

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el 1. de febrero de 1978 a los señores que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES

11
21

NUMERO

466.434

AI

FECHA DE PRESENTACION

27.1.78

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
77 02391	28.1.77	Francia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL B01D/C08L	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	---	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COPOLIMEROS ESTATICOS RETICULADOS TRIDIMENSIONALES.

71 SOLICITANTE (S)

MAR-PHA Société d'Etudes et d'Exploitation de Marques.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

25 boulevard de l'Amiral Bruix - 75116 PARIS - Francia

72 INVENTOR (ES)

Eric Brown; Monique Corgier; Joël Touet, de nacionalidad francesa y Egisto Boschetti, de nacionalidad italiana.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 La presente invención tiene por objeto nuevos co-
polímeros hidrófilos, sus procedimientos de preparación y
su empleo, en forma de geles acuosos, en técnicas de separa-
ción tales que la cromatografía en fase líquida sobre gel
5 y en las técnicas de inmovilización de sustancias natura-
les, principalmente las proteínas y en particular las en-
zimas.

10 La cromatografía en fase líquida sobre gel es un
método corriente de fraccionamiento y separación de las
moléculas en función a su tamaño. Las moléculas de tamaño
superior a los poros más grandes del gel se desplazan con
la fase móvil líquida, mientras que las moléculas de tama-
ño más pequeño penetran más o menos profundamente en los
15 poros del gel, que constituye la fase estacionaria y por
consiguiente son más o menos retenidas. Si por consiguiente
se hace circular sobre una columna llena de gel una fase
líquida en la cual se ha inyectado una muestra que contiene
moléculas de tamaños diferentes, la velocidad de migración
de estas moléculas hacia la parte baja de la columna va-
20 riará de una molécula a otra y las moléculas por consiguien-
te se separaran.

25 Los principales hidrogeles actualmente utilizados
como soporte en las técnicas mencionadas anteriormente son
por una parte los geles de polisacáridos naturales even-
tualmente reticulados (geles de agarosa, geles de dextrano
conocidos bajo la marca comercial Sephadex) y por otra
parte geles de polímeros sintéticos o semisintéticos como,
por ejemplo, los geles de poliacrilamida o los geles mixtos
poliacrilamida - agarosa. Estos soportes no están exentos
30 de defectos. Los geles de poliacrilamida o poliacrilamida-

1 agarosa son químicamente inestables en medio básico debido
a la hidrólisis de los grupos amida en grupos ácido car-
boxílico, lo cual limita su ámbito de utilización. Algunos
geles de dextrano presentan unas propiedades mediocres,
5 de donde viene la imposibilidad de conseguir columnas con
un caudal relativamente elevado y constante. Por último
los geles de agarosa resisten mal al calor y a los agentes
que debilitan los enlaces hidrógeno (urea, guanidina, etc..)
y además, como todos los geles de origen natural, son muy
10 sensibles al ataque por las bacterias o algunas enzimas.

A causa de los defectos señalados anteriormente,
se ha propuesto sustituir los geles anteriores por geles de
copolímeros hidrófilos de N- $\left[\text{tris}(\text{hidroximetil})\text{metil} \right]$ me-
tacrilamida y de N,N'-etilen-bis-metacrilamida o N,N'-me-
15 tilen-bis-acrilamida (agente reticulante) (cf Tetrahedron
Letters No. 6, p 357 - 358. 1975). Pero la obtención de
geles homogéneos, por consiguiente transparentes, de tales
copolímeros es difícil pues, en la polimerización, se for-
man, especialmente a altas concentraciones de agente reti-
20 culante, homopolímeros de N,N'-etilen-bis-metacrilamida o
N,N'-metilen-bis-acrilamida, que forman precipitados blan-
cos dentro del gel.

