



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑥1 Int. Cl.³: D 01 D 5/247
B 29 D 27/04
D 01 F 1/08
C 12 N 11/00



Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

636 381

⑯1 Numero della domanda: 15384/77

⑯3 Titolare/Titolari:
Anic S.p.A., Palermo (IT)

⑯2 Data di deposito: 14.12.1977

⑯2 Inventore/Inventori:
Francesco Di Gregorio, Monterotondo (IT)
Silvio Gulinelli, Monterotondo (IT)

⑯4 Vrevetto rilasciato il: 31.05.1983

⑯4 Mandatario:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑯4 Procedimento per la preparazione di fibre a struttura porosa, fibre porose così ottenute e loro uso.

⑯5 Per preparare fibre porose si parte da un polimero solubile o fusibile, si scioglie o fonde il polimero, si disperde omogeneamente nella massa disciolta oppure fusa un liquido immiscibile oppure un solido finemente suddiviso e quindi si procede alla filatura della miscela così ottenuta.

Allontanando la fase dispersa, liquida o solida che sia, restano spazi vuoti nel corpo della fibra.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di fibre a struttura porosa comprendente i seguenti stadi:
 - a) dissoluzione o fusione di un polimero
 - b) dispersione omogenea nella massa polimerica di un liquido immiscibile o di un solido insolubile finemente suddiviso
 - c) filatura della miscela ottenuta
 - d) allontanamento della fase dispersa.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il polimero di cui al punto a) è scelto fra cellulosa, suoi esteri, eteri o nitrati, poliammidi, poliesteri, poliesteriammidi, poliimmidi, polipeptidi, polimeri e copolimeri di acrilonitrile, metacrilonitrile, esteri acrilici e metacrilici, esteri ed eteri vinilici, polimeri di cloruro di vini-
le, cloruro di vinilidene, vinilbutirrale e stirolo.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la filatura di cui al punto c) viene effettuata secondo una tecnica scelta fra quelle ad umido, a secco o a fuso.
4. Fibre a struttura porosa ottenute mediante il procedimento secondo la rivendicazione 1.
5. L'uso di fibre a struttura porosa, preparate mediante il procedimento secondo la rivendicazione 1, come supporto per reattivi chimici.
6. L'uso secondo la rivendicazione 5, come supporto per proteine ed enzimi insolubilizzati.
7. L'uso secondo la rivendicazione 5, come supporto per inibitori selettivi di enzimi insolubilizzati.

La presente invenzione concerne un procedimento per la preparazione di fibre a struttura porosa ed il loro uso.

Tali fibre a struttura porosa presentano infatti un grande sviluppo superficiale utile, una buona stabilità dimensionale, buone proprietà meccaniche, una grande facilità di conservazione ed una grande versatilità d'uso.

Il procedimento per la preparazione di fibre a struttura porosa è caratterizzato nella rivendicazione 1 precedente; l'uso di dette fibre è indicato nella rivendicazione 5 precedente.

Secondo il procedimento come definito nella rivendicazione 1 dunque, un materiale polimerico naturale o sintetico viene sciolto in un solvente oppure portato a fusione, a seconda della natura del polimero. Alla massa omogenea si aggiunge un liquido non miscibile ed un solido insolubile finemente suddiviso (fase dispersa). La miscela viene omogeneizzata e quindi filata ad umido, oppure a secco oppure a fuso. Si ottengono così fibre che hanno la forma di fibre tessili, ma contenenti una fase dispersa liquida o solida che rende porosa la loro struttura. Successivamente la fase dispersa viene allontanata mediante lavaggio con opportuni solventi.

Le fibre porose così preparate, presentano uno sviluppo superficiale utile maggiore di quello delle fibre note fino ad ora.

Esse possono contenere gruppi funzionali di qualsiasi natura chimica, dipendenti dal polimero scelto per la loro fabbricazione, unica limitazione essendo la capacità del polimero di dare fibre. I gruppi funzionali presenti possono essere già idonei all'uso cui le fibre sono destinate, oppure essere trasformati, con successive reazioni chimiche, in gruppi reattivi opportuni.

Le proprietà meccaniche delle fibre preparate col procedimento definito nella rivendicazione 1 dipendono dal polimero prescelto e dalle particolari condizioni di filatura. Tali proprietà possono essere fatte variare entro larghi limi-

ti, essendo vasta la gamma di materiali polimerici utilmente impiegabili. Inoltre, per un dato materiale polimerico, anche le condizioni di ottenimento delle fibre porose possono essere fatte variare entro ampi limiti. Per cui, ad ogni condizione particolare, corrisponderanno una superficie utile e proprietà meccaniche particolari. Esse quindi saranno scelte in funzione dell'uso specifico cui sono destinate.

