

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
Y DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



|       |                          |        |
|-------|--------------------------|--------|
| 10 ES | 11 NUMERO                | 10 A 1 |
|       | 21 453.362               |        |
|       | 22 FECHA DE PRESENTACION |        |
|       | 16.11.76                 |        |

PATENTE DE INVENCION

|                 |          |               |
|-----------------|----------|---------------|
| 30 PRIORIDADES: | 32 FECHA | 33 PAIS       |
| 31 NUMERO       |          |               |
| P 25 52 510.4   | 22.11.75 | Rep. Fed. Al. |

|                        |                                |                                      |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 42 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|                        | C07G, C08H                     |                                      |

|   |
|---|
| 64 TITULO DE LA INVENCION   |
| "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COMBINACION FORMADA POR UN COPOLIMERO DE VINILENGLICOL Y UNA SUSTANCIA BIOLÓGICAMENTE ACTIVA" |

|                                  |
|----------------------------------|
| 71 SOLICITANTE (S)               |
| BEIERINGWERKE AGTLENGESELLSCHAFT |

|                             |
|-----------------------------|
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE   |
| Marburg/Lahn, Rep. Fed. Al. |

|  |
|--|
| 72 INVENTOR (ES)   |
| Dr. Heinrich Huemer, Rudolf Schmidtberger y Dr. Tibor Toth |

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

|  |
|--|
| 74 REPRESENTANTE                           |
| DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ P.- 64.333 |

P.-64.333

1           La invención se refiere a nuevos compuestos formados  
por sustancias biológicamente activas y compuestos de al-  
to peso molecular, insolubles en agua, a un procedimiento  
para su preparación y a su utilización, preferentemente,  
5           en la cromatografía por afinidad.

          En los últimos años, se ha impuesto cada vez más una  
nueva técnica dentro de los métodos de trabajo bioquími-  
cos, cuya característica principal consiste en emplear la  
afinidad de sustancias biológicamente activas, unidas al  
10          vehículo, en reacciones a realizar selectivamente.

          Mediante una específica formación de complejos de la  
sustancia unida al vehículo, con una segunda sustancia --  
que esté presente en una mezcla, la sustancia correspon-  
diente puede ser separada de la mezcla y, en caso desea-  
do, puede ser aislada seguidamente por desorción.

15          Las enzimas unidas al vehículo ofrecen la ventaja de  
realizar transformaciones de materia en procedimientos con-  
tinuos preparativos, y de obtener los productos de reac-  
ción libres de enzimas.

20          En la técnica analítica enzimática bioquímica, se --  
dispone de enzimas insolubles en agua y unidas al vehícu-  
lo, como reactivos utilizables de modo múltiple.

          Sobre la base de la propiedad de las enzimas de mos-  
trar afinidades no solamente frente a los substratos, si-  
no también frente a los inhibidores específicos, ha mos-  
25

1       trado ser especialmente favorable la obtención de inhi-  
bidores enzimáticos, con ayuda de la cromatografía por  
afinidad, en enzimas unidas al vehículo. Por otra parte,  
la unión de inhibidores a las matrices insolubles en --  
5       agua, permite la obtención preparativa de las correspon-  
dientes enzimas.

      Como los llamados inmunoadsorbentes, se unen anti-  
genos o anticuerpos a matrices insolubles en agua, y --  
permiten, después, el aislamiento de los correspondien-  
tes anticuerpos o antígenos.  
10

      Como sustancias biológicamente activas se entien-  
den, en correspondencia con las formas de realización --  
precedentes, sustancias naturales y artificialmente pre-  
paradas, activas "in vivo" e "in vitro", las cuales pue-  
den ser designadas en el más amplio sentido, como enzi-  
15       mas, activadores, inhibidores, antígenos o anticuerpos,  
vitaminas y hormonas. Para estas sustancias biológica-  
mente activas se ha introducido la designación de efec-  
tuadores, puesto que representan los principios activos  
de los sistemas insolubles en agua.  
20

      La mayoría de los efectadores unidos al vehículo,  
hasta ahora descritos, son esencialmente más estables --  
que las correspondientes sustancias biológicamente acti-  
vas en solución.

25       Como materiales de vehículo, llamados matrices, se

1 pueden emplear ventajosamente los materiales que junto  
a la insolubilidad en sistemas acuosos, presentan una  
adsorción no específica lo más baja posible. Para ello,  
han de reprimirse ampliamente interacciones hidrófobas,  
5 hidrófilas e iónicas entre la matriz y el participante  
en la reacción del efectuator. Con sustancias cuya --  
unión al efectuator es indeseable, por ejemplo con las  
que no son participantes de reacción específicos del -  
efectuador, debería excluirse una unión.

