

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 224**

51 Int. Cl.:

B01J 20/32 (2006.01)
B01D 67/00 (2006.01)
B01D 61/24 (2006.01)
B01D 71/16 (2006.01)
C12N 11/06 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C12N 11/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2011 PCT/SG2011/000069**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11102807**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011 E 11744984 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2536485**

54 Título: **Un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales y un método para preparar las mismas**

30 Prioridad:

19.02.2010 GB 201002824

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.03.2021

73 Titular/es:

**TEMASEK POLYTECHNIC (100.0%)
21 Tampines Avenue 1
529757 Singapore, SG**

72 Inventor/es:

**BLUCHEL, CHRISTIAN GERT y
WANG, YANMEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 816 224 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales y un método para preparar las mismas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales. La presente invención se refiere también a métodos de preparación del sustrato.

10 **Antecedentes**

Los ensayos biológicos y químicos y los procesos que se usan analítica o preparativamente para la investigación, con fines clínicos, diagnósticos e industriales requieren a menudo la fijación, o la inmovilización, de una sustancia funcional sobre un soporte sólido (o sustrato). Esta fijación mejora a menudo la estabilidad y versatilidad de la sustancia sin comprometer su eficacia y actividad, y permite la utilización repetida de la sustancia. Por ejemplo, las sustancias funcionales que incluyen sustancias biológicas tales como enzimas, se inmovilizan normalmente sobre un soporte sólido o un gel de poliacrilamida para mejorar su estabilidad contra el cambio de las condiciones de pH o temperatura cuando se usan en un proceso industrial catalizado por enzimas, y para facilitar su posterior separación de los productos de reacción. Esto permite reutilizar las enzimas inmovilizadas y facilita significativamente la purificación del producto, lo que conduce a procesos más económicos.

La inmovilización de una sustancia funcional que incluye una sustancia biológica puede efectuarse mediante inmovilización física o inmovilización química. Una forma de inmovilización física es la adsorción física (fisisorción), donde la sustancia funcional o biológica se une al sustrato mediante encapsulación o fuerzas electrostáticas, hidrófobas o fuerzas de van der Waals. Aunque la adsorción física proporciona un método de inmovilización relativamente simple con amplia aplicabilidad a una gama completa de sustancias funcionales y/o biológicas, a menudo no proporciona una inmovilización suficientemente estable y es susceptible a la lixiviación de las sustancias funcionales y/o biológicas inmovilizadas.

Un método más estable de inmovilización de las sustancias funcionales y/o biológicas es la inmovilización química, que une covalentemente la sustancia funcional y/o biológica al sustrato como resultado de una reacción química. La inmovilización química da como resultado normalmente una actividad mejorada, una adsorción no específica reducida, y una mayor estabilidad de la sustancia funcional y/o biológica. Sin embargo, la inmovilización química requiere generalmente la modificación química de la sustancia o el sustrato funcional y/o biológico para promover su unión eficaz.

La modificación de la superficie de un material de soporte sólido, o "preactivación" de un soporte sólido, para mejorar su unión a una sustancia funcional y/o biológica, implica normalmente la incorporación de restos químicos reactivos sobre la superficie del material polimérico generalmente poco reactivo. Se puede conseguir la modificación superficial por medios físicos, tales como la unión no covalente de un espaciador de afinidad, o medios químicos tales como la activación con glutaraldehído, activación con bromuro de cianógeno, bromoacetilación, diazotación, la oxidación inducida por radiación ionizante y el injerto químico.

La unión no covalente de un espaciador de afinidad está asociada, sin embargo, con una mala reproducibilidad y/o una unión inestable a la superficie de los sustratos. Algunas uniones covalentes, de forma más notable las iminas, pero en una menor extensión también los ésteres, pueden hidrolizarse en las condiciones de reacción usadas para las reacciones enzimáticas, dando como resultado una pérdida parcial de la enzima inmovilizada y un escape de la enzima hacia el medio de reacción. Dichos problemas pueden afectar, entre otros, a los métodos de inmovilización basados en la activación con glutaraldehído y a la bromoacetilación. Aunque la diazotación, activación con bromuro de cianógeno, oxidación inducida por radiación ionizante y el injerto químico producen enlaces covalentes que son más estables que los enlaces no covalentes, estos métodos implican el uso de condiciones de reacción peligrosas, caras, complicadas, y/o rigurosas.

Algunos de estos métodos también dan como resultado una alta carga neta sobre el soporte sólido, lo que produce una unión electrostática no específica indeseable de la sustancia funcional y/o biológica durante los procedimientos posteriores en un proceso biológico/químico. Otro problema común encontrado con el uso de condiciones de reacción rigurosas es la modificación desfavorable de las propiedades superficiales, que puede dificultar la unión de una sustancia funcional y/o biológica, particularmente una sustancia polimérica grande. Esto puede conducir a una carga baja de la sustancia funcional y/o biológica sobre el sustrato. Otros problemas más encontrados con algunos soportes sólidos activados comercialmente disponibles son la baja estabilidad, la toxicidad pronunciada y la falta de biocompatibilidad, dando como resultado una vida útil corta, una manipulación difícil, y una aplicabilidad limitada para fines médicos.

Algunos de estos métodos también dan como resultado una alta carga neta sobre el soporte sólido, lo que produce una unión electrostática no específica indeseable de la sustancia funcional y/o biológica durante los procedimientos posteriores en un proceso biológico/químico. Otro problema común encontrado con el uso de condiciones de reacción

5 rigurosas es la modificación desfavorable de las propiedades superficiales, que puede dificultar la unión de una sustancia funcional y/o biológica, particularmente una sustancia polimérica grande. Esto puede conducir a una carga baja de la sustancia funcional y/o biológica sobre el sustrato. Otros problemas más encontrados con algunos soportes sólidos activados comercialmente disponibles son la baja estabilidad, la toxicidad pronunciada y la falta de biocompatibilidad, dando como resultado una vida útil corta, una manipulación difícil, y una aplicabilidad limitada para fines médicos.

10 Algunos de estos métodos se basan en la modificación adicional de los soportes "preactivados" con un agente de acoplamiento de epoxisilano para inmovilizar las moléculas hidrófilas. Otros métodos se basan en la preparación de un sustrato haciendo reaccionar un enlazador de bisepoxioxirano para inmovilizar una molécula al sustrato. Los enlazadores alifáticos usados en estos métodos llevan a una disminución en la cantidad de grupos reactivos disponibles para la inmovilización, una disminución en la biocompatibilidad y una disminución en la reproducibilidad.

15 El documento US 4.415.663 (Symon et al.) describe el uso de una matriz de soporte que comprende un soporte poroso impregnado con una poliamina donde sustancialmente todos sus átomos de nitrógeno tienen grupos epóxido colgantes para inmovilizar enzimas, un método para preparar dicha matriz de soporte y un sistema de enzima inmovilizada es el resultado de la unión covalente de una enzima a la matriz de soporte descrita.

20 El documento US 4.915.839 (Marinaccio et al.) describe un proceso para modificar superficialmente una membrana microporosa polimérica orgánica hidrófila formando la membrana a partir de una composición que contiene agentes modificadores de la superficie, donde la membrana microporosa modificada superficialmente se puede usar para la microfiltración de fluidos.

25 El documento WO 2009/157877 A1 (Temasek Polytechnic) describe un sorbente para retirar productos residuales metabólicos de un líquido de diálisis, comprendiendo el sorbente una capa de partículas enzimáticas que tratan la toxina urémica inmovilizada entremezcladas con partículas de intercambio catiónico.

30 El documento EP 1 352 957 A1 (Resindion S.R.L.) describe un transportador para la inmovilización covalente multipuntual de enzimas sobre una superficie hidrófila en virtud de una adsorción iónica inicial, teniendo el transportador una capa interna de grupos próticos y una capa externa de grupos epóxido, un método para sintetizar dicho transportador y el uso del transportador para inmovilizar enzimas sobre una superficie mediante adsorción iónica y unión covalente.

35 El documento EP 0 200 107 A2 (Rohm GmbH) describe un método para inmovilizar proteínas, particularmente enzimas, cuando se disuelven en agua, sobre un soporte sólido en presencia de un electrolito.

40 El documento EP 0 146 329 A2 (Rohm y Haas Company) describe un proceso para preparar transportadores poliméricos que transportan oxirano para inmovilizar material que transporta hidrógeno activo, por ejemplo, enzimas, cuyos transportadores pueden prepararse mediante copolimerización de la suspensión y cuyo proceso se describe permitiendo la provisión de transportadores, en forma de perlas, para facilitar la penetración por los materiales que transportan hidrógeno activo, por ejemplo, enzimas.

45 El documento US 6.033.719 A (Keogh) describe un método para preparar un dispositivo médico que tiene al menos una biomolécula inmovilizada sobre una superficie de sustrato, cuyo método puede incluir combinar una biomolécula que comprende un resto de 1,2-dicarbonilo con un material que comprende un resto guanidino o combinar una biomolécula que comprende un resto guanidino con un material que comprende un resto de 1,2-dicarbonilo.

50 Existe necesidad de proporcionar métodos de preparar un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales y biológicas que supere, o al menos mejore, una o más de las desventajas descritas anteriormente.

Existe necesidad de proporcionar métodos que sean cómodos, baratos, sólidos y fiables para preparar un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales y biológicas.

55 Existe también necesidad de proporcionar sustratos que sean estables, fáciles de manipular, baratos, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables para la inmovilización de sustancias funcional y biológicamente activas, y que pueda utilizarse para la inmovilización de una amplia gama de sustancias a densidades de carga altas con actividad y reactividad mejoradas.

60 Sumario

65 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un sustrato sólido que tiene compuestos dispuestos sobre el mismo, en donde se inmoviliza una molécula funcional sobre los compuestos, teniendo cada compuesto una cadena que comprende: un resto R que está acoplado químicamente al sustrato, seleccionándose dicho resto R entre el grupo que consiste en un éter, éster, carbonilo, éster de carbonato, tioéter, disulfuro, sulfonilo, sulfonilo, carbonotioilo, amina, amida, carbamida, ureas y guanidinas; en donde el término "acoplado químicamente" se refiere a enlazar covalentemente y abarca un enlace covalente indirecto y un enlace covalente directo; y un resto que contiene epóxido

que está acoplado al resto R mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico seleccionado entre el grupo que consiste en una amina, hidroxilo y tiol; en donde el resto epóxido forma un enlace químico con dicha molécula funcional para inmovilizarla; y

5 en donde la molécula funcional comprende una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasas, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K,

10 en donde el sustrato es un sustrato a base de polisacárido seleccionado entre el grupo que consiste en celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.

15 En una realización, el sustrato comprende un grupo que contiene un epóxido adicional acoplado a la cadena. En otra realización, el número de grupos que contienen epóxidos adicionales se selecciona entre el número 1, 2, 3, 4 y 5. En una realización, el enlazador comprende grupos nucleofílicos adicionales a los que dichos grupos que contienen epóxido adicionales se acoplan a la mencionada cadena. Esto supone una ventaja, ya que la densidad de los grupos que contienen epóxido disponibles para reaccionar con una molécula funcional está aumentada y, por consiguiente, el número de sitios de inmovilización que están disponibles para inmovilizar una sustancia está también aumentado.

20 Es una ventaja de la divulgación que el enlazador aumente la longitud del anclaje entre la molécula funcional y el sustrato y ayude a unir la molécula funcional al sustrato.

25 En otra realización, el enlazador comprende una especie dinucleofílica. En una realización, el enlazador dinucleofílico se selecciona entre al menos uno de una alquil-diamina y una alqueno-diamina. Ventajosamente, el enlazador de diamina puede introducir sitios adicionales para la activación de epoxi. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, se cree que hasta cinco moléculas de compuesto que contiene epóxido (tal como epíclorohidrina) pueden reaccionar con una molécula de enlazador de diamina. Esto es ventajoso ya que permite un aumento en la densidad de, por ejemplo, un compuesto que contiene epóxido y, por consiguiente, el número de sitios de inmovilización que están disponibles para inmovilizar una molécula funcional.

30 En otra realización, el enlazador comprende una especie polinucleofílica. En otra realización, la especie polinucleofílica puede ser una poliamina tal como putrescina, espermidina, espermina, cadaverina, dietilentriamina, trietilentetramina, tetraetilenpentamina y tetrahidrofurfurilamina.

35 La introducción de los grupos amina del enlazador sirve también de forma beneficiosa como un tampón de pH interno para la sustancia inmovilizada. Es una ventaja adicional que los grupos amina pueden funcionar también como intercambiadores de iones para proporcionar condiciones estabilizantes para la sustancia inmovilizada. Es una ventaja adicional que los grupos amina sean fuertemente nucleofílicos, haciendo que el acoplamiento del primer y el segundo compuesto que contiene epóxido sea más eficaz que otros grupos nucleofílicos, por ejemplo, grupos OH. La naturaleza fuertemente nucleofílica de los grupos amina del enlazador es adicionalmente ventajosa ya que permite el uso de enlazadores largos a la vez que mantiene la reactividad con el compuesto que contiene epóxido. Esto es ventajoso adicionalmente ya que el uso de enlazadores más largos permite una reducción adicional del impedimento estérico entre el sustrato y la sustancia inmovilizada. Más ventajosamente, las diaminas tales como hexanodiamina son relativamente baratas en comparación con otros enlazadores y son materiales de consumo comercialmente disponibles. El bajo coste de las hexanodiaminas asegura que el sustrato divulgado pueda producirse en masa a

45 50 Es una ventaja adicional que el enlace de alquil-amina formado entre el compuesto que contiene epóxido y el enlazador de hexanodiamina sea resistente a la hidrólisis en condiciones fisiológicas, de tal manera que puede usarse en sistemas acuosos, por ejemplo, dispositivos de diálisis. Es una ventaja adicional que el sustrato de acuerdo con la divulgación sea biológicamente inerte.

