



Concedido el presente de acuerdo con las datos que figuran en la presente descripción y en el contenido de la memoria adjunta.

8261 707 02

ES

11	NUMERO	459200
21		
22	FECHA DE PRESENTACION	27 MAYO 1977

A 1

PATENTE DE INVENCION

40	PRIORIDADES:	42	FECHA.	43	PAIS
31	NUMERO				
	691.172		28 de mayo de 1.976		EE.UU. de A.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07G//A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA SEPARAR SELECTIVAMENTE ALBUMINA DE FLUIDOS ACUOSOS QUE LA CONTIENEN.	

71	SOLICITANTE (S)
CUTTER LABORATORIES, INC.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
Fourth and Parker Streets, Berkeley, California 94710, EE.UU. de A.	

72	INVENTOR (ES)
DUANE D. SCHROEDER.	

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO.	

Esta invención se relaciona con un procedimiento para la adsorción selectiva de albúmina a partir de mezclas que la contienen y para la elución prácticamente cuantitativa de la albúmina mediante el empleo de una nueva serie de com-
5 puestos soporte insolubles en colorantes.

La albúmina es una proteína principal del plasma sanguíneo o suero y constituye un producto comercialmente im-
portante usado en el campo médico. El proceso Cohn bien cono-
cido, o sus modificaciones, se utiliza en general en el frac-
10 cionamiento del plasma en diversas fracciones proteínicas me-
dicamente útiles e importantes, en adición a la producción de
albúmina. La albúmina, al ser una de las proteínas más solu-
bles, se encuentra entre las últimas que se aíslan en este
procedimiento de fraccionamiento largo y tedioso para la ob-
15 tención de una variedad de diferentes proteínas de plasma.
Como resultado, se han buscado otros métodos para la separa-
ción de albúmina a partir de plasma, sin sacrificio o perjuicio
de las restantes proteínas, que sea más rápido y económico.
Por otra parte, con frecuencia es deseable aislar componentes
20 específicos de plasma, tales como enzimas, que están libres
del contaminante principal, albúmina.

Recientemente, se ha descrito un método estable-
ciendo que la albúmina del plasma podría adsorberse selectiva-
mente y eluirse de compuestos insolubles que se producen a
25 partir de una clase específica de colorantes copulados a aga-
rosa (German Offenlegungsschrift 2443119 presentada el 9 de
septiembre de 1.974; J. Travis y R. Pannell, Clin. Chim. Acta
49, pp. 49-52, 1973). Esta clase de colorantes se caracteriza,
por cada colorante, por tener un núcleo triazina que está sus-
30 tituido con grupos anilina o naftilamina sulfonados. Uno de

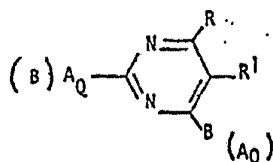
los compuestos colorante-agarosa descrito es Sepharose 4B el cual se activa primero con bromuro de cianógeno y se copula entonces a Blue Dextran. Blue Dextran es Cibacron Blue F3G-A en donde el átomo de cloro de la mitad triazina ha sido reemplazado con O-Dextran. El compuesto Dextran Sepharose 4B-Blue parece absorber 96 % de la albúmina del plasma con practicamente ninguna adsorción de los otros componentes proteínicos. La albúmina se eluye en un 80 % aproximadamente utilizando un disolvente de elución de fosfato-etanol a pH 2,4. Se ha descrito otros compuestos de colorante-agarosa incluyendo Cibacron Blue F3G-A copulado a Sepharose 4B reticulado. Aunque se han descrito diversos solutos para la elución de albúmina, incluyendo una mezcla de ácido octanóico, tris hidrocioruro y cloruro sódico, cloruro de calcio, magnesio o potasio con tri hidrocioruro, y elevadas concentraciones molares de urea acuosa, no se ofrecen detalles algunos sobre la eficacia de la elución.

si bien este método de Travis et al parece útil para la separación selectiva de albúmina a partir de mezclas de proteínas, la recuperación de albúmina no es suficientemente alta para garantizar el empleo de este proceso a escala comercial. Por otra parte, no existe indicación alguna de la eficacia en la absorción selectiva de albúmina a partir de soluciones proteínicas distintas a las de plasma, en el caso de que las soluciones contengan mayores o menores porcentajes de albúmina como en ciertas fracciones Cohn, por ejemplo gamma-globulina en bruto, fracciones Cohn IV-1, IV, IV-4, la proteína en Supernatant II + III y Plasmanate^R (fracción de proteína de plasma aislada del Supernatant IV-1 de Cohn).

Se ha encontrado que una clase específica de co-

lorantes, cuando se copulan químicamente a ciertos soportes
poliméricos insolubles, proporcionan compuestos de colorante-
soporte que no solo adsorben selectivamente albúmina a partir
de mezclas de soluciones proteínicas conteniendo albúmina,
5 sino que también permiten la elución de albúmina de un modo
prácticamente cuantitativo. Esta característica mejorada con
respecto a la elución de albúmina a partir de los compuestos
adsorbentes, es inesperada puesto que la estructura de los
colorantes que forman los compuestos colorante-soporte utiliza-
10 dos en el presente procedimiento y los colorantes de los sopor-
tes-colorantes utilizados por Travis et al no son notablemente
diferentes. Una diferencia estructural reside en que un colo-
rante se une a un soporte mediante un núcleo pirimidina según
los compuestos utilizados en la presente invención, mientras
15 que los compuestos de la técnica anterior tienen un núcleo
de triazina que conecta un colorante a un soporte.

En el proceso de la presente invención, la al-
búmina es cuantitativa y selectivamente adsorbida a partir de
soluciones proteínicas que contienen dicha albúmina, poniendo
20 en contacto las soluciones con un compuesto insoluble de fór-
mula general:

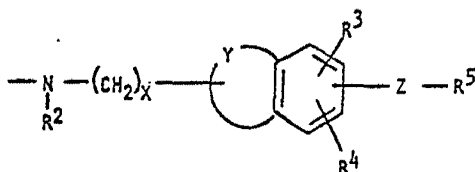


(I)

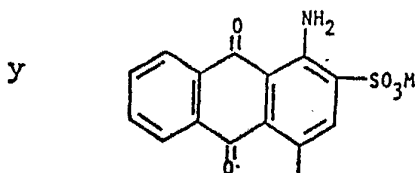
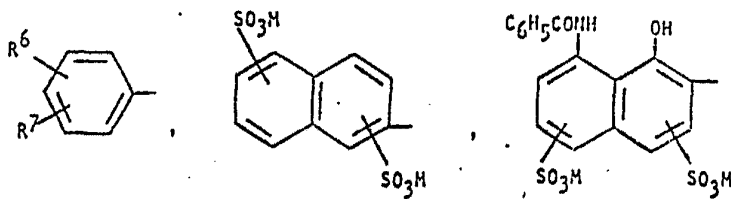
y separando el compuesto adsorbido de albúmina de la fase
acuosa. El proceso de esta invención incluye también la etapa
adicional de tratar el compuesto adsorbido de albúmina con un
25 eluyente, para separar prácticamente toda la albúmina del com-

puesto colorante-soporte.

