



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 34 142 T2 2005.12.29

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 959 975 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 34 142.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK96/00399

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 930 037.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/010887

(86) PCT-Anmeldetag: 19.09.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 27.03.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.12.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 29.12.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29.12.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: B01D 15/08

C07D 251/54

(30) Unionspriorität:

9519197 20.09.1995 GB

(73) Patentinhaber:

Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, DK; Prometic  
Biosciences Ltd., Ballasalla, Isle, GB

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

LOWE, R., Christopher, Saffron Walden CB10  
2PW, GB; SPROULE, Kenneth, Cambridge CB3  
9NN, GB; LI, Rongxiu, Cambridge CB4 3LX, GB;  
STEWART, J., David, Huntingdon, US; PEARSON,  
C., James, Chesterton, Cambridge CB4 1DX, GB;  
BURTON, J., Steven, Cambridge CB3 7HP, GB

(54) Bezeichnung: NEUARTIGE AFFINITATSLIGANDEN UND IHRE VERWENDUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue Affinitätsliganden, deren Herstellung und Verknüpfung mit Matrizes, die aus festen, halbfesten, teilchenförmigen oder kolloidalen Materialien oder löslichen Polymeren bestehen können. Die Erfindung betrifft weiter diese neuen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate und die Herstellung und Verwendung derselben bei der Reinigung von proteinhaltigen Materialien, wie zum Beispiel Immunglobulinen, Insulinen, Faktor VII oder Human-Wachstumshormon oder Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen.

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Moderne Protein-Reinigungsprinzipien beruhen in großem Maß auf chromatographischen Trenntechniken, wie Gelpermeationschromatographie (GPC), Ionenaustauschchromatographie (IEC), Hydrophober Wechselwirkungchromatographie (HEC), Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie (RP-HPLC) und Affinitätschromatographie (AC). Diese Techniken werden leicht für die Reinigung von Peptiden und Proteinen im Labormaßstab angepasst, welche für Forschung und wissenschaftliche Experimente gedacht sind, was reine und biologisch aktive Substanzen zum Ergebnis hat. In den meisten Fällen wird der Verfahrenswirtschaftlichkeit, der Verfahrensvalidierung oder Cleaning in Place-Verfahren wenig oder kein Interesse entgegengebracht, da das Material nur selten für klinische Experimente verwendet wird und da die Arbeitskosten bei weitem die Kosten der Ausrüstung und Matrizes überschreiten.

**[0003]** Jedoch muss eine industrielle Downstream-Verarbeitung im großen Maßstab Faktoren wie Wirtschaftlichkeit, Robustheit der Matrizes und ein Cleaning in Place mit z.B. NaOH, Harnstoff oder Ethanol berücksichtigen. Heutzutage wird die Nachfrage für preiswerte und robuste Matrizes, die in 1 N NaOH, 7 M Harnstoff oder 80%-igem Vol/Vol. Ethanol stabil sind, von einer Anzahl von kommerziellen Lieferanten auf dem Gebiet der GPC, IEC, HIC und RP-HPLC befriedigt. Eine Kombination dieser Prinzipien hat viele Jahre lang beinahe reine Protein-Bulk-Substanzen Ergebnis gehabt, obwohl die Verwendung von extremen Puffern und vielen Reinigungsschritten schlechte Ausbeuten, erhöhte Kosten und eine fragliche Stabilität der Bulk-Präparate zum Ergebnis hatten.

**[0004]** Es wurde seit langem wahrgenommen, dass das Prinzip der Affinitätschromatographie auch für einen Betrieb im großen Maßstab angewendet werden könnte. Leider weisen Adsorbenzien, die mit natürlichen biologischen Liganden, wie monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, geschaffen werden, die Tendenz auf, teuer herzustellen zu sein, da die Liganden selbst häufig eine umfangreiche Reinigung erfordern, biologisch und chemisch labil sind und dazu neigen, schwierig unter Beibehaltung ihrer biologischen Aktivität zu immobilisieren zu sein. Deshalb gibt es seit langem einen Bedarf, die teuren chemischen und biologisch labilen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper durch weniger teure und robustere Liganden zu ersetzen, welche die Spezifität von Antikörpern nachahmen.

**[0005]** Die Affinitätschromatographie nimmt eine einzigartige Stelle in der Abtrenntechnologie ein, da das zu reinigende Protein selektiv und reversibel an die komplementäre bindende Substanz, wie ein Antikörper-Molekül, adsorbiert. Reinigungsfaktoren vom mehreren Tausendfachen mit hohen Ausbeuten werden häufig beobachtet, im Gegensatz zu den herkömmlichen Reinigungsverfahren, die Faktoren vom 5- bis 50-fachen anbieten. Die hohen Reinigungsfaktoren, die in der Affinitätschromatographie erhalten werden, verringern dramatisch die Anzahl der Reinigungsschritte im Downstream-Verfahren. Weiter macht es die sehr geringe nicht-spezifische Bindung, die in der Affinitätschromatographie beobachtet wird, möglich, ein gegebenes Protein aus komplexen biologischen Mischungen zu reinigen, um unkorrekt gefaltete Formen von nativen Molekülen abzutrennen und das Protein selbst aus großen Volumina von Gewebeextrakten und Fermentationskulturen spezifisch zu gewinnen.

**[0006]** Das Affinitätssorbens umfasst eine feste, gewöhnlich permeable Trägermatrix, an die ein geeigneter Ligand kovalent geknüpft ist und die in einer herkömmlichen Chromatographiesäule enthalten ist. Eine rohe Probe, welche das komplementäre Biopolymer enthält, wird unter Bedingungen über die Trägermatrix geleitet, welche die spezifische Bindungswechselwirkung mit dem immobilisierten Liganden fördern. Die Säule wird mit Puffer gewaschen, um nicht zurückgehaltene Moleküle zu entfernen, gefolgt von einem Elutionsschritt, in dem das Protein in seiner reinen Form eluiert wird. Ein typisches Affinitätsadsorbens basiert auf einem festen Träger, einem Abstandhalterarm und einem Liganden. Der feste Träger kann aus perlenförmiger Agarose mit einer offenen Porenstruktur hergestellt sein. Der Abstandhalterarm kann eine Proteinbindung fördern, indem er den Liganden zugänglicher macht. Die Länge und die Natur des Abstandhalterarms können vom Fachmann festgelegt werden. Der Ligand sollte selbst nach Immobilisierung eine spezifische und reversible Bindung an das

zu reinigende Protein zeigen. Zusätzlich zu Antikörpern sind eine Anzahl von Verbindungen, einschließlich enzymatischer Cofaktoren, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Concanavalin A, Lectin, Thiolen und Farbstoffen, als Affinitätsliganden verwendet worden.

**[0007]** Affinitätschromatographie ist in vielen Anwendungen verwendet worden. Eine umfassende Liste ist z.B. in "Affinity Chromatography A Practical Approach" von IRL Press, 1985, und "Affinity Chromatography, Principles and Methods" von Pharmacia Fine Chemicals 1979, angegeben.

**[0008]** Herkömmliche Substrat- oder Substratanalogon-Affinitätsliganden, insbesondere Farbstoffe, sind für die Reinigung von speziellen Enzymen oder Gruppen von Enzymen im großen Maßstab verwendet worden. (Scawen M. D. und Atkinson T. 1987, Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology, Hsg. Clonis Y. D. et al.; Macmillan Press, S. 51-85).

**[0009]** Die Farbstoff-Affinitätschromatographie hat im Laufe der Jahre wegen des relativ geringen Preises derartiger Matrices, ihrer Robustheit und ihrer Fähigkeit, NaOH, Harnstoff und Ethanol standzuhalten, viel Interesse auf sich gezogen. Einige der umfangreicher verwendeten Liganden in dieser Art Affinitätschromatographie sind eine Vielfalt von reaktiven Textil-Farbstoffen auf Triazin-Basis, die auf Agarose und anderen Trägern immobilisiert werden. Die Verwendung von Affinitätschromatographie auf immobilisierten Farbstoffen ist in einem Übersichtsartikel beschrieben worden (Lowe C. R. und Pearson J. C. 1984, Methods in Enzymology 105, S. 97-113). Selektive Wechselwirkungen mit der NAD<sup>+</sup>-Bindungsstelle von Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase wurden bei Farbstoff-Analoga von Cibacron Blue F3G-A gezeigt (Lowe C. R. et al. 1986; Journal of Chromatography 376, S. 121-130). Auf der Suche nach Trägern für eine nicht-kovalente Bindung von Interferon unter 1,3,5-Triazin-Derivaten von Dextran wurden Verbindungen mit einer Struktur ähnlich der von Cibacron Blue synthetisiert und mittels kovalenter (Ether)-Bindung an Dextran mit verschiedenem Molekulargewicht gebunden. Die erhaltenen Verbindungen mit hohem Molekulargewicht wurden biologischen Tests unterzogen, welche anzeigen, dass eine Verknüpfung mit Chinon-System in ihrem System ein unabdingbares, aber nicht ausreichendes Mittel für die Affinität zu Interferon ist (Mieczyslaw Konieczny et al. 1982, Arch. Immunol. Ther. Exp. 30 S. 1-9). Der selektive Reinigungsansatz wurde weiter durch die Computer-unterstützte Konstruktion eines neuen Affinitäts-Adsorbens veranschaulicht, welches das Phenyl-Arginin-Dipeptid-Substrat für die Reinigung von Schweinepankreas-Kallikrein nachahmt (Burton N. P. und Lowe C. R. 1992, Journal of Molecular Recognition 5, S. 55-58).

**[0010]** Das U.S. Patent Nr. 4,562,252 offenbart eine spezielle Ligandenstruktur, die aus zwei m-Aminophenylborsäure-Gruppen besteht, die für eine Glycoprotein-Abtrennung an einem Triazinring angebracht sind.

**[0011]** Jedoch besteht trotz des raschen Fortschritts in der Affinitätstechnologie in den letzten paar Jahren immer noch ein Bedarf, eine Technologie zu entwickeln, durch welche ein spezifischer nachahmender Ligand für ein Protein identifiziert werden kann, um eine preiswerte und stabile Affinitätssäule zu erzeugen, die zu einer wiederholten Reinigung des Proteins im großen Maßstab in der Lage ist, z.B. bei der Abtrennung und Reinigung von proteinhaltigen Materialien, wie Immunglobulinen, Insulinen, Faktor VII oder Human-Wachstums-Hormon oder Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen, ungeachtet, ob sie aus natürlichen oder rekombinanten Quellen abstammen.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue Affinitätsliganden, deren Herstellung und Verknüpfung mit Matrices und die Verwendung dieser neuen Affinitätsligand-Matrices bei der Reinigung von proteinhaltigen Materialien.

**[0013]** Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass die Selektivität von hydrophoben Liganden durch Erhöhung der Komplexität und räumlichen Geometrie der hydrophoben Komponente und die Einverleibung von verschiedenen funktionellen Gruppen, die an elektrostatischen und Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkungen teilhaben können, wodurch die selektiven Wechselwirkungen mit Protein-Bindungsstellen gefördert werden, erhöht werden kann. Diese Arbeit führte zu der Entdeckung einer generischen Gruppe von neuen Affinitätsliganden, von denen unerwartet gefunden wurde, dass sie allgemein für die Isolierung und Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie anwendbar sind.

**[0014]** Im Gegensatz zu dem oben erwähnten selektiven Ansatz, in dem Enzymsubstrate, Analoga derselben oder Substrat-Mimetika als Liganden verwendet wurden, sind die in dieser Anmeldung definierten Liganden gegen jede Oberfläche des Protein-Moleküls gerichtet, was das Prinzip für jedes Protein anwendbar macht.

Die Liganden werden durch Computer-Modellierungstechniken und/oder anhand einer Durchmusterung von Bibliotheken von nachahmenden Liganden konstruiert. Weiter weist die vorliegende Erfindung den Vorteil auf, dass die Struktur der Protein-Bindungsstellen-Architektur für die Konstruktion und Entwicklung des Liganden nicht erforderlich ist, und demgemäß weisen die hierin beschriebenen Materialien und Techniken eine signifikant größere Nützlichkeit auf.

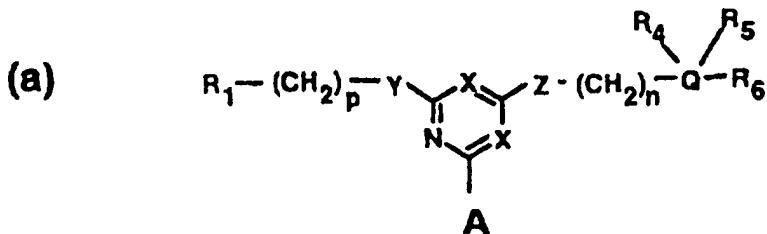
**[0015]** Ein Merkmal der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines allgemeinen Werkzeugs für die Proteinauf trennung, -isolierung und -reinigung. Es wurde eine Familie von subtil unterschiedlichen chemischen Strukturen synthetisiert, welche die Fähigkeit aufweisen, mit verschiedenen Proteinen wechselzuwirken. Eine besonders wirksame Ligandenstruktur für ein gegebenes Protein wird anhand einer Durchmusterung eines von der Erfindung bereitgestellten Bereichs von Liganden bezüglich geeigneter Bindungseigenschaften identifiziert.

**[0016]** Beispielsweise sind Affinitätsliganden mit hoher Selektivität und Spezifität, die derzeit für die Abtrennung und Reinigung von Immunglobulinen verfügbar sind, häufig proteinhaltige Materialien, die entweder von bakteriellen oder rekombinanten Quellen abstammen und Materialien wie Protein A, Protein G und Protein L einschließen. Die Immobilisierung dieser und ähnlicher Proteine hat häufig einen signifikanten Verlust an biologischer Aktivität zur Folge. Eine fortgesetzte und wiederholte Verwendung von immobilisierten Proteinen als Affinitätsmedien führt zu einer weiteren Verringerung der biologischen Aktivität. Weiter legt die inhärente Natur dieser biologischen Makromoleküle der Verwendung von Puffersalzen, organischen Lösungsmitteln und pH-Niveaus in der Affinitätschromatographie und verwandten Techniken strenge Beschränkungen auf.

**[0017]** Die neuen Affinitätsliganden, die von dieser Erfindung bereitgestellt werden, können anstelle von Protein A und Protein G verwendet werden und sind in ihrer Verwendung signifikant flexibler, sind robuster, weniger teuer herzustellen und bieten äquivalente Reinigungsgrade.

**[0018]** Ein weiteres Beispiel ist die Verwendung der durch diese Erfindung bereitgestellten neuen Affinitätsmatrizes in der Biotechnologie.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung betrifft Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die einen Liganden mit der allgemeinen Formel (a) umfassen:



in der

R<sub>1</sub> ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxyalkylgruppe, eine Cyclohexylgruppe, eine Aminogruppe, eine Phenylgruppe, Naphthylgruppe, 1-Phenylpyrazol-, Indazol-, Benzthiazolgruppe oder eine Benzimidazolgruppe darstellt, wobei der Benzol-, Naphthalin-, 1-Phenylpyrazol-, Indazol-, Benzthiazol- oder Benzimidazolring jeweils gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten substituiert ist, die unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylgruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkoxygruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Acyloxy- oder Acylaminogruppen, Aminogruppen, Hydroxylgruppen, Carbonsäuregruppen, Sulfonsäuregruppen, Carbamoylgruppen, Sulfamoylgruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylsulfonylgruppen oder Halogenatomen;

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe N-R<sub>2</sub> darstellt;

Z ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe N-R<sub>3</sub> darstellt;

R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxyalkylgruppe, eine Benzylgruppe oder eine β-Phenylethylgruppe darstellen;

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Acyloxy- oder Acylaminogruppe, eine Carbonsäuregruppe, eine Sulfonsäuregruppe, eine Carbamoyl- oder Sulfamoylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylsulfonylgruppe oder ein Halogenatom darstellen;

eines der Symbole X ein Stickstoffatom und das andere Symbol X ein Stickstoffatom oder ein Kohlenstoffatom

darstellt, dass ein Chloratom oder eine Cyanogruppe trägt;

Q einen Benzol-, Naphthalin-, Benzthiazol-, Benzoxazol-, 1-Phenylpyrazol-, Indazol- oder Benzimidazolring darstellt;

n eine ganze Zahl zwischen 0 und 6 ist;

p eine ganze Zahl zwischen 0 und 20 ist;

und

wobei der Ligand gegebenenfalls durch einen zwischen die Matrix und den Liganden eingeschobenen Abstandhalterarm in der Position A an eine Trägermatrix geknüpft ist,

mit der Maßgabe, dass die Formel (a) nicht die Reaktionsprodukte der Verbindungen 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3'-sulfonsäure, 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure und 4-Chlor-2-(4"-aminophenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure mit Dextran T500 umfasst.

**[0020]** Der fakultative Abstandhalterarm wird vorzugsweise durch die allgemeine Formel (b)

$-T-[-L-V-]_m-$  (b)

dargestellt, in der T ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe  $N-R_7$  darstellt; wobei  $R_7$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;

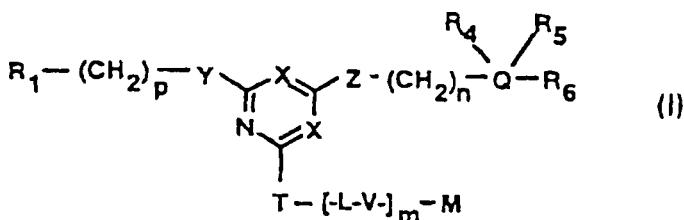
V ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe  $-COO-$ , eine Gruppe  $CONH$  oder eine Gruppe  $NHCO$  oder eine Gruppe  $-PO_3H-$ , eine Gruppe  $NH-Arylen-SO_2-CH_2CH_2$  oder eine Gruppe  $N-R_8$  darstellt; worin  $R_8$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;

L eine gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoff-Verknüpfung darstellt, die 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthält; und m für 0 oder 1 steht.

**[0021]** Bei der Trägermatrix kann es sich um jede Verbindung oder jedes Material, teilchenförmig oder nicht teilchenförmig, löslich oder unlöslich, porös oder nicht porös, handeln, das in Verbindung mit Affinitätsliganden verwendet werden kann, um ein Affinitätsligand-Matrix-Konjugat zu bilden, und das ein zweckmäßiges Mittel zur Abtrennung der Affinitätsliganden von gelösten Stoffen in einer Kontaktierungslösung bereitstellt.

**[0022]** Die vorliegende Erfindung stellt neue Affinitätsligand-Matrix-Konjugate bereit, wobei die Affinitätsligand-Matrix-Konjugate bei der Abtrennung und Reinigung von proteinhaltigen Materialien, wie Immunglobulinen, Insulinen, Faktor VII oder Human-Wachstumshormon oder Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen, verwendet werden können, ungeachtet, ob diese von natürlichen oder rekombinanten Quellen abstammen.

**[0023]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung neue Affinitätsligand-Matrix-Konjugate bereit, die durch die allgemeine Formel (I)



dargestellt werden, in der

$R_1$ , Y, Z,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ , X, Q, n und p die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen,

T ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe  $N-R_7$  darstellt;

V ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe  $-COO-$ , eine Gruppe  $CONH$  oder eine Gruppe  $NHCO$  oder eine Gruppe  $-PO_3H-$ , eine Gruppe  $NH-Arylen-SO_2-CH_2CH_2$  oder eine Gruppe  $N-R_8$  darstellt;

$R_7$  und  $R_8$  jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellen;

L eine gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoff-Verknüpfung darstellt, die 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthält;

m für 0 oder 1 steht; und

M den Rest einer Trägermatrix darstellt.

