



ESPAÑA

19 ES

11

21

22

NUMERO

437.153

10 A1

FECHA DE PRESENTACION

29.4.75

P.- 60.166

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO P 24 21 789.8	32 FECHA 6.5.74	33 PAIS Rep. Fed. Al.
---	--------------------	--------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN COMPUESTO BIOLOGICAMENTE ACTIVO A BASE DE POLI(HIDROXIMETILENO) O POLI(CARBONATO DE VINILENO)"
--

71 SOLICITANTE (S) BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT
---

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Marburg/Lahn, República Federal Alemana
--

72 INVENTOR (ES) Rudolf Schmidtberger y Dr. Heinrich Huemer
--

73 TITULAR (ES)
-----------------

74 REPRESENTANTE D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ
--

La invención se refiere a nuevos compuestos de sustancias biológicamente activas y de compuestos macromoleculares insolubles en agua, a modos de procedimiento para su preparación, y a su utilización en la cromatografía por afinidad.

5

En los últimos años se ha impuesto cada vez más entre los métodos de trabajo bioquímicos una nueva técnica, cuya característica principal consiste en utilizar la afinidad de sustancias biológicamente activas, unidas a un vehículo, para reacciones a realizar selectivamente.

10

Por medio de una formación específica de un complejo de la sustancia unida al vehículo con una segunda sustancia, que está presente en una mezcla, la sustancia en cuestión puede ser separada de la mezcla, y eventualmente puede ser aislada a continuación por desorción.

15

Las enzimas unidas a un vehículo ofrecen la ventaja de llevar a cabo transformaciones de sustancias en los procesos continuos preparativos, y de obtener los productos de reacción libres de enzima.

20

En la química analítica enzimática, bioquímica, se dispone de enzimas insolubles en agua como reactivos utilizables varias veces.

A causa de la propiedad de las enzimas de tener afinidades no sólo frente a los substratos, sino también frente a los inhibidores específicos, la obtención

25

22.5.75

de inhibidores de enzimas con ayuda de la cromatografía por afinidad con enzimas unidas a un vehículo, ha manifestado ser especialmente favorable. Por otra parte, la unión de inhibidores con matrices insolubles en agua permite la obtención preparativa de las correspondientes enzimas.

5 Como los llamados inmunoadsorbentes, antígenos o anticuerpos son unidos a matrices insolubles en agua y posibilitan después de ello el aislamiento de los correspondientes anticuerpos o antígenos.

10 Como sustancias biológicamente activas, en correspondencia con las explicaciones anteriores, se entienden sustancias activas in vivo e in vitro, naturales o preparadas artificialmente, que en el sentido más amplio pueden ser designadas como enzimas, activadores, inhibidores, 15 antígenos o anticuerpos, vitaminas y hormonas. Estas sustancias biológicamente activas, puesto que representan los principios activos de los sistemas insolubles en agua, pueden ser denominadas efectores.

20 La mayor parte de los efectores unidos a un vehículo, descritos hasta ahora, son esencialmente más estables que las correspondientes sustancias en solución.

25 Como materiales de vehículo, las llamadas matrices, se pueden utilizar ventajosamente sólo las sustancias que, junto a la insolubilidad en sistemas acuosos, tienen una adsorción no específica lo más baja posible. Para ello

tienen que ser prácticamente reprimidas interacciones hidrófobas, hidrófilas e iónicas entre la matriz y el participante en la reacción del efector. Deberá estar excluida una unión con sustancias que no son ningún participante en la reacción del efector.

5

Las matrices utilizadas hasta ahora como vehículos para sustancias biológicamente activas pueden ser agrupadas en las que unen a los efectores por adsorción física; a ellas pertenecen carbón activo y perlas de vidrio, y en las que están unidas con los efectores a través de un enlace covalente. Las mencionadas en último lugar incluyen polímeros vinílicos, por ejemplo poli(ácidos acrílicos), poli(amidas de ácido acrílico) y poliestireno sustituido con grupos amino, carboxilo o sulfonilo, además la celulosa y sus derivados, y por último polipéptidos y proteínas naturales y sintéticos. A causa de la interacción equilibrada entre matriz y efector, la utilización de hidratos de carbono, en especial de la celulosa, del dextrano, del almidón, del agar o de sus derivados, como matrices en sistemas acuosos, ha encontrado la mayor difusión, si bien los grupos carboxilo contenidos con frecuencia en estas sustancias naturales, a causa de su reacción no específica son considerados como perturbadores. Además de ello, estas sustancias tienen una estabilidad térmica y química relativamente escasa.

10

15

20

25

22.5.75

Se ha encontrado ahora que los inconvenientes que tienen los derivados de hidratos de carbono como matrices en reacciones que dependen de la afinidad, pueden ser soslayados si como matriz se utiliza poli(hidroximetileno).