En la fórmula general I, A y B son diferentes y son intercambiables con respecto a sus posiciones en el anillo pirimidina; A es un soporte que comprende un polímero insoluble que tiene grupos hidroxilo, alguno de los cuales han sido reemplazados por enlaces éter conectados a la posición 2 ó 4 del núcleo pirimidina; B es una mitad colorante de fórmula general:

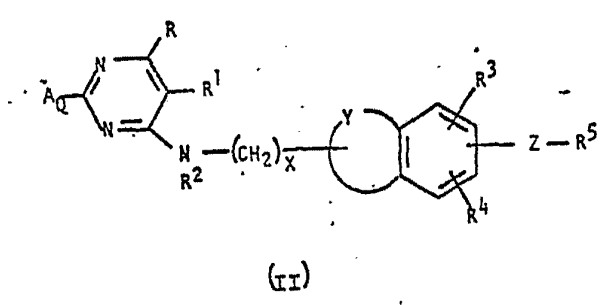


sustituída en la posición 4 ó 2 del núcleo pirimidina; R es halógeno, por ejemplo fluor o cloro, o alquilo inferior (C₁ a C₄); R¹ es hidrógeno, halógeno, por ejemplo fluor o cloro, SCH₃ o alquilo inferior (C₁ a C₄); R² es hidrógeno o alquilo inferior (C₁ a C₄); R³ y R⁴, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen del grupo consistente en hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior (C₁ a C₄), alcoxi inferior (C₁ a C₄) y -SO₃M; X es 0 ó 1; Y es (-H)₂ ó -CH=CH-CH=CH-; Z es -NH ó -N=N-; R⁵ es arilo sustituido, por ejemplo:

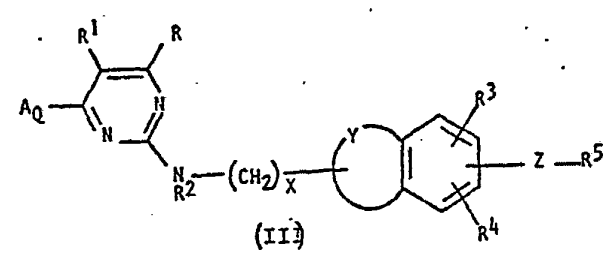


5 y R⁶ y R⁷, que pueden ser iguales o diferentes, se eligen del grupo consistente en hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior y SO₃M; M es hidrógeno o un metal alcalino; y Q es la relación en peso del polímero insoluble A a la mitad colorante B, que oscila entre 1:1 y 50:1.

10 En el procedimiento de la invención, las dos modalidades de compuestos de colorante-soporte insolubles, empleados para adsorber selectivamente albúmina a partir de soluciones proteínicas que contienen albúmina, están representados por la fórmula general II:



o por la fórmula general III:

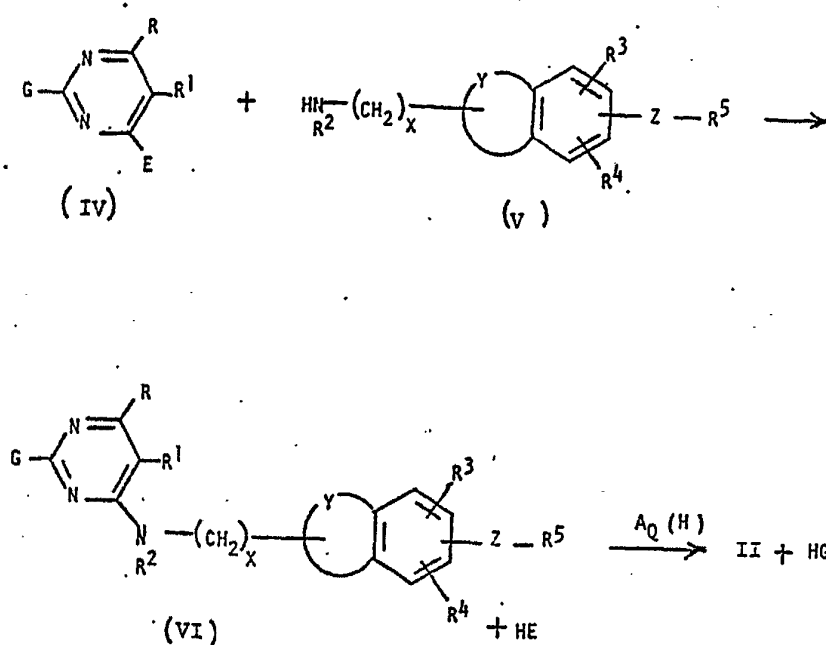


15 en donde A, R, R¹ - R⁵, X, Y, Z y Q se definen como en la fórmula I anterior.

El polímero A usado como soporte al cual se

5 copula o acopla el colorante, puede ser cualquier polímero
 insoluble que tenga un número de grupos hidroxilo. Se inclu-
 yen, pero no de forma limitativa, agarosa, agarosa reticulada
 y dextranos modificados tales como los suministrados por
 10 Pharmacia Fine Chemicals con los nombres registrados de
 geles Sepharose, grados 2B, 4B, y 6B, geles Sepharose reticu-
 lados, grados CL-2B, CL-4B, y CL-6B, y geles Sephadex, grados
 G-75, G-100, G-150 y G-200, respectivamente. Cualquier polí-
 15 mero insoluble portador de grupos hidroxilo deberá tener un
 tamaño de poro suficiente para permitir que la albúmina entre
 en los poros para adsorberse sobre el colorante que está aco-
 plado a la estructura soporte dentro de los poros. Los diver-
 sos grados de geles Sepharose and Sephadex indicados anterior-
 mente caen bastante bien dentro de esta necesidad. Los geles
 Sephadex son en general los preferidos.

Los compuestos colorante-soporte de fórmula general II se preparan por el esquema de reacción:

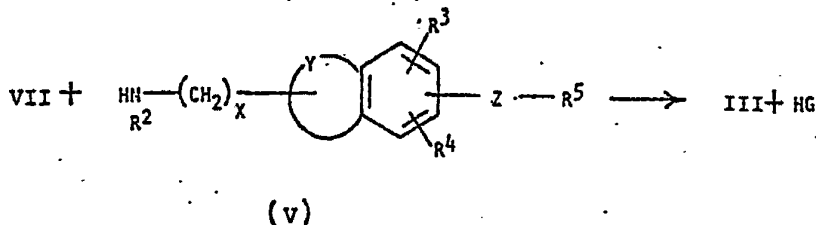
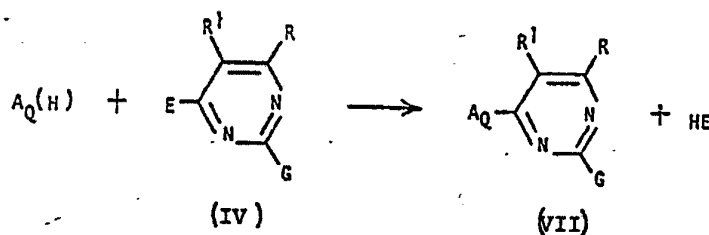


5

en donde E es un átomo de halógeno, preferiblemente fluor, y G es un átomo de halógeno, preferiblemente fluor, u otro grupo reactivo tal como $-SO_2CH_3$. Un número de los átomos (H) de los grupos hidroxilo del soporte A son reemplazados con el colorante reactivo VI. Un miembro preferido de agentes de copulación de pirimidina IV es 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina.

Los compuestos colorante-soporte de fórmula general III se preparan por el esquema:

10



15

La reacción del agente de copulación IV con el colorante V o soporte A se efectúa generalmente a temperatura ambiente o inferior en un medio alcalino. Por ejemplo, se puede añadir IV a una solución acuosa básica del colorante V a 20-30°C aproximadamente manteniéndose el pH de la mezcla de reacción próximo a la neutralidad por la adición de solución de carbonato sódico.