**[0024]** Der Ausdruck "1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe" bezeichnet, wie hierin allein oder in Kombination verwendet, eine gerade oder verzweigte gesättigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sek-Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, n-Pentyl, 2-Methyl-

butyl, 3-Methylbutyl, n-Hexyl, 4-Methylpentyl, Neopentyl, n-Hexyl und 2,2-Dimethylpropyl.

**[0025]** Der Ausdruck "1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxyalkylgruppe" bezeichnet, wie hierin allein oder in Kombination verwendet, eine gerade oder verzweigte gesättigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, die mit einer oder mehreren Hydroxygruppen, vorzugsweise einer Hydroxygruppe substituiert ist, wie Hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, 3-Hydroxypropyl, 2-Hydroxypropyl, 4-Hydroxybutyl, 5-Hydroxy-pentyl, 6-Hydroxyhexyl.

**[0026]** Der Ausdruck "1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkoxygruppe" bezeichnet, wie hierin allein oder in Kombination verwendet, einen geraden oder verzweigten einwertigen Substituenten, der eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe umfasst, die durch einen Ethersauerstoff verknüpft ist, wobei ihre freie Valenz vom Ethersauerstoff aus gebunden ist, und die 1 bis 6 Kohlenstoffatome aufweist, z.B. Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isoproxy, Butoxy, Pentoxy.

**[0027]** Der Ausdruck "Halogen" bedeutet Fluor, Chlor, Brom oder Iod.

**[0028]** Der Ausdruck "1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltendes Acyloxy oder Acylamino" bezeichnet, wie hierin verwendet, einen einwertigen Substituenten, der eine 1 bis 5 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe umfasst, die durch eine Carboxyloxy- oder Oxy carbonylgruppe verknüpft ist, wie eine Methylcarboxyloxy-, Ethylcarboxyloxy-, Methyloxycarbonyl- oder Ethyloxycarbonylgruppe, oder durch eine Carbonylamino- oder Amino-carbonylgruppe verknüpft ist, wie eine Methylcarbonylamino-, Ethylcarbonylamino-, Methylaminocarbonyl- oder Ethylaminocarbonylgruppe.

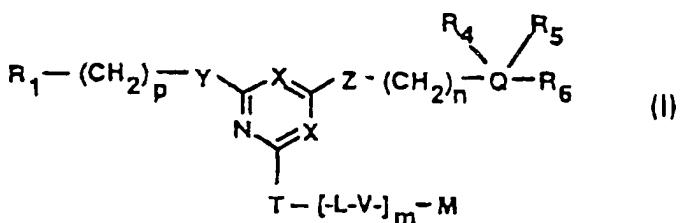
**[0029]** Der Ausdruck "1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltendes Alkylsulfonyl" bezeichnet, wie hierin verwendet, einen einwertigen Substituenten, der eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe umfasst, die durch eine Sulfonylgruppe verknüpft ist, wie z.B. Methylsulfonyl, Ethylsulfonyl, n-Propylsulfonyl, Isopropylsulfonyl, n-Butylsulfonyl, sek-Butylsulfonyl, Isobutylsulfonyl, tert-Butylsulfonyl, n-Pentylsulfonyl, 2-Methylbutylsulfonyl, 3-Methylbutylsulfonyl, n-Hexylsulfonyl, 4-Methylpentylsulfonyl, Neopentylsulfonyl, n-Hexylsulfonyl und 2,2-Dimethylpropylsulfonyl.

**[0030]** Der Ausdruck "ein oder mehrere Substituenten, die unabhängig ausgewählt sind aus" soll bevorzugter 1-3 Substituenten bezeichnen. Der Ausdruck soll weiter bevorzugt 1-2 Substituenten bezeichnen und am bevorzugtesten einen Substituenten bezeichnen.

**[0031]** Wann immer in der vorliegenden Beschreibung der Ausdruck Insulin im Plural oder im generischen Sinn verwendet wird, ist beabsichtigt, dass sowohl natürlich vorkommende Insuline als auch Insulin-Analoga und Derivate derselben und Vorstufen umfasst werden. Mit dem Ausdruck Insulin ist auch Insulin von jeder Art gemeint, z.B. Human-Insulin. Mit dem Ausdruck "Insulin-Analogon", wie hierin verwendet, ist Human-Insulin mit einer oder mehreren Aminosäure-Substitutionen, einer oder mehreren Aminosäure-Deletionen, einer oder mehreren Aminosäure-Additionen oder Kombinationen derselben gemeint. Der Ausdruck "Insulin-Derivat" bedeutet Insulin, das chemisch in einem oder mehreren Resten modifiziert ist. Mit "Insulin-Vorstufe", wie hierin verwendet, ist jedes Molekül gemeint, welches durch enzymatische oder chemische Umwandlung die Bildung von Insulin, Insulin-Fragmenten, z.B. Des-Thr(B30)-Insulin, Insulin-Analoga oder Insulin-Derivaten zum Ergebnis hat.

**[0032]** Der Ausdruck "gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoff-Verknüpfung, die 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthält" bezeichnet, wie hierin verwendet, eine oder mehrere lineare oder verzweigte Alkylketten, die gegebenenfalls beispielsweise mit Hydroxy- oder 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkoxygruppen substituiert sind und gegebenenfalls durch Amino-, Ether-, Thioether-, Ester-, Amid- oder Sulfonamid-Bindungen verknüpft sind, was eine Kette bereitstellt, die 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthält. Die Konstruktion ist bevorzugt flexibel. Die Konstruktion derartiger gegebenenfalls substituierter Kohlenwasserstoff-Verknüpfungen ist zum Beispiel in Lowe, C. R. und Dean, P. D. G., 1974, Affinity Chromatography, John Wiley & Sons, London, beschrieben, was hierdurch durch Bezugnahme aufgenommen wird.

**[0033]** In einer bevorzugten Ausführungsform werden diese Konjugate durch die allgemeine Formel (I) dargestellt:



in der

R<sub>1</sub> ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome Hydroxalkylgruppe, eine Cyclohexylgruppe, eine Aminogruppe, eine Phenylgruppe oder eine Naphthylgruppe, die am Benzol- oder Naphthalinring durch 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppen substituiert sein kann, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkoxygruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Acyloxy- oder Acylaminogruppen, Aminogruppen, Hydroxylgruppen, Carbonsäuregruppen, Sulfonsäuregruppen, Carbamoylgruppen, Sulfamoylgruppen, Alkylsulfonylgruppen oder Halogenatome darstellt:

T ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe  $N-R_2$  darstellt:

Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe N-R<sub>7</sub> darstellt, Y ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe N-R<sub>7</sub> darstellt:

Z ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine Gruppe N-R<sub>3</sub> darstellt; R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxalkylgruppe, eine Benzylgruppe oder eine  $\beta$ -Phenethylgruppe darstellen:

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Acyloxy- oder Acylaminogruppe, eine Carbonsäuregruppe, eine Sulfonsäuregruppe, eine Carbamoyl- oder Sulfamoylgruppe, eine Alkylsulfonylgruppe oder ein Halogenatom darstellen; eines der Symbole X ein Stickstoffatom darstellt und das andere Symbol X ein Stickstoffatom oder ein Kohlenstoffatom darstellt, das ein Chloratom oder eine Cyanogruppe trägt; V ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine Gruppe -COO-, eine Gruppe CONH oder eine Gruppe NHCO oder eine Gruppe -PO<sub>3</sub>H-, eine Gruppe NH-Arylen-SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> oder eine Gruppe N-R<sub>8</sub> darstellt;

$R_7$  und  $R_8$  jeweils unabhängig ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellen:

L eine gegebenenfalls substituierte Kohlenwasserstoff-Verknüpfung darstellt, die 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthält:

enthalt, Q einen Benzol- oder Naphthalinring darstellt:

Q einen Benzol- oder Naphthalinring dar, n eine ganze Zahl zwischen 0 und 6 ist:

p eine ganze Zahl zwischen 0 und 20 ist:

„p“ eine ganze Zahl zwischen 0 und 1 steht: und

M für 0 oder 1 steht, und M den Rest einer Trägermatrix darstellt, bei der es sich um jede Verbindung oder jedes Material, teilchenförmig oder nicht teilchenförmig, löslich oder unlöslich, porös oder nicht porös, handeln kann, welche bzw. welches in Verbindung mit Affinitätsliganden verwendet werden kann, um ein neues Affinitätsligand-Matrix-Konjugat der allgemeinen Formel (I) zu bilden, und welches ein zweckmäßiges Mittel zur Abtrennung der Affinitätsliganden von löslichen Stoffen in einer Kontaktierungslösung bereitstellt.

**[0034]** Man erkennt, dass diese Erfindung unter anderem die Verwendung von Verbindungen betrifft, die Pyridine, Diazine oder Triazine sind, welche einen Substituenten  $T-[L-V]_{0-1}-M$  oder die Vorstufe desselben und andere Substituenten tragen, die über ein Heteroatom an den Ring geknüpft sind. Derartige Substituenten können eine nicht-störende Gruppe einschließen, die 0 bis 10 oder 20 C-Atome umfasst.

**[0035]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>1</sub> eine Phenyl- oder Naphthylgruppe dar, die jeweils gegebenenfalls am Benzol- oder Naphthalinring mit einem oder mehreren Substituenten substituiert ist, die unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Hydroxylgruppen oder Carbonsäuregruppen

[0036] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom dar.

[0037] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom dar.

**[0038]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe dar.

[0039] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt  $R_5$  ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe dar.

[0040] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>6</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe dar.

[0041] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt R<sub>7</sub> ein Wasserstoffatom dar.

[0042] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt T ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe dar.

[0043] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt Y N-R<sub>2</sub> dar, worin R<sub>2</sub> wie oben definiert ist.

[0044] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt Z N-R<sub>3</sub> dar, worin R<sub>3</sub> wie oben definiert ist.

[0045] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellen beide X ein Stickstoffatom dar.

[0046] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt Q einen Benzol- oder Naphthalinring dar.

[0047] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt n 0 oder 2 dar.

[0048] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt p 0 oder 2 dar.

[0049] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt m 0 oder 1 dar.

[0050] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt L eine Ethyl-, Propyl-, Hydroxypropyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Octyl- oder Decylgruppe dar und sind V und m wie oben definiert.

[0051] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt V ein Sauerstoffatom, eine Gruppe -COO-, eine Gruppe -PO<sub>3</sub>H- oder eine Gruppe N-R<sub>8</sub> und bevorzugter ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe dar und sind L und m wie oben definiert.

[0052] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt m 1 dar und sind L und V wie definiert.

[0053] Der Ausdruck "ganze Zahl zwischen x und y" kann die Werte x (einschließlich 0) und y einschließen.

[0054] Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Herstellung der neuen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate gemäß der Erfindung bereit, welches umfasst, dass man in irgendeiner Reihenfolge eine halogenheterocyclische Verbindung der allgemeinen Formel (II)

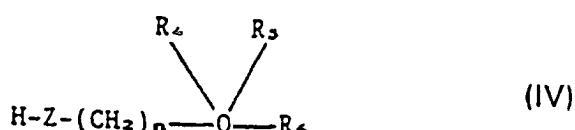


in der die Symbole X die vorstehend angegebene Bedeutung aufweisen und W ein Halogenatom darstellt, mit  
(i) einer Verbindung der allgemeinen Formel (III):



in der die Symbole R<sub>1</sub>, Y und p die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen und H für Wasserstoff steht,

(ii) einer Verbindung der allgemeinen Formel (IV)



in der die Symbole R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, Q, Z und n die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen, und

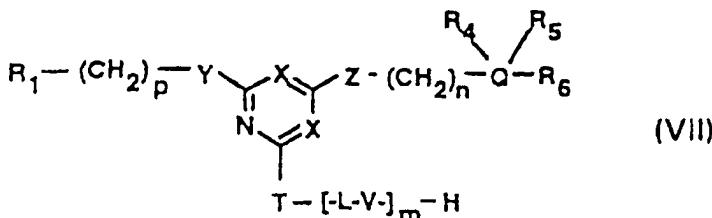
(iii) mit entweder einer gegebenenfalls derivatisierten Trägermatrix der allgemeinen Formel V



in der die Symbole L, M, V, T und m die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen, oder mit einer Verknüpfungseinheit der allgemeinen Formel (VI)



in der die Symbole H, L, V und T die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen, umsetzt, was eine Verbindung der allgemeinen Formel (VII) ergibt:



in der  $R_1, R_4, R_5, R_6, Q, L, T, V, X, Y, Z, m, n$  und  $p$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen; die Verbindung der allgemeinen Formel (VII) wird dann weiter mit einer Trägermatrix, deren Rest durch  $M$  dargestellt wird, unter Verwendung von dem Fachmann wohlbekannten Aktivierungs- und Kupplungsverfahren umgesetzt.

**[0055]** Als Beispiele für halogenheterocyclische Verbindungen der allgemeinen Formel (II) können 5-Chlor-2,4,6-trifluorpyrimidin, 5-Cyano-2,4,6-trichlorpyrimidin, Cyanurfluorid, Cyanurbromid und vor allem Cyanurchlorid erwähnt werden.

**[0056]** Als Beispiele für Verbindungen der allgemeinen Formel (III) können Amine, wie Ammoniak, Methylamin, Ethylamin, Propylamin, Isopropylamin, Diisopropylamin, Isobutylamin, Amylamin, Hexylamin, Ethanolamin, Diethanolamin, Anilin, N-Methylanilin, N-Ethylanilin, N-Isopropylanilin, 1,4-Diaminobutan, 1,6-Diaminoheptan, N-tert-Butylanilin, p-Toluidin, p-Butylanilin, 2,4-Dimethylanilin, p-Anisidin, p-Ethoxyanilin, p-Aminoacetanilid, p-Aminophenol, p-Chloranilin, Orthoanilinsäure, Metaanilinsäure, Sulfanilinsäure, 4-Methylanilin-2-sulfonsäure, 4-Methoxyanilin-2-sulfonsäure, Anilin-2,5-disulfonsäure, N-Methylmethylanilinsäure, o-, m- und p-Aminobenzoësäure, p-Aminobenzamid, p-Aminobenzolsulfonamid, 1-Amino-2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-naphthol, 2-Amino-3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-naphthol, 5-, 6- und 7-Amino-1-naphthol-3-sulfonsäure, N-Benzylanilin, Benzylamin, 4-Methylbenzylamin, 4-Hydroxybenzylamin, 4-Methoxybenzylamin, 4-Acetoxybenzylamin, 4-Acetylaminobenzylamin, N-Methylbenzylamin,  $\beta$ -Phenylethylamin, N-Butylbenzylamin, N-Benzyl- $\beta$ -phenylethylamin, N-( $\beta$ -Hydroxyethyl)benzylamin, N-tert-Butylbenzylamin, N-Benzyltyramin und Tyramin; Phenole, wie Phenol, o-, m- und p-Cresol, Brenzkatechin, Resorcinol, Hydrochinon, p-Chlorphenol, 1-Naphthol und 2-Naphthol, 1-Naphthol-4-sulfonsäure, 2-Naphthol-6-sulfonsäure und 2-Hydroxy-3-naphthoësäure; Thiole, wie Ethylthiol, Thioglycolsäure, Thiophenol und Thio-p-cresol, und aromatische Heterocyclen, wie 5-Amino-1-phenolpyrazol, 6-Aminoindazol, 2-Aminobenzimidazol, 2-Aminobenzthiazol und 2-Amino-5-chlorbenzoxazol erwähnt werden.

**[0057]** Als Beispiele für Verbindungen der allgemeinen Formel (IV) können Amine, wie Anilin, N-Methylanilin, N-Ethylanilin, N-Isopropylanilin, N-tert-Butylanilin, p-Toluidin, p-Butylanilin, 2,4-Dimethylanilin, p-Anisidin, p-Ethoxyanilin, p-Aminoacetanilid, p-Aminophenol, p-Chloranilin, Orthoanilinsäure, Metaanilinsäure, Sulfanilinsäure, 4-Methylanilin-2-sulfonsäure, 4-Methoxyanilin-2-sulfonsäure, Anilin-2,5-disulfonsäure, N-Methylmetaanilinsäure, o-, m- und p-Aminobenzoësäure, 1-Amino-2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-naphthol, 2-Amino-3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-naphthol, 5-, 6- und 7-Amino-1-naphthol-3-sulfonsäure, p-Aminobenzamid, p-Aminobenzolsulfonamid, N-Benzylanilin, Benzylamin, 4-Methylbenzylamin, 4-Hydroxybenzylamin, 4-Methoxybenzylamin, 4-Acetoxybenzylamin, 4-Acetylaminobenzylamin, N-Methylbenzylamin,  $\beta$ -Phenylethylamin, N-Butylbenzylamin, N-Benzyl- $\beta$ -phenylethylamin, N-( $\beta$ -Hydroxyethyl)benzylamin, N-tert-Butylbenzylamin, N-Benzyltyramin und Tyramin; Phenole wie Phenol, o-, m- und p-Cresol, Brenzkatechin, Resorcinol, Hydrochinon, p-Chlorphenol, 1- und 2-Naphthol, 1-Naphthol-4-sulfonsäure, 2-Naphthol-6-sulfonsäure und 2-Hydroxy-3-naphthoësäure; Thiole, wie Thiophenol und Thio-p-cresol, und aromatische Heterocyclen, wie 5-Amino-1-phenolpyrazol, 6-Aminoindazol, 2-Aminobenzimidazol, 2-Aminobenzthiazol und 2-Amino-5-chlorbenzoxazol erwähnt werden.

**[0058]** Als Beispiele für Trägermatrizes, deren Rest durch M dargestellt wird, können unlösliche Trägermatrizes, wie ein natürlich vorkommendes Polymer, zum Beispiel ein Polypeptid oder Protein, wie vernetztes Albumin, dienen.

min, oder ein Polysaccharid, wie Agarose, Alginat, Carrageenan, Chitin, Cellulose, Dextran oder Stärke; synthetische Polymere, wie Polyacrylamid, Polystyrol, Polyacrolein, Polyvinylalkohol, Polymethylacrylat, Perfluorkohlenstoff; anorganische Verbindungen, wie Siliciumdioxid, Glas, Kieselgur, Aluminiumoxid, Eisenoxid oder andere Metalloxide, oder Copolymere, die aus irgendeiner Kombination von zwei oder mehr aus einem natürlich vorkommenden Polymer, synthetischen Polymer oder anorganischen Verbindungen bestehen, erwähnt werden. Ebenfalls eingeschlossen in die Definition von Trägermatrices, deren Rest durch M dargestellt wird, sind lösliche Trägermatrices, die Polymere wie Dextran, Polyethylenglycol, Polyvinylalkohol oder hydrolysierte Stärke umfassen und Affinitätsligand-Matrix-Konjugate zur Verwendung in der flüssigen Verteilung bereitstellen; oder Trägermatrices, die Verbindungen wie Perfluordecalin umfassen, welche Affinitätsligand-Matrix-Konjugate zur Verwendung bei der Bildung von Affinitätsemulsionen bereitstellen. Um jeden Zweifel zu vermeiden, ist eine Trägermatrix hierin als jede Verbindung oder jedes Material, ob teilchenförmig oder nicht teilchenförmig, löslich oder unlöslich, porös oder nicht porös, definiert, das verwendet werden kann, um ein neues Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß der Erfindung zu bilden, und das ein zweckmäßiges Mittel zur Abtrennung des Affinitätsliganden von löslichen Stoffen in einer Kontaktierungslösung bereitstellt.