5

Por consiguiente, son objeto de la invención son compuestos biológicamente activos, caracterizados por un poli(hidroximetileno) insoluble en agua, con el que está unida una sustancia biológicamente activa, con conservación de su actividad biológica. En estos compuestos

10

- a) la matriz de vehículo es poli(hidroximetileno),
- b) la sustancias biológicamente activas son sustancias tales como enzimas, activadores, inhibidores, antígenos o anticuerpos, otras proteínas de plasma, sustancias de los grupos sanguíneos, fitohemaglutininas, antibióticos, vitaminas u hormonas, péptidos o aminoácidos, o efectores preparados sintéticamente,

15

- c) el poli(hidroximetileno) y las sustancias biológicamente activas están unidos por enlaces covalentes, directamente entre sí o a través de un compuesto intermedio.

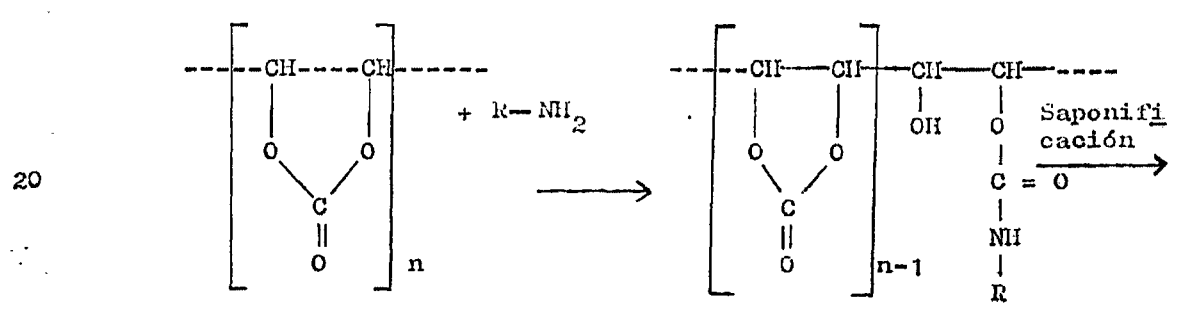
20

El poli(hidroximetileno) es un polímero sintético con una cadena carbonada en toda su extensión. Cada átomo de carbono lleva un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo. Su preparación y sus propiedades han sido descritas, entre otros autores, por N.D. Field, J.R. Schaeffer, J. Polymer Sci., Vol.58, 533-543(1962) y G. Smets, K. Hayashi, J. Polymer Sci., Vol,29, 257-274(1958). Puede ser preparado a

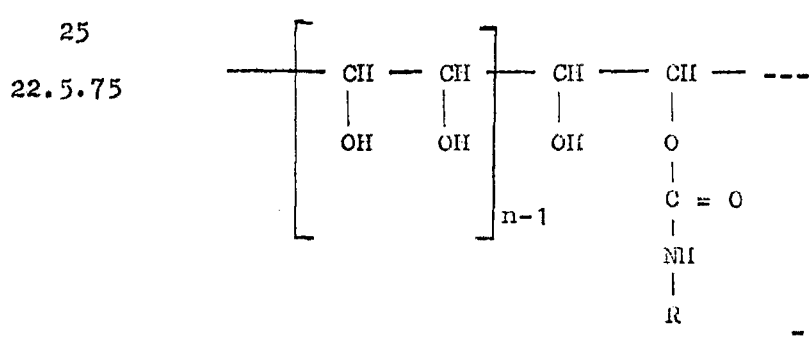
25

22.5.75

partir de poli(carbonato de vinileno) por hidrólisis básica o ácida. En un sentido amplio, el poli(hidroximetileno) se ha de considerar como derivado del poli(carbonato de vinileno). La unión de los efectores con el poli(hidroximetileno) puede ser lograda por una parte por las medidas que pasan a emplearse en el caso de la unión covalente de los efectores con los grupos hidroxilo, y por otra parte por reacción del poli(carbonato de vinileno), mediante la reacción aminolítica, igualmente conocida, de un anillo de ciclocarbonato del poli(carbonato de vinileno) con una amina primaria, por ejemplo con hexametildiamina, para formar un poli(carbonato de vinileno) sustituido con un distanciador o efector a través de un enlace de uretano, cuyos grupos ciclocarbonato restantes son saponificados a continuación para formar grupos hidroxilo:



poli(carbonato de vinileno)



Para la utilización de los productos es especialmente ventajoso no hacer reaccionar directamente los efectores biológicamente activos con el poli(hidroximetileno), sino unirlos covalentemente con la matriz a través de un miembro intermedio, designado en la cromatografía de afinidad como brazo o, como en la bibliografía inglesa, como "Spacer" o distanciador.

