



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 215 941

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 06 80
(21) PV 4665-80

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³ C 08 B 37/10
C 08 F 120/06

(40) Zveřejněno 30 06 81
(45) Vydáno 01 10 84

(75)
Autor vynálezu

RYBÁK MIROSLAV ing. CSc.,
ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., PRAHA

(54)

Heparin imobilisovaný na hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmethakrylátových nosičích a způsob jeho výroby

Heparin imobilizovaný na hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmethakrylátových nosičích jako sorbent plasmatických bílkovin, koagulačních faktorů, enzymů, inhibitorů enzymů, receptorů steroidních hormonů, lipoproteinů, faktorů proteosynthesy a imunoaktivních bílkovin, vyznačující se tím, že na makroporesních, trojrozměrných hydrofilních kopolymerech hydroxyalkylakrylátů, popřípadě hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkyl obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, je kovalentně navázán heparin.

Předmětem vynálezu je dále způsob výroby shora uvedených sloučenin, který spočívá v tom, že se makroporesní, trojrozměrné hydrofilní kopolymery hydroxyalkylakrylátů případně hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkyl obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, aktivu-

jí reakcí s epichlorhydrinem, produkt aktivace se ponechá reagovat s roztokem heparinu v tlumivém roztoku pH 8 až 10 při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin a po skončení reakce se zbylé nezreagované epoxidové skupiny odstraní působením ethanolaminu.

Sloučeniny podle vynálezu se používají jako sorbenty plasmatických bílkovin a podobných systémů.

Vynález se týká heparinu imobilisovaného kovalentní vazbou na trojrozměrných makroporesních hydrofilních kopolymerech hydroxyalkylakrylátů případně hydroxyalkylmethakrylátů s alkylendiakryláty nebo dimethakryláty a způsobu imobilisace, která je charakterizována vazebnou reakcí nosiče obsahujícího na vnitřním povrchu makropórů reaktivní epoxidové skupiny s heparinem.

Hydrofilní trojrozměrné makroporesní kopolymery hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmethakrylátů s alkylendiakryláty nebo alkylendimethakryláty a způsob jejich přípravy řízenou suspenzní kopolymerizací v přítomnosti inertních organických sloučenin ve vodném nebo v organickém disperzním prostředí jsou známy z čs. autorských osvědčení č. 148 828 a 150 819. Kopolymery se vyznačují velmi dobrými mechanickými vlastnostmi a jejich sférický tvar a makroporesní struktura je předurčují k celé řadě aplikací při dělení složitých směsí přírodního i syntetického původu. Hydroxylové funkční skupiny lze chemicky přeměnit řadou substitučních reakcí, oxidací a pod. Polymeranalogickými reakcemi modifikované kopolymery byly využity jako nosiče ionogenních skupin (čs. autorské osvědčení č. 171 963, 177 507 a 173 201) nebo jako specificky účinné sorbenty v afinitní chromatografii (čs. autorské osvědčení č. 167 530, 175 047 a 193 845).

Heparin je mukopolysacharid přírodního původu. Jde o vysoce sulfatovaný glykosaminoglykan, u něhož však část primárních aminoskupin zůstává volná a může reagovat za vhodných podmínek s funkčními skupinami nosiče za vzniku kovalentní vazby. Heparin je antikoagulant, jehož účinnost je založena na schopnosti selektivně interagovat s plasmatickým proteolytickým inhibitorem antitrombinem III. Komplex antitrombin III - heparin má zvýšenou inhibiční aktivitu vůči trombinu a je dále schopen inaktivovat některé další faktory v koagulačním schématu jako jsou faktory IXa, Xa, XIa a XII. S ohledem na svůj charakter polyaniontu interaguje heparin s větší či menší selektivitou s celou řadou biologicky aktivních sloučenin jako jsou některé další plasmatické bílkoviny, lipasy, lipoproteiny RNA a DNA polymerasy, receptory steroidních hormonů, faktory proteosynthesy, imunoaktivní bílkoviny a další.