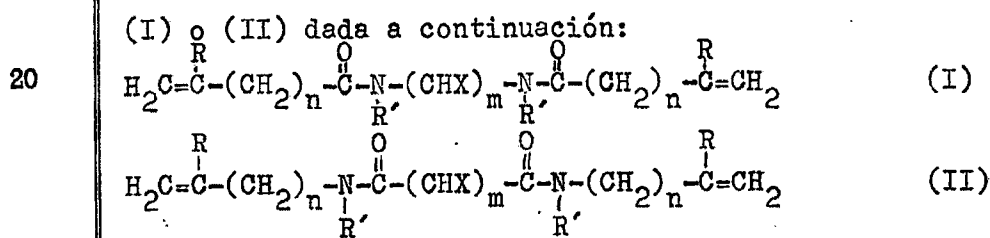
Ahora bien, se han encontrado, conforme a la presen-
te invención, nuevos copolímeros muy hidrófilos que son
25 fáciles de obtener en forma de geles acuosos homogéneos y
que son susceptibles de sustituir ventajosamente, en sus
aplicaciones, tanto a los geles altamente reticulados tales
como los geles de dextrano como los geles macroreticulados
tales como los geles de agarosa.

30 Los copolímeros de acuerdo con la invención son

- 1 copolímeros estáticos reticulados tridimensionales, insolubles en el agua, que contienen, en forma copolimerizada:
- 5 a) del 25% al 98% en peso de N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida o de N-[tris(hidroximetil)metil]metacrilamida, o de una mezcla de estos dos compuestos,
- b) del 2% al 50% en peso de uno o de varios monómeros que tienen varios dobles enlaces etilénicos polimerizables y uno o varios grupos hidroxilo, y libres de grupos NH₂ o COOH,
- 10 c) del 0% al 50% en peso de uno o de varios monómeros que tienen un doble enlace etilénico polimerizable y uno o varios grupos amino o carboxílico.

Los monómeros a) son productos conocidos. Han sido descritos, con sus procedimientos de preparación, en diversas publicaciones (cf, por ejemplo, JEDLINSKI y PAPROTNY, 15 ROCZNIKI Chemii, Ann. Soc. Chim. Polonorum, 1966, 40, p 1487 - 1493; Tetrahedron Letters No 6, 1975, p 357-358).

Los monómeros b), que son agentes reticulantes, que responden preferentemente a una de las fórmulas generales



en las cuales R es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, 25 R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroximetilo, X es un átomo de hidrógeno o un grupo OH, n y m son números enteros que van de 0 a 6, con la limitación de que X y R' no pueden ser simultáneamente átomos de hidrógeno.

Como ejemplos de monómeros b) se pueden citar en particular la N,N'-dialil-tartradiamida, el glioxal-bis- 30

1 acrilamida (o N,N'-dihidroxietilen-bis-acrilamida) y la
N,N'-metilen-bis-hidroximetilacrilamida.

5 Como ejemplos de compuestos c) se pueden citar,
entre otros, la N- \int (N-acriloil)glicil \int glicina, la N- \int (N-
metacriloil)glicil \int glicina, el ácido N-acriloil ϵ -aminoca-
proico.

10 Aunque la presente invención se refiere al conjun-
to de copolímeros anteriormente definidos, tiene más parti-
cularmente por objeto los de estos copolímeros que contie-
nen, en forma copolimerizada, del 50 al 98% en peso de mo-
nómeros a), estando constituido el complemento al 100% por
uno o varios monómeros b), y muy especialmente los que con-
tienen del 50 al 98% en peso de N- \int tris(hidroximetil)
metil \int acrilamida, estando constituido el complemento al
15 100% por uno o varios monómeros b).

20 Los copolímeros hidrófilos reticulados de acuerdo
con la invención pueden prepararse, según procedimientos
conocidos, por polimerización radical de diversos monóme-
ros en solución acuosa. La polimerización se realiza a una
temperatura de 0°C a 100°C, preferentemente de 40°C a 60°C,
y en presencia de iniciadores habitualmente utilizados en
polimerización radical. Como tales se pueden citar, por
ejemplo, los sistemas red-ox como N,N,N,'N'-tetrametiletile-
25 n-diamina (TEMED) + persulfato alcalino o dimetilaminopro-
pionitrilo + persulfato alcalino, los peróxidos orgánicos
como el peróxido de benzoilo, y el 2,2'-azo-bis-isobutiro-
nitrilo. La concentración total en monómeros (es decir la
concentración en monómeros a) + b) + c)) de las soluciones
acuosas sometidas a la polimerización se encuentra lo más
30 a menudo comprendida entre 20 g/l y 300 g/l y el porcenta-

1 je en peso de monómero b) en los monómeros totales es del
2% al 50%.