Las sustancias distanciadoras son la mayoría de las veces estructuras hidrocarbonadas de una longitud de aproximadamente 1-2 nm. Dos grupos funcionales terminales del distanciador permiten en cada caso la reacción tanto con la matriz como también con el efector, siendo utilizables, en el caso de la reacción con la matriz, tanto poli(hidroximetileno) como también poli(carbonato de vinileno), en condiciones adecuadas.

Objeto de la invención son además procedimientos para la unión covalente de las sustancias biológicamente activas con el vehículo.

Para ello se dispone de una serie de reacciones generalmente conocidas: la unión del efector con la matriz se realiza de un modo especialmente sencillo de acuerdo con una activación de los grupos hidroxilo del poli(hidroximetileno) por medio de halogenuros de cianógeno, ventajosamente con bromuro de cianógeno, y una posterior reacción de los efectores biológicamente activos, que contienen grupos amino, a través de estos grupos activados.

Otro procedimiento se basa en que, en una modificación del método de la azida de Curtius, un poli(hidroximetileno), tal como un polisacárido, se hace reaccionar con un ácido carboxílico halogenado, tal como ácido clorogénico, en un medio alcalino, el ácido correspondiente se esterifica con alcohol, después el éster se transforma en la hidrazida, y por último, la azida que resulta a continuación con el grupo amino de la proteína del efector, es unida con la matriz de poli(hidroximetileno).

Otra posibilidad para la unión del efector con una matriz de poli(hidroximetileno) consiste en la acilación de los grupos hidroxilo con bromuro de bromoacetilo, seguida de la alcoholación del grupo amino del efector.

Pueden lograrse cursos similares de reacción, por ejemplo, por reacción de los grupos hidroxilo del vehículo con triazinas reactivas, entrando en reacción una parte de los grupos reactivos de la triazina con el compuesto de poli(hidroximetileno), y otra parte con grupos amino del efector.

Aminas aromáticas diazotables, que a través de otro grupo reactivo pueden entrar en combinación por una parte con los grupos hidroxilo del vehículo, hacen posible la copulación por la otra parte con aminoácidos activados, idóneos para ello, por ejemplo con los radicales de tirosina o de histidina del efector proteínico.

Derivados de vinilsulfona y semiésteres de ácido sulfúrico de  $\beta$ -hidroxietilsulfona que contienen grupos arilamino pueden ser hechos reaccionar con los grupos hidroxilo del vehículo. Estos hacen posible la unión del efector de acuerdo con la reacción de diazotación antes descrita.

Un enlace éter especialmente estable se forma en el caso de la reacción de los grupos hidroxilo del poli(hidroximetileno) con compuestos epoxídicos que no forman iones, que contienen por lo menos 2 grupos reactivos, tales como las epihalohidrininas o los poliepóxidos, por ejemplo epiclorhidrina o bisepóxido.

Junto a los procedimientos citados aquí a título de ejemplo para la obtención de la unión covalente entre la matriz de vehículo y el efector proteínico u otros efectores, se podrían enumerar aún otros métodos que conducen a la reacción, por una parte, de los grupos hidroxilo del poli(hidroximetileno), y, por otra parte, de determinados grupos del efector, y con ello producen la unión covalente entre ambos, tal como la reacción conocida pasando por compuestos metálicos formadores de complejos, por ejemplo, compuestos de titanio.

El poli(hidroximetileno) se destaca, además de por la estabilidad química y térmica mencionada, por ventajosas propiedades técnicas de transformación, y por consi-

5 guiente conduce a una superioridad frente a las matrices de vehículo consideradas como óptimas hasta ahora, a base de hidratos de carbono naturales. El poli(hidroximetileno) se puede preparar, por ejemplo, en forma de fibras, hilos, láminas, partículas esféricas, o preferiblemente material pulverizado de modo que puede ser elegida la forma más adecuada según el sector de utilización del efector a unir sobre él.

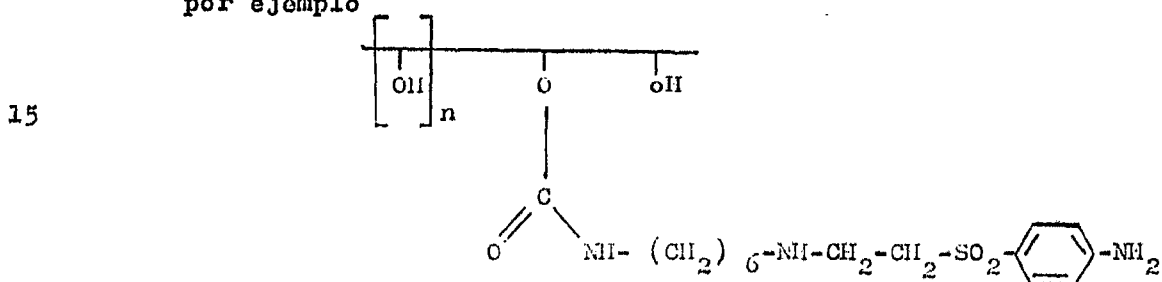
10 Por la magnitud regulable, según la técnica de producción, de la superficie disponible para la unión de los efectores o de los distanciadores, se manifiesta otra ventaja del poli(hidroximetileno) frente a los materiales vehículos del estado actual de la técnica.