La copulación del colorante reactivo VI con el soporte A se efectúa añadiendo una solución acuosa del colo-

rante reactivo a una suspensión acuosa tamponada del soporte insoluble, a temperaturas algo elevadas, y continuando la reacción de copulación con agitación durante unos cuantos minutos hasta 1 hora o así. El producto copulado II se lava entonces totalmente con agua caliente seguido por un lavado con tampón Tris conteniendo azida sódica como agente bacterioestático. El compuesto colorante-soporte húmedo se utiliza en el acto o se puede almacenar a unos 5°C durante periodos indefinidos.

Las proporciones de reactantes, concentraciones, tiempo y temperaturas no parecen ser críticos. Por ejemplo, la relación del peso del colorante reactivo al peso del soporte insoluble puede variar, es decir entre 0,1 a 5 g aproximadamente de colorante por 5 g de soporte insoluble. Una cantidad demasiado pequeña de colorante se traduciría en un desperdicio del soporte mientras que una cantidad demasiado alta de colorante constituiría un desperdicio del mismo. Entre 0,5 y 1,5 g del colorante reactivo por 5 g de soporte, constituye la proporción preferida. Puesto que los geles de Sepharose se suministran como suspensiones, es más conveniente realizar las medidas en volumen que en peso. De este modo, 100 ml de gel de Sepharose sedimentado corresponde a unos 4 g de soporte seco.

La solución de colorante reactivo se prepara en general como una solución al 5 % aproximadamente, si bien se pueden utilizar soluciones más diluidas o concentradas. La suspensión de soporte insoluble puede variar en una amplia gama, si bien parece más conveniente la utilización de una suspensión al 2 %. La reacción de copulación se presenta a un pH de 7 a 10 aproximadamente, el cual se proporciona por

adición de un tampón adecuado tal como carbonato sódico u otro álcali. La temperatura de la reacción puede variar entre 45 y 85°C aproximadamente, con preferencia no superior a 65°C cuando se utilizan geles de Sepharose, ya que tienden a fundir a unos 70°C aproximadamente. Si se utilizan temperaturas mayores, por ejemplo unos 85°C, entonces se deberá utilizar un gel reticulado de Sepharose. Con los geles de Sephadex, pueden utilizarse los límites superiores (85°C, si bien la reacción es rápida a temperaturas menores, prefiriéndose la gama de 50 a 60°C. En la práctica de la separación de albúmina a partir de mezclas proteínicas acuosas que contienen dicha albúmina, esta última se absorbe selectivamente sobre un compuesto de colorante-soporte utilizando una operación discontinua o en columna. Cualquier operación es conveniente a escala comercial. El compuesto de colorante-soporte se equilibra primero con una solución de concentración iónica adecuada, tal como cloruro sódico, tampón de tris-HCl/cloruro sódico, tampón de carbonato o fosfato sódico, normalmente a una gama pH de 6,5 a 8,5, preferiblemente a 8 aproximadamente.

El material de partida a partir del cual se puede separar la albúmina, puede estar constituido por diferentes soluciones proteínicas que contienen diversos porcentajes de albúmina, incluyendo: plasma humano; Supernatant II + III (del proceso Cohn; E. J. Cohn et al, J. Am. Chem. Soc., 68, 459 (1946); mezclas conteniendo predominante globulinas y albúmina, incluyendo la fracción de proteína Plasmanate[®] (Patente USA No. 2.958.628); fracciones Cohn IV-1, IV y IV-4 (del proceso Cohn); y albúmina humana ligeramente impura. La utilidad del proceso de esta invención no queda limitada a las mezclas anteriores como materiales de partida, por ejem

5 plo se puede utilizar albúmina procedente de mezclas distintas a las derivadas de personas. El proceso es también de utilidad para la purificación de enzimas y otros productos biológicos en los cuales las enzimas en bruto u otros productos impuros están contaminados con albúmina.

10 Después de la equilibración del compuesto colorante-soporte, se deja que la solución de proteína conteniendo albúmina entre en contacto con el compuesto colorante-soporte. En general, se deja que la solución de proteína entre en contacto con unos 10 ml de compuesto colorante-soporte experimentado, en una cantidad de la solución que contenga aproximadamente 100 mg de albúmina. Son también posibles el empleo de cantidades más pequeñas o mayores de albúmina por 10 ml de colorante-soporte, por ejemplo normalmente una gama preferida es la de 10 a 500 mg/10 ml aproximadamente. La adsorción de la albúmina sobre el compuesto colorante-soporte se puede realizar según un procedimiento discontinuo o en columna y requiere solo un periodo muy breve de tiempo de contacto de aproximadamente 1 minuto a varios minutos para efectuar la adsorción prácticamente cuantitativa de la albúmina. En un procedimiento en columna, las velocidades de flujo pueden ser muy rápidas.

25 Después de la adsorción, en el caso de las operaciones discontinuas, el líquido sobrenadante se separa por decantación o filtración, etc., y el compuesto colorante-soporte se lava hasta liberarlo de cualquier proteína sin adsorber, por ejemplo con tampón tris-HCl 0,05 M. En las operaciones en columna, se deja fluir el tampón a través de la columna hasta que se observa la ausencia de proteína, convenientemente analizando los lavados por absorbancia U.V. a

30

280 nm.

5 El proceso de la presente invención incluye además la elución prácticamente cuantitativa de la albúmina, la cual está adsorbida en el compuesto colorante-soporte, con
10 agentes eluyentes adecuados que no alteran la albúmina y que son fisiológicamente aceptables. La mejora de la etapa de elución de la presente invención con respecto a la técnica anterior, es decir la separación prácticamente cuantitativa de la albúmina del compuesto colorante-soporte, se cree que está
15 relacionada al hecho de que la albúmina está menos unida firmemente a la porción colorante del compuesto utilizado en el presente procedimiento. Sin embargo, la resistencia de la unión de la albúmina al colorante es bastante grande ya que la totalidad de la albúmina de las mezclas proteínicas conteniendo albúmina está absorbida sobre el compuesto colorante-so-
20 porte. Los compuestos colorante-soporte utilizados en la presente invención son capaces de utilizarse repetidamente después de la elución de la albúmina, es decir mantienen sus propiedades de adsorción para la ulterior separación de albúmina de mezclas proteínicas conteniendo albúmina.

25 La elución de la albúmina absorbida es prácticamente cuantitativa cuando la albúmina se obtiene esencialmente pura. La elución se puede efectuar con diversos tipos diferentes de agentes eluyentes incluyendo soluciones básicas tamponadas de ácidos grasos, de los cuales el ácido caprílico es un miembro preferido ya que constituye también un buen es-
30 tabilizante para la albúmina. Entre otros agentes eluyentes adecuados se encuentran las soluciones de electrolitos, preferiblemente aquellas que son también fisiológicamente aceptables, tales como cloruro sódico, fosfato sódico, etc., tenien-

do en general una concentración iónica de aproximadamente 0,2 a 1 M. Otros agentes eluyentes eficaces son los aminoácidos tales como triptofano, N-acetilriptofano, glicina con cloruro sódico y tiocianato, sales de calcio, potasio y magnesio y bicarbonato amónico o carbonato sódico. Estas últimas sales, si bien son eficaces, no son fisiológicamente aceptables en un producto final y deben ser eliminadas, por ejemplo, por diálisis, ultrafiltración u otro medio, antes de que la albúmina resulte adecuada para uso parenteral.