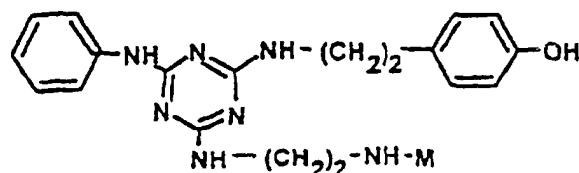
**[0059]** Ebenfalls eingeschlossen in die Definition von Trägermatrices, deren Rest durch M dargestellt wird, sind Trägermatrices wie Agarose, Cellulose, Dextran, Stärke, Alginat, Carrageenan, synthetische Polymere, Siliciumdioxid, Glas und Metalloxide, die durch Behandlung mit einem Aktivierungsmittel vor oder während der Anknüpfung des Liganden modifiziert worden sind oder modifiziert werden.

**[0060]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt M gegebenenfalls aktiviertes Agarose, Siliciumdioxid, Cellulose, Glas, Toyopearl, Hydroxyethylmethacrylat, Polyacrylamid, Styroldivinylbenzol, Hyper D, Perfluorkohlenstoffe dar.

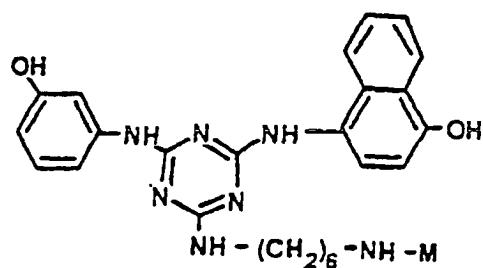
**[0061]** Bevorzugt stellt M gegebenenfalls Tresyl-aktivierte, Sulfonylchlorid-aktivierte, Tosyl-aktivierte, Vinylsulfon-aktivierte oder Epoxy-aktivierte Agarose dar.

**[0062]** Bevorzugte Affinitätsligand-Matrix-Konjugate gemäß der Erfindung sind

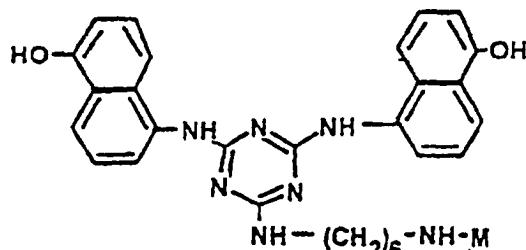
i)



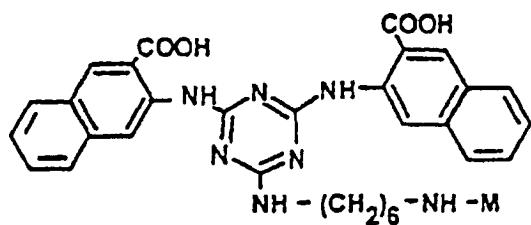
ii)



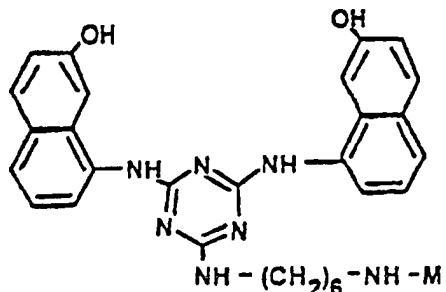
iii)



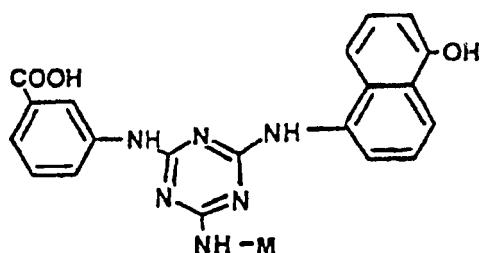
iv)



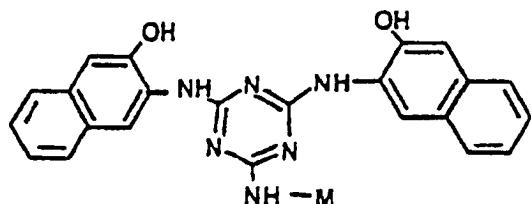
v)



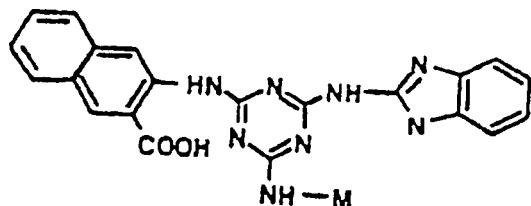
vi)



vii)



viii)



worin M wie oben definiert ist.

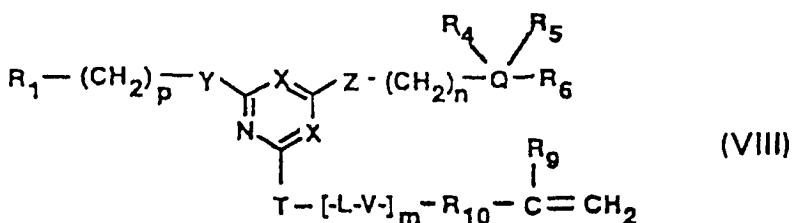
**[0063]** Es gibt eine beträchtliche Anzahl an Aktivierungsmitteln, die für den allgemeinen Zweck der Verknüpfung von Liganden mit Trägermatrices Verwendung gefunden haben. Diese Verbindungen und ihre Verwendungsverfahren sind dem Fachmann wohlbekannt, und da der Kernpunkt der vorliegenden Erfindung in der Natur des Liganden liegt, der mit der Matrix verknüpft wird, und nicht in der Verknüpfungsweise, dient irgendeines dieser Aktivierungsmittel für die Herstellung der neuen Matrix-Ligand-Konjugate der Erfindung. Als nicht-beschränkende Beispiele für derartige Aktivierungsmittel können so verschiedene Verbindungen wie Bromcyan, Cyanurchlorid, Epichlorhydrin, Divinylsulfon, p-Toluolsulfonylchlorid, 1,1'-Carbonyldiimidazol, Natriummetaperiodat, 2-Fluor-1-methylpyridiniumtoluol-4-sulfonat, Glycidoxypropyltrimethoxysilan und 2,2,2-Trifluorethansulfonylchlorid erwähnt werden. Wie oben angegeben, sind die Verfahren, durch welche derartige Aktivierungsschritte durchgeführt werden, dem Fachmann wohlbekannt.

**[0064]** Ähnlich kann eine große Vielfalt von Kondensationsmitteln verwendet werden, um die Verbindungen der allgemeinen Formel (VI) mit Trägermatrices wie Agarose, Cellulose, Dextran, Stärke, Alginat, Carrageenan, Siliciumdioxid oder Glas zu verknüpfen. Wiederum sind diese Verbindungen und ihre Verwendungsverfahren dem Fachmann wohlbekannt, und da der Kernpunkt der vorliegenden Erfindung in der Natur des Liganden und nicht in der Verknüpfungsweise liegt, dient wiederum irgendeines dieser Kondensationsmittel für die Herstellung der neuen Matrix-Ligand-Konjugate der Erfindung. Als nicht-beschränkende Beispiele für derartige Kondensationsmittel können N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin, Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid erwähnt werden.

**[0065]** Als Beispiele für Verknüpfungseinheiten der allgemeinen Formel (VI), die verwendet werden können, um Verbindungen der allgemeinen Formel (VII) zu erzeugen, können Diamine, wie Ethylendiamin, N,N'-Dimethyläthylendiamin, N-Ethylethylendiamin, N-( $\beta$ -Hydroxyethyl)ethylendiamin, Propylendiamin, N-Methylpropylendiamin, N-( $\beta$ -Hydroxyethyl)propylendiamin, 1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, 1,6-Diaminohexan, 1,7-Diaminoheptan, 1,8-Diaminooctan, 1,9-Diaminononan, 1,10-Diaminodecan, 1,12-Diaminododecan, Piperazin, 3-Hydroxy-1,5-diaminopentan, m- und p-Phenylendiamin, m- und p-Aminobenzylamin; Aminoalkohole, wie Ethanolamin, N-Methylethanolamin, N-Propylethanolamin, Diethanolamin, 3-Hydroxypropylamin, 2,3-Dihydroxypropylamin, Isopropanolamin, 5-Aminopentan-1-ol und 6-Aminohexan-1-ol; Aminophenole, wie o-, m- und p-Aminophenol, Aminocarbonsäuren, wie Glycin, N-Methylglycin, 3- und 4-Aminobuttersäure, 3-Aminoiso-buttersäure, 5-Aminovaleriansäure, 6-Aminocapronsäure, 7-Aminoheptansäure, n- und p-Aminobenzoësäure; Aminophosphonsäuren, wie n-Aminobenzolphosphonsäure und p-Aminobenzylphosphonsäure; und Aminoarylenvinylsulfon-Vorstufen, wie Anilin-3- $\beta$ -sulfatoethylsulfon und Anilin-4- $\beta$ -sulfatoethylsulfon, erwähnt werden.

**[0066]** Die Umsetzung von halogenheterocyclischen Verbindungen der allgemeinen Formel (II) mit Verbindungen der allgemeinen Formeln (III), (IV) und (V) oder (VI) kann in einem organischen Lösungsmittel, das mit Wasser nicht mischbar ist; oder in einem organischen Lösungsmittel, das mit Wasser mischbar ist, oder in einer Mischung von Wasser und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel durchgeführt werden. Beispiele für geeignete organische Lösungsmittel, die nicht mit Wasser mischbar sind, sind Toluol, Xylol oder Chlorbenzol; Beispiele für geeignete organische Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar sind, sind Aceton, Methylethylketon oder Dioxan. Die erste Reaktion der halogenheterocyclischen Verbindung kann bei Temperaturen zwischen 0°C und 25°C, idealerweise zwischen 0°C und 5°C durchgeführt werden; die zweite Reaktion kann bei Temperaturen zwischen 20°C und 50°C, idealerweise zwischen 30°C und 45°C durchgeführt werden, und die dritte Reaktion bei Temperaturen zwischen 20°C und 100°C. Während derartiger Reaktionen wird die anorganische Säure, wie Chlorwasserstoffsäure oder Fluorwasserstoffsäure, die erzeugt wird, durch die Verwendung eines Säure-bindenden Mittels, wie Natriumhydroxid, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Calciumhydroxid oder Calciumcarbonat, neutralisiert.

**[0067]** Zusätzlich können Verbindungen der allgemeinen Formel (VII) mit einem reaktiven polymerisierbaren Monomer unter Bildung einer polymerisierbaren Verbindung der allgemeinen Formel (VIII) umgesetzt werden:

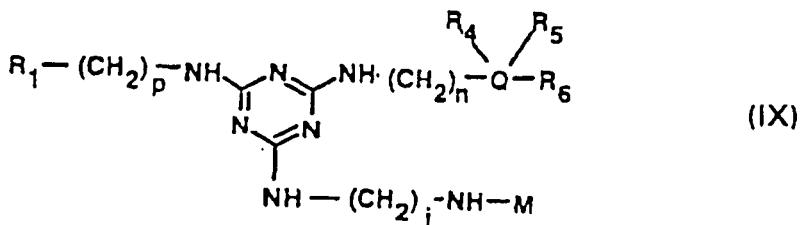


in der  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $Q$ ,  $L$ ,  $T$ ,  $V$ ,  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $m$ ,  $n$  und  $p$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen;  $R_9$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;  $R_{10}$  eine Carbonylgruppe, eine Methylengruppe, eine Gruppe  $-NH-CH_2-$  oder eine Gruppe  $-S-CH_2-$  darstellt. Beispiele für reaktive polymerisierbare Monomere schließen Acryloylchlorid, Methacryloylchlorid, Allylbromid, Allylamin oder 3,4-Epoxybuten ein. Polymerisierbare Verbindungen der allgemeinen Formel (VIII) können gegebenenfalls in Anwesenheit anderer polymerisierbarer Monomere unter Bildung von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten der allgemeinen Formel (I) polymerisiert werden. Derartige Polymerisationsverfahren sind dem Fachmann wohlbekannt.

**[0068]** Die Erfindung deckt weiter die Verwendung aller derartiger Affinitätsligand-Trägermatrizes bei der Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Quantifizierung, Identifikation und Charakterisierung von proteinhaltigen Materialien, wie Immunglobulinen, Insulinen, Faktor VII oder Human-Wachstumshormon oder Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen, ab.

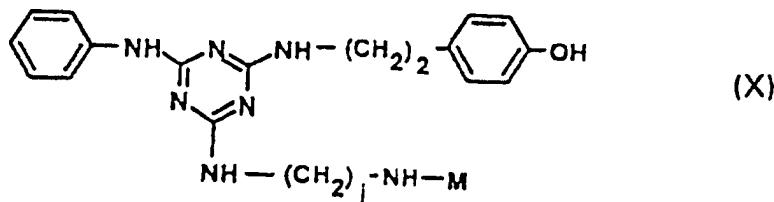
**[0069]** Immunglobuline sind eine Familie von Proteinen, häufig als Ig abgekürzt, die eine gemeinsame Struktur aufweisen. Immunglobuline sind auch kollektiv als Antikörper bekannt, und beide Wörter können verwendet werden, um diese Gruppe von Proteinen zu beschreiben. Immunglobuline liegen in einer Anzahl von verschiedenen Formen vor, wobei zum Beispiel die bedeutendsten Antikörper-Typen IgA, IgD, IgE, IgG, IgM und IgY und verschiedene Unterklassen derselben sind. Immunglobuline können in Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Aszites, Speichel, Milch oder Eigelb, vorkommen oder können unter Verwendung gentechnischer Methoden produziert werden. Immunglobuline können durch eine Vielfalt von Techniken abgeändert werden, um ihnen wünschenswerte Eigenschaften zu verleihen. Derartige Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt, und die resultierenden modifizierten Antikörper sind ebenfalls durch die Ansprüche dieser Erfindung eingeschlossen. Als nicht-beschränkende Beispiele für Antikörper-Modifikationstechniken können Antikörper-Fragmente, markierte Antikörper, Antikörper-Konjugate und Antikörper-Fusionsproteine durch chemische Modifikation, durch Behandlung mit einem oder mehreren Enzymen oder durch eine Kombination beider Techniken erhalten werden. Es gibt eine beträchtliche Anzahl an chemischen Modifikationsreagenzien und Enzymen, die bei der Antikörper-Modifikation Verwendung gefunden haben, und diese Verbindungen und ihre Verwendung sind dem Fachmann wohlbekannt. Eine weitere Weise des Erhalts von modifizierten oder neuen Antikörpern ist, sie unter Verwendung von gentechnischen Verfahren zu erzeugen. Derartige Verfahren und ihre Verwendung sind dem Fachmann wohlbekannt und können verwendet werden, um beispielsweise Antikörper-Fragmente oder Antikörper-Fusionsprodukte zu erzeugen. Modifizierte oder neue Antikörper, die aus gentechnischen Verfahren abstammen, werden ebenfalls von den Ansprüchen dieser Erfindung erfasst.

**[0070]** Eine wertvolle Gruppe von Affinitätsligand-Trägermatrizes wird durch die allgemeine Formel (IX) dargestellt:



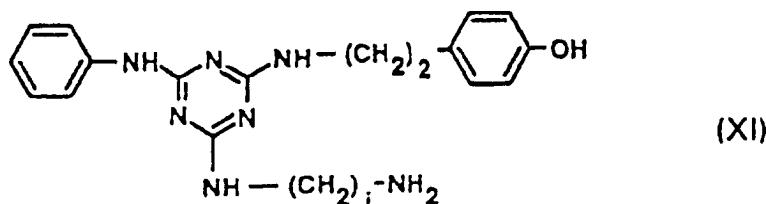
in der  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $M$ ,  $Q$ ,  $n$  und  $p$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen und  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

**[0071]** Eine besonders wertvolle Gruppe von Affinitätsligand-Trägermatrizes wird durch die allgemeine Formel (X) dargestellt:



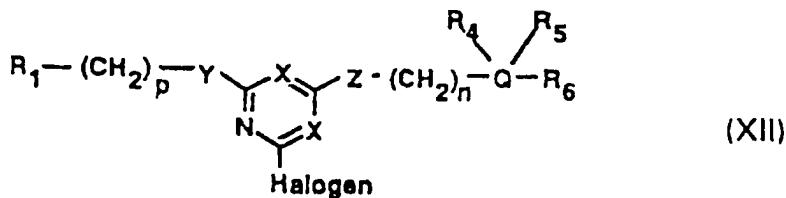
in der  $j$  und  $M$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen.

[0072] Typisch erzeugt die Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel (XI)



mit 3-Propoxy-(1,2-epoxy)-Agarose bei Temperaturen zwischen 10°C und 30°C in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels neue Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die von herausragendem Wert bei der Reinigung von proteinhaltigen Materialien sind. Diese neuen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate besitzen eine hohe Affinität zu der Immunglobulingeruppe der Proteine. Diese einzigartige Eigenschaft verleiht ihnen einen herausragenden Wert bei der Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Quantifizierung, Identifikation und Charakterisierung von Proteinen dieser Klasse.

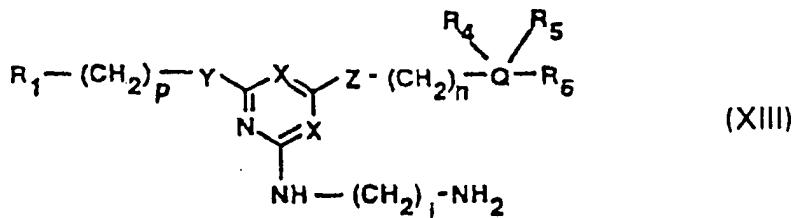
[0073] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XII):



in der  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen und Halogen ein Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatom darstellt.

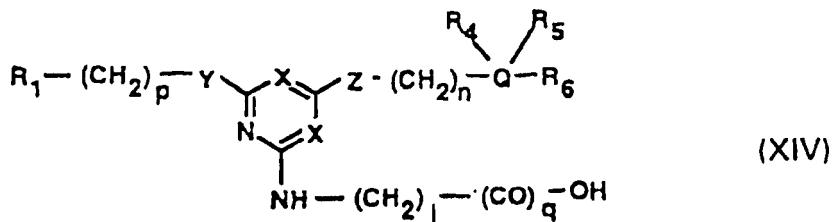
[0074] Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XII), wie vorstehend definiert, mit einer Matrix der allgemeinen Formel (V), wie vorstehend definiert, durch Umsetzung der neuen Affinitätsliganden mit der Matrix bei Temperaturen zwischen  $-20^\circ\text{C}$  und  $121^\circ\text{C}$  gegebenenfalls in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels.

[0075] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XIII):



in der  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen und  $\text{j}$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

[0076] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XIV):

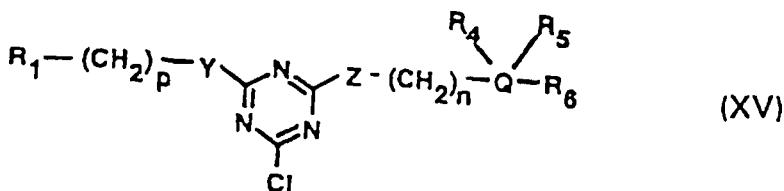


in der  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen,  $\text{q}$  für 0 oder 1 steht und  $\text{j}$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

[0077] Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von neuen Affinitätsliganden der vorstehenden allgemeinen Formel (XIV) durch Umsetzung einer Verbindung der vorstehenden allgemeinen Formel (XII) mit einer Aminohydroxy-Verbindung der allgemeinen Formel  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_j-(\text{CO})_q-\text{OH}$  bei Temperaturen zwischen  $0^\circ\text{C}$  und  $100^\circ\text{C}$  gegebenenfalls in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels.