15 Por los mecanismos de reacción análogos, tal como se han descrito para la unión del efector con la matriz de poli(hidroximetileno), se pueden unir también con la matriz las sustancias distanciadoras, si, por ejemplo, los distanciadores llevan un grupo amino como uno de los grupos funcionales. Sin embargo, la introducción de un distan-  
20 tanciador ofrece también la posibilidad de introducir posibilidades de reacción adicionales para la unión del efector. En el caso de que el espaciador unido a la matriz lleve un grupo carboxilo libre, este grupo carboxilo es activable, por ejemplo, por compuestos de carbodiimida, que des-  
25 pués es capaz de la formación de un enlace amida con los

grupos amino del efector. Además, los grupos carboxilo permiten la formación de enlaces amida con ayuda de las sales de isoxazolio, introducidas por Woodward.

Si el distanciador unido a la matriz posee un grupo amino libre disponible, es posible, con derivados 5  
vinil-sulfónicos o con ésteres de ácido sulfúrico de  $\beta$ -hidroxietilsulfonas, que contienen grupos arilamino, la introducción de grupos arilamino en la prolongación del distanciador, que después son diazotados según métodos conocidos y a continuación son unidos con grupos correspondientemente reactivos del efector:

por ejemplo



20 Los compuestos biológicamente activos según la invención son adecuados para la mayor parte de los procedimientos de utilización que se han conocido hasta ahora para otros efectores unidos a vehículos hidrófilos, insolubles en agua. Por consiguiente, las enzimas pueden ser hechas insolubles en agua. Las enzimas insolubles son utilizadas

25  
22.5.75

de modo creciente para la determinación de substratos en aparatos automáticos de análisis y como los llamados electrodos de enzimas. A causa de la elevada estabilidad, una serie de enzimas unidas con un vehículo son adecuadas para la realización de reacciones enzimáticas técnicas.

Las sustancias biológicamente activas, unidas a un vehículo, a causa de su propiedad como adsorbentes específicos, han encontrado una amplia utilización en la cromatografía por afinidad. Con ayuda de inhibidores de enzimas naturales o sintéticos, unidos con un vehículo, se hace posible la purificación elevada de enzimas, mientras que las enzimas se han encontrado como sobresalientemente adecuadas como efectores, en especial para la obtención de inhibidores naturales de enzimas a partir de extractos brutos. Antígenos insolubles en agua unidos con un vehículo son utilizados para el aislamiento de los anticuerpos que les corresponden, que de este modo son obtenidos libres de otros componentes del suero y libres de otros antígenos. Mediante la cromatografía por afinidad pueden también ser aislados, y también determinados cuantitativamente, anticuerpos no precipitables, así como aquéllos que, a causa de su escasa concentración en el suero, no son precipitables.

En los ejemplos mencionados a continuación para ilustrar la invención se muestra que un vehículo preparado según uno de los procedimientos individuales es adecuado

para la unión de los efectores más diferentes, y que el cuerpo fundamental poli(hidroximetileno) puede ser hecho adecuado, mediante una sustitución apropiada, para la unión de cualquier efector que se desee.

5                    Además se muestra, a título de ejemplo, cómo pueden ser utilizados los efectores unidos con la matriz.

Ejemplo 1 / compuesto de poli(hidroximetileno)-toxóide del tétanos

10                    Preparación de la matriz a partir de poli(hidroximetileno) sustituido con grupos ( $\omega$ -amino-n-hexilo):

15                    20 g de poli(hidroximetileno), suspendidos en 900 ml de agua, se mezclan con una solución de 20 g de BrCN en 50 ml de dimetilformamida y, con agitación y a una temperatura interna de 15°C, se mantienen durante 6 minutos a un valor del pH de 11,5 por adición lenta, gota a gota, de lejía de sosa 2N. Después se filtra onseguida con succión, se lava bien con hielo/agua y se exprime. El poli(hidroximetileno) así activado, aún húmedo con agua, se añade a una  
20                    solución bien agitada, mantenida a temperatura ambiente, regulada a pH 8,5 con HCl concentrado, de 20 g de hexametilendiamina en 500 ml de H<sub>2</sub>O, se completa con agua hasta un volumen total de 1 litro, se regula el pH a un valor permanente entre 8,5-9,0, y se agita aún durante 5 horas a temperatura ambiente. Después se filtra con succión y se la-  
25

22.5.75

va bien con agua. Una muestra seca del poli(hidroximetileno) sustituido con grupos ( $\omega$ -amino-n-hexilo) tenía un contenido de nitrógeno de 1,9%. Con el reactivo de Sanger para el reconocimiento de grupos amino primarios libres, se obtienen productos intensamente coloreados de amarillo.