El pH del agente eluyente deberá estar comprendido generalmente entre 6 y 8,5 aproximadamente, con preferencia el pH debe ser de 8 aproximadamente, si bien resulta también eficaz un pH inferior. El mantenimiento del pH preferido se puede llevar a cabo por la inclusión de un tampón, por ejemplo, bicarbonato sódico, fosfato sódico o tris-HCl. La cantidad de agente eluyente necesaria para separar prácticamente toda la albúmina adsorbida, puede variar en función de los eluyentes específicos utilizados. El término de la elución se puede determinar fácilmente por absorbancia UV a 280 nm del eluado. El eluado, conteniendo albúmina que es esencialmente pura o está libre de otro material proteínico, se puede concentrar por métodos bien conocidos en la técnica, tal como precipitación, diafiltración, ultrafiltración, etc., cuyos procedimientos separan también parte o la totalidad del material utilizado como agente eluyente de la albúmina. Las soluciones concentradas de la albúmina conteniendo agentes estabilizantes adecuados, se pueden tratar térmicamente para destruir cualquier virus de hepatitis que pueda estar presente, filtrarse hasta esterilidad y liofilizarse para proporcionar albúmina seca y pura. Alternativamente, el eluado tra-

tado termicamente se puede concentrar hasta una concentración adecuada para uso parenteral, por ejemplo 5 %, tras lo cual se filtra bajo condiciones estériles en viales.

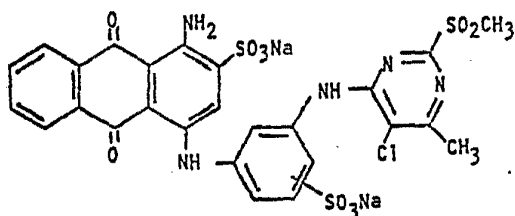
5 Los compuestos colorante-soporte utilizados en el proceso de esta invención se pueden utilizar repetidamente mediante el simple hecho de re-equilibrar con una solución adecuada, por ejemplo tris-HCl entre 0,05 y 0,1 M, cloruro sódico, etc.

10 Algunos de los colorantes reactivos VI utilizados para la copulación a los soportes A insolubles, incluyen los siguientes:

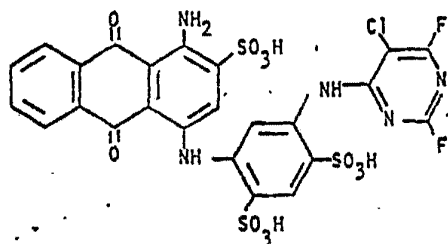
Tabla 1

Colorante reactivo

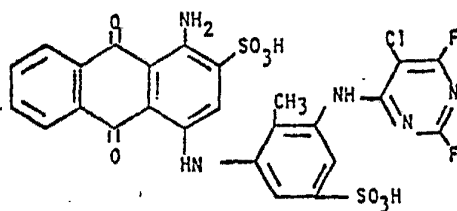
Número



RD-1



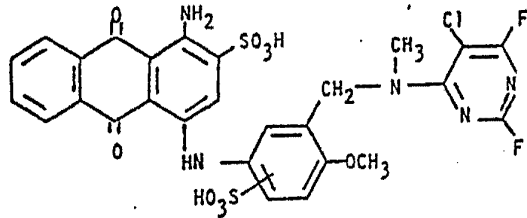
RD-2



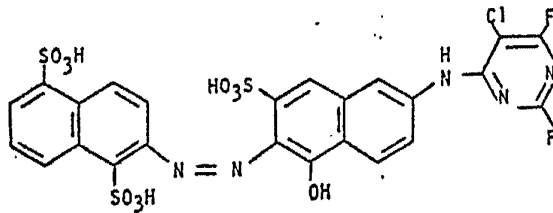
RD-3

Colorante reactivo

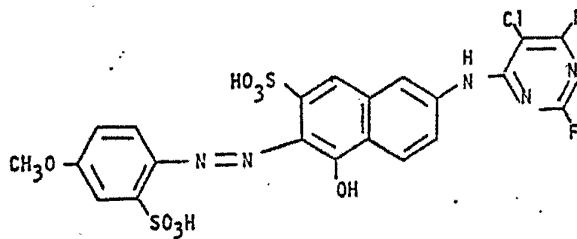
Número



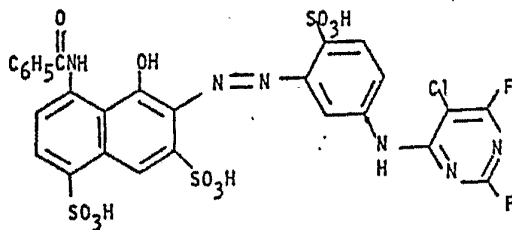
RD-4



RD-5



RD-6



RD-7

La invención puede entenderse más completamente mediante algunas modalidades preferidas establecidas en los siguientes ejemplos.

PREPARACION DE COLORANTES REACTIVOS (RD)

A. Preparación de RD-1

Una solución de 38,2 g de ácido 1-amino-4-bromo-2-antraquinona sulfónico (suministrado por Pfaltz & Bauer, Inc., Flushing, N.Y.) y 1,5 g de cloruro cúprico en 750 ml de agua, se añade a una solución de 38 g de m-fenilendiamina, 20 g de sulfito sódico y 25 g de carbonato sódico en 250 ml de agua. La mezcla se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 6-8 horas, se clarifica con carbón vegetal y el producto de condensación se precipita con la adición de 220 g de cloruro sódico.

A una solución de 40,9 g de producto de condensación, ácido 1-amino-4-(3'-aminoanilino)antraquinona-2-sulfónico, en 300 ml de agua, se añaden 26,5 g de 2-metilsulfonil-4,5-dicloro-6-metilpirimidina (Patente alemana No. 2242.507). La mezcla se calienta a 50°C y el ácido clorhídrico se neutraliza con solución de carbonato sódico. El producto copulado se seca, se pulveriza y se añaden 220 ml de ácido sulfúrico fumante al 15 %, manteniendo la mezcla a una temperatura por debajo de 30°C con enfriamiento. La mezcla se añade a 500 g de hielo, se filtra el precipitado, se disuelve en 300 ml de agua, se neutraliza con hidróxido sódico, se calienta a 75°C y se trata con salina al 10 %. Con enfriamiento, se obtiene el colorante reactivo RD-1 que tiene la estructura mostrada anteriormente en la Tabla I.

B. Preparación de RD-2

El procedimiento es el mismo que el descrito en la preparación A (anterior) para la síntesis de ácido 1-amino-4-(3'-aminoanilino)antraquinona-2-sulfónico. A una solución de 8,2 g de este intermedio, en una mezcla de 160 ml de agua,

80 ml de dioxano y 1,05 g de carbonato sódico, se añaden gota a gota 3,8 g de 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina a 0°C. El pH de la mezcla se mantiene entre 6 y 6,5 por adición de solución de carbonato sódico 2N. El producto de reacción se salifica por adición de 5 g de cloruro sódico a 20°C, se lava con solución de cloruro sódico al 2 % y se seca a 30°C. Se añaden lentamente 10 g del producto seco a 70 g de oleum al 13 % a 0°C, permitiendo que la temperatura suba a unos 20°C cerca del final de la reacción. La mezcla se vierte en 220 g de agua de hielo conteniendo 30 g de cloruro potásico. El producto precipitado se filtra y se lava con solución saturada de cloruro potásico hasta neutralidad, para dar el colorante reactivo RD-2 que tiene la estructura mostrada en la Tabla 1.

La 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina se obtiene por el procedimiento descrito en la Patente británica No. 1.157.948.