10 Las matrices hasta ahora utilizadas como vehículo  
para sustancias biológicamente activas, pueden subdivi-  
dirse en las que fijan a los efectuadores mediante ad-  
sorción física, a las que pertenecen, por ejemplo, po-  
liestireno, carbón activo y perlas o glóbulos de vi-  
15 drio, y las que están unidas a los efectuadores median-  
te un enlace covalente. Las mencionadas en último lugar  
incluyen polímeros vinílicos en forma de homopolímeros  
y copolímeros, por ejemplo poli-(ácidos acrílicos), poli-  
(amidas de ácidos acrílicos y poliestireno sustituido  
20 con amino, carboxi o sulfonilo, y además la celulosa y  
sus derivados y, finalmente, polipéptidos sintéticos -  
y naturales, y proteínas. Debido a la interacción equi-  
librada entre matriz y efectuator, ha encontrado la --  
más amplia difusión el empleo de hidratos de carbono,  
25 especialmente celulosa, dextrano, almidón, agar o sus

1 derivados, como matrices en sistemas acuosos, aunque se  
consideran perturbadores los grupos carboxilo frecuente  
mente contenidos en estas sustancias naturales, debido  
a sus afinidades no específicas. Además, estas sustan--  
5 cias muestran una estabilidad térmica y química, relati  
vamente escasa.

Muchas de estas desventajas podrían soslayarse me-  
diante la utilización de polivinilenglicol, un polímero  
sintético, como matriz. El polivinilenglicol, también -  
10 denominado polihidroximetileno, se prepara por hidrólisis  
ácida o básica, a partir de policarbonato de vinile  
no. Cada átomo de carbono lleva un grupo hidroxilo y un  
átomo de hidrógeno. El enlace -C-C- continuo presta al  
portador una estabilidad especialmente alta.

15 Se ha encontrado ahora que, en lugar de polivini-  
lenglicol, se pueden emplear ventajosamente, como ma--  
triz de vehículo, copolímeros de vinilenglicol. Median  
te la introducción por polimerización de comómeros -  
adecuados en poli(carbonato de vinileno), se pueden ha  
20 cer variar ampliamente las propiedades físicas y quími  
cas del polivinilenglicol preparado a partir de ello.

Así, por ejemplo, puede modificarse la "hidrofilia"  
o el "hinchamiento" del polivinilenglicol, mediante la  
introducción por polimerización de monómeros hidrófo--  
25 bos, tales como etileno, cloruro de vinilo o estireno,

1        en el poli(carbonato de vinileno). Mediante la copoli-  
merización de acetato de vinilo, se reemplaza, en el -  
producto final saponificado, un grupo vinilenglicol por  
un grupo de alcohol vinílico, lo cual tiene como conse-  
5        cuencia una acrecentada capacidad de hinchamiento en un  
medio acuoso.

      Con ayuda de comonómeros, tales como, por ejemplo,  
dietilenglicol-divinil-éster y divinilbenceno, es posi-  
ble obtener una reticulación y, con ello, una mejora de  
10       las propiedades mecánicas del vehículo. Mediante la in-  
troducción por polimerización de funciones electrófilas,  
por ejemplo, grupos oxirano (grupos epóxido) proceden-  
tes de comonómeros de vinilglicidil-éster, es posible una  
reacción directa de la matriz con funciones nucleófilas  
15       (-NH<sub>2</sub>, -OH, etc). Grupos carboxilo pueden introducirse  
mediante comonómeros de ésteres de ácido acrílico. Des-  
pués de realizada la copolimerización, los grupos éster  
se saponifican para formar grupos carboxilo. La intro-  
ducción de grupos -NH<sub>2</sub>- o -COOH permite la activación -  
20       con ayuda de carbodiimidas, sales de isoxazolio, aldehí-  
do glutárico, etc. Los copolímeros de vinilenglicol/al-  
cohol vinílico poseen una superficie específica más al-  
ta y, con ello, una más alta capacidad de combinación -  
para, por ejemplo, proteínas, en la superficie del polí-  
25       vo de polímero, en comparación con el homopolímero de -

1       vinilenglicol.

          Según esto, son objeto de la invención compuestos biológicamente activos, consistentes en un copolímero del polivinilenglicol, preferentemente insoluble en --  
5       agua, y una sustancia biológicamente activa unida a éste, con mantenimiento de su actividad biológica. En estos compuestos, la matriz de vehículo es un copolímero de polivinilenglicol que contiene hasta 45%, preferentemente de 5 a 20%, de un comonomero. Las sustancias --  
10       biológicamente activas son materiales, como enzimas, --  
          activadores, inhibidores, antígenos o anticuerpos, o--  
          tras proteínas de plasma, sustancias de grupos sanguíneos, fitohemoaglutinina, antibióticos, vitaminas u --  
          hormonas, péptidos o aminoácidos, o efectadores sinté--  
15       ticamente preparados.

          El vehículo polímero y la sustancia biológicamente activa están unidos entre sí, covalentemente, bien sea directamente bien sea a través de una cadena lateral (espaciador).

20       El hecho de unir los compuestos biológicamente activos a través de una cadena lateral (espaciador) es --  
          ventajoso cuando los pesos moleculares de sus participantes afines son muy diferentes, o cuando en la utilización en un proceso bioespecífico toman parte proteí--  
25       nas de muy alto peso molecular o constituidas por varias

1 subunidades. Espaciadores son cadenas laterales de de-  
terminada longitud, ancladas a la matriz polímera, que  
pueden obtenerse mediante introducción por polimeriza-  
ción, mediante incorporación o adosado (unión de com-  
5 puestos bifuncionales o polifuncionales—por ejemplo de  
un tripéptido—a la matriz), o mediante incorporación -  
de grupos funcionales y prolongación escalonada de és-  
tos.

10 Son objeto de la invención, además, procedimien-  
tos para la unión covalente de las sustancias biológi-  
camente activas con el vehículo.

Para ello se dispone de una serie de reacciones,  
en general conocidas.