#### Preparación del efector unido con el vehículo

Efector: antígeno del tétanos

10 g del vehículo según el ejemplo 1 se suspenden en 200 ml de una solución de fosfato sódico 0,5 N de pH 10. La suspensión se calienta con agitación a 50°C y se mezcla con 5 g de semiéster de ácido sulfúrico de 1-amino-4- $\beta$ -hidroxi-etilsulfona. Después de la corrección del valor del pH a 10 con NaOH 2 N, la carga se agita durante 1 hora a 50°C. A continuación se filtra en un filtro de succión y se lava con 2 l de agua, 2 l de acetona y 2 l de HCl 0,2 M. Para la diazotación de los grupos arilamino introducidos en el poli(hidroximetileno), el residuo del filtro se suspende en 200 ml de HCl 0,2 M, se enfría a 2°C y se mezcla, con agitación, con solución de NaNO<sub>2</sub> 1 M hasta que con un papel de KI-almidón se puede comprobar un ligero exceso de nitrito. Después de 10 minutos se filtra en un filtro de succión y el residuo en el filtro se lava con 1 litro de un ácido amidosulfónico acuoso 0,01 M a 2°C y a continuación con 200 ml de fosfato sódico 0,2 N, de pH

7,5, a 2°C. Para la copulación, el producto que contiene grupos diazonio se suspende en 150 ml de una solución de 2 g de toxoide del tétanos con 1260 Lf/mg<sup>x</sup> de N en fosfato sódico 0,2 M, a pH 7,5 y 2°C, y se agita durante 20 horas a 5°C. Las partes del toxoide no unidas se separan por lavado sobre un filtro de succión con 1 litro de solución de NaCl 1 M.

\*Una dosis Lf es la cantidad de un antígeno de tétanos que con una unidad internacional del antisuero específico proporciona en condiciones óptimas y en un tiempo muy corto una precipitación en forma de grumos gruesos.

Utilización del compuesto de poli(hidroximetileno)-toxoide del tétanos

Obtención de antitoxina del tétanos

10 g del producto según el ejemplo 1 se suspenden en 150 ml de solución de NaCl 0,15 M, con una adición de fosfato sódico M/15, ("PBS") de pH 7,2, y son introducidos en una columna de 3 cm de diámetro y 10 cm de altura. 20 ml de suero de caballo para tétanos con 1650 UI de antitoxina del tétanos/ml son aplicados a la columna, que a continuación es lavada con 500 ml de PBS de pH 7,2. La elución de los anticuerpos se realiza con un tampón de glicina/HCl 0,5 M, de pH 2,5. El eluato, después de neutralización con NaOH 2M y centrifugación subsiguiente, contiene en total 240 mg de proteína y, tal como se calcula en un experimento de protección en ratones, 12.300 UI de antitoxina del tétanos.



de trishidroximetilaminometano-HCl 0,05 M, de pH 8,0, con una adición de KCl 0,5 M (Tris-HCl).

Utilización del compuesto de poli(hidroximetileno)-aminobenzamida

5 Obtención de trombina

100 mg de trombina bruta de vacuno se disuelven en 5 ml de Tris 0,05 M, KCl 0,5 M, a pH 8,0 y se aplican a la columna preparada como se ha descrito anteriormente. A continuación la columna se enjuaga con 200 ml de tampón de Tris-KCl. La trombina unida con la m-aminobenzamida insolubilizada, se separa de ésta con 100 ml de una solución de m-aminobenzamida 0,05 M en tampón de Tris-KCl.

15 Las fracciones que contienen la proteína se reúnen y se hacen pasar a través de una columna Sephadex G-25 1 x 30 cm en tampón Tris-KCl. En el primer pico del eluato de la columna, que contiene la proteína, se pudo encontrar, por determinación de la actividad según Chase y Shaw, Biochem 8, 1969, Pág. 2212, un 78% de la actividad de partida.