5 La polimerización puede ser una polimerización en
bloque o en emulsión. En el caso de la polimerización en
bloque; la solución acuosa que contiene los diversos monó-
meros y el iniciador se somete a una polimerización en fase
homogénea. El bloque de gel acuoso obtenido se fracciona
seguidamente en granos, por ejemplo mediante el paso por
la mallas de un tamiz.

10 La polimerización en emulsión, que es el modo de
preparación preferido pues proporciona directamente el gel
acuoso en forma de gránulos esféricos de tamaño determina-
do, puede realizarse como sigue:

15 La solución acuosa que contiene los diversos monó-
meros se vierte lentamente en una fase líquida orgánica,
no miscible en agua, mantenida en agitación y conteniendo
eventualmente un agente emulsificante. La velocidad de agi-
tación se regula con el fin de obtener una emulsión de la
fase acuosa en la fase orgánica que tiene el tamaño de
20 gotitas deseado. El control de este tamaño, por consiguien-
te la regulación de la agitación, se realiza por examen al
microscopio de extracciones realizadas en la emulsión. Una
vez regulada la velocidad de agitación, se introduce en la
emulsión el iniciador, que inicia la polimerización. Esta
25 última se continua hasta su término conservando las mismas
condiciones de agitación. Las perlas de gel acuoso así ob-
tenidas se lavan con un disolvente o un agente tensoactivo
con el fin de liberarlas de las trazas de la fase orgánica,
y luego con agua.

30 Como fase orgánica líquida utilizable se puede

1 citar, por ejemplo, los aceites vegetales (aceite de soja,
aceite de cacahuete, aceite de girasol, etc..) o minerales
(aceite de parafina, aceite de siliconas), los productos
de destilación fraccionada del petróleo (benceno, tolueno,
5 etc..) los hidrocarburos clorados (tetracloruro de carbono,
cloruro de metileno, etc.) y las mezclas de estos diversos
compuestos. La fase orgánica líquida puede eventualmente
contener un agente emulsionante como los productos conoci-
dos bajo la denominación comercial "Spans" o "Tweens", a
10 la concentración de 0,1% al 4% en volumen.

Las perlas de gel acuoso obtenidas por el procedi-
miento de polimerización en emulsión tienen un diámetro de
partículas que varia, según las condiciones operatorias, de
10 μm a 600 μm .

15 Los geles acuosos obtenidos mediante uno de los pro-
cedimientos expuestos anteriormente pueden conservarse en
suspensión en agua o en una solución tampón acuosa, en pre-
sencia de trazas de un bacteriostático como, por ejemplo,
el azothidrato de sodio. Una concentración del 0,02% de
20 azothidrato de sodio basta para asegurar la conservación.

Los geles acuosos pueden también secarse por los
procedimientos convencionales (liofilización, tratamiento
mediante un disolvente orgánico miscible en agua, etc..).
Se obtienen así los copolímeros en forma de un polvo
25 blanco, rehidratable en el momento del empleo. La rehidra-
tación se realiza por simple contacto con el agua o una
solución tampón acuosa. Los polvos de copolímeros represen-
tan una forma muy cómoda de almacenado pues ocupan un volu-
men muy pequeño y pueden conservarse indefinidamente, sin
30 adición de conservadores y bacteriostáticos.

1 Los geles acuosos pueden contener de un 2% a un 60%
en peso de copolímero según la invención, estando el resto
constituido por agua de hidratación.

5 Los copolímeros de acuerdo con la invención son
estables térmicamente (resisten a temperaturas que alcan-
zan los 120°C-130°C) y son insensibles al ataque bacteria-
no o enzimático. Además son estables químicamente en pre-
sencia de soluciones acuosas netamente ácidas (pH 2) o bási-
ca (pH 13), lo cual permite su empleo en un ámbito de pH
10 extenso.