15 Estas se refieren, primeramente, a los procedimien-  
tos para la preparación de los copolímeros de polivi-  
nilenglicol. Se caracterizan porque se polimeriza car-  
bonato de vinileno con comonomeros de las fórmulas ge-  
nerales

20

25



1           La preparación del compuesto biológicamente acti-  
vo es posible, por ejemplo, introduciendo un grupo elec-  
trófilo, bien sea en la sustancia biológicamente activa  
bien sea en el copolímero de polivinilenglicol, y, me-  
5           diante aquél, se hace reaccionar la sustancia biológi-  
camente activa con el copolímero de polivinilenglicol.

          La introducción de los grupos electrófilos en la  
matriz de vehículo tiene lugar bien sea por copolimeri-  
zación de carbonato de vinileno con comonómeros que --  
10           contienen grupos electrófilos, bien sea por reacción -  
de la matriz de vehículo con compuestos de bajo peso -  
molecular, portadores de grupos electrófilos, activado  
res.

          En general, la copulación química de un partici-  
15           pante en la reacción con la matriz de vehículo, es sen-  
cilla, cuando, en un lado, hay presentes funciones nu-  
cleófilas y, en el otro, funciones electrófilas. Como  
funciones nucleófilas reactivas se consideran sobre to-  
do, grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo, que usualmen-  
20           te están contenidos, bien sea en la matriz bien sea en  
el participante de la reacción. Las funciones electró-  
filas deben ser introducidas primeramente. Para ello -  
pueden transformarse grupos carboxilo en halogenuros -  
de ácidos, azidas de ácidos, anhídrido de ácidos, imi-  
25           dazolidas, o pueden activarse directamente con carbo--

1 diimidias. Como grupos electrófilos reactivos se emplean,  
también, grupos isocianato, isotiocianato, diazonio o ésteres de imidocarbonato cíclicos. Especialmente favorable  
es la introducción de grupos reactivos con ayuda de la -  
5 copolimerización.

Mediante la introducción por polimerización de monómeros con grupos epóxido, por ejemplo con epoxialcoholvinil-éteres en el poli(carbonato de vinileno), y mediante las diferencias muy grandes de velocidades de saponificación entre los grupos carbonato cíclicos y los grupos epóxido, se obtiene fácilmente una matriz de polivinilenglicol con grupos epóxido reactivos, que pueden hacerse - - reaccionar con funciones nucleófilas. Así es posible la unión directa de una sustancia biológicamente activa y/o  
10 la introducción (prolongación) de una cadena lateral (espaciador).

Según esto, una ventaja adicional es también, en la utilización de copolímeros, la posibilidad de la introducción directa (introducción por polimerización) de funciones electrófilas que permiten la reacción según métodos conocidos.  
20

Por copolimerización de carbonato de vinileno con acrilato de etilo y subsiguiente saponificación de los polímeros, se obtiene una matriz con funciones -OH- y --COOH. Los grupos carboxilo pueden ser activados con ayu  
25

1 da de carbodiimidas y, acto seguido, puede tener lugar una unión amídica con grupos amino. Los grupos carboxilo permiten, además, la formación de enlaces amida con ayuda de las sales de isoxazolio introducidas por Woodward.

5 Otro método adicional para la copulación de sustancias biológicamente activas con polímeros que contienen grupos carboxilo, se realiza con ayuda de N-etoxicarbonyl-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ).

10 Los grupos carboxilo pueden ser esterificados según métodos conocidos; se puede transformar después el éster en la hidrazida y, finalmente, la azida resultante, como consecuencia, con el grupo amino de la proteína efectuada, se puede unir con la matriz de polivinilenglicol.

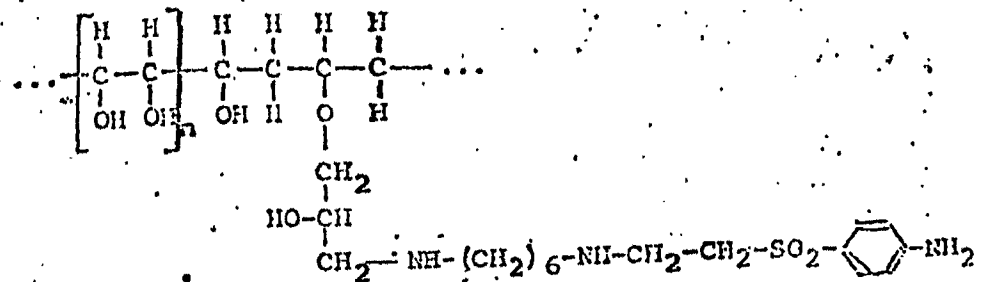
15 Si el comonomero introducido en la matriz por polimerización, posee por reacciones subsiguientes grupos -- amino libremente disponibles, será posible la introducción de grupos arilamino, con derivados vinilsulfónicos que contienen grupos arilamino o con ésteres de ácido -- sulfúrico de  $\beta$ -hidroxiethyl-sulfonas, pudiéndose, acto --  
20 seguido, diazotar los grupos arilamino según métodos conocidos y, seguidamente, unirlos con correspondientes -- grupos reactivos de un efectuator; por ejemplo

---

25

1

5



10

De esta manera, se puede realizar también una "prolongación" de un espaciador.

Otra manera de unir proteínas a través de los grupos amino, tiene lugar con ayuda del dialdehído glutárico.

