



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 653 348 A5

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 K 17/08
C 07 K 17/10
B 01 J 20/22
C 08 G 81/00

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 3226/80</p> <p>㉒ Anmeldungsdatum: 25.04.1980</p> <p>㉓ Priorität(en): 28.04.1979 CS 2982-79</p> <p>㉔ Patent erteilt: 31.12.1985</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 31.12.1985</p>	<p>⑦③ Inhaber: Prirodovedecka fakulta University Karlovy, Prag 2 (CS)</p> <p>⑦② Erfinder: Filka, Karel, Dr., Prag 10 (CS) Coupek, Jiri, Prag 4 (CS) Kocourek, Jan, Dr., Prag 4 (CS)</p> <p>⑦④ Vertreter: Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

⑤④ **Sorbentien für Saccharide und Saccharide enthaltende Polymerisate und Verfahren zur Herstellung derselben.**

⑤⑦ In den Sorbentien sind Lektine covalent an Trägerstoffe gebunden. Die Trägerstoffe sind ausgewählt aus Oxidationsprodukten von Polysacchariden, von glykosylierten Hydroxyalkylacrylat- oder -methacrylatpolymerisaten, von glykosylierte Monomereinheiten enthaltendem Polyacrylamid oder von glykosyliertem Polyvinylalkohol.

Die Herstellung erfolgt durch Oxidation der covalent gebundene Saccharide enthaltenden Polymerisate mit Natrium- oder Kaliumperjodat, Umsetzung der derart aktivierten Polymerisate mit Lektinen und Entfernung der nicht umgesetzten aktiven Aldehydgruppen mit einem Reduktionsmittel.

PATENTANSPRÜCHE

1. Sorbentien für Saccharide und Saccharide enthaltende Polymerisate, z.B. Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass an Trägerstoffe, die aus Oxidationsprodukten von Polysacchariden, von glykosylierten Hydroxyalkylacrylatpolymerisaten, von glykosylierten Hydroxyalkylmethacrylatpolymerisaten, von glykosylierte Monomereinheiten eingebaut enthaltendem Polyacrylamid oder von glykosyliertem Polyvinylalkohol ausgewählt sind, Lektine covalent gebunden sind.

2. Verfahren zur Herstellung von Sorbentien nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die zu den genannten Oxidationsprodukten zu oxidierenden, covalent gebundene Saccharide enthaltenden Polymerisate mit Natrium- oder Kaliumperjodat oxidiert, hierauf die derart aktivierten Polymerisate mit Lektinen bei einer Temperatur von 0 bis 40°C in Pufferlösung von pH 7 bis 12 reagieren lässt, und dann die nach der Reaktion übriggebliebenen aktiven Aldehydgruppen aus dem Polymerisat durch Einwirkung von Reduktionsmitteln eliminiert.

3. Verfahren nach Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Reduktionsmittel Natriumborhydrid verwendet.

Die Erfindung betrifft Sorbentien für Saccharide und Saccharide enthaltende Polymerisate, z.B. Glykoproteine, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Substanzen.

Eiweissstoffe, die fähig sind auf selektive Weise Komplexe mit Zuckern, Polysacchariden und Glykoproteinen zu bilden und welche den allgemeinen Namen «Lektine» tragen, wurden aus einer ganzen Reihe von pflanzlichen und tierischen Quellen isoliert. Sie zeichnen sich nicht nur durch ihren Ursprung, sondern vor allem durch ihre spezifische Affinität gegenüber den Zuckerstoffen und deren Derivaten aus.

Durch Binden der Lektine an eine geeignete Trägersubstanz entstehen spezifische Adsorbentien für Saccharide. Die Bedingung für eine solche Bindungsreaktion besteht in der Aufrechterhaltung des aktiven Sorptionszentrums in Lektinmolekül, das während der Reaktion nicht blockiert werden darf. Die Lektine enthaltenden Sorbentien finden in der analytischen, sowie präparativen Affinitätschromatographie und bei selektiven, zum Isolieren von biologisch aktiven Fraktionen angewandten Präzipitationstechniken Verwendung.

