



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

263374

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 08 F 20/28,
C 08 F 20/22,
C 08 F 8/18,
B 01 J 20/26

(22) Prihlášené 24 04 87

(21) PV 2905-87.N

(40) Zverejnené 16 09 88

(45) Vydané 14 07 89

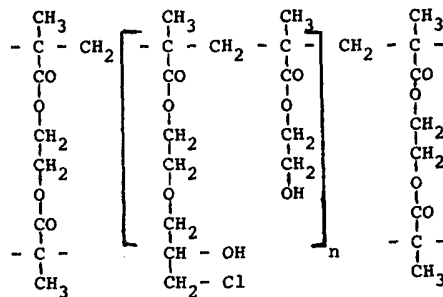
(75)

Autor vynálezu

KÉRY VLADIMÍR ing. CSc., TIHLÁRIK KAROL ing. CSc., BRATISLAVA

(54) 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného
poly-hydroxyetylmetakrylátu

2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu (vzorca I), ktorý je schopný viazať ligandy najmä typu sacharidov a amínov. Pripravuje sa zo sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu reakciou s chlormetyloxiránom v prostredí dioxánu a v prítomnosti kyseliny chloristej pri teplotách 95 až 102 °C. Jej uplatnenie je v oblasti biotechnológií a medicíny pri väzbe biologicky aktívnych látok, v afinitnej chromatografii enzýmov a nukleových kyselín a pri imobilizácii enzýmov.



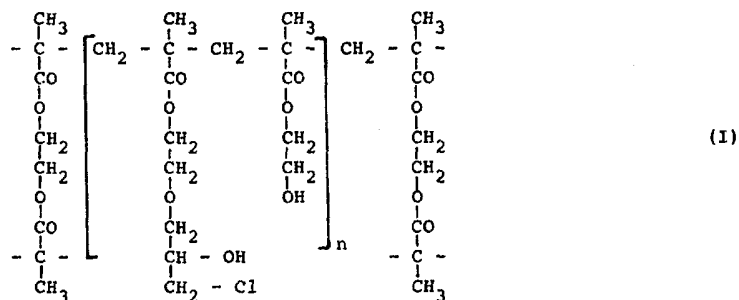
(I)

Vynález sa týka novej látky 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivátu sieťovaného poly-hydroxy-etylnetakrylátu.

Polyhydroxyetylnetakryláty (gély SPHERON) sú československé sorbenty, vyrábané radikálovou suspenznou polymerizáciou zmesi etyléndimetakrylátu, 2-hydroxy-etylnetakrylátu v cykloheanole alebo dodekanole /Lím.D., Čoupek J., Křivánková M., Pokorný S., Čsl. AO 150 819 (1973)/. Zmenou zloženia dispergovanej organickej fázy je možné v ňom meniť rozmer a objem pórov, hodnotu mernej povrchu, obsah reaktívnych skupín a ďalšie parametre /Švec F., Hradil J., Čoupek J., Kálal J., Angew. Makromol. Chem., **48**, 135 (1975)/. Sieťované poly-hydroxyetylnetakryláty sa využívajú ako materiály pre gélovú chromatografiu /Vondruška M., Šudřich M., Mládek M., J. Chromatogr. **116**, 457 (1976)/. Primárne hydroxylové skupiny možno rôznym spôsobom modifikovať za vzniku derivátov sieťovaného poly-hydroxyetylnetakrylátu s využitím ako ionomeniče /Mikeš O., Štrop P., Čoupek J., J. Chromatogr. **153**, 23 (1978)/, chelátové iontomeniče a selektívne sorbenty /Slovák Z., Toman J., Z. Anal. Chem. **278**, 115 (1976)/, nosiče pre afinitnú chromatografiu /Filka K., Čoupek J., Kocourek J., Biochim. Biophys. Acta, **539**, 518 (1978)/ alebo imobilizáciu enzýmov a iných biologicky aktívnych látok /Čoupek J., Turková J., Valentová O., Labský J., Kálal J., Biochim. Biophys. Acta, **481**, 289 (1977)/.

V súčasnosti sa v n.p. LACHEMA Brno vyrábajú sieťované poly-hydroxyetylnetakryláty a ich deriváty pod obchodným názvom SPHERON o rôznom zrení a rôznej porozite. Sú známe tieto deriváty: dietylamoetyl, karboxymetyl a jeho hydrazid, aminoaryl, p-nitrofenoxycarbonylmetyl, aminoaryl, oxín (8-hydroxychinolín viazaný azoväzbou), salicyl, tio. Z nich aminoaryl, hydrazid, p-nitrofenoxycarbonylmetyl a 1,2-epoxypropyl sa môžu uplatniť ako nosiče biologicky aktívnych látok. Ich nevýhodou je, že pred viazaním biologicky aktívnej látky vyžadujú buď ďalšiu aktiváciu s nebezpečením výbuchu (aminoaryl a hydrazido deriváty sa po reakcii s kyselinou dusitou prevedú na reaktívne, výbušné azoderiváty), obsahujú hydrofóbnu chromoforickú skupinu, ktorá sa môže na nosič sorbovať nešpecificky a skresľovať výsledky viazania (p-nitrofenoxycarbonylmetylderiváty), alebo obsahujú reaktívnu skupinu, ktorá sa časom môže rozložiť reakciou so vzdušným kyslíkom alebo vzdušnou vlhkosťou (1,2-epoxypropyl deriváty).