15

La unión del efectuator con la matriz es sencilla, después de una activación de los grupos hidroxilo o amino del copolímero de polivinilenglicol mediante halógenos de cianógeno, ventajosamente con bromuro de cianógeno y una reacción subsiguiente de los efectadores biológicamente activos, que contienen grupos amino, a través de estos grupos activados.

20

25

Una posibilidad adicional para la unión del efectuator con una matriz de polivinilenglicol o de copolímero de polivinilenglicol, consiste en la acilación de los grupos hidroxilo con bromuro de bromoacetilo, seguida por la alcoholación de los grupos amino del efectuator.

1           Se pueden conseguir cursos de reacción similares,  
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  
5           compuesto de polivinilenglicol y, otra parte, con los --  
grupos amino del efector.

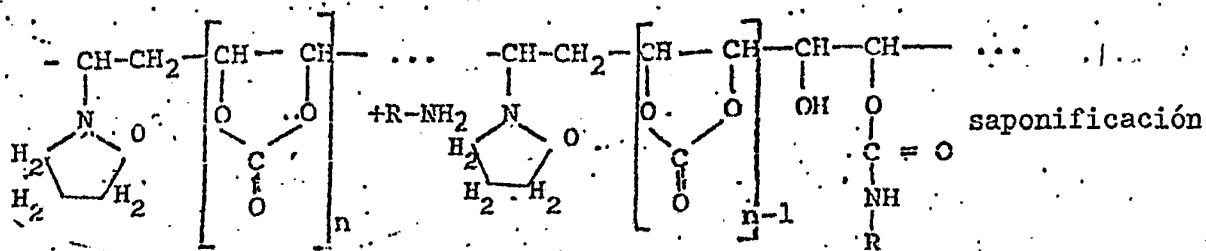
          Aminas aromáticas diazotables que, por una parte, -  
pueden entrar en unión, a través de otro grupo reactivo,  
con los grupos hidroxilo del vehículo, permiten, por o--  
10          tra parte, la copulación con aminoácidos activados, capa  
citados para ello, por ejemplo con los radicales de tiro  
sina o histidina del efector proteínico.

          Derivados vinilsulfónicos que contienen grupos arila  
mino y semiésteres de ácido sulfúrico y β-hidroxietil--  
15          sulfona pueden hacerse reaccionar con los grupos hidroxi  
lo del vehículo. Estos hacen posible la unión del efec--  
tuador, de acuerdo con la reacción de diazotación previa  
mente descrita.

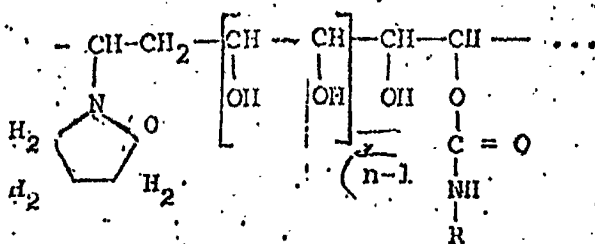
20          Se forman enlaces éter especialmente estables, en -  
la reacción de los grupos hidroxilo del copolímero de po  
livinilenglicol con epóxidos no formadores de iones, que  
contienen por lo menos dos grupos reactivos, tales como  
las epihalohidrinias o los poliepóxidos, por ejemplo, epi  
25          clorhidrina o bisepóxidos.

          Otro tipo adicional de modificación es la introduc--

- 1 ción por polimerización de comonómeros en la cadena de  
 poli(carbonato de vinileno) (tal como, por ejemplo, de  
 5 vinilpirrolidona) con subsiguiente reacción parcial de  
 los anillos carbonato cíclicos del poli(carbonato de vi-  
 nileno) con una amina, por ejemplo con hexametilendiami-  
 na, para formar un copolímero de poli(carbonato de vini-  
 leno) sustituido, a través de un enlace uretano con un es-  
 paciador o efectuator. Los restantes grupos carbonato cíc-  
 clicos se saponifican luego para formar grupos hidroxilo:



poli(carbonato de vinileno)



1            Además del método aquí indicado como ejemplo, para  
el establecimiento del enlace covalente entre la matriz  
de vehículo y el efectuator proteínico u otros efectua-  
2            dores, existen además otros métodos que conducen a la reac-  
5            ción de los grupos hidroxilo o de determinados grupos del  
copolímero, con un efectuator y, de este modo, establecen  
el enlace covalente entre ambos; así, la conocida reacción  
con compuestos metálicos formadores de complejos, por ejem-  
plo, con compuestos de titanio. Todos estos métodos son -  
10            conocidos para el técnico en la materia.

En el caso de la unión de compuestos biológicamente  
activos de bajo peso molecular, es frecuentemente ventajo-  
so no activar al vehículo, sino al efectuator.

15            En principio, pueden ser utilizados todos los proce-  
dimientos que se conocen en la química macromolecular en  
el caso de la modificación de compuestos macromoleculares,  
sintéticos o naturales. Los copolímeros de polivinilengli-  
col se caracterizan, además de por su estabilidad química  
y térmica, por unas ventajosas propiedades de técnicas de  
20            transformación y conducen con ello a una superioridad fren-  
te a las matrices de vehículo, hasta ahora consideradas co-  
mo óptimas, a base de hidratos de carbono naturales. Se -  
pueden preparar, por ejemplo, en forma de fibras, hilos,  
láminas o partículas esféricas, de modo que, según la fi-  
25            nalidad de aplicación del efectuator a unir con ellos, -

1 se puede elegir la forma más adecuada. Preferentemente, estos copolímeros se emplean en forma de polvos de tamaño fino de partículas, con una elevada superficie específica.

