液体是指血液或血浆。

[0035] 换句话说,本发明同样指向柠檬酸溶液用于从血液和/或血浆亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料来进行。

[0036] 柠檬酸溶液

[0037] 术语“柠檬酸盐”如本文所用是指柠檬酸阴离子,亦即柠檬酸的盐,或换言之下述化学式的有机三羧酸盐:



[0039] 柠檬酸盐/酯能够以不同形式(或化合物)出现,亦即例如作为柠檬酸(1至3质子化的形式),作为柠檬酸与其它(不同于H⁺)无机阳离子结合的盐(例如作为与金属阳离子的金属盐或作为与铵离子的铵盐),但也作为柠檬酸偏酯。就此而言本文也使用术语“柠檬酸化合物”。

[0040] 如果柠檬酸的盐亦即柠檬酸阴离子与无机阳离子复合,在此也作为柠檬酸化合物的特殊形式提为“柠檬酸盐”。

[0041] 术语“柠檬酸溶液”如本文所用因此包括包含至少一种柠檬酸化合物的水性溶液。柠檬酸溶液成分的更详细信息进一步提供于下文。

[0042] 然而本发明优选,柠檬酸溶液的柠檬酸浓度不小于1mM,优选不小于1.1mM,优选不小于1.2mM,进一步优选不小于1.3mM,还进一步优选不小于1.4mM和通常优选不小于1.5mM。

[0043] 此外本发明优选,柠檬酸化合物是本发明柠檬酸溶液的重要组成部分。在这方面“重要组成部分”意指,柠檬酸溶液中全部柠檬酸化合物的总摩尔浓度与柠檬酸溶液中的其他化合物(然而除了水以外)相比,排在柠檬酸溶液中出现的最高的三个浓度。

[0044] 本发明因此也指向柠檬酸溶液从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含选自下组的至少一种柠檬酸化合物,所述组包含下述由下述组成:柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾,柠檬酸三钾,柠檬酸二氢锂,柠檬酸氢二锂,柠檬酸三锂,柠檬酸二氢铵,柠檬酸氢二铵,柠檬酸三铵,二柠檬酸三钙(柠檬酸钙),二柠檬酸三镁(柠檬酸镁)和/或柠檬酸偏酯。

[0045] 按照本发明同样可能的是,柠檬酸溶液包含多种上文列出的柠檬酸化合物的混合物。

[0046] 术语“柠檬酸化合物”如本文所用不仅包括柠檬酸而且包括其盐。

[0047] 在本申请中使用一般术语“柠檬酸钠”时,所述术语包括柠檬酸钠的不同质子化形式,亦即不仅包括非质子化的形式(柠檬酸三钠),而且包括简单质子化的形式(柠檬酸氢二

钠)或双质子化的形式(柠檬酸二氢钠)。

[0048] 在本申请使用一般术语“柠檬酸钾”时,所述术语包括柠檬酸钾的不同质子化形式,亦即不仅包括非质子化的形式(柠檬酸三钾),而且包括简单质子化的形式(柠檬酸氢二钾)或双质子化的形式(柠檬酸二氢钾)。

[0049] 在本申请中使用一般术语“柠檬酸锂”时,所述术语包括柠檬酸锂的不同质子化形式,亦即不仅包括非质子化的形式(柠檬酸三锂),而且包括简单质子化的形式(柠檬酸氢二锂)或双质子化的形式(柠檬酸二氢锂)。

[0050] 在本申请中使用一般术语“柠檬酸铵”时,所述术语包括柠檬酸铵的不同质子化形式,亦即不仅包括非质子化的形式(柠檬酸三铵),而且包括简单质子化的形式(柠檬酸氢二铵)或双质子化的形式(柠檬酸二氢铵)。

[0051] 术语“柠檬酸偏酯”如本文所用表示柠檬酸的酯,然而其中并非柠檬酸的全部三个羧基(即-COO⁻)都被酯化(即-COOR,其中R是有机残基),而是柠檬酸的三个羧基中最多二个、然而优选柠檬酸的三个羧基中最多一个被酯化。除了1至2个酯基,柠檬酸偏酯还包含1至2个生理学相容的无机阳离子(例如金属阳离子如Na⁺,K⁺),其与1或2个未酯化的柠檬酸羧基复合。

[0052] 本发明的优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含至少一种选自下组的柠檬酸化合物,所述包含下述或由下述组成:柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾,柠檬酸三钾,柠檬酸二氢锂,柠檬酸氢二锂,柠檬酸三锂,柠檬酸二氢铵,柠檬酸氢二铵,柠檬酸三铵,二柠檬酸三钙(柠檬酸钙),二柠檬酸三镁(柠檬酸镁)和/或柠檬酸偏酯,其中所述至少一种柠檬酸化合物选自柠檬酸以及与一价金属阳离子的柠檬酸盐。

[0053] 本发明优选,柠檬酸溶液不含柠檬酸铁(II)。还更优选,柠檬酸溶液不含柠檬酸铁(III)。此外本发明优选,柠檬酸溶液不含柠檬酸铜(II)(二柠檬酸三铜)和不含柠檬酸铝。

[0054] 在本发明的其他优选实施方式中,柠檬酸溶液不包含柠檬酸钙(也称为二柠檬酸三钙)。

[0055] 在本发明的另一种优选实施方式中,柠檬酸溶液不包含柠檬酸镁(也称为二柠檬酸三镁)或包含最高1mM浓度的柠檬酸镁。

[0056] 在本发明的另一种优选实施方式,柠檬酸溶液不包含柠檬酸钙和不包含柠檬酸镁或包含最高1mM浓度的柠檬酸镁。

[0057] 如果在本申请中提及溶液不包含某些物质则其是指,这些溶液完全不包含所述物质或者至少考虑到可能的不可避免的杂质,包含不超过0.01重量百分比的所述物质。

[0058] 本发明的特别优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含至少一种选自下组的柠檬酸化合物,所述组包含下述或由下述组成:柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾,柠檬酸三钾,柠檬酸二氢锂,柠檬酸氢二锂,和/或柠檬酸三锂。然而还优选柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水

合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾和/或柠檬酸三钾。然而最通常优选柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠和柠檬酸三钠二水合物。

[0059] 本发明还优选,柠檬酸溶液除了所述一种或多种柠檬酸化合物之外并不包含额外的也即其他的螯合 Ca^{2+} 的非-柠檬酸-基物质(所谓的 Ca^{2+} -螯合剂)。

[0060] 本发明的优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液不包含化学上并不基于柠檬酸化合物的 Ca^{2+} -螯合剂。化学上不基于柠檬酸化合物且因此不优选的 Ca^{2+} -螯合剂的可能实例是EDTA(乙二胺四乙酸),EGTA(乙二醇-二(氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸),BAPTA(1,2-二(o-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)以及草酸。

[0061] 本发明的优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中柠檬酸溶液包含至少一种选自下组的柠檬酸化合物,所述组包含下述或由下述组成:柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾,柠檬酸三钾,柠檬酸二氢锂,柠檬酸氢二锂,柠檬酸三锂,柠檬酸二氢铵,柠檬酸氢二铵,柠檬酸三铵,二柠檬酸三钙(柠檬酸钙),二柠檬酸三镁(柠檬酸镁)和/或柠檬酸偏酯,其中所述柠檬酸溶液除了柠檬酸化合物之外不含额外 Ca^{2+} -螯合剂。

[0062] 本发明因此还优选,柠檬酸溶液不含EDTA(乙二胺四乙酸),EGTA(乙二醇-二(氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸),BAPTA(1,2-二(o-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)或草酸。

[0063] 除了上文指定的柠檬酸化合物,柠檬酸溶液能够包含额外的物质,然而其不具备 Ca^{2+} -螯合特性。因此例如其他物质可能作为添加剂,其有助于柠檬酸溶液的容量渗透摩尔浓度大致对应生物液体亦即例如血液或血浆的容量渗透摩尔浓度。用于调节容量渗透摩尔浓度的这种物质包括无机盐例如氯化钠,氯化钾,但也包括糖例如葡萄糖,右旋糖(D-葡萄糖),果糖和蔗糖或肝素。术语葡萄糖和D-葡萄糖是同义词并且能够因此在本文中用作同义词。

[0064] 其他物质同样可能充当添加剂,其起到调整柠檬酸溶液pH值为规定值例如生物液体(亦即例如血液或血浆)pH值的作用。本文例如可能的是,额外包含的物质与柠檬酸化合物一起形成缓冲系统,其能够调整柠檬酸溶液的pH值并且能够补偿pH值的轻微波动。柠檬酸溶液包含由柠檬酸化合物和非-柠檬酸-缓冲物质组成的缓冲系统,因此也使用术语“含柠檬酸的缓冲液”。所加缓冲物质,其不是柠檬酸化合物(亦即非-柠檬酸-缓冲物质),的可能实例包括磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,磷酸氢二钾,磷酸二氢钾,乳酸盐和醋酸盐。