 Los copolímeros de acuerdo con la invención pueden
ser utilizados ventajosamente, en estado de geles acuosos,
como soportes en las técnicas de cromatografía de permeabi-
lización que operan en medio acuoso o en medio mixto H₂O +
15 disolvente orgánico. Permiten separar, según sus tamaños,
los componentes de las mezclas de sustancias macromoleculares
y particularmente los componentes de las mezclas de protei-
nas. Las propiedades de los geles (rigidez, campo de frac-
cionamiento) dependen de la concentración total de monóme-
ros de la solución acuosa sometida a la polimerización, de
20 la naturaleza del agente reticulante (monómero b) y de su
porcentaje en los monómeros totales, y también de las con-
diciones de polimerización. Haciendo variar estos diversos
parámetros se obtiene toda una gama de geles en las diver-
25 sas características. Estos geles permiten la separación de
macromoléculas cuyo peso molecular va de 500 daltons hasta
varios millones de daltons.

 Los copolímeros de acuerdo con la invención pueden
también ser utilizados, en forma de geles acuosos, tanto
30 como soporte para la inmovilización o la cromatografía de

1 afinidad de las macromoléculas biológicas tales como, por
ejemplo, las proteínas y en particular las enzimas. A este
efecto, los copolímeros se activan previamente, es decir
que los grupos alcohol primario del copolímero son trans-
5 formados, por reacción química con compuestos bi- o poli-
funcionales, en grupos capaces de traer consigo el injer-
tado de las macromoléculas biológicas sobre el soporte
(por ejemplo grupos imidocarbonato). Los copolímeros de
acuerdo con la invención son activados de acuerdo con mé-
10 todos conocidos en sí (ver a este respecto las patentes
inglesas 1.183.257 y 1.343.703, y la patente alemana 2.061.
008). Como ejemplos de agentes de activación utilizables
se puede citar el bromuro de cianógeno en medio alcalino,
el glutaraldehído, los derivados epoxidados como la epi-
15 clorhidrina o el éter diglicídico del 1,4-butanodiol, y
los derivados de la 1,3,5-tricloro-2,4,6-triazina. Los co-
polímeros de acuerdo con la invención se prestan muy par-
ticularmente a la activación mediante bromuro de cianógeno.

20 La inmovilización, es decir el injertado, de las
proteínas sobre los geles acuosos de copolímero activado
se realiza de acuerdo con métodos clásicos, por ejemplo
agitando, durante varias horas, las perlas de gel activado
en un medio tampón acuoso que contiene la proteína a fijar.
Al final de la operación, las perlas de gel, que han fija-
25 do al menos parcialmente la proteína, se separan y conser-
van en un medio tampón adecuado.

30 Como ejemplos de proteínas que pueden de este modo
inmovilizarse en forma de combinación con geles activados
de copolímeros de acuerdo con la invención se pueden citar
la arginasa, la invertasa, la glucosa oxidasa, la ureasa,

1 la fosfatasa alcalina, la tripsina y la quimotripsina.

Los copolímeros de acuerdo con la invención pueden asociarse a productos macromoleculares naturales solubles en agua y gelificables, tales como, por ejemplo, el agar-
5 agar, la agarosa o la gelatina, con el fin de obtener geles mixtos con características particulares. Así, para disponer de geles particularmente duros, se asociará un copolímero de acuerdo con la invención a la agarosa. En estos geles mixtos la relación en peso

10
$$\frac{\text{producto macromolecular natural gelificable}}{\text{copolímero de acuerdo con la invención}}$$
 es de ≤ 2 .

Para preparar tales geles mixtos se opera como se ha indicado anteriormente, salvo que se introduce al comienzo en la solución acuosa de los monómeros la cantidad
15 deseada de producto macromolecular natural gelificable, correspondiendo esta cantidad a una concentración comprendida en general entre 0,5 y 6% en peso en la solución acuosa. El producto macromolecular natural se gelifica en el interior de las mallas del copolímero cuando se enfria el
20 medio reaccional después de la polimerización.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitarla.

25 EJEMPLO 1: Preparación de un copolímero N- \int tris(hidroximetil)metil \int acrilamida N,N'-dialil-tartradiamida en forma de gel acuoso, por polimerización en bloque.