Kovalentní vazbou heparinu na polysacharidový nosič agarosu byl pomocí bromkyanové aktivace připraven švédskou firmou Pharmacia Uppsala sorbent Heparin-Sepharose CL-6B. Vedle vysoké botnací schopnosti ve vodných roztocích, závislosti objemu zbotnalých částic na hodnotě pH a iontové síle roztoku, nepřilíš vysoké chemické odolnosti vůči extrémním hodnotám pH určené polysacharidovým charakterem nosiče a konečně omezené stálosti vůči působení mikroorganismů, patří ke značné nevýhodě tohoto sorbentu aminolytické odbourávání afinantů vázaných pomocí bromkyanové metody, při kterém vznikají deriváty guanidinu. Ani podmínky aktivační reakce s ohledem na vysokou toxicitu bromkyanu, ani prokázaná hydrolysa afinantů při vlastním použití, nepatří k ideálním vlastnostem polysacharidového nosiče obsahujícího vázaný heparin. Některé z uvedených vlastností komerčního imobilisovaného heparinu na agarovém nosiči byly odstraněny u jiného typu sorbentu - polymethylmethakrylátu, jehož polymerisace byla iniciována heparinovými radikály. Výsledný produkt obsahoval cca 10 % hmot. vázaného heparinu, jehož aktivita vůči antitrombinu odpovídala 1 % hmot. Sorbent byl však připraven v amorfni práškovité formě a již při samotné polymerizační reakci

v přítomnosti heparinu docházelo ke štěpení, projevujícím se snížením molekulové hmotnosti heparinu a ke snížení jeho aktivity na 20 %. Hydrofobní nosič (polymethylmethakrylát) rovněž přispívá ke snížení aktivity konečné formy imobilisovaného heparinu (M.C.Boffa et al. Thrombos, Haemostas.(Stuttg.) 41(1979/346).

Z uvedeného je zřejmé, že pro dosažení dobré mechanické a hydrolytické stability imobilisovaného heparinu pro použití v laboratorní, případně v průmyslové biospecifické chromatografické separační technice je žádoucí volit nosič na bázi rigidního makroporesního materiálu s pravidelným tvarem částic, který má vhodné hydrodynamické vlastnosti při kolonovém uspořádání procesu a který je dostatečně hydrofilní. Provedení vazby heparinu musí být jednoduché, technologicky nenáročné a musí zaručit dostatečnou stabilitu afinantu vůči hydrolyse bez ztráty jeho biochemické aktivity. Těchto vlastností je dosaženo imobilisací heparinu na hydroxyalkylmethakrylátových a hydroxyalkylakrylátových nosičích.

Předmětem vynálezu je heparin imobilisovaný na hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmethakrylátových nosičích jako sorbent plasmatických bílkovin, koagulačních faktorů, enzymů, inhibitorů enzymů, receptorů steroidních hormonů, lipoproteinů, faktorů proteosynthesy a imunoaktivních bílkovin, který spočívá v tom, že sestává z epichlorhydrinem aktivovaného makroporesního, trojrozměrného, hydrofilního kopolymeru hydroxyalkylakrylátů nebo hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, na kterém je kovalentně navázán heparin v množství 0,5 až 100 mg/g suchého aktivovaného nosiče.

Dále je předmětem vynálezu způsob výroby uvedených sloučenin, který je charakterizován tím, že se makroporesní, trojrozměrné a hydrofilní kopolymery hydroxyakrylátů popřípadě hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, aktivují reakcí s 1 až 5 ml epichlorhydrinu/g suchého kopolymeru, produkt aktivace se nechá reagovat s roztokem heparinu v tlumivém roztoku o pH 8 až 10 o koncentraci 0,1 až 1 g heparinu/g suchého aktivovaného nosiče při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin a po skončení reakce se zbylé nezreagované epoxidové skupiny odstraní působením 8 až 20 ml ethanolaminu ve vodném roztoku.

Sorbenty podle tohoto vynálezu obsahují vázaný heparin v aktivní formě a proti dosud známým preparátům využívajícím jiné typy nosičů mají řadu výhod.

