

423.152

PATENTE DE INVENCION

Le A 14 345-Sp.

F.C. 24-IV-75

29 MAR.



Int. Cl.<sup>2</sup>: C08F; C07G

## Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PREPARADOS DE  
PROTEINA INSOLUBLES EN AGUA.

*Solicitante:* BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en  
Leverkuser.-Bayerwerk, República Federal Alemana.

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nuevos preparados de proteína insolubles en agua, que se caracterizan por el hecho de que se tratan de proteínas que están fijadas en nuevos copolimerizados reticulados capaces de hincharse. Estos nuevos preparados son

5.



adecuados para la realización de reacciones catalizables por enzimas.

- El enlace covalente de sustancias a soportes polímeros insolubles adquirió en los últimos años cada vez mayor importancia. Ofrece ventajas particulares la fijación de compuestos catalíticamente eficaces, por ejemplo enzimas, en virtud de que en esta forma, una vez terminada la reacción pueden ser separados fácilmente y aplicados nuevamente repetidas veces.
- 5.
10. Como soportes con grupos reactivos ya se propusieron varias veces copolimerizados de anhídrido de ácido maléico y de compuestos de vinilo. Copolímeros del anhídrido de ácido maléico con etileno y compuestos monovinílicos, sin embargo, en la reacción con soluciones acuosas de enzima llegan a ser más o menos hidrosolubles, con el resultado de que antes de o durante la reacción convenientemente debe agregarse un agente reticulante adicional, por ejemplo una diamina. Los preparados de enzima así obtenidos son filtrables en forma relativamente mala y comprenden componentes solubles, lo que
- 15.
20. conduce a pérdidas en enzima fijada (compárese: E. Katschalski, *Biochemistry* 3, (1964), páginas 1905-1919).
- Además, fueron descritos copolimerizados de acrilamida y ácido maléico que por calentamiento posterior son transformados en la forma de anhídrido. Estos productos están reticulados en forma relativamente débil, se hinchan muy fuertemente en agua y poseen una estabilidad mecánica tan solo moderada, lo que conduce a pérdidas por fricción en la aplicación de estas resinas (compárese: Patente alemana publicada no examinada No. 1.908.290).
- 25.
30. Además, fueron preparados polímeros de soporte fuer-



5. temente reticulados por copolimerización de anhídrido de ácido maléico con éteres divinílicos. Debido al tipo alternante de copolimerización de los monómeros, esos polímeros contienen una proporción muy elevada de grupos anhídrido - en los ejemplos indicados, cada vez más de 50 % en peso de anhídrido de ácido maléico - cuya proporción es determinada por el peso molecular del monómero éter vinílico y, por ésto, puede ser adaptada tan solo dentro de límites relativamente estrechos a la respectiva finalidad de aplicación (compárese: Patente alemana publicada no examinada No. 2.008.996).

10. El problema a soluciones por el presente invento, era aquél de encontrar nuevos productos de reacción de proteínas y péptidos con nuevos copolimerizados fuertemente reticulados hinchables en agua con un contenido fuertemente variable de grupos cíclicos de anhídrido de ácido dicarboxílico y un  
15. procedimiento para su producción. Los nuevos productos de reacción de proteínas y péptidos con los nuevos copolimerizados no deben tener o tan solo deben tener a un grado insignificante las desventajas de los preparados de proteína hasta ahora conocidos.  
20.

El problema fué solucionado de tal manera que, según los métodos de polimerización en suspensión o de precipitación, anhídridos de ácidos dicarboxílicos  $\alpha, \beta$ -monoolefinicamente insaturados y di- o poli-acrilatos o -metacrilatos de dioles  
25. o polioles fueron polimerizados a formar copolimerizados estadísticamente sintetizados y estos copolimerizados según la invención se hicieron reaccionar con soluciones acuosas de proteína a formar preparados de proteína.

30. Por consiguiente, constituyen el objeto de la invención proteínas fijadas en copolimerizados reticulados que cons



tan de unidades copolimerizadas de

5. A) 0,1 a 50 % en peso, preferiblemente 2 a 20 % en peso de anhídridos de ácidos dicarboxílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -monoolefinicamente insaturados con 4 a 9 átomos de carbono y
- B) 99,9 a 50 % en peso, preferiblemente 80 a 98 % en peso de di- y/o poli-acrilatos o -metacrilatos de di- y/o polioles.

10. Los copolimerizados reticulados poseen volúmenes por peso de 2 a 20 ml/g, superficies específicas de 1 a 400 m<sup>2</sup>/g y, después de la saponificación de los grupos anhídrido, contienen 0,02 a 10 miliequivalentes de ácido por gramo.

15. Además, constituye el objeto de la invención un procedimiento para la producción de estos preparados de proteína, caracterizado porque -calculado sobre los monómeros en total-

20. A) 0,1 a 70 % en peso, preferiblemente 2 a 35 % en peso de anhídridos de ácidos dicarboxílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -monoolefinicamente insaturados con 4 a 9 átomos de carbono y
- B) 99,9 a 30 % en peso, preferiblemente 98 a 65 % en peso de di- y/o poli-acrilatos o -metacrilatos de di- y/o polioles,

25. se polimerizan según el método de la polimerización de precipitación o el de la polimerización en suspensión en disolventes o mezclas de disolventes inertes para grupos anhídrido, a temperaturas de 20 a 200°C en presencia de compuestos formadores de radicales, y los copolimerizados así obtenidos se hacen reaccionar con soluciones de proteína bajo formación de

30. los preparados de proteína según la invención.



Finalmente, constituye el objeto de la invención la aplicación de preparados de enzima insolubles en agua obtenidos según el invento para la realización de reacciones catalizables por enzimas.

5. Sobre la preparación de los copolimerizados requeridos como productos de partida para la síntesis de preparados de proteína, cabe decir lo que sigue:

10. Como anhídridos de ácidos dicarboxílicos  $\alpha, \beta$ -monoolefinicamente insaturados con 4 a 9 átomos de carbono, preferiblemente con 4 a 5 átomos de carbono, que se necesitan para la producción de los copolimerizados, sean mencionados particularmente: anhídrido de ácido maléico, itacónico o citracónico, especialmente el anhídrido de ácido maléico. Para la copolimerización pueden aplicarse también mezclas de estos anhídridos.