Lektine wurden bereits an Polysaccharide vom Dextran- bzw. Agarose-Typ unter Verwendung der Cyanbromid-Methode gebunden und für eine ganze Reihe von Isoliertechniken bei der Abtrennung von Glycoproteinen (K. Asperg, J. Porath, Acta Chem. Scand, 24 1970, 1839), Dextranen (K. O. Lloyd, Arch. Biochem. Biophys. 137, 1970, 460) oder Zellen (G. H. Edelman, U. Rutishauser, C. F. Millette, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1971, 2153) eingesetzt. Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt in seiner Selektivität und Geschwindigkeit. Trägerstoffe vom Dextran- oder Polysaccharid-Typ weisen jedoch auch gewisse nachteilige Eigenschaften auf. Unter diese Eigenschaften gehören vor allem grosse Quellungsunterschiede in Lösungen mit variabler Ionenstärke und pH-Wert, niedrige mechanische Festigkeit von Partikeln und daraus folgende Schwierigkeiten durch Verstopfung der mit solchen Materialien zu füllenden Kolonnen bei erhöhten Druckwerten und durch reduzierte Durchflussgeschwindigkeiten der mobilen Phase. Nicht zuletzt kann auch eine relativ niedrige Beständigkeit gegen die Hydrolyse und die Wirkung von Mikroorganismen im Wege stehen. Die Bindung der Lektinmoleküle bei der Cyanbromid-Methode erfordert es, mit einem hochtoxischen

Aktivierungsmittel von verhältnismässig niedriger Wirksamkeit zu arbeiten. Die mit der Cyanbromid-Methode entstehende Bindung ist für bestimmte Zwecke nicht genug stabil. So wurde deren sukzessive hydrolytische Spaltung mit gleichzeitiger Herabsetzung des Sorptionsvermögens festgestellt.

Die erfindungsgemässen Substanzen schalten die vorerwähnten Nachteile der bisher bekannten Sorptionsmaterialien aus. Die Ausgangsverbindungen werden vorzugsweise nach dem Verfahren gemäss dem tschechoslowakischen Urheberschein No. 206 823 hergestellt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind selektiv wirkende polymere Sorbentien für Saccharide und Saccharide enthaltende Polymerisate gemäss der Definition in Patentanspruch 1.

Das Verfahren zur Herstellung dieser Sorbentien ist in Patentanspruch 2 definiert. Als Reduktionsmittel wird hierbei vorzugsweise Natriumborhydrid verwendet.

Die Ausgangsverbindungen des erfindungsgemässen Verfahrens werden mit Perjodat oxidiert, wodurch die Spaltung der C-C-Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen mit vicinal gebundenen Hydroxylgruppen in Molekülen der covalent gebundenen Saccharide unter Entstehen zweier Aldehydgruppen erfolgt, die erheblich reaktiv sind. Das durch Oxidation aktivierte Polymer reagiert mit Lektinen unter Entstehung einer Schiff'schen Base. Die Schnelligkeit dieser Reaktion hängt von der Konzentration der Komponenten und von der Temperatur ab, und wird durch den pH-Wert des Reaktionsmediums stark beeinflusst. Die nicht umgesetzten aktiven Aldehydgruppen werden durch die Wirkung von Natriumborhydrid reduziert. Die so entstandenen Sorbentien zeichnen sich durch hohe Kapazität aus.

In ihrer Wirkung sind die erfindungsgemässen Substanzen mit bekannten und zur Verfügung stehenden mit Lektinen nach der Cyanbromid-Methode gebundenen Sacchariden vergleichbar, wenn für den Vergleich das Adsorptionsvermögen des Sorbenten gewählt wird. Das erfindungsgemässe Verfahren ist vom technologischen Gesichtspunkt im wesentlichen leichter, erfordert keine besonderen Massnahmen für die Arbeit mit hochtoxischen Aktivierungsmitteln und ermöglicht einfache Steuerung des Konversionsgrades von Bindungsreaktionen bei hoher Reproduzierbarkeit. Darüber hinaus verleihen die nichtoxidierten, an den Trägerstoff gebundenen Saccharidmoleküle diesem Trägerstoff einen hydrophilen Charakter oder steigern seine ursprüngliche Hydrophilität. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Interaktionen der Komponenten der zu hemmenden Systeme bei der Verwendung der Sorbentien in der Affinitätschromatographie herabgesetzt.