55 De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para inmovilizar una molécula funcional sobre un sustrato sólido que tiene compuestos dispuestos en el mismo, que comprende la etapa de exponer dicha molécula funcional a dichos compuestos, en donde dicho compuesto es un compuesto que comprende un resto que contiene epóxido, y en donde dicha molécula funcional forma un enlace químico con el resto epóxido para inmovilizar dicha molécula funcional sobre el anterior y producir dicho sustrato de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

60 65 De acuerdo con un tercer aspecto se proporciona un método para preparar un sustrato sólido que comprende moléculas funcionales inmovilizadas sobre el mismo, comprendiendo el método las etapas de: (i) proporcionar compuestos electrofílicos acoplados a la superficie del sustrato, en donde dicha etapa comprende acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato, en donde el término "acoplar químicamente" se refiere a enlazar covalentemente y abarca el enlace covalente indirecto y el enlace covalente directo; (ii) dejar que los compuestos electrofílicos experimenten una reacción de sustitución nucleofílica para proporcionar un grupo nucleofílico a los mismos y de este modo aumentar la nucleofilia de la superficie del sustrato; (iii) dejar que el grupo nucleofílico experimente una reacción de sustitución nucleofílica con otro compuesto electrofílico para proporcionar un grupo electrofílico sobre la superficie del sustrato y de este modo aumentar la electrofilia del sustrato; en donde el otro compuesto electrofílico es un compuesto que comprende un resto epóxido; y (iv) exponer las moléculas funcionales a

dicho otro compuesto electrofílico, en donde dichas moléculas funcionales forman un enlace químico con dicho resto epóxido del otro compuesto electrofílico para inmovilizar dichas moléculas funcionales sobre el mismo, en donde las moléculas funcionales comprenden enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasas, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K,

en donde el sustrato es un sustrato a base de polisacárido seleccionado entre el grupo que consiste en celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.

Es una ventaja del método que el espaciador alargado unido a los grupos electrofílicos del sustrato proporcione una accesibilidad aumentada del compuesto funcional al grupo electrofílico y permite simultáneamente un aumento en la densidad y la reactividad del grupo electrofílico con la molécula funcional para inmovilizar de este modo la molécula funcional sobre el sustrato. Es una ventaja adicional que la etapa (iii) del método proporcione también una accesibilidad aumentada de una molécula funcional al grupo electrofílico para su posterior inmovilización sobre el sustrato.

En una realización, las etapas (ii) y (iii) se repiten un número n de veces para formar n generaciones de grupos electrofílicos sobre dicho sustrato. Esto es ventajoso ya que permite un alargamiento del espaciador y un aumento en la densidad de los grupos electrofílicos y por consiguiente el número de sitios de inmovilización que están disponible para inmovilizar una molécula funcional al sustrato.

Es una ventaja adicional que la etapa (iii) del método permita una reacción relativamente más rápida entre el enlazador y el segundo compuesto electrofílico. Esto da como resultado una tasa disminuida de hidrólisis de los compuestos electrofílicos y una mayor incorporación de grupos electrofílicos no hidrolizados sobre el sustrato. Esto es una ventaja adicional, ya que esto permite también un aumento en la densidad de los grupos electrofílicos sobre el sustrato para inmovilizar una molécula funcional.

Es una ventaja adicional del método que los grupos electrofílicos se desplacen con respecto al sustrato de tal manera que la capacidad de la molécula funcional para quedar inmovilizada sobre el anterior esté potenciada en relación a tener un sustrato con solo un compuesto electrofílico que se acopla directamente a un sustrato. Es una ventaja adicional que este desplazamiento relativo permita también una accesibilidad aumentada de una molécula funcional al grupo electrofílico para su posterior inmovilización sobre el sustrato.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona un cartucho sorbente para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el cartucho sorbente un sustrato del primer aspecto de la invención para inmovilizar ureasa.

Se describe también en el presente documento un método de diálisis que comprende las etapas de: exponer un dializado que contiene urea a un sustrato como se describe en el presente documento; y retirar el dializado de dicho sustrato.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un dializador para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el dializador un sustrato del primer aspecto de la invención para inmovilizar ureasa. Por tanto, la ureasa puede inmovilizarse sobre una membrana de diálisis tal como un filtro de membrana de acetato de celulosa comprendido en el dializador.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un método para modificar una membrana de diálisis que comprende moléculas funcionales inmovilizadas a la misma, comprendiendo el método las etapas de:

(i) acoplar compuestos electrofílicos a la superficie de la membrana, en donde dicha etapa comprende acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato, en donde el término "acoplar químicamente" se refiere a enlazar covalentemente y abarca el enlace covalente indirecto y el enlace covalente directo;

(ii) dejar que los compuestos electrofílicos experimenten una reacción de sustitución nucleofílica para proporcionar un grupo nucleofílico a los mismos y de este modo aumentar la nucleofilia de la superficie de la membrana;

(iii) dejar que el grupo nucleofílico experimente una reacción de sustitución nucleofílica con otro compuesto electrofílico para proporcionar un grupo electrofílico sobre la superficie de la membrana y de este modo aumentar la electrofilia de la superficie de la membrana para inmovilizar moléculas funcionales sobre la misma, en donde el otro compuesto electrofílico es un compuesto que comprende un resto epóxido; y

(iv) exponer las moléculas funcionales a dicho otro compuesto electrofílico, en donde dichas moléculas funcionales forman un enlace químico con dicho resto epóxido del otro compuesto electrofílico para inmovilizar dichas moléculas funcionales, en donde las moléculas funcionales comprenden enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasas, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K,

en donde dicha membrana es una membrana de acetato de celulosa.

Ventajosamente, se puede usar el método para modificar una membrana de diálisis lista para usar, tal como una membrana de acetato de celulosa, de un dializador. Esta etapa de modificación permite que la superficie de la membrana de diálisis tenga moléculas funcionales inmovilizadas, tales como enzimas dializadas, sobre la misma

cuando se usan en un dializador.

De acuerdo con un séptimo aspecto, se proporciona el uso de un sustrato sólido del primer aspecto de la invención en un dispositivo de diálisis.

5 Se describe también en el presente documento un método de preparar un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales sobre el mismo, comprendiendo el método las etapas de acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato; y acoplar químicamente un segundo compuesto electrofílico al primer compuesto electrofílico que se ha acoplado al sustrato, en donde dicho segundo compuesto electrofílico, cuando se acopla a dicho primer compuesto electrofílico, se configura para inmovilizar la sustancia funcional sobre el mismo.

15 Ventajosamente, el primer y el segundo compuestos electrofílicos se seleccionan para desplazarse uno respecto al otro de tal manera que la capacidad de la sustancia funcional para quedar inmovilizada sobre el anterior esté potenciada en relación a tener un sustrato con solo un compuesto electrofílico que se acopla a un sustrato. Más ventajosamente, el primer y el segundo compuestos electrofílicos se seleccionan para desplazarse uno con respecto al otro de tal manera que los efectos del impedimento estérico en la proximidad del segundo electrófilo se reducen o minimizan para potenciar la unión de la sustancia funcional al segundo compuesto electrofílico durante el uso.

20 Más ventajosamente, el primer y el segundo compuestos electrofílicos pueden ser un dielectrófilo que convierte eficazmente un sustrato poco nucleofílico en un sustrato fuertemente electrofílico. Esto constituye un cambio en la polaridad y la reactividad del sustrato.

25 Más ventajosamente, el método es un medio simple y económico para producir un sustrato que tiene una reactividad relativamente alta a sustancias funcionales para inmovilización sobre el mismo en comparación con sustratos producidos por métodos conocidos. Más ventajosamente, el segundo compuesto electrofílico puede unirse de forma estable a una sustancia funcional incluyendo una sustancia biológica tal como una enzima. Incluso más ventajosamente, el segundo compuesto electrofílico ofrece un sitio de unión para la sustancia funcional que está a una distancia adecuada lejos del sustrato, de tal manera que se reduce el impedimento estérico. La densidad de grupos electrofílicos por gramo del sustrato puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mmol/g.

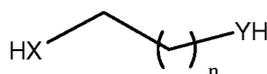
30 Esto reduce a su vez el impedimento durante la inmovilización de la sustancia funcional y permite que la sustancia funcional se ancle al sustrato fácilmente, mediante el segundo compuesto que contiene epóxido. Esto potencia también la accesibilidad y la flexibilidad estructural de la sustancia unida (enzima), aumentando de esta forma su actividad. El método divulgado también puede producir sustratos que pueden inmovilizar ligandos quirales, ligandos de afinidad y/o partículas de intercambio iónico.

40 El primer y el segundo compuestos electrofílicos pueden ser compuestos que contienen epóxido. El método divulgado puede comprender la etapa de utilizar un enlazador para acoplar el segundo compuesto que contiene epóxido al primer compuesto que contiene epóxido. Esto aumenta la longitud del anclaje entre el sitio de oxirano activo y el sustrato y ayuda en la unión de la sustancia funcional al sitio del oxirano. Esto potencia también la accesibilidad y de este modo, la actividad de la sustancia unida tal como una enzima. Ventajosamente, el enlazador puede contener grupos funcionales adicionales para comunicar propiedades químicas deseables al sustrato. Por ejemplo, el enlazador puede contener grupos amina que tienen propiedades tamponantes que pueden ser beneficiosas cuando se usa el sustrato en aplicaciones tales como dispositivos de diálisis. El enlazador puede contener también grupos que pueden funcionar como antioxidantes o secuestrantes de metales que complementan las funciones del sustrato en determinadas aplicaciones. Más ventajosamente, el enlazador puede también proporcionar más cantidad de sitios para la unión del segundo compuesto electrofílico y/o los compuestos que contienen epóxido posteriores. En efecto, el enlazador puede aumentar el número de compuestos que contienen epóxido acoplados al sustrato, lo que a la vez aumenta la probabilidad y la fuerza de inmovilización de la sustancia funcional. El enlazador también puede ser neutro e inerte que no altere negativamente la propiedad funcional o biológica de una sustancia funcional o biológica acoplada al mismo.

55 El enlazador no tiene que contener un grupo epóxido. El enlazador funcional puede comprender también un grupo nucleofílico. Ventajosamente, el grupo nucleofílico es reactivo y capaz de unirse químicamente a los compuestos electrofílicos (que contienen epóxido). El enlazador funcional puede ser un enlazador dinucleofílico. La presencia de dos grupos nucleofílicos permite al enlazador unirse al primer y al segundo compuestos que contienen epóxido, formando un puente entre los dos compuestos que contienen epóxido. en al menos uno de los nucleófilos del enlazador dinucleofílico, el nucleófilo se puede seleccionar del grupo que consiste en NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNH, CONRNH, cONR¹NR², CNO, Ph y PR, donde R, R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido.

60 El enlazador dinucleofílico puede tener también la fórmula general (I):

65



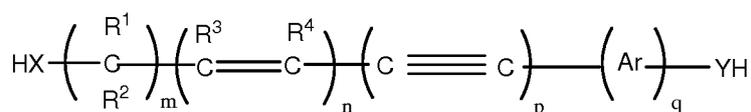
fórmula (I)

5 en donde:

X e Y se seleccionan independientemente entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH y PR;

10 R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y n es un número entero de 0 a 25.

El enlazador dinucleofílico puede tener la fórmula general (II):



15

fórmula (II)

en donde:

20

X e Y se seleccionan independientemente entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH, PR;

25 donde R, R¹, R², R³, R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y m, n, p y q es un número entero seleccionado independientemente entre 0 y 25.

30

El enlazador dinucleofílico puede ser una alquil-diamina tal como hexanodiamina o etilendiamina. Ventajosamente, el enlazador de diamina puede introducir sitios adicionales para la activación de epoxi. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, se cree que hasta cinco moléculas de compuesto que contiene epóxido (tal como epíclorohidrina) pueden reaccionar con una molécula de enlazador de diamina. Esto es ventajoso ya que permite un aumento en la densidad de, por ejemplo, un compuesto que contiene epóxido y por consiguiente, el número de sitios de inmovilización que están disponibles para inmovilizar una sustancia. La introducción de los grupos amina del enlazador sirve también de forma beneficiosa como un tampón de pH interno para la sustancia inmovilizada. Es una ventaja adicional que los grupos amina pueden funcionar también como intercambiadores de iones para proporcionar condiciones estabilizantes para la sustancia inmovilizada. Es una ventaja adicional que los grupos amina sean fuertemente nucleofílicos, haciendo que el acoplamiento del primer y el segundo compuesto que contiene epóxido sea más eficaz que otros grupos nucleofílicos. La naturaleza fuertemente nucleofílica de los grupos amina del enlazador es adicionalmente ventajosa ya que permite el uso de enlazadores largos a la vez que mantiene la reactividad con el compuesto que contiene epóxido. Esto es ventajoso adicionalmente ya que el uso de enlazadores más largos permite una reducción adicional del impedimento estérico entre el sustrato y la sustancia inmovilizada. Más ventajosamente, la hexanodiamina es relativamente barata en comparación con otros enlazadores y es un material de consumo comercialmente disponible. El bajo coste de las hexanodiaminas asegura que el sustrato divulgado pueda producirse en masa a costes relativamente bajos. Es una ventaja adicional que el enlace de alquil-amina formado cuando se utiliza un enlazador de hexanodiamina sea resistente a la hidrólisis en condiciones fisiológicas, de tal manera que puede usarse en sistemas acuosos, por ejemplo, dispositivos de diálisis. Es una ventaja adicional del enlazador de hexanodiamina que sea biocompatible y biodegradable.