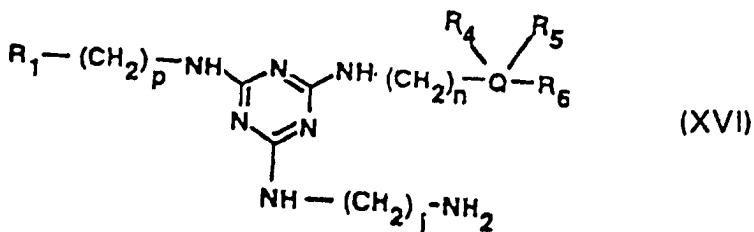
[0078] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der vorstehenden allgemeinen Formel (VIII), in der  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{L}$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{T}$ ,  $\text{V}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen;  $\text{R}_9$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;  $\text{R}_{10}$  eine Carbonylgruppe, eine Methylengruppe, eine Gruppe  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$  oder eine Gruppe  $-\text{S}-\text{CH}_2-$  darstellt; bevorzugt ist  $\text{L}$  eine Ethyl-, Butyl- oder Hexylgruppe, bevorzugt stellt  $\text{T}$  eine Gruppe  $-\text{NH}-$  dar, bevorzugt stellt  $\text{V}$  eine Gruppe  $-\text{NH}-$  dar und ist  $\text{m}$  bevorzugt 1.

[0079] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XV):



in der  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $Q$ ,  $n$  und  $p$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen.

**[0080]** In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XVI):



in der  $R_1$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $Q$ ,  $n$  und  $p$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen aufweisen und  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

**[0081]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen R<sub>1</sub> eine Phenyl- oder Naphthylgruppe darstellt, die jeweils gegebenenfalls am Benzol- oder Naphthalinring mit einem oder mehreren Substituenten substituiert ist, welche unabhängig aus Hydroxylgruppen oder Carbonsäuregruppen ausgewählt sind.

**[0082]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen  $R_4$  ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

**[0083]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen  $R_5$  ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

**[0084]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen  $R_6$  ein Wasserstoffatom, eine Hydroxylgruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

**[0085]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen Q einen Benzol- oder Naphthalinring darstellt.

**[0086]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV) und (VIII), in denen X ein Stickstoffatom darstellt.

**[0087]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV) und (VIII), in denen Y eine Gruppe -NH- darstellt.

**[0088]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV) und (VIII), in denen Z eine Gruppe -NH- darstellt.

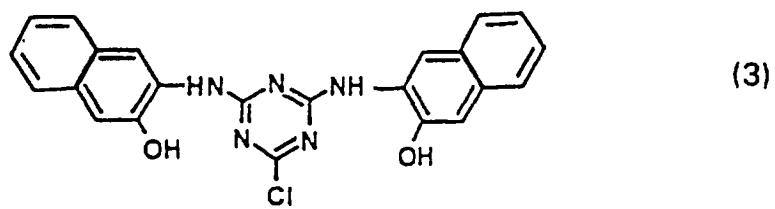
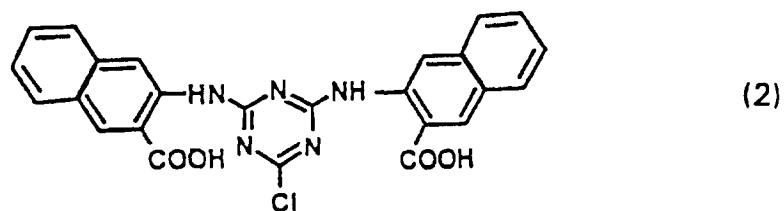
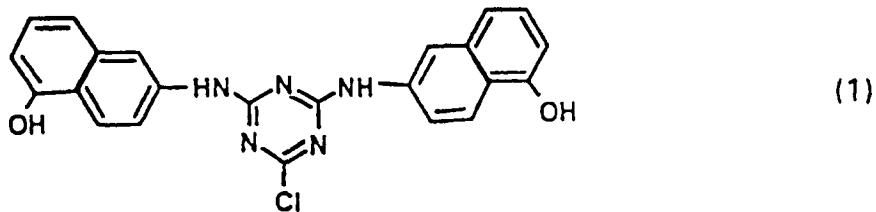
**[0089]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen  $n$  für 0 oder 2 steht.

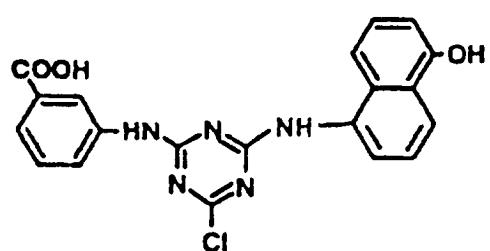
**[0090]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XII), (XIII), (XIV), (VIII), (XV) und (XVI), in denen  $p$  für 0 oder 2 steht.

**[0091]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XIII), (XIV) und (XVI), in denen  $i$  für 2, 4 oder 6 steht.

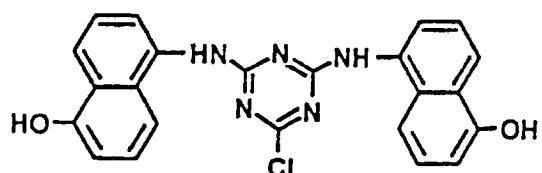
[0092] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Affinitätsliganden der vorstehenden allgemeinen Formel (XI), in der j eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

[0093] Bevorzugte Affinitätsliganden gemäß der Erfindung sind:

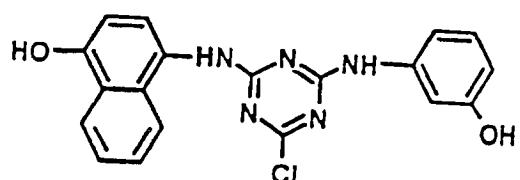




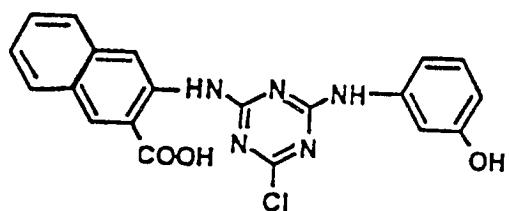
(4)



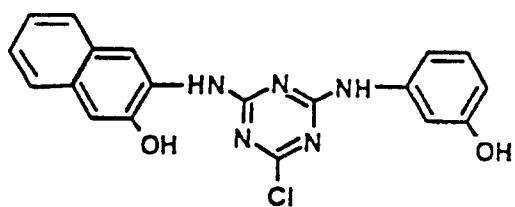
(5)



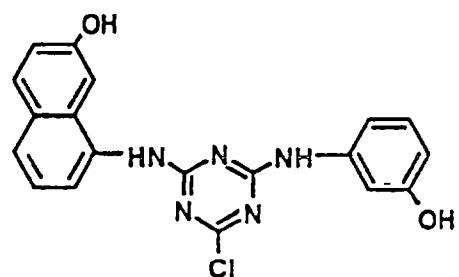
(6)



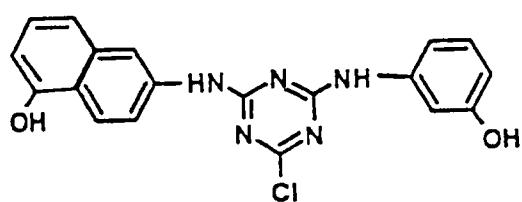
(7)



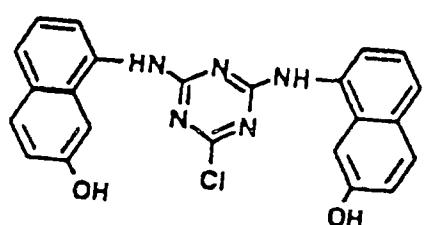
(8)



(9)

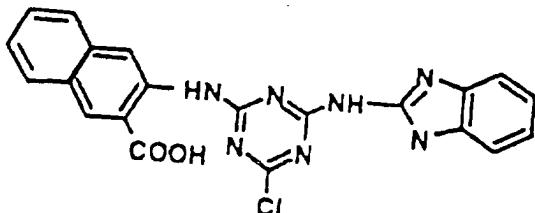
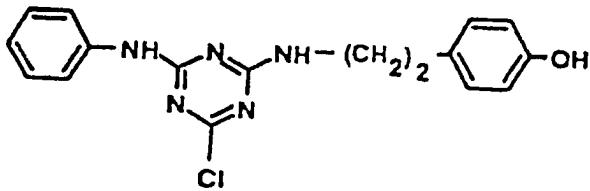


(10)



(11)

(12)



(13)

**[0094]** Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (VII), wie vorstehend definiert, (XIII), wie vorstehend definiert, (XVI), wie vorstehend definiert, und (XI), wie vorstehend definiert, mit einer Kohlenhydrat- oder organischen Polymer-Matrix durch Umsetzung der Kohlenhydrat- oder organischen Polymer-Matrix mit einem Aktivierungsmittel, gefolgt von der Umsetzung der aktivierten Matrix mit dem neuen Affinitätsliganden gegebenenfalls in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XIV), wie vorstehend definiert, mit einer Kohlenhydrat- oder organischen Polymer-Matrix durch Kondensation mit der Matrix. Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (VII), wie vorstehend definiert, (XIII), wie vorstehend definiert, (XVI), wie vorstehend definiert, und (XI), wie vorstehend definiert, mit einer Metalloxid-, Glas- oder Siliciumdioxid-Matrix, die gegebenenfalls mit einem organischen Polymer beschichtet ist, durch Umsetzung der gegebenenfalls beschichteten Metalloxid-, Glas- oder Siliciumdioxid-Matrix mit einem Aktivierungsmittel, gefolgt von der Umsetzung der aktivierten Matrix mit dem neuen Affinitätsliganden gegebenenfalls in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formel (XIV), wie vorstehend definiert, mit einer Metalloxid-, Glas- oder Siliciumdioxid-Matrix, die gegebenenfalls mit einem organischen Polymer beschichtet ist, durch Kondensation mit der Matrix. In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verknüpfung der neuen Affinitätsliganden der allgemeinen Formeln (XV), wie vorstehend definiert, und (XII), wie vorstehend definiert, mit einer Matrix der allgemeinen Formel (V), wie vorstehend definiert, durch Umsetzung der neuen Affinitätsliganden mit der Matrix bei Temperaturen zwischen -20°C und 121°C gegebenenfalls in Anwesenheit eines Säure-bindenden Mittels. Die Erfindung betrifft auch alle Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die wie in den vorstehenden Verfahren beschrieben hergestellt sind.

**[0095]** In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Affinitätsliganden und der erfindungsgemäßen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die derartige Liganden umfassen, für die Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifikation oder Quantifizierung von Proteinen oder proteinhaltigen Materialien, wie Immunglobulinen oder Unterklassen, Fragmenten, Vorstufen oder Derivaten derselben, die sowohl aus natürlichen als auch aus rekombinanten Quellen abstammen, zum Beispiel Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin A (IgA) oder Unterklassen, Fragmenten, Vorstufen oder Derivaten derselben, die sowohl aus natürlichen als auch aus rekombinanten Quellen abstammen. In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifikation oder Quantifizierung von Immunglobulinen durch irgendein Verfahren, bei dem die Immunglobuline auf Affinitätsligand-Matrix-Konjugate gemäß der Erfindung bei einem pH im Bereich von 5,0 bis 12,0 aufgetragen und anschließend entfernt, eluiert oder desorbiert werden, indem der pH auf 4,9 oder niedriger verringert wird.

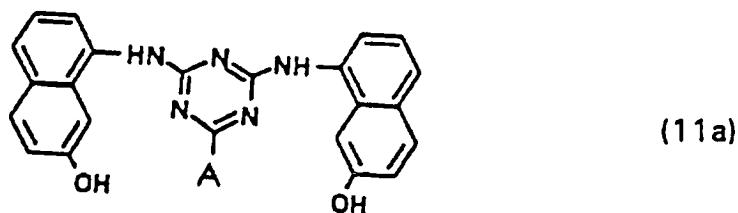
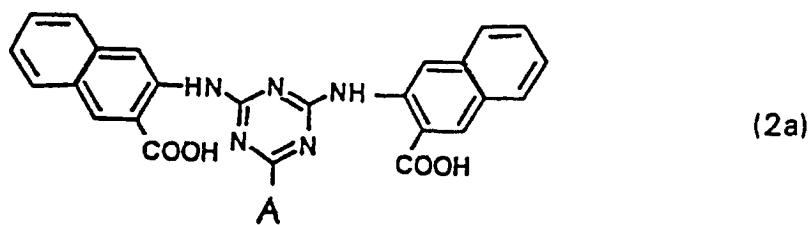
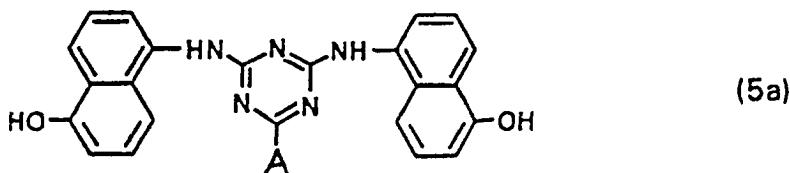
**[0096]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Abtrennung oder Reinigung von proteinhaltigen Materialien, welches umfasst, dass man eine Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Liganden der allgemeinen Formel (a), wie vorstehend definiert, als des biospezifische Liganden durchführt.

**[0097]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Affini-

tätsliganden und der erfindungsgemäßen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die derartige Liganden umfassen, für die Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifikation oder Quantifizierung von Insulinen und Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen, die sowohl aus natürlichen als auch rekombinanten Quellen abstammen, und von Faktor VII oder Human-Wachstumshormon oder Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen.

**[0098]** Beispielsweise wurde eine Bibliothek zusammengestellt, die mehr als 60 verschiedene Liganden umfasst. Die Bibliothek wurde mit nur teilweise gereinigter Insulin-Vorstufe durchmustert, und ausgewählte Liganden wurden durch Festphasen-Synthese an Agarose immobilisiert. Die Matrizes wurden bezüglich der Kupp lungstechnologie, Länge und Natur des Abstandhalterarms, der Ligandendichte usw. optimiert, was 3 Prototypen mit einer dynamischen Bindungskapazität von 2–5 mg/ml zum Ergebnis hatte. Eine rekombinant abgeleitete Insulin-Vorstufe wurde aus geklärter Hefe-Fermentationsbrühe durch einen einzigen nachahmenden Affinitäts-Reinigungsschritt unter sehr milden Bedingungen auf mehr als 95% Reinheit gereinigt.

**[0099]** Eine besonders bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäßen Affinitätsliganden und der erfindungsgemäßen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, die derartige Liganden umfassen, ist demgemäß die Reinigung von Insulinen und Analoga, Derivaten und Fragmenten derselben und Vorstufen, die sowohl von natürlichen als auch rekombinanten Quellen abstammen. Besonders bevorzugte Affinitätsligand-Matrix-Konjugate für diese Verwendung umfassen einen Liganden, der aus den Folgenden ausgewählt ist:



wobei der Ligand in der Position A gegebenenfalls durch einen Abstandhalterarm, der zwischen der Matrix und dem Liganden angeordnet ist und durch die allgemeine Formel (b), wie vorstehend definiert, dargestellt wird, an eine Trägermatrix geknüpft ist, wie vorstehend angegeben. Bevorzugt handelt es sich bei dem Liganden um 11a und ist die Trägermatrix bevorzugt gegebenenfalls aktivierte Agarose, Cellulose, gegebenenfalls als aktivierte Siliciumdioxid oder Glas.

**[0100]** In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifikation oder Quantifizierung von Insulinen oder Insulin-Analoga oder Derivaten derselben und Vorstufen durch irgendein Verfahren, bei dem die Insuline, Insulin-Derivate, -Analoga und -Vorstufen bei einem pH im Bereich von 4,0 bis 9,0 auf erfindungsgemäßen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate aufgetragen und anschließend entfernt, eluiert oder desorbiert werden, indem der pH auf 3,99 oder niedriger oder 9,01 oder höher verändert wird. Das Elutionsverfahren kann alternativ z.B. durch Erniedrigung der Ionenstärke oder durch Zugabe von Hilfslösungsmitteln, wie organischen Lösungsmitteln, durchgeführt werden.

**[0101]** Die Erfindung wird nun in weiterer Einzelheit mit Bezug auf die folgenden Beispiele beschrieben. Die

Beispiele werden für erläuternde Zwecke bereitgestellt und sollten nicht als Beschränkung des Bereichs der Erfindung auf irgendeine Weise angesehen werden.

### Beispiel 1

**[0102]** Dieses Beispiel erläutert die Synthese eines typischen Affinitätsliganden, die durch die Umsetzung von halogenheterocyclischen Verbindungen der allgemeinen Formel (II) mit Verbindungen der allgemeinen Formeln (III) und (IV) definiert ist.

**[0103]** 19,8 Teile Anilin wurden in 50 Teilen Aceton gelöst, und die Lösung wurde in eine Suspension überführt, die durch Gießen einer Lösung von 36,8 Teilen Cyanurchlorid in Teilen von 200 Teilen Aceton in eine Mischung von 50 Teilen Eis und 50 Teilen Wasser gebildet wurde. Die Mischung wurde 2 Stunden gerührt, während dessen der pH durch Zugabe einer Lösung von 16,8 Teilen Natriumhydrogencarbonat in 300 Teilen Wasser zwischen 6 und 7 gehalten wurde. Am Ende dieser Zeit wurde der Niederschlag aus 2-Anilino-4,6-dichlor-1,3,5-triazin abfiltriert, mit Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und aus Dichlormethan kristallisiert.

**[0104]** Eine Lösung von 2,74 Teilen Tyramin in einer Mischung von 50 Teilen Aceton und 10 Teilen Wasser wurde zu einer Lösung von 4,82 Teilen 2-Anilino-4,6-dichlor-1,3,5-triazin in 100 Teilen Aceton gegeben. Die Mischung wurde bei 50°C erwärmt und 2 Stunden bei dieser Temperatur gehalten, während dessen der pH durch Zugabe einer Lösung von 1,86 Teilen Natriumhydrogencarbonat in 30 Teilen Wasser zwischen 6 und 7 gehalten wurde. Am Ende dieser Zeit wurde der Niederschlag aus 2-Anilino-4-[β-(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### Beispiel 2

**[0105]** Dieses Beispiel erläutert die Immobilisierung des Produkts von Beispiel 1 auf einem Festphasen-Träger.

**[0106]** 10 Teile Aminogruppen tragende Agarose wurden durch Lösungsaustausch unter Verwendung von 100 Teilen 30%-igem wässrigem Aceton, gefolgt von 100 Teilen 70%-igem wässrigem Aceton und dann 100 Teilen Aceton, in ein Aceton-Lösungsmittel überführt. Ein Teil 2-Anilino-4-[β-(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin wurde in 20 Teilen Aceton gelöst und auf 50°C erwärmt. Diese warme Aceton-Lösung wurde zu der Aceton-Suspension eines Aminogruppen tragenden Agarose-Derivats gegeben. Eine Lösung von 0,42 Teilen Natriumhydrogencarbonat in 5 Teilen Wasser wurde zu der resultierenden Suspension gegeben, und die Mischung wurde 16 Stunden bei 50°C gerührt. Am Ende dieser Zeit wurde die Agarose-Trägermatrix mit Aceton frei von ungebundenem 2-Anilino-4-[β-(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin gewaschen. Der resultierende derivatisierte Affinitätsträger wurde dann durch Waschen zuerst mit 70%-igem wässrigem Aceton, dann mit 30%-igem wässrigem Aceton und schließlich mit Wasser zurück in Wasser überführt.

### Beispiel 3

**[0107]** Dieses Beispiel demonstriert die Verwendung der neuen, in Beispiel 2 beschriebenen Affinitätsmatrix als spezifische Chromatographie-Matrix für Immunglobuline.