Queste fibre possono essere di notevole utilità in svariati campi applicativi, esclusi però quelli tessili. Esse, usate come supporto per reattivi chimici.

Esse possono essere usate come supporto per insolubilizzare catalizzatori solubili, specie se enzimi. In questo caso si ottengono catalizzatori insolubilizzanti che presentano elevate concentrazioni di attività con elevati rendimenti catalitici, anche su substrati ad alto peso molecolare.

Esempio 1

Preparazione di fibre a struttura porosa di triacetato di cellulosa

In un pallone di vetro di 1 l a due colli, munito di agitatore meccanico sono stati sciolti g 50 di triacetato di cellulosa (prodotto commerciale della Ditta Montefibre, Pallanza, Novara) in 664 g di cloruro di metilene. A questa soluzione sono stati aggiunti lentamente 200 g di glicerina ed il tutto è stato agitato ad 800 rpm per 15 minuti. La miscela omogeneizzata ottenuta è stata raffreddata a 0°C e versata in un contenitore munito di filiera da 500 fori per 125 micrometri di diametro. È stata quindi filata applicando una pressione di azoto di 1 atmosfera e raccogliendo il filo su rullo dopo coagulo in un bagno di toluolo a 20°C lungo circa 80 cm. La fibra ottenuta è stata essiccata in corrente di aria secca a temperatura ambiente per due ore e conservata in recipiente chiuso. Essa aveva la seguente composizione in peso:

Triacetato di cellulosa 18%, glicerina 70% e rimanente 12% solventi della filatura. Il rapporto tra glicerina e polimero nella fibra era quindi $70/18 = 3,86$, mentre nella miscela di filatura era di 4,00. In pratica quasi tutta la glicerina inizialmente presente è rimasta intrappolata nella matrice polimerica coagulata, rendendone porosa la struttura.

La fibra può essere liberata dalla glicerina per semplice lavaggio con acqua. Essa dopo essere stata liberata completamente dai solventi di filatura e dalla glicerina ha una densità apparente di $0,253 \pm 0,005$ g per ml, misurata secondo la tecnica descritta nell'esempio n. 8.

Esempio 2

Preparazione di fibre a struttura porosa di poli-L-γ-metilglutammato

In un pallone da 1 l a due colli munito di agitatore meccanico sono stati versati 290 g di PLG-30 (prodotto Kyowa-Hakko Kogyo Co. Ltd. Tokyo-Japan), soluzione al 10% in peso/volume di poli-L-γ-metilglutammato con peso molecolare da 100 000 a 300 000 in 1,2 dicloroetano simmetrico. Sotto agitazione lentamente sono stati aggiunti prima 145 g di 1,2-dicloroetano simmetrico e poi 58 g di una soluzione al 50% in peso di acqua e glicerina. In definitiva la miscela contiene:

g 23 di poli-L-γ-metilglutammato
65 g 412 di 1,2-dicloroetano simmetrico
g 28 di acqua
g 23 di glicerina

Questa miscela è stata raffreddata a 0°C ed emulsionata applicando un'agitatore di 800 rpm per 30 minuti. È stata poi versata in un contenitore, raffreddata a -6°C e munita di filiera da 48 fori per 80 micrometri. La miscela è stata quindi filata applicando una pressione di azoto di 0,8 atmosfere e raccogliendo il filo su rullo dopo coagulo in bagno di etere di petrolio 40-70°C, raffreddato a -3°C.

Il filo ottenuto, dopo essiccare in corrente di aria a temperatura ambiente per 1 ora è stato conservato in recipiente chiuso. Esso aveva la seguente composizione in peso: poli-L- γ -metilglutammato 25,5%, H₂O 26,0%, glicerina 26,0%, solventi di filatura 22,5%.

Il rapporto tra la fase dispersa (acqua e glicerina) e polimero nella fibra era quindi di

$$\frac{26 + 26}{25,5} = 2,04,$$

mentre nella miscela di filatura era di 56/23 = 2,43.