[0065] 由柠檬酸化合物和非-柠檬酸-缓冲物质组成的缓冲系统,亦即根据本发明的含柠檬酸缓冲液形式的柠檬酸溶液,的可能实例是柠檬酸与磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,磷酸氢二钾或磷酸二氢钾的组合。然而特别优选柠檬酸与磷酸氢二钠的组合。

[0066] 然而柠檬酸溶液包含二种不同的柠檬酸化合物,它们一起同样代表缓冲系统,因此也使用术语“柠檬酸-缓冲液”。

[0067] 由二种不同柠檬酸化合物构成的缓冲系统,亦即根据本发明的柠檬酸-缓冲液形式的柠檬酸溶液,的可能实例是柠檬酸与柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬

酸二氢钾,柠檬酸氢二钾或柠檬酸三钾的组合;柠檬酸二氢钠与柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸氢二钾或柠檬酸三钾的组合;柠檬酸二氢钾与柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠柠檬酸氢二钾或柠檬酸三钾的组合;柠檬酸氢二钠与柠檬酸三钠或柠檬酸三钾的组合;以及柠檬酸氢二钾与柠檬酸三钠或柠檬酸三钾的组合。

[0068] 然而特别优选柠檬酸与柠檬酸三钠的组合作为柠檬酸-缓冲液形式的柠檬酸溶液。

[0069] 自然同样可以想象的是,向包含二种不同柠檬酸化合物的柠檬酸溶液(亦即柠檬酸-缓冲液)继续添加物质以调节容量渗透摩尔浓度。

[0070] 本发明优选,柠檬酸溶液仅由下述组成:水,一种或多种上文列出的柠檬酸-化合物,以及任选的一种或多种上文列出的调节容量渗透摩尔浓度的化合物(也称为“等渗物(Osmolytika)”)和/或任选的一种或多种上文列出的非-柠檬酸-缓冲物质。

[0071] 本发明的其他实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液由下述组成:水;和

[0072] 至少一种选自下组的柠檬酸化合物,所述组包含下述或由下述组成:柠檬酸,柠檬酸二氢钠,柠檬酸氢二钠,柠檬酸三钠,柠檬酸三钠二水合物,柠檬酸二氢钾,柠檬酸氢二钾,柠檬酸三钾,柠檬酸二氢锂,柠檬酸氢二锂,柠檬酸三锂,柠檬酸二氢铵,柠檬酸氢二铵,柠檬酸三铵,二柠檬酸三钙(柠檬酸钙),二柠檬酸三镁(柠檬酸镁)和/或柠檬酸偏酯;和

[0073] (任选的)至少一种选自下组的化合物,所述组包含下述或由下述组成:氯化钠,氯化钾,葡萄糖,果糖和蔗糖,和/或

[0074] (任选的)至少一种选自下组的化合物,所述组包含下述或由下述组成:磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,磷酸氢二钾,磷酸二氢钾,乳酸盐和醋酸盐。

[0075] 本发明的优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液由柠檬酸,柠檬酸三钠和水组成。

[0076] 本发明特别优选的实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含38mM柠檬酸,74.8mM柠檬酸三钠,和水。

[0077] 本发明优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液由柠檬酸,柠檬酸三钠,D-葡萄糖和水组成。

[0078] 由柠檬酸,柠檬酸三钠,D-葡萄糖和水组成的柠檬酸溶液也称为“酸-柠檬酸-葡萄糖-溶液(ACD-溶液)”。

[0079] 本发明优选变型使用的柠檬酸溶液涉及ACD-溶液,其包含在22.9mM和38.0mM之间的柠檬酸,在44.9mM和74.8mM之间的柠檬酸三钠,在74.2mM和123.6mM之间的D-葡萄糖和水。

[0080] 本发明特别优选的变型使用的柠檬酸溶液涉及ACD-溶液,其包含38mM柠檬酸,74.8mM柠檬酸三钠,123.6mM D-葡萄糖和水。其也称为“ACD-A溶液”。

[0081] 本发明特别优选的实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移

除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含38mM柠檬酸,74.8mM柠檬酸三钠,123.6mM D-葡萄糖和水。

[0082] 本发明的其他优选实施方式涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液由柠檬酸,柠檬酸三钠,磷酸氢钠,D-葡萄糖和水组成。

[0083] 由柠檬酸,柠檬酸三钠,磷酸氢钠,D-葡萄糖和水组成的柠檬酸溶液也称为“柠檬酸-磷酸-葡萄糖-溶液(CPD)”。

[0084] 本发明优选变型使用的柠檬酸溶液涉及CPD-溶液,其包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,128.7mM D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠和水。

[0085] 本发明特别优选的实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,128.7mM D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠和水。

[0086] 本发明其他优选实施方式涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液由柠檬酸,柠檬酸三钠,磷酸氢钠,D-葡萄糖,腺嘌呤和水组成。

[0087] 由柠檬酸,柠檬酸三钠,磷酸氢钠,D-葡萄糖,腺嘌呤和水组成的柠檬酸溶液也称为“含腺嘌呤的柠檬酸-磷酸-葡萄糖-溶液(CPDA)”。

[0088] 本发明的优选变型使用的柠檬酸溶液涉及CPDA-溶液,其包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,在128.7mM和160.9mM之间的D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠,2mM腺嘌呤和水。本发明其他优选变型使用的柠檬酸溶液涉及CPDA-溶液,其包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,128.7mM D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠,2mM腺嘌呤和水。本发明特别优选变型使用的柠檬酸溶液涉及CPDA-溶液,其包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,160.9mM D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠,2mM腺嘌呤和水。

[0089] 本发明特别优选的实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液包含15.6mM柠檬酸,89.4mM柠檬酸三钠,在128.7mM和160.9mM之间的D-葡萄糖,16.1mM磷酸氢钠,2mM腺嘌呤和水。

[0090] 根据本发明的一些实施方式优选,柠檬酸溶液不含与多价即二价或三价阳离子的金属盐。因此在本发明的另一种优选实施方式中柠檬酸溶液不包含钙盐。在本发明的另一种优选实施方式柠檬酸溶液不包含镁盐或至少包含最高1mM浓度的镁盐。

[0091] 换句话说,根据本发明的一些实施方式优选,柠檬酸溶液只包含与一价阳离子的金属盐。

[0092] 柠檬酸浓度和用生物液体稀释

[0093] 本发明优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液具有在50mM至200mM,优选60mM至150mM,还优选70mM至

120mM,还优选75mM至115mM,和最通常优选74.8mM至113mM范围的柠檬酸总浓度。

[0094] 本发明的优选实施方式因此同样涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液具有优选50mM,150mM,200mM,优选60mM,优选120mM,还优选115mM,还优选70mM,还优选75mM,还优选74.8mM,最通常优选113mM的柠檬酸总浓度。

[0095] 自然地,柠檬酸浓度不仅在原本的柠檬酸溶液中是重要的,并且特别在柠檬酸溶液和生物液体亦即例如血液或血浆组成的混合物中的最终浓度也是重要的。因此所用的柠檬酸溶液稀释也是重要的。

[0096] 因此本发明也涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述生物液体在移除CRP之前与柠檬酸溶液混合。

[0097] 本发明同样涉及柠檬酸溶液作为结合缓冲液(或结合溶液)从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述生物液体在移除CRP之前与柠檬酸溶液混合。

[0098] 本发明因此也涉及柠檬酸溶液的用途从生物液体亲和色谱式移除CRP,其中所述亲和色谱式移除CRP借助CRP与用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料的(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行,并且其中所述生物液体在移除CRP之前与柠檬酸溶液混合。

[0099] 在柠檬酸溶液与生物液体(亦即例如血液或血浆)混合之后,将柠檬酸溶液和生物液体组成的混合物施用至用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料,从而发生CRP与所述官能化的柱材料的(Ca^{2+} -依赖性)结合。

[0100] 本发明因此同样涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液以1:50至1:5,优选1:40至1:10,优选1:30至1:20,优选1:20至1:15,优选1:15至1:10的范围用生物液体稀释。

[0101] 本发明因此同样涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液以1:50,优选1:45,进一步优选1:40,优选1:35,优选1:30,优选1:25,进一步优选1:20,进一步优选1:15,进一步优选1:10,优选1:5用生物液体稀释。

[0102] 本发明优选实施方式因此涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液以1:50至1:5的范围用生物液体稀释。

[0103] 本发明的优选实施方式因此也涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液具有50mM至200mM,优选60mM至150mM,还优选70mM至120mM,还优选75mM至115mM,和最通常优选74.8mM至113mM的范围的柠檬酸总浓度;并且其中所述柠檬酸溶液以1:50至1:5,优选1:40至1:10,优选1:30至1:20,优选1:20至1:15,优选1:15至1:10的范围用生物液体稀释。