15. Los di- y/o polimetacrilatos o los di- y/o poli-acrilatos de dioles y/o polioles a aplicar según la invención, se derivan de compuestos con por lo menos dos grupos OH alcohólicos o fenólicos, preferiblemente alcohólicos, respectivamente de sus productos de reacción con óxidos de alquileo de 2 a 8 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono, o mezclas de estos óxidos de alquileo, estando copolimerizado con 1 mol del compuesto que lleva grupos hidroxilo, 1 a  $10^4$ , preferiblemente 1 a 20 partes estructurales de óxidos de alquileo. A título de ejemplo sean mencionados óxidos de alquileo: los óxidos de etileno, propileno, butileno, trimetileno y tetrametileno, el bis-clorometil-oxaciclobutano y el óxido de estireno, preferiblemente el óxido de etileno y el óxido de propileno. También es absolutamente posible aplicar productos de reacción de compuestos con por lo menos 2 áto-

20.

25.

30.

-4-13132



mos de hidrógeno reactivos de Zerewitinoff, que no se derivan de alcoholes o fenoles, con los precitados óxidos de alquileo para la producción de los di- y/o poli-acrilatos o -metacrilatos.

5. Los di- y poli-acrilatos y -metacrilatos de dioles y polioles a aplicar según la invención, son obtenidos según métodos conocidos, por ejemplo, por reacción de los dioles y/o polioles con cloruro de ácido acrílico, respectivamente ácido metacrílico en presencia de cantidades aproximadamente equimolares, calculados sobre cloruro de ácido, de aminas terciarias, por ejemplo trietilamina, a temperaturas inferiores a 20°C, en presencia de benceno (compárese: Patente alemana publicada no examinada No. 1.907.666).
10. Como dioles, respectivamente polioles con por lo menos 2 átomos de carbono, preferiblemente 2 a 12 átomos de carbono, entran en consideración, por ejemplo, etilenglicol, propandiol-1,2, propandiol-1,3, butandioles, particularmente butandiol-1,4, hexandioles, decandioles, glicerina, trimetilolpropano, pentaeritrita, sorbita, sucrosa y sus productos de reacción con óxidos de alquileo, tales como los precedentemente indicados. También poli-bis-clorometil-oxaciclobutano y óxido de poliestireno son apropiados. Pueden aplicarse también mezclas de dioles y polioles.
15. De preferencia, se emplean diacrilatos o dimetacrilatos de dioles con 2 a 4 átomos de carbono y/o productos de reacción de 1 mol de estos dioles con 1 a 20 moles de óxido de alquileo con 2 a 4 átomos de carbono, respectivamente trimetacrilato de trimetilolpropano.
20. Son particularmente ventajosos los dimetacrilatos de etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetractilen-
- 25.
- 30.



glicol o polialquilenglicoles superiores de un peso molecular de hasta 1000 o sus mezclas.

5. Si se desea, además de los di- y/o poliacrilatos o -metacrilatos a emplear según la invención, podrían agregarse también agentes reticulantes usualmente empleados con por lo menos 2 ligaduras dobles no conjugadas, por ejemplo adipato de divinilo, bisacrilamida de metileno, triacrilformal o cianurato de trialilo en cantidades de aproximadamente 0,01 a 30 % en peso de la mezcla de monómeros.
10. Gracias a la posible amplitud de variaciones en la composición de la mezcla de monómeros, dentro de un margen muy amplio, pueden adaptarse a la respectiva finalidad de aplicación la hidrofilia, la densidad de reticulación, la capacidad de hinchamiento y el contenido de grupos anhídrido de los copolimerizados según la invención.
15. La polimerización puede ser realizada, por ejemplo, en un disolvente orgánico, como polimerización de precipitación, en la cual los polímeros empiezan a precipitarse ya brevemente después del comienzo de la polimerización. De por sí son apropiados todos los disolventes inertes para grupos anhídrido. Disolventes particularmente ventajosos son hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos y aromáticos, así como hidrocarburos halógeno-sustituídos, hidrocarburos alquilo-aromáticos y ésteres de ácidos carboxílicos.
20. A título de ejemplo, sean mencionados: heptano, octano, isooctano, fracciones de bencina con puntos de ebullición de aproximadamente 60 a 200°C, ciclohexano, benceno, tolueno, xilenos, clorobenceno, diclorobencenos, acetato de etilo, acetato de butilo.
25. Los disolventes deben tener preferiblemente un punto
- 30.



- de ebullición de por lo menos 60°C y deben ser bien eliminables en vacío del polimerizado de precipitación. Para 1 parte de la mezcla de monómeros, se aplican unas 2 a 50, preferiblemente 5 a 20 partes en peso del disolvente. Sobre las propiedades de los copolimerizados, particularmente el peso y la superficie específica tienen influencia esencial la clase y cantidad del disolvente.
- 5.
- En muchos casos es ventajoso emplear mezclas de los precipitados disolventes o bien iniciar la polimerización en un disolvente para el polímero y durante el desarrollo de la polimerización agregar continuamente un agente de precipitación para el polímero. El agente de precipitación puede ser agregado también en determinados momentos en una o varias porciones. Además la mezcla de monómeros puede ser aplicada conjuntamente con un agente iniciador como solución o, sin disolvente, en una cantidad dispuesta de disolvente, de modo que durante la polimerización se mantiene una concentración baja uniforme de monómeros. Por aplicación de monómeros de acrílico o metacrílico de diferente hidrofilia y por variación de las condiciones de polimerización, pueden prepararse, dentro de un margen muy amplio, productos de buena estabilidad mecánica con una capacidad de hinchamiento, una densidad y una superficie específica adaptadas a la respectiva finalidad de aplicación.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- Los copolimerizados según la invención pueden ser producidos también por polimerización en suspensión. El tipo más usual de la polimerización en suspensión, en la cual los monómeros, eventualmente bajo adición de un disolvente orgánico, son suspendidos en agua, puede ser aplicada en este caso tan sólo con poco éxito, en vista de que el anhídrido es hidro