**[0108]** Eineinviertel Teile Humanplasma wurden mit 3,75 Teilen wässrigem Phosphat-Puffer mit einem pH von 7 und einer Konzentration von 10 Millimol pro Liter verdünnt und auf eine Säule aufgetragen, die aus 1 Teil Affinitätsmatrix bestand, deren Herstellung in Beispiel 2 beschrieben ist. Die Affinitätssäule wurde dann mit Phosphat-Puffer gewaschen, bis die UV-Überwachung der Waschflüssigkeiten zeigte, dass alles ungebundene Protein entfernt worden war. Die Affinitätsmatrix wurde dann mit einem Citrat-Puffer mit einem pH von 3,8 und einer Konzentration von 0,2 Millimol pro Liter gewaschen, bis die UV-Überwachung der Waschflüssigkeit zeigte, dass die Entfernung von gebundenem Protein aufgehört hatte. Es wurde gezeigt, dass das in dieser Waschflüssigkeit enthaltende Protein Immunglobulin G war.

**[0109]** Tabelle 1 gibt weitere Beispiele für neue Affinitätsliganden der Erfindung an, die durch das Verfahren von Beispiel 1 hergestellt werden können, aber unter Ersatz der 36,8 Teile des in Beispiel 1 verwendeten Cyanurchlorids durch die entsprechende Menge der halogenheterocyclischen Verbindung, die in Spalte II der Tabelle aufgeführt ist; unter Ersatz der 19,8 Teile des in Beispiel 1 verwendeten Anilins durch die entsprechende Menge des Amins, das in Spalte III der Tabelle aufgeführt ist, und unter Ersatz der 2,74 Teile des in Beispiel 1

verwendeten Tyramins durch die entsprechende Menge des Amins, das in Spalte IV der Tabelle aufgeführt ist.  
Die Zahl des Beispiels ist in Spalte 1 der Tabelle angegeben.

Tabelle 1

I	II	III	IV
4	5-Cyano-2,4,6-trichlorpyrimidin	Anilin	Tyramin
5	5-Chlor-2,4,6-trifluorpyrimidin	Anilin	Tyramin
6	Cyanurchlorid	Tyramin	Tyramin
7	Cyanurchlorid	Anilin	4-Hydroxybenzylamin
8	Cyanurchlorid	Anilin	Benzylamin
9	Cyanurchlorid	N-Methylaniilin	4-Hydroxybenzylamin
10	Cyanurchlorid	p-Anisidin	p-Aminophenol
11	Cyanurchlorid	Anilin	4-Acetylaminobenzylamin
12	Cyanurchlorid	p-Toluidin	Tyramin
13	Cyanurchlorid	p-Chloranilin	Tyramin
14	Cyanurchlorid	p-Aminophenol	Tyramin
15	Cyanurchlorid	Cyclohexylamin	Tyramin
16	Cyanurchlorid	β-Phenylethylamin	Tyramin
17	Cyanurchlorid	4-Hydroxybenzylamin	Tyramin
18	Cyanurchlorid	4-Hydroxybenzylamin	4-Hydroxybenzylamin
19	Cyanurchlorid	Benzylamin	Tyramin
20	Cyanurchlorid	Tyramin	3-Methylsulfonylanilin
21	Cyanurchlorid	N-tert-Butylbenzylamin	Tyramin
22	Cyanurchlorid	N-Isopropylbenzylamin	Tyramin
23	Cyanurchlorid	p-Aminoacetanilid	Tyramin
24	Cyanurchlorid	Diisopropylamin	Tyramin
25	Cyanurchlorid	Anilin	N-Benzyltyramin
26	Cyanurchlorid	Tyramin	N-Benzyltyramin
27	Cyanurchlorid	p-Aminobenzamid	Tyramin
28	Cyanurchlorid	p-Aminobenzolsulfonamid	Tyramin
29	Cyanurchlorid	p-Aminobenzoësäure	Tyramin
30	Cyanurchlorid	p-Aminobenzoësäure	1-Amino-4-naphthol
31	Cyanurchlorid	p-Aminophenol	1-Amino-5-naphthol
32	Cyanurchlorid	p-Aminobenzoësäure	1-Amino-5-naphthol
33	Cyanurchlorid	p-Aminophenol	p-Aminophenol
34	Cyanurchlorid	m-Aminobenzoësäure	Anilin
35	Cyanurchlorid	m-Aminobenzoësäure	Tyramin
36	Cyanurchlorid	1-Amino-5-naphthol	1-Amino-5-naphthol
37	Cyanurchlorid	m-Aminophenol	1-Amino-5-naphthol
38	Cyanurchlorid	1-Amino-4-naphthol	1-Amino-5-naphthol

[0110] Diese in den Beispielen 4–38 beschriebenen Liganden können durch das Verfahren, das in Einzelheit in Beispiel 2 angegeben ist, mit einer Agarose-Matrix verknüpft werden und bei der Reinigung von Immunglobulin G durch das in Beispiel 3 angegebene Verfahren verwendet werden.

### Beispiel 39

[0111] 6 Teile Ethyldiamin wurden zu einer Lösung von 2,5 Teilen 2-Anilino-4-[ $\beta$ -(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin in 20 Teilen Toluol gegeben, und die Mischung wurde 16 Stunden bei 100°C erwärmt. Das Toluol wurde dann unter verringertem Druck aus der Mischung abgedampft, und der Rückstand wurde 5-mal mit 100 Teilen Wasser gewaschen und dann bei 70°C getrocknet.

[0112] Tabelle 2 gibt weitere Beispiele für neue Affinitätsliganden der Erfindung an, die durch das Verfahren von Beispiel 39 hergestellt werden können, aber unter Ersatz der 2,5 Teile des in Beispiel 39 verwendeten 2-Anilino-4-[ $\beta$ -(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazins durch die entsprechende Menge des Chlortriazins, das in Spalte II von Tabelle 2 aufgeführt ist, und unter Ersatz des in Beispiel 39 verwendeten Ethyldiamins durch die entsprechende Menge der Diamin- oder Aminohydroxy-Verbindung, die in Spalte III von Tabelle 2 aufgeführt ist.

Tabelle 2

I	II	III
40	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	Propylendiamin
41	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	1,6-Diaminohexan
42	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	1,8-Diaminoctan
43	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	1,9-Diaminonanon
44	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	1,10-Diaminodecan
45	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	1,12-Diaminododecan
46	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 14	1,6-Diaminohexan
47	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 30	1,6-Diaminohexan
48	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 31	1,6-Diaminohexan
49	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 33	1,6-Diaminohexan
50	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 35	1,6-Diaminohexan
51	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 38	1,6-Diaminohexan
52	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	N,N'-Dimethylethylendiamin
53	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	N- $\beta$ -Hydroxyethylethylendiamin
54	Chlorotriazin, beschrieben in Beispiel 1	Piperazin
55	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	Ethanolamin
56	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	Diethanolamin
57	Chlortriazin, beschrieben in Beispiel 1	Isopropanolamin

### Beispiel 58

[0113] Dieses Beispiel erläutert die Immobilisierung der in Beispiel 39 erzeugten Verbindung auf einem Festphasen-Träger.

[0114] 60 Teile Epoxid-Gruppen tragende Agarose wurden mit 300 Teilen Wasser, gefolgt von 300 Teilen einer Lösung, die aus 5,95 Teilen Kaliumhydrogencarbonat, gelöst in 180 Teilen Methanol und 120 Teilen Wasser, bestand, gewaschen. Ein Teil der gemäß Beispiel 39 hergestellten Verbindung wurde in 60 Teilen Methanol gelöst und zu einer Lösung von 40 Teilen wässriger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gegeben. 100 Teile dieser wässrigen Methanol-Lösung wurden dann zu der hergestellten Suspension von 60 Teilen Epoxygruppen

tragender Agarose gegeben, und die resultierende Suspension wurde sanft 16 Stunden bei Umgebungsraumtemperatur gerührt. Die erhaltene Matrix auf Agarose-Basis wurde zuerst mit einer Mischung von 360 Teilen Methanol und 240 Teilen Wasser und dann mit 600 Teilen Wasser gewaschen.

Beispiel 59

**[0115]** Beispiel 3 wird wiederholt, aber unter Ersatz der Säule, die aus 1 Teil Affinitätsmatrix besteht, deren Herstellung in Beispiel 2 beschrieben ist, durch eine Säule, die aus 1 Teil Affinitätsmatrix besteht, deren Herstellung in Beispiel 58 beschrieben ist. Es wurde wiederum gezeigt, dass das in der Waschflüssigkeit mit pH 3,8 enthaltene Protein Immunglobulin G war.

Beispiel 60

**[0116]** Dieses Beispiel erläutert die Immobilisierung des in Beispiel 39 erhaltenen Produkts auf einem Festphasen-Träger.

**[0117]** 80 Teile Agarose wurden mit 1050 Teilen Wasser, gefolgt von 1050 Teilen 30%-igem wässrigem Aceton, dann 1050 Teilen 70%-igem wässrigem Aceton und schließlich 1425 Teilen Aceton, gewaschen. Die 80 Teile Agarose wurden dann in 100 Teilen Aceton suspendiert, und die Suspension wurde auf 37°C erwärmt. 15 Teile p-Toluolsulfonylchlorid, gelöst in 15 Teilen Pyridin und 25 Teilen Aceton, wurden zu der Agarose-Suspension gegeben, und die Mischung wurde 8 Stunden bei 37°C gehalten. Die aktivierte Agarose wurde dann mit 225 Teilen Aceton, gefolgt von 225 Teilen 70%-igem wässrigem Aceton, dann 225 Teilen 30%-igem wässrigem Aceton und schließlich 225 Teilen Wasser, gewaschen.

**[0118]** 45 Teile dieser aktivierten Matrix wurden mit 225 Teilen einer Lösung gewaschen, die aus 2,3 Teilen Kaliumhydrogencarbonat bestand, welche in einer Mischung aus 178 Teilen Methanol und 47 Teilen Wasser gelöst waren. Eine Lösung von 0,75 Teilen der gemäß Beispiel 39 hergestellten Verbindung in einer Mischung von 45 Teilen Methanol und 30 Teilen Wasser, die 1,5 Teile Kaliumhydrogencarbonat enthielt, wurde zu der aktivierten Agarose-Suspension gegeben, und die Mischung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die resultierende Affinitätsmatrix wurde mit 270 Teilen Methanol und 180 Teilen Wasser, das 9 Teile Kaliumhydrogencarbonat enthielt, gefolgt von 450 Teilen Wasser, gewaschen.

**[0119]** Vor der Verwendung wurden 115 Teile der resultierenden Affinitätsmatrix in einer Lösung von 0,36 Teilen Natriumhydroxid in 45 Teilen Wasser suspendiert.

Beispiel 61

**[0120]** Wenn Beispiel 3 wiederholt wird, aber unter Ersatz der Säule, die aus 1 Teil Affinitätsmatrix bestand, deren Herstellung in Beispiel 2 beschrieben ist, durch eine Säule, die aus 1 Teil Affinitätsmatrix bestand, deren Herstellung in Beispiel 60 beschrieben ist, wurde wiederum gezeigt, dass das in der Waschflüssigkeit mit pH 3,8 enthaltene Protein Immunglobulin G war.

Beispiel 62

**[0121]** 10 Teile der gemäß Beispiel 60 hergestellten Affinitätsmatrix wurden in einem Phosphat-Puffer mit pH 8,0 16 Stunden stehengelassen. Beispiel 3 wurde wiederholt, aber unter Ersatz der darin verwendeten Matrix durch eine äquivalente Menge dieser neuen Affinitätsmatrix und unter Verwendung von Zell-freiem Überstand aus Mäuse-Immunglobulin-Zellkulturmedium anstelle des in Beispiel 3 verwendeten Humanplasmas. Es wurde wiederum gezeigt, dass das in der Waschflüssigkeit mit pH 3,8 enthaltene Protein Mäuse-Immunglobulin M war.

**[0122]** Tabelle 3 gibt weitere Beispiele der Anknüpfung der neuen Affinitätsliganden der Erfindung an, welche gemäß dem Verfahren von Beispiel 58 hergestellt werden können, aber unter Ersatz des in Beispiel 58 verwendeten neuen Affinitätsliganden durch die entsprechende Menge des neuen Affinitätsliganden, der in Spalte II von Tabelle 3 angegeben ist, und unter Ersatz der 39 Teile der in Beispiel 58 verwendeten Epichlorhydrin-aktivierten Agarose durch die entsprechende Menge des in Spalte III von Tabelle 3 aufgeführten Kohlehydrats, das durch das in Spalte IV von Tabelle 3 aufgeführte Reagens aktiviert ist.

Tabelle 3

I	II	III	IV
61	Ligand von Beispiel 39	Agarose	1,4-Butandioldiglycidylether
62	Ligand von Beispiel 39	Agarose	Bromcyan
63	Ligand von Beispiel 39	Agarose	Epichlorhydrin
64	Ligand von Beispiel 39	Agarose	Natriummetaperiodat
65	Ligand von Beispiel 39	Agarose	2,2,2-Trifluorethansulfonylchlorid
66	Ligand von Beispiel 39	Agarose	1,1'-Carbonyldiimidazol
67	Ligand von Beispiel 39	Agarose	2-Fluor-1-methylpyridiniumtoluol-4-sulfonat
68	Ligand von Beispiel 39	Agarose	Divinylsulfon
69	Ligand von Beispiel 39	Agarose	Cyanurchlorid

## Beispiel 70

**[0123]** Wenn die in Beispiel 1 in Einzelheit angegebene Herstellung des Liganden wiederholt wird, aber mit Umsetzung der 2,74 Teile Tyramin mit 4,84 Teilen 2-Phenoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazin anstelle von 4,82 Teilen 2-Anilino-4,6-dichlor-1,3,5-triazin, erhält man 2-Phenoxy-4-[ $\beta$ -(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin, das anstelle von 2-Anilino-4-[ $\beta$ -(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin bei der Herstellung einer Affinitätsmatrix durch das Verfahren von Beispiel 2 verwendet werden kann. Wiederum wird Immunglobulin G bequem durch die in Beispiel 3 beschriebene Technik aus Humanplasma isoliert.

## Beispiel 71

**[0124]** Die Verwendung von 5,16 Teilen 2-Phenylthio-4,6-dichlor-1,2,5-triazin anstelle der 4,84 Teile des in Beispiel 70 verwendeten 2-Phenoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazins ergibt 2-Phenylthio-4-[ $\beta$ -(4'-hydroxyphenyl)ethylamino]-6-chlor-1,3,5-triazin, das ähnlich verwendet werden kann, um Immunglobulin G zu reinigen.

## Beispiel 72

**[0125]** Dieses Beispiel veranschaulicht einen alternativen Ansatz für die Herstellung von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten, wie in Beispiel 2 und Beispiel 58 exemplifiziert.

**[0126]** Zehn Teile Aminoethylaminogruppen tragende Agarose wurden bei 0–5°C mit 5 Teilen Aceton und 5 Teilen eines wässrigen Phosphatpuffers mit einem pH von 7 und einer Konzentration von 0,5 Mol pro Liter geführt. Zu dieser Suspension wurden 2,5 Teile einer 1 Teil Cyanurchlorid in 10 Teilen Aceton umfassenden Lösung hinzugesetzt, und die Mischung wurde dann eine Stunde bei einer Temperatur von 0–5°C bewegt. Die resultierende Dichlortriazin-aktivierte Agarose wurde nacheinander mit 50 Teilen 50%-igem wässrigem Aceton, 50 Teilen Wasser, 50 Teilen 50%-igem wässrigem Aceton und 100 Teilen Wasser gewaschen. Zwanzig Teile der gewaschenen Dichlortriazin-aktivierten Agarose wurden zu 20 Teilen einer 1 Teil Tyramin in 200 Teilen Wasser umfassenden wässrigen Lösung hinzugesetzt, und die resultierende Suspension wurde 16 h bei Umgebungstemperatur bewegt. Am Ende dieses Zeitraums wurde die resultierende derivatisierte Matrix mit 200 Teilen Wasser gewaschen und 20 Teilen einer wässrigen Lösung zugesetzt, welche 0,55 Teile Anilin, gelöst in 200 Teilen Wasser, umfasste. Die resultierende Suspension wurde 16 h bei 90°C bewegt, nach welcher Zeit die derivatisierte Matrix mit 200 Teilen Wasser gewaschen wurde.

## Beispiel 73

**[0127]** Wenn Beispiel 3 wiederholt wird, jedoch die Säule, die aus 1 Teil der Affinitätsmatrix, deren Herstellung in Beispiel 2 beschrieben wird, besteht, durch eine Säule, die aus 1 Teil der Affinitätsmatrix, deren Herstellung in Beispiel 72 beschrieben wird, besteht, ersetzt wird, wurde wieder gezeigt, dass das in der Waschflüssigkeit mit pH 3,8 enthaltene Protein Immunglobulin G war.

## Beispiel 74

**[0128]** Dieses Beispiel veranschaulicht die Synthese einer Bibliothek von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten dieser Erfindung, welche nachfolgend durchmustert werden kann, um deren Proteinbindungseigenschaften zu bestimmen.

**[0129]** Ein Teil von Aminogruppen tragender Agarose wurde mit 1 Teil 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, gemischt und man ließ sie sich unter Schwerkraft absetzen. Die gepufferte Amin-Agarose wurde in ein Reaktionsgefäß transferiert und bei 0–5°C mit 0,5 Teilen 0,5 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, und 0,5 Teilen Aceton gemischt. Ein Viertel eines Teils einer 1 Teil Cyanurchlorid in 10 Teilen Aceton umfassenden Lösung wurde hinzugesetzt, und die Mischung wurde bei 0–5°C 1 h gerührt, wonach die Mischung filtriert und nacheinander mit 10 Teilen 50% Aceton, 6 Teilen Wasser, 6 Teilen 50% Aceton und 10 Teilen Wasser gewaschen wurde, wodurch 2,4-Dichlor-s-triazin-6-yl-aktivierte Agarose erhalten wurde.

**[0130]** Ein Teil der 2,4-Dichlor-s-triazin-6-yl-aktivierten Agarose wurde zu 5 Moläquivalenten der in Spalte II von Tabelle 4 aufgelisteten Aminverbindung, welche in 2 bis 3 Teilen einer 1 Teil Aceton und 1 Teil Wasser umfassenden Lösung gelöst worden waren, hinzugesetzt und durch Zugabe von Natriumhydroxid auf neutralen pH eingestellt. Die Suspension wurde 24 h bei 30°C gemischt. Die resultierenden Monochlor-s-triazin-6-yl-aktivierten Agarosen wurden nacheinander mit 10 Teilen Dimethylformamid, 10 Teilen einer 3 Teile Propan-2-ol und 7 Teile 0,2 M Natriumhydroxid umfassenden Lösung, 10 Teilen Wasser gewaschen, und man ließ sie unter Schwerkraft sich absetzen.

**[0131]** Ein Teil der Monochlor-s-triazin-6-yl-aktivierten Agarose wurde zu 5 Moläquivalenten der in Spalte III von Tabelle 4 aufgelisteten Aminverbindung, welche in 2 bis 3 Teilen einer 1 Teil Dimethylformamid und 1 Teil Wasser umfassenden Lösung gelöst worden waren, gegeben und durch Zugabe von Natriumhydroxid auf neutralen pH eingestellt. Die Suspension wurde 72 h bei 85 bis 95°C gemischt. Die resultierenden Affinitätsligand-Matrix-Konjugate wurden nacheinander mit 10 Teilen Dimethylformamid, 10 Teilen einer 3 Teile Propan-2-ol und 7 Teile 0,2 M Natriumhydroxid umfassenden Lösung, 10 Teilen Wasser gewaschen, und man ließ sie sich unter Schwerkraft absetzen. Es wurde eine Bibliothek von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten dieser Erfindung synthetisiert, von denen Beispiele in Spalte I von Tabelle 4 angegeben werden.