5 Debido al tamaño, regulable mediante técnicas de producción, de la superficie accesible para el enlace de los efectadores o del espaciador, se manifiesta una ventaja adicional de los copolímeros de polivinilenglicol frente a los materiales de vehículo conocidos.

10 Los compuestos biológicamente activos, de acuerdo con la invención, son indicados para la mayor parte de los procedimientos de utilización que se han dado a conocer para otros efectadores unidos con vehículos insolubles en agua, hidrófilos. Según esto, se pueden hacer in-  
15 solubles en agua las enzimas. Las enzimas insolubles se utilizan cada vez más para la determinación de substratos en aparatos automáticos de análisis y como los llamados electrodos enzimáticos. Debido a la mayor estabilidad, una serie de enzimas unidas a vehículos están indicadas para la realización de reacciones enzimáticas técnicas.  
20

Las sustancias biológicamente activas, unidas con vehículos, han encontrado, debido a su propiedad de adsorbentes específicos, una amplia utilización en la cromatografía por afinidad. Con ayuda de inhibidores enzimáticos  
25

1       cos, naturales o sintéticos, unidos con vehículos, se  
      consigue la alta purificación de enzimas, mientras que  
      las enzimas se han encontrado sobresalientemente indica  
5       das como efectadores, especialmente para la obtención  
      de inhibidores enzimáticos naturales a partir de extra  
      tos brutos. Antígenos insolubles en agua, unidos con ve  
      hículos, se emplean para el aislamiento de los anticuer  
      pos correspondientes, los cuales, de esta manera, se ob  
10       tienen exentos de otros componentes de suero y exentos  
      de otros antígenos. Mediante cromatografía por afinidad,  
      se pueden aislar también anticuerpos no precipitables,  
      tales como los que, debido a su escasa concentración en  
      el suero, no son precipitables, y pueden también deter  
      minarse cuantitativamente.

15       Ejemplos

Preparación de los copolímeros de carbonato de vinileno.

      El carbonato de vinileno empleado para la prepara  
      ción de los copolímeros (CP), se puso en ebullición a -  
      reflujo, antes del empleo, durante una hora, sobre borohi  
20       druro de sodio (100 partes en peso de carbonato de vini  
      leno por 2 partes en peso de  $\text{NaBH}_4$ ) a una presión de 33  
      mm, después se destiló a  $75^\circ\text{C}/33$  mm por una columna de  
      50 cm de longitud, con envolverte de plata, rellena de -  
      anillos de vidrio Raschig, y se empleó de la manera más  
25       inmediata posible para la copolimerización. Asimismo, -

1 los comonomeros empleados se purificaron previamente de modo adicional por destilación.

1) Copolímero de vinilenglicol/alcohol vínico a partir de copolímero saponificado de carbonato de vinileno/  
5 acetato de vinilo.

a) En 9 partes en peso de carbonato de vinileno y 1 parte en peso de acetato de vinilo se disuelven 0,05 partes en peso de azobisisobutironitrilo, bajo nitrógeno. - La mezcla de monómeros se carga, bajo nitrógeno, en un -  
10 tubo bomba de aluminio aplanado (4 mm de espesor, 60 mm de anchura, 150 mm de longitud) con cierre de rosca, (volumen de llenado total, aproximadamente 35 ml), se cierra bajo nitrógeno y se cuelga dentro de un baño de agua caliente a 50°C, durante 48 horas. Se obtienen placas de -  
15 material sintético, duras y quebradizas, que se trituran previamente en un molino de impacto. Seguidamente, el -- granulado se calienta a 120°C, a una presión de 1-2 mm, durante 5 horas, para separar el resto de monómero que - no se ha polimerizado.

20 El granulado desprovisto de monómero se continúa moliendo en un molino hasta un tamaño de granos inferior a 0,1 mm, se incorpora en 500 partes en peso de lejía de - sosa 0,5 N, se mezcla durante una hora a 20°C con un agitador de movimiento rápido, siendo saponificados los gru-  
25 pos carbonato y acetilo. El copolímero de vinilenglicol/

1 alcohol vinílico, insoluble en agua, se filtra con suc-  
ción, se lava bien con agua hasta quedar libre de sales  
inorgánicas y se liofiliza (seca por congelación). Rendi-  
5 miento: 4,7 partes en peso de copolímero de vinilenglicol/  
alcohol vinílico, con una superficie específica medida -  
según el método BET, de  $34 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

b) Como se ha descrito en el apartado 1.) a), a ex-  
cepción de que por cada 7 partes en peso de carbonato de  
vinileno se emplean 3 partes en peso de acetato de vinilo.

10 Rendimiento: 4,1 partes en peso de copolímero de vi-  
nilenglicol/alcohol vinílico, con una superficie especí-  
fica del polvo de polímero secado por congelación, de -  
 $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

c) Ensayo de comparación como se describe en 1.) a),  
15 a excepción de que se emplean 10 partes en peso de carbo-  
nato de vinileno y nada de comonomero.