- lizado muy rapidamente, el ácido dicarboxílico formado pasa principalmente a la fase acuosa y es incorporado tan solo en pequeña cantidad en el polímero. Por esta razón, la polimerización en suspensión es realizada convenientemente en un medio orgánico. Los monómeros y el agente iniciador se disuelven en un disolvente inmiscible con parafinas e inertes para grupos anhídrido, tal como por ejemplo, acetonitrilo, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo o triamida de ácido hexametilfosfórico y, en la mayoría de los casos, se distribuyen bajo adición de agentes dispersantes en la fase coherente. Como fase coherente, son particularmente apropiados hidrocarburos de parafina, tales como hexano, heptano, octano y homólogos superiores; hidrocarburos cicloalifáticos, tales como ciclohexano, así como mezclas de parafinas, tales como fracciones de bencina o aceite de parafina. La proporción en volumen de fase coherente:fase de monómeros es de 1:1 hasta 10:1, preferiblemente de 2:1 hasta 5:1.
- Para la estabilización de la suspensión, pueden aplicarse, por ejemplo, mono- y dioleatos de glicerina, así como mezclas de estos compuestos, mono- y trioleatos o -estearatos de sorbitán, monoésteres de polietilenglicol con alcohol estearílico o laurílico o nonilfenol, monoésteres de polietilenglicol con ácido oléico, ácido esteárico y otros ácidos grasos con más de 10 átomos de carbono, así como la sal sódica del éster dietílico de ácido sulfosuccínico. Estas sustancias son aplicadas en cantidades de preferiblemente 0,1 a 10 %, calculadas sobre la mezcla de monómeros y, por lo general, son disueltas en la fase de hidrocarburo. El tamaño de partícula de los polimerizados en suspensión puede ser reducido, además de por el aumento de la velocidad de agitación, por la adición
- 5.
  - 10.
  - 15.
  - 20.
  - 25.
  - 30.



de un 0,1 a 2 %, calculado sobre los monómeros; de una sustancia tensioactiva ulterior, por ejemplo de un sulfonato de alquilo.

5. La polimerización es provocada por agentes iniciadores radicálicos. Agentes iniciadores apropiados son por ejemplo compuestos azóicos o per-compuestos. El compuesto azóico más usual para provocar la polimerización, es el nitrilo de ácido azoisobutírico. Como per-compuestos entran en consideración principalmente peróxidos de diacilo, tal como peróxido de dibenzoilo, o percarbonatos, tales como los percarbonatos de diisopropilo y de dicitclohexilo; sin embargo, pueden emplearse para la iniciación de la polimerización también peróxidos dialquílicos, hidroperóxidos y sistemas redox (de reducción-oxidación) eficaces en disolventes orgánicos.

10. Los agentes iniciadores son agregados en cantidades de un 0,01 a 10 %, preferiblemente de un 0,1 a 3 %, calculado sobre la cantidad en peso de la mezcla de monómeros.

15. La polimerización es realizada a temperaturas de unos 20 a 200°C, preferiblemente de 50 a 100°C, en dependencia de la velocidad de descomposición de los agentes iniciadores y, en la mayoría de los casos, a una temperatura inferior al punto de ebullición de los disolventes y, en el caso de la polimerización en suspensión, a una temperatura inferior a la temperatura de mezclamiento de las dos fases. Además, por regla general, es ventajoso polimerizar en una atmósfera inerte bajo ausencia de oxígeno.

20. Los copolimerizados obtenidos por polimerización de precipitación, son sustancias pulverulentas incoloras hasta debilmente amarillas con volúmenes por peso de 1,5 a 30 ml/g, preferiblemente de 2 a 20 ml/g y con superficies específicas

25.  
30.



de 0,1 a 500 m<sup>2</sup>/g, preferiblemente de 1 a 400 m<sup>2</sup>/g. El contenido de grupos carboxilo determinado titrimetricamente después de la saponificación de los grupos anhídrido, es de 0,02 a 10 miliequivalentes/g, preferiblemente de 0,4 a 4 miliequivalentes/g.

5.

Los polimerizados en suspensión son perlas blancas o debilmente coloreadas que, en algunos casos, pueden tener una forma irregular y un diámetro de 0,03 a 1 mm preferiblemente de 0,05 a 0,5 mm y volúmenes por peso de aproximadamente 1,4 a 8 mg/g, preferiblemente de 1,4 a 5 ml/g. Su contenido de grupos carboxilo determinado después de la hidrólisis de los grupos anhídrido, es de 0,02 a 10 miliequivalentes/g, preferiblemente de 0,4 a 4, miliequivalentes/g.

10.

Los copolimerizados según la invención contienen las unidades copolimerizadas estadísticamente distribuidas. Gracias a su elevada densidad de reticulación, los copolimerizados son insolubles en todos los disolventes. Por ésto, no pueden determinarse pesos moleculares.

15.

Los copolimerizados pueden hincharse en agua a 1,1 hasta 2,5 veces su volumen aparente. Se prestan excelentemente bien como resinas de soporte para la fijación de sustancias que pueden reaccionar con los grupos anhídrido de los copolimerizados.

20.

Las resinas de soporte son introducidas a temperaturas entre 0 y 30°C directamente en la solución acuosa de la sustancia a ligar, preferiblemente en la solución acuosa de una proteína debiéndose mantener constante el valor pH.

25.

Si han de ligarse proteínas a los copolimerizados según la invención, convenientemente se trabaja, mediante un aparato capaz de mantener constante el valor pH, dentro de un

30.

41-3132



5. margen pH de 3 a 10, preferiblemente de 5,5 a 9,0. Si como proteína se aplica penicilinacilasa, convenientemente se trabaja dentro del margen pH de 5,7 y 6,8. Durante la reacción de ligadura, al objeto de mantener constante el margen pH, debe agregarse permanentemente una base, entrando en consideración bases inorgánicas (por ejemplo lejías alcalinas) y bases orgánicas (por ejemplo aminas orgánicas terciarias).

10. En contraposición con experiencias de la literatura con otras resinas, según las cuales la reacción es llevada a cabo en soluciones amortiguadas, los rendimientos de enzima ligada con las resinas arriba descritas eran tanto mejores, cuanto menor era el contenido de sal de las soluciones.

15. La proporción en peso de la sustancia ligada, por ejemplo, proteína o péptido, a la resina de soporte puede variar dentro de límites amplios y puede ser adaptada a la posterior finalidad de aplicación. Se obtienen buenos rendimientos con una proporción de 1 parte en peso de proteína a 4 a 10 partes en peso de soporte polímero. Las proporciones óptimas, sin embargo, dependen tanto de la composición y de la estructura del polímero, como también de la clase de proteína. En el caso de numerosas enzimas es conveniente agregar estabilizadores a la solución de enzima.

20. Como tales entran en consideración polietilenglicoles o agentes reticulantes no iónicos para debilitar la desnaturalización en superficies, así como los conocidos reactivos SH o iones de metal en el caso de enzimas especiales.

25. El tiempo de reacción necesario depende de la clase del polímero. En el caso normal, la reacción queda terminada al cabo de 20 horas a la temperatura ambiente. A 4°C la reacción procede mejor por un tiempo algo más largo.
30. En el caso de



5. cargas preparativas, la carga es interrumpida por el aparato para mantener constante el pH no antes de 2 horas a contar de la terminación de la adición de álcali. Subsiguientemente, el polímero con la proteína ligada es recogido por succión o separado por centrifugación y, el residuo es lavado con soluciones salinas de elevada fuerza iónica, por ejemplo una solución de cloruro de sodio 1-molar, y subsiguientemente con un amortiguador en que la enzima es estable. Por lavado con soluciones de elevada concentración salina, la proteína ionogeenamente ligada es deslizada del soporte.

