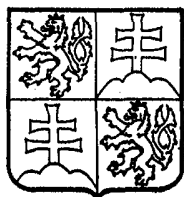


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÝ ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

270 536

(11)

(13) 81

(51) Int. Cl.⁴
C 08 B 15/05

(21) PV 8066-88.I

(22) Prihlásené 07 12 88

(40) Zverejnené 14 11 89

(45) Vydané 25 06 91

(75) Autor vynálezu KÉRY VLADIMÍR ing. CSc.,
SLÁMOVÁ KATARÍNA, BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy boronátových afinitných
nosičov

(57) Riešenie sa týka spôsobu prípravy boronátových afinitných nosičov. Vychádza sa z aminoaryl derivátu nosiča aktivovaného diazotáciou na ktorý sa priamo naviaže nederivatizovaná kyselina fenylboronová za vzniku azo-väzby. Riešenie nájde uplatnenie v biotechnológiách, kde sa fenylboronátové afinitné nosiče môžu využiť na izoláciu a purifikáciu rôznych biochemikálií (glykoproteínov, sacharidov, nukleových kyselín a pod.).

Vynález sa týka spôsobu prípravy boronátových afinitných nosičov priamym pripojením nederivatizovanej kyseliny fenylborónovej na nosič.

Schopnosť kyseliny boritej a jej derivátov špecificky interagovať s vicinálnymi diolmi sa využíva v rôznych oblastiach chémie a biochémie. V chémii cukrov pri rôznych syntézach, pri ktorých interakcia boronátu s vicinálnymi diolovými skupinami umožňuje stereoselektívnu reakciu ostatných hydroxylových skupín. Podstatne významnejšiu a širšiu aplikáciu majú deriváty kyseliny boritej (najmä analógy kyseliny fenylborónovej) imobilizované na tuhé nosiče najrôznejšej štruktúry. Z takto upravených nosičov sa stávajú afinitné adsorbenty vhodné pre chromatografické delenie cukrov /Weith, H. L., Wiebers, J. L., Gilham, P. T., Biochemistry, 9, 4396 (1970)/, nukleozidov a nukleotidov /Rosenberg, M., Wiebers, J. L., Gilham, P. T., Biochemistry 11, 3623 (1972)/, ribonukleových kyselín a oligoribonukleotidov /Rosenberg, M., Gilham, P. T., Biochim. Biophys. Acta 246, 337 (1971)/, glykoproteínov /Malik, A. K., Hermanson, G. T., Krohn, R. I., Fujimoto, E. K., Smith, P. K., Anal. Lett., 14 (88), 649 (1981)/, enzýmov, najmä serínových proteáz /Akparov, V. H., Stepanov, V. M., J. Chromatogr. 155, 329 (1978)/, peptidov /Rose, K., Priddle, J. D., Offord, R. E., J. Chromatogr. 210, 301 (1981)/ a katecholamínov /Hansson, C., Agrup, G., Rorsman, H., Rosengren, A. M., Rosengren, J., J. Chromatogr. 161, 352 (1978)/, s uplatnením v biochémii, biotechnológii a najmä v medicíne.

V súčasnosti je rozpracovaných niekoľko spôsobov prípravy boronátových afinitných adsorbentov. V nich sa využívajú dva základné deriváty kyseliny fenylborónovej: 4-vinylbenzén-boronová kyselina a m-aminofenylborónová kyselina. Prvý derivát sa využíva ako monomér pre radikálovú kopolymerizáciu s etylvinylbenzénom /Barker, S. A., Hatt, B. W., Sommers, P. J., Woodbury, R. R., Carbohydr. Res., 26, 55 (1973)/ alebo styrénom, akrylamidom a N, N'-metylénbis(akrylamidom) /Elliger, C. A., Chan, B. G., Stanley, W. L., J. Chromatogr., 104, 57 (1975)/. Vznikajú polyméry so zabudovaným zvyškom kyseliny fenylborónovej. V prípade kyseliny m-aminofenylborónovej sa zase využíva nukleofilná reaktivita aminoskupiny na benzénovom jadre v kondenzačných reakciách typických pre aminoskupiny. Využívajú sa buď kondenzačné činidlá typu karbodiimidov /McCutchan, T. F., Gilham, P. T., Soll, D. Nucleic Acids Res. 2, 853 (1975)/, brómkyán /Bouriotis, V., Galpin, I. J., Dean, P. D. D., J. Chromatogr. 210, 267 (1981)/ alebo sa matrice aktivujú naviazaním reaktívnych skupín epoxypopylu /Glad, M., Ohlson, S., Hansson, L., Hansson, M. O., Mosbach, K., J. Chromatogr. 200, 254 (1980)/, acylazidu /Davis, G. E., Suita, R. D., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., Waalkes, T. P., Borek, E., Clin. Chem. 23, 1427 (1977)/ apod.