20

Ejemplo 3 / compuesto de poli(hidroximetileno)-pepsina  
Preparación de la matriz a partir de poli(hidroximetileno)  
sustituido con grupos ( $\omega$ -amino-n-hexilo):

25 8,0 g de poli(carbonato de vinileno) reprecipitado a partir de dimetilformamida/metanol, preparado según

22.5.75

N.D. Field, J.R. Shaefgen, J. Polymer Sci., Vol. 58, página 534 (1962), se suspenden a temperatura ambiente en una solución de 7,5 g de hexametildiamina en 180 ml de metanol, y se agitan durante 48 horas a temperatura ambiente, se filtran con succión, se lavan con metanol y se suspenden en una solución de 10 g de metilato de sodio en 300 ml de metanol al 96 por ciento, durante 4 días a temperatura ambiente, se lavan con metanol y después muy intensamente con agua. Una muestra seca del adsorbente de poli(hidroximetileno) sustituido a través de un distanciador de 6 grupos  $\text{CH}_2$  con grupos amino primarios, tenía un contenido de nitrógeno de 5,7%.

#### Preparación del efector unido con el vehículo

Efector: pepsina

20 g de poli(hidroximetileno) sustituido con grupos ( $\omega$ -amino-n-hexilo), preparado según el ejemplo 3, se suspenden en 400 ml de fosfato sódico 0,2 M de pH 10. A la suspensión se añaden con agitación 40 ml de una solución al 25 % de dialdehído glutárico. Después de 2 horas de agitación a temperatura ambiente se separa por filtración en un filtro de succión, y el residuo en el filtro se lava con 4 litros de tampón de acetato sódico 0,2 M de pH 4,0. A continuación el producto de reacción se añade a 500 ml de una solución de 5 g de pepsina, en total con 500.000 unidades, determinadas según Anson, en acetato de sodio 0,2 M de pH 4,0, y se agita durante 15 horas a 6°C. El pro

ducto obtenido según ello se lava sobre un filtro de succión con 5 litros de acetato sódico/ácido acético 0,1 M, de pH 4,0 y una adición de NaCl 1 M.

Utilización del compuesto de poli(hidroximetileno)-pepsina  
5 Desdoblamiento proteolítico de inmunoglobulinas

El adsorbente según el presente ejemplo se suspende en tampón de acetato 0,1 M, de pH 4,0 y se lleva a cabo una determinación de actividad del mismo según Anson. La suspensión contiene en total 21.000 unidades de pepsina en forma unida y reconocible con este ensayo. Para el desdoblamiento proteolítico de inmunoglobulina humana G, el adsorbente de pepsina se separa por filtración y el residuo se suspende en una solución al 2,5 por ciento de 30 g de inmunoglobulina humana G en solución fisiológica de NaCl de pH 4,1. La carga de desdoblamiento se agita durante 15 24 horas a 37°C. Después de separación por filtración de la pepsina unida con el vehículo, el producto filtrado se mezcla con 1.250 ml de solución saturada de sulfato de amonio. El precipitado que se forma de este modo, se separa por centrifugación; contiene el fragmento F(ab)<sub>2</sub> de la 20 inmunoglobulina con su actividad de anticuerpos. El sedimento decantado se desecha.

25 Ejemplo 4 / preparación del compuesto de poli(hidroximetileno)-ácido oxálmico

22.5.75

10 g de poli(hidroximetileno) se activan con BrCN como se ha descrito en el ejemplo 1, y se hacen reaccionar con 5 g de tiramina, disueltos en 150 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M, a 5°C, por agitación durante 60 minutos. Las partes no unidas de la tiramina se separan por filtración en un filtro de succión, y el residuo en el filtro se lava con 1 litro de tampón de fosfato de sodio 0,1 M, de pH 7,0 y a 5°C. El residuo en el filtro se suspende en 150 ml de una solución, enfriada a 5°C, de 1,0 g de ácido p-aminofeniloxámico diazotado, y se agita durante 15 horas a 5°C. El adsorbente se lava sobre un filtro de succión con 1 litro de tampón de acetato de sodio-ácido acético 0,05 M, de pH 5,5, con una adición de 2 milimoles de CaCl<sub>2</sub> y 0,2 milimoles de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Utilización del compuesto de poli(hidroximetileno)-ácido oxámico

Obtención de la neuraminidasa

El adsorbente según el ejemplo 4 se vuelve a suspender en el tampón de acetato antes mencionado y se transfiere a una columna de cromatografía de 2 cm de diámetro. A través de esta columna se hace pasar 1 litro de un producto filtrado de cultivo de Vibrio Cholerae con 800 U<sub>I</sub> de neuraminidasa/ml, que previamente había sido ajustado con ácido acético 2 M a pH 5,5 y que había sido mezclado

do con  $\text{CaCl}_2$  y EDTA hasta una concentración de 2 milimoles y de 0,2 milimoles respectivamente. Las proteínas no unidas son separadas por lavado con 500 ml de tampón de acetato.