Tabelle 4

I	II	III
75	1,3-Diaminopropan	Tyramin
76	1,3-Diaminopropan	N-Benzylphenethylamin
77	1,4-Diaminobutan	3-Aminophenol
78	1,4-Diaminobutan	Tyramin
79	1,4-Diaminobutan	1-Amino-5-naphthol
80	1,4-Diaminobutan	N-Isopropylbenzylamin
81	1,4-Diaminobutan	N-Benzylphenethylamin
82	Anilin	Diaminopropan
83	Anilin	Anilin
84	Anilin	3-Aminophenol
85	Anilin	3-Aminobenzoësäure
86	Anilin	Tyramin
87	Anilin	1-Amino-4-naphthol
88	Anilin	1-Amino-2-naphthol
89	Anilin	3-Amino-2-naphthol
90	Anilin	1-Amino-6-naphthol
91	Anilin	N-Isopropylbenzylamin-4-phenylbutylamin
92	Anilin	N-Benzylphenethylamin
93	3-Aminophenol	3-Aminophenol
94	3-Aminophenol	1-Amino-5-naphthol
95	1,6-Diaminohexan	Tyramin
96	1,6-Diaminohexan	4-Phenylbutylamin
97	3-Aminobenzoësäure	1-Amino-5-naphthol
98	Tyramin	Tyramin
99	Tyramin	1-Amino-5-naphthol
100	Tyramin	1-Amino-7-naphthol

I	II	III
101	Tyramin	1-Amino-6-naphthol
102	1-Amino-5-naphthol	Anilin
103	1-Amino-5-naphthol	3-Aminophenol
104	1-Amino-5-naphthol	4-Aminobenzoësäure
105	1-Amino-5-naphthol	3,5-Diaminobenzoësäure
106	1-Amino-5-naphthol	Benzylamin
107	1-Amino-5-naphthol	Tyramin
108	1-Amino-5-naphthol	1-Amino-5-naphthol
109	1-Amino-7-naphthol	3-Aminophenol
110	1-Amino-7-naphthol	1-Amino-7-naphthol
111	1-Amino-4-naphthol	3-Aminophenol
112	1-Amino-4-naphthol	1-Amino-4-naphthol
113	1-Amino-2-naphthol	3-Aminophenol
114	1-Amino-2-naphthol	1-Amino-2-naphthol
115	3-Amino-2-naphthol	3-Aminophenol
116	3-Amino-2-naphthol	3-Amino-2-naphthol
117	1-Amino-6-naphthol	3-Aminophenol
118	1-Amino-6-naphthol	1-Amino-6-naphthol
119	2-Amino-1-naphthol	3-Aminophenol
120	2-Amino-1-naphthol	2-Amino-1-naphthol
121	6-Amino-1-naphthol	3-Aminophenol
122	6-Amino-1-naphthol	6-Amino-1-naphthol
123	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	3,5-Diaminobenzoësäure
124	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	Benzylamin
125	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	Tyramin
126	3-Amino-2-naphthoësäure	3-Aminophenol
127	3-Amino-2-naphthoësäure	3-Amino-2-naphthoësäure

## Beispiel 128

**[0132]** Dieses Beispiel demonstriert das Durchmusterungs-Verfahren, durch welches die Proteinbindungseigenschaften der in Beispiel 74 beschriebenen Affinitätsligand-Matrix-Konjugate identifiziert werden können.

**[0133]** Chromatographie-Säulen mit 1 ml Gesamtvolumen wurden mit Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten der Beispiele 75–127 gepackt. Die Säulen wurden durch Spülen mit 10 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, äquilibriert. Ein ml einer 1,5 mg humanes IgG pro ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, umfassenden Lösung wurde auf jede Chromatographiesäule aufgetragen, die nachfolgend mit 10 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen wurde, um ungebundenes IgG zu entfernen. Gebundenes IgG wurde eluiert, indem jede Säule mit 5 ml 50 mM Natriumcitratpuffer, pH 3,0, gespült wurde. Der IgG-Gehalt der Wasch- und Elutionsfraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm gegen eine Puffer-Leerwertprobe bestimmt. Eine Analyse der Ergebnisse enthielt, dass die Affinitätsligand-Matrix-Konjugate der Beispiele 75 bis 127 allesamt eine Bindung von humanem IgG zeigten. Von diesen wurde bei den Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten der Beispiele 92, 99, 101, 102, 103, 111, 113 und 119 eine nahezu quantitative Elution des gebundenen IgG erzielt, welche als Konsequenz als von außergewöhnlichem Wert bei der Auftrennung, Isolierung oder Reinigung von humanem IgG angesehen werden.

## Beispiel 129

Selektive Bindung und Elution von rekombinantem Gerinnungsfaktor VIIa (rFVIIa), aufgetragen auf die Affinitätsmatrix gemäß Beispiel 181, ausgehend von Zellkulturmedien

## Vorgehensweise:

**[0134]** Eine  $5 \times 50$  mm-Säule (Pharmacia HR 5/5) wurde mit einem durch Absetzenlassen erhaltenen Volumen von 0,85 ml der wie in Beispiel 181 hergestellten Affinitätsmatrix gepackt und mit 20 ml Puffer A: 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0, äquilibriert. 5 ml konditionierter BHK-Zellkultur-Überstand, angereichert mit 1,4 mg rFVIIa, wurde auf die gepackte Säule aufgetragen. Nachdem nicht-bindende Proteine mit 10 ml Puffer A ausgewaschen worden waren, wurde rFVIIa eluiert, indem 5 ml Puffer B: 20 mM Trinatriumcitrat, 50 mM Tris, pH 8,0, aufgetragen wurden.

**[0135]** Die Durchsatz während des Chromatographieverfahrens betrug 0,3 ml/min.

**[0136]** Der Säulenausfluss wurde durch einen nachgeschalteten UV-Monitor geleitet und in 1 ml-Fraktionen gesammelt, und jede Fraktion wurde hinsichtlich des Gehalts an rFVIIa und Gesamtprotein durch analytische Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) analysiert.

## Ergebnisse:

**[0137]** Die Ausgabe des UV-Monitors zeigte, dass das meiste des UV (280 nm)-absorbierenden Materials während des Auftragens des Überstands und der folgenden Wäsche mit Puffer A herunterkam. Während der folgenden Elution mit Puffer B wurde ein klar definierter Peak aufgezeichnet, der mit der erwarteten Größe für die aufgetragene Menge von rFVIIa übereinstimmte.

**[0138]** Die RP-HPLC-Analyse der gesammelten Fraktionen zeigte, dass 90% der aufgetragenen Menge von rFVIIa in den Fraktionen während der Elution mit Puffer B herunterkamen. Die Reinheit von rFVIIa in diesen Fraktionen lag über 95%.

**[0139]** Die Ergebnisse zeigen, dass eine selektive Bindung von rFVIIa aus angereicherten Kulturmedien an den verwendeten Liganden erzielt wird.

## Beispiel 130

Reinigung von Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

**[0140]** 255 mg Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-Ala-Ala-Lys-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> (Charge A202558) wurden in 51 ml H<sub>2</sub>O suspendiert, 10 Tropfen 1 M Essigsäure wurden zugesetzt, um die Vorstufe zu solubilisieren, 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 510 ml zugesetzt, was zu einer Lösung von 0,12 mg/ml (anhand einer RP-HPLC-Analyse) führte. Der pH wurde durch Messung zu 5,53, die Ionenstärke zu 30,0 mS/cm und das Redoxpotential zu 278 mV bestimmt.

**[0141]** 400 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 12 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

**[0142]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E091b	0,12 mg/ml	400 ml	48,8 mg	100
Durchlauf	E091c	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E093a	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 3	E093b	0,01 mg/ml	5,0 ml	0,1 mg	
Fraktion 4	E093c	5,00 mg/ml	5,0 ml	25,0 mg	
Fraktion 5	E093d	2,62 mg/ml	5,0 ml	13,1 mg	
Fraktion 6	E093e	0,52 mg/ml	5,0 ml	2,6 mg	
Fraktionen				40,8 mg	83

**[0143]** Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 83% erhalten.

**[0144]** Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 94% bestimmt. Die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

#### Beispiel 131

Reinigung von des-Thr<sup>B30</sup>-Insulin an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

**[0145]** 150 mg des-Thr<sup>B30</sup>-Insulin (INS-J-009)-Präzipitat wurden in 50 ml H<sub>2</sub>O suspendiert, 5 Tropfen 2 M Essigsäure wurden zugesetzt, um die Suspension zu lösen, 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, wurde bis zu einem Volumen von 500 ml zugesetzt, was zu einer Konzentration von 0,076 mg/ml (anhand einer RP-HPLC-Analyse) führte. Der pH wurde durch Messung zu 5,52, die Ionenstärke zu 30,0 mS/cm und das Redoxpotential zu 264 mV bestimmt. 400 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 10 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

**[0146]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E105a	0,076 mg/ml	400 ml	30,0 mg	100
Durchlauf	E105b	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E105d	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 3	E105e	0,00 mg/ml	5,0 ml	0,0 mg	0

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Fraktion 4	E105f	0,41 mg/ml	5,0 ml	2,1 mg	
Fraktion 5	E105n	1,93 mg/ml	5,0 ml	9,7 mg	
Fraktion 6	E105o	1,14 mg/ml	5,0 ml	5,7 mg	
Fraktion 7	E105p	0,48 mg/ml	5,0 ml	2,4 mg	
Fraktion 8	E105J	0,31 mg/ml	5,0 ml	1,6 mg	
Fraktionen				21,5 mg	71%

**[0147]** Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 71% erhalten.

**[0148]** Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 91% bestimmt; die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

## Beispiel 132

Reinigung von Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 145:

**[0149]** 2 l zentrifugierte Brühe (Charge 628) wurden mit 5 M NaOH auf pH 5,5 eingestellt und durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EK)-Filter filtriert, gefolgt von einer Filtration durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EKS)-Filter. Die Konzentration wurde durch RP-HPLC zu 0,006 mg/ml gemessen. Die Ionenstärke wurde durch Messung zu 12,2 mS/cm und das Redoxpotential zu 316 mV bestimmt. 1000 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 11 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

**[0150]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E111e	0,006 mg/ml	1000ml	6,0 mg	100
Durchlauf	E115a	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E115b	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 3	E115c	0,00 mg/ml	5,0 ml	0,0 mg	0
Fraktion 4	E115d	0,58 mg/ml	5,0 ml	2,9 mg	
Fraktion 5	E115e	0,11 mg/ml	5,0 ml	0,6 mg	
Fraktion 6	E115f	0,04 mg/ml	5,0 ml	0,2 mg	
Fraktion 7	E115g	0,02 mg/ml	5,0 ml	0,1 mg	
Fraktionen				3,8 mg	63%

**[0151]** Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 63% erhalten.

**[0152]** Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 88% bestimmt. Die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

## Beispiel 133

Reinigung von Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

**[0153]** 2 l zentrifugierte Brühe (Charge 628) wurden mit 5 M NaOH auf pH 5,5 eingestellt und durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EK)-Filter filtriert, gefolgt von einer Filtration durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EKS)-Filter. Die Konzentration wurde durch RP-HPLC zu 0,006 mg/ml gemessen. Die Ionenstärke wurde durch Messung zu 12,2 mS/cm und das Redoxpotential zu 316 mV bestimmt. 1000 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 11 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

**[0154]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert: Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E111e	0,006 mg/ml	830 ml	5,0 mg	100
Durchlauf	E113a	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E113b	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 3	E113c	0,00 mg/ml	5,0 ml	0,0 mg	0
Fraktion 4	E113d	0,58 mg/ml	5,0 ml	2,9 mg	
Fraktion 5	E113e	0,10 mg/ml	5,0 ml	0,5 mg	
Fraktion 6	E113f	0,04 mg/ml	5,0 ml	0,2 mg	
Fraktion 7	E113g	0,02 mg/ml	5,0 ml	0,1 mg	
Fraktionen				3,7 mg	74%

[0155] Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 74% erhalten.

[0156] Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 86% bestimmt. Die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

#### Beispiel 134

Reinigung von EEAEPK-Insulin B-Kette(1-29)-AAK-Insulin A-Kette(1-21) an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

[0157] Zentrifugierte Hefe-Brühe (Charge Y44) wurde durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EK)-Filter filtriert, was zu einer Konzentration von 0,35 mg/ml (anhand einer RP-HPLC-Analyse) führte. Der pH wurde durch Messung zu 5,27, die Ionenstärke zu 7,38 mS/cm und das Redoxpotential zu 221 mV bestimmt.

[0158] 120 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 11 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

[0159] Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E127b	0,35 mg/ml	120 ml	42,0 mg	100
Durchlauf	E127c	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E127d	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 3	E127e	2,26 mg/ml	5,0 ml	11,3 mg	
Fraktion 4	E127f	2,07 mg/ml	5,0 ml	10,4 mg	
Fraktion 5	E127g	1,12 mg/ml	5,0 ml	5,6 mg	
Fraktion 6	E127h	1,27 mg/ml	5,0 ml	6,4 mg	
Fraktionen				33,6 mg	79%

[0160] Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 79% erhalten. Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 93% bestimmt. Die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

## Beispiel 135

Reinigung von [Asp<sup>B28</sup>]-Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

**[0161]** Zentrifugierte Brühe (Charge GSG9414) wurde mit 5 M NaOH auf pH 5,5 eingestellt und durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EK)-Filter filtriert, gefolgt von einer Filtration durch einen Leitz Tiefenfilter (Seitz EKS)-Filter. Die Konzentration wurde durch RP-HPLC zu 0,02 mg/ml gemessen. Die Ionenstärke wurde durch Messung zu 17,0 mS/cm und das Redoxpotential zu 308 mV bestimmt. 800 ml der obigen Lösung wurden auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml des obigen Matrix-Konjugats, das in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt worden war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 12 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

**[0162]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden vor der Analyse mit 2 M Essigsäure verdünnt.

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Auftragung	E107b	0,02 mg/ml	800 ml	16,0 mg	100
Durchlauf	E107c	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Waschen	E107d	0,00 mg/ml		0,0 mg	0
Fraktion 2	E109a	0,00 mg/ml	5,0 ml	0,0 mg	0
Fraktion 3	E109b	0,12 mg/ml	5,0 ml	0,6 mg	
Fraktion 4	E109c	0,76 mg/ml	5,0 ml	3,8 mg	
Fraktion 5	E109d	1,04 mg/ml	5,0 ml	5,2 mg	
Fraktion 6	E109e	0,31 mg/ml	5,0 ml	1,6 mg	

Probe	Identifikation	MI3-Konz.	Volumen	Menge	%
Fraktion 7	E109f	0,10 mg/ml	5,0 ml	0,5 mg	
Fraktion 8	E109g	0,06 mg/ml	5,0 ml	0,3 mg	
Fraktionen				12 mg	75%

**[0163]** Es wurde dementsprechend eine Gesamtausbeute von 75% erhalten.

**[0164]** Die Reinheit des Produkts wurde durch RP-HPLC-Analyse zu 84% bestimmt. Die verbleibenden Verunreinigungen waren mit Insulin verwandt.

## Beispiel 136

**[0165]** Dieses Beispiel demonstriert das Durchmusterungs-Verfahren, durch welches die Proteinbindungseigenschaften von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten dieser Erfindung identifiziert werden können, weiter.

**[0166]** Eine Bibliothek von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten dieser Erfindung wurde gemäß Beispiel 74 synthetisiert mit der Ausnahme, dass die 5 Moläquivalente der in Spalte II von Tabelle 4 aufgeführten Aminverbindung durch die entsprechende Menge der in Spalte II von Tabelle 5 aufgeführten Aminverbindung ersetzt wurden und die 5 Moläquivalente der in Spalte III von Tabelle 4 aufgeführten Aminverbindung durch die entsprechende Menge der in Spalte III von Tabelle 5 aufgeführten Aminverbindung ersetzt wurden. Es wurde eine Bibliothek von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten dieser Erfindung synthetisiert, von denen Beispiele in Spalte I von Tabelle 5 angegeben werden.

**[0167]** Chromatographiesäulen von 1 ml Gesamtvolumen wurden mit Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten der Beispiele 137–180 gepackt. Die Säulen wurden durch Spülen mit 10 ml 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumchlorid-Puffer, pH 5,0, äquilibriert. Zwölf ml geklärte Fermenterbrühe, die 50 mg/ml Human-Insulin-Vorstufe

enthielt, wurden auf jede Chromatographiesäule aufgetragen, die nachfolgend mit 12 ml 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumchloridpuffer, pH 5,0, gewaschen wurde, um nicht gebundenes Material zu entfernen. Gebundene Human-Insulin-Vorstufe wurde eluiert, indem jede Säule mit 3 ml 2 M Essigsäure gespült wurde. Der Gehalt an Human-Insulin-Vorstufe des Durchlaufs, der Wasch- und Elutionsfraktionen wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung einer C18-Umkehrphasen-Siliciumdioxid-Säule (4 × 250 mm) und eines Laufmittelsystems, umfassend Puffer A (0,2 M Natriumsulfat, 40 mM Phosphorsäure und 10% (Vol./Vol.) Acetonitril, pH 2) und Puffer B (50% (Vol./Vol.) Acetonitril), zugeführt mit einem Durchsatz von 1 ml pro Minute, im Verhältnis 55% Puffer A zu 45% Puffer bestimmt. Die Elutionszeit der Human-Insulin-Vorstufe wurde durch Vergleich mit einem Referenzstandard bestimmt.

**[0168]** Die Analyse der Ergebnisse enthüllte, dass die Affinitätsligand-Matrix-Konjugate der Beispiele 139, 140, 145, 148, 153, 159, 162, 163, 164, 166, 167, 170, 171, 173 alle die Human-Insulin-Vorstufe banden, die unter den in diesem Beispiel beschriebenen Bedingungen eluiert wurde. Als Folge werden die Affinitätsligand-Matrix-Konjugate der Beispiele 139, 140, 145, 148, 153, 159, 162, 163, 164, 166, 167, 170, 171, 173 als von herausragendem Wert bei der Auf trennung, Isolierung oder Reinigung der Human-Insulin-Vorstufe angesehen.