Spoločnou nevýhodou všetkých uvedených postupov je, že vyžadujú ďalšiu derivatizáciu kyseliny fenylborónovej, čo znamená vo väčšine prípadov minimálne dvojstupňovú syntézu a okrem toho vyžadujú komplikovanú derivatizáciu matrice, na ktorú sa derivát kyseliny fenylborónovej viaže. Používané kondenzačné činidlá (karbodiimid, brómkyán) sú vysoko toxické, drahé a pre prácu vo väčšom meradle nevhodné.

Uvedené nedostatky rieši spôsob prípravy boronátových afinitných nosičov podľa vynálezu. Podstata vynálezu spočíva v tom, že k 1 hmot. dielu aminoarylderivatizovaného nosiča sa pridá 10 obj. dielov 0,5 až 2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkovej, zmes sa ochladí na 0 až 10 °C, pridá sa 1 obj. diel 1 až 2 mol.l⁻¹ roztoku dusitanu sodného a mieša sa 4 až 7 minút pri 0 až 10 °C. Po dôkladnom premiešaní sa odsaje, premyje destilovanou vodou a teplota 0 až 10 °C a získaný aktivovaný nosič sa pridá k 10 obj. dielom 0,01 až 0,1 mol.l⁻¹ roztoku kyseliny fenylborónovej v bázičkom tmivom roztoku s pH 7,0 až 9,5, mieša sa pri teplote 10 až 50 °C, 10 až 120 min. Po reakcii sa produkt premyje destilovanou vodou, 1 až 2 mol.l⁻¹ roztokom chloridu sodného, opäť destilovanou vodou, etanolom, acetonom a vysuší sa.

Spôsobom prípravy podľa vynálezu sa pripraví boronátové afinitné adsorbenty priamym pripojením nederivatizovanej kyseliny fenylborónovej na tuhý nosič po aktivácii po-

vrchových aminoarylskupín bez ďalšej derivatizácie kys. fenyloborónovej. Boronátové nosiče pripravené spôsobom podľa vynálezu majú 70 až 90 % aminoarylskupín pôvodného nosiča derivatizovaných na azofenyloborónové deriváty. Množstvo naviazanej fenyloborónovej kyseliny sa stanovilo acidobázickou titráciou.

Uvedené príklady ilustrujú, ale neobmedzujú predmet vynálezu.

Príklad 1

K 5 g p-aminofenylsulfonylderivátu perlovej celulózy obsahujúcej $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$ aminoarylsulfonyl skupín (Osteorb AV) sa pridalo 50 ml $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkovej a ochladilo sa na 0°C . Potom sa pridalo 5 ml 1 mol.l^{-1} roztoku dusitanu sodného, 7 min sa miešalo pri 0°C . Po rýchlom odesatí a premytí studenou destilovanou vodou sa aktivovaný nosič pridal do 50 ml $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny fenyloborónovej v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ uhličitanovom tlmivom roztoku, pH 9,5 a miešal sa pri laboratórnej teplote 2 h. Derivatizovaný nosič sa premyl destilovanou vodou, 2 mol.l^{-1} chloridom sodným, destilovanou vodou, etanolom, acetonom a vysušil sa. Výsledný produkt - boronátový afinitný adsorbent - obsahoval $0,08 \text{ ml.g}^{-1}$ (t.j. 80 %) fenyloborónových skupín (stanovené acidobázickou titráciou).

Príklad 2

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa fenyloborónová kyselina rozpustila v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,0. Produkt obsahoval $0,075 \text{ mol.g}^{-1}$ fenyloborónových skupín, t.j. derivatizácia prebehla na 75 %.

Príklad 3

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako nosič sa použil SPHERON Ara (modifikovaný hydroxyetyl metakrylátový gél, obsahujúci $0,85 \pm \text{mmol.g}^{-1}$ aminoarylskupín). Produkt obsahoval $0,7 \text{ mmol.g}^{-1}$ fenyloborónových skupín, t.j. derivatizácia prebehla na 84 %.

Riešenie nájde uplatnenie v biotechnológiách, kde sa fenyloboronátové sorbenty môžu využiť na izoláciu a purifikáciu rôznych biochemikálií (glykoproteínov, sacharidov, nukleových kyselín).

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy boronátových afinitných nosičov, vyznačujúci sa tým, že k 1 objemovému dielu aminoarylderivatizovaného nosiča sa pridá 10 objemových dielov $0,5$ až 2 mol.l^{-1} kyseliny chlorovodíkovej, ochladí sa na 0 až 10°C , pridá sa 1 objemový diel 1 mol.l^{-1} dusitanu sodného, 4 až 7 min sa mieša pri 0 až 10°C , odesaje sa, premyje sa destilovanou vodou o teplote 0 až 10°C a aktivovaný nosič sa pridá do 10 objemových dielov $0,01$ až $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku kyseliny fenyloborónovej s pH 7,0 až 9,5 a nechá sa reagovať pri teplote 10 až 50°C 10 až 120 min.