10. Para examinar el resultado de la ligadura de proteína, en el caso de enzimas, se determinó la actividad enzimática tanto en el polímero, como en la solución restante y las aguas de lavado. En el caso de proteínas sin efecto específico, se determinó el contenido de nitrógeno en el polímero según Kjerdahl. Los rendimientos en la ligadura de proteína son de entre 10 % y más de 90 %. Si se observa la actividad enzimática, en algunos casos, es ventajoso no aplicar un exceso demasiado grande de material de polímero, en vista de que, si bien llega a ser ligada toda la proteína, pero la actividad sufre bajo tal exceso.

15. Las resinas de soporte son apropiadas para ligar todas las sustancias que llevan un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo anhídrido del polímero. En el caso de proteínas y péptidos, se trata principalmente de los grupos amino, en la posición final, de la lisina y de los grupos amino libres en los extremos de cadena de péptidos.

20. Péptidos y proteínas ligados a o fijados en soportes son de gran importancia científica y técnica. Las enzimas que, en la mayoría de los casos, son caras e inestables, son

25.  
30.



sustancialmente estabilizadas por la ligadura a la resina. Además, la recuperación fácil y completa de la resina de enzima permite una aplicación múltiple durante largos lapsos de tiempo.

5. A título de ejemplo, las siguientes sustancias pueden ser fijadas en los copolimerizados según la invención:

Enzimas: Hidrolasas, tales como proteasas, por ejemplo tripsina, quinsotripsina, papaina, elastasa; amidasas, por ejemplo asparaguinasa, glutaminasa, ureasa; aciltransferasas, por ejemplo penicilinasas; liasas, por ejemplo hialorunidasa.

10.

Otras proteínas, tales como componentes de plasma, globulinas (anticuerpos).

Polipéptidos, tales como el inhibidor de calicreina o insulina.

15.

Aminoácidos, tales como lisina o alanina.

Las proteínas aplicadas según el invento, por lo general, son obtenidas de bacterias, hongos, actinomicos o de material animal.

20.

Algunos ejemplos de reacciones técnicamente importantes con enzimas ligadas, son la degradación hidrolítica del almidón por amilasa covalentemente ligada, la clarificación de jugos de fruta entre otros por pectinasa ligada, la producción de hidrolizados de albúmina onzimáticamente gradada, la hidrólisis de penicilinas a formar ácido 6-aminopenicilánico.

25.

Además, enzimas ligadas, péptidos ligados entre otros fueron empleados también para el aislamiento de inhibidores por cromatografía de afinidad y viceversa inhibidores ligados fueron utilizados para el aislamiento de enzimas. Otras aplicaciones están en el sector de la medicina. Es un ejemplo, la aplicación

30.

de 1-asparaguinasa o ureasa ligada en una circulación



extracorporal para la reducción de la concentración de asparagina, respectivamente urea en la sangre.

5. Estas y numerosas otras posibilidades de aplicación fueron descritas en la literatura. Véase al respecto, por ejemplo los resúmenes en Chem.Eng.News del 15.2.1970, página 86 y Rev. Pure a. Appl.Chem. 21, 83 (1971).

10.. Un ejemplo importante para la aplicación de los preparados de proteína según la invención, es el desdoblamiento de penicilinas con la ayuda de penicilinacilasa ligada a los copolimerizados de acuerdo con la invención.

15. Para la preparación de ácido 6-aminopenicilánico (6 APS), penicilinas pueden ser desdobladas con la ayuda de acilasas de microorganismos, tales como por ejemplo, bacterias, particularmente E. Coli, Erwinia, o actinomices, tales como Streptomyces, Micromonospora, Nocardia, y hongos, tales como Fusarium y levaduras.

20. De acuerdo con el procedimiento de la Patente alemana No. 1.111.778, para la preparación de 6-APS, una solución de penicilina G es mezclada con un fango de bacterias que contiene la enzima penicilinacilasa (E.C. 3.5.1.11). Por la reacción de la enzima la agrupación de carbonamida en la cadena lateral de la penicilina es desdoblada, sin que sea producida la apertura del anillo de  $\beta$ -lactama.

25. El empleo de suspensiones de microorganismos tiene las siguientes desventajas:

30. a. La suspensión de microorganismos contiene, además de la penicilinacilasa intracelular, otras proteínas y enzimas, así como componentes del medio de cultivo o sus productos de transformación formados en la fermentación. En la elaboración, estas impurezas no pueden ser total-



mente eliminadas por lavado del 6-APS cristalizado.

- b. La suspensión de microorganismos, desde el punto de vista económico, puede ser aplicada convenientemente tan solo una vez.
- 5. c. La suspensión de microorganismos contiene impurezas y otras enzimas que inactivan la penicilina y/o el 6-APS por apertura del anillo de  $\beta$ -lactama.
- d. La suspensión contiene tan solo pequeñas cantidades de penicilinacilasa. La aplicación de mayor cantidad de material de enzima, por ejemplo para conseguir tiempos de reacción más cortos y, con éstos, mejores rendimientos de 6-APS a menor contenidos de productos ajenos, es prácticamente imposible.
- 10. e. Los rendimientos de 6-APS, en la producción, dependen de la formación oscilante de penicilinacilasa en las respectivas cargas de fermentación.
- 15. f. La separación total de microorganismos suspendidos requiere, en la elaboración de las cargas de 6-APS, una etapa adicional de trabajo que implica pérdidas en el rendimiento. Para la eliminación de impurezas de tipo proteico que pueden provocar reacciones alérgicas, son necesarias etapas purificadoras ulteriores (Patentes británicas Nos. 1.169.696, 1.078.847, 1.114.311).
- 20.

25. Todas las desventajas mencionadas son evitadas si, en lugar de una suspensión de microorganismos, se aplica una penicilinacilasa que es obtenida por la ligadura covalente a un soporte insoluble en agua.

30. Si bien son conocidos ensayos para preparar 6-APS por desdoblamiento enzimático de penicilinas con penicilinacilasa ligada a un soporte (Véase al respecto: Patentes alemanas pu-



blicadas no examinadas No. 1.917.057, 1.907.365), pero los mismos no pudieron adaptarse a la producción a escala técnica. Las razones de esta imposibilidad residen, por un lado, en las propiedades mecánicas del material de soporte empleado que conduce a un elevado desgaste por fricción, y por otro lado, en que a moderados rendimientos del procedimiento pudieron alcanzarse tan solo actividades específicas poco considerables de penicilinacilasa ligada al soporte.