[0104] 本发明的进一步优选实施方式因此也涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液具有70mM至120mM的范围的柠檬酸总浓度;并且其中所述柠檬酸溶液以1:50至1:5的范围用生物液体稀释。

[0105] 自然也可以想象使用柠檬酸溶液,其包含比前述段落的描述更低或者更高的柠檬酸浓度。因此,自然必须相应地减少(柠檬酸浓度较低)或提高(柠檬酸浓度较高)生物液体稀释度。然而,在前述段落中描述的柠檬酸浓度和稀释被证明是对本发明柠檬酸溶液从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途特别有利的。

[0106] 因为溶液pH值对从酸和碱(亦即也例如柠檬酸)的离解具有关键影响,并因此在本发明的情况下也影响与 Ca^{2+} 的结合,所使用的柠檬酸溶液的pH值是本发明的重要方面。

[0107] 本发明因此也涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其中所述柠檬酸溶液具有pH 4.0至pH 7.0,优选pH 4.5至pH 6.5,进一步优选pH 4.7至pH 6.0,还进一步优选pH 4.9至pH 5.8,还进一步优选pH 5.0至pH 5.6,和最通常优选pH 5.0至pH 5.5范围的pH值。

[0108] CRP的 Ca^{2+} -依赖性配体

[0109] 如已多次提及的,为了从生物液体例如从血液或血浆亲和色谱式移除CRP而使用柱材料,其包含磷酸胆碱和/或磷酸乙醇胺或其衍生物,由此CRP与所述官能化的柱材料的 Ca^{2+} -依赖性结合是可能的。

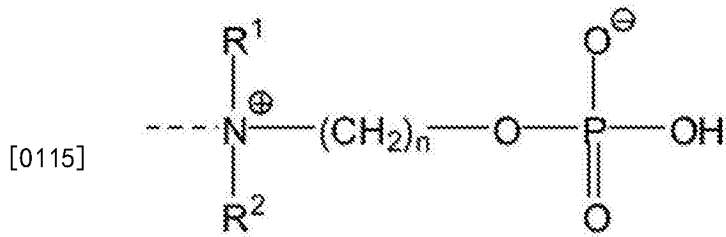
[0110] 为此将磷酸胆碱,磷酸乙醇胺或其衍生物固定化在柱材料上。这通常通过有机连接体基团发生,磷酸胆碱,磷酸乙醇胺或其衍生物通过该基团吸附地或更优选共价地与柱材料结合。这样获得所谓的“官能化的柱材料”,其中负责与CRP的 Ca^{2+} -依赖性结合的化学基团向外暴露,从而存在于生物液体中的CRP也能接触所述化学基团。

[0111] 换句话说,术语“官能化的柱材料”如本文所用是指用于亲和色谱法的柱材料,其携带官能化的化学基团。在这方面,官能化的化学基团能够通过吸附或离子相互作用但优选通过共价结合与柱材料结合。自然重要的是官能化的化学基团与柱材料结合,使得官能化的基团是活化且暴露的,从而保留其功能。因此可能的是,固定在柱材料上的基团(此处: ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基)与来自试样(此处:生物液体例如血液或血浆)的配体(此处:CRP)能够相互作用或者能够与其结合。

[0112] 根据磷酸胆碱、磷酸乙醇胺或其衍生物通过铵基团或通过磷酸基团通过有机连接体与柱材料结合来区分用 ω -膦酰基氧基烷基铵基官能化的(通过铵基团联接)柱材料,和用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的(通过磷酸基团联接)柱材料。

[0113] 与柱材料(必要时通过有机连接体)的联接在下式(I)和(II)中通过铵基团氮原子上或磷酸基团氧原子上的虚线显示。

[0114] 术语“ ω -膦酰基氧基烷基铵基”如本文所用能够与“omega-膦酰基氧基烷基铵”同义地使用并且描述下述通式(I)的化合物

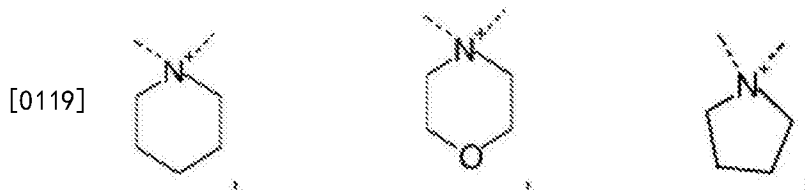


(I)

[0116] 其中

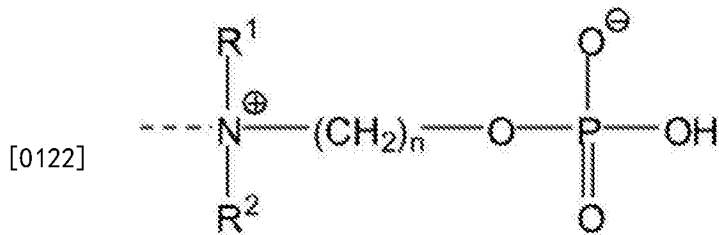
[0117] n选自2和3;

[0118] R¹和R²彼此独立地选自:-H,-CH₃,-C₂H₅,-C₃H₇,-C₄H₉,-C₅H₁₁,-C₆H₁₃,或R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0120] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0121] 本发明因此同样指向柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用ω-膦酰基氧基烷基铵基和/或用ω-铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其特征在于,ω-膦酰基氧基烷基铵基具有下述通式(I)

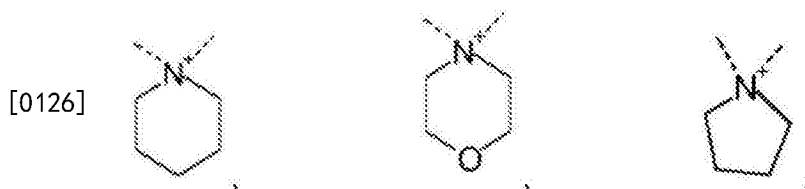


(I)

[0123] 其中

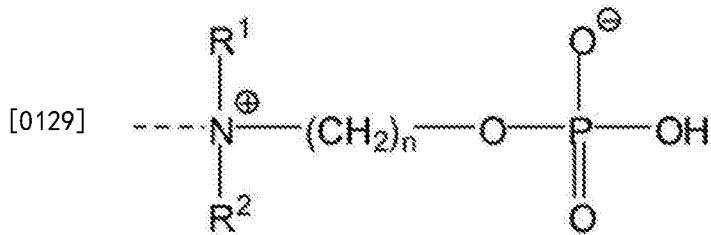
[0124] n选自2和3;

[0125] R¹和R²彼此独立地选自:-H,-CH₃,-C₂H₅,-C₃H₇,-C₄H₉,-C₅H₁₁,-C₆H₁₃,或者R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0127] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0128] 优选的ω-膦酰基氧基烷基铵基包括通式(I)化合物

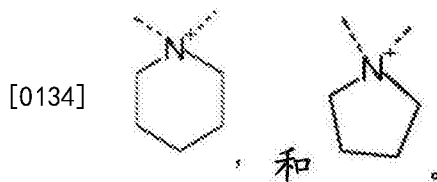


[0130] (I)

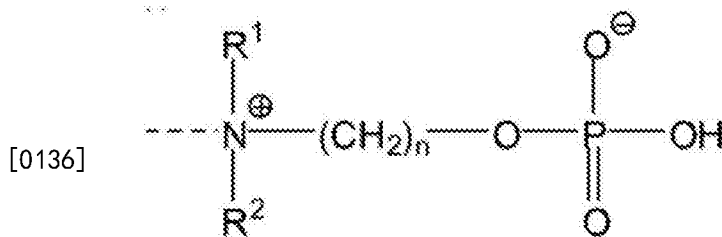
[0131] 其中

[0132] $n=2$ 或 3 ;

[0133] R^1 和 R^2 彼此独立地选自： $-H$ ， $-CH_3$ ， $-C_2H_5$ ， $-C_3H_7$ 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环：



[0135] 特别优选的 ω -膦酰基氧基烷基铵基包括通式(I)化合物

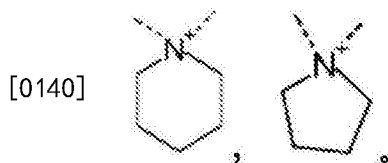


(I)

[0137] 其中

[0138] $n=2$;

[0139] R^1 和 R^2 选自： $-H$ ， $-CH_3$ ， $-C_2H_5$ ，和特别优选 $-CH_3$ 和 $-C_2H_5$ 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环：

