

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

250534
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 H 15/02

(22) Přihlášeno 30 09 85

(21) {PV 6968-85}

(40) Zveřejněno 18 09 86

(45) Vydáno 15 07 88

(75)
Autor vynálezu

ŠMÍD FRANTIŠEK RNDr., BRADOVÁ VLASTA PhMr.,
MIKEŠ OTAKAR ing. dr. DrSc., SEDLÁČKOVÁ JANA, PRAHA

(54) Způsob separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií

1

2

Způsob separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií.

Rychlá separace gangliosidových frakcí na organických hydrofilních makroporéz-ních měničích aniontů glykol-methakryláto-vého typu otevírá možnosti účelné přípra-vy těchto biopreparátů z homogenátů živo-čišných tkání (zejména z mozku) v labora-torním i větším výrobním měřítku. Vynález popisuje chromatografii na středně bazic-kých hydrofilních anexech, které tak citli-vé a složité látky, jakými gangliosidy jsou, nepoškozují vedlejšími reakcemi. Mozkové gangliosidy se chromatografují podle ob-sahu kyseliny sialové v molekule na die-thylaminoethylovém rigidním glykolmetha-krylátovém makroporézním hybridním ane-xu lineárním gradientem: methanol — 0,2 M octan amonný, draselný nebo sodný v me-thanolu za tlaku 0,1 až 2,0 MPa za labora-torní teploty při specifickém průtoku do 10 ml/cm². min.

Vynález se týká způsobu separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií.

Gangliosidy jsou kyselé glykosfingolipidy. Jejich molekula obsahuje vždy hydrofobní část — ceramid tvořený vyšším alifatickým aminoalkoholem — sfingosinem a vyšší mastnou kyselinou a hydrofilní část — oligosacharid obsahující různý počet hexos a aminohexos a jednu nebo několik molekul kyseliny sialové [N-acetylneuraminové, eventuálně N-glykolyneuraminové aj.).

V živočišných tkáních nejsou přítomny ve vysoké koncentraci. V největším množství jsou přítomny v mozkové tkáni, a to zejména v šedé hmotě mozkové. Chemicky čisté gangliosidy se uplatňují jako biopreparáty.

Starší postupy izolace gangliosidů vytěpáváním neumožňovaly dostatečné čištění a absorpční chromatografie, nevedla — vzhledem k rozmanitosti jednotlivých látek — k izolaci chemických individuí. Použitím novějších adsorbentů pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii (HPLC) se sice podařilo rozlišení hlavních běžných gangliosidů, ale pro možnost izolace i minoritních komponent je obecně užívána kombinace ionexové a adsorpční chromatografie.

Různý obsah kyseliny sialové v mono-, di-, tri-, tetra-, event. pentasialogangliosidech byl základem pro jejich postupnou izolaci z kolony diethylaminoethyl-anexů (DEAE) elucí vzestupnou koncentrací acetátových iontů v methanolu. K tomuto účelu bylo rovněž použito diethylaminoethylderivátu s matricí celulózovou, polysacharidovou a silikagelovou (dále jen DEAE silikagel).

Mono-, di-, a trisialogangliosidy byly dále děleny adsorpční chromatografií na totálně porézním silikagelu a podařila se izolace jednotlivých gangliosidů ve velké čistotě.

Všechny uvedené nosiče byly však použity pro klasickou nízkotlakou chromatografii. Separace na nich trvala řadu hodin až dní.

Předmětem vynálezu je způsob separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií, jehož podstatou je, že gangliosidy mozkové se chromatografují, podle obsahu kyseliny sialové v molekule na diethylaminoethylovém rigidním glykolmethakrylátovém makroporézním hybridním anexu lineárním gradientem: methanol — 0,2 M octan amonný, draselný nebo sodný v methanolu za tlaku 0,1 až 2,0 MPa za laboratorní teploty při specifickém průtoku do 10 ml/cm² · min.

Vynález řeší výrobu gangliosidových frakcí, charakterizovaných obsahem jedné nebo několika skupin sialové kyseliny, extrahovaných ze zvířecí mozkové tkáně rychlou ionexovou chromatografií na středně basic-kém tvrdém hydrofilním makroporézním glykolmethakrylátovém měničů aniontů v

prostředí methanolu lineární gradientovou elucí vhodným pufrem s využitím kontroly průběhu chromatografie měřením elektrické vodivosti eluentu.