Rendimiento: 4,7 partes en peso de homopolímero de  
vinilenglicol, con una superficie específica del polvo -  
de polímero secado por congelación de  $20,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

20 2.) Copolímero de vinilenglicol/vinilglicidil-éter

Una mezcla de 7 partes en peso de carbonato de vi-  
nileno, 3 partes en peso de vinilglicidil-éter y 0,1 par-  
tes en peso de azobisisobutironitrilo, se calienta, como  
se ha descrito en 1.) a), en tubos bomba de aluminio pla-  
25 nos, a  $50^\circ\text{C}$ , bajo nitrógeno, durante 3 días. Como se des-

1       cribe en l.) a), las placas de material sintético obtenidas se desmenuzan, se elimina de ellas el monómero, se muelen hasta un tamaño de granos inferior a 0,1 mm, se suspenden en 500 partes en peso de NaOH 0,5 n, enfriada  
5       con hielo, con un agitador de movimiento rápido, durante 30 minutos, seguidamente se separa de inmediato por -- centrifugación el polímero saponificado, se pone en suspensión en hielo/agua, se neutraliza hasta pH 7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 n, enfriando con hielo, se filtra con succión, se lava  
10       con hielo/agua y se seca por congelación.

Rendimiento: 3,9 partes en peso de copolímero de vinilenglicol/vinilglicidil-éter, que contiene 1,3 miliequívalentes de grupos oxirano/gramo (determinado según: --  
15       "Praktikum der makromolekularen organischen Chemie", página 221, de Braun, D., Chardron, H., Kern, W., Hüthig Verlag, Heidelberg 1966).

3.) Material de vehículo copolímero sustituido con amino.

      3,9 partes en peso de copolímero de vinilenglicol/vinilglicidil-éter (procedente del Ejemplo 2)) se suspenden con un agitador Ultra-Turrax en 100 partes en peso  
20       de agua y se mezclan con 10 ml de amoníaco al 30%. Con un agitador magnético pequeño se continúa agitando, seguidamente, durante otras 10 horas, a 50°C, finalmente se filtra con succión y se lava bien con agua y se seca por  
25       congelación.

1            Rendimiento: 3,5 partes en peso de material de vehí-  
culo copolímero, que contiene 0,9 miliequivalentes de --  
grupos amino por gramo, en forma de grupos 3-amino-2-hi-  
droxi-propilo (formados a partir de la reacción de amo-  
5            níaco con grupos glicidilo).

4.) Copolímero de vinilenglicol/ácido acrílico

9 partes en peso de carbonato de vinileno, 1 parte  
en peso de éster etílico de ácido acrílico y 0,05 partes  
en peso de azobisisobutironitrilo se polimerizan bajo -  
10            nitrógeno como en el Ejemplo 1.)a), se desmenuzan, se --  
elimina de ellas el monómero y se muelen hasta un tamaño  
de granos inferior a 0,1 mm, se filtran con succión, se  
lavan y se secan por congelación.

15            Rendimiento: 5,0 partes en peso de polvo de polímero  
hidrófilo, que contienen 1,1 miliequivalentes de grupos  
carboxilo por gramo de vehículo, con una superficie espe-  
cífica, según el método BET, de  $27,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

5.) Poli-vinilenglicol sustituido con grupos  $\omega$ -aminohexilo

5 partes en peso de copolímero de vinilenglicol/áci-  
20            do acrílico, (procedente del Ejemplo 4), se suspenden, -  
con el Ultra Turrax, en 100 ml de agua, se enfrían hasta  
5°C, se mezclan con 2,5 g de para-toluenosulfonato de N-  
-ciclohexil-(N'-(N-metilmorfolino)-etil)-carbodiimida, se  
agitan durante 30 minutos a pH 5 y 5°C, se separan por -  
25            filtración y se lavan rápidamente con hielo/agua. El vehí-

1       culo activado se suspende seguida e inmediatamente, en  
una solución de 5 g de hexametilendiamina en 100 ml de  
agua, puesta a pH 7,5 con HCl 2 n y enfriada a 5°C, y se  
5       agita durante 24 horas más en estas condiciones con un -  
agitador magnético, se filtra con succión, se lava bien  
con agua y se seca por congelación.

Rendimiento: 4,5 partes en peso de poli-vinilengli-  
col sustituido con grupos  $\omega$ -aminohexilo, con 0,7 milie-  
quivalente de grupos amino por gramo de vehículo.

10      6.) Reacción de copolímero de vinilenglicol/alcohol viní-  
lico procedente del Ejemplo 1.)a), con una superficie es-  
pecífica según el método BET, de  $34 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

a) con epíclorhidrina

15      50 g de un copolímero de vinilenglicol/alcohol viní-  
lico, preparado según el Ejemplo 1.)a), se suspenden en  
1 litro de NaOH 2 n, se mezclan con 250 ml de epíclorhi-  
drina y se agitan durante 2 horas a 55-60°C. El valor del  
pH de la suspensión desciende, al cabo de un corto tiempo,  
20      hasta 10-11. Mediante la adición de NaOH se mantiene du-  
rante 1 hora más este valor de pH. Al cabo de 2 horas de  
tiempo de reacción se filtra con succión el material só-  
lido, se lava con agua, con acetona y, finalmente, nueva-  
mente con agua.

b) con hexametilendiamina

25      50 g de hexametilendiamina se disuelven en 1,5 li-

1 tros de agua y se mezclan con HCl hasta pH 10. A la solu-  
ción se añade el copolímero de vinilenglicol/alcohol viní-  
lico, activado según 6.)a), y se agita durante 6 horas a  
5 50-55°C. Después, se filtra el producto con succión y se  
lava con agua hasta liberarlo de hexametenodiamina.

c) con éster de ácido sulfúrico de 1-aminobenceno-  
-4-β-hidroxietilsulfona.