Esempio 3

Preparazione di fibra a struttura porosa di cloruro di polivinile

In un pallone di vetro da 1 litro a 2 colli, munito di agitatore meccanico sono stati versati g 47,5 di Solvik-523K (prodotto Solvik, Via Filippo Turati 8, Milano), copolimero di cloruro di vinile e acetato di vinile contenente il 12% in peso di acetato, e 452,5 g di cloruro di metilene. La miscela è stata agitata fino a dissoluzione completa del copolimero, quindi sono stati aggiunti lentamente e sotto agitazione g 95 di glicerina. La miscela è stata raffreddata a 10°C ed emulsionata applicando una agitazione di 800 rpm per 15 minuti.

La massa ottenuta è stata versata in un contenitore termostato a 10°C e munito di filiera da 100 fori per 80 micrometri. È stata quindi eseguita la filatura applicando una pressione di 0,6 atmosfere e raccogliendo il filo su rullo dopo coagulo in bagno di n-esano a 20°C.

La fibra ottenuta, dopo essiccare in corrente di aria secca per due ore, è stata conservata in recipiente chiuso. Essa aveva la seguente composizione in peso: copolimero Solvik-523K = 29,5%, glicerina = 57,9%, solventi di filatura 12,6%.

Anche in questo caso ogni g di matrice polimerica coagulata ha trattenuto 1,96 g di glicerina dispersa in vacuoli che rendono porosa la struttura.

Esempio 4

Uso di fibre a struttura porosa di triacetato di cellulosa come supporto per l'ancoraggio chimico di proteine

Sono stati presi in esame i tre tipi seguenti di fibre:

A) fibra a struttura porosa, ottenuta filando, con la stessa tecnica descritta nell'esempio 1, 50 g di triacetato di cellulosa in 664 g di cloruro di metilene e 200 g di glicerina come fase dispersa, da 500 bave e titolo 3,7 denari della singola bava.

B) fibra a struttura porosa, ottenuta nelle medesime condizioni di A, ma con 100 g di glicerina come fase dispersa, da 500 bave e titolo 3,7 denari della singola bava.

C) fibra a struttura non porosa, ottenuta nelle medesime condizioni di A e B ma senza fase dispersa, da 500 bave e titolo 3,9 denari della singola bava.

Il titolo sopracitato è il valore medio ottenuto su 10 determinazioni così eseguite: un campione da 500 bave lungo 100 cm è stato sottoposto a 5 lavaggi consecutivi con

acqua distillata, usando in ogni lavaggio 50 cc di acqua e 10 minuti di tempo di contatto sotto agitazione a temperatura ambiente. Il campione lavato, seccato in stufa a 70°C e 0,1 mm di Hg di pressione per 8 ore è stato quindi pesato. Dal peso secco ottenuto è stato calcolato il titolo della singola bava applicando la formula

$$\text{peso secco in g} \times 9000$$

500

Per ogni tipo di fibra è stato prelevato un campione tale da contenere la stessa quantità di 1,78 g di triacetato di cellulosa e precisamente g 9,89 di fibra A, g 5,78 di fibra B, e g 1,85 di fibra C. Ogni campione è stato introdotto in beuta da 300 cc e lavato 5 volte con 200 cc per volta di acqua distillata, quindi trattato per 4 ore sotto blanda agitazione a temperatura ambiente con 200 cc di soluzione acquosa di soda 0,5 M.

Questo trattamento trasforma il polimero originario in cellulosa ed è tale da conservare almeno in parte la struttura preesistente della fibra, come è dimostrato dai risultati che seguono. Ogni campione dopo idrolisi con soda è stato quindi lavato con acqua fino a pH neutro e trattato a temperatura ambiente sotto blanda agitazione per 20 ore con 165 cc di soluzione acquosa di tampone fosfato 0,05 M, pH = 8,0 contenente g 0,285 di benzochinone (questo trattamento attiva la fibra e la rende atta a legare chimicamente la proteina secondo il metodo descritto nel brevetto svizzero n. 676 402 del 5 aprile 1976 a nome della stessa richiedente).

Dopo questo trattamento ogni campione è stato lavato alternativamente con acqua e con tampone fosfato 0,05 M a pH 8,0 fino a quando le acque di lavaggio non risultano contenere sostanze assorbenti a 250 manometri e quindi sottoposto alla reazione di insolubilizzazione della tripsina; ogni campione è stato messo in contatto con 47 ml di tampone fosfato 0,05 M pH 8,0 raffreddato a 2°C, contenente 47 mg di tripsina con attività specifica di 30 unità BAEE per mg (una unità enzimatica BAEE è la quantità di enzima che idrolizza 1 micromole per minuto di N α -Benzoyl-L-Argininmetilester, a pH 8,0 e 25°C). La reazione è stata condotta per 24 ore sotto blanda agitazione a 2°C. Dopo la reazione i tre campioni sono stati lavati alternativamente con acqua e con tampone fosfato 0,05 M pH 8,0 fino a quando nelle acque di lavaggio non c'era più attività enzimatica dosabile.