35

40

45

Al menos uno del compuesto electrofílico y el segundo compuesto electrofílico es una epihalohidrina. Preferentemente, la epihalohidrina es epíclorohidrina. De forma similar, la epíclorohidrina es relativamente barata en comparación con otras epihalohidrinas y se consigue fácilmente ya que es un material de uso frecuente comercialmente disponible. De nuevo, el bajo coste de la epíclorohidrina asegura que el sustrato divulgado pueda producirse en masa a costes relativamente bajos. La epíclorohidrina tiende también a reaccionar muy rápida y exhaustivamente, dando solo productos no tóxicos (glicerol y aminoglicérol) y por tanto, es adecuada para usar en la preparación de un sustrato que se utilizaría eventualmente en aplicaciones médicas. Además, como la epíclorohidrina es parcialmente miscible con agua y completamente miscible con alcohol, cualquier exceso de epíclorohidrina puede eliminarse de forma relativamente fácil lavando el sustrato con agua y/o alcohol. Además, la epíclorohidrina y sus productos de hidrólisis son volátiles y por tanto pueden eliminarse eficazmente mediante evaporación.

55

60 El método puede comprender seleccionar un sustrato poco reactivo. El sustrato del método divulgado puede ser una

perla, una partícula microdimensionada, una partícula nanodimensionada, una membrana, una malla, un almacén o cualquier soporte sólido que sea capaz de prepararse usando el método divulgado para inmovilizar una sustancia funcional que incluye una sustancia biológica de la misma. El sustrato es un sustrato a base de polisacárido. El sustrato a base de polisacárido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en fibras de celulosa, perlas de celulosa, polvo de celulosa, celulosa microcristalina, membranas de celulosa, rayón, celofán, acetato de celulosa, membranas de acetato de celulosa, quitosano, quitina, derivados de dextrano y derivados de agarosa. Los sustratos pueden ser también biodegradables y, por tanto, respetuosos con el medio ambiente, lo que permite su aplicación en aplicaciones ambientalmente sensibles tales como aplicaciones agrícolas o aplicaciones para el tratamiento de residuos. El sustrato puede ser también biocompatible de tal manera que cuando el sustrato está implantado en el cuerpo humano o junto con el cuerpo humano, por ejemplo, en diálisis, se estimulan pocos o ningunos efectos adversos.

Las etapas de acoplamiento químico de los métodos divulgados pueden llevarse a cabo a un intervalo de temperatura de -30 °C a 100 °C, preferentemente de 0 °C a 100 °C. La etapa de acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 60 °C; la etapa de acoplar químicamente un enlazador al primer compuesto electrofílico se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 °C a 40 °C; la etapa de acoplar químicamente un segundo compuesto electrofílico al enlazador se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20 a 40 °C; y la etapa de acoplar químicamente la sustancia funcional al segundo compuesto electrofílico se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 2 a 6 °C. Ventajosamente, el sustrato puede producirse y/o prepararse en condiciones suaves, por ejemplo, a temperatura ambiente, y en atmósfera normal. Esto se traduce de nuevo en costes de producción más bajos y una mayor facilidad de manipulación. Más ventajosamente, la reacción de inmovilización final puede llevarse a cabo en condiciones muy suaves, tal como en un tampón acuoso de 2 a 6 °C y atmósfera normal, y no requiere ningún reactivo adicional. Esto elimina el riesgo de desactivación o desnaturalización de la sustancia bioactiva en condiciones extremas o reactivos fuertes, de tal manera que puede ser problemático en otros métodos de inmovilización. Incluso más ventajosamente, ya que el método puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, la inmovilización de las sustancias activas sobre el sustrato puede también llevarse a cabo de forma simultánea o posterior a la activación del sustrato.

La sustancia funcional puede ser una ureasa. Ventajosamente, cuando la ureasa está inmovilizada sobre el sustrato, el sustrato que contiene la ureasa inmovilizada puede usarse en aplicaciones de diálisis, por ejemplo, para la regeneración del dializado o hemodializado del peritoneo. Las enzimas pueden ser también al menos una de uricasa, creatininasa, lipasa, esterasa, celulasa, amilasa, pectinasa, catalasa, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K.

El método divulgado puede comprender además la etapa de acoplar químicamente uno o más compuestos electrofílicos posteriores al primer y al segundo compuestos electrofílicos, en donde dicho compuesto o compuestos electrofílicos, cuando se acoplan a dicho primer y segundo compuestos electrofílicos se configura(n) para inmovilizar la sustancia funcional del mismo o los mismos. Por ejemplo, un tercero, cuarto, quinto, sexto compuesto electrofílico, y así sucesivamente, se puede acoplar al primer y segundo compuestos electrofílicos. Los grupos electrofílicos que se divulgan en el presente documento pueden contener al menos un grupo epóxido.

Se describe también en el presente documento un método para inmovilizar una molécula funcional sobre un sustrato, comprendiendo el método las etapas de proporcionar el sustrato que tiene compuestos sobre el mismo preparados mediante el método de la divulgación, comprendiendo cada uno de dichos compuestos un resto que contiene éter que está químicamente acoplado al sustrato y un resto que contiene epóxido que se acopla al resto éter; y presentar una solución que contiene dicha molécula funcional a los mencionados compuestos dispuestos sobre dicho sustrato, en donde el resto que contiene epóxido forma un enlace químico con dicha molécula funcional para inmovilizarla.

Ventajosamente, este enlace químico puede ser un enlace covalente no hidrolizable, tal como un enlace amina. Por consiguiente, la molécula funcional se inmovilizará sobre el sustrato con suficiente estabilidad y no se puede eliminar fácilmente del sustrato.

El método del segundo aspecto puede comprender además la etapa de aplicar una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes sobre la superficie del sustrato para estabilizar dicha molécula funcional. La etapa de aplicar la mezcla sustancialmente homogénea de aditivos puede comprender evaporar el disolvente de una solución de dichos aditivos sobre el sustrato. Los aditivos estabilizantes se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en un azúcar tal como glucosa, un ácido orgánico tal como ácido etilendiaminotetraacético, un aminoácido tal como cisteína y un ácido sacárico tal como ácido ascórbico y tioles tales como mercaptoetanol.

Se describe también en el presente documento un sustrato que tiene compuestos dispuestos sobre el mismo para inmovilizar una molécula funcional, comprendiendo cada compuesto un resto que contiene éter que está acoplado químicamente al sustrato y un resto que contiene epóxido que se acopla al resto éter mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico, de modo que dicho resto que contiene epóxido se dispone desde dicho resto que contiene éter para inmovilizar la molécula funcional a dicho resto que contiene epóxido sin impedimento estérico sustancial que está producido por dicho resto que contiene éter o el sustrato. Ventajosamente, el sustrato tiene una estabilidad mejorada y puede producirse a un coste relativamente bajo cuando se compara con sustratos conocidos que pueden inmovilizar eficazmente sustancias funcionales. Más ventajosamente, el sustrato puede reutilizarse de forma repetida sin perder sustancialmente sus propiedades enzimáticas, debido a la elevada estabilidad

de la unión entre la biomolécula y el resto que contiene epóxido. Además, como no se produce lixiviado de sustancias potencialmente peligrosas, el sustrato es adecuado para usar en aplicaciones médicas tales como en diálisis peritoneal.

- 5 El enlazador puede ser un no hidrocarburo tal como una hidrazina, hidroxilamina, amoniaco, agua o sulfuro de hidrógeno.

10 El enlazador puede ser una cadena alifática saturada o insaturada que tiene de 2 a 18 átomos de carbono, 2 a 16 átomos de carbono, 2 a 14 átomos de carbono, 2 a 12 átomos de carbono o 2 a 10 átomos de carbono, 2 a 8 átomos de carbono, 2 a 6 átomos de carbono y 2 a 4 átomos de carbono. El enlazador puede ser una cadena alifática saturada que tiene 4 a 8 átomos de carbono, más preferentemente 6 átomos de carbono. El grupo nucleofílico de dicho enlazador puede estar localizado en uno de los extremos terminales de la cadena alifática o entre los extremos terminales de la cadena alifática. El grupo nucleofílico de dicho enlazador puede acoplarse químicamente a la cadena alifática por medio de una cadena ramificada que se extiende desde el anterior. Dos grupos nucleofílicos pueden estar
15 dispuestos sobre dicho enlazador, preferentemente en los extremos terminales de la cadena alifática. Al menos un grupo nucleofílico puede estar dispuesto sobre un extremo terminal de la cadena alifática y está acoplado tanto al éter como al resto que contiene epóxido con una cadena de enlazador alifático secundario entre los mismos. La cadena del enlazador alifático secundario puede tener de 1 a 3 átomos de carbono.

20 El sustrato puede comprender además un revestimiento dispuesto sobre dicho sustrato, comprendiendo el revestimiento una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes. Los aditivos estabilizantes se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en un azúcar tal como glucosa, un ácido orgánico tal como ácido etilendiaminotetracético, un aminoácido tal como cisteína y un ácido sacárico tal como ácido ascórbico.

25 Se describe también en el presente documento un cartucho sorbente para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el cartucho sorbente un sustrato que tiene compuestos dispuestos sobre el mismo que comprenden una ureasa inmovilizada, comprendiendo cada compuesto un resto que contiene éter que está acoplado químicamente al sustrato y un resto que contiene epóxido que se acopla al resto éter mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico, de modo que dicho resto que contiene epóxido se dispone desde dicho resto que contiene éter
30 éter para inmovilizar la molécula de ureasa a dicho sustrato sin impedimento estérico sustancial que está producido por dicho resto que contiene éter o el sustrato.

35 Se describe también en el presente documento un método de diálisis que comprende las etapas de exponer un dializado que contiene urea a un sustrato que tiene los compuestos dispuestos sobre el mismo que comprende una ureasa inmovilizada, comprendiendo cada compuesto un resto que contiene éter que está acoplado químicamente al sustrato y un resto que contiene epóxido que se acopla al resto éter mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico, de modo que dicho resto que contiene epóxido se dispone desde dicho resto que contiene éter para inmovilizar la molécula de ureasa a dicho sustrato sin impedimento estérico sustancial que está producido por dicho resto que contiene éter o el sustrato; y retirar el dializado de dicho sustrato después que se haberse
40 descompuesto una porción de dicha urea.

Se describe también en el presente documento el uso del sustrato de acuerdo con la divulgación en un dispositivo de diálisis. Ventajosamente, el sustrato puede usarse para retirar toxinas del dializado en el dispositivo de diálisis eficazmente y con seguridad.

45

Definiciones

Las siguientes palabras y términos utilizados en el presente documento tendrán el significado indicado:

50 El término "epóxido", "grupo epoxi" u "oxirano" representa gráficamente un grupo funcional químico que consiste en una disposición de anillo de tres miembros de dos átomos de carbono y un átomo de oxígeno. Los dos átomos de carbono en el anillo de tres miembros pueden sustituirse de forma independiente. El término "epóxido" puede representar también gráficamente una molécula o compuesto que comprende al menos un grupo epoxi.

55 La expresión "compuesto que contiene epóxido" significa cualquier compuesto que es un epóxido o un compuesto que contiene un resto epóxido. Los compuestos ilustrativos que contienen epóxido son los óxidos de alquileo y, en particular, los óxidos de alquileo inferior tales como óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno, epóxidos de alcoholes tales como glicidol, y epihalohidrinatos tales como epiclorohidrina, epibromohidrina, epiyodohidrina, 1,2-epoxi-4-clorobutano, 1,2-epoxi-4-bromobutano, 1,2-epoxi-4-yodobutano, 2,3-epoxi-4-clorobutano, 2,3-epoxi-4-bromobutano, 2,3-epoxi-4-yodobutano, 2,3-epoxi-5-cloropentano, 2,3-epoxi-5-bromopentano y 1,2-epoxi-5-cloropentano; compuestos epoxi tales como 2,2-bis(p-1,2-epoxipropoxifenil)-propano y 1,4-bis(1,2-epoxipropoxi)benceno, N,N'-bis(2,3-epoxipropil)piperazina.

65 Los términos "grupo electrofílico" y "electrófilo", como se usan en el presente documento se refieren a un átomo o grupo de átomos que puede o pueden aceptar un par de electrones para formar un enlace covalente. El "grupo electrofílico" utilizado en el presente documento incluye compuestos que contienen haluro, carbonilo y epóxido. Los electrofílicos comunes pueden ser haluros tales como tiosfogeno, glicerindiclorohidrina, cloruro de ftaloílo, cloruro de

succinilo, cloruro de cloroacetilo y cloruro de clorosuccinilo; cetonas tales como cloroacetona y bromoacetona; aldehídos tales como glioxal; isocianatos tales como diisocianato de hexametileno, diisocianato de tolueno, diisocianato de meta-xilileno y ciclohexilmetano-4,4-diisocianato y derivados de estos compuestos.

5 Los términos "grupo nucleofílico" y "nucleófilo" como se usan en el presente documento se refieren a un átomo o a un grupo de átomos que tienen un par de electrones capaz de formar un enlace covalente. Los grupos de este tipo pueden ser grupos ionizables que reaccionan como grupos aniónicos. El "grupo nucleofílico" usado en el presente documento incluye hidroxilo, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias y tioles.

10 El término "éter" o "que contiene éter" se refiere a una clase de compuestos orgánicos de fórmula general R-O-R, en donde R' es carbono. El término "éter" o "que contiene éter" como se usa en el presente documento se pretende que excluya aquellos compuestos donde R no es carbono, por ejemplo sialil éteres, Si-O-Si.