5 La elución de la neuraminidasa absorbida en el inhibidor unido con el vehículo se realiza por lavado de la columna con solución de bicarbonato de sodio 0,1 M y recogida de las fracciones que contienen la neuraminidasa activa. Estas contienen 86% de la actividad utilizada.

10

#### Ejemplo 5

a) Reacción de poli(hidroximetileno) con epíclorhidrina. 50 g de poli(hidroximetileno) se suspenden en 1 litro de NaOH 2N, se mezclan con 250 ml de epíclorhidrina y se agitan durante 2 horas a 55-60°C. Al cabo de poco tiempo el valor del pH de la suspensión disminuye a 10-11. Por adición de NaOH se mantiene durante 1 hora más este valor del pH. Después de un tiempo de reacción de 2 horas, la sustancia sólida se separa por filtración con succión, se lava con agua, con acetona y por último de nuevo con agua.

15

20

b) 50 g de hexametilendiamina se disuelven en 1,5 litro de agua y se mezclan con HCl hasta pH 10. A la solución se añade el poli(hidroximetileno) activado según 5 a) y se agita a 50-55°C durante 6 horas. Después el producto se filtra con succión y se lava con agua hasta que está libre de

25  
22.5.75

hexametildiamina.

5 c) El producto obtenido según el ejemplo 5b) se agita durante una hora con 50 g de éster de ácido sulfúrico de 1-aminobenceno-4-β-hidroxiethylsulfona, a 55°C y pH 10. A continuación la sustancia sólida se separa por filtración, se lava con agua, con acetona y de nuevo con agua.

10 d) 10 g del producto obtenido según 5c) se lavan en un filtro de succión con 200 ml de HCl 0,1 N y después se suspenden en 300 ml de HCl 0,5 N. La suspensión se mezcla con agitación a 0-4°C con solución de NaNO<sub>2</sub> 0,1 N, hasta que en la diazotación es reconocible con papel de KI-almidón un pequeño exceso de nitrito. Al cabo de 10 minutos se filtra en un filtro de succión y el residuo se lava con hielo/agua y a continuación con tampón de fosfato de sodio 0,15 M, de pH 7,5 a 0-4°C.

15 e) 0,75 g de albúmina se disuelven en 250 ml de tampón de fosfato de pH 7,5, se enfrían a 4°C, y se añade el producto preparado según 5d). La suspensión se agita durante 20 horas a 4°C, después se filtra, y la sustancia sólida se lava con NaCl 1 M y con solución de sal común tamponada con fosfato (PBS) (solución acuosa al 0,9 % de NaCl con un contenido de 1/15 moles de tampón de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pH 7,2). El producto filtrado y las aguas de lavado se investigan en cuanto a albúmina, por el método de la inmunodifusión radial. 75 mg de albúmina se unen a 1 g del vehículo así

preparado.

5 f) 2,4 g de inmunoglobulina M se disuelven en 250 ml de tam-  
pón de fosfato de pH 7,5, y se enfrían a 4°C. Se añaden  
10 g del producto diazotado según 5 d) y la suspensión se  
5 agita durante 20 horas a 4°C. Después de la filtración,  
la sustancia sólida se lava con solución de NaCl 1 M y con  
PBS.

1 g del vehículo preparado según 5 f) une 240 mg de immuno-  
globulina M.

10

#### Ejemplo 6

a) 10 g de poli(hidroximetileno) son activados con epiclor  
hidrina como se ha descrito en el ejemplo 5 a)b), se hacen  
reaccionar con hexametilendiamina y se transforman.

15 b) 10 g del vehículo así preparado se succinoflan durante  
4 horas a 10°C y pH 6, con 5 g de anhídrido de ácido succi-  
nico, que están suspendidos en 200 ml de agua. El valor  
del pH se regula con NaOH 2 N. Después del lavado de la  
sustancia sólida con agua, el producto se agita durante 30  
20 minutos, a pH 5 y 5°C, con 2,5 g de p-toluen-sulfonato de  
N-ciclohexil-N'-((N-metilmorfolino)-etil)-carbodiimida, se  
separa por filtración y se lava rápidamente con agua helada.

25

c) 1 g de inmunoglobulina G se disuelve en 250 ml de tampón  
de fosfato a pH 7,5 y se agita durante 24 horas a 4°C con

22.5.75

el vehículo preparado según 6 f). Después de filtración, el producto se lava con sal común 1 M y con PBS.

A 1 g del vehículo se unen covalentemente 85 mg de inmunoglobulina G.

5

#### Ejemplo 7

a) 20 g del producto preparado según 5a) se agitan durante 6 horas a pH 10 y 50-55°C, con 20 g de ácido aminocaproico. Después de ello se filtra con succión y se lava con agua.