Alla fine della reazione di insolubilizzazione della proteina è stata dosata l'attività enzimatica residua nella soluzione di reazione. Essa era rispettivamente:

50 Soluzione in contatto col campione A - 7,9 unità BAEE/ml
Soluzione in contatto col campione B - 13,1 unità BAEE/ml
Soluzione in contatto col campione C - 25,2 unità BAEE/ml

55 Mentre dosando l'attività enzimatica rimasta legata alle fibre sono stati ottenuti i dati seguenti:
Fibra A - 650 unità BAEE per grammo di prodotto secco
Fibra B - 450 unità BAEE per grammo di prodotto secco
Fibra C - 80 unità BAEE per grammo di prodotto secco

Esempio 5

Uso di fibre a struttura porosa di triacetato di cellulosa come supporto per l'ancoraggio chimico di proteine

4,94 g di fibra A dell'esempio precedente, sono stati lavati con acqua, poi idrolizzati con 100 cc di NaOH 0,5 M,

indi sottoposti alla reazione di attivazione con benzochinone con 83 cc di tampone fosfato 0,05 M a pH = 8,0 contenenti g 0,142 di benzochinone e quindi lavati.

Le modalità di queste operazioni sono identiche a quelle usate nell'esempio precedente. Il prodotto ottenuto è stato fatto reagire con l'enzima penicillina-acilasi nelle seguenti condizioni: il campione è stato messo in contatto e tenuto sotto blanda agitazione per 24 ore a temperatura ambiente con 25 ml di tampone fosfato 0,04 M a pH = 7,6 contenente 38 unità per ml di penicillina-acilasi da Escherichia Coli (ATCC-9637) con attività specifica di 5 unità per mg di proteina. (Una unità enzimatica è la quantità di enzima che trasforma 1 micromole per minuto di penicillina G in acido 6-ammino penicillanico ed acido fenilacetico nelle seguenti condizioni: temperatura = 37°C, pH = 8,0,

tampone fosfato 0,01 M e penicillina G = 2% peso-volume,

volume totale 200 ml e da 15 a 30 unità enzimatiche totali presenti. In queste condizioni la misura della velocità iniziale della reazione enzimatica espressa in micromole per minuto coincide con le unità enzimatiche stesse).

Infine il campione lavato, per allontanare l'enzima non reagito, con le stesse modalità descritte nell'esempio precedente è stato sottoposto alla determinazione dell'attività enzimatica rimasta legata sulla fibra.

Essa esplicava un'attività di 444 micromoli per minuto e per g di prodotto secco.

Esempio 6

Uso di fibre a struttura porosa di poli-L-γ-metil glutammato come supporto per l'ancoraggio chimico di proteine

3,92 g di fibra di poli-L-γ-metilglutammato, la cui preparazione è stata descritta nell'esempio 2, sono stati lavati con 50 cc di acqua distillata per 4 volte per allontanare la glicerina, quindi 5 volte con 50 cc per volta di metanolo assoluto per allontanare acqua ed infine sospesi in 50 cc di metanolo assoluto contenenti 2,0 millimoli di idrazina idrata. Il tutto è stato tenuto sotto blanda agitazione e temperatura ambiente. La reazione è stata eseguita titolando la scomparsa di idrazina della soluzione di reazione. Dopo che 0,98 millimoli di idrazina erano scomparse dalla soluzione, la reazione è stata interrotta filtrando la soluzione metanolica e lavando 3 volte con 50 cc di metanolo il supporto fibroso. Questo è stato quindi lavato con acqua fredda (1°C - 2°C) e quindi immerso in 100 cc di acido cloridrico acquoso 0,5 M raffreddato in bagno di ghiaccio. A questa miscela, tenuta sotto agitazione, è stato aggiunto in piccole porzioni in circa 15 minuti 1 g di nitrito sodico. Dopo l'aggiunta il tutto è stato lasciato sotto agitazione e freddo per 1 ora e successivamente il supporto fibroso è stato lavato con acido cloridrico acquoso freddo 0,01 M.

