



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

195568

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 16 12 77
/21/ /PV 8437-77/

(10) Zveřejněno 31 05 79

(45) Vydáno 15 04 82

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/22//
C 07 C 47/12
C 08 G 63/00

(75)

Autor vynálezu

FRANĚK FRANTIŠEK RNDr. DrSc., ROZPRIMOVÁ LADISLAVA RNDr., PRAHA,
KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY nad Vltavou
a NOVOTNÝ JOSEF ing., PRAHA

(54) **Přípravek pro insolubilizaci bílkovin a jejich sloučenin s jinými látkami, zejména se sacharidy nebo lipidy**

1

2

Vynález se týká přípravku, který slouží k insolubilizaci rozpustných bílkovin nebo sloučenin bílkovin s jinými látkami, zejména se sacharidy nebo lipidy. Přípravek podle vynálezu je vhodný i k insolubilizaci dalších forem bílkovin, např. jejich komplexů s ionty kovů nebo s koenzymy.

Insolubilizované bílkoviny a jejich sloučeniny s jinými látkami nacházejí široké použití jako adsorbenty pro biospecifickou chromatografii. Dosud se využívá existence specifických vazebných míst na bílkovinách jako jsou substráty nebo inhibitory enzymů, antigeny, protilátky nebo lektiny k tomu, aby se látka, která s vazebnými místy interaguje, oddělila ze směsi jiných látek, jako jsou komplexní materiály původu rostlinného, živočišného nebo mikrobiálního. Dosahuje se tak rychlého a účinného čištění látek nejrozličnější chemické povahy, pokud jsou rozpustné ve vodě. Proces biospecifické adsorpce a desorpce se může provádět jak způsobem sloupcovým, tak vsádkovým.

Insolubilizace se podle dosud známých postupů řeší buď imobilizací, tj. navázáním bílkovin na nerozpustný nosič, nebo kopolymerací rozpustných bílkovin s bifunkčními nízkomolekulárními látkami. Nejčastěji se používají nosiče na bázi granulovaných gelů zesíťovaných polysacharidů nebo polyakrylamidu. Tyto gely však nevykazují dostatečnou pevnost při manipulaci a jejich použití zůstává omezeno převážně na laboratorní práce. Podobně nepříznivé mechanické vlastnosti mají i nerozpustné kopolymery bílkovin s nízkomolekulárními látkami.

V nejnovější době byl vynalezen způsob polymerace rozpustných bílkovin s dialdehydy, který se provádí v přítomnosti jemně granulovaných polyesterů podle čs. autor. osvědčení č. 190 863. Kopolymer bílkoviny s dialdehydem obalí částice polyesteru tenkou nerozpustnou vrstvou o velkém povrchu. Výhodou tohoto postupu je, že takto připravená nerozpustná bílkovina je ve formě rigidních částic a lze ji ze suspenzí snadno oddělit filtrací nebo odstředěním. Nevýhodou tohoto postupu však je, že k jeho uskutečnění je třeba poměrně vysoké kvalifikace pracovníků, kteří jej realizují, neboť jde o reakci v heterogenním systému za přísného dodržení koncentrací látek. Proto byl tento známý postup využitelný pouze na pracovištích specializovaných na práce s biologickými makromolekulami.

Uvedený nedostatek tohoto jinak velmi výhodného postupu odstraňuje přípravek k jeho provádění podle vynálezu. Podstata vynálezu spočívá v tom, že přípravek pro insolubilizaci bílkovin a jejich sloučenin s jinými látkami, zejména se sacharidy nebo lipidy sestává ze tří samostatných složek, z nichž první složka je tvořena 1 až 40% hmot. jemně granulovaného polyesteru suspenzovaného ve vodě nebo ve vodném roztoku látek tlumících změny pH, druhá složka je tvořena 5 až 40% hmot. vodným roztokem dialdehydu a třetí složka je tvořena 0,1 až 5% hmot. vodným roztokem dialdehydu vztaženo vždy na hmotnost každé z těchto samostatných složek. Je výhodné, z hlediska dlouhodobé stability přípravku, jestliže první složka je tvořena polyesterem

aromatických aminokyselin a ethylenglykolu. Jako dialdehydu se ve druhé a třetí složce zpravidla použije glutaraldehydu, ale je možno použít i jiných dialdehydů jako např. glyoxalu. Dále je výhodné, jestliže vodný roztok látek tlumících změny pH je tvořen roztokem primárního a sekundárního fosforečnanu sodného nebo draselného.