5.

10.

También la enzima insoluble empleada en la solicitud de Patente alemana P 21 57 970.4, la cual fué obtenida por ligadura covalente de la penicilinacilasa a un polimerizado mixto de acrilamida N,N'-metilen-bis-acrilamida o anhídrido de ácido maléico, tiene desventajas para el desdoblamiento de penicilina a una escala técnica, en vista de que se hincha fuertemente y es mecánicamente inestable. Estas desventajas afectan el empleo varias veces repetido de la resina así preparada en una producción a escala industrial.

15.

20.

Ahora se ha encontrado que las mencionadas desventajas son evitadas, si se aplica una penicilinacilasa ligada a un soporte insoluble en agua de acuerdo con la invención, para el desdoblamiento de penicilinas.

25.

30.

El desdoblamiento de penicilinas con penicilinacilasa ligada a un soporte según la invención, puede ser realizada en forma sencilla y también a gran escala industrial. La enzima insoluble ligada al soporte es suspendida en una solución con 75000 a 150.000 UI/ml (unidades internacionales) de penicilina, por ejemplo penicilina G o penicilina V. El desdoblamiento enzimático es realizado a un valor pH constante del margen de 6 a 9, principalmente del margen del valor pH óptimo de la respectiva penicilinacilasa ligada, por ejemplo al valor pH de



- 7,8. Para la neutralización del radical acilo desdoblado, por ejemplo del ácido fenilacético o del ácido fenoxiacético, se emplean soluciones acuosas de álcali, por ejemplo lejía de potasa o de sosa o aminas orgánicas, preferiblemente trietilamina. Del consumo de la base puede apreciarse la velocidad de reacción y la terminación del desdoblamiento. La penicilinacilasa cataliza tanto el desdoblamiento de penicilina a formar 6-APS, como también la resíntesis de las penicilinas de los productos de desdoblamiento. El equilibrio es dependiente del valor pH del medio. A menores valores pH, el equilibrio se des-  
5. plaza en favor del producto de partida penicilina. Esto puede ser aprovechado para la reacilación de penicilinas en presencia de otros radicales acilo o para la síntesis de penicilinas a partir de 6-APS.
10. La temperatura de reacción del desdoblamiento enzimático es preferiblemente de 38°C. A temperaturas más bajas disminuye la actividad de la enzima. Si se lleva a cabo el des-  
15. doblamiento, por ejemplo a 25°C, debe aplicarse una cantidad de enzima dos veces aquella necesaria a 38°C, si han de conseguirse iguales tiempos de reacción.
20. A una temperatura dada, la velocidad de reacción depende de la actividad específica y de la cantidad de la penicilinacilasa ligada al soporte. Además, la velocidad de reacción es dependiente de la relación entre la cantidad de la penicilinacilasa ligada al soporte y la concentración de la penicili-  
25. na. Una carga de desdoblamiento con una concentración de 100.000 UI/ml (1 mg de penicilina G-potasio corresponde a 1598 UI) de penicilina G potásica queda hidrolizada totalmente a 6-APS y ácido fenilacético al cabo de 10 horas a un pH de  
30. 7,8 y a 38°C, si por unidad de penicilinacilasa se aplican



- 3 .  $10^5$  unidades de penicilina G (una unidad de enzima (U) se define como la actividad que hidroliza  $1/\mu$  mol de ácido 6-nitro-3-(fenilacetil)-aminobenzóico (NIPAB) por minuto a  $25^\circ\text{C}$ ). La proporción de resina de enzima seca asciende a tan solo
5. 0,5 a 1 % de la mezcla de reacción. Si por  $10^5$  UI de penicilina G se aplican 2 unidades de penicilinacilasa, el desdoblamiento completo dura 2 horas solamente. Son posibles también tiempos de reacción más cortos todavía con la aplicación de todavía más penicilinacilasa ligada, al emplearse, por ejemplo,
10. penicilinacilasa ligada a un soporte a partir de enzima cristalizada.
- La penicilinacilasa ligada a un soporte según la invención, puede ser preparada en forma de perlas y se distingue por una elevada estabilidad mecánica y por un peso específico comparativamente alto. Estas propiedades permiten, combinado
15. con una aplicación múltiple, un empleo durante largos lapsos de tiempo. Estas propiedades permiten, además, en el caso del procedimiento discontinuo por cargas individuales, una agitación intensiva y una separación sencilla por centrifugación sin pérdidas por esfuerzos mecánicos, por ejemplo desgaste por fricción. Así, en el procedimiento por cargas individuales, se
20. obtienen filtrados claros que, sin filtración adicional, pueden ser elaborados ulteriormente para la obtención del producto final, del 6-APS. La penicilinacilasa ligada a un soporte, preparada según el invento, permite también una filtración rápida
25. y sencilla, en vista de que gracias a la estabilidad mecánica no se forman componentes finísimos que obturan la superficie del filtro. La resina ofrece ventajas ulteriores en el procedimiento discontinuo por cargas individuales, gracias al peso
30. específico comparativamente alto que implica una rápida sedi-



5. mentación de la resina, con el resultado de que, una vez terminado el proceso, la solución sobrenadante puede ser secada fácilmente, por ejemplo con una pipeta. De esto resulta una simplificación de la ejecución del procedimiento, en virtud de que, en el proceso por cargas individuales, la resina puede quedar en el recipiente de reacción y puede ser empleada directamente para el siguiente desdoblamiento.

10. Las propiedades del polimerizado además, permiten el empleo de la penicilinacilasa ligada a un soporte no solamente en los procesos por cargas individuales, sino también en el procedimiento continuo, por ejemplo en columnas de reacción, permitiendo la forma de perla la requerida elevada velocidad de flujo.

15. El 6-APS formado en el desdoblamiento enzimático, después de la separación de la resina de enzima, es obtenido de la solución de reacción según procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Patente alemana No. 1.111.778) y cristalizado al valor pH de 4,3. En el caso del desdoblamiento de penicilina según el invento con la penicilinacilasa fijada en un soporte preparada según la invención, se obtienen rendimientos sustancialmente más altos de 6-APS que con el empleo de un fango de E.Coli, y también rendimientos más altos que con el empleo de la resina de enzima según la Solicitud de patente alemana P 21 57 970.4. Así, como se demuestra en los Ejemplos 20. 8 y 9, se aisló el 6-APS con un rendimiento de aproximadamente un 90 % de la teoría. El 6-APS así preparado no contiene ningunas proteínas como impurezas. Tampoco contiene practicamente ningunos polímeros que pueden formarse en otros modos de proceder. Efectos secundarios alérgenos que han de atribuirse a proteínas o polímeros, quedan excluidos en el caso del 6-APS 25. 30.



preparado según la invención.