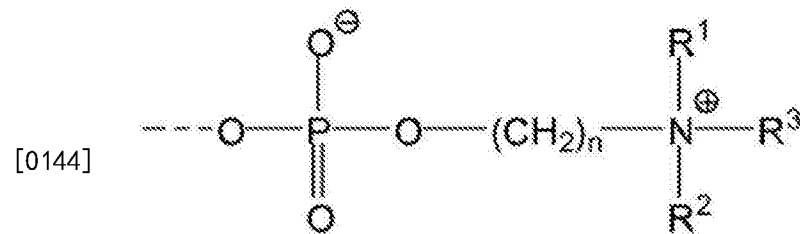


[0141] 包含上述 ω -膦酰基氧基烷基铵基的和适于官能化相应柱材料的优选化合物包括例如：

[0142] 2-[2-(2-氨基乙氧基)乙基-二乙基-铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[4-[2-(2-氨基乙氧基)乙基]哌啶-4-基]乙基-磷酸氢盐, 2-[1-[2-(2-氨基乙氧基)乙基]吡啶-1-基]乙基-磷酸氢盐, 2-[2-(2-氨基乙氧基)乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[3-氨基丙基-(二甲基)铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[二甲基(4-硫烷基丁基)铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[4-叠氮基丁基(二甲基)铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[二甲基(戊-4-炔基)铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[3-(6-氨基己酰基-氨基)丙基-二乙基-铵基]乙基-磷酸氢盐, 2-[1-[2-[2-(6-氨基己酰基-氨基)乙氧基]乙基]吡啶-1-基]乙基-磷酸氢盐, 2-[4-[2-[2-[3-(6-氨基己

酰基氨基]丙酰基氨基]乙氧基]乙基]吗啉-4-鎗-4-基]乙基-磷酸氢盐,2-[1-[2-[2-[6-(6-氨基己酰基氨基)己酰基氨基]乙氧基]乙基]吡咯烷-1-鎗-1-基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-烯丙氧基乙基(二甲基)铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-烯丙氧基乙基(二乙基)铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[4-(2-烯丙氧基乙基)吗啉-4-鎗-4-基]乙基-磷酸氢盐,2-[1-(2-烯丙氧基乙基)哌啶-1-鎗-1-基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-[2-(6-氨基己酰基氨基)乙氧基]乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-[2-[3-(6-氨基己酰基氨基)丙酰基氨基]乙氧基]乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[3-叠氨基丙基(二甲基)铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[二甲基-[2-[2-(丙-2-炔氧基羰基氨基)乙氧基]乙基]铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-[2-(烯丙氧基羰基氨基)乙氧基]乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-[2-[6-(烯丙氧基羰基氨基)己酰基氨基]乙氧基]乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[2-(6-氨基己酰基氨基)乙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐,2-[二甲基-[3-[6-(丙-2-炔氧基羰基氨基)己酰基氨基]丙基]铵基]乙基-磷酸氢盐,以及2-[3-(6-氨基己酰基氨基)丙基-二甲基-铵基]乙基-磷酸氢盐。

[0143] 术语“ ω -铵烷氧基-羟基-磷酰基氧基”如本文所用能够与“omega-铵烷氧基-羟基-磷酰基氧基”同义地使用并且描述下述通式(II)化合物



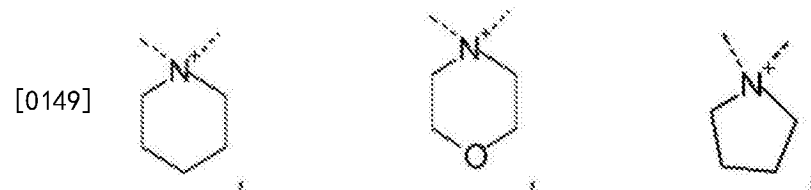
(II)

[0145] 其中

[0146] n选自2和3;

[0147] R^1 , R^2 和 R^3 彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃,

[0148] 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:

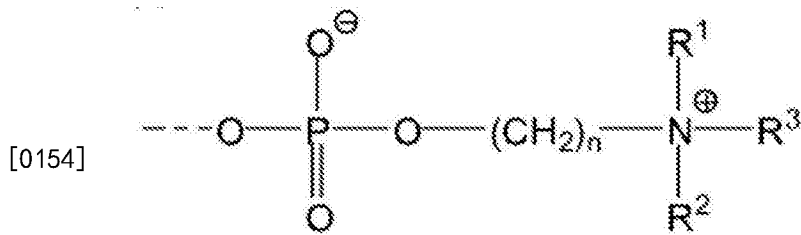


[0150] 和

[0151] R^3 选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 和优选-H;

[0152] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0153] 优选的 ω -铵烷氧基-羟基-磷酰基氧基包括通式(II)化合物

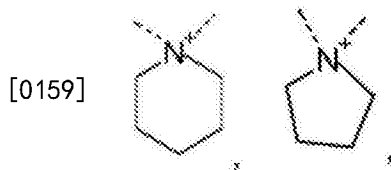
**(II)**

[0155] 其中

[0156] n选自2和3;

[0157] R^1, R^2 和 R^3 彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇,

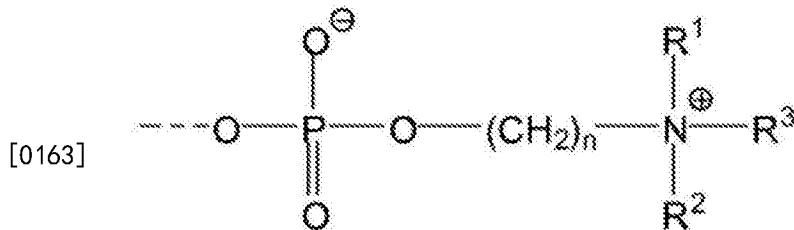
[0158] 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0160] 和 $R^3 = -H$ 。

[0161] 在本发明范围中特别优选, ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基是指 ω -三烷基铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基。

[0162] 因此包括特别优选的通式(II)的 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基化合物

**(II)**

[0164] 其中

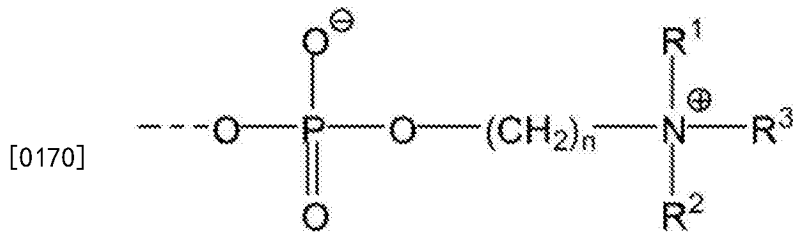
[0165] n=2;

[0166] 和 R^1, R^2 和 R^3 选自: -H, -CH₃, -C₂H₅和特别优选-CH₃和-C₂H₅。

[0167] 因此同样特别优选, ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基是指 ω -三甲基铵基乙氧基-羟基-磷酰基氧基或 ω -三甲基铵基丙氧基-羟基-磷酰基氧基。

[0168] 包含如上述 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基的和适于官能化相应柱材料的优选化合物包括例如:p-氨基苯基磷酰胆碱(APPC), 4-[[羟基[2-(三甲基铵基)乙氧基]氧磷基]氧基]-苯重氨基(p-重氮-苯基磷酸胆碱)或p-硝基苯-6-(0-磷酸胆碱)羟基丁酸酯。

[0169] 本发明也指向柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途, 其借助用 ω -磷酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基官能化的柱材料进行, 其特征在于 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酰基氧基具有下述通式(II)

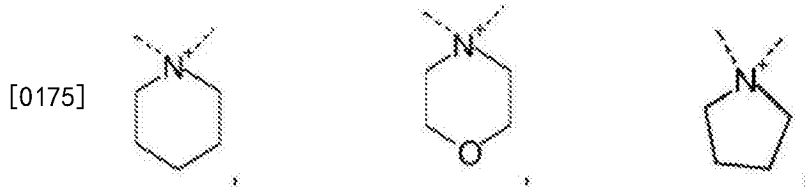
**(II)**

[0171] 其中

[0172] n选自2和3;

[0173] R¹, R²和R³彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃,

[0174] 或R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:

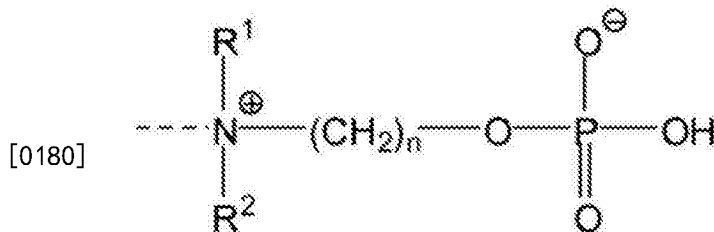


[0176] 和

[0177] R³选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 和优选-H;

[0178] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

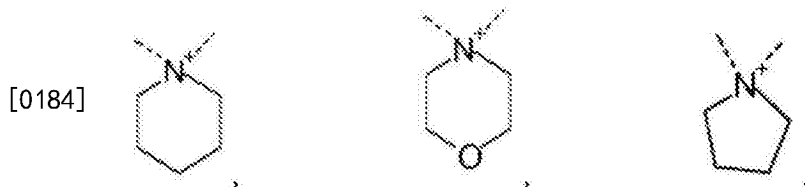
[0179] 本发明因此同样指向柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途, 其借助用 ω-膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω-铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行, 其特征在于 ω-膦酰基氧基烷基铵基具有下述通式 (I)