Ve srovnání s předchozími známými postupy postup podle vynálezu dovoluje provést sorpci a separaci gangliosidů během 30 minut a otevírá perspektivy pro ještě rychlejší dělení. Využívá diethylaminoethylovaného derivátu jemnozrného makroporézního rigidního čistě organického kopolymery glykolmethakrylátového typu, dále jen Spheron — DEAE nebo DEAE — Separon HEMA [Mikeš O. a kol. J. Chromatogr., 180 [1979] 17, A. O. 187 563 a A. O. 189 539].

Tento středně basic-ký anex obsahuje hybridní (hydrofobně/hydrofilní) matrici s dostatečně velkými póry, dovolujícími penetraci látek o molekulové hmotnosti až 1 000 000 daltonů, takže gangliosidy mohou dobře pronikat k funkčním skupinám ionexu. Matrice je přitom dostatečně tvrdá, takže dobře snáší tlaky několika desítek až sto atmosfér. Tato matrice není silně hydrofobní, jako je tomu např. u styren-divinylbenzenových anexů, které by interagovaly s hydrofobními gangliosidy, je však daleko pevnější než měkké hydrofilní anexy celulózového, polydextranového nebo agarózového typu, které se dosud k separaci gangliosidů užívaly, avšak které nedovolují rychlý průtok, poněvadž nelze použít velký tlak. Námi použitý glykolmethakrylátový anex má podstatně větší kapacitu než DEAE — silikagel [Kundu S. K. a kol., J. Chromatogr., 170 [1979] 65], který je sice také tvrdý, avšak otázka dostatečné kapacity je velmi významná pro výrobní účely. Anexy s polysacharidovou matricí [Momi T. a spol., Biochim. Biophys. Acta, 441 [1976] 488, Ledeen R. W. a Yu R. K., Methods Enzymol., 83 [1982] 139, Iwamori M. a Nagai Y., Biochim. Biophys. Acta, 528 [1978] 252] nebo s polysacharidovým povlakem [Fredman P. a spol., Biochim. Biophys. Acta, 618 [1980] 42] mají sice vyšší vazebné kapacity než DEAE — Silikagel, avšak anexy glykolmethakrylátového typu podle vynálezu jsou na rozdíl od nich naprosto neštěpitelné žádnými enzymy v přírodě se vyskytujícími a proto dobře odolávají mikrobiální infekci, což je rovněž z provozního hlediska důležité. Pro tyto ionexy je také typická velká chemická odolnost.

Glykolmethakrylátové matrice dovolují např. rychlou důkladnou regeneraci 2M HCl a 2M NaOH i při opakovaném používání.

Další výhodou je, že se ionex snadno regeneruje a ekvilibruje přímo na koloně, takže není nutné jeho vyjímání z kolony a opětné plnění před další chromatografií. V podstatě se pouze přepínají roztoky přiváděné na kolonu: 1) vzorek, 2) methanol k ekvibraci, 3) eluční roztoky připravované v gradientovém mísiči, 4) 2M octan amonný k běžné regeneraci a 5) methanol k ekvibraci.

Takové přepínání lze snadno zmechanizovat či programovaně automatizovat, což je další předpoklad k účelné moderní výrobě. Použití lineárních gradientů místo v tomto oboru běžně užívaných konkávních velmi usnadňuje nejen instrumentaci celého zařízení, ale i vyhodnocování separací. Dosud nepoužívané zavedení kontroly chromatografie gangliosidů měřením elektrické vodivosti přiváděných methanolicých roztoků a vyteklých frakcí, které je velmi snadné, umožňuje výbornou kontrolu celého kolonového procesu bez nutnosti speciálního detektoru. To vše jsou přednosti námi popisovaného způsobu frakcionace gangliosidového extraktu, které jsou významné z hlediska výroby těchto látek.

Velmi významné je snížení doby separace o 1 až 2 řády ve srovnání s dříve publikovanými metodami, což je z hlediska provozní ekonomiky velmi důležité.

Způsobem podle vynálezu lze dosáhnout frakcionace gangliosidů pouze ionexovou chromatografií podle počtu kyseliny sialové v molekule na mono-, di-, tri-, tetra-, pentasialogangliosidy.

Je známo, že pro potřeby vysokotlaké chromatografie gangliosidů je použit silně basický organický ionex Mono Q (Pharmacia, Uppsala) s pomocí stupňovitého gradientu octanu draselného v rozsahu koncentrací 0–0,225 M v methanolu a za průtoku 2 ml/min. [Mansson J. E., Rosengren B. a Svennerholm L., J. Chromatogr., 322 (1985) 465–472.].

Popsaný způsob splňuje požadavky na rychlost dělení s použitím středních tlaků i na zatížení. Nevýhodou však je, že dosažené dělení gangliosidů se neřídilo vždy množstvím vázané sialové kyseliny, nýbrž značná část gangliosidu CQ1b byla eluována spolu s monosialogangliosidy a větší množství trisialogangliosidu GT1b a malé množství disialogangliosidů bylo evulováno s tetrasialogangliosidy.