15 El término "poliamina" se refiere a un compuesto orgánico que tiene al menos dos grupos amino seleccionados positivamente procedentes del grupo que comprende grupos amino primarios, grupos amino secundarios y grupos amino terciarios. Por consiguiente, una poliamina cubre diaminas, triaminas y aminas superiores.

20 El término "biodegradable" o "polímero biodegradable" como se usa en el presente documento se refiere a materiales respetuosos con el medio ambiente que son degradables y/o compostables. Dichos materiales pueden ser degradables/compostables por diversos organismos vivos o por exposición a la luz y/o al oxígeno. Por lo tanto, el término "biodegradable", como se usa en el presente documento, se entenderá que incluye materiales que son oxobiodegradables, fotobiodegradables y microbianamente biodegradables.

25 El término "biocompatible" o "polímero biocompatible" se refiere a polímeros que, en las cantidades empleadas, no son tóxicos, no son migradores, son químicamente inertes, y sustancialmente no inmunógenos cuando se usan en contacto con fluidos biológicos, por ejemplo, plasma o sangre. Los polímeros biocompatibles adecuados incluyen, a modo de ejemplo, polisacáridos tales como celulosa o quitina.

30 El término "biopolímero" se refiere a polímeros que se producen o se derivan de organismos vivos. Los biopolímeros ilustrativos incluyen polipéptidos, ácidos nucleicos y polisacáridos, por ejemplo, celulosa y quitina.

35 El término "funcional", cuando se usa para describir una molécula o sustancia, se refiere a un grupo de átomos dispuestos en un modo que determina las propiedades químicas de la sustancia y la molécula a la cual se une. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen átomos de halógeno, grupos amida, grupos hidroxilo y grupos de ácidos carboxílicos.

40 La expresión "molécula diana" se refiere a una molécula que va a detectarse, aislarse, o ensayarse, y que es capaz de hacerse reaccionar o unirse a una sustancia funcional tal como una sustancia biológica. Las moléculas diana ilustrativas incluyen proteínas, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, lípidos, moléculas pequeñas, fármacos, metabolitos, cofactores, análogos en estado de transición y toxinas, o cualquier ácido nucleico que no es complementario con su ácido nucleico análogo. La molécula diana puede estar *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, o *ex vivo*.

45 la expresión "sustancias funcionales", usada en el presente documento se refiere de forma amplia a moléculas o sustancias activas que tienen un sitio capaz de reaccionar o unirse, o que tienen una afinidad con una molécula diana. La expresión "sustancias funcionales" abarca de manera amplia las sustancias biológicas y las biomoléculas.

50 Las expresiones "sustancias biológicas" o "biomoléculas", usadas en el presente documento, se refieren a cualesquiera sustancias o compuestos sustancialmente de origen biológico. Por tanto, los términos abarcan no solo moléculas naturales, tales como las que se pueden aislar de fuentes naturales, sino también formas, fragmentos y derivados que se pueden obtener de las anteriores, así como formas recombinantes y moléculas artificiales, siempre que esté presente al menos una propiedad de las moléculas nativas. Por tanto, el término cubre moléculas orgánicas que se producen por un organismo vivo, incluyendo moléculas poliméricas grandes tales como proteínas, polisacáridos, y ácidos nucleicos, así como moléculas pequeñas tales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, y productos naturales.

55 Las expresiones "sustancias biológicamente activas" y "sustancias bioactivas", usadas en el presente documento, se refiere de forma amplia a moléculas biológicas o sustancias fisiológicamente activas que tienen un sitio capaz de reaccionar o unirse o que tienen una afinidad con una molécula diana. Esto incluye sustancias que tienen un sitio catalíticamente activo tales como enzimas, sustancias que tienen un sitio capaz de unirse a compuestos específicos o clases específicas de compuestos, tales como oligonucleótidos de ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), o lectinas, vitaminas, péptidos, proteínas, hormonas, sustancias químicas que alteran el sistema endocrino, azúcares y lípidos.

65 La expresión "sustancia poco reactiva" significa un sustrato que está compuesto de un material que no reacciona de manera apreciable química o biológicamente con una sustancia funcional o biológica como se ha definido anteriormente. La sustancia funcional o biológica puede comprender una biomolécula y el sustrato no reactivo está

compuesto de un material que es biocompatible en que el material del sustrato no es tóxico y no produce ningún efecto adverso sobre la salud al cuerpo humano. Los sustratos no reactivos que son también biocompatibles son normalmente materiales poliméricos que son generalmente insolubles, flexibles, y que pueden conformar muchas formas diferentes, incluyendo superficies curvadas. Se señala que el término "polímero" se usa para denotar un compuesto químico con un elevado peso molecular que consiste en numerosas unidades estructurales unidas juntas por enlaces covalentes. Un material polimérico ilustrativo que no es reactivo y biocompatible con sustancias biológicas como se ha definido anteriormente es el polisacárido celulosa.

Los términos "enlazador" y "espaciador" como se usan en el presente documento se refieren a un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye en su significado radicales hidrocarburo saturados monovalentes ("alquilo") y divalentes ("alquilenos") de cadena lineal o ramificada o grupos alifáticos saturados cíclicos que tienen de 1 a 25 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos de carbono. Por ejemplo, El término "alquilo" incluye metilo, etilo, 1-propilo, isopropilo, 1-butilo, 2-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, amilo, 1,2-dimetilpropilo, 1,1-dimetilpropilo, pentilo, isopentilo, hexilo, 4-metilpentilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 2-etilpentilo, 3-etilpentilo, heptilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, 5-metilheptilo, 1-metilheptilo, octilo, nonilo y decilo. Los alquilos inferiores son grupos alquilo como se ha definido anteriormente de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente 1 a 4 átomos de carbono.

El término "alqueno", como se usa en el presente documento incluye en su significado grupos hidrocarburo alifáticos insaturados cíclicos o monovalentes ("alqueno") y divalentes ("alquilenos") de cadena lineal o ramificada que tienen de 2 a 25 átomos de carbono, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos de carbono y que tienen al menos un doble enlace, de cualquier estereoquímica E, Z, cis o trans donde sea aplicable, en cualquier parte de la cadena de alquilo. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen vinilo, alilo, 1-metilvinilo, 1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1,3-pentadienilo, 2,4-pentadienilo, 1,4-pentadienilo, 3-metil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 2-metilpentenilo, 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-heptenilo, 1-octenilo, 1-nonenilo y 1-decenilo. Los alquenos inferiores son grupos alqueno como se ha definido anteriormente con 2 a 6 átomos de carbono, preferentemente 2 a 4 átomos de carbono.

El término "alquino" como se usa en el presente documento incluye en su significado grupos hidrocarburo alifáticos insaturados cíclicos o monovalentes ("alquino") y divalentes ("alquilenos") de cadena lineal o ramificada que tienen de 2 a 10 átomos de carbono y que tienen al menos un triple enlace en cualquier parte en la cadena de carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-metil-2-butinilo, 3-metil-1-butinilo, 1-pentinilo, 1-hexinilo, metilpentinilo, 1-heptinilo, 2-heptinilo, 1-octinilo, 2-octinilo, 1-nonilo y 1-decinilo. Los alquinos inferiores son los grupos alquino como se ha definido anteriormente con 2 a 6 átomos de carbono, preferentemente 2 a 4 átomos de carbono.

El término "arilo" como se usa en el presente documento se refiere a un sistema de anillo monocíclico o multicíclico que tiene uno o más anillos aromáticos incluyendo fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo e indenilo. Los grupos arilo (incluyendo los grupos arilo bicíclicos) pueden ser no sustituidos o sustituidos con uno a cinco sustituyentes o más (normalmente uno a cinco sustituyentes para el arilo monocíclico y más de cinco sustituyentes para el arilo bicíclico/oligocíclico) seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en alquilo, alqueno, alquino, haloalquilo, alcoxi, tioalcoxi, hidroxilo, mercapto, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, aminoacilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, azido, ciano, halo, nitro, carboxaldehído, carboxilo, carboxamida, carbamida, carbamato, sulfato, sulfonato, sulfinato, fosfato, fosfonato, fosfinato, fosfina, e hidroxilo protegido. Además, los grupos arilo sustituidos incluyen tetrafluorofenilo y pentafluorofenilo.

El término "heteroarilo", ya se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a un sistema de anillo heterocíclico aromático sustituido o no sustituido (monocíclico o bicíclico). Los grupos heteroarilo pueden tener, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 átomos de carbono. Los grupos heteroarilo incluyen normalmente sistemas de anillos heterocíclicos aromáticos que tienen aproximadamente 4 a aproximadamente 14 átomos del anillo y que contienen átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno o azufre. Los grupos heteroarilo ilustrativos incluyen furano, tiofeno, indol, azaindol, oxazol, tiazol, isoxazol, isotiazol, imidazol, N-metilimidazol, piridina, pirimidina, pirazina, pirrol, N-metilpirrol, pirazol, N-metilpirazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-triazol, 1-metil-1,2,4-triazol, 1H-tetrazol, 1-metiltetrazol, benzoxazol, benzotiazol, benzofurano, benzoisoxazol, bencimidazol, N-metilbencimidazol, azabenzimidazol, indazol, quinazolina, quinolina, e isoquinolina. Los grupos heteroarilo aromáticos bicíclicos incluyen anillos de fenilo, piridina, pirimidina o piridizina que se (a) fusionan a un anillo heterocíclico aromático de 6 miembros (insaturado) que tiene un átomo de nitrógeno; (b) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 o 6 miembros que tiene dos átomos de nitrógeno; (c) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 miembros que tiene un átomo de nitrógeno junto con un átomo de oxígeno o un átomo de azufre; o (d) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 miembros que

tiene un heteroátomo seleccionado entre O, N o S. El término "heteroarilo" incluye también anillos heterocíclicos aromáticos que están sustituidos, por ejemplo con 1 a 5 sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, alcoxi, tioalcoxi, hidroxilo, mercapto, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, aminoacilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, azido, ciano, halo, nitro, carboxaldehído, carboxi, carboxamida, carbamida, carbamato, sulfato, sulfonato, sulfinato, fosfato, fosfonato, fosfinato, fosfina, e hidroxilo protegido.

La expresión "opcionalmente sustituido" como se usa en el presente documento, significa que el grupo al cual se refiere este término puede estar sin sustituir o puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, tioalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, halo, carboxilo, carboxialquilo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, alcoxi, tioalcoxi, mercapto, alquenilo, haloalcoxi, haloalquenilo, nitro, amino, nitroalquilo, nitroalquenilo, nitroalquinilo, nitroheterocicloalquilo, alquilamino, dialquilamino, alquenilamina, alquinilamino, acilo, alquenoilo, alquinoilo, acilamino, diacilamino, aminoacilo, aciloxi, alquilsulfonilo, heterociclooxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, azido, carboxaldehído, carboxi, carboxamida, carbamida, carbamato, oxima, hidroxilamina, sulfato, sulfonato, sulfinato, alquilsulfenilo, alquilcarbonilo, alquiltio, aciltio, grupos que contienen fósforo tales como fosfato, fosfonato, fosfinato y fosfina, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, ciano, cianato, isocianato, -C(O)NH(alquilo), -C(O)N(alquilo)₂ y -C(O)NR'R", donde R' y R" son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo o heteroarilo como se ha definido en el presente documento.

El término "halógeno" o variantes tales como "haluro" o "halo", como se usa en el presente documento, se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "amino" o "amina" como se usa en el presente documento se refiere a grupos de la forma -NR_aR_b en la que R_a y R_b se seleccionan individualmente del grupo que incluye hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido y grupos arilo opcionalmente sustituidos.

Las expresiones "acoplado químicamente" y "acoplar químicamente" y las variaciones gramaticales de los mismos se refieren al enlace covalente y al enlace no covalente de moléculas e incluye específicamente, pero no de forma exclusiva, enlaces covalentes, enlaces electrostáticos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las expresiones abarcan los enlaces indirectos y directos de las moléculas. Por tanto, si un primer compuesto se acopla químicamente a un segundo compuesto, la conexión puede ser a través de un enlace químico directo, o a través de un enlace químico indirecto mediante otros compuestos, enlazadores o conexiones.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad de ureasa", o "unidad enzimática" de ureasa, [U], se refiere a esa cantidad de enzima (ureasa), que produce la liberación de un micromol de amoníaco por minuto a 23 °C y pH 7,5.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente exenta" de Y puede estar completamente exenta de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Salvo que se especifique otra cosa, los términos "que comprende" y "comprende", y las variantes gramaticales de los mismos, se pretende que representen lenguaje "abierto" o "inclusivo" de tal manera que incluyen los elementos pero también permiten la inclusión de elementos adicionales no enumerados.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", en el contexto de concentraciones de componentes de las formulaciones, normalmente significa +/- el 5 % del valor establecido, más normalmente +/- el 4 % del valor establecido, más normalmente +/- el 3 % del valor establecido, más normalmente, +/- el 2 % del valor establecido, aún más normalmente +/- el 1 % del valor establecido e incluso más normalmente +/- el 0,5 % del valor establecido.

A lo largo de la presente divulgación, determinadas realizaciones pueden divulgarse en un formato de intervalo. debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de los intervalos divulgados. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6 y de 3 a 6, así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Divulgación detallada

Se divulgarán ahora los métodos no limitantes ilustrativos de preparar un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales sobre el mismo y un sustrato para inmovilizar moléculas funcionales sobre el mismo.