V praktickém provedení je každá z těchto samostatných složek umístěna v samostatné nádobce a teprve při uskutečnění postupu dojde k jejich smísení tak, že se nejdříve smísí první a druhá složka a když proběhne aktivace polymeru v první složce, odstraní se kapalná fáze a aktivovaný polymer se smísí s roztokem bílkoviny a s třetí složkou. Reakce se nechá proběhnout a insolubilizovaná bílkovina se oddělí, např. filtrací a promytím se zbaví rozpustných reakčních produktů. Tím je použití přípravku podle vynálezu ukončeno.

Jak je zřejmé z uvedeného popisu použití přípravku podle vynálezu, je jeho výhodou především to, že umožňuje provést podle shora posledně uvedeného, jinak velmi výhodného, postupu insolubilizaci i pracovníkům relativně velmi málo kvalifikovaným, což je důležité zejména ve zdravotnických zařízeních a podnicích.

Vynález je blíže vysvětlen pomocí dále uvedených příkladů jeho provedení.

P ř í k l a d 1

Přípravek pro insolubilizaci podle vynálezu sestával ze 100 mg práškového polyethyltereftalátu suspendovaného v 1 ml vody. Tato první složka byla umístěna ve skleněné uzavřené nádobce. Druhá složka přípravku byla tvořena 1 ml 20% vodného roztoku glutaraldehydu umístěného ve skleněné ampuli. Třetí složka byla tvořena 0,5 ml 1% vodného roztoku glutaraldehydu umístěného v oddělené skleněné ampuli. Všechny tři složky byly uskladněny v chladnici při +4 °C.

Při vlastním použití přípravku podle vynálezu byla k první složce přidána druhá složka z ampule a obsah skleněné nádoby byl protřepán. Směs první a druhé složky byla ponechána 40 hodin při laboratorní teplotě. Pak byl polymer odfiltrován, na filtru promyt 10 ml fosfátového pufru pH 7,0 a suspendován v 5 ml 1% roztoku lidského imunoglobulinu G ve fosfátovém pufru pH 7,0. Suspenze byla intenzívně míchána elektrickým míchadlem. Za míchání byla přidána třetí složka. Míchání suspenze pokračovalo dvě hodiny. Polymer s insolubilizovanou bílkovinou byl pak odfiltrován. Ve filtrátu bylo měřením optické absorpce při 280 nm stanoveno množství nenavázané bílkoviny a z rozdílu vypočteno, že na částicích polymeru bylo insolubilizováno 96 % přidaného lidského imunoglobulinu G.

P ř í k l a d 2

Přípravek pro insolubilizaci podle vynálezu sestával z 200 mg práškového polypropyltereftalátu suspendovaného v 1,5 ml fosfátového pufru pH 8,0. Tato první složka byla umístěna ve skleněné ampuli. Druhá složka přípravku byla tvořena 2 ml 0,2% vodného roztoku glyoxalu umístěného v oddělené skleněné ampuli. Všechny tři složky byly uskladněny v chladnici při +4 °C.

Při použití byl obsah ampule s první složkou a ampule s druhou složkou smíchán ve skleněné nádobce. Uzavřená nádobka byla umístěna do termostatu s teplotou 40 °C na

dobu 16 hodin. Pak byl polymer odfiltrován a ihned suspendován v 5 ml 0,8% lidského serumalbuminu v octanovém pufru pH 4,0. Suspenze byla intenzívně míchána magnetickým míchadlem. Za míchání byla po kapkách přidávána třetí složka. Míchání suspenze pokračovalo při laboratorní teplotě tři hodiny. Polymer s insolubilizovanou bílkovinou byl odfiltrován. Ve filtrátu bylo měřením optické absorpce při 280 nm stanoveno množství nenavázané bílkoviny a z rozdílu vypočteno, že na částicích polymeru bylo insolubilizováno 76 % přidaného lidského serumalbuminu.