Uvedené nedostatky rieši tento vynález, ktorého podstatou je 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného poly-hydroxyetylnetakrylátu obecného vzorca (I).



Vzhľadom k tomu, že sa jedná o sieťovaný produkt, nedá sa presná hodnota indexu n stanoviť.

Oproti doteraz syntetizovaným derivátom má jeho použitie výhodu v tom, že pred viazaním ligandu nevyžaduje nijakú aktiváciu a ani neuvoľňuje sorbovateľný chromofor. Množstvo naviazaného ligandu možno sledovať acidobázickou titráciou. Látka podľa vynálezu je podstatne stabilnejšia ako príslušný 1,2-epoxypropylový derivát sieťovaného poly-hydroxyetylnetakrylátu, u ktorého časom dochádza k poklesu obsahu reaktívnych epoxidových skupín. Reaktivita chlôru v molekule látky podľa vynálezu je súčasne dostatočná, aby bolo možné viazanie cez primárne, prípadne sekundárne hydroxylové a aminosé skupiny, prípadne hydrazínové skupiny. Navyše, kým 1,2-epoxypropylový derivát sieťovaného poly-hydroxyetylnetakrylátu reaguje v dôsledku

vysokej reaktivity oxiránu s polyfunkčnými látkami typu bielkovín nešpecificky s viacerými typmi funkčných skupín naraz, látka podľa vynálezu reaguje v mierne alkalickom prostredí selektívnejšie.

Nová chemická látka, 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného polyhydroxyetylmetakrylátu sa pripravuje zo známeho sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu reakciou s chlórmetyl--oxiránom v prostredí diosánu v prítomnosti kyseliny chloristej. Kyslá katalýza zabezpečuje vysokú účinnosť reakcie s potláča vznik nežiadúcich vedľajších produktov.

Pr í k l a d 1

2 g sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu (Spheron-300, o zrní 0,063-0,100 mm) sa suspenduje v 20 ml diosánu. K zmesi sa postupne pridá 20 ml chlórmetyloxiránu a oddelene pripravená zmes 1 ml HClO_4 (70 %) a 5 ml diosánu. Nakoniec sa k zmesi pridá 1 ml vody a zmes sa zahrieva pod spätným chladičom za miešania pri teplote 95 až 97 °C 4 hodiny. Po skončení reakcie a ochladení na teplotu 20 až 25 °C sa k zmesi pridá 20 ml acetónu. Po premiešaní a odfiltrovaní sa zmes suspenduje v 20 ml acetóne, odfiltruje a premyje 20 ml acetónu a vysuší sa na vzduchu 24 hodín. Hmotnosť produktu: 2,0 g, obsah chlóru 7,50 % hmotnostných.

Pr í k l a d 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije 30 ml chlórmetyloxiránu a 1,5 ml vody a 2,0 ml HClO_4 (70 %). Reakčná doba bola pri teplote 102 °C 8 hodín. Výťažok: 1,8 g, obsah chlóru 8,7 % hmotnostných.

Pr í k l a d 3 - aplikačný

2 g 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivátu sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu (Spheron-300, o zrní 0,020-0,040 mm), pripraveného podľa príkladu 1 sa suspenduje v 5 ml 0,1 mol.l⁻¹ uhličitanu sodného, pH 10,0 a nechá stáť pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Potom sa pridá 5 ml 10 %-ného roztoku manánu, izolovaného z bunkových stien *Saccharomyces cerevisiae* v tom istom tlmivom roztoku a inkubuje sa na trepačke pri 40 °C 6 hodín. Potom sa nosič premyje vodou, 2 mol.l⁻¹ NaCl, vodou, etanolom, acetónom a vysuší sa. Obsah naviazaného manánu sa stanovil fenolsírovou metódou a bol 13,5 μmol na gram suchého nosiča. Takto pripravený nosič môže slúžiť na izoláciu a purifikáciu mananáz, manozidáz alebo lektínov, špecifických na manózu z rôznych biologických zdrojov.

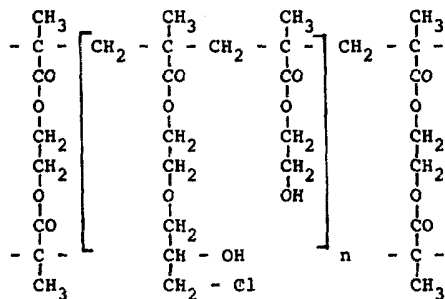
Pr í k l a d 4 - aplikačný

2 g 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivátu sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu, pripraveného podľa príkladu 1 sa suspendovalo v 5 ml 0,1 mol.l⁻¹ uhličitanu sodného pH 9,0 a nechalo stáť pri laboratórnej teplote 2 h. Potom sa pridalo 5 ml roztoku trypsínu z býčieho pankreasu o koncentrácii 20 mg.ml⁻¹ a enzýmovej aktivite 670 nkat.mg⁻¹ (stanovené na N-benzoyl--arginín-etyléster ako substrát pri 25 °C podľa /Kézdy a kol., Biochemistry 4, 2 303, (1965)/ v tom istom tlmivom roztoku a suspenzia sa pri laboratórnej teplote inkubovala za miešania 24 hodín. Potom sa nosič premyl 2 mol.l⁻¹ chloridom sodným, TRIS-HCl tlmivým roztokom, pH 8,2 a stanovila