5. La penicilinacilasa fijada en un soporte preparada según el invento, permite una aplicación múltiple durante un lapso de tiempo prolongado. También al cabo de tal tiempo la actividad de enzima queda conservada en forma practicamente total.

Los puntos de ebullición indicados en los siguientes ejemplos, fueron determinados a la presión normal.

Ejemplo 1a

10. 80 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol, 20 g de anhídrido de ácido maléico y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico se disuelven en 1 litro de benceno y se calienta la solución bajo agitación durante 4 horas a 60°C. Entonces se agregan 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico y 200 ml de bencina (P.e. = 100 a 140°C) y se polimeriza durante otras 5 horas a 70°C. Se recoge por succión el polímero pulverulento, se lo revuelve una vez en benceno y tres veces en éter de petróleo (P.e. 30 a 50°C) y se lo seca en el vacío.

20. Rendimiento: 94 g.  
Volúmen: 3,5 ml/g.  
Volúmen de hinchamiento en agua: 4,7 ml/g  
Superficie específica: 5 m<sup>2</sup>/g.  
Contenido de ácido después de la saponificación de los grupos anhídrido: 3,5 miliequivalentes/g.

25. Ejemplo 1b

30. 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 1a, se suspende en 30 ml de una solución acuosa de 132 U (unidades) de penicilinacilasa (actividad específica 1 U/mg de proteína (biuret)). Mientras se mantiene constante el valor pH a 6,3 por adición de lejía de sosa 1-normal, con la ayuda de



5. un aparato para mantener constante el pH, se agita la suspensión durante 20 horas a 25°C. Subsiguientemente se filtra a succión por una frita de vidrio G3 y se lava la resina primeramente con 50 ml de fosfato tampón 0,05 molar, pH = 7,5, que contiene cloruro de sodio 1-molar y luego con 50 ml de fosfato tampón 0,05-molar sin cloruro de sodio. Por un lavado ulterior, la actividad de la resina no se altera.

Actividades enzimáticas (ensayo con NIPAB)

- |     |                                |       |
|-----|--------------------------------|-------|
|     | Solución de partida:           | 132 U |
| 10. | Capa superior + agua de lavar: | 12 U  |
|     | Resina después de la reacción: | 86 U  |
- = 65 % de la actividad de partida.

15. La actividad enzimática de la penicilinacilasa fué medida colorimetricamente o titrimetricamente con ácido 6-nitro-3-(N-fenilacetil)-aminobenzóico (NIPAB) 0,002-molar como sustrato al valor pH de 7,5 y a 25°C. El coeficiente de extinción molar del ácido 6-nitro-3-aminobenzóico que se forma, asciende a  $E_{405\text{nm}} = 9090$ , 1 unidad (U) corresponde a la reacción de  $1/\mu$  mol de sustrato por minuto.

20. Ejemplo 2a

- Una solución de 90 g de dimetacrilato de etilenglicol, 10 g de anhídrido de ácido maléico y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico en 1 litro de benceno, se polimeriza bajo agitación primeramente a 60°C. Al cabo de 4 horas se agregan 200 ml de bencina (P.e. = 100 a 140°C) y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico y se polimeriza durante 2 horas a 70°C y otras 2 horas a 80°C.
- 25.

- Subsiguientemente se recoge por succión el polímero, se lo lava bien con éter de petróleo (P.e. = 30 a 50°C) y se lo seca en vacío.
- 30.



Rendimiento: 97 g

Volúmen aparente: 6,4 ml/g

Volúmen de hinchamiento en agua: 8,0 ml/g

Superficie específica: 298 m<sup>2</sup>/g

5. Contenido de ácido después de la saponificación de los grupos anhídrido: 1,5 miliequivalentes/g.

Ejemplo 2b

10. 6 g de la resina de soporte obtenida según el Ejemplo 2a, se hicieron reaccionar análogamente al Ejemplo 1b, con 590 U de penicilinacilasa en 165 ml de agua.

Resultado:

Actividades enzimáticas (ensayo con NIPAB)

Solución de partida: 590 U

Capa superior + agua de lavado: 26 U

15. Resina de soporte después de la reacción: 352 U  
= 60 % de la actividad de partida.

Ejemplo 2c

20. 1 g de la resina de soporte obtenida según el Ejemplo 2a, se hizo reaccionar análogamente al Ejemplo 1b, con 100 g de asparaginasa.

Actividades enzimáticas (Hidrólisis de asparaguina)

Solución de partida: 21000 U

Capa superior después de la reacción: 3360 U

25. Resina de soporte después de la reacción: 3910 U  
= 19 % de la actividad de partida.

Ejemplo 3a

30. La copolimerización de 10 g de dimetacrilato de dietilenglicol con 10 g de anhídrido de ácido maléico bajo las condiciones del Ejemplo 2a da:

Rendimiento: 96 g



Volúmen aparente: 5,5 ml/g  
 Volúmen de hinchamiento en agua: 6,7 ml/g  
 Superficie específica: 9,2 m<sup>2</sup>/g  
 Contenido de ácido después de la saponificación de grupos  
 anhídrido: 1,9 miliequivalentes/g

5.

Ejemplo 3b

Se agregó 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 3a, a una solución de 50 mg de una elastasa inespecífica de una actividad enzimática de 139 U en 32 ml de agua. Se agitó la preparación durante 16 horas a la temperatura ambiente, manteniéndose constante el valor pH a 5,8. Terminada la reacción se recogió la resina por succión y se la lavó primeramente con 50 ml de una solución de cloruro de sodio 1-normal en fosfato tampón 0,05-molar, pH 7,5, y subsiguientemente con 50 ml de fosfato tampón 0,05-molar, pH 7,5.

10.

15.

Resultado:

Solución de partida:	139 U
Capa superior y soluciones de lavar:	51 U
ligadas a la resina de soporte:	15 U

20.

= 11 % de la actividad de partida.

En esto, se determinó la actividad enzimática titriméticamente con caseína como sustrato (concentración 11,9 mg/ml) al pH de 8,0 y a 25°C. 1 unidad (U) corresponde al consumo de 1/μ mol de lejía de potasa cáustica por minuto.

25.