**(I)**

[0181] 其中

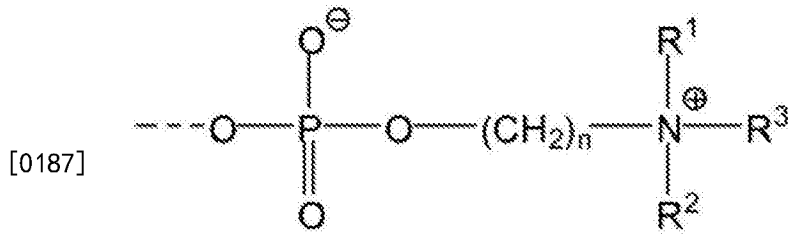
[0182] n选自2和3;

[0183] R¹和R²彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 或者R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0185] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换;

[0186] 并且其特征在于 ω-铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基具有下述通式 (II)

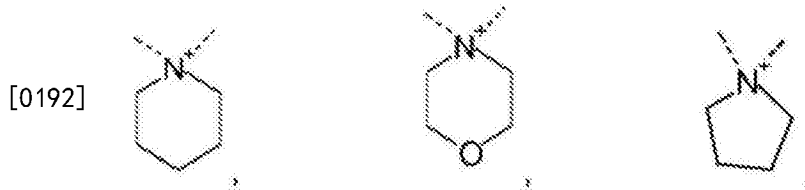
**(II)**

[0188] 其中

[0189] n选自2和3;

[0190] R¹, R²和R³彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃,

[0191] 或者R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:

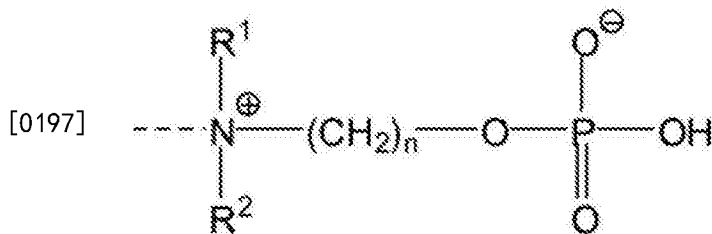


[0193] 和

[0194] R³选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 和优选-H;

[0195] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

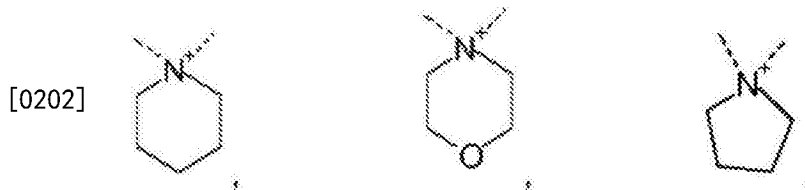
[0196] 因此本发明同样涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途, 其中亲和色谱式移除CRP通过CRP与用ω-膦酰基氧基烷基铵基和/或用ω-铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料(Ca²⁺-依赖性)结合而进行, 其中ω-膦酰基氧基烷基铵基具有下述通式(I)

**(I)**

[0199] 其中

[0200] n选自2和3;

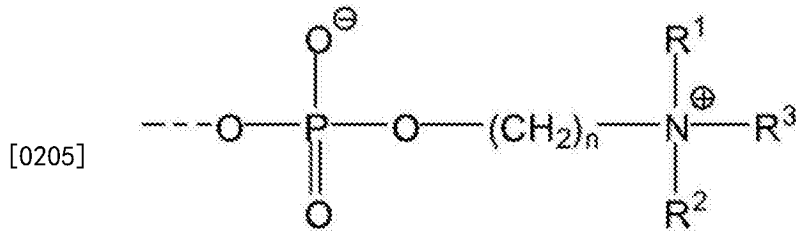
[0201] R¹和R²彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 或者R¹和R²与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0203] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0204] 本发明也指向柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途, 其中亲和

色谱式移除CRP通过CRP与用 ω -磷酸基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酸基氧基官能化的柱材料(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行,其中 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酸基氧基具有下述通式(II)



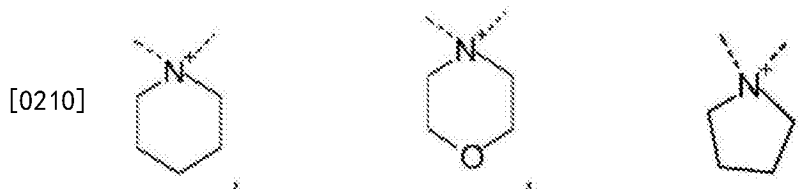
(II)

[0206] 其中

[0207] n选自2和3;

[0208] R^1, R^2 和 R^3 彼此独立地选自: -H, - CH_3 , - C_2H_5 , - C_3H_7 , - C_4H_9 , - C_5H_{11} , - C_6H_{13} ,

[0209] 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:

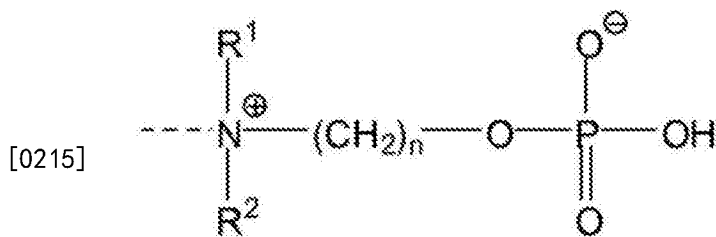


[0211] 和

[0212] R^3 选自: -H, - CH_3 , - C_2H_5 , - C_3H_7 , - C_4H_9 , - C_5H_{11} , - C_6H_{13} , 和优选-H;

[0213] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0214] 因此本发明同样涉及柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其中亲和色谱式移除CRP通过CRP与用 ω -磷酸基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-磷酸基氧基官能化的柱材料(Ca^{2+} -依赖性)结合而进行,其中 ω -磷酸基氧基烷基铵基具有下述通式(I)

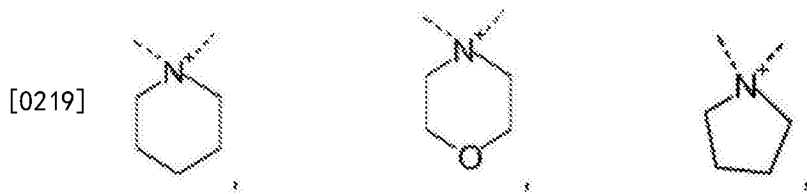


(I)

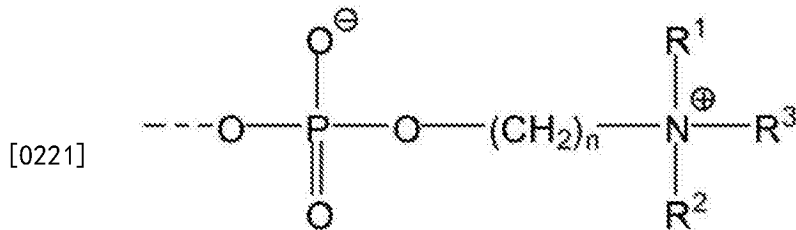
[0216] 其中

[0217] n选自2和3;

[0218] R^1 和 R^2 彼此独立地选自: -H, - CH_3 , - C_2H_5 , - C_3H_7 , - C_4H_9 , - C_5H_{11} , - C_6H_{13} , 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0220] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换;和其中 ω -铵烷基-羟基-磷酸基氧基具有下述通式 (II)



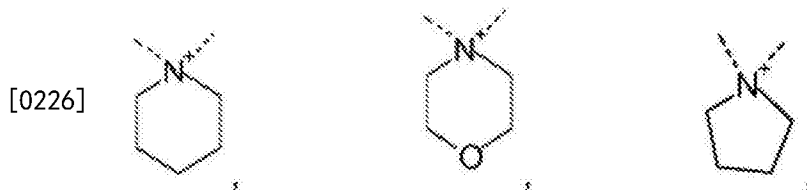
(II)

[0222] 其中

[0223] n选自2和3;

[0224] R^1, R^2 和 R^3 彼此独立地选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃,

[0225] 或者 R^1 和 R^2 与它们与之结合的氮原子一起能够形成选自下述的杂环:



[0227] 和

[0228] R选自: -H, -CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇, -C₄H₉, -C₅H₁₁, -C₆H₁₃, 和优选-H;

[0229] 其中一个或多个氢原子能够被氟原子替换。

[0230] 在本发明的可能实施方式中, ω -铵烷基-羟基-磷酸基氧基通过磷酸酯键与甘油分子(有机连接体)的羟基联接, 其中所产生的甘油酯然后通过甘油的第二羟基与柱材料联接。在这样的实施方式中还可能的是, 甘油的剩余的第三羟基与脂肪酸酯化或与第二 ω -铵烷基-羟基-磷酸基氧基酯化。此外甘油分子上的各酯化位置能够变化。能够用作脂肪酸的是通常饱和的、单烯烃、多烯烃、单炔烃、不饱和的线性和/或支化的具有8至28个碳原子的脂肪酸。优选的脂肪酸残基是棕榈酸, 花生四烯酸, 氧代戊酸, 戊二酸, 环氧异前列烷和硬脂酸。