C. Preparación de RD-3

Siguiendo el procedimiento análogo al descrito en la preparación A, se condensa ácido 1-amino-4-bromo-2-antraquinona sulfónico con ácido 2,6-diaminotolueno-4-sulfónico, describiéndose la síntesis de este último compuesto por Bückel, Chem. Zentr. 28, p. 1410 (1904). Este producto condensado se copula entonces con 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina de forma análoga al procedimiento descrito en la preparación de B, para dar el colorante reactivo RD-3 que tiene la estructura mostrada en la Tabla I.

D. Preparación de RD-4

Por un procedimiento análogo al descrito en la preparación A, se condensa ácido 1-amino-4-bromo-2-antraquinona sulfónico con 3-metilaminometil-4-metoxianilina, descri-

biéndose la síntesis de este último compuesto en la Patente alemana No. 2.107.914. El producto condensado se sulfona por el procedimiento descrito en la preparación A. Se hace reaccionar una solución acuosa al 5 % aproximadamente del producto sulfonado con un equivalente molar de 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina a 20-25°C, manteniendo el pH entre 6 y 6,5 por adición de carbonato sódico. Se añade cloruro sódico a la mezcla de reacción la cual se ajusta a pH 5 hasta que la precipitación parece completa. El producto cristalino se filtra, se lava con solución de cloruro sódico al 15 % y se seca para dar el colorante reactivo RD-4 que tiene la estructura mostrada en la Tabla I.

E. Preparación de RD-5

A 27 g de la sal sódica de ácido 2-amino-5-hidroxinaftaleno-7-sulfónico (J-ácido suministrado por Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.) en 150 ml de agua, se añaden 20 g de 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina con agitación a 30°C, mientras se neutraliza el fluoruro de hidrógeno formado por adición de 34 ml de solución de carbonato sódico al 16%. Una vez terminada la reacción, se añaden 30 g de bicarbonato sódico. Se añade gota a gota, a 20°C, en 15 minutos, una suspensión de la sal de diazonio preparada a partir de 34 g de la sal disódica del ácido 2-aminonaftaleno-1,7-disulfónico (síntesis de la amina descrita por Bucherer et al, J. Pract. Chem. (2) 103, 144 (1868) en 200 ml de agua. Después de la adición de 80 g de cloruro sódico, la mezcla se agita 1 hora, se filtra el colorante precipitado, se lava con solución diluida de cloruro sódico y se seca a 35°C para dar el colorante reactivo RD-5 que tiene la estructura mostrada en la Tabla I.

F. Preparación de RD-6

Por el mismo procedimiento descrito en la preparación E, se condensa J-ácido con 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina. Este intermedio se copula entonces a ácido 2-amino-5-metoxibencenosulfónico diazotado (síntesis de esta amina descrita en Chem. Zentr., 1903 II, p. 1301) por un procedimiento similar al descrito en la preparación E. Se obtiene el colorante reactivo RD-6 que tiene la estructura mostrada en la Tabla I.

G. Preparación de RD-7

A una solución de 21 g de la sal sódica de ácido 2,4-diaminobencenosulfónico en 100 ml de agua (síntesis de esta amina descrita por Post et al, Ann. der Chem. 205, 107 (1880)) se añade con rápida agitación 20 g de 2,4,6-trifluor-5-cloropirimidina a 20 - 30°C, mientras se neutraliza el fluoruro de hidrógeno formado. El producto resultante se diazota utilizando 7 g de nitrito sódico y 28 g de ácido clorhídrico, tras lo cual se añade a una solución de 47 g de la sal sódica de ácido 1-hidroxi-8-benzamido-naftaleno-3,5-disulfónico (síntesis descrita por Brieger et al, J. Pract. Chem. (2) 89, 165 (1863) y 12 g de carbonato sódico en 200 ml de agua. El producto copulado se salifica, se filtra, se lava con salina y se seca para dar el colorante reactivo RD-7 que tiene la estructura mostrada en la Tabla I.

COMPUESTO COLORANTE-SOPORTE DE FORMULA GENERAL II

EJEMPLO 1

Preparación de Sepharose 4B reticulada

Por el procedimiento descrito por J. Forath et al. J. Chromatogr. 60, 167 (1971), se suspende 1 litro de Sepharose 4B (volumen de gel sedimentado húmedo) en 1 litro

5 hidróxido sódico 1N conteniendo 5 g de borohidruro sódico. Con suave agitación, se añaden 20 ml de epíclorhidrina y la mezcla se calienta a 60°C durante 1 hora. La Sepharose 4B reticulada así obtenida se lava con agua caliente hasta neutralidad.

EJEMPLO 2

Copulación de colorante reactivo a Sepharose 4B reticulada

10 Por el procedimiento descrito por H.J. Boehme et al, J. Chromatogr. 69, 209 (1972), 20 ml del gel de Sepharose 4B reticulado húmedo, enlechado en 20 ml de agua, se calienta a 65-70°C. Con agitación, se añade una solución de 0,2 g de un colorante reactivo en 10 ml de agua, seguido por 20 ml de una solución conteniendo 75 g de cloruro sódico y 15 g de carbonato sódico por litro. La reacción se continúa durante 1 hora
15 aproximadamente a 65-70°C. El compuesto de colorante-Sepharose 4B se filtra, se lava con agua caliente hasta que los lavados son incoloros, lavándose entonces con tampón tris-HCl (tris-HCl 0,05 M, cloruro sódico 0,5 M, pH 8) conteniendo 0,02 % de azida sódica. Después de filtrar, el compuesto húmedo se puede almacenar indefinidamente a 5°C.
20

Se obtienen los siguientes compuestos de colorante reactivo-Sepharose 4B reticulada.

<u>Ejemplo 2</u>	<u>Colorante reactivo copulado a Sepharose 4B reticulada</u>
A	RD-1
B	RD-2
C	RD-3
D	RD-4
E	RD-5
F	RD-6
G	RD-7

25

EJEMPLO 3

Copulación de colorante reactivo a Sephadex G-100

5 El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito para la copulación de un colorante reactivo a Sepharose 4B reticulada (Ejemplo 2), excepto que se utilizan condiciones más suaves. Se suspenden 10 g de polvo seco de Sephadex G-100 en 500 ml de agua a 50-60°C hasta que el hinchamiento es completo, tras lo cual se añade al gel agitado una solución de 2,5 g de colorante reactivo en 50 ml de agua. A la mezcla se añaden luego 20 g de cloruro sódico y 5 g de carbonato sódico y se continúa la agitación a 50-60°C durante 1-2 horas aproximadamente. El compuesto se filtra, se lava hasta estar libre de colorante en exceso, seguido por un lavado con tampón tris-HCl y se almacena a 5°C.