Ejemplo 3c

Se agregó 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 3a, a una solución de 50 mg de ureasa cristalizada (Merck) en 32 ml de agua. Se agitó la preparación durante 16 horas a la temperatura ambiente, manteniéndose el valor pH constante a 6,3. La elaboración procedió como se indicó en el

30.



Ejemplo 2d.

Resultado:

	Solución de partida:	5013 U
	Capa superior y soluciones de lavado:	1397 U
5.	ligadas a la resina de soporte:	1405 U
	= 28 % de la actividad de partida.	

10. Se determinó la actividad enzimática de la ureasa titriméticamente con urea 0,17-molar como sustrato a 25°C y al pH de 6,1. 1 unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima que desdobra 1/μ mol de urea por minuto.

Ejemplo 3d

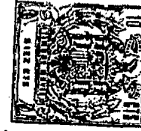
15. 0,4 g de la resina de soporte obtenida según el Ejemplo 3a, se hicieron reaccionar con 40 mg de glutatión en 32 ml de agua durante 16 horas a la temperatura ambiente y a un valor pH constante de 6,3. Se recogió la resina por succión y se la lavó primeramente con una solución de cloruro de sodio 1-normal en fosfato tampón 0,05-molar, pH 7,5, y subsiguientemente con agua. Después del secamiento de la resina en vacío a 20. 100°C sobre pentóxido de fósforo, se obtuvieron 0,47 g. La determinación de nitrógeno según Dumas dió un valor de 1,1 % de N correspondiente a un contenido de 8,04 % o 37,8 mg de glutatión. Esto es un 94 % de la cantidad aplicada de glutatión.

Ejemplo 4a

25. Se disuelven 30 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol, 20 g de anhídrido de ácido maléico y 1 g de Poroform N en 1 litro de benceno y se polimeriza bajo agitación lenta durante 16 horas a 80°C. Se elabora el polímero en forma análoga al Ejemplo 1a.

Rendimiento: 95 g

30. Volúmen aparente: 2,5 ml/g.



Volúmen de hinchamiento: 3,0 ml/g

Contenido de ácido después de la saponificación de los grupos anhídrido: 2,6 miliequivalentes/g.

Ejemplo 4b

5. La reacción de 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 4a, con penicilinacilasa en forma análoga al Ejemplo 1b, da los siguientes resultados:

Actividades enzimáticas (ensayo con NIPAB)

Solución de partida: 123 U

10. Capa superior + soluciones de lavar: 13 U

Resina de soporte después de la reacción: 79 U

= 64 % de la actividad de partida.

Ejemplo 4c

15. Se agregaron 0,4 g de la resina de soporte preparada según el ejemplo 4a, a una solución de 40 mg de tripsina en 32 ml de una solución de cloruro de calcio 0,01-molar y se la agitó durante 16 horas a la temperatura ambiente, mientras se mantiene constante el valor pH a 6,3. Se recogió la resina y se la lavó según el Ejemplo 1b.

20. Actividad enzimática

en la solución de partida: 44 U

en la capa superior y en las soluciones de lavar: 5,2 U

ligadas a la resina: 8,3 U

= 19 % de la actividad de partida.

25. Se midió la actividad enzimática colorimetricamente según Tuppy, Z. Physiol. Chem. 329 (1962) 278, con p-nitro-anilida de benzoil-arginina como sustrato. 1 unidad (U) corresponde al desdoblamiento de  $1 \mu$  mol a 25°C y al pH de 7,8.

Ejemplo 4d

30. Se agregó 1 g de la resina preparada según el Ejem-



5. plo 4a, a una solución de 50 mg de elastasa inespecífica en 32 ml de agua. Se agitó la suspensión durante 16 horas a la temperatura ambiente, mientras se mantuvo constante el valor pH a 5,8. La elaboración y la determinación titrimétrica de las actividades enzimáticas con caseína como sustrato fueron realizadas según lo indicado en el Ejemplo 3b.

Actividad enzimática

en la solución de partida: 139 U

en la capa superior y las soluciones de lavar: 32 U

10. ligadas a la resina: 36 U

= 26 % de la actividad de partida.

Ejemplo 5a

15. En un recipiente agitador se calientan 1 litro de bencina (P.e. 100 a 140°C) y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico durante una hora a 90°C. Entonces a 80°C se instila una solución de 95 g de dimetacrilato de etilenglicol, 5 g de anhídrido de ácido maléico y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico dentro de 3 horas y se agita durante otras 2 horas a la misma temperatura.

20. Se recoge el polímero por succión, se lo lava varias veces con benceno y con éter de petróleo (P.e. 30 a 50°C) y se lo seca en vacío.

Rendimiento: 96 g

Volúmen aparente: 14 ml/g

25. Volúmen de hinchamiento en agua: 18,2 ml/g

Superficie específica: 70 m<sup>2</sup>/g

Contenido de ácido después de la saponificación

de los grupos anhídrido: 0,5 miliequivalentes/g.

Ejemplo 5b

30. Se agitaron 0,4 g de la resina preparada según el



5. Ejemplo 5a, con 40 mg de glutatión en 32 ml de agua durante 16 horas a la temperatura ambiente y a un valor pH de 6,3 mantenido constante. Se recogió la resina por succión y se la lavó y secó de acuerdo con el Ejemplo 3d. Se obtuvieron 0,46 g de resina que contenía 0,9 % de N, según Dumas. Esto corresponde a un contenido de 6,6 % ó 30,4 mg de glutatión = 76 % de la cantidad aplicada.

Ejemplo 6a

10. Una solución de 62,5 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol, 37,5 g de anhídrido de ácido maléico y 1 g de nitrilo de ácido azoisobutírico en 150 ml de acetato de butilo y 1 litro de bencina (P.e. = 100 a 140°C), se polimeriza bajo agitación durante 2 horas a 70°C, durante otras 2 horas a 75°C y durante una hora y media a 90°C. Se recoge el polímero a succión, se lo extrae con benceno durante 24 horas en el extractor de Soxhlet y se lo seca en vacío.

15. Rendimiento: 77 g  
 Volúmen aparente: 7,3 ml/g  
 Volúmen de hinchamiento en agua: 8,2 ml/g  
 20. Superficie específica: 19,4 m<sup>2</sup>/g  
 Contenido de ácido después de la saponificación de los grupos anhídrido: 4,0 miliequivalentes/g.

Ejemplo 6b

25. La reacción de 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 6a, con penicilinacilasa en forma análoga al Ejemplo 1b, dió los siguientes resultados:

- Actividades enzimáticas (ensayo con NIPAB)  
 Solución de partida: 107 U  
 Capa superior y soluciones de lavar: 28 U  
 30. Resina de soporte después de la reacción: 55 U



= 51 % de la actividad de partida.