[0231] 柱材料

[0232] 原则上为了生产用 ω -磷酸基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基-羟基-磷酸基氧基官能化的柱材料适当的是全部惰性色谱材料或柱材料用作材料, 其特别地不与血液或血浆反应或者不改变或污染血液或血浆, 使得血液或血浆在与柱材料接触后不再能够注射给患者。因此, 本发明适当的柱材料包括但不限于: **Eupergit®**, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 聚砜(PS), 聚醚砜(PES), 聚芳基醚砜(PAES), 聚丙烯酸酯, 甲基丙烯酸酯, 甲基丙烯酸酯-树脂如聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)和聚(缩水甘油基甲基丙烯酸酯)(PGMA), 聚(羟基甲基丙烯酸

酯),聚苯乙烯(PS),聚四氟乙烯(PTFE),聚丙烯酰胺,聚丙烯醛,丙烯腈-丁二烯-苯乙烯(ABS),聚丙烯腈(PAN),聚氨酯(PU),**琼脂糖**[®],丙烯基-珠,琼脂糖,纤维素基质,聚乙二醇(PEG),海藻酸盐,角叉菜,壳多糖,淀粉,硝化纤维素,陶瓷基质,玻璃珠和/或固相-硅土或这些物质的混合物和/或衍生物。固相-硅土-基质能够包括几乎每种形式的具体硅土,包括无定形二氧化硅,如胶体硅土,硅胶,沉淀的硅土,和烟熏或热解硅土;微晶硅土如硅藻土;和结晶硅土如石英。硅土应该具有大约45至120目(对应约345 μ m至125 μ m)范围,优选大约45至60目(对应约345 μ m至212 μ m)范围的粒径。

[0233] 为了用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化经常使用已经“预官能化”(即提供化学基团)的柱材料,其然后反过来使得 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基的共价连接成为可能。

[0234] 柱材料的这种“预官能化”通过技术人员众所周知的方法实现(ChinJ Chem 2012, 30,2473;Polym Int 2013,62,991)。还可商购得到一些已经“预官能化的”柱材料,例如:**Toyopearl**[®]AF-环氧,**Toyopearl**[®]AF-氨基,**Toyopearl**[®]AF-三氟乙磺酰基,**TSKgel**[®]三氟乙磺酰基,环氧-活化**Sepharose**[®]6B(GE Healthcare Life Sciences),CNBr-活化**Sepharose**[®]4快流(GE Healthcare Life Sciences),ECH**Sepharose**[®]4B(GE Healthcare Life Sciences),NHS-活化**Sepharose**[®]4快流(GE Healthcare Life Sciences),终端乙烯基砒活化**Sepharose**[®]4快流(Affiland),醛**Separopore**[®](Agarose)4B,ECH**Separopore**[®](Agarose)4B(Separopore),Sterogene生物分离公司的琼脂糖,例如环氧-Ultraflow-4琼脂糖(Sterogene Bioseparations,Inc.),环氧-Ultraflow-6琼脂糖(Sterogene Bioseparations,Inc.),emp Biotech GmbH的琼脂糖,环氧-Ultraflow-4琼脂糖(emp Biotech GmbH),环氧-Ultraflow-6琼脂糖(emp Biotech GmbH),任何交联度的活化琼脂糖。

[0235] 为了从血液或血浆体外移除CRP特别适当的是根据本发明的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其用于在心脏骤停后复苏以及用于预防和/或治疗心血管疾病,其中心血管疾病特别是指心肌梗死(心肌梗塞),卒中和肺栓塞。为了从血液或血浆体外移除CRP同样适当的是根据本发明的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷基氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行,其用于预防和/或治疗免疫系统的过度反应,其中所述免疫系统的过度反应选自慢性炎症,移植排斥反应和变应性反应。根据本发明的柠檬酸溶液的用途因此特别适于从血液或血浆体外移除CRP,从而预防和/或治疗选自下组的慢性炎症:痛风,骨关节炎,多发性硬化症,慢性炎性肠道疾病如克罗恩病和溃疡性结肠炎,类风湿性关节炎,银屑病关节炎,重症肌无力,巴塞多氏病(Graves病),自身免疫性甲状腺炎如Hashimoto-甲状腺炎和Ord-甲状腺炎,寻常型银屑病,强直性脊柱炎(别赫捷列夫氏病),肺出血肾炎-综合征和特发性血小板减少性紫癜(ITP),红斑狼疮,硬皮病,舍格伦-综合征,韦格纳-肉芽肿(韦格纳病),多发性肌炎和皮炎。上述慢性炎症包括属于上位术语类风湿病的一些疾病,例如类风湿性关节炎,银屑病关节炎,重症肌无力,巴塞多氏病(Graves病),Hashimoto-甲

状腺炎,Ord-甲状腺炎,寻常型银屑病,强直性脊柱炎(别赫捷列夫氏病),肺出血肾炎-综合征和特发性血小板减少性紫癜(ITP),红斑狼疮,硬皮病,舍格伦-综合征,韦格纳-肉芽肿(韦格纳病),血管炎,风湿性多肌痛,多发性肌炎和皮炎。

[0236] 柠檬酸是良好的抗凝剂,原因在于其防止血小板聚合以及补体激活。在使用血浆离心机时其是特别重要的。这需要柠檬酸,否则则发生凝结。这通过肝素的纯抗凝作用是不可行的。此外柠檬酸在肝中于TCA循环中快速代谢。患者因此不额外全身抗凝。特别是在梗死患者的情况下很有意义,原因是他们在标准梗死治疗的范围中无论如何已经是强抗凝的(例如通过乙酰水杨酸,氯吡格雷)。额外的抗凝放大危急的出血风险。血浆离心机额外允许实现比膜(过滤器)基初级分离系统要小得多的血流。通常或期望的血浆流量为约30ml/分钟。膜初级分离系统为此需要约150-200ml/分钟的血流(效率为约17%)。血浆离心机满足 ≤ 60 ml/分钟血流(效率约87%)。较小的血流量特别是在具有较少潜力的老年患者等的情况下简单得多地实现。额外地,对于膜基初级分离系统通常需要创伤性很大的且对抗凝患者由于出血风险而危险的中央接触(例如导管),而在使用血浆离心机期间通过例如更大注射套管的周围接触(不带来出血问题)通常就已足够。

附图说明

[0237] 图1:显示纯化CRP的多个色谱过程的结果,其中以半对数表示CRP-消耗%与应用的基质体积。将CRP-浓度50mg/L的人血浆以1:5,1:10,1:20或1:50与柠檬酸溶液加入,将其施用至含0.5g APPC-偶合的环氧-Ultraflow-4琼脂糖(Sterogene)作为基质的色谱柱。不加柠檬酸的试样作为对照。柱过程在5,10,25,50,和75基质体积流量捕获于1mL级分中。随后确定级分中的CRP-浓度,根据CRP起始浓度(施用前)确定CRP-消耗%。数据点代表至少二个独立实验的平均值。

[0238] 图2:柱状图,其显示血浆中的CRP消耗量,其加和不加柠檬酸地通过用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行亲和色谱纯化。

[0239] 图3:显示血浆施用至其上的SDS-凝胶,其在不同的三天各自加和不加柠檬酸地通过用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行亲和色谱纯化。箭头标记C1q-条带。在来自加入ACD-A的血浆的洗脱液中,这些条带包含较少蛋白质。

实施例

[0240] 术语“基质体积”(也缩写为MV)如本文所用是指各亲和色谱中使用的柱材料体积。

[0241] 实施例1:添加柠檬酸溶液对从血浆亲和色谱纯化CRP的影响的比较研究

[0242] 作为原料首先将CRP-浓度约50mg/L的人血浆用35 μ m-过滤器过滤和必要时加入柠檬酸溶液(见下文)。

[0243] 亲和色谱的一般过程

[0244] 为了进行色谱使用低压-色谱系统(BioLogicTMLP系统,Bio-Rad,München德国,目录编号731-8300)、柱(Mobicol“Classic”,MoBiTecGmbH,**Göttingen**,德国,产品编号M1002)和35 μ M-过滤器(MoBiTecGmbH,产品编号M523515),其中填充0.5g APPC-偶合的琼脂糖(环氧-Ultraflow-4琼脂糖,Sterogene)作为柱材料(1.6mg APPC/mL),即具有

Sepharose-基质的柱材料,所述基质偶合了磷酸胆碱-衍生物p-氨基苯基磷酰胆碱(APPC)。将柱用3倍基质体积(MV)的洗涤缓冲液(0.1M Tris,0.2M NaCl,2mM CaCl₂,pH 8.0)平衡,抛弃流过物。