15 Se obtienen los siguientes compuestos de colorante reactivo-Sephadex G-100:

Ejemplo 3 Colorante reactivo copulado a Sephadex G-100

A	RD-1
B	RD-2
20 C	RD-3
D	RD-4
E	RD-5
F	RD-6
G	RD-7

25 COMPUESTOS COLORANTE-SOPORTE DE LA TECNICA ANTERIOR

EJEMPLO 4

Cibacron Blue F3G-A copulado a Sepharose 4B reticulada

30 Se sigue el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la Offenlegungsschrift Alemana No. 2.443.119 utilizando Cibacron Blue F3G-A (Procion Blue HBS) en lugar de Cibacron

Brilliant Blue FBR-P. Se suspenden 100 ml de Sepharose 4B reticulada sedimentada (del ejemplo 1, supra) en 250 ml de agua. Se añade una solución de 1 g de Cibacron Blue F3G-A (obtenido de Ciba-Geigy, Basilea, Suiza) en 25 ml de agua y la mezcla se
5 agita suavemente a 80°C durante 45 minutos. El pH se mantiene a 8 aproximadamente por adición de carbonato sódico. Después de enfriar a temperatura ambiente, el líquido sobrenadante se decanta y la fase sólida se lava primero con 3 litros de agua, luego con 2 litros de solución de hidrocioruro de guanidina
10 5M y finalmente con una solución que contiene tris-hidrocioruro 0,05 M y cloruro sódico 0,5 M. El compuesto de Cibacron Blue F3G-A-Sepharose 4B reticulado así obtenido se utiliza como control en una comparación con los compuestos colorante-soporte de esta invención en el proceso de la invención como más adelante se describe.

EJEMPLO 5

Cibacron Blue F3G-A copulado a Sephadex G-100

El procedimiento es idéntico al del ejemplo 3 excepto que se utilizan 2,5 g del colorante Cibacron Blue F3G-A (obtenido de Ciba-Geigy, Basilea, Suiza) en lugar de un colorante reactivo. El producto copulado similar al compuesto colorante-soporte del ejemplo 4, siendo el soporte Sephadex en lugar de Sepharose reticulado.

ADSORCION Y ELUCION DE ALBUMINA

EJEMPLO 6

Separación de albúmina del plasma

Una solución de 0,1 ml de plasma humano en 3 ml de tampón tris-HCl (tris-HCl 0,05 M + cloruro sódico 0,15 M, pH 8) se añade a cada porción de 1 ml de un compuesto de colorante reactivo-Sepharose 4B reticulado, sedimentado, húmedo, en tubos de
30

ensayo. Los contenidos se arremolinan ocasionalmente y después de 30 minutos los compuestos sólidos se recogen por centrifugación, se separa la solución sobrenadante y los sólidos se lavan dos veces con porciones de 3 ml de tampón tris-HCl. La parte sobrenadante y los lavados se combinan en cada caso y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro U.V. para determinar la cantidad de proteína no adsorbida por el compuesto. Cada compuesto se arremolina entonces ocasionalmente durante 10 minutos en 3 ml de una solución conteniendo tiocianato sódico 0,2 M y tampón tris-HCl 0,05 M. Las partes sobrenadantes de tiocianato-tampón se leen también mediante U.V. para determinar la cantidad de albúmina eluida. Tanto los lavados compuestos como los eluidos se ensayan adicionalmente mediante electrofóresis con acetato de celulosa para determinar el grado de adsorción y el grado de elución de albúmina a partir de un compuesto particular. Como controles se tratan como anteriormente cantidades de 1 ml de Sepharose 4B reticulada y Cibacron Blue F3G-A-Sepharose 4B reticulada.

Los modelos electroforéticos indican que la albúmina eluida es practicamente pura. En general, los compuesto de colorante-Sepharose de la presente invención adsorben albúmina del plasma tan eficazmente como el complejo del ejemplo 4 y en general permiten un mayor grado de elución que el compuesto del ejemplo 4 (véase Tabla 2).

EJEMPLO 7

Este ejemplo es esencialmente una repetición del ejemplo 6 excepto con ciertas modificaciones menores. Se utiliza una cantidad mucho más pequeña de agente eluyente para obtener una solución más concentrada de albúmina adecuada para el análisis de pureza mediante electrofóresis con acetato de celulosa. Los compuestos de colorante-soporte (1 ml) se tratan con 0,2 ml

de plasma humano en 3 ml de tampón tris-HCl durante 2 minutos aproximadamente y a continuación se lavan 4 veces con el tampón. La albúmina se eluye con solamente 0,5 ml de la solución eluyente de tiocianato-tris-HCl. Los resultados se muestran en la

5 Tabla 3.

TABLA 2

<u>Compuesto colorante-soporte</u>	<u>Absorbancia a 280 nm</u>	<u>% proteína sin lugar</u>	<u>Absorbancia del eluado (1)</u>	<u>Eficacia relativa de elución</u>	<u>Modelo electroforético, grado de absorción</u>	<u>Elución</u>
Ejemplo 4 (Control)	0,685	56,8	0,137	1,0 (2)	++	++
Ejemplo 1 (Control)	1,205	100,0	0,000	-	-	-
Ejemplo 2A	0,910	75,5	0,161	1,18	+	++
Ejemplo 2B	0,755	62,7	0,157	1,15	++	++
Ejemplo 2C	0,658	54,6	0,309	2,25	++	+++
Ejemplo 2D	0,788	65,4	0,267	1,95	++	+++
Ejemplo 2E	0,932	77,3	0,112	0,82	+	+
Ejemplo 2F	1,000	83,0	0,114	0,83	+	+

(1) Absorbancia del eluado menos absorbancia del tiocianato solo (0,026)

(2) Asignado un valor de 1 al control (Ejemplo 4)

TABLA 3

<u>Compuesto colorante-soporte</u>	<u>Absorbancia de proteína sin lugar a 280 nm</u>	<u>Absorbancia del eluado</u>	<u>Eficacia relativa de elución</u>	<u>Modelo electroforético, grado de elución</u>
Ejemplo 4	2,147	0,110	1,0	+
Ejemplo 2A	2,789	0,148	1,35	+++
Ejemplo 2B	2,262	0,224	2,04	++
Ejemplo 2C	2,207	0,700	6,36	++++
Ejemplo 2D	2,397	0,540	4,91	++++
Ejemplo 2E	2,985	0,400	3,64	++++
Ejemplo 2F	2,983	0,376	3,42	+++
Ejemplo 2G	2,698	0,272	2,47	+++

Todos los compuestos de colorante reactivo-Sepharose 4B reticulada demuestran una aglomeración más débil de albúmina que el compuesto colorante-soporte del ejemplo 4. Esta característica deseable permite que la albúmina sea eluida más eficazmente.

5

EJEMPLO 8

Este ejemplo ilustra la aplicación del proceso de la invención a una mezcla proteínica que contiene un mayor porcentaje de albúmina que el plasma. Se comparan con el control (Ejemplo 4) dos compuestos de diferente resistencia de unión (Ejemplos 2D y 10 2E). Se utiliza un procedimiento en columna.

Se llenan pipetas Pasteur, que tienen un volumen de 1,8 ml, con los compuestos seleccionados de colorante-Sepharose 4B reticulada y se equilibra con tampón tris-HCl. A las pipetas separadas se aplica 0,5 ml de una solución de plasma humano 15 diluída al 50 % con tampón tris HCl o una solución tamponada al 1 % de fracción proteínica de plasma humano (fracción proteínica Plasmanate de Cutter Laboratories, Inc., Berkeley, California, que contiene aproximadamente 83% de albúmina y 17 % de alfa y 20 beta-globulinas). A continuación se añade 1 ml de tampón tris-HCl y se recogen luego 0,5 ml de eluado como volumen en vacío para el análisis de la proteína no ligada. Se deja fluir 2,5 ml más de tampón, seguido por 1 ml de solución eluyente (tiocianato sódico 0,2 M, tris-HCl 0,05 M) y a continuación con más solución eluyente, para recoger entonces 1 ml que contiene albúmina.