- 5 El sustrato tiene compuestos dispuestos sobre el mismo para inmovilizar una molécula funcional, teniendo cada compuesto una cadena que comprende: un resto R que está acoplado químicamente al sustrato, seleccionándose dicho resto R entre el grupo que consiste en un éter, éster, carbonilo, éster de carbonato, tioéter, disulfuro, sulfinilo, sulfonilo, carbonotioilo, amina, amida, carbamida, ureas y guanidinas; y un resto que contiene epóxido que está acoplado al resto R mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico.
- El resto R puede seleccionarse del grupo que consiste en una amina, amida, carbamida, ureas y guanidinas.
- 10 El grupo nucleofílico puede excluir al menos uno de los restos que contienen oxígeno y los restos que contienen azufre.
- El sustrato puede comprender un grupo que contiene un epóxido adicional acoplado a la cadena. El número de grupos que contienen epóxidos adicionales se puede seleccionar entre el número 1, 2, 3, 4 y 5. Al menos uno de los grupos que contienen epóxidos adicionales puede acoplarse a dicha cadena por el grupo nucleofílico de dicho enlazador.
- 15 El enlazador puede comprender grupos nucleofílicos adicionales a los que dichos grupos que contienen epóxido adicionales se acoplan a la mencionada cadena. Los grupos que contienen epóxido adicionales pueden ramificarse a partir de la cadena mediante acoplamiento con los grupos nucleofílicos adicionales de dicho enlazador.
- 20 El grupo nucleofílico de dicho enlazador puede ser una amina. El enlazador se puede seleccionar entre el grupo que consiste en aminas, diaminas, y triaminas alifáticas y aromáticas saturadas e insaturadas. Los grupos alifáticos de dichas aminas pueden ser grupos alquilo.
- El enlazador puede contener un grupo epóxido.
- 25 El enlazador puede comprender una especie dinucleofílica. El enlazador dinucleofílico se puede seleccionar entre al menos una de una alquil-diamina y una alqueno-diamina. El enlazador dinucleofílico se puede seleccionar entre al menos una de etano-diamina, propano-diamina, butano-diamina, pentano-diamina, hexano-diamina. El enlazador dinucleofílico puede ser hexano-diamina.
- 30 El compuesto que contiene epóxido puede derivarse mediante reacción de una epihalohidrina con los grupos nucleofílicos de dicho enlazador.
- El sustrato puede ser inerte para una molécula funcional que se ha inmovilizado mediante dicho grupo que contiene epóxido.
- 35 El sustrato es un sustrato a base de polisacárido que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en fibras de celulosa, perlas de celulosa, polvo de celulosa, celulosa microcristalina, membranas de celulosa, rayón, celofán, acetato de celulosa, membranas de acetato de celulosa, quitosano, quitina, derivados de dextrano y derivados de agarosa.
- 40 El sustrato se selecciona entre celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.
- El sustrato puede comprender un revestimiento dispuesto sobre dicho sustrato, comprendiendo el revestimiento una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes seleccionados para estabilizar dicha molécula funcional. Los aditivos estabilizantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.
- 45 Se describe también en el presente documento un método para inmovilizar una molécula funcional sobre un sustrato. El método comprende la etapa de exponer la molécula funcional al sustrato como se describe en el presente documento.
- 50 La molécula funcional es una enzima seleccionada del grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininas, lipasas, esterases, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K.
- 55 El método puede comprender además la etapa de aplicar una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes sobre la superficie del sustrato para estabilizar dicha molécula funcional seleccionada. La etapa de aplicar la mezcla sustancialmente homogénea de aditivos comprende evaporar el disolvente de una solución de dichos aditivos sobre el sustrato. Los aditivos estabilizantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.
- 60 Se describe también en el presente documento un método de preparar un sustrato para inmovilizar moléculas funcionales sobre el mismo. El método comprende las etapas de: (i) proporcionar compuestos electrofílicos acoplados a la superficie del sustrato; (ii) dejar que los compuestos electrofílicos experimenten una reacción de sustitución nucleofílica para proporcionar un grupo nucleofílico a los mismos y de este modo aumentar la nucleofilia de la superficie del sustrato; (iii) dejar que el grupo nucleofílico experimente una reacción de sustitución nucleofílica con otro compuesto electrofílico para proporcionar un grupo electrofílico sobre la superficie del sustrato y de este modo
- 65

aumentar la electrofilia del sustrato.

Las etapas (ii) y (iii) pueden repetirse un número n de veces para formar n generaciones de grupos electrofílicos sobre dicho sustrato. Las etapas (ii) y (iii) pueden repetirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más veces.

Dicha etapa de proporcionar compuestos electrofílicos a la superficie del sustrato puede comprender acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato. La etapa (ii) puede comprender la etapa de hacer reaccionar un nucleófilo con el primer compuesto electrofílico. La etapa (iii) puede comprender acoplar químicamente un segundo compuesto electrofílico al nucleófilo.

El compuesto electrofílico puede ser un compuesto que contiene epóxido. El compuesto electrofílico se puede seleccionar entre compuestos epoxi tales como óxidos de alquileo, epóxidos de alcoholes, y epihalohidrina, haluros. El compuesto electrofílico puede incluir también cetonas, aldehídos, isocianatos y derivados de estos compuestos.

El compuesto que contiene epóxido puede ser una epihalohidrina. La epihalohidrina se puede seleccionar del grupo que consiste en epiclorohidrina, epibromohidrina, epiyodohidrina, 1,2-epoxi-4-clorobutano, 1,2-epoxi-4-bromobutano, 1,2-epoxi-4-yodobutano, 2,3-epoxi-4-clorobutano, 2,3-epoxi-4-bromobutano, 2,3-epoxi-4-yodobutano, 2,3-epoxi-5-cloropentano, 2,3-epoxi-5-bromopentano, 1,2-epoxi-5-cloropentano. La epihalohidrina puede ser epiclorohidrina.

El nucleófilo puede ser un dinucleófilo o un polinucleófilo. El nucleófilo puede comprender una amina. La amina se puede seleccionar del grupo que consiste en aminas, diaminas, triaminas alifáticas o aromáticas saturadas e insaturadas y poliaminas superiores. El grupo alifático de dichas aminas se puede seleccionar de un grupo alquilo. La amina se puede seleccionar a partir de al menos una de etano-diamina, propano-diamina, butano-diamina, pentano-diamina, hexano-diamina. La amina puede ser una hexano-diamina.

El sustrato a base de polisacárido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en fibras de celulosa, perlas de celulosa, polvo de celulosa, celulosa microcristalina, membranas de celulosa, rayón, celofán, acetato de celulosa, membranas de acetato de celulosa, quitosano, quitina, derivados de dextrano y derivados de agarosa.

El sustrato se selecciona entre celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.

La molécula funcional es una enzima seleccionada del grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatinasa, lipasas, esterases, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, proteinasa-K.

El método puede comprender además la etapa de aplicar una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes a la superficie del sustrato en donde dichos aditivos estabilizantes se seleccionan para estabilizar dicha molécula funcional. La etapa de aplicar la mezcla sustancialmente homogénea de aditivos puede comprender evaporar el disolvente de una solución de dichos aditivos sobre el sustrato. Los aditivos estabilizantes pueden seleccionarse del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.

Se describe también en el presente documento un cartucho sorbente para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el cartucho sorbente un sustrato como se describe en el presente documento para inmovilizar ureasa.

Se describe también en el presente documento un dializador para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el dializador un sustrato como se describe en el presente documento para inmovilizar ureasa.

Se proporciona también un método de diálisis que comprende las etapas de: exponer un dializado que contiene urea a un sustrato como se describe en el presente documento; y retirar el dializado de dicho sustrato.

Se proporciona el uso del sustrato como se describe en el presente documento en un dispositivo de diálisis.

Se describe también en el presente documento el uso del sustrato de acuerdo con la divulgación como un material de fase sólida para cromatografía (incluyendo cromatografía quiral y cromatografía de afinidad). La divulgación también proporciona el uso del sustrato en sensores y biosensores.

Se describe también en el presente documento un método de preparar un sustrato para inmovilizar sustancias funcionales sobre el mismo, comprendiendo el método las etapas de acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato; y acoplar químicamente un segundo compuesto electrofílico al primer compuesto electrofílico que se ha acoplado al sustrato, en donde dicho segundo compuesto electrofílico, cuando se acopla a dicho primer compuesto electrofílico, se configura para inmovilizar la sustancia funcional sobre el mismo. El primer compuesto electrofílico puede ser un dielectrófilo y estar unido químicamente al sustrato debido a una reacción de sustitución nucleofílica entre un grupo electrofílico del dielectrófilo y un grupo nucleofílico del sustrato.

Como resultado de esta primera reacción, un sustrato poco reactivo (nucleofílico) se convierte en un sustrato fuertemente reactivo (electrofílico). El reactivo dielectrofílico puede ser una epihalohidrina. Puede ser también uno del

grupo que comprende bromuro de cianógeno, ácido bromoacético y aldehído glutárico. El segundo compuesto electrofílico puede estar unido químicamente de forma directa de al primer compuesto electrofílico tal como mediante un enlace químico. El segundo compuesto electrofílico puede estar unido químicamente de forma indirecta al primer compuesto electrofílico, por ejemplo, mediante un enlazador. El primer y el segundo compuestos electrofílicos pueden ser monómeros.

Antes de la etapa de acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato, el método puede incluir la etapa de funcionalizar el sustrato de tal manera que el sustrato comprenda grupos funcionales que puedan acoplarse químicamente al primer compuesto electrofílico.

El método puede comprender la etapa de utilizar un enlazador para acoplar el segundo compuesto electrofílico al primer compuesto electrofílico. El enlazador puede también estar cargado de forma neutra. El enlazador puede comprender también una cadena alifática C₁₋₂₅ que está saturada o insaturada, lineal o ramificada, que está opcionalmente sustituida, y en donde los átomos de carbono de la cadena pueden estar opcionalmente sustituidos por -C(O)-, -C(O)C(O)-, -C(O)NR*, -C(O)NR*NR*, -CO₂ -, -OC(O)-, -NR*CO₂ -, -O-, -NR*C(O)NR*, -OC(O)NR*, -NR*NR*, -NR*C(O)-, -S-, -SO-, -SO₂ -, -NR*-, -SO₂ NR*-, -NR*SO₂ -, -C(O)NRO- o -NRC(NR)NR-, en donde R* se selecciona entre hidrógeno o C₁₋₁₀ alifático; en donde C₁₋₁₀ alifático puede estar sustituido o no sustituido.

El enlazador no tiene que contener un grupo epóxido. El enlazador puede comprender también un grupo nucleofílico. El enlazador puede ser un enlazador multinucleofílico, es decir, el enlazador puede contener más de un grupo nucleofílico. El enlazador puede ser un enlazador dinucleofílico. Cuando el enlazador es un enlazador dinucleofílico, al menos uno de los nucleófilos del enlazador dinucleofílico se puede seleccionar entre el grupo que consiste en NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNH, CONRNH, CONR¹NR², CNO, PH y PR,

donde R, R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido.

Cuando el enlazador funcional no contiene un grupo epóxido y es un enlazador dinucleofílico, El enlazador puede tener la fórmula general (I):



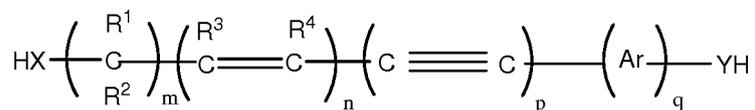
fórmula (I)

en donde:

X e Y se seleccionan independientemente entre NH, NR, O, S, COO, CONH y CONR;

R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y n es un número entero de 0 a 25.

El enlazador dinucleofílico puede tener la fórmula general (II):



fórmula (II)

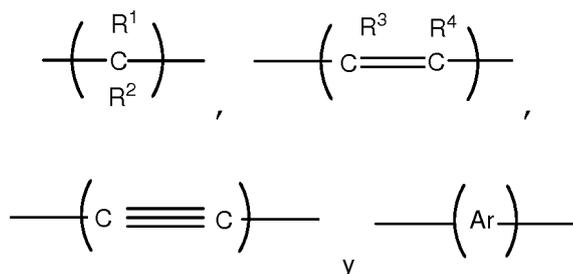
en donde:

X e Y se seleccionan independientemente entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH, PR;

R, R¹, R², R³, R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

m, n, p y q es un número entero seleccionado independientemente entre 0 y 25.

La posición de los grupos



5 de la fórmula (II) puede ser indistinta y estos grupos pueden estar también presentes en más de una posiciones como entenderá la persona experta.

El enlazador dinucleofílico puede tener la fórmula general (IIa):



10

fórmula (IIa)

en donde:

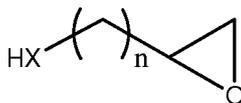
15 X e Y se seleccionan independientemente entre los grupos que consisten en -NR¹R², NRO, OR, SR, SeR, COOR, CONR, CSSR, COSR, CONRO, CONRNR¹R², CNOR y PR¹R², y cualesquiera otros sustituyentes que puedan formar aductos catiónicos; R, R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y n es un número entero de 0 a 25.

20

Las variables X e Y pueden ser también cualquier grupo nucleofílico que sea capaz de reaccionar con un grupo epóxido para formar un enlace químico.

25 El enlazador dinucleofílico puede comprender un grupo alquildiamina. El enlazador dinucleofílico puede ser al menos uno de una etilendiamina y una hexanodiamina. El enlazador puede ser un compuesto cargado que comprende nucleófilos tales como NR¹R² donde, R¹ y R² son como se ha definido anteriormente. El enlazador puede estar también formado por compuestos pequeños seleccionados entre el grupo que consiste en H₂O, H₂S, H₂Se, PH₃, PH₂R, NH₃, NH₂R y NHR¹R², donde, R, R¹ y R² son como se han definido anteriormente.