Ejemplo 7a

5. Una solución de 90 g de dimetacrilato de tetraetilen glicol, 10 g de anhídrido de ácido maléico y 1,0 g de nitrilo de ácido azoisobutírico en 200 ml de acetonitrilo suspendido en 1000 ml de bencina (P.e. 100 a 140°C) en que se disolvieron 5 g de una mezcla de mono- y dioleato de glicerina. Se polimeriza la mezcla de reacción a 60°C hasta la formación de perlas sólidas (aproximadamente durante 2 horas) y subsiguientemente durante 20 horas a 65°C. Se aísla el polimerizado por filtración y se lo lava tres veces en benceno y tres veces en éter de petróleo (P.e. = 30 a 50°C) y se lo seca en vacío a 50°C.

15. Rendimiento: 94 g  
 Diámetro medio de las partículas: ~ 0,35 mm  
 Volúmen aparente: 2,8 ml/g  
 Volúmen de hinchamiento en agua: 3,1 ml/g  
 Superficie específica: 3,4 m<sup>2</sup>/g  
 Contenido de ácido después de la saponificación de los grupos anhídrido: 1,5 miliequivalentes/g
- 20.

Ejemplo 7b

- La reacción de 1 g de la resina de soporte preparada según el Ejemplo 7a, con penicilinacilasa en forma análoga al Ejemplo 1b, dió los siguientes resultados:
25. Actividades enzimáticas (ensayo con NIPAB)
- Solución de partida: 107 U  
 Capa superior y soluciones de lavar: 51 U  
 Resina de soporte después de la reacción: 19 U  
 = 18 % de la actividad de partida.



Ejemplos para el desdoblamiento de penicilina

Ejemplo 8

5. 79 g de penicilinacilasa ligada a un soporte en estado húmedo con una actividad de 687 U (ensayo con NIPAB), que fué preparada por ligadura de penicilinacilasa a un copolimerizado de dimetacrilato de etilenglicol y anhídrido de ácido maléico, según el Ejemplo 2, se agitan con 129 g de penicilina G potásica (pureza 98 %) en 2000 ml de agua durante 9 horas a 38°C, manteniéndose el valor pH de la mezcla de reacción por
10. adición continuada de trietilamina constante a 7,8. La absorción de trietilamina se paraliza con la terminación de la reacción. Se separa la penicilinacilasa ligada al soporte por centrifugación o por filtración a succión, se la lava con 200 ml de agua y con 200 ml de fosfato tampón 0,2-molar, pH = 6,5;
15. la misma queda así lista para una nueva carga. El filtrado con inclusión de las soluciones de lavado, se concentra en vacío hasta 300 ml. El ácido 6-aminopenicilánico (6-APS) es precipitado por adición de ácido clorhídrico semiconcentrado en el punto isoelectrico al pH de 4,3 en presencia de 200 ml de
20. metilisobutilcetona. Al cabo de una hora se lo recoge por succión, se lo lava primeramente con 200 ml de agua y luego con 200 ml de acetona. El 6-APS es secado en vacío a 40°C; P.f. = 208°C. El rendimiento de 6-APS asciende a 67,8 g = 90,5 % de la teoría.
25. La pureza es de un 98 %.

Ejemplo 9

30. 60 g de penicilinacilasa ligada a un soporte en estado húmedo con una actividad de 673 U (ensayo con NIPAB), que fué preparada por ligadura de penicilinacilasa a un copolimerizado de dimetacrilato de tetraetilenglicol y anhídrido de



5. ácido maléico según el Ejemplo 1, son agitados con 129 g de penicilina G potásica en 2000 ml de agua durante 9 horas a 38°C, manteniéndose, por adición de trietilamina, el valor pH constante a 7,8. La elaboración ulterior es efectuada análogamente al Ejemplo 8. El rendimiento de 6-APS asciende a 65,3 g = 87 % de la teoría.

## N O T A

=====

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Alemania con el nº P 22 15 539.1 de 30 de marzo de 1972, acogándose
15. por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PREPARADOS DE PROTEINA INSOLUBLES EN AGUA; caracterizándose
20. por lo siguiente:

- 1.- Procedimiento para la producción de preparados de proteína insolubles en agua, caracterizado porque, calculados sobre el total de monómeros del copolimerizado, A) 0,1 a 50 % en peso de anhídridos de ácidos dicarboxílicos  $\alpha, \beta$ -monoolefinicamente insaturados con 4 a 9 átomos de carbono, y
25. B) 99,9 a 50 % en peso de por lo menos un miembro del grupo consistente en di- y poliacrilatos y di- y polimetacrilatos de dioles y polioles, según el método de la polimerización de precipitación así como de la polimerización en suspensión, en
30. disolventes o mezclas de disolventes inertes para grupos anhi-





druido, se polimerizan a temperaturas de 20 a 200°C en presencia de compuestos formadores de radicales y subsiguientemente el copolimerizado se hace reaccionar en suspensión acuosa con una solución de proteína para formar preparados de proteína insolubles en agua.

5.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las unidades copolimerizadas del componente A del copolimerizado constan de un anhídrido de uno de los ácidos maléico, itacónico y citracónico, y las unidades copolimerizadas del componente B del copolimerizado constan de compuestos del grupo que comprenden diacrilatos y dimetacrilatos de dioles con 2 a 4 átomos de carbono, y por lo menos un miembro del grupo formado por producto de reacción de 1 mol de estos dioles con 1 a 20 moles de óxido de alquileo con 2 a 4 átomos de carbono, y trimetacrilato de trimetilolpropano.

10.

15.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las unidades copolimerizadas del componente A del copolimerizado constan de anhídrido de ácido maléico y aquellas del componente B constan de dimetacrilatos de los siguientes glicoles: etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol y polietilenglicoles superiores con un peso molecular de hasta 1000.

20.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proteína ligada es una enzima.

25.

5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la proteína ligada es un inhibidor de enzima.

30.

6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el copolimerizado se hace reaccionar en suspensión acuosa con una solución de penicilinacilasa acuosa



pobre en sal, a un pH de 5,7 a 6,8.

5. 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la concentración salina del medio de reacción en el comienzo de la reacción del copolimerizado con la solución de penicilinacilasa asciende a menos de 0,02 moles/litro.

8.- Procedimiento para la producción de preparados de proteína insolubles en agua, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta Memoria consta de 33 hojas escritas a máquina por una sola cara.

29 MAR. 1973

Madrid,

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ ACEBO Y MODEG  
p. p. Firmados L. Geste Farabolas