TABLA 4

<u>Compuesto colorante-soporte</u>	<u>Proteína usada</u>	<u>Contenido en albúmina por electroforesis</u>		<u>Absorbancia de solución de lavado, proteína sin ligar</u>
		<u>Volúmen vacío</u>	<u>Eluado</u>	
Ejemplo 4	Plasma	-	++	0,940
	Plasmanate	-	±	0,074
5 Ejemplo 2D	Plasma	±	++++	1,000
	Plasmanate	-	+++	0,080
Ejemplo 2E	Plasma	++++	++++	1,450
	Plasmanate	-	+++	0,105

10 Los resultados indican que ciertos compuestos de colorante-soporte de la invención tienen una mayor utilidad que el compuesto del ejemplo 4 cuando se utiliza sobre mezclas proteínicas que contienen una superior proporción de albúmina. Por ejemplo, el compuesto de colorante-soporte del ejemplo 2B absorbe albúmina esencialmente de modo cuantitativo, como lo hace 15 el compuesto del ejemplo 4, pero la recuperación de albúmina es mucho mayor.

EJEMPLO 9

Este ejemplo muestra la eficacia de colorantes reactivos que se copulan a Sephadex G-100 como soporte. El compuesto de colorante-soporte se empaca en columnas de 1,6 x 20 cm, 20 equilibradas con tampón tris-HCl y se aplican a las columnas varias mezclas proteínicas a una velocidad de 25 ml/hora aproximadamente. Las columnas 1 a 4 reciben aproximadamente 2 ml de plasma humano; las columnas 5, 6 y 23 reciben una solución de 100 mg de polvo de Plasmanate disuelto en 3 ml de agua, ajustada a pH 8 25 con hidróxido sódico; las columnas 7 a 10 reciben 3 ml de una solución conteniendo 150 g de la mezcla proteínica obtenida por liofilización de Cohn Supernatant II + III; las columnas 11 a 14 reciben una solución de 150 mg de fracción IV de Cohn en 3 ml

ajustado a pH 8; las columnas 15 a 17 reciben una solución de 150 mg de fracción Cohn IV-IV en 3 ml ajustados a pH 8; y las columnas 18 a 22 reciben 3 ml de cada una de las soluciones de albúmina humana ligeramente impura (100 mg, pH 8). Después de la aplicación de las mezclas proteínicas, se pasa tampón tris-HCl a través de las columnas, controlando constantemente el eluado por U.V. Cuando la absorbancia del eluado indica ningún paso más de proteína sin absorber, se aplica la solución eluyente de tiocianato tamponada y se controla el eluado.

Los resultados de la Tabla 5 muestran el grado generalmente elevado de utilidad de un compuesto de colorante reactivo-gel de Sephadex en el proceso de aislamiento de albúmina pura en alto rendimiento a partir de mezclas de proteínas, independientemente de la composición de la mezcla o de la proporción de albúmina en la misma. Igualmente, los datos muestran que los compuestos de esta invención se pueden utilizar para aislar albúmina convenientemente sobre materiales de partida (por ejemplo, Supernatant II + III) disponibles con anterioridad en el proceso de fraccionamiento Cohn, evitando con ello el proceso Cohn mucho más largo y costoso que conduce a la preparación de albúmina. Adicionalmente, los datos muestran que la albúmina se puede recuperar de fracciones que normalmente son desechadas siguiendo el aislamiento de albúmina del proceso Cohn, por ejemplo fracciones IV y IV-1. El compuesto colorante-soporte conocido utilizado en la columna 23 se incluye para compararlo con el compuesto 3A y 3D utilizado en las columnas 5 y 6. La superioridad de los compuestos 3A y 3D en la obtención de albúmina pura a partir de la mezcla proteínica Plasmanate, resulta muy evidente.

El análisis de los eluados por electrofóresis con

acetato de celulosa confirma la selectividad de adsorción y la elución eficaz de la albúmina a partir de estos compuestos. Por ejemplo, en los experimentos de las columnas 1 y 3, no existe albúmina detectable en los eluados proteínicos sin ligar y los eluados de tiocianato muestran solamente albúmina en alto rendimiento. Con los experimentos de las columnas 5 y 6, existe solo una traza de albúmina en los eluados sin ligar de la columna 5, nada en la columna 6 y los eluados de tiocianato solo tienen albúmina en altos rendimientos.

TABLA 5

Columna	Compuesto colorante-soporte del ejemplo:	Proteína	Modelo de absorbancia U.V. a 280 nm <u>Proteína sin ligar</u>	<u>Eluado</u>
1	3A	Plasma	L-sh, M-sh	M-sh
2	3C	Plasma	L-b, M-sh, S-b	L-b-t
3	3D	Plasma	L-sh, M-sh	L-sh
4	3G	Plasma	L-sh, M-b-t	M-b-t
5	3A	Plasmanate	ML-sh, M-sh	M-sh
6	3D	Plasmanate	M-sh, S-b	L-sh
7	3B	Supernatant II + III	L-sh, Msh	L-sh-t
8	3C	Supernatant II + III	L-sh, M-sh	L-sh
9	3D	Supernatant II + III	L-sh, S-b	L-b
10	3G	Supernatant II + III	M-b, S-b	L-sh-t
11	3B	Fracción IV	L-sh	M-sh
12	3C	Fracción IV	L-b, M-b	ML-sh-t
13	3D	Fracción IV	L-b-t	M-b
14	3G	Fracción IV	L-b, S-b-t	L-b-t
15	3B	Fracción IV-4	L-sh, M-sh-t	ML-sh
16	3C	Fracción IV-4	L-sh, S-b-t	M-sh
17	3D	Fracción IV-4	L-b, S-b-t	M-b
18	3A	Albúmina, Humana	ML-b, MS-t	M-sh

TABLA 5 (Continuación)

<u>Columna</u>	<u>Compuesto colorante-soporte del ejemplo:</u>	<u>Proteína</u>	<u>Modelo de absorbancia U.V. a 280 nm Proteína sin ligar</u>	<u>Eluado</u>
19	3B	Albúmina, Humana	S-sh, VS-b	L-b-t
20	3C	Albúmina, Humana	S-sh, VS-b	L-sh
5 21	3D	Albúmina, Humana	S-t, VS-b	L-b
22	3G	Albúmina, Humana	S-sh-t, VS-b	L-b-t
23	4	Plasmanate	M-b, S-b	S-b-t

*Las siguientes letras designan la altura (cantidad) y carácter de la absorbancia continua de los eluados: L = grande, M = medio, S = pequeño, ML = Grande medio, MS = pequeño medio, sh = agudo, b = amplio, t = residuo.

EJEMPLO 10

Electrolitos de alta concentración iónica como agentes eluyentes

Una solución de 100 mg de albúmina humana ligeramente impura en 3 ml de tampón Tris-HCl, se aplica a una columna de 1,6 x 20 cm rellena con el compuesto colorante-soporte del ejemplo 3D. El tampón tris-HCl se pasa entonces a través de la columna seguido por una solución que contiene tris-HCl 0,05 M y cloruro sódico 1 M. Para determinar si el cloruro sódico eluye completamente a la albúmina adsorbida, la columna se lava adicionalmente con soluciones de tiocianato sódico 0,2 M y 4 M. Los lavados de proteína sin ligar contienen solamente cantidades muy pequeñas de proteína (controlado por U.V.) y los eluados de cloruro sódico muestran una cresta aguda muy alta. El eluado de tiocianato 0,2 M muestra solamente una traza de albúmina y el

eluado 4M no contiene albúmina. El cloruro sódico es un agente eluyente muy eficaz para la albúmina adsorbida sobre compuestos de colorante reactivo-Sephadex.