Tabelle 5

I	II	III
137	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	Benzylamin
138	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	3,5-Diaminobenzoësäure
139	1-Amino-5-naphthol	Benzylamin
140	1-Amino-5-naphthol	3,5-Diaminobenzoësäure
141	Benzylamin	3-Aminobenzoësäure
142	Benzylamin	4-Aminobenzoësäure
143	Tyramin	3-Aminobenzoësäure
144	Tyramin	4-Aminobenzoësäure
145	1-Amino-5-naphthol	1-Amino-5-naphthol
146	1-Amino-5-naphthol	3-Aminobenzoësäure
147	1-Amino-5-naphthol	4-Aminobenzoësäure
148	1-Amino-5-naphthol	Tyramin
149	1-Amino-6-naphthalinsulfonsäure	Tyramin
150	1-Amino-5-naphthol	3-Amino-1,2-propanediol
151	1-Amino-5-naphthol	3-Aminopropan-1-ol
152	1-Amino-5-naphthol	5-Aminopentan-1-ol
153	1-Amino-5-naphthol	3-Aminophenol
154	1-Amino-5-naphthol	6-Aminocapronsäure
155	1-Aminonaphthalin	Benzylamin
156	1-Aminonaphthalin	3,5-Diaminobenzoësäure
157	1-Aminonaphthalin	3-Aminobenzoësäure
158	1-Aminonaphthalin	4-Aminobenzoësäure
159	3-Amino-2-naphthoësäure	3-Aminophenol
160	4-Amino-1-naphthol	3-Aminophenol
161	1-Amino-2-naphthol	3-Aminophenol
162	3-Amino-2-naphthol	3-Aminophenol
163	1-Amino-6-naphthol	3-Aminophenol
164	1-Amino-7-naphthol	3-Aminophenol
165	2-Amino-1-naphthol	3-Aminophenol
166	6-Amino-1-naphthol	3-Aminophenol
167	3-Amino-2-naphthoësäure	3-Amino-2-naphthoësäure
168	4-Amino-1-naphthol	4-Amino-1-naphthol
169	1-Amino-2-naphthol	1-Amino-2-naphthol
170	3-Amino-2-naphthol	3-Amino-2-naphthol
171	1-Amino-7-naphthol	1-Amino-7-naphthol
172	2-Amino-1-naphthol	2-Amino-1-naphthol

I	II	III
173	6-Amino-1-naphthol	6-Amino-1-naphthol
174	3-Amino-2-naphthoësäure	1-Amino-5-naphthol
175	3-Amino-2-naphthoësäure	4-Amino-1-naphthol
176	3-Amino-2-naphthoësäure	2-Amino-1-naphthol
177	1-Amino-7-naphthol	1-Amino-5-naphthol
178	1-Amino-7-naphthol	3-Amino-2-naphthoësäure
179	1-Amino-7-naphthol	4-Amino-1-naphthol
180	1-Amino-7-naphthol	2-Amino-1-naphthol

## Beispiel 181

**[0169]** Dieses Beispiel demonstriert das Verfahren, durch welches Affinitätsligand-Matrix-Konjugate dieser Erfindung, die für die Reinigung von Faktor VII von Wert sind, synthetisiert werden können.

**[0170]** Ein Affinitätsligand-Matrix-Konjugat dieser Erfindung wurde gemäß Beispiel 74 synthetisiert mit der Ausnahme, dass die 5 Moläquivalente der in Spalte II von Tabelle 4 aufgeführten Aminverbindung durch die entsprechende Menge 2-Aminobenzimidazol ersetzt wurden und die 5 Moläquivalente der in Spalte III von Tabelle 4 aufgeführten Aminverbindung durch 3-Amino-2-naphthoësäure ersetzt wurden. Dieses Affinitätsligand-Matrix-Konjugat kann für die Reinigung von Faktor VIIa gemäß Beispiel 129 dieser Erfindung verwendet werden.

## Beispiel 182

Reinigung von EEAEPK-Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> an einem Affinitätsligand-Matrix-Konjugat gemäß Beispiel 171:

**[0171]** 50 ml mittels Ionenaustausch gereinigte Insulin-Vorstufe (EEAEPK-Insulin B-Kette<sup>1-29</sup>-A-A-K-Insulin A-Kette<sup>1-21</sup> in einer Konzentration von 2,2 mg/ml) wurde auf eine Pharmacia-K16 (1,6 × 6 cm)-Säule, die mit 12 ml der Konjugat-Matrix, welche in 0,2 M Kaliumcitrat, pH 5,5, äquilibriert worden war, gepackt war, mit 1,8 ml/min bei Umgebungstemperatur aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml 0,1 M Kaliumcitrat, 0,2 M Kaliumsulfat, pH 5,5, gewaschen und dann mit 0,1 M Essigsäure mit 1,8 ml/min eluiert. Es wurden 5,0 ml-Fraktionen gesammelt.

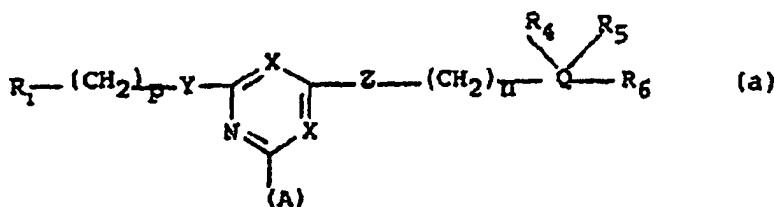
**[0172]** Die Säule wurde mit 50 ml 0,5 M NaOH gereinigt und mit 50 ml 0,1 M Citronensäure, 60% (Vol./Vol.) Ethanol regeneriert. Proben für die RP-HPLC-Analyse wurden mit 2 M Essigsäure vor der Analyse verdünnt.

Probe	Identifikation	Konz. mg/ml	Volumen ml	Menge mg	%
Auftragung	R-029e	2,27	50	114	100
Durchlauf	R-033a	0,03	50	1,4	1,2
Waschen	R-033b	0,09	50	4,3	3,8
Pool 1	R-033c	5,61	15	84,2	74
Pool 2	R-033d	0,55	10	5,5	4,8

**[0173]** Es wurde ein dynamisches Bindungsvermögen von 9,5 mg/ml Matrix mit einer Ausbeute von 88% der Vorstufe gezeigt.

## Patentansprüche

1. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, umfassend einen Liganden der allgemeinen Formel (a)



wobei

$R_1$  ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxyalkylgruppe, eine Cyclohexylgruppe, eine Aminogruppe, eine Phenylgruppe, Naphthylgruppe, 1-Phenylpyrazol-, Indazol-, Benzthiazolgruppe, Benzoxazolgruppe oder eine Benzimidazolgruppe, wobei jeder der Benzol-, Naphthalin-, 1-Phenylpyrazol-, Indazol-, Benzthiazol- oder Benzimidazolringe gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylgruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkoxygruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Acyloxy- oder Acylaminogruppen, Aminogruppen, Hydroxygruppen, Carbonsäuregruppen, Sulfonsäuregruppen, Carbamoylgruppen, Sulfamoylgruppen, 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylsulfonylgruppen und Halogenatomen, substituiert ist, darstellt;

$Y$  ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine  $N-R_2$ -Gruppe darstellt;

$Z$  ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine  $N-R_3$ -Gruppe darstellt;

$R_2$  und  $R_3$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Hydroxyalkylgruppe, eine Benzylgruppe oder eine  $\beta$ -Phenylethylgruppe darstellen;

$R_4$ ,  $R_5$  und  $R_6$  unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkoxygruppe, eine Aminogruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Acyloxy- oder Acylaminogruppe, eine Carbonsäuregruppe, eine Sulfonsäuregruppe, eine Carbamoyl- oder Sulfamoylgruppe, eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylsulfonylgruppe oder ein Halogenatom darstellen;

eines der Symbole  $X$  ein Stickstoffatom und das andere Symbol  $X$  ein Stickstoffatom oder ein Kohlenstoffatom, das ein Chloratom oder eine Cyanogruppe trägt, darstellt;

$Q$  einen Benzol-, Naphthalin-, 1-Phenylpyrazol-, Indazol-, Benzthiazol-, Benzoxazol- oder Benzimidazolring darstellt;

$n$  eine ganze Zahl zwischen 0 und 6 ist;

$p$  eine ganze Zahl zwischen 0 und 20 ist;

und

wobei der Ligand gegebenenfalls durch einen zwischen die Matrix und den Liganden eingeschobenen Abstandhalterarm an eine Trägermatrix in Position (A) angelagert ist,

mit der Maßgabe, dass Formel (a) nicht die Reaktionsprodukte der Verbindungen 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3'-sulfonsäure, 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure und 4-Chlor-2-(4"-aminophenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure mit Dextran T 500 umfasst.

2. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach Anspruch 1, wobei der optionale zwischen den Liganden und die Matrix eingeschobene Abstandhalterarm durch die allgemeine Formel (b)



dargestellt ist, wobei

$T$  ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine  $N-R_7$ -Gruppe darstellt, wobei  $R_7$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;

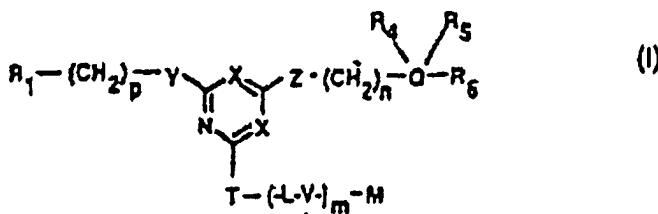
$V$  ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine  $-COO$ -Gruppe, eine  $CONH$ -Gruppe oder eine  $NHCO$ -Gruppe oder eine  $-PO_3H$ -Gruppe, eine  $NH$ -Arylen- $SO_2-CH_2-CH_2$ -Gruppe oder eine  $N-R_8$ -Gruppe darstellt, wobei  $R_8$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt;

$L$  eine gegebenenfalls substituierte, 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthaltende Kohlenwasserstoffverknüpfung darstellt;

und

$m$  0 oder 1 ist.

3. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach Anspruch 1, die durch die allgemeine Formel (I)



dargestellt sind, wobei

R<sub>1</sub>, Y, Z, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, X, Q, n und p wie vorstehend definiert sind;

T ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom oder eine N-R<sub>7</sub>-Gruppe darstellt;

V ein Sauerstoffatom, ein Schwefelatom, eine -COO-Gruppe, eine CONH-Gruppe oder eine NHCO-Gruppe oder eine -PO<sub>3</sub>H-Gruppe, eine NH-Arylen-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Gruppe oder eine N-R<sub>8</sub>-Gruppe darstellt;

R<sub>7</sub> und R<sub>8</sub> unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellen;

L eine gegebenenfalls substituierte, 2 bis 20 Kohlenstoffatome enthaltende Kohlenwasserstoffverknüpfung darstellt;

m 0 oder 1 ist; und

M den Rest einer Trägermatrix darstellt.

4. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei M den Rest einer Trägermatrix darstellt, die eine beliebige Verbindung oder ein beliebiges Material, teilchenförmig oder nicht-teilchenförmig, löslich oder unlöslich, porös oder nicht-porös, sein kann, die/das zusammen mit Affinityliganden verwendet werden kann, um ein neues Affinityligand-Matrix-Konjugat nach einem der vorangehenden Ansprüche zu bilden, und die/das ein günstiges Mittel zum Abtrennen der Affinityliganden von gelösten Stoffen in einer Kontaktlösung bereitstellt.

5. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>1</sub> eine Phenyl- oder Naphthylgruppe darstellt, wobei jede davon gegebenenfalls am Benzol- oder Naphthalinring mit einem oder mehreren, unabhängig voneinander ausgewählt aus Hydroxygruppen und Carbonsäuregruppen, substituiert ist.

6. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>2</sub> ein Wasserstoffatom darstellt.

7. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>3</sub> ein Wasserstoffatom darstellt.

8. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

9. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

10. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>6</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

11. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei R<sub>7</sub> ein Wasserstoffatom darstellt.

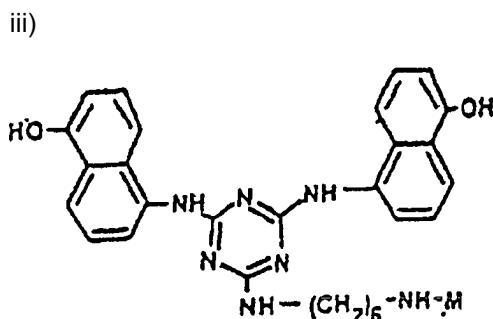
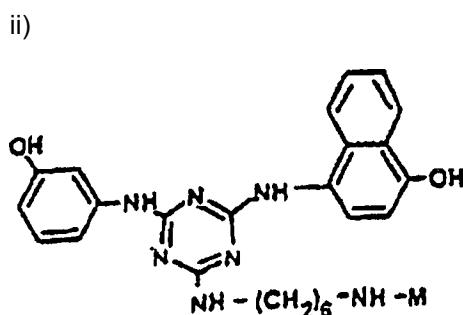
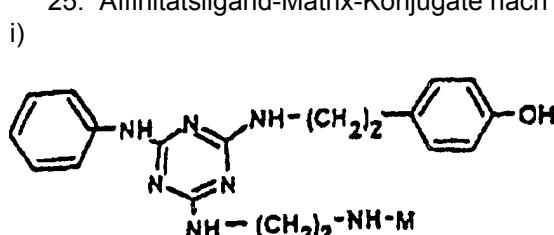
12. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei T ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe darstellt.

13. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Y N-R<sub>2</sub> darstellt, wobei R<sub>2</sub> wie vorstehend definiert ist.

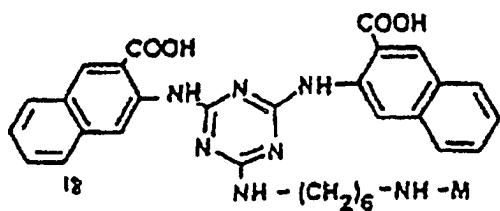
14. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Z N-R<sub>3</sub> darstellt, wobei R<sub>3</sub> wie vorstehend definiert ist.

15. Affinityligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei beide X ein Stickstoffatom darstellen.

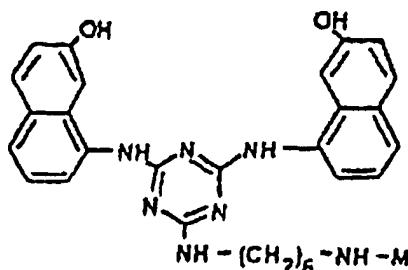
16. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei Q einen Benzol- oder Naphthalinring darstellt.
17. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei n 0 oder 2 darstellt.
18. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei p 0 oder 2 darstellt.
19. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei m 0 oder 1 darstellt.
20. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei L eine Ethyl-, Propyl-, Hydroxypropyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Octyl- oder Decylgruppe darstellt und V und m wie vorstehend definiert sind.
21. Affinitätsligand-Matrix-Konjugat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei V ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe darstellt und L und m wie vorstehend definiert sind.
22. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei m 1 darstellt und L und V wie vorstehend definiert sind.
23. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Rest einer Trägermatrix M gegebenenfalls aktivierte/s Agarose, Siliciumdioxid, Cellulose, Glas, Toyopearl, Hydroxyethylmethacrylat, Polyacrylamid, Styroldivinylbenzol, Hyper D, Perfluorkohlenstoffe darstellt.
24. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach Anspruch 23, wobei M gegebenenfalls Tresyl-aktivierte, Sulfonylchlorid-aktivierte, Tosyl-aktivierte, Vinylsulfon-aktivierte oder Epoxy-aktivierte Agarose darstellt.
25. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche, ausgewählt aus



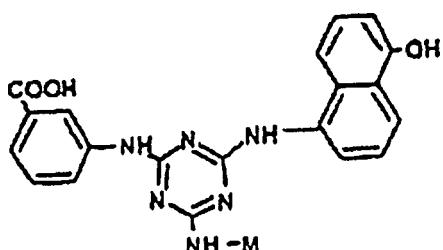
iv)



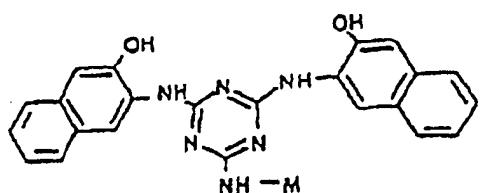
v)



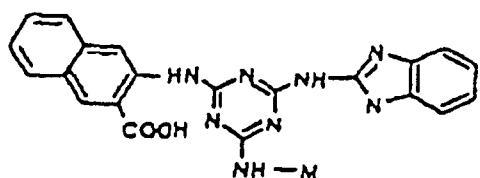
vi)



vii)



viii)



wobei M wie vorstehend definiert ist.

26. Verfahren zur Herstellung der neuen wie in einem der vorangehenden Ansprüche definierten Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, umfassend die Umsetzung in beliebiger Reihenfolge einer heterocyclischen Halogenverbindung der Allgemeinen Formel (II)

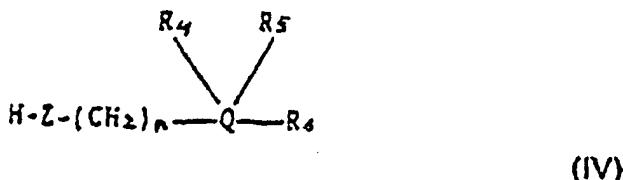


wobei die Symbole X die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen und W ein Halogenatom darstellt, mit

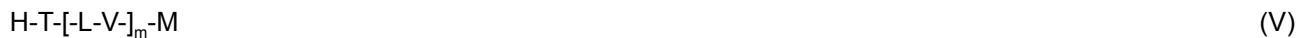
(i) einer Verbindung der Allgemeinen Formel (III)



wobei die Symbole  $R_1$ ,  $p$  und  $Y$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen, (ii) einer Verbindung der Allgemeinen Formel (IV)



wobei die Symbole  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $Q$ ,  $Z$  und  $n$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen, und  
 (iii) einer gegebenenfalls derivatisierten Trägermatrix der Allgemeinen Formel (V)



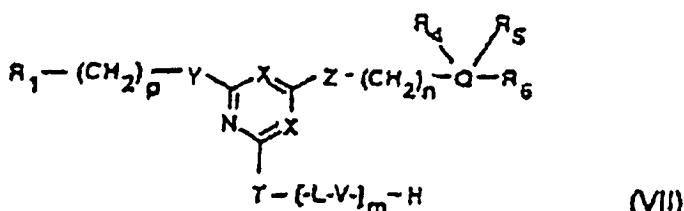
wobei die Symbole L, M, V, T und m die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen.

27. Verfahren zur Herstellung der neuen wie in einem der vorangehenden Ansprüche definierten Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, umfassend das Umsetzen in beliebiger Reihenfolge einer wie in Anspruch 26 definierten heterocyclischen Halogenverbindung der Allgemeinen Formel (II) mit

- hierten heterocyclischen Halogenverbindung der Allgemeinen Formel (II) mit  
(i) einer wie in Anspruch 26 definierten Verbindung der Allgemeinen Formel (III),  
(ii) einer wie in Anspruch 26 definierten Verbindung der Allgemeinen Formel (IV) und  
(iii) mit einer Verknüpfungseinheit der Allgemeinen Formel (VI)

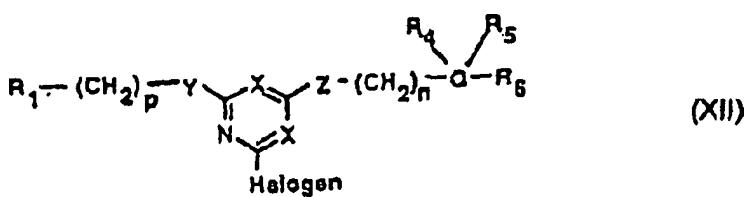


wobei die Symbole L, V und T die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen, um eine Verbindung der Allgemeinen Formel (VII) zu erhalten.



wobei  $R_1, R_4, R_5, R_6, T, Q, L, V, X, Y, Z, m, n$  und  $p$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen,  
gefolgt von der Umsetzung der Verbindung der Allgemeinen Formel (VII) mit einem Matrixträger.

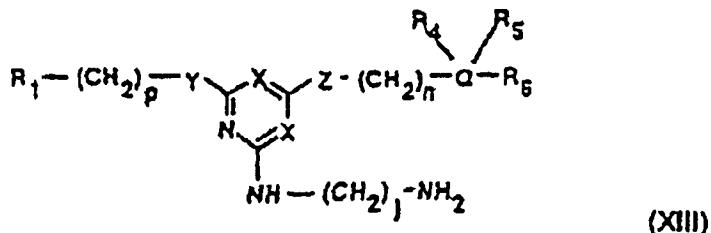
## 28. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XII)



wobei R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, Q, X, Y, Z, n und p die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen und Halogen ein Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatom darstellt, mit der Maßgabe dass Formel (XII) nicht die Verbindungen 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3'-sulfonsäure, 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure und 4-Chlor-2-(4"-aminophenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure umfasst.