En 100 ml de agua desmineralizada, contenidos en un recipiente colocado al baño de maria a 50°C, se disuelven 10 g de N- \int tris(hidroximetil)metil \int acrilamida y 1g de
30 N,N'-dialil-tartradiamida. La solución se filtra a conti-

1 nuación, se desgasifica a vacío y se vuelve a poner al baño
de maria a 50°C. La solución se agita suavemente con ayuda
de un agitador magnético y se introducen en el 150 mg de
persulfato de amonio y 0,16 ml de TEMED. Al cabo de algu-
5 nos minutos se observa un ligero calentamiento del medio de
reaccion, seguido por el fraguado en masa de la solución.
Se obtiene así un bloque de gel acuoso rígido y transpa-
rente. Este bloque se fragmenta en granos mediante el pase
por un tamiz con mallas de 100 um. Los granos se lavan y
10 se conservan en la solución tampón seleccionada.

El gel homogéneo así obtenido puede ser utilizado
como soporte en cromatografía de permeabilización. Su campo
de fraccionamiento se extiende de 2500 daltons a 300.000
daltons.

15 El gel puede también utilizarse, después de la ac-
tivación, para inmovilizar las mocromoléculas biológicas.

EJEMPLOS 2 a 4:

Se opera como en el ejemplo 1 pero utilizando, para
100 ml de agua desmineralizada, las cantidades siguientes
20 de monómeros:

	N- \int tris(hidroxi- metil) / acrilamida	N,N'-dialiltartra- diamida
Ejemplo 2	5 g	1 g
Ejemplo 3	10 g	0,5 g
25 Ejemplo 4	20 g	1 g

30 Se obtienen geles transparentes homogéneos, de ca-
racterísticas variadas. El gel del ejemplo 2 es poco com-
pacto, el del ejemplo 3 es compacto y el del ejemplo 4 es
muy duro.

1 Estos geles son utilizables como soporte en cromatografía de permeabilización o para la inmovilización de las macromoléculas biológicas. Los ámbitos de fraccionamiento de los geles de los ejemplos 3 y 4 son respectivamente:

5 2500 daltons a 300.000 daltons (ejemplo 3)

 1000 daltons a 100.000 daltons (" 4)

EJEMPLO 5: Preparación de un copolímero N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida glioxal-bis-acrilamida en forma de perlas de gel acuoso.

10 En un reactor de 700 ml, se introducen 350 ml de aceite de parafina y 2 ml de agente emulsificante conocido bajo la denominación comercial "Span-85". Se agita mecánicamente la mezcla y se calienta a 55°C. Por otro lado se disuelve, en 200 ml de agua calentada a 55°C, 40 g de N-

15 [tris(hidroximetil)metil]acrilamida y 4 g de glioxal-bis-acrilamida y se añade a esta solución 300 mg de persulfato de amonio. La solución así obtenida se vierte en aceite de parafina agitado. La velocidad de agitación se regula con

20 el fin de obtener una emulsión estable cuyas gotitas tengan un diámetro de aproximadamente 100 µm. Al cabo de 10 minutos de agitación, se introduce en la emulsión 0,32 ml de TEMED y se continua la agitación durante 30 minutos más.

25 Se enfría entonces el medio de reacción mediante adición de agua helada, se detiene la agitación y se deja reposar la mezcla algunas horas. La fase aceitosa sobrenadante es eliminada por succión y las perlas de gel obtenidas, de un diámetro aproximado de 100 µm, son recuperadas por decantación. Estas perlas son lavadas con ayuda de una

30 solución acuosa de Triton X - 100 al 0,1%, para eliminar

1 los restos de aceite, luego con agua desmineralizada hasta la eliminación total del detergente. Las perlas pueden conservarse en agua o en una solución tampón adecuada.

5 El gel acuoso transparente homogéneo así obtenido es muy duro. Tiene un ámbito de fraccionamiento que se extiende de 1.500 a 50.000 daltons. Resulta particularmente indicado para las operaciones de desaladura sobre columna de las soluciones de proteínas.