5 La columna se lava hasta estar libre de tiocianato sódico y se equilibra con el tampón usual tris-HCl. Por el mismo procedimiento, se absorbe albúmina sobre la columna y se eluye con una solución conteniendo Tris-HCl 0,05 M y cloruro cálcico 0,2 M, seguido por tiocianato sódico 0,2 M. La albúmina se eluye completamente pero existen ciertos residuos. Mediante el tiocia-
10 nato no se eluye albúmina adicional. Este experimento demuestra que el cloruro cálcico es un buen agente eluyente, demostrando igualmente que los compuestos de colorante-soporte de la invención pueden trabajar eficazmente con el uso repetido después de la regeneración.

15 EJEMPLO 11

Acidos carboxílicos y aminoácidos como agentes eluyentes

Se absorbe albúmina sobre el compuesto colorante-soporte como se describe en el ejemplo 10 y se eluye con una solución conteniendo DL-N-acetiltriptofano 0,02 M y tampón
20 Tris-HCl 0,05 M ajustado a pH 8 por hidróxido sódico. La albúmina se eluye de modo practicamente completo pero con ciertos residuos. El lavado ulterior con tiocianato 0,2 M eluye menos del 2 % de la albúmina total eluida.

Después de la regeneración de la columna mediante
25 lavados con Tris-HCl, la albúmina se absorbe de nuevo como anteriormente y se eluye con una solución que contiene caprilato sódico 0,027 M, seguido por tiocianato 0,02 M. El eluado de caprilato muestra una separación practicamente completa de la albúmina, sin residuos. El ulterior lavado con tiocianato eluye menos del
30 2 % de la cantidad total de albúmina.

EJEMPLO 12

Este ejemplo muestra la capacidad de los compuestos de colorante-soporte para ligar albúmina. Cuatro partes alicuotas secuenciales (2 ml) conteniendo cada una de ellas 100 mg de albúmina humana ligeramente impura en agua a pH 8, se aplican a una columna (0,9 x 14 cm) conteniendo 8 ml del compuesto colorante-soporte sedimentado húmedo del ejemplo 3G. Se pasa tampón de tris-hidrocloruro a través de la columna después de la aplicación de cada parte alicuota, para separar cualquier proteína sin ligar y cada lavado se analiza mediante U.V. Se obtiene un total de 5,9 % de proteína no derivada de albúmina, tal y como se determina por U.V. y electrofóresis. El lavado después de la cuarta porción alicuota contiene una traza de albúmina, indicando que se ha alcanzado la capacidad de ligación. La capacidad de ligación es de este modo de unos 400 mg de albúmina por 8 ml de compuesto colorante-soporte o de 50 mg por ml.

La albúmina se eluye con tiocianato sódico 0,2 M en tampón tris 0,05 M y por análisis U.V. se determina que se recupera 93,3 % de la proteína aplicada como albúmina (evaluada como pura mediante ensayo electroforético) lo cual indica la recuperación prácticamente cuantitativa de la albúmina disponible en la muestra.

EJEMPLO 13

Este ejemplo ilustra la eficacia mejorada en la elución de albúmina de los compuestos colorante-soporte de esta invención, en comparación con un compuesto colorante-soporte de la técnica anterior. Mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 12, se aplica albúmina ligeramente impura a columnas de los compuestos colorante-soporte del ejemplo 3G y ejemplo 5, con

los siguientes resultados:

TABLA VI

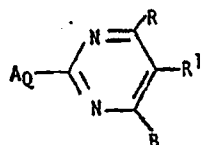
	<u>Compuesto del ejemplo 3G</u>	<u>Compuesto del ejemplo 5</u>
Capacidad de adsorción de albúmina	aprox. 50 mg/ml.	aprox. 50 mg/ml.
5 Proteína sin ligar	5,9 %	8,2 %
Albúmina eluida	93,3 %	74,8 %
Albúmina recuperada	99,2 %	83,0 %

10 Describa 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.

REIVINDICACIONES

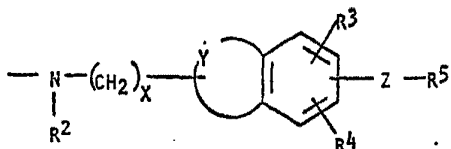
1.- Procedimiento para separar selectivamente albúmina de fluidos acuosos que la contienen, caracterizado porque comprende las etapas de:

5 a) absorber la albúmina sobre un compuesto de fórmula general:



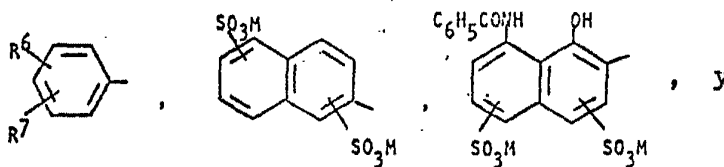
en la que A y B son diferentes, siendo A un soporte consistente en un polímero insoluble que tiene grupos hidroxilo y siendo B un colorante de fórmula:

10

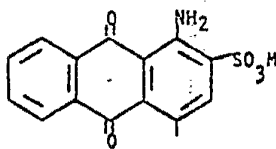


15

en la que R es halógeno o alquilo inferior, R¹ es hidrógeno, SCH₃, halógeno o alquilo inferior, R² es hidrógeno o alquilo inferior, R³ y R⁴ son cada uno miembros del grupo consistente en hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo y -SO₃M, X es un entero de 0-1, Y es -H/2 ó -CH=CH-CH=CH-; Z es -NH- ó -N=N-; R⁵ es un arilo sustituido seleccionado del grupo consistente en:



Handwritten signature or initials.



5 en donde R^6 y R^7 son cada uno miembros del grupo consistente en hidrógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior y $-SO_3M$, en donde M es hidrógeno o un metal alcalino; y Q es la relación en peso del polímero insoluble al resto del compuesto, siendo del orden de 1:1 a 50:1; efectuándose esta etapa de absorción durante un periodo de al menos un minuto aproximadamente y a un pH de 3 a 3,5 aproximadamente;

10 b) separar el compuesto, sobre el cual se ha absorbido la albúmina, de la fase acuosa; y

15 c) separar la albúmina por tratamiento del compuesto sobre el cual se ha absorbido la albúmina, con una solución eluyente que contiene una sustancia que separa sustancialmente toda la albúmina absorbida del compuesto, efectuándose la etapa de elución a un pH de 7 a 9 aproximadamente, durante al menos un minuto.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la relación Q es de 3,75:1 a 10:1.

20 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque A se elige del grupo consistente en agarosa, agarosa reticulada y dextrano modificado.

25 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto se elige del grupo consistente en un ácido carboxílico conteniendo hasta 10 átomos de carbono, un aminoácido, electrolitos inorgánicos fisiológicamente aceptables, y sales de calcio, magnesio y potasio de tiocianatos y carbonatos.

Ry

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el ácido carboxílico es ácido caprílico.

5 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la solución de ácido caprílico es al menos 0,02 M aproximadamente y el pH de la solución eluyente es de 8 aproximadamente.

7.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el electrolito inorgánico es cloruro sódico.

10 8.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la solución de electrolito inorgánico tiene una concentración iónica de 0,2 a 1 M aproximadamente.

9.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el aminoácido es N-acetiltriptofano.

15 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el N-acetiltriptofano es al menos 0,02 M aproximadamente y el pH de la solución eluyente es de 8 aproximadamente.

20 11.- Procedimiento para separar selectivamente albúmina de fluidos acuosos que la contienen, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 34 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16 MAYO 1978

CUTTER LABORATORIES, INC

J. W. ESTER... y P...
S. S. ... Diaz