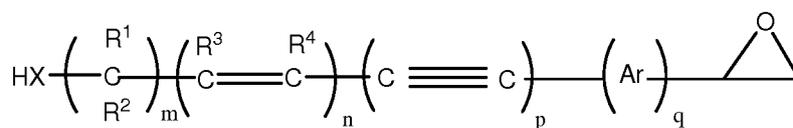
30 El enlazador puede ser o no un compuesto que contiene epóxido. Cuando el enlazador es un compuesto que contiene epóxido, El enlazador puede tener la fórmula general (Ia):



35 en donde:

40 X se selecciona entre NH, NR, O, S, Se, COO, CONR¹NR², CONRO, CONH y CONR; R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y n es un número entero de 0 a 25.

El enlazador que contiene epóxido puede tener la fórmula general (Ib):



45

fórmula (Ib)

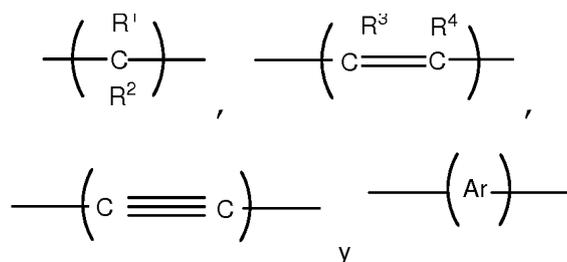
en donde:

X se selecciona entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO CONHNNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH, PR;

R, R¹, R², R³, R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

m, n, p y q es un número entero seleccionado independientemente entre 0 y 25.

La posición de los grupos



de la fórmula (II) puede ser indistinta y estos grupos pueden estar también presentes en más de una posiciones como entenderá la persona experta.

La variable X puede ser también cualquier grupo nucleofílico que sea capaz de reaccionar con un grupo epóxido para formar un enlace químico.

El enlazador que contiene epoxi puede comprender hidroxioxiranos. El enlazador que contiene epoxi puede ser glicidol.

El método divulgado puede comprender también las etapas de acoplar químicamente un compuesto electrofílico posterior o un compuesto ambifílico al compuesto electrofílico anterior directa o indirectamente mediante el enlazador funcional divulgado anteriormente. Estas etapas adicionales de acoplar químicamente los compuestos electrofílicos posteriores pueden llevarse a cabo repetidamente hasta que se consigue la longitud de cadena deseada. Ventajosamente, repitiendo estas etapas, puede aumentar el número de sitios electrofílicos tales como sitios de oxirano activos para la unión con las sustancias biológicas, aumentando por tanto la probabilidad y la afinidad de la sustancia biológica al sustrato. Cuando el enlazador es un compuesto ambifílico, el enlazador puede comprender glicidol.

Los compuestos electrofílicos divulgados en el presente documento pueden comprender compuestos que contienen epóxido. Por ejemplo, el primer compuesto electrofílico y el segundo compuesto electrofílico pueden ser un primer compuesto que contiene epóxido y un segundo compuesto que contiene epóxido. Al menos uno del primer compuesto que contiene epóxido y el segundo compuesto que contiene epóxido puede ser una epihalohidrina. La epihalohidrina se puede seleccionar del grupo que consiste en, epiclorhidrina, epibromohidrina y epiyodohidrina. El método puede comprender seleccionar un sustrato reactivo. El sustrato a base de polisacárido puede seleccionarse entre el grupo que consiste en fibras de celulosa, perlas de celulosa, polvo de celulosa, celulosa microcristalina, membranas de celulosa, rayón, celofán, acetato de celulosa, membranas de acetato de celulosa, quitosano, quitina, derivados de dextrano y derivados de agarosa.

Las etapas de acoplamiento químico pueden llevarse a cabo a un intervalo de temperatura de -30 °C a 100 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 27 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 70 °C, de aproximadamente 23 °C a aproximadamente 35 °C y de aproximadamente 23 °C a aproximadamente 30 °C.

Las sustancias funcionales son una enzima. El método puede comprender la etapa de acoplar químicamente una enzima a dicho segundo compuesto electrofílico que se ha acoplado al primer compuesto electrofílico. La etapa de acoplar químicamente una enzima a dicho segundo compuesto electrofílico puede incluir proporcionar estabilización y activar aditivos tales como azúcares, tioles, antioxidantes y quelantes.

Preferentemente, las enzimas son ureasas. La enzima puede acoplarse químicamente al segundo compuesto que contiene epóxido que se ha acoplado al primer compuesto que contiene epóxido. Se puede acoplar también directamente al primer compuesto que contiene epoxi.

El sustrato obtenido a partir del método descrito para la inmovilización de las sustancias biológicas del mismo tiene un compuesto que contiene éter que tiene un resto acoplado a un sustrato y otro resto acoplado a un compuesto que contiene epóxido. El sustrato se puede usar en un dispositivo de diálisis, tal como un dispositivo de diálisis peritoneal o un dispositivo de hemodiálisis. El sustrato puede utilizarse en un sorbente de un dispositivo de hemodiálisis.

Breve descripción de los dibujos

5 Los dibujos acompañantes ilustran una realización divulgada y sirven para explicar los principios de la realización divulgada. Debe entenderse, sin embargo, que los dibujos están diseñados únicamente con fines ilustrativos, y no como una definición de los límites de la invención.

La Fig. 1a es un esquema de una realización del método divulgado de utilizar enlazadores dinucleofílicos.

10 La Fig. 1b es un esquema que muestra otro posible sustrato modificado que puede obtenerse de la misma realización del método que se muestra en la Fig. 1a.

La Fig. 2 es un esquema de otra realización del método divulgado que utiliza enlazadores funcionalizados de oxirano.

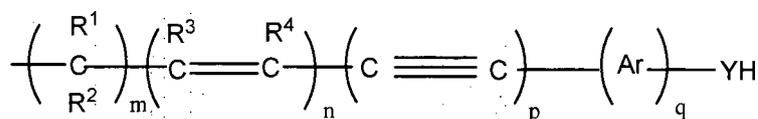
15 La Fig. 3 es un esquema de un ejemplo específico del método que se muestra en la Fig. 1a, cuando se usa una hexanodiamina como un enlazador y se usa epíclorohidrina como el primer y el segundo compuesto que contiene epóxido.

20 La Fig. 4 es un esquema de un ejemplo específico del método que se muestra en la Fig. 1b, cuando se usa glicidol como un enlazador.

Descripción detallada de los dibujos

25 En referencia a la Fig. 1a, se muestra un esquema de una realización del método 100 divulgado de utilizar enlazadores dinucleofílicos. Un grupo hidroxilo libre (primario) sobre la superficie de un polímero 110 insoluble se hace reaccionar en primer lugar con una epihalohidrina que se muestra en la etapa A-1. La reacción da como resultado la liberación del halógeno sobre la epihalohidrina y un protón sobre el grupo hidroxilo, formando un enlace éter, de tal manera que el sustrato 112 modificado resultante está ahora acoplado químicamente a un grupo epóxido por su extremo terminal.

30 El sustrato 112 que contiene el grupo epóxido a continuación, en la etapa A-2, se hace reaccionar con un enlazador dinucleofílico que tiene la fórmula general (II), que proporciona el sustrato (114) enlazador modificado como producto.



35 fórmula (II)

en donde:

40 X e Y se seleccionan independientemente entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH, PR;

R, R¹, R², R³, R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

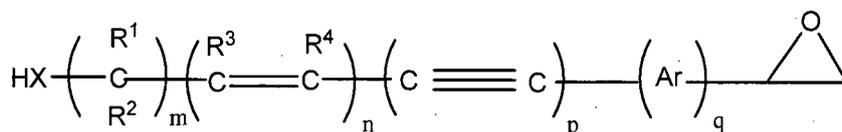
45 m, n, p y q es un número entero seleccionado independientemente entre 0 y 25.

Tras la reacción con el grupo enlazador en la etapa A-2, el sustrato 114 modificado contiene ahora el grupo Y nucleofílico en su extremo terminal. El grupo Y nucleofílico se hace reaccionar a continuación en la etapa A-3 con otra epihalohidrina. Mediante sustitución nucleofílica, el halógeno presente en la epihalohidrina se sustituye por el grupo Y nucleofílico, dando como resultado el sustrato 116 modificado que tiene ahora un resto 140 éter, un resto 142 epoxi terminal, que están acoplados respectivamente al enlazador 144. El grupo epóxido terminal del sustrato 116 modificado se hace reaccionar a continuación con una sustancia biológica en forma de la enzima 120 que contiene un grupo Z nucleofílico en la etapa A-4. La enzima queda inmovilizada sobre el sustrato para dar el producto 130 global. En la etapa A-4 se pueden añadir también estabilizantes tales como tioles.

55 En referencia a la Fig. 1b, se muestra un esquema 200 que muestra otro producto que se puede obtener de la misma realización del método que se muestra en la Fig. 1a. Las etapas que se llevan a cabo en la Fig. 1b son las mismas que en la Fig. 1a. Sin embargo, en la etapa B-3, más de una molécula de epihalohidrina experimenta sustitución nucleofílica en los grupos X e Y nucleofílicos, dando como resultado un sustrato que tiene múltiples grupos epóxido. Por consiguiente, el sustrato final modificado obtenido (216) difiere del sustrato 116 modificado en que el sustrato 216 contiene restos 242 epóxido adicionales en los grupos X e Y nucleofílicos. El sustrato 216 modificado puede a continuación experimentar reacciones de inmovilización similares a las de la Etapa B-4 en la Fig. 1a.

En referencia a la Fig. 2, se muestra un esquema de una realización del método 300 divulgado que utiliza enlazadores

funcionalizados con oxirano. El sustrato 310 que contiene un grupo hidroxilo se hace reaccionar en primer lugar con una epihalohidrina que se muestra en la etapa C-1. La reacción da como resultado la liberación del halógeno sobre la epihalohidrina y el hidrógeno forma el grupo hidroxilo de tal manera que el sustrato 312 modificado resultante queda unido ahora a un grupo epóxido por su extremo terminal. El sustrato 312 que contiene el grupo epóxido se hace reaccionar a continuación en la etapa C-2 con al menos una unidad de enlazador funcionalizado con oxirano que tiene la fórmula general (Ib):



fórmula (Ib)

en donde:

X se selecciona entre NH, NR, NHO, NRO, O, S, Se, COO, CONH, CONR, CSS, COS, CONHO, CONRO, CONHNH, CONRNH, CONRNR, CNO, PH, PR;

R, R¹, R², R³, R⁴ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

m, n, p y q es un número entero seleccionado independientemente entre 0 y 25.

Tras la reacción con el enlazador en la etapa C-2, el sustrato 314 modificado resultante contiene ahora el grupo epóxido del enlazador funcionalizado con oxirano en su extremo terminal. El grupo epóxido terminal se hace reaccionar a continuación con una sustancia biológica 320 que contiene un grupo Z nucleofílico en la etapa C-3. Eventualmente, la sustancia biológica queda inmovilizada sobre el sustrato para dar el producto 330 global.

En referencia a la Fig. 3, se muestra un esquema 400 de un ejemplo específico del método que se muestra en la Fig. 1a, pero cuando se usa hexanodiamina como un enlazador en la etapa D-2 y se usa epoclorohidrina como el primer y el segundo compuesto que contienen epóxido en las etapas D-1 y D-3. El sustrato modificado resultante contiene un resto 440 éter y al menos un resto 442 epoxi, como se ilustra en el sustrato 416. Puede contener también múltiples restos epoxi, como se muestra en los sustratos 450 y 452 modificados.

En referencia a la Fig. 4, se muestra un esquema 500 de un ejemplo específico del método que se muestra en la Fig. 1b, cuando se usa glicidol como un enlazador en la etapa E-2. El producto resultante obtenido está indicado por el número de referencia 514.

Ejemplos

Las realizaciones no limitantes de la invención y un ejemplo comparativo se describirán adicionalmente con mayor detalle en referencia a los Ejemplos específicos, que no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación del sustrato funcionalizado con epoxi

Se llevó a cabo la mercerización y la funcionalización con epoxi de la celulosa tratando una suspensión agitada vigorosamente de 5,0 g de celulosa en 100 ml de hidróxido de sodio 2,4 M con 30 ml de epoclorohidrina a 55 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró con succión y el residuo sólido ("celulosa-epoxi primaria") se lavó con agua ultrapura (3x 50 ml). La carga del grupo epoxi de la celulosa-epoxi primaria era de 125 μmol/g (véase la Table 1).

La celulosa-epoxi primaria (15,3 g de materia húmeda) se hizo reaccionar con 15 ml de hexano-diamina (solución acuosa al 70 %) en 100 ml de metanol a 23 °C durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró mediante succión y se lavó una vez con 100 ml de metanol para dar 9,8 g de "aminocelulosa" húmeda. Se evaluó cuantitativamente la presencia de grupos amino primarios mediante su reacción con nichidrina.

A continuación se hizo reaccionar la aminocelulosa (9,6 g de materia húmeda) con 30 ml de epoclorohidrina en 100 ml de metanol a 23 °C durante 4 h. El producto de reacción ("celulosa-epoxi secundaria") se obtuvo mediante filtración con succión y lavado con agua fría (3x 100 ml). La carga del grupo epoxi del producto de celulosa-epoxi secundaria seca era de 108 μmol/g (véase la Tabla 1).

MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CARGA DE GRUPOS EPOXI

Una muestra del material que contenía grupos epoxi (aproximadamente 1 g de materia húmeda) se suspendió en 5 ml de agua. La suspensión se valoró volumétricamente con HCl 0,01 N hasta pH neutro en caso necesario. La suspensión neutra se trató con 5 ml de una solución acuosa de tiosulfato de sodio 1,3 M seguido por incubación durante 15 min con agitación ocasional. A continuación, la suspensión se valoró volumétricamente con HCl 0,01 N frente a azul de bromofenol. La cantidad total de grupos epoxi -presentes en la muestra es equivalente a la cantidad de HCl consumida en la valoración volumétrica. La carga de epoxi de la materia seca se calculó basándose en el contenido de agua conocido (LOD) de la materia húmeda. En la tabla 1 se resumen los valores experimentales representativos.

Ejemplo 2

Inmovilización de la ureasa

La celulosa-epoxi secundaria preparada en el Ejemplo 1 (12,5 g de materia húmeda) se suspendió en una solución enfriada de ureasa de Jack Bean (4,2 g) en 150 ml de tampón fosfato de potasio 1,0 M a pH 7,5. La reacción de inmovilización se llevó a cabo en una incubadora con agitador a 4 °C durante 24 h.

A continuación, la mezcla de reacción se filtró con succión y el residuo ("ureasa inmovilizada") se lavó 3 veces con agua ultrapura fría (3x 150 ml).

TRATAMIENTO POSTERIOR A LA INMOVILIZACIÓN DE LA UREASA INMOVILIZADA

La ureasa inmovilizada se sumergió en una solución acuosa de cisteína (5 mg/ml), ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, 1,0 mM) y glucosa (0,2 g/ml) durante 10 min, seguido por filtración con succión y liofilización durante 24 h.

Ejemplo comparativo

TABLAS

	Carga de epoxi después de la etapa D-1 (µmol/g)	Carga de epoxi después de la etapa D-3 (µmol/g)	Eupergit (µmol/g)
Valor de titulación	125	108	260
Valor comercial reivindicado	N.A.	N.A.	≥ 200

Sustrato	Celulosa activada con aminoenzimador	Celulosa activada sin aminoenzimador
Actividad del producto de la ureasa inmovilizada (U/g)	1100	<100

Sustrato	Eupergit® C	Celulosa activada
Actividad del producto de la ureasa inmovilizada (U/g)	689	1850

Aplicaciones

El método divulgado de preparar un sustrato es un medio económico y eficaz de producir un sustrato que puede inmovilizar sustancias funcionales sobre el mismo. Ventajosamente, el método asegura que el sustrato producido mediante el método permite que las sustancias funcionales, tales como enzimas, queden inmovilizadas de forma estable sobre el mismo. Más ventajosamente, puesto que las enzimas se unen de forma estable al sustrato, el sustrato puede reutilizarse de forma repetida durante largos periodos de tiempo sin perder sustancialmente su actividad enzimática.

Como el método divulgado puede trabajar también con materiales de partida de bajo coste, los costes de producción

globales pueden reducirse sustancialmente si se utiliza el método en una producción a gran escala de los sustratos. Además, el enlazador químico entre el sustrato tal como un soporte sólido y la sustancia funcional no es hidrolizable. Más ventajosamente, la inerticidad del enlazador atribuye también estabilidad a la sustancia funcional inmovilizada ya que se reduce la posibilidad de rotura del enlazador debido a reacciones químicas indeseables.

5 El método divulgado permite también al usuario variar la distancia entre los grupos de oxirano activos y el sustrato. Cuando los grupos de oxirano activos están a una distancia adecuada del sustrato, su reactividad hacia la inmovilización de las sustancias funcionales puede aumentar debido a un menor impedimento estérico. Además, el enlazador puede seleccionarse para asegurar una alta carga de grupos epóxido reactivos, lo que se traduce a la vez
10 en una alta carga de sustancias funcionales. Más ventajosamente, el enlazador puede seleccionarse también de tal manera que posea inherentemente determinadas propiedades químicas deseadas. Por ejemplo, cuando se seleccionan enlazadores de diamina, el sustrato final obtenido puede tener una propiedad inherente de tamponar el pH. Esto es especialmente útil en aplicaciones del tipo diálisis peritoneal donde la vida útil y la eficacia del sorbente pueden estar afectadas negativamente por un pH alto o bajo.

15 El método también permite una modificación posterior al montaje fácil de las membranas de diálisis listas para usar, tal como dializadores basados en acetato de celulosa con ureasa. La ureasa puede inmovilizarse tras el montaje, y puede también inmovilizarse en una cara de la membrana solo.

20 El sustrato obtenido del método divulgado permite también la inmovilización de la sustancia biológica del mismo que se va a llevar a cabo de una manera simple, sólida y fácil de usar. Por ejemplo, la inmovilización de una sustancia biológica puede llevarse a cabo fácilmente en el laboratorio. Esto es así, ya que la inmovilización de la sustancia biológica se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (por ejemplo, temperaturas de la sala) en soluciones acuosas/tampón sin requerir sustancias o reactivos químicos adicionales. Ventajosamente, la ausencia de sustancias
25 o reactivos químicos facilita significativamente la purificación del producto inmovilizado. La materia funcional inmovilizada obtenida del método divulgado puede ser también no tóxica, biodegradable y biocompatible. Ventajosamente, esto permite que el sustrato se utilice en aplicaciones médicas, tales como por ejemplo en aplicaciones de diálisis como sorbente para eliminar productos residuales no deseados procedentes del cuerpo humano. Además, estas propiedades permiten también que el producto se utilice en aplicaciones ambientales tales
30 como el tratamiento del agua, el tratamiento del suelo, o el tratamiento de los residuos.

Además, el método y el sustrato divulgados pueden también ser útiles en una cualquiera de las aplicaciones siguientes: cromatografía de afinidad, materiales en fase sólida para la cromatografía (quiral), impresión molecular, colorantes inmovilizantes, sensores, biosensores, filtros orgánicos para la absorción selectiva de toxinas, aplicaciones
35 farmacéuticas (revestimiento y unión), intercambiadores iónicos en fase sólida, secuestrantes de metales y antioxidantes en fase sólida.

REIVINDICACIONES

1. Un sustrato sólido que tiene compuestos dispuestos sobre el mismo, en donde se inmoviliza una molécula funcional sobre los compuestos, teniendo cada compuesto una cadena que comprende:

5 un resto R que está acoplado químicamente al sustrato, seleccionándose dicho resto R entre el grupo que consiste en éter, éster, carbonilo, éster de carbonato, tioéter, disulfuro, sulfinilo, sulfonilo, carbonotioílo, amina, amida, carbamida, ureas y guanidinas; en donde el término "acoplado químicamente" se refiere a enlazar covalentemente y abarca un enlace covalente indirecto y un enlace covalente directo; y
 10 un resto que contiene epóxido que está acoplado al resto R mediante un enlazador que comprende al menos un grupo nucleofílico seleccionado entre el grupo que consiste en una amina, un hidroxilo y un tiol; en donde el resto epóxido forma un enlace químico con dicha molécula funcional para inmovilizarla; y
 15 en donde la molécula funcional comprende una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasas, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa y proteinasa-K,
 en donde el sustrato es un sustrato a base de polisacárido seleccionado entre el grupo que consiste en celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.

20 2. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un grupo que contiene un epóxido adicional acoplado a la cadena.

3. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 2, en donde:

25 (a) el número de grupos que contienen epóxido adicionales se selecciona entre el número 1, 2, 3, 4 y 5, opcionalmente en donde dicho enlazador comprende grupos nucleofílicos adicionales en los que dichos grupos que contienen epóxido adicionales se acoplan a dicha cadena, opcionalmente en donde dichos grupos que contienen epóxido adicionales se ramifican a partir de la cadena mediante acoplamiento con los grupos nucleofílicos adicionales de dicho enlazador; y/o

30 (b) al menos uno de los grupos que contienen epóxido adicionales se acopla a dicha cadena mediante el grupo nucleofílico de dicho enlazador, opcionalmente en donde dicho enlazador comprende grupos nucleofílicos adicionales en los que dichos grupos que contienen epóxido adicionales se acoplan a dicha cadena, opcionalmente en donde dichos grupos que contienen epóxido adicionales se ramifican a partir de la cadena mediante acoplamiento con los grupos nucleofílicos adicionales de dicho enlazador.

35 4. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) el grupo nucleofílico de dicho enlazador es una amina; y/o

(b) el enlazador se selecciona del grupo que consiste en aminas, diaminas y triaminas alifáticas y aromáticas saturadas e insaturadas, opcionalmente en donde el grupo alifático de dichas aminas son grupos alquilo.

40

5. El sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(i) el enlazador contiene un grupo epóxido; y/o

45 (ii) el enlazador comprende al menos una especie dinucleofílica y una especie polinucleofílica, opcionalmente en donde:

(a) el enlazador se selecciona entre al menos una de una alquil-diamina y una alqueno-diamina; o

b) el enlazador se selecciona entre al menos una de etano-diamina, propano-diamina, butano-diamina, pentano-diamina, hexano-diamina; y/o

50

(iii) el compuesto que contiene epóxido se deriva mediante reacción de una epihalohidrina con los grupos nucleofílicos de dicho enlazador; y/o

55 (iv) el sustrato comprende además un revestimiento dispuesto sobre dicho sustrato, comprendiendo el revestimiento una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes seleccionados para estabilizar dicha molécula funcional, opcionalmente en donde los aditivos estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.

60 6. Un método para inmovilizar una molécula funcional sobre un sustrato sólido que tiene compuestos dispuestos sobre el mismo, que comprende la etapa de exponer dicha molécula funcional a dichos compuestos, en donde dicho compuesto es un compuesto que comprende un resto que contiene epóxido, y en donde dicha molécula funcional forma un enlace químico con el resto epóxido para inmovilizar dicha molécula funcional y producir dicho sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

65 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además la etapa de aplicar una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes a la superficie del sustrato en donde dichos aditivos se seleccionan para estabilizar dicha molécula funcional, opcionalmente en donde:

(a) la etapa de aplicar la mezcla sustancialmente homogénea de aditivos comprende evaporar un disolvente de una solución de dichos aditivos sobre el sustrato; y/o

5 (b) los aditivos estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.

8. Un método para preparar un sustrato sólido que comprende moléculas funcionales inmovilizadas sobre el mismo, comprendiendo el método las etapas de:

10 (i) proporcionar compuestos electrofílicos acoplados a la superficie del sustrato, en donde dicha etapa comprende acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato, en donde el término "acoplar químicamente" se refiere a enlazar covalentemente y abarca el enlace covalente indirecto y el enlace covalente directo;

(ii) dejar que los compuestos electrofílicos experimenten una reacción de sustitución nucleofílica para proporcionar un grupo nucleofílico a los mismos y de este modo aumentar la nucleofilia de la superficie del sustrato;

15 (iii) dejar que el grupo nucleofílico experimente una reacción de sustitución nucleofílica con otro compuesto electrofílico para proporcionar un grupo electrofílico sobre la superficie del sustrato y de este modo aumentar la electrofilia del sustrato; en donde el otro compuesto electrofílico es un compuesto que comprende un resto epóxido;

20 (iv) exponer las moléculas funcionales a dicho otro compuesto electrofílico, en donde dichas moléculas funcionales forman un enlace químico con dicho resto epóxido del otro compuesto electrofílico para inmovilizar dichas moléculas funcionales sobre el mismo, en donde las moléculas funcionales comprenden enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasas, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa y proteinasa-K, en donde el sustrato es un sustrato a base de polisacárido seleccionado entre el grupo que consiste en celulosa, quitosano, quitina, dextrano, agarosa y sus derivados.

25

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:

30 (a) las etapas (ii) y (iii) se repiten un número n de veces para formar n generaciones de grupos electrofílicos sobre dicho sustrato; y/o

(b) dicha etapa (ii) comprende la etapa de hacer reaccionar un nucleófilo con el primer compuesto electrofílico, opcionalmente, en donde la etapa (iii) comprende acoplar químicamente un segundo compuesto electrofílico al nucleófilo; y/o

35 (c) el primer compuesto electrofílico es un compuesto que contiene epóxido, opcionalmente en donde el compuesto que contiene epóxido es epihalohidrina.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el nucleófilo es un dinucleófilo, opcionalmente en donde el nucleófilo comprende una amina, más opcionalmente en donde la amina se selecciona del grupo que consiste en aminas y poliaminas alifáticas o

40 aromáticas saturadas e insaturadas, aún más opcionalmente donde el grupo alifático de dichas aminas y poliaminas se selecciona de un grupo alquilo, además opcionalmente en donde la poliamina se selecciona entre al menos una de etano-diamina, propano-diamina, butano-diamina, pentano-diamina, hexano-diamina.

45 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además la etapa de aplicar una mezcla sustancialmente homogénea de aditivos estabilizantes a la superficie del sustrato, seleccionándose dichos aditivos estabilizantes para estabilizar dicha molécula funcional, opcionalmente en donde:

50 (a) la etapa de aplicar la mezcla sustancialmente homogénea de aditivos comprende evaporar un disolvente de una solución de dichos aditivos sobre el sustrato; y/o

(b) los aditivos estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en un azúcar, un ácido orgánico, un aminoácido, un ácido sacárico y un tiol.

55 12. Un cartucho sorbente para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el cartucho sorbente un sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para inmovilizar la ureasa.

13. Un dializador para usar en un dispositivo de diálisis, comprendiendo el dializador un sustrato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para inmovilizar la ureasa.

60 14. Uso del sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un dispositivo de diálisis.