EJEMPLOS 6 a 8:

10 Se opera como en el ejemplo 5 pero utilizando, para 200 ml de agua, las cantidades siguientes de monómeros:

	N- <u>tris</u> (hidroximetil)metil acrilamida	glioxal-bis- acrilamida
15 Ejemplo 6	10 g	1 g
Ejemplo 7	20 g	2 g
Ejemplo 8	40 g	2 g

20 Se obtienen geles transparentes homogéneos, utilizables como soporte en cromatografía de permeabilización o para la inmovilización de las macromoléculas biológicas. El ámbito de fraccionamiento del gel del ejemplo 7 es:

2500 daltons a 300.000 daltons.

EJEMPLO 9:

Este ejemplo se da a título comparativo.

25 Si, en los ejemplos 1, 2, 5, 6 y 7 anteriores, se sustituye la N,N'-dialil-tartradiamida y el glioxal-bis-acrilamida por la N,N'-metilen-bis-acrilamida, se obtienen geles acuosos que no son transparentes, y por lo tanto son heterogéneos.

30

1 EJEMPLO 10: Preparación de un gel mixto que contiene agarosa y un copolímero N-[-tris(hidroximetil)metil]acrilamida glioxal-bis-acrilamida.

5 La polimerización se lleva a cabo como en el ejemplo 5, con la excepción de que el aceite de parafina se sustituye por aceite de soja, en que se utilizan 7 ml de "Span 85" en lugar de 2 ml, y en que la solución acuosa vertida en el aceite contiene, para 200 ml de agua, 30 g de N-[-tris(hidroximetil)metil]acrilamida, 3 g de glioxal-bis-acrilamida, 4 g de agarosa y 300 mg de persulfato de amonio.

10 Una vez terminada la polimerización se baja la temperatura de la emulsión progresivamente hasta 40°C luego se enfria bruscamente la emulsión mediante adición de agua helada. La fase aceitosa sobrenadante es eliminada por succión y las perlas de gel mixto obtenidas son separadas, lavadas con ayuda de una solución acuosa al 0,2% de laurilsulfato de sodio, luego con agua desmineralizada. Estas perlas se conservan en suspensión en agua a 4°C con trazas de un bacteriostático tal como el azothidrato de sodio.

15 El gel acuoso así obtenido es particularmente duro y es particularmente adecuado para la cromatografía de caudal elevado. Este gel no es termoestable y debe utilizarse a temperaturas inferiores a 37°C.

20 EJEMPLO 11: Preparación de un copolímero N-[-tris(hidroximetil)metil]acrilamida/glioxal-bis-acrilamida en forma seca.

25 Las perlas de gel acuoso obtenidas en los ejemplos 5 a 8 son colocadas con agua en un recipiente provisto en su base de una salida a la cual se ha dotado de un filtro.

30

1 Las perlas son mantenidas en suspensión mediante agitación
magnética continua. Se introduce de forma continua alcohol
etílico por la parte superior del recipiente, regulándose
5 el caudal de introducción con el fin de que sea igual al
caudal de salida del agua por la base del recipiente. Las
perlas en suspensión se encontrarán por consiguiente en
contacto con un medio cada vez más rico en etanol. El agua
se va eliminando de este modo progresivamente del interior
de las perlas y es sustituida por el etanol. Cuando se ha
10 terminado la operación, se sustituye a su vez el etanol
por acetona y luego la acetona por el éter etílico siguien-
do el mismo método. Se obtiene finalmente un gel empapado
de éter que se seca bajo una corriente de aire en unos mi-
nutos.

15 Se obtienen así, para 100 ml de gel de partida,
aproximadamente de 5 a 20 g de copolímero, en forma de un
polvo fino constituido por pequeñas esferas. Este polvo se
rehidrata inmediatamente mediante simple contacto con agua
y las partículas vuelven a tomar su forma inicial. El com-
20 portamiento en cromatografía del gel secado y rehidratado
no difiere del del gel acuoso de partida.

EJEMPLO 12: Aplicación en la inmovilización de enzimas.

25 En un matraz cónico de 20 ml, se colocan 5 ml de
las perlas de gel acuoso obtenidas en el ejemplo 7 y 15 ml
de agua desmineralizada. Se agita y se añaden 4 ml de una
solución acuosa de bromuro de cianógeno a 50 mg/ml. Se con-
tinúa agitando manteniendo el pH a 11 mediante adición de
sosa N. Después de la estabilización del pH, se agita du-
rante 30 minutos más, se filtran las perlas, se lavan rápi-
30 damente con 100 ml de una solución acuosa 0,1 M de bicarbo-

1 nato de sodio, luego con una solución M de cloruro de sodio. Las perlas de gel activado así obtenidas son utilizadas a continuación para la fijación de la arginasa.