10

b) 10 g del producto preparado según 7a) se mezclan con 2,5 g de p-toluen-sulfonato de N-ciclohexil-N'-((N-metilmorfolino)-etil)-carbodiimida, y al cabo de 5 minutos se añaden a ello 2 g de N-hidroxisuccinimida, a pH 5. Después de 5 horas de agitación a 24°C se separa la sustancia sólida por filtración y se lava con agua.

15

c) 0,5 g de albúmina se disuelven en 200 ml de tampón de fosfato y se agitan durante 24 horas a 4°C con el vehículo activado preparado según 7b). Después de filtración, el producto se lava con sal común 1 M y con PBS.

20

A 1 g del vehículo se unen covalentemente 50 mg de albúmina.

#### Ejemplo 8

10 g de poli(hidroximetileno) se activan con epiclorhidrina del modo descrito en el ejemplo 5 a)b), se hacen reaccio

25

22.5.75

nar con hexametilendiamina y se transforman.

5 a) 10 g del vehículo así preparado se suspenden en 100 ml de agua y se hacen reaccionar con 500 ml de dialdehído glu-  
tárico al 25 por ciento. Después de 1 hora de agitación,  
la sustancia sólida se separa por filtración y se lava con  
agua o con PBS.

10 b) 0,5 g de albúmina se disuelven en 200 ml de tampón de  
fosfato y se agitan durante 20 horas a 4°C con el vehículo  
preparado según 8a). Después de filtración, el producto  
se lava con sal común 1 M y con PBS.

#### Ejemplo 9

Reacción directa de poli(hidroximetileno) activado con epi-  
clorhidrina.

15 a) 10 g de poli(hidroximetileno) se activan con 50 ml de  
epiclorhidrina, como se ha descrito en el ejemplo 5a). Des-  
pués de filtración, el producto se lava rápidamente con  
agua, con acetona, con agua y por último con PBS.

20 b) 0,5 g de albúmina se disuelven en 200 ml de PBS y se agi-  
tan durante 60 horas a 4°C con el producto preparado según  
9a). Después de filtración, la proteína unida con el vehí-  
culo se lava con sal común 1 M y con PBS.

1 g del vehículo así preparado une 45 mg de albúmina.

25

#### Ejemplo 10

22.5.75

5

10 g de poli(hidroxiacetileno) son agitados a pH 9,5 (tampón 0,15 M de bicarbonato de sodio/NaOH) durante 3 días a 25°C con 30 g de dietilenglicoldiglicidiléter, el producto se filtra con succión, se lava bien, y se añaden a 0,5 g de albúmina humana en 200 ml de tampón de fosfato 0,15 M de pH 8 y se agita a 10°C durante 60 horas. Después de filtración, la proteína unida con el vehículo con solución de sal común 1 M y con PBS.

10

1 g del vehículo preparado de este modo contiene 35 mg de albúmina unida.

#### Ejemplo 11

15

10 g de poli(hidroximetileno) son hechos reaccionar, como se describe en el ejemplo 10, con 30 g de glicidil-tris(glicidiléter), son añadidos a 0,5 g de inmunoglobulina G (Ig G) en 200 ml de tampón de fosfato 0,15 M de pH 7,5 y agitados a 4°C durante 60 horas. Después de filtración, se lava el producto con solución de sal común 1 M y con PBS.

20

1 g de la resina proteínica preparada de este modo contiene 50 mg de inmunoglobulina G unida.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el día 6 de Mayo de 1974, bajo el N° P 24 21 789.8, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

22.5.75

## REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención, propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la preparación de un compuesto biológicamente activo a base de poli(hidroxi-metileno) o poli(carbonato de vinileno), caracterizado porque el poli(hidroxi-metileno) se hace reaccionar con una sustancia biológicamente activa, directamente o a través de un compuesto con varios grupos funcionales, o el poli(carbonato de vinileno) se hace reaccionar con un compuesto polifuncional o con un efector sintético, se hidrolizan los restantes grupos ciclocarbonato, y eventualmente el polímero se hace reaccionar posteriormente con un compuesto biológicamente activo.

15

20

25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se hace reaccionar poli(carbonato de vinileno) con un efector que lleva grupos amino primarios reactivos, y a continuación se saponifican los grupos ciclocarbonato no reaccionados.

20.11.76

3ª.- Procedimiento para la preparación de un compuesto biológicamente activo a base de poli(hidroxi metileno) o poli(carbonato de vinileno).

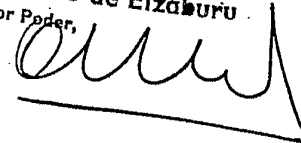
5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

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

Madrid, 28. DIC. 1976

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Por Poder,



10

15

20

25

20.12.76