15. Un método para modificar una membrana de diálisis que comprende moléculas funcionales inmovilizadas sobre la misma, comprendiendo el método las etapas de:

65 (i) acoplar compuestos electrofílicos a la superficie de la membrana, en donde dicha etapa comprende acoplar químicamente un primer compuesto electrofílico al sustrato, en donde el término "acoplar químicamente" se refiere

a enlazar covalentemente y abarca el enlace covalente indirecto y el enlace covalente directo;

(ii) dejar que los compuestos electrofílicos experimenten una reacción de sustitución nucleofílica para proporcionar un grupo nucleofílico a los mismos y de este modo aumentar la nucleofilia de la superficie de la membrana;

5 (iii) dejar que el grupo nucleofílico experimente una reacción de sustitución nucleofílica con otro compuesto electrofílico para proporcionar un grupo electrofílico sobre la superficie de la membrana y de este modo aumentar la electrofilia de la superficie de la membrana para inmovilizar moléculas funcionales sobre la misma, en donde el otro compuesto electrofílico es un compuesto que comprende un resto epóxido; y

10 (iv) exponer las moléculas funcionales a dicho otro compuesto electrofílico, en donde dichas moléculas funcionales forman un enlace químico con dicho resto epóxido del otro compuesto electrofílico para inmovilizar dichas moléculas funcionales, en donde las moléculas funcionales comprenden enzimas seleccionadas entre el grupo que consiste en ureasa, uricasa, creatininasa, lipasas, esterasas, celulasas, amilasas, pectinasas, catalasas, acilasa, penicilina amidasa, y proteinasa-K, en donde dicha membrana es una membrana de acetato de celulosa.

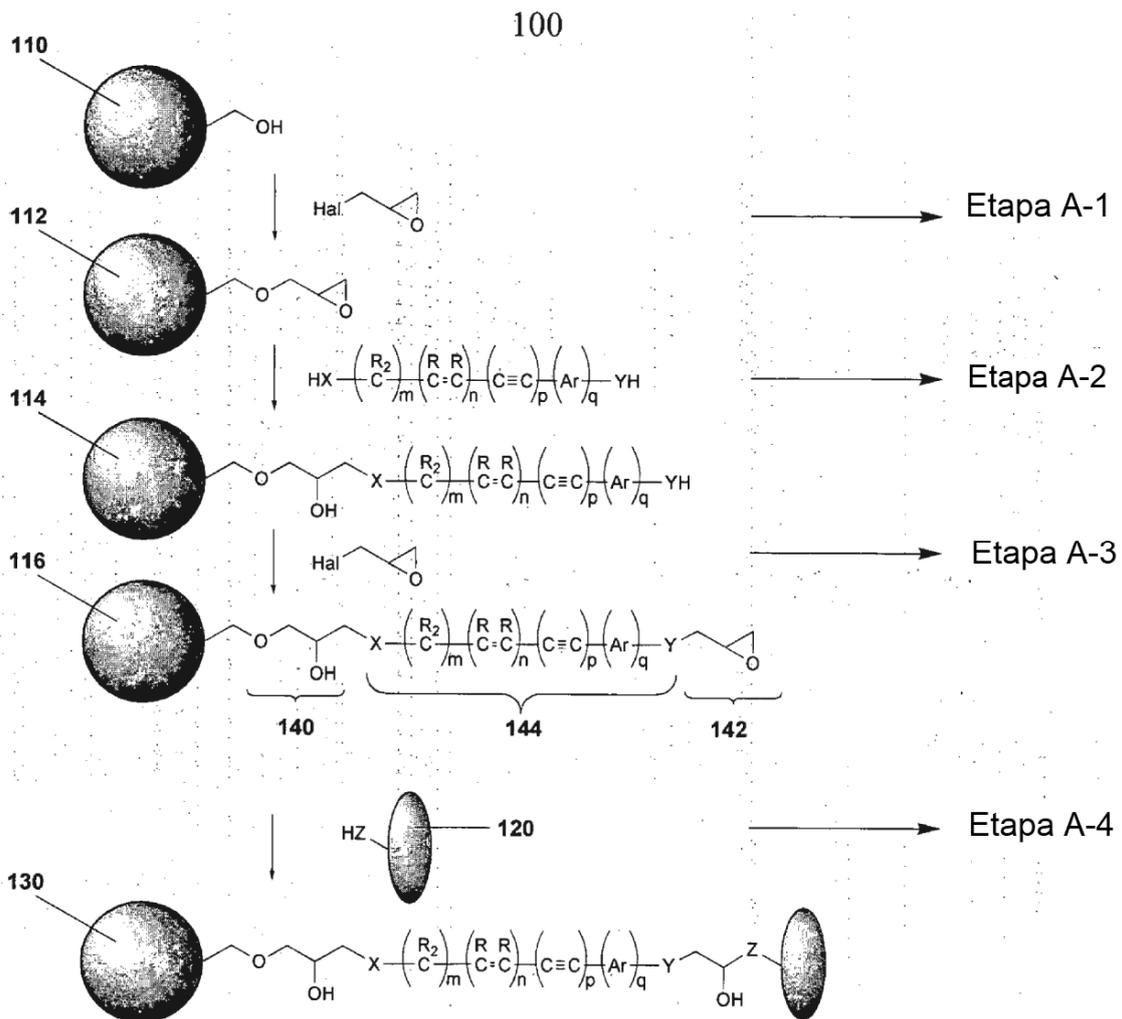


Fig. 1a

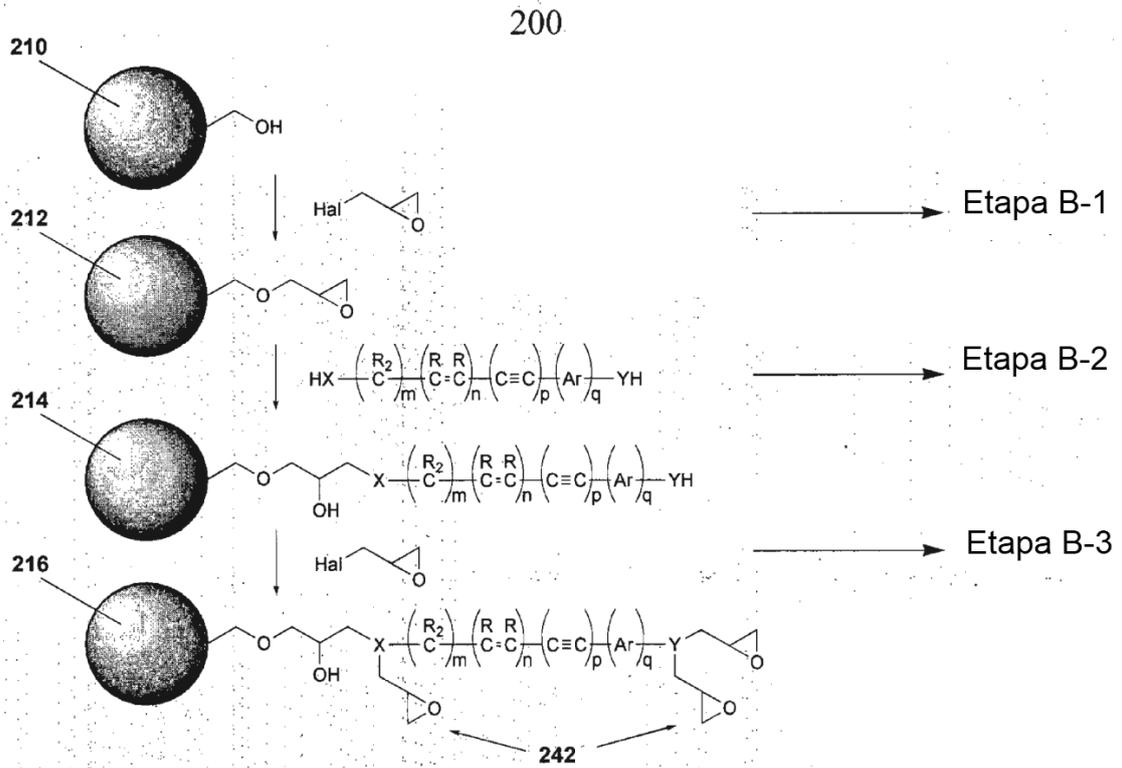


Fig. 1b

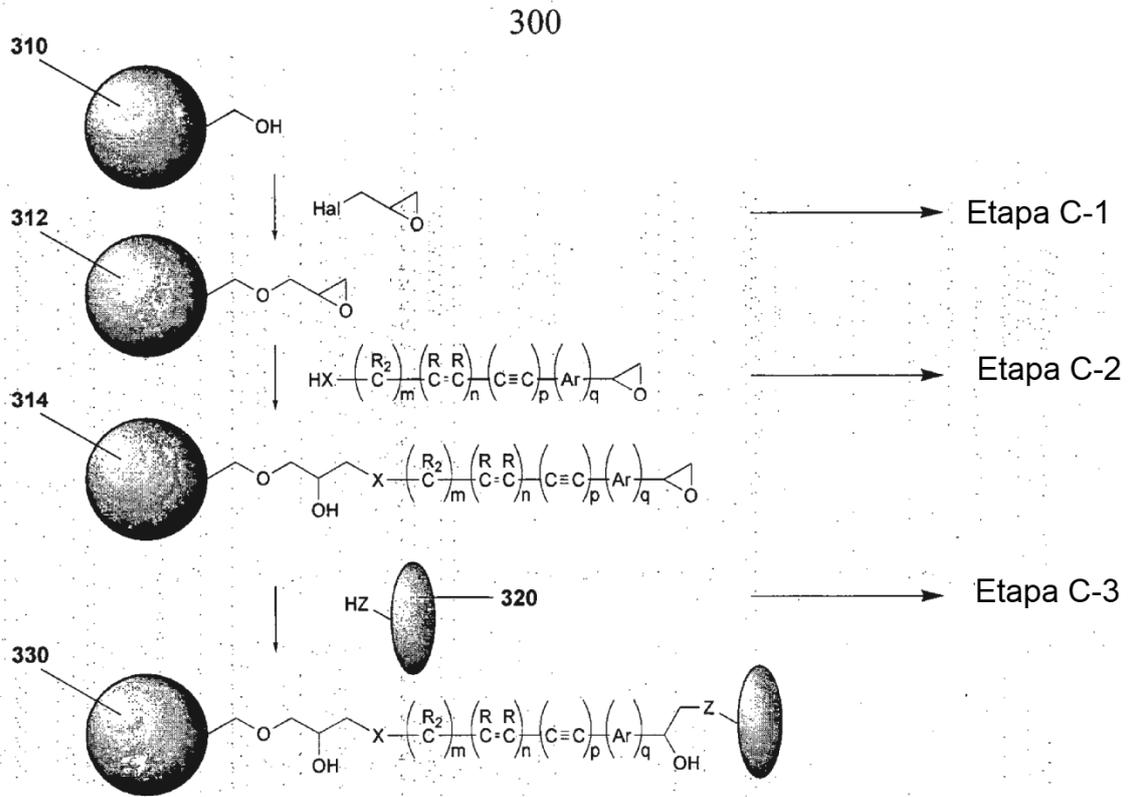


Fig. 2

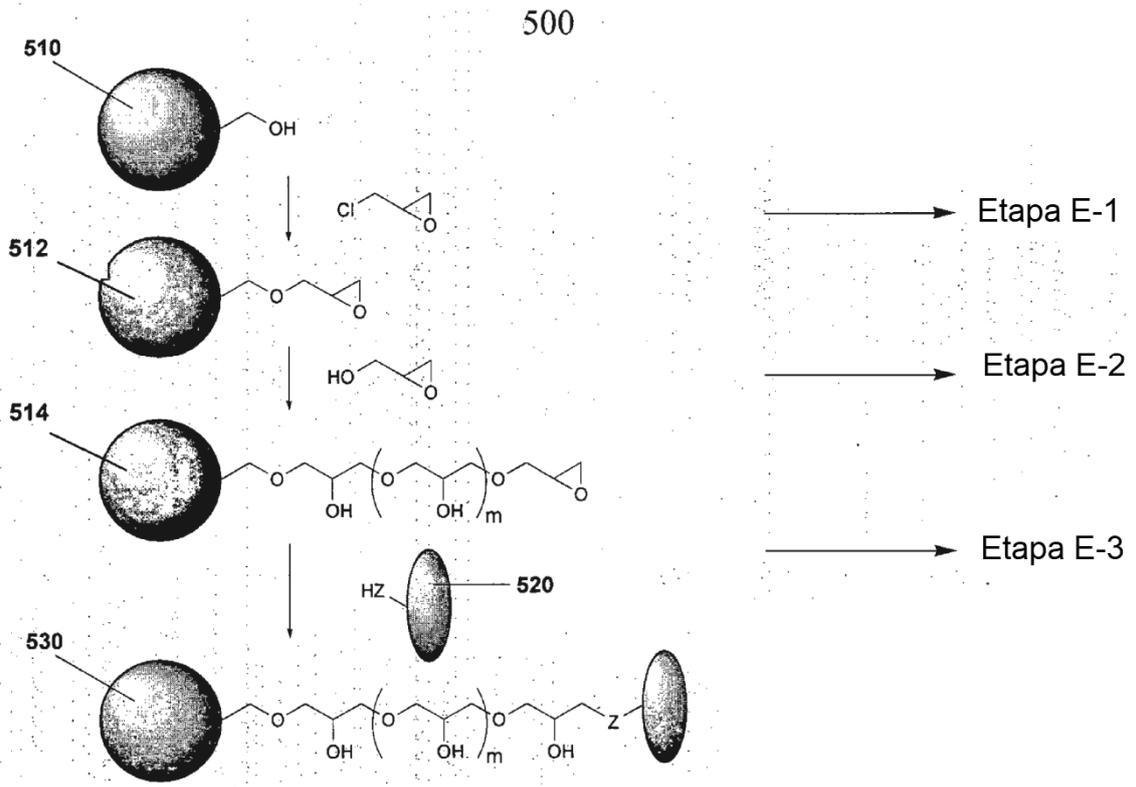


Fig. 4