Ve srovnání s heparinem vázaným na polysacharidových nosičích je při srovnatelné specifické aktivitě podstatný rozdíl ve vlastnostech sorbentů podle tohoto vynálezu, jsou-li v kontaktu s vodnými roztoky dělených složek. Makroporesní charakter hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmethakrylátových nosičů zaručuje stálost objemu sorbentů při změně pH a iontové síly roztoku; sférický tvar a mechanická pevnost částic umožňuje vysoké průtokové rychlosti kapalného media v kolonovém uspořádání. Makroporesní charakter struktury dovoluje penetraci molekul s molekulovou hmotností do cca $2 \cdot 10^6$ daltonů do vnitřní domény sorbentů bez podstatných omezení způsobených zpomalením difuze, která je často pozorována u homogenních xerogelů polysacharidového typu. Sorbenty umožňují dokonce práce za zvý-

šeného tlaku nebo ve vysokých preparativních sloupcích bez nebezpečí jejich sesedání a upcpávání. Syntetická matrice nosiče zaručuje odolnost proti působení mikroorganismů.

Aktivace akrylátových a methakrylátových nosičů přímou reakcí s epichlorhydrinem je technologicky nenáročná a poskytuje reaktivní produkt, který je v suchém stavu možno beze ztráty aktivity skladovat. Důležitou skutečností je, že aktivace nosiče probíhá pouze na vnitřním hydrofilním povrchu pórů, nikoli ve hmotě, takže po následné vazebné reakci s heparinem je eliminace zbylých reaktivních skupin úplná, poměrně rychlá a konečná.

Vlastní vazba heparinu se uskutečňuje adicí primárních aminoskupin heparinu na epoxidový kruh aktivovaného kopolymeru. Nutnou podmínkou je, aby aminoskupiny nebyly protonisovány, je proto nutno upravit alkalitu roztoku heparinu vhodným pufrům na hodnotu pH 8 až 10. S výhodou lze použít 0,1 M borátových pufrů a pH 9,4. Teplota a čas reakce určují stupeň konverze, s výhodou lze vázat heparin při teplotách 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin při mírném míchání suspence. Stanovení obsahu vázaného heparinu bylo provedeno titrací sulfoskupin louhem v methanolickém roztoku (L.B. Jaques and H.J. Bell, in *Methods of Biochemical Analysis*, Ed. D. Glick, Vol. 7, 254-309, Interscience Publishers Inc., New York, London, 1959). Účinek sorbentů podle předmětu vynálezu byl ověřován v reálných systémech.

Předmět vynálezu je objasněn v následujících příkladech provedení, aniž by však byl jimi jakkoli omezen.

P ř í k l a d 1

100 g kopolymeru ethyldimethakrylátu s 2-hydroxyethylmethakrylátem o vylučovacím limitu 10^6 daltonů s velikostí sférických částic 100 až 200 μm se nabotná v 500 ml 50% hydroxidu draselného po dobu 15 hodin při teplotě 5 °C. Takto zbotnalý nosič se odfiltruje a za stálého míchání se vnese do reaktoru opatřeného zpětným ohladičem a teploměrem, ve kterém bylo předloženo 400 ml epichlorhydrinu. Asi po 1 hodině vystoupí teplota reakční směsi na teplotu varu epichlorhydrinu. Po odeznění reakce se přidá 100 ml nasyceného roztoku bromidu draselného a reakční směs se zahřívá k varu po dobu 3 hodin. Po skončení reakce se aktivovaný sorbent odfiltruje, na filtru se promyje 3 x 500 ml acetonu, rychle 2 x 1000 ml vody do neutrální reakce filtrátu, znovu 3 x acetonem, etherem a vysuší se ve vakuové sušárně při 20 °C po dobu 24 hodin. Obsah epoxidových skupin se stanovuje titračně: 0,420 mmol/g suchého kopolymeru.

1 g aktivovaného nosiče připraveného podle uvedeného postupu se nechá stát 3 hod. v 5 ml čerstvě destilované nebo převařené vody (30 minut varu). Voda se odfiltruje a vlhký nosič se promyje borátovým pufrům (0,1 M, pH 9,4). Ve stejném pufru se přidá roztok 0,2 až 0,3 g heparinu (100 m.j. v 1 mg preparátu). Po dobu 70 hodin se směs protřepává při teplotě 20 až 25 °C, pak se pufr se zbytkem nezreagovaného heparinu oddělí od pevné fáze filtrací nebo odstředěním a případně po přidání čerstvého heparinu se použije k nové reakci s aktivovaným nosičem.