P ř í k l a d 3

Přípravek pro insolubilizaci sestával z 1 g práškového polyesteru kyseliny tereftalové a kyseliny sulfoisofthalové s ethylenglykolem suspendovaného ve 20 ml vody, jejíž pH bylo nastaveno primárním fosforečnanem draselným na 5,2. Tato první složka byla umístěna ve skleněné láhvi s uzavěrem z polyethylenu. Druhá složka byla tvořena 10 ml 40% vodného roztoku glutaraldehydu umístěného ve skleněné ampuli. Třetí složka byla tvořena 1 ml 3% glutaraldehydu umístěného v oddělené skleněné ampuli. Všechny tři složky byly uchovávány v chladnici při +4 °C.

Při použití byl obsah ampule s druhou složkou přidán do láhve obsahující první složku, směs byla promíchána a ponechána 20 hodin při laboratorní teplotě. Pak byl polymer odfiltrován a po promytí vodou suspendován v 25 ml 1% vodného roztoku lidského imunoglobulinu A ve fosfátovém pufru pH 6,0. Suspenze byla intenzívně míchána magnetickým míchadlem. Za míchání byla přidána třetí složka. Míchání suspenze pokračovalo při laboratorní teplotě 4 hodiny. Polymer s insolubilizovanou bílkovinou byl odfiltrován. Ve filtrátu bylo měřením optické absorpce při 280 nm stanoveno množství nenavázané bílkoviny a z rozdílu vypočteno, že na částicích polymeru bylo insolubilizováno 89 % lidského imunoglobulinu A.

P ř í k l a d 4

Přípravek pro insolubilizaci sestával ze 100 mg práškového polyethyltereftalátu suspendovaného ve 2 ml fosfátového pufru pH 7,2. Tato první složka byla umístěna v uzavřené skleněné lahvičce. Druhá složka byla tvořena 0,5 ml 25% vodného roztoku glutaraldehydu umístěného ve skleněné ampuli. Třetí složka byla tvořena 0,5 ml 1% vodného roztoku glutaraldehydu umístěného v oddělené skleněné ampuli. Všechny tři složky byly uchovávány v chladnici při +4 °C.

Při použití byl obsah ampule s druhou složkou přidán do lahvičky obsahující první složku, obsah byl promíchán a v uzavřené lahvičce umístěn na 10 hodin do termostatu s teplotou 37 °C. Pak byl polymer odfiltrován a po promytí vodou suspendován v 2,5 ml 1% roztoku alfa-1 kyselého glykoproteinu v octanovém pufru pH 4,6.

Suspenze byla míchána magnetickým míchadlem. Po 25 minutách míchání byla po kapkách přidána třetí složka. Míchání suspenze pokračovalo ještě dvě hodiny při laboratorní teplotě. Polymer s insolubilizovaným glykoproteinem byl odfiltrován. Ve filtrátu bylo měřením optické absorpce při 280 nm stanoveno množství nenavázaného glykoproteinu a z rozdílu vypočteno, že na částicích polymeru bylo insolubilizováno 88 % alfa-1 kyselého glykoproteinu.

Přípravku podle vynálezu je možno použít zejména v oblasti zdravotnictví, farmacie a biologického výzkumu k selektivní biospeci-

fické izolaci látek, jako např. protilátek z imunních sér.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Přípravek pro insolubilizaci bílkovin a jejich sloučenin s jinými látkami, zejména se sacharidy nebo lipidy, vyznačující se tím, že sestává ze tří samostatných složek, z nichž první složka je tvořena 1 až 40 % hmot. jemně granulovaného polyesteru suspendovaného ve vodě nebo vodném roztoku látek tlumících změny pH, druhá složka je tvořena 5 až 40% hmot. vodným roztokem dialdehydu a třetí složka je tvořena 0,1 až 5% hmot. vodným roztokem di-

aldehydu, vztaženo na hmotnost každé z těchto složek.

2. Přípravek podle bodu 1, vyznačující se tím, že první složka je tvořena polyesterem aromatických kyselin a ethylenglykolu.

3. Přípravek podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že vodný roztok látek tlumících změny pH je tvořen roztokem primárního a sekundárního fosforečnanu sodného nebo draselného.