10 El producto obtenido en el Ejemplo 6.)b) se agita -  
durante una hora, con 50 g de éster sulfúrico de 1-amin-  
benceno-4-β-hidroxietilsulfona, a 55°C y a pH 10. Se-  
guidamente, se separa el material sólido por filtración,  
se lava con agua, con acetona y, nuevamente, con agua.

d.) Diazotación

15 10 g del producto obtenido en el Ejemplo 6.)c) se -  
lavan sobre un embudo Buchner, con 200 ml de HCl 0,1 n y,  
después, se suspenden en 300 ml de HCl 0,5 N. La suspen-  
sión se mezcla, con agitación, con una solución de NaNO<sub>2</sub>  
0,1 n, a 0-4°C, hasta que se pueda comprobar en la diazo-  
tación, con papel de almidón KI, un pequeño exceso de ni-  
20 trito. Al cabo de 10 minutos, se separa por filtración -  
mediante un embudo Buchner y el residuo se lava con hielo/  
agua y, seguidamente, con tampón de fosfato sódico 0,15  
M y de pH 7,5, a la temperatura de 0 a 4°C.

e) Unión covalente con proteína.

25 0,8 g de albúmina se disuelven en 350 ml de tampón

1 de fosfato de pH 7,5, se enfrían a 4°C y se les añade el  
 producto preparado en 6.)d). La suspensión se agita duran  
 te 20 horas a 4°C, después de ello se separa por filtra-  
 ción, y el material sólido se lava con NaCl 1 M y con so  
 5 lución de sal común tamponada con fosfato (PBS), (solu-  
 ción acuosa de NaCl al 0,9%, con un contenido de tampón  
 de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  1/15 mol, de pH 7,2).

El producto filtrado y las soluciones de lavado se  
 investigan sobre albúmina según el método de la inmunodi  
 10 fusión radial. 60 mg de albúmina se unen con 1 g del vehí-  
 culo así preparado.

7.) Reacción de copolímero de vinilenglicol/alcohol viní-  
 lico procedente del Ejemplo 1.)b), con una superficie es-  
pecífica, según el método BET, de  $62,5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

15 Según reacciones análogas a las descritas en 6.)a) hasta  
 e), se pueden unir cuantitativamente 80 mg de albúmina --  
 con 1 g de vehículo activado.

8.) Reacción de homopolímero de vinilenglicol procedente -  
 del Ejemplo 1.)c), con una superficie específica, según -  
 20 el método BET, de  $20,5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

Según reacciones análogas a las descritas en 6.)a) has-  
 ta e), se pueden unir cuantitativamente 45 mg de albúmina -  
 con 1 g de vehículo activado.

9.) Copolímero de vinilenglicol/vinilpirrolidona sustituí-  
 25 do con grupos  $\omega$ -aminohexilo.

1            En 9 partes en peso de carbonato de vinileno y 1 parte en peso de vinilpirrolidona, se disuelven, bajo nitrógeno, 0,05 partes en peso de azobisisobutironitrilo, y se polimerizan y transforman de manera análoga a la del Ejemplo 1.) a).

5

10

15

20

25

Después de eliminar el monómero, el granulado se disuelve hasta formar una solución al 12% en peso en dimetilformamida, y esta solución se inyecta, con una presión de 15 atmósferas manométricas, en un baño de precipitación de metanol. Se obtiene un precipitado de fibras finas de copolímero de carbonato de vinilideno/vinilpirrolidona, al cual se filtra con succión, se lava posteriormente con metanol y se vuelve a suspender en 200 partes en peso de metanol. Se añaden 6 partes en peso de hexametilenodiamina, disueltas en 50 partes en peso de metanol, se agita la suspensión durante 2 días a la temperatura ambiente, se filtra con succión y se lava con metanol. El residuo de filtración, lavado, se suspende luego en una solución de 10 partes en peso de metilato sódico en 300 partes en peso de metanol al 96%, durante 4 días a la temperatura ambiente, se lava con metanol y, después, de manera muy intensa, con agua, y se seca por congelación.

Rendimiento: 5,0 partes en peso de copolímero de vinilenglicol/vinilpirrolidona, sustituido con grupos  $\omega$ -aminohexilo, a través de enlaces uretano, que contiene 1,6 -

1 miliequivalentes de grupos  $\text{NH}_2/\text{g}$  de vehículo.

10.) Unión de IgG con un copolímero sustituido con grupos  $\omega$ -aminohexilo procedente del Ejemplo 9.), con ayuda de anhídrido de ácido succínico y carbodiimida soluble en agua.