[0245] 随后,将试样施用至柱。通过柱下游的馏分收集器(BioFracTMFraction Collector,Bio-Rad,目录编号741-0002)将柱流过物分为各自1mL的级分。在5MV,10MV,25MV,50MV,75MV和100MV流量收集1mL-级分(也称为流过级分),而其余级分合并至所谓的“流过池”。

[0246] 在样品施加后随后将柱用25MV洗涤缓冲液洗涤。随后通过应用7.5MV洗脱缓冲液1(0.1M Tris 0.2M NaCl,2mM EDTA,pH 8.0)将柱结合的CRP洗脱。在此,于UV-吸收超过0.01才随后将洗脱液分馏并捕获。

[0247] 随后将5MV洗脱缓冲液2(甘氨酸缓冲液pH 2.8)用于柱的再生。在通过洗脱缓冲液1并未完全进行洗脱的情况下,在所述级分中还能够存在蛋白质和特别是CRP。为了CRP在洗脱缓冲液2的2.8酸性pH值不变性,向洗脱液添加中和缓冲液(3.5M Tris,pH 9.0)。最终将柱再用20MV洗涤缓冲液洗涤。

[0248] 过滤原料、流过池以及收集级分的CRP-含量通过竞争的和对人CRP特异性的免疫测试(参见例如实施例2)来进行确定。

[0249] 从原料中的平均CRP-浓度(也称为平均[CRP])出发,按照下述方程确定每个级分的百分比CRP-消耗。

[0250]

$$\text{CRP-消耗(按\%计)} = 100 - \left(\frac{\text{级分X中的平均[CRP]}}{\text{原料中的平均[CRP]}} \times 100 \right)$$

[0251] 因此能够根据级分(亦即柱流过物)中的CRP-浓度,考虑到同样确定的原料中的CRP-浓度,推导出CRP通过柱的保留。

[0252] 能够计算在柱上保留的总-CRP-量,其方式为从原料中的总-CRP-量减去流过池和各级分中的总-CRP-量。

[0253] 柠檬酸的影响

[0254] 为了研究柠檬酸对从生物液体例如血浆亲和色谱纯化CRP的影响,其通过用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-磷酰基氧基官能化的柱材料进行,以不同混合比例将柠檬酸溶液加入人血浆。所用的柠檬酸溶液组成如下:7.3g柠檬酸(无水)/升(即38mM柠檬酸),22.0g柠檬酸三钠二水合物/升(即74.8mM柠檬酸三钠二水合物),用水加至1L。柠檬酸溶液额外包含24.5g葡萄糖(一水合物)/升(即123.6mM葡萄糖一水合物)的实验提供相同的结果。

[0255] 在这方面研究了下述混合比例:

[0256] 1:50即1份柠檬酸溶液+49份血浆

[0257] 1:20即1份柠檬酸溶液+19份血浆

[0258] 1:10即1份柠檬酸溶液+9份血浆

[0259] 1:5即1份柠檬酸溶液+4份血浆

[0260] 不加柠檬酸的人血浆作为参考样本。向人血浆添加柠檬酸溶液在柱前用梯度混合器进行。

[0261] 对于参考样本(不加柠檬酸)以及对于各柠檬酸浓度进行二个独立的亲和色谱过程。

[0262] 结果

[0263] 在图1中可见,在参考测量(即无柠檬酸)的情况下发生从血液的有效CRP-消耗。在这方面,在样品施加至柱的初始阶段百分比消耗超过90%(参见5GV),然后在样品施加的额外进程降至不到50%。这样降低解释如下,随着持续的测试任务所用的柱结合越来越多的CRP,因此越来越饱和。

[0264] 然而,在1:50至1:5的混合比例令人惊讶地显示CRP-消耗,其对应参考条件下的消耗效能(同样参见图1)。因此完全出乎意料的是,本发明的柠檬酸溶液用于从生物液体亲和色谱式移除CRP的用途能够从血浆有效移除CRP,其借助用 ω -膦酰基氧基烷基铵基和/或用 ω -铵烷氧基-羟基-膦酰基氧基官能化的柱材料进行。

[0265] 实施例2:hu-CRP-ELISA用于测定试样中的CRP-浓度

[0266] 为了能够确定从生物液体例如血浆亲和色谱纯化CRP的有效性,通过免疫测试(ELISA,酶联免疫吸附测定法)进行对应试样的人CRP(hu-CRP)的浓度测定。

[0267] 为此首先将微量滴定板的凹槽用针对人CRP的抗体涂层,其方式为各凹槽分别含100 μ l来自家兔的多克隆抗-人CRP-抗体的溶液(Dako,Hamburg,德国;产品编号Q0329),以1:500稀释于涂层缓冲液(0.1MNaHCO₃)中,在室温温育1h。随后用至少250 μ l PBST(0.1% Tween20/PBS)洗涤四次。

[0268] 为了浓度测定如下使用不加调节的样品缓冲液(5mM EDTA/PBST)以及浓度300,200,100,50,30,15和8.3ng CRP/mL的标准系列(在样品缓冲液中)。对于标准系列,将商购可得的CRP-标准(人血清C-反应性蛋白质标准,162mg CRP/L;Dako,产品编号X0923)相应地用样品缓冲液稀释。

[0269] 此外,将具有高CRP-浓度的参考样本(人血清C-反应性蛋白质高对照;Dako,产品编号X0926)以1:600和1:1500用样品缓冲液稀释以及具有低CRP-浓度得到参考样本(人血清C-反应性蛋白质低对照;Dako,产品编号X0925)以1:250和1:1000用样品缓冲液稀释,并且用作ELISA的额外参考样本。将真正待测量的试样(亦即例如原料、流过池、流过级分)以各自三份稀释(在样品缓冲液中)施用至微量滴定板。

[0270] 微量滴定板每凹槽各自应用100 μ l,在室温和在搅动下于振动装置(600转/分钟)上温育1.5h,随后再用至少250 μ l PBST洗涤四次。

[0271] 为了检测随后在封闭液(1%酪蛋白,0.9%NaCl,0.001%硫柳汞)中添加过氧化物酶(POD)-标记的抗体(家兔-抗-huCRP-POD-共轭物,20 μ g/mL母液,1:1000稀释)以及来自家兔的竞争性多克隆抗-人CRP-抗体(Dako,产品编号Q0329,1:2000稀释)。再施用各100 μ l/凹槽,在室温和在搅动下于振动装置(600转/分钟)温育1.5h,后来再用至少250 μ lPBST洗涤四次。

[0272] 随后添加用于证明反应的底物。为此将3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,25mg/mL,在DMSO和EtOH中)的溶液以1:250稀释于底物缓冲液(0.01%H₂O₂/0.2M柠檬酸,pH 3.95),由此将各100 μ l移液入每个凹槽。在避光温育10至15分钟之后,通过添加50 μ l停止溶液/凹槽停止证明反应。随后进行光度法检测:通过借助微量滴定板-读取器(BioRad680XR,BioRad,München,德国)测定450nm的消光(参考655nm)。

[0273] 每个微量滴定板各自进行双重测定以消除仪器测量误差。此外每个测试手段重复三次,以提高结果的重现性。

[0274] 在初步测试中,能够排除所用的柠檬酸浓度对hu-CRP-ELISA可靠性的影响。

[0275] 自然在此应指出,也能够应用测定CRP的其它方法来确定待研究试样的CRP-浓度。

[0276] 实施例3:在柠檬酸情况下的CRP消耗

[0277] 将具有定义的CRP-浓度(38.8mg/L)的血浆分为各自12.5ml。一半在添加柠檬酸(酸柠檬酸葡萄糖溶液A(ACDA)-溶液,1:15稀释)的情况下通过亲和色谱柱(0.5ml基质体积,由琼脂糖和与之偶联的4-氨基苯基磷酸胆碱组成),另一半不加ACDA通过相同的柱。在单采血液成分术之前和之后确定CRP-含量。由此计算移除的CRP量。显示的是,在添加柠檬酸之后更多CRP在柱上结合并且被移除。结果显示在图2中。

[0278] 此外将洗脱物应用至SDS-凝胶上,其照片示于图3。在此显示的是,与不用柠檬酸溶液得到单采血液成分术相比,使用柠檬酸(ACDA)的单采血液成分术移除更少的补体(C1q)。

[0279] 发明人如下解释由于柠檬酸导致的柱容量增加,但不强求正确性。补体与CRP结合,后者与 ω -磷酸基氧基烷基铵基或 ω -铵烷氧基-羟基-磷酸基氧基结合。似乎的是,在柠檬酸存在下更少的补体被激活并且结合更少的C1q/C1r/C1s-复合物。在柱材料上直接或间接结合更少的C1q/C1r/C1s-复合物的情况下,也更少发生通过这些很大复合物的CRP-结合的空间阻碍。