Der Erfindungsgegenstand soll durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

15 g Mischpolymerisat von 2-Hydroxyäthylmethacrylat und Äthylmethacrylat mit einer Molekulargewicht-Ausscheidungs-grenze von 1 000 000, welches ausserdem 16% covalent gebundene D-Galaktose (z.B. «Separon» HEMA-1000-Gal) enthält, wurde in 150 ml Wasser 20 Stunden lang gequollen. Die Flüssigkeit wurde dann abgesaugt und 346 ml 0,1 M NaIO₄ zugegeben. Die Oxidation wurde 100 Minuten bei 25°C vorgenommen. Das Produkt wurde mit Wasser bis zur negativen Reaktion auf Oxidationsmittel (Mn²⁺) gewaschen, mit einem Puffer, in welchem die Bindung des Lektins durchgeführt wurde (Acetatpuffer mit verschiedenem pH), ins Gleichgewicht gebracht und in der nachfolgende Bindungsreaktion eingesetzt.

140 ml Acetatpuffer (pH 7,8) wurden zum Lösen von 2,4 g Lektin aus *Canavalia ensiformis* DC (Concanavalin-A)

verwendet, und dieser Lösung wurde der äquilibrierte oxidierte Trägerstoff aus der vorherigen Stufe in Form von dickem Brei zusammen mit 250 mg D-Glukose zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Stunden bei 4°C in einem Kühlschrank gerührt. Darauf wurden 25 mg NaBH₄ und nach 20 Minuten eine weitere Dosis von 25 mg NaBH₄ zugegeben. Das Gemisch wurde in Kontakt mit Natriumborhydrid insgesamt 40 Minuten lang belassen. Nachher wurde das Sorbens mit Acetatpuffer (pH 7,3) gewaschen und ferner dreimal mit 200 ml Tris-HCl-Puffer in 1 Mol NaCl (pH 8) und mit Acetatpuffer in 1 Mol NaCl (pH 4) gewaschen. Das derart behandelte Sorbens wurde in eine Kolonne übertragen und mit einem Puffer gewaschen, in welchem eine Sorptionswirkung gegenüber Saccharidderivaten nachgewiesen wurde. Die Menge an gebundenem Concanavalin betrug 15 mg pro Gramm des trockenen Trägerstoffes.

Die Wirkung des gebundenen Lektins wurde durch Sorption eines löslichen Polyacrylamidderivates mit einpolymerisiertem Allyl- α -D-glucosid [V. Horejsi et al., Biochim. Biophys. Acta 538, 293 (1979)] durch den nachfolgenden Vorgang bewiesen:

An eine Kolonne von 1 g Trägerstoff mit gebundenem Lecton nach Äquilibrierung mit Acetatpuffer (pH 7,3) wurden 0,3427 g lösliche Polyacrylamidpolymeren mit 9,4 gewichtsprozentigem Gehalt an Glucose im Anfahrpuffer angesetzt. Bei Elution von 102 ml Puffer wurde der Zuckergehalt bis zum Nullwert überwacht. An die Kolonne wurde dann eine Lösung von 0,5 Mol Methyl- α -D-glukopyranosid (30 ml) gebracht, worauf die Kolonne mit dem Anfahrpuffer (pH 7,3) gewaschen wurde. Das Eluat wurde aufgefangen, dialysiert und lyophilisiert. Auf gravimetrischem Wege wurden 0,016 g Polymer festgestellt. Aufgrund der Stoffbilanz wurden bei der Chromatographie ein 3,1%iger Verlust an glykosyliertem Polyacrylamid-Standard gefunden.

Beispiel 2

Das Sorbens wurde analog wie in Beispiel 1 hergestellt und behandelt. Seine Wirkung wurde durch selektive Sorption von Ovalbumin nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die wiederholte Verwendung untersucht. 1 g Sorbens, gemäss Beispiel 1, mit gebundenem Concanavalin-A wurde durch Acetatpuffer (pH 7,3) und nachher durch Tris-HCl-Puffer, pH 7,8 und 0,15 M NaCl, äquilibriert. An die Kolonne wurden 49 mg Ovalbumin in 5 ml Anfahrpuffer angesetzt und das System mit Puffer bis zur negativen Reaktion auf Eiweissstoffe (UV-Absorption 280 nm) unter gleichzeitigem Auffangen des Eluates gewaschen. Darauf wurde eine 0,1 M-Lösung von Methyl- α -D-glukopyranosid (50 ml) angesetzt. Das Eluat wurde aufgefangen, dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute im Eluat betrug 7,8 mg. Der Gehalt an ungebundenem Eiweissstoff wurde auf 40 mg bestimmt, Verlust 2,44%.