5 El gel activado se coloca en 10 ml de un medio tampón maleato $Mn Cl_2$ $5 \times 10^{-2}M$, pH 7,2, conteniendo 10 mg de arginasa en 15 unidades/mg. Se agita la suspensión en un balancín durante 24 h a $4^{\circ}C$. Luego se filtran las perlas, se lavan con 25 ml de una solución M de cloruro de sodio y 25 ml de agua desmineralizada. El derivado de gel activado-arginasa así obtenido se conserva en suspensión en un tam-
10 pón maleato/ $Mn Cl_2$ $5 \times 10^{-2}M$, pH 7, 2.

La cantidad de enzima fijada sobre el gel activado se determina indirectamente dosificando la enzima que queda en el filtrado por el método clásico con reactivo de FOLIN
15 (cf LOWRY y col. J. Biol. Chem, 1951, 193, 265). La actividad enzimática del derivado de gel activado-arginasa se determina por el método de hidrólisis de la arginina (J.J. HAGAN y R.D. DALLAM, Anal. Biochem. 1968, 22, 518).

20 Los resultados obtenidos en dos ensayos similares se dan en la tabla siguiente:

Ensayo	mg de arginasa fijada por ml de gel	% de arginasa fijado sobre el gel activado	% de actividad residual de la arginasa fijada.
1	1,3	65%	36%
25	1,47	73,5%	37%

30 El porcentaje de actividad residual, que traduce la actividad enzimática del derivado, se define por la fórmula $100 \frac{M_1}{M_3}$, en la cual M_3 representa la masa de enzima fijada y M_1 la masa de enzima natural que tiene la misma actividad que la masa de enzima fijada.

1 EJEMPLO 13: Preparación de un copolímero N-[tris(hidroxi-
metil)metil]acrilamida, N,N'-dihidroxietilen-bis-acrilamida,
ácido acrilamido-6-hexanoico (o ácido N-acriloil ϵ -aminoca-
proico) en forma de perlas de gel acuoso.

5 Se opera como en el ejemplo 5, sustituyendo en la
solución acuosa los 40 g de N-[tris(hidroximetil)metil]
acrilamida y los 4 g de glioxal-bis-acrilamida por 35,6 g
de N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida, 4,0 g de N,N'-
dihidroxietilen-bis-acrilamida y 0,4 g de ácido acrilamido-
10 6-hexanoico. La solución acuosa se lleva a un pH de 6 y se
prosigue como en el ejemplo 5.

Se obtienen así, en forma de perlas con un diámetro
comprendido entre 30 y 250 μ m, un gel acuoso que contiene
de 6 a 20 microequivalentes (μ eq) COOH por ml de gel.

15 EJEMPLO 14: Preparación de un copolímero N-[tris(hidroxi-
metil)metil]metacrilamida, N,N'-dihidroxietilen-bis-acril-
amida, N-[(N-metacriloil)glicil]glicina en forma de per-
las de gel acuoso.

20 Se opera como en el ejemplo 5, sustituyendo en la
solución acuosa los 40 g de N-[tris(hidroximetil)metil]
acrilamida y los 4 g de glioxal-bis-acrilamida por 10,6 g
de N-[tris(hidroximetil)metil]metacrilamida, 1,2 g de
N,N'-dihidroxietilen-bis-acrilamida y 0,2 g de N-[(N-meta-
cristoil)glicil]glicina.

25 Se obtienen así, en forma de perlas con un diámetro
comprendido entre 30 y 250 μ m, un gel acuoso que contiene
6 a 20 μ eq COOH por ml de gel.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

30

1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de copolímeros estáticos reticulados tridimensionales, cuyo procedimiento comprende:

5

i) someter a reacción de copolimerización los siguientes monómeros:

10

a) del 25% al 98% en peso de N-[tris(hidroximetil)metil] acrilamida o de N-[tris(hidroximetil)metil] metacrilamida, o de una mezcla de estos dos compuestos,

15

b) del 2% al 50% en peso de uno o varios monómeros que tienen varios dobles enlaces etilénicos polimerizables y uno o varios grupos hidroxilo, y exentos de grupos NH₂ o COOH,

20

c) del 0% al 50% en peso de uno o varios monómeros que tienen un doble enlace etilénico polimerizable y uno o varios grupos amino o carboxílico.