[0280] 总之,向待纯化的生物液体添加柠檬酸溶液导致通过 ω -磷酸基氧基烷基铵基和/或 ω -铵烷氧基-羟基-磷酸基氧基官能化的柱材料的容量提高。此外,更少的补体被激活。在与肽配体比较的情况下,未观察到这种通过柠檬酸的容量增加。

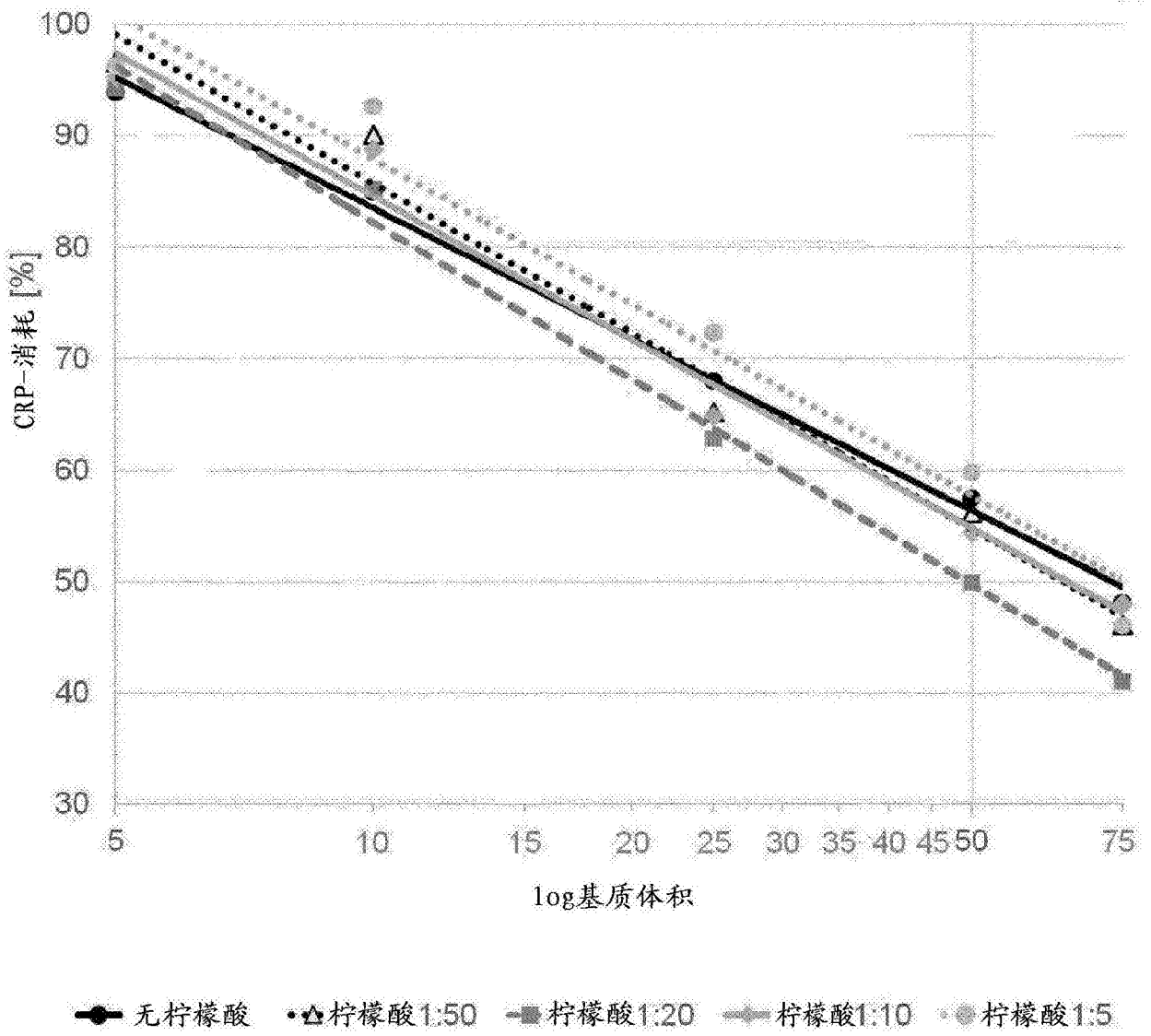


图1

加 (ACDA) 和不加 (对照)
柠檬酸的消耗效能对比

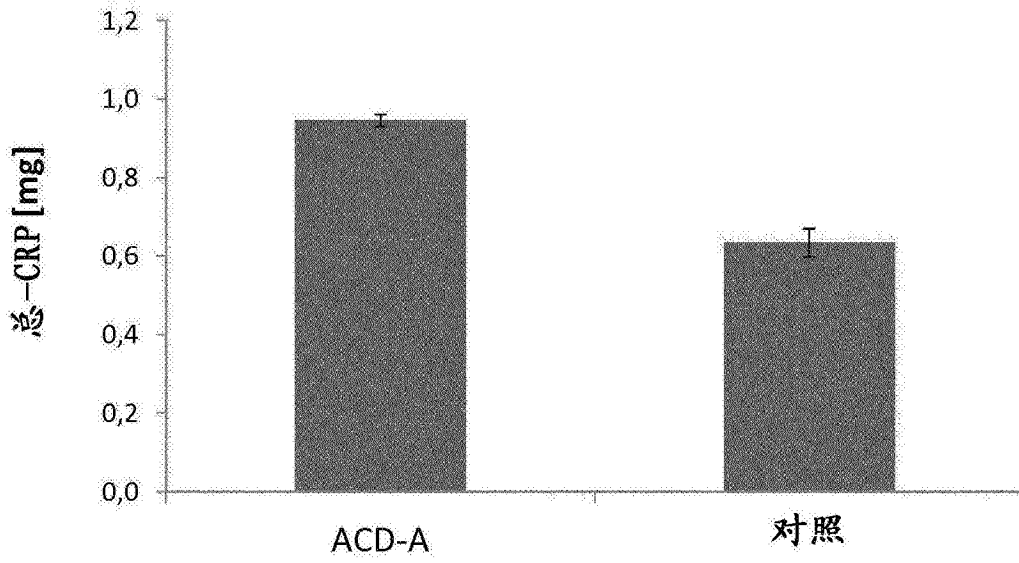


图2

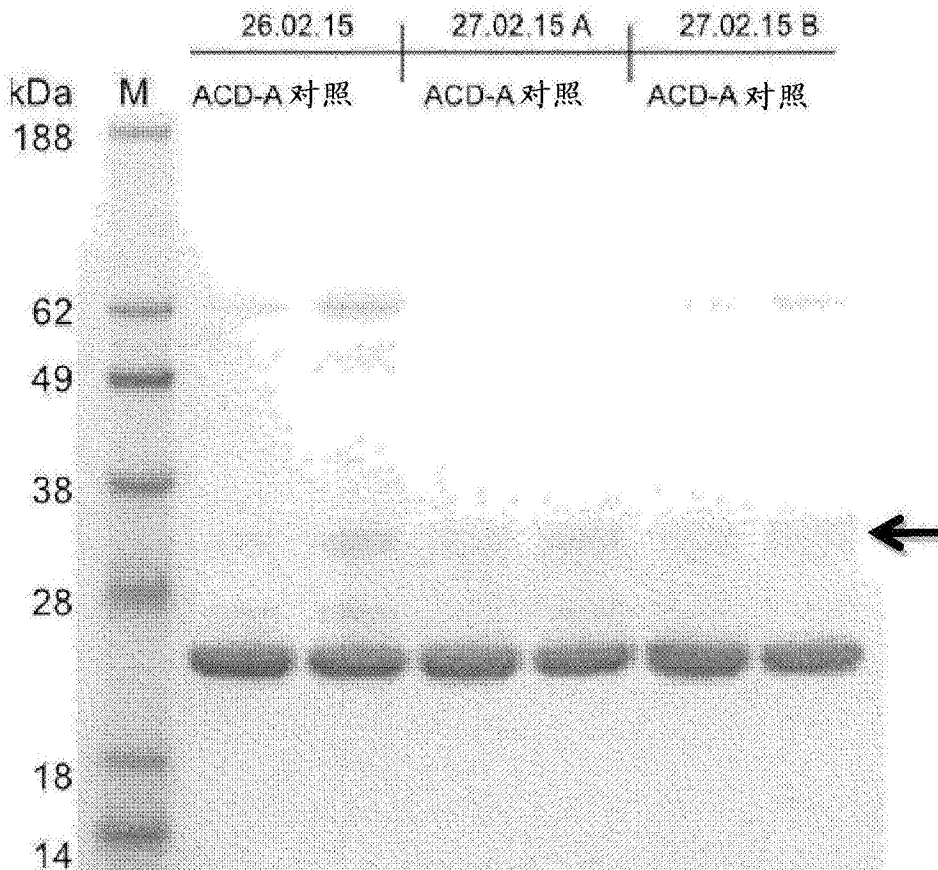


图3