Silně basická kvartérní amoniová skupina anexu Mono Q katalyzuje laktonizaci GQ1b na koloně a vyvolává peruchy chromatografické separace na základě sialové kyseliny. Námi použitý DEAE-Spheron DEAE-Separon HEMA je slabě až středně basický anex, a proto jeho funkční skupina nekatalyzuje destrukční reakce a při chromatografii nevznikají artefakty.

Dále jsou uvedeny příklady provedení způsobu separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií podle vynálezu.

Příklad 1

Byly připraveny gangliosidy k separaci, označeno dále jako vzorek I. [Suzuki, J. Neurochem., 12 (1965) 629–638.]

Anex Spheron DEAE 1000, zrnění 25–40 μm kapacita 1,6 mequiv/g byl vpraven ve formě suspenze v methanolu do kolony o průměru 0,9 cm až vytvořil sloupec vysoký

21 cm. Pak byl v koloně promýván 2 M roztokem octanu amonného v methanolu (60 mililitrů) a ten byl pak vymýván čistým methanolem (200 ml). Poté bylo 47,3 mg gangliosidů (vzorek I) rozmícháno v 1 ml směsi methanol – voda 1 : 1 na suspenzi, která byla vpravena na vrchol anexové kolony. Kolona byla promývána 5 ml methanolu a pak stoupající koncentrací octanu amonného. Byly použity dva lineární gradienty, první od 0 do 0,15 M octanu amonného v methanolu (celkem 83 ml), druhý strmější od 0,15 do 1 M octanu amonného v methanolu (celkem 70 ml). Kolona byla pak regenerována promytím 60 ml 1 M octanu amonného v methanolu a ekvilibrována 200 mililitry methanolu.

Použitý hydrostatický přetlak odpovídal rozdílu hladiny reservoáru a výtoku 1,8 m. Frakce 1 ml byly brány v intervalech 5 minut a byly vyhodnocovány tenkovrstvou chromatografií. Podle výsledků analýz monosialogangliosidy byly obsaženy ve frakcích 33–42; disialo- ve frakcích 44–55; trisialo- ve frakcích 56–64 a tetra- ve frakcích 65–70.

Podle odhadu z kolorimetrického vyhodnocení bylo sice ve spojených frakcích získáno 67 % vázané kyseliny sialové ve srovnání s naneseným vzorkem, avšak pouze oddělení monosialogangliosidů bylo úplné, mezi di-, tri-, tetra-deriváty docházelo k částečnému překrývání v úpatí píků.

Příklad 2

Gangliosidy (vzorek I) byly připraveny podle příkladu 1.

Použitý anex byl Spheron DEAE 1000, zrnění 17 μm , kapacita 1,6 mequiv/1 g. Anex v OH^- cyklu byl vpraven do kolony ve formě kaše v methanolu a upěchován pulsní metodou [Mikeš O., v Comprehensive Biochemistry, Vol. 8, Separation Methods, Z. Deil (Editor): Elsevier, Amsterdam 1984, s. 242]. Pak byly na vrchol kolony naneseny podvrstvením gangliosidy (vzorek I) v množství 15 mg, suspendované ve směsi 40 μl vody a 300 μl methanolu. Po krátké isokratické eluci methanolem (20 ml) byla na kolonu přivedena soustava čtyř lineárních gradientů (všechny roztoky jsou methanolicke):

I) 30 ml MeOH + 30 ml 0,1 M octan amonný,

II) 10 ml 0,1 M + 10 ml 0,5 M,

III) 10 ml 0,5 M + 10 ml 1 M,

IV) 10 ml 1 M + 10 ml 2 M octanu amonného.

Eluční roztoky byly na kolonu čerpány proporcionálním programovým mikročerpádem 68 005 (Vývojové dílny ČSAV) s reverzně pracujícími písty, nastavenými na hodnotu 50%, čímž bylo docíleno minimální pulsace. Pracovní teplota byla 27 °C.