5 partes en peso del vehículo sustituido con grupos  $\omega$ -aminohexilo preparado según el Ejemplo 9, se someten a succinilación durante 4 horas, a  $10^\circ\text{C}$  y pH 6, con 2,5 partes en peso de anhídrido de ácido succínico, que están suspendidas en 200 partes en peso de agua. El valor de pH se regula con NaOH 2n. Después de lavar el material sólido con agua, el producto se agita con 1,25 partes en peso de para-tolueno-sulfonato de N-ciclohexil-(N'-metilmorfolino)-etil-carbodiimida a pH 5 y a  $5^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos, se separa por filtración y se lava rápidamente con hielo/agua.

15 0,5 partes en peso de IgG se disuelven en 150 partes en peso de tampón de fosfato de pH 7,5, y se agitan con el vehículo activado, durante 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Después de filtración, el producto se lava con sal común 1 M y con PBS.

20 Con 1 g del vehículo se unen covalentemente 75 mg de IgG.

11.) Copolímero de vinilenglicol/dietilenglicol-divinil-éter.

1           En 9 partes en peso de carbonato de vinileno y 1 --  
parte en peso de dietilenglicol-divinil-éter, se disuel-  
ven 0,1 partes en peso de azobisisobutironitrilo, bajo ni-  
trógeno, y, como se ha descrito en 1.)a), se calientan  
5           en tubos-bomba de aluminio aplanados, bajo nitrógeno, du-  
rante 3 días, a 50°C, y se polimerizan. Después de trans-  
formación y saponificación como se describe en 1.)a), se  
obtienen 3,5 partes en peso de copolímero de vinilengli-  
col/dietilenglicol-divinil-éter.

10       12.) Copolímero de vinilenglicol/N-acriloilaminoacetalde-  
hidodimetilacetal.

15           a) En 9 partes en peso de carbonato de vinileno y 1  
parte en peso de N-acriloilaminoacetaldehidodimetilace-  
tal, se disuelven 0,05 partes en peso de azobisisobutiro-  
nitrilo, bajo nitrógeno. La mezcla de monómeros se poli-  
meriza como se describe en 1.)a), se transforma y se sa-  
ponifica para formar 4,1 partes en peso de copolímero de  
N-acriloilaminoacetaldehidodimetilacetal/vinilenglicol.

20           10 partes en peso de copolímero de N-acriloilaminoac-  
etaldehidodimetilacetal/vinilenglicol se agitaron en --  
100 partes en peso de HCl 1 n, durante 4 a 5 horas. El -  
vehículo activado se lavó con agua y con tampón de fosfa-  
to de pH 7,5.

25           b) 0,5 g. de albúmina se disolvieron en 200 ml de PBS  
y se agitaron, a 4°C, durante 14 horas, con el producto

preparado en a). Después de filtración, la proteína unida con el vehículo se lavó con sal común 1 M y con PBS.

1 g del vehículo así preparado se une con 40 mg de albúmina.

5

- REIVINDICACIONES -

10

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

15

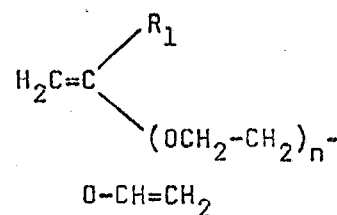
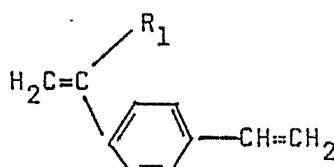
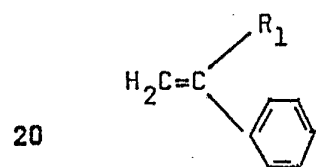
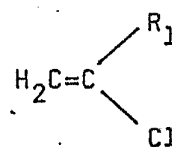
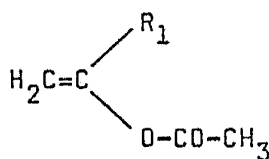
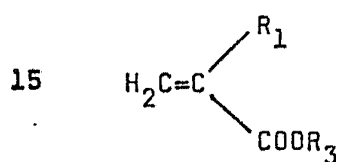
1ª.- Procedimiento para la preparación de una combinación formada por un copolímero de vinilenglicol y una sustancia biológicamente activa, unida con éste químicamente, caracterizado porque (A) se hace reaccionar un copolímero del carbonato de vinileno con una sustancia biológicamente activa y, después de ello se transforman los grupos carbonato cíclico, todavía presentes, en grupos hidroxí, o (B) se transforman los grupos carbonato cíclico de un copolímero del carbonato de vinileno, en grupos hidroxí, y (a) se hacen reaccionar grupos electrófilos

20

25

presentes en el copolímero, o introducidos en éste, con una sustancia biológicamente activa, o (b) estos grupos hidroxilo se hacen reaccionar (1) bien sea primeramente con un compuesto que contiene grupos electrófilos y, después, con una sustancia biológicamente activa, (2) bien sea directamente con una sustancia biológicamente activa portadora de grupos electrófilos.

2a.- Procedimiento según la reivindicación 1a, caracterizado porque el copolímero contiene por lo menos 55% de unidades monómeras de vinilenglicol y, como máximo, 45% de unidades monómeras de por lo menos un compuesto de las fórmulas generales:



25



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

Esta Memoria consta de treinta y dos hojas  
escritas a máquina por una sola cara.

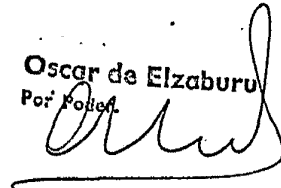
5

Madrid,

P.A.

19. MAR 1977

Oscar de Elzaburu  
Por Poder.



10

15

20

25