Pevný podíl se promyje vodou a pomocí ethanolaminu se vysytí zbývajících nezreagovaných epoxidových skupin. Na 1 g aktivovaného nosiče se přidá roztok 4 ml ethanolaminu v 8 ml vody a při 20 °C se suspence míchá 2 hodiny, roztok se odsaje a přidá se nový roztok 4 ml

ethanolaminu v 16 ml vody a při 20 °C se produkt míchá po dobu 4 hodin. Nezareagovaný ethanolamin se odstraní odsátím a produkt na filtru se promývá vodou a 0,1 M borátovým pufrům do negativní reakce vůči Na-1,2-naftochinon-4-sulfonátu (J.M.McKibbin in Methods of Biochemical Analysis, Ed.D.Glick, Vol.7, 111-143, Interscience Publishers Inc., New York, London, 1959). Účinek připraveného sorbentu byl ověřen izolací některých bílkovin z lidské plasmy. 1 g takto imobilizovaného heparinu váže 45 až 60 mezinárodních jednotek (NIH) trombinu. Obsah vázaného heparinu 3,9 mg/g suchého nosiče.

P ř í k l a d 2

Aktivace kopolymeru 2-hydroxyethylakrylátu s ethylenglykoldimethakrylátem (vylučovací limit molekulové hmotnosti 500 000 daltonů) se provádí analogicky jako v příkladu 1. Reakce s heparinem se provádí za stejných podmínek jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že teplota reakce se udržuje na 10 °C, při trvání reakce 100 hodin při pH tlumivého roztoku 10. Obsah vázaného heparinu stanovený titrací sulfo skupin činí 2,8 mg/g suchého nosiče.

P ř í k l a d 3

Imobilizace heparinu se provádí analogicky jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že jako nosiče bylo použito kopolymeru 2-hydroxyethylakrylátu s ethylendiakrylátem o vylučovacím limitu molekulové hmotnosti 10^6 daltonů. Obsah vázaného heparinu činí 3,0 mg/g suchého nosiče.

P ř í k l a d 4

Aktivace kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylendimethakrylátem o vylučovacím limitu molekulové hmotnosti $2 \cdot 10^6$ daltonů se provádí stejně jako v příkladu 1. Reakce s heparinem se rovněž provádí analogicky, jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že množství heparinu nasazeného k reakci činí 0,5 g ve 4 ml 0,1 M borátového pufru pH 9,4. Reakční teplota činí 40 až 45 °C a doba reakce 30 hodin. Po dosycení zbývajících epoxidových funkčních skupin se sorbent zbaví ethanolaminu elucí v chromatografické koloně. Obsah vázaného heparinu činí 4 mg/g suchého nosiče.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Heparin imobilizovaný na hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmethakrylátových nosičích jako sorbent plasmatických bílkovin, koagulačních faktorů, enzymů, inhibitorů enzymů, receptorů steroidních hormonů, lipoproteinů, faktorů proteosyntézy a imunoaktivních bílkovin vyznačující se tím, že sestává z epichlorhydrinem aktivovaného makroporézního, trojrozměrného, hydrofilního kopolymeru hydroxyalkylakrylátů nebo hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, na kterém je kovalentně navázán heparin v množství 0,5 až 100 mg/g suchého aktivovaného nosiče.

2. Způsob výroby sloučenin podle bodu 1, vyznačující se tím, že se makroporézní, trojrozměrné a hydrofilní kopolymery hydroxyakrylátů případně hydroxyalkylmethakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo s alkylendimethakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, aktivují reakcí s 1 až 5 ml epichlorhydrinu/g suchého kopolymeru, produkt aktivace se ponechá reagovat s roztokem heparinu v tlumivém roztoku pH 8 až 10 o koncentraci 0,1 až 1 g heparinu/g suchého aktivovaného nosiče při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin a po skončení reakce se zbylé nezreagované epoxidové skupiny odstraní působením 8 až 20 ml ethanolaminu ve vodném roztoku.