Infine la fibra è stata immersa in 100 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 8,5 contenente 100 mg di tripsina con attività specifica di 30 unità BAEE per mg. Il tutto è stato lasciato sotto agitazione per una notte a 0°C. Il supporto fibroso, lavato con acqua fino a scomparsa di attività enzimatica nelle acque di lavaggio, sottoposto al saggio dell'attività enzimatica legata esplicava una attività enzimatica di 350 unità BAEE per g di prodotto secco.

Esempio 7

Uso di fibre a struttura porosa di cloruro di polivinile come supporto per l'ancoraggio chimico di proteine

3,39 g di fibra, la cui preparazione è stata descritta nell'esempio 3, sono stati lavati 4 volte con 50 cc per volta

di acqua e poi 5 volte con 50 cc per volta di metanolo assoluto, infine sono stati immersi in 100 cc di metanolo assoluto contenenti 1 cc di acido solforico concentrato e bolliti a ricadere per 6 ore. Quindi sono stati filtrati e lavati due volte con 50 cc di metanolo e 4 volte con 50 cc di toluolo. La fibra così trattata è stata immersa in una soluzione di 5 g di fosgene in 100 cc di toluolo a temperatura ambiente e tenuta in agitazione per una notte, quindi liberata dall'eccesso di fosgene mediante lavaggi (5 da 50 cc) con toluolo ed infine essiccata a temperatura ambiente in corrente di azoto secco. La fibra è stata quindi immersa in 100 ml di tampone fosfato 0,1 M a pH 7,5, raffreddato a 0°C, e contenente 100 mg di tripsina con attività specifica di 30 unità BAEE per mg. Il tutto è stato tenuto in agitazione a freddo per 20 ore. Alla fine l'enzima non reagito è stato allontanato mediante lavaggi con acqua fino a scomparsa di attività enzimatica nelle acque.

Il materiale fibroso così ottenuto esplicava una attività enzimatica di 250 unità BAEE per g di prodotto secco.

20

Esempio 8

Uso di fibre a struttura porosa di triacetato di cellulosa come setaccio molecolare

25

137 g di fibra di triacetato di cellulosa, la cui preparazione è stata descritta nell'esempio 1, contenente 24,6 g di polimero, sono stati tagliati in pezzetti da 0,3-0,6 cm di lunghezza ed impaccati in una colonna da 2,5 cm di diametro fino ad una altezza di 34,7 cm in modo da occupare un volume totale di 170 ml di letto. La fibra così impacciata è stata liberata dalle bolle di aria e contemporaneamente lavata eluendola con circa 5 l di acqua degassata sotto vuoto. La colonna così ottenuta ha mostrato possedere proprietà di setaccio molecolare. Infatti sottoposta a misurare di gel-filtrazione, usando come eluente una soluzione acquosa di KCl a 13,3 g/l, ha dato per il Blue destrano 2000 (prodotto Pharmacia-Fine Chemicals AB - Upsala - Svezia) di peso molecolare due milioni in volume di eluizione di 73 ml. Tale valore era costante nell'intervallo di flusso da 5 ml/ora a 50 ml/ora. Mentre il volume di eluizione del bicromato potassico di peso molecolare 294 era variabile tra 128 ml a 7,5 ml/ora e 118 ml a 45 ml/ora. Questi dati dimostrano la proprietà di setaccio molecolare della fibra ed al tempo stesso forniscono un metodo per la misura della sua densità apparente:

170 ml (volume totale del letto) - 73 ml (volume vuoto della colonna) = 97 ml. Quindi 24,6 g di polimero occupavano 97 ml di volume, per cui si ha 24,6 : 97 : 0,253 g/ml.

Tutta la fibra della colonna è stata quindi trasformata in cellulosa, mediante trattamento con soda acquosa 0,5 M a temperatura ambiente per otto ore, impacciata nella stessa colonna e risottoposta alle stesse misure di gel-filtrazione.

55 I risultati sono:

volume totale del letto = 100 ml

volume di eluizione del Blue-Destrano 2000 = 38 ml

volume di eluizione del bicromato potassico = 92 ml

60 (In questo caso il volume di eluizione del bicromato potassico è risultato anch'esso costante nello stesso intervallo di flusso).

Infine è stato determinato il peso secco della fibra, secandola a 80°C sotto vuoto. Esso era di 14,1 g. Per cui la densità apparente della fibra di cellulosa così ottenuta è risultata essere:

14,1 : (100 - 38) = 0,227 g/ml.