Die Kolonne wurde dann mit 20 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,8 und 1 M NaCl-Gehalt sowie mit 20 ml Acetatpuffer, pH 4 und 1 M NaCl-Gehalt gewaschen, mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,8 mit 0,15 M NaCl-Gehalt äquilibriert und der gesamte Prozess wiederholt.

Bei dem zweiten Zyklus wurde der Eiweissstoffgehalt im Eluierungsmittel nach dem Waschen mit Methyl- α -D-glukopyranosid mit 7,6 mg, beim dritten Zyklus mit 7,8 mg und beim vierten Zyklus mit 7,6 mg festgestellt.

Beispiel 3

Das Sorbens wurde analog wie in Beispiel 1 vorbereitet, mit der Ausnahme, dass anstelle des Mischpolymerisates mit der Molekulargewicht-Ausscheidungsgrenze von 1 000 000 Dalton, ein Mischpolymerisat von 2-Hydroxy-äthylmethacrylat mit Äthylendimethacrylat von 300 000 Mo-

lekulargewicht als Trägerstoff verwendet wurde. Beim Testen der Wirkung durch glykosyliertes Polyacrylamid wurde ein 4,6%iger Verlust (Ansatzmenge 0,3470 g, im Eluierungsmittel 0,0154 g) gefunden. Das Ausgangssorbens enthielt 18 Gewichtsprozent von kovalent gebundener Glukose.

Beispiel 4

Zur Bindung des Lektins aus Ricinus communis wurde der oxidierte, in Beispiel 3 beschriebene Trägerstoff angewandt. 1,9 g Lektin wurden in 70 ml Acetatpuffer (pH 7,3), enthaltend 220 mg Galaktose, gelöst und 10 g des oxidierten Trägerstoffes zugesetzt. Die Eliminierung der nicht-umgesetzten aktiven Aldehydgruppen wurden mit 25 mg NaBH₄ vorgenommen. Reaktionszeit: wie in Beispiel 1 angegeben.

Die Wirkung wurde durch Polyacrylamid mit 9,4 gewichtsprozentigem Zuckergehalt geprüft. Ansatzmenge: 0,3412 g; Ausbeute im Elutionsmittel: 0,0154 g; Verluste: 3,8%.

Beispiel 5

Die Bindung des Lektins aus Ricinus communis wurde analog wie in Beispiel 4 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der oxidierte Trägerstoff die Molekulargewicht-Ausscheidungsgrenze von 300 000 Dalton aufwies.

Beim Testen der Wirkung durch Polyacrylamid mit gebundener D-Glukose wurden pro 1 g der Trägerkolonne 0,3400 g Polymer angesetzt. Ausbeute im Eluierungsmittel: 0,0171 g; Verluste: 4,75%.

Beispiel 6

4,2 g kugelförmige Zellulose wurde innerhalb von 20 Stunden in 50 ml Dioxan, das mit Chlorwasserstoffgas gesättigt war, bis zum 16 gewichtsprozentigen Gehalt quellen gelassen. Nach dieser Zeitspanne wurden der Reaktionsmischung 2,0 g D-Galactose zugegeben und sie wurde dann 24 Stunden bei Laboratoriumstemperatur geschüttelt. Darauf wurde der Inhalt des Gefässes in 5 Liter Wasser eingegossen und das Produkt nach Absaugung über einem Filter mit Wasser bis zum neutralen pH-Wert zur negativen Reaktion auf Zucker wiederholt gewaschen.