Frakce o velikosti 1,6 ml byly brány v intervalech 3 minuty. Gangliosidové frakce byly velmi dobře odděleny podle výsledků tenkovrstvé chromatografie (metoda je uvedena v textu k obrázku č. 1). Monosialogangliosidy se nalézaly ve frakcích 33–38, Di- ve frakcích 44–49, Tri: 54–58 a Tetra: 59–63. Ve srovnání s kolorimetrickou hodnotou sialové kyseliny ve směsi gangliosidů nanášených na kolonu, byly ve frakcích spojených podle výše uvedeného klíče získány tyto výtěžky kyseliny sialové vázané glykolipidy: Mono-: 164,8 μ g; Di-: 167,1 μ g; Tri-: 99,7 μ g; Tetra-: 16,5 μ g; Celkem: 448 μ g vázané sialové kyseliny, což odpovídá 68,9 % původní hodnoty vázané kyseliny sialové v původním vzorku. Zbylých 32,1 % se nachází v úpatí píků nespojených frakcí a ve ztrátách na koloně i v celkovém procesu, prováděném v tak malém měřítku.

Příklad 3

Extrakce gangliosidů byla prováděna jiným způsobem, podle postupu Svennerholma a spol., [Biochim. Biophys. Acta, 617 (1984) 97–103.]. Tento postup umožňuje získat směs gangliosidů obsahující výtěžek tetrasialogangliosidů a i pentasialogangliosidy. Takto připravené gangliosidy jsou dále označovány jako vzorek II.

Anex a kolona byly stejné jako v příkladu 2, ale anex nebyl z kolony vyjímán, nýbrž regenerován a ekvilibrován po předchozím pokusu přímo na koloně promýváním 2M octanem sodným (20 ml) v methanolu a pak čistým methanolem (350 ml). Vzorek II (25 mg) byl rozmíchán ve směsi 300 μ l vody + 400 μ l methanolu a suspenze nanášena podvrstvením do methanolu nad vrcholem ionexu. Zprvu následovala isokratická eluce 20 ml methanolu, pak lineární gradient 35 ml methanolu + 35 ml 0,1M octanu amonného v methanolu, dále lineární gradient 20 ml 0,1M octanu + 20 ml 0,2M octanu v methanolu a nakonec krátký gradient 10 ml 0,2M + 10 ml 0,5M octanu amonného v methanolu. Průtoková rychlost kolonou byla 2,06 ml/min.

Eluce posledního píku (tetrasialogangliosidů) byla uskutečněna po 52 minutách. Nakonec byla kolona regenerována promytím 20 ml 2M octanu amonného v methanolu a pro další pokus připravena promytím methanolem do vyplavení octanu amonného.

Příklad 4

Anex, kolona, zařízení a pracovní technika byla shodná s příkladem 2 a 3. Zatížení ionexu a rychlost byly podstatně zvýšeny, gradientový systém byl zjednodušen.

30 mg vzorku II gangliosidů připraveného postupem uvedeným v příkladu 3 bylo suspendováno ve směsi 400 μ l vody + 400 μ l methanolu. Chromatografie byla zahájena krátkou isokratickou elucí 20 ml methanolu, pak následoval dlouhý lineární gradient 70 ml methanolu + 70 ml 0,2M octanu amonného v methanolu a krátký strmý lineární gradient 10 ml 0,2M + 10 ml 0,5M octanu amonného v methanolu.

Mono- až pentasialogangliosidy byly eluovány v prvním gradientu. Druhý gradient sloužil jako pojistka na odhalení dalších případně přítomných anionických látek. Kolona byla poté promyta 20 ml 0,2M octanu za účelem regenerace. Pak byla připravena k další chromatografii 88 minutovým promýváním čistým methanolem (300–350 ml) až bylo docíleno snížení vodivosti pod 10 μ S. Potom mohl být nasazen další vzorek.

Frakce o velikosti 2 ml byly odebírány v intervalech 35 sekund a byly vyhodnocovány chromatografií na tenké vrstvě. Bylo dosaženo rozdělení mono- až pentasialogangliosidů. Výtěžky mono- až tetrasialogangliosidů odpovídají hodnotám uvedeným v příkladu 2. Pentasialogangliosidy byly přítomny v malém množství. Proto bylo nutno silně zakoncentrovat příslušnou frakci a nanést ji na desku tenkovrstvé chromatografie, aby mohly být kvalitativně prokázány.

Gangliosidy nacházejí využití jako biopreparáty k diagnostickým a vědecko-výzkumným účelům jako léčiva nervových onemocnění a jako antigeny k přípravě cílených protilátek.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob separace gangliosidových frakcí ionexovou chromatografií vyznačený tím, že gangliosidy mozkové se chromatografují podle obsahu kyseliny sialové v molekule na diethylaminoethylovém rigidním glykol-methakrylátovém makroporézním hybrid-

ním anexu lineárním gradientem: methanol — 0,2M octan amonný, draselný nebo sodný v methanolu za tlaku 0,1 až 2,0 MPa za laboratorní teploty při specifickém průtoku do 10 ml/cm². min.