25

d) opcionalmente, un producto macromolecular natural gelificado, siendo la relación en peso producto macromolecular natural gelificable, en copolímero

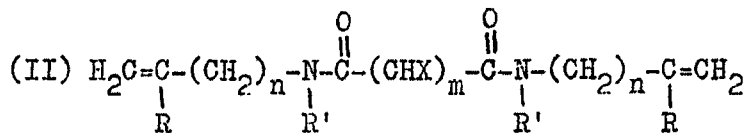
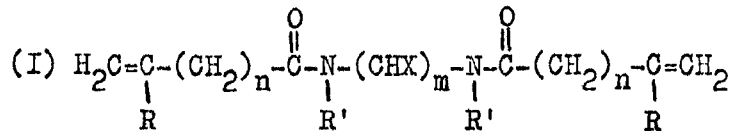
el gel, inferior o igual a 2, para obtener un copolímero que opcionalmente contiene un producto macromolecular natural gelificable, en forma de geles acuosos;

30

ii) opcionalmente, hacer reaccionar el gel obtenido en la etapa anterior con un compuesto bi- o polifuncional para obtener un gel activado y

iii) si se desea, adicionar al gel obtenido en la etapa anterior una macromolécula biológica.

1 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
los monómeros b) responden a una de las fórmulas:



10 en las cuales R es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo,
R' es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroximetilo, X es
un átomo de hidrógeno o un grupo OH, n y m son números en-
teros que van del 0 al 6, no pudiendo X y R' ser simultánea-
mente átomos de hidrógeno.

15 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2,
donde el monómero a) está constituido por un 50% a un 98% -
en peso y el complemento al 100% por uno o varios monómeros
b).

20 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde
el monómero a) es la N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida.

 5. Un procedimiento según las reivindicaciones 3 ó 4,
donde el monómero b) es la N,N'-dialiltartradiamida.

 6. Un procedimiento según las reivindicaciones 3 ó 4,
donde el monómero b) es el glioxal-bis-acrilamida.

25 7. Un procedimiento según las reivindicaciones 3 ó 4,
donde el monómero b) es la N,N'-metilen-bis-hidroximetila-
crilamida.

30 8. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7,
donde los geles acuosos contienen del 2% al 60% en peso de
copolímero.

1 9. Un procedimiento según la reivindicación 8, donde los geles se encuentran en forma de perlas con un diámetro de 10 μm a 600 μm .

5 10. Un procedimiento según las reivindicaciones 8 y 9, donde los geles contienen además un producto macromolecular natural gelificable, siendo la relación en peso producto macromolecular natural gelificable en el gel inferior o igual copolímero a 2.

10 11. Un procedimiento según la reivindicación 10, donde el producto macromolecular natural gelificable es la agarosa, el agar-agar o la gelatina.

 12. Un procedimiento según las reivindicaciones 8 a 11, donde en la etapa ii) se activa el gel por reacción con un compuesto bi- σ polifuncional.

15 13. Un procedimiento según la reivindicación 12, donde el compuesto bis- σ polifuncional es el bromuro de cianógeno, el glutaraldehído, la epíclorhidrina, el éter diglicídico del 1,4-butanodiol, o un derivado de la 1,3,5-tricloro-2,4,6-triazina.

20 14. Un procedimiento según las reivindicaciones 12 y 13, donde al gel activado se le adiciona una macromolécula biológica.

 15. Un procedimiento según la reivindicación 14, donde la macromolécula biológica es una proteína.

25 16. Un procedimiento según la reivindicación 15, donde la proteína es un enzima.

30 17. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COPOLIMEROS ESTATICOS RETICULADOS TRIDIMENSIONALES.

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de ventiuna pá-
gina mecanografiada.

5 Madrid, 27 de Enero de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

20

25

30