4,0 g kugelförmige Zellulose mit gebundener D-Galactose (11,7 Gewichtsprozent Gehalt an gebundener D-Galactose analytisch bestimmt) wurde 20 Stunden lang in destilliertem Wasser quellen gelassen. Das Wasser wurde dann abfiltriert und dem nassen Gel 100 ml 0,1 M NaIO₄ zugesetzt. Die Oxidation verlief 1 Stunde bei Laboratoriumstemperatur unter Rühren. Darauf wurde die Natriumperjodatlösung abfiltriert und das Gel an der Kolonne mit destilliertem Wasser durchgewaschen bis die Leitfähigkeit des Eluates der des angewandten, destillierten Wassers entsprach. Dem Zellulosegel wurde dann Boratpuffer vom pH 8,5 und nach 1 Stunde 500 mg Concanavalin-A (Lectin aus Canavalia ensiformis) zugegeben. Das Lektin wurde mit Methyl- α -glukopyranosid inhibiert. Nach 70stündiger Verweilperiode bei 4°C wurden die nicht umgesetzten aktiven Gruppen bei 4°C mit 20 mg NaBH₄ unter 20 Minuten dauerndem Rühren reduziert. Das Gel wurde nachher abwechselnd mit Acetatpuffer pH 4,1 (1 M NaCl) und Tris-HCl-Puffer pH 9 (1 M NaCl) gewaschen. In der Endphase vor der Applizierung wurde das Gel in Acetatpuffer pH 6 (1 M NaCl), enthaltend 10⁻³ M MnCl₂ und 10⁻³ M CaCl₂, aufbewahrt. Der Gehalt an gebundenem Eiweissstoff betrug 9,0 mg pro Millimeter des nassen Gels.

Beispiel 7

Das Aminoglykosyl-Derivat von Zellulose wurde analog wie in Beispiel 6 hergestellt, mit der Ausnahme, dass in die

Reaktion 0,8 g N-Acetyl-D-glucosamin eingesetzt, und dass das Produkt nicht oxidiert wurde. Es wurde nur die Menge des an den Zelluloseträger gebundenen Aminozuckers bestimmt.

Beispiel 8

Ein ähnliches Experiment wie in Beispiel 7 wurde mit dem aus Hydroxyäthylmethacrylat-Mischpolymerisat mit 1 000 000 Molekulargewicht-Ausscheidungsgrenze (siehe Beispiel 1) bestehenden Trägerstoff durchgeführt. Der Gehalt des gebundenen Aminozuckers betrug 8,9 Gewichtsprozent, das die doppelte Menge gegenüber dem Beispiel 7 war.

Beispiel 9

4,0 g lösliches Polyacrylamid-Gel mit einpolymerisiertem Allyl- α -D-glucosid (hergestellt nach V. Horejsi, P. Smolek und J. Kocourek: Biochim. Biophys. Acta, 538 (1978), 293 bis 298) wurde in 100 ml 0,1 M NaIO₄ 1 Stunde bei Laboratoriumstemperatur oxidiert. Nach dieser Zeit wurde das Reaktionsgemisch auf 250 ml verdünnt und gegen destilliertes Wasser dialysieren gelassen. Nach der Beseitigung des Perjodates aus dem Reaktionsgemisch durch Dialyse wurde das Gel lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Lösung wurden 500 mg Lektin aus Canavalia ensiformis, inhibiert mit Methyl- α -D-

-glukopyranosid, zugegeben. Das Gemisch reagierte innerhalb von 70 Stunden bei 4°C, worauf die übrig bleibenden Aldehydgruppen durch Reaktion mit NaBH₄, ähnlich wie in Beispiel 6, reduziert wurden. Die resultierende Reaktionsmischung — nach Verdickung durch Lyophilisation — wurde durch präparative Gelchromatographie an Dextrangel in eine Lektinfraktion und eine an Polyacrylamid mit einpolymerisiertem Allyl- α -D-glucosid gebundenes Lektin enthaltende Fraktion getrennt.

10

Beispiel 10

4,0 g Polyvinylalkohol (125 000 Molekulargewicht und 87 bis 89% Hydrolysegrad), welcher durch D-Glukose gemäss dem tschechoslowakischen Urheberschein No. 195 044 15 substituiert wurde, wurde analog wie in Beispiel 9 oxidiert.

Beispiel 11

Das Sorbens wurde analog wie in Beispiel 1 hergestellt, mit der Ausnahme, dass anstelle des Mischpolymerisates 20 von Äthylendimethacrylat und Hydroxyäthylmethacrylat ein Mischpolymerisat von Hydroxyäthylacrylat mit Äthylen-diacrylat von 500 000 Dalton Molekulargewicht-Ausscheidungsgrenze angewandt wurde. Durch Testen der Wirkung durch Polyacrylamid mit einpolymerisiertem Allyl- α -D-glucosid wurde ein 5,3%iger Verlust festgestellt.