29. Verfahren zum Anlagern von neuen Affinitätsliganden der wie in Anspruch 28 beanspruchten Allgemeinen Formel (XII) an eine Matrix der wie in Anspruch 26 definierten Allgemeinen Formel (V) durch Umsetzen der neuen Affinitätsliganden mit der Matrix bei Temperaturen zwischen  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $121^{\circ}\text{C}$  gegebenenfalls in Gegenwart eines Säurebindemittels.

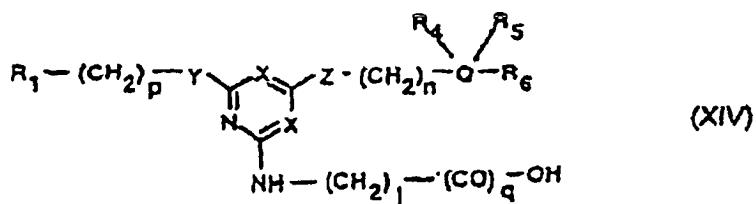
## 30. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XIII)



wobei  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen und  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

31. Verfahren zur Herstellung von neuen Affinitätsliganden der wie in Anspruch 30 beanspruchten Allgemeinen Formel (XIII) durch Umsetzen einer wie in Anspruch 28 beanspruchten Verbindung der Allgemeinen Formel (XII) mit einem Alkylendiamin der Allgemeinen Formel  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_j-\text{NH}_2$  bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C in Gegenwart eines Säurebindemittels.

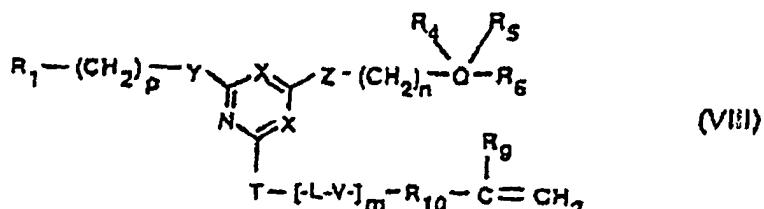
## 32. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XIV)



wobei  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen,  $q$  0 oder 1 ist und  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

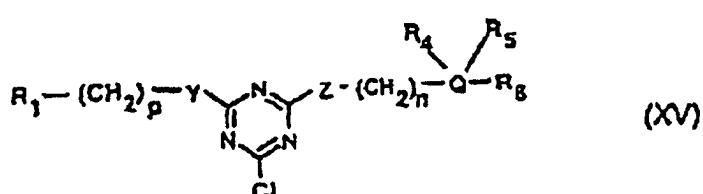
33. Verfahren zur Herstellung von wie in Anspruch 32 beanspruchten neuen Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XIV) durch Umsetzen einer wie in Anspruch 28 beanspruchten Verbindung der Allgemeinen Formel (XII) mit einer Hydroxyverbindung der Allgemeinen Formel  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_j-(\text{CO})_q-\text{OH}$  bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C in Gegenwart eines Säurebindemittels.

## 34. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (VIII)



wobei  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{L}$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{T}$ ,  $\text{V}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$ ,  $\text{Z}$ ,  $\text{m}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen,  $\text{R}_9$  ein Wasserstoffatom oder eine 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltende Alkylgruppe darstellt,  $\text{R}_{10}$  eine Carbonylgruppe, eine Methylengruppe, eine  $-\text{NH}-\text{CH}_2$ -Gruppe oder eine  $-\text{S}-\text{CH}_2$ -Gruppe darstellt.

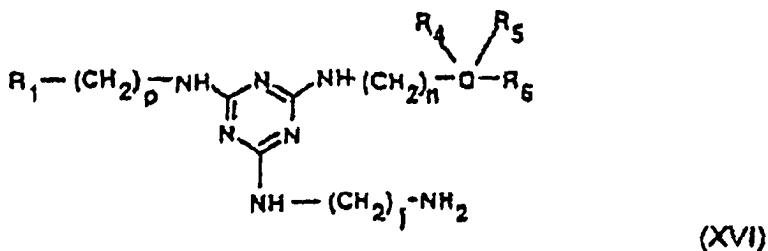
## 35. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XV)



wobei  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{Q}$ ,  $\text{n}$  und  $\text{p}$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen, mit der Maßgabe dass Formel (XV) nicht die Verbindungen 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3'-sulfonsäure, 4-Chlor-2,6-di(phenylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfon-säure und 4-Chlor-2-(4"-aminophenoxy)-1,3,5-triazin-2,6-diol-4-säure darstellt.

nylamino)-1,3,5-triazin-3',2"-disulfonsäure umfasst.

### 36. Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XVI)



wobei  $R_1, R_4, R_5, R_6, Q, n$  und  $p$  die in einem der vorangehenden Ansprüche spezifizierte Bedeutung aufweisen und  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

37. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei R, eine Phenyl- oder Naphthylgruppe darstellt, wobei jede davon gegebenenfalls am Benzol- oder Naphthalinring mit einem oder mehreren, unabhängig voneinander ausgewählt aus Hydroxygruppen und Carbonsäuregruppen, substituiert ist.

38. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

39. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei R<sub>5</sub> ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

40. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei  $R_6$  ein Wasserstoffatom, eine Hydroxygruppe, eine Carbonsäuregruppe oder eine Aminogruppe darstellt.

41. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei Q einen Benzol- oder Naphthalinring darstellt.

42. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32 oder 34, wobei X ein Stickstoffatom darstellt.

43. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34 oder 35, wobei Y eine -NH-Gruppe darstellt.

44. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34 oder 35, wobei Z eine -NH-Gruppe darstellt.

45. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei n 0 oder 2 ist.

46. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28, 30, 32, 34, 35 oder 36, wobei  $p = 0$  oder  $2$  ist.

47. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 30, 32 oder 36, wobei  $j$  2, 4 oder 6 ist.

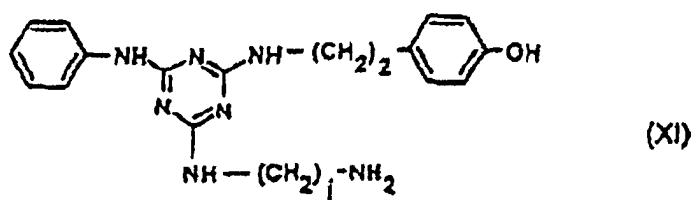
48. Affinitätsliganden nach Anspruch 34, wobei L eine Ethyl-, Butyl- oder Hexylgruppe ist.

49. Affinitätsliganden nach Anspruch 34, wobei T eine -NH-Gruppe darstellt.

50. Affinitätsliganden nach Anspruch 34, wo bei V eine -NH-Gruppe darstellt

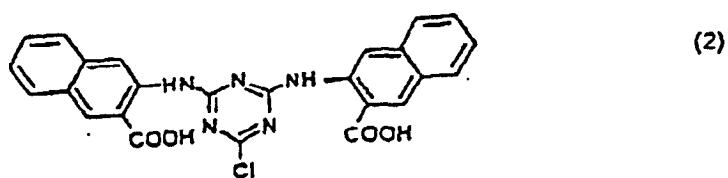
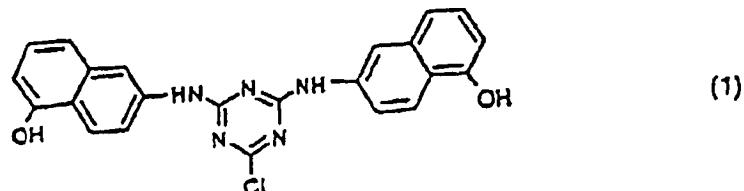
### 51 Affinitätsliganden nach Anspruch 34, wobei m 1 ist

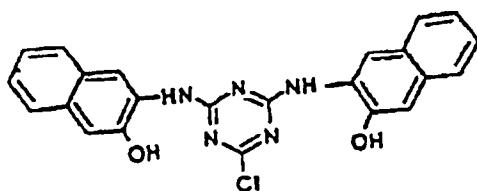
## 52 Neue Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XII)



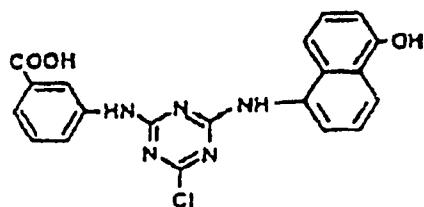
wobei  $j$  eine ganze Zahl zwischen 2 und 20 ist.

53. Affinitätsliganden nach einem der Ansprüche 28 bis 51, ausgewählt aus

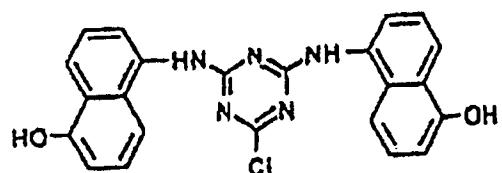




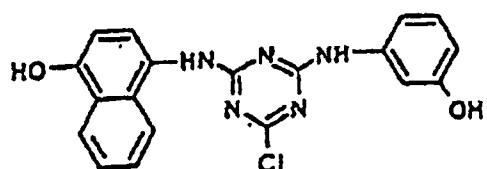
(3)



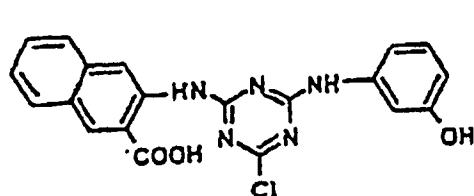
(4)



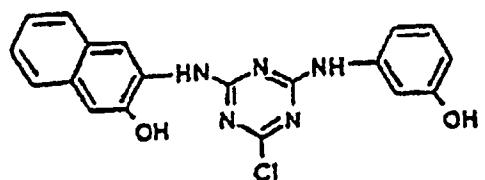
(5)



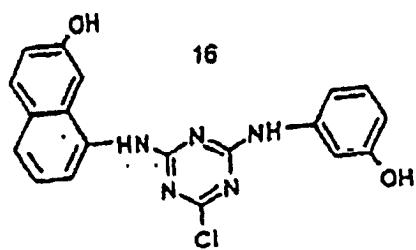
(6)



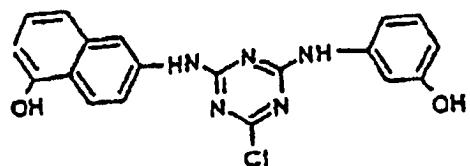
(7)



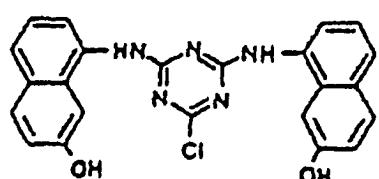
(8)



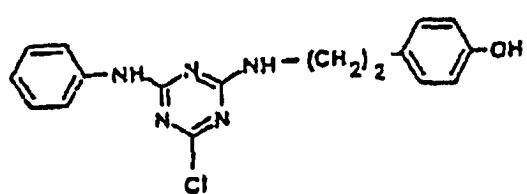
(9)



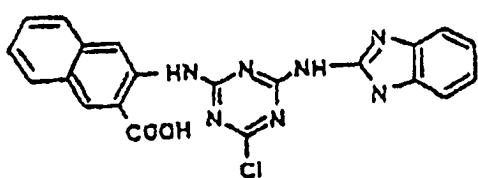
(10)



(11)



(12)



(13)

54. Verwendung von Affinitätsliganden nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Herstellung von Affinitätsligand-Matrix-Konjugaten.

55. Verfahren zum Anlagern der neuen Affinitätsliganden der Allgemeinen Formeln (VII), wie in Anspruch 27 definiert, und (XIII), wie in Anspruch 30 definiert, (XVI), wie in Anspruch 36 definiert, und (XI), wie in Anspruch 52 definiert, an Kohlenhydrat- oder organischen Polymermatrices durch Umsetzen der Kohlenhydrat- oder organischen Polymermatrix mit einem Aktivierungsmittel, gefolgt von der Umsetzung der aktivierten Matrix mit dem neuen Affinitätsliganden gegebenenfalls in Gegenwart eines Säurebindemittels.

56. Verfahren zum Anlagern der neuen Affinitätsliganden der wie in Anspruch 32 definierten Allgemeinen

Formel (XIV) an Kohlenhydrat- oder organischen Polymermatrices durch Kondensation mit der Matrix.

57. Verfahren zum Anlagern der neuen Affinitätsliganden der Allgemeinen Formeln (VII), wie in Anspruch 27 definiert, und (XIII), wie in Anspruch 30 definiert, (XVI), wie in Anspruch 36 definiert, und (XI), wie in Anspruch 52 definiert, an gegebenenfalls mit einem organischen Polymer beschichtete Metalloxid-, Glas- oder Siliciumdioxidmatrices durch Umsetzen der gegebenenfalls beschichteten Metalloxid-, Glas- oder Siliciumdioxidmatrix mit einem Aktivierungsmittel, gefolgt von der Umsetzung der aktivierten Matrix mit dem neuen Affinitätsliganden gegebenenfalls in Gegenwart eines Säurebindemittels.

58. Verfahren zum Anlagern der neuen Affinitätsliganden der wie in Anspruch 32 definierten Allgemeinen Formel (XIV) an gegebenenfalls mit einem organischen Polymer beschichtete Metalloxid-, Glas oder Siliciumdioxidmatrices durch Kondensation mit der Matrix.

59. Verfahren zum Anlagern von neuen Affinitätsliganden der Allgemeinen Formel (XV), wie in Anspruch 35 definiert, und (XII), wie in Anspruch 28 definiert, an eine Matrix der wie in Anspruch 26 definierten Allgemeinen Formel (V) durch Umsetzen der neuen Affinitätsliganden mit der Matrix bei Temperaturen zwischen –20°C und 121°C gegebenenfalls in Gegenwart eines Säurebindemittels.

60. Affinitätsligand-Matrix-Konjugate, hergestellt wie in den Ansprüchen 26, 27, 29, 54, 55, 56, 57 und 58 beansprucht.

61. Verwendung der Affinitätsligand-Matrix-Konjugate nach einem der vorangehenden Ansprüche als Affinitätsligand-Matrix-Konjugate zur Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifizierung oder Quantifizierung von Proteinen.

62. Verwendung nach Anspruch 61, wobei es sich bei dem proteinhaltigen Material um IgG, IgM, IgA, Insuline, Faktor VII oder Menschliches Wachstumshormon oder Analoga, Derivate und Fragmente davon und Vorstufen handelt.

63. Verfahren zur Abtrennung oder Reinigung von proteinhaltigen Materialien, umfassend das Durchführen von Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Liganden der wie vorstehend definierten allgemeinen Formel (a) als den biospezifischen Liganden.

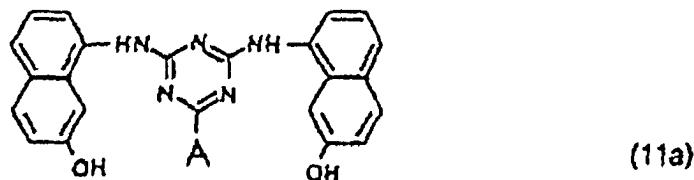
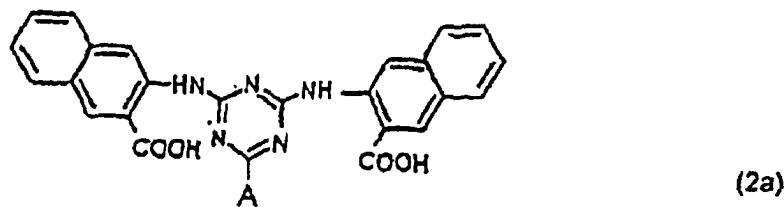
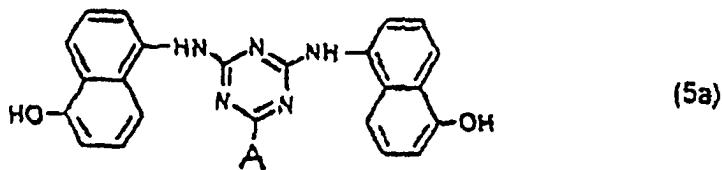
64. Verwendung nach Anspruch 61, wobei es sich bei dem proteinhaltigen Material um Immunglobuline oder Unterklassen, Fragmente, Vorstufen oder Derivate davon handelt, die entweder von natürlichen oder rekombinanten Quellen abgeleitet sind.

65. Verwendung nach Anspruch 61, wobei es sich bei dem proteinhaltigen Material um Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin A (IgA) oder Unterklassen, Fragmente, Vorstufen oder Derivate davon handelt, die entweder von natürlichen oder rekombinanten Quellen abgeleitet sind.

66. Verwendung nach Anspruch 61, wobei es sich bei dem proteinhaltigen Material um Insuline oder Insulinanaloga, Derivate und Fragmente davon und Vorstufen handelt, die entweder von natürlichen oder rekombinanten Quellen abgeleitet sind.

67. Verwendung nach Anspruch 61, wobei es sich bei dem proteinhaltigen Material um FVII oder Analoga, Derivate und Fragmente davon und Vorstufen handelt, die von natürlichen oder rekombinanten Quellen abgeleitet sind.

68. Verwendung nach Anspruch 61, wobei die Affinitätsligand-Matrix-Konjugate einen Liganden umfassen, der aus Folgendem ausgewählt ist:



wobei der Ligand gegebenenfalls durch einen Abstandhalterarm der durch die wie vorstehend spezifizierte allgemeine Formel (b) dargestellt wird, an eine Trägermatrix in Position (A) angelagert ist.

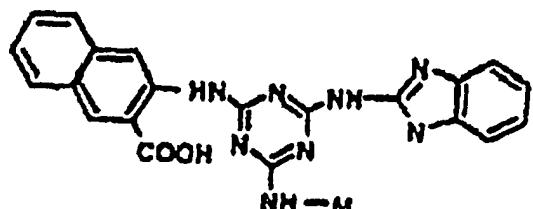
69. Verwendung nach Anspruch 68, wobei es sich bei dem Liganden um 11 a handelt.

70. Verwendung nach Anspruch 68 oder 69, wobei es sich bei der Trägermatrix um gegebenenfalls aktivierte Agarose, Cellulose, Siliciumdioxid oder Glas handelt.

71. Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifizierung oder Quantifizierung von Immunoglobulinen durch ein beliebiges Verfahren, wodurch die Immunglobuline auf wie in einem der vorstehenden Ansprüche für Affinitätsligand-Matrix-Konjugate definierte Affinitätsligand-Matrix-Konjugate bei einem pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 12,0 aufgebracht und anschließend durch Senken des pH-Werts auf 4,9 oder niedriger entfernt, eluiert oder desorbiert werden.

72. Abtrennung, Isolierung, Reinigung, Charakterisierung, Identifizierung oder Quantifizierung von Insulinen oder Insulinanaloga oder Derivaten davon und Vorstufen durch ein beliebiges Verfahren, wodurch die Insuline auf wie in einem der vorstehenden Ansprüche für Affinitätsligand-Matrix-Konjugate definierte Affinitätsligand-Matrix-Konjugate bei einem pH-Wert im Bereich von 4,0 bis 9,0 aufgebracht und anschließend durch Senken des pH-Werts auf 3,99 oder niedriger oder 9,01 oder höher entfernt, eluiert oder desorbiert werden.

73. Abtrennung von rekombinantem FVIIa durch selektives Binden von FVIIa an die Affinitätsmatrix der Formel (viii)



wobei M Aminogruppen tragende Agarose ist, von Zellkulturmedien, wobei der FVIIa auf das Affinitätsligand-Matrix-Konjugat in Gegenwart von 5 mM Ca<sup>2+</sup> aufgebracht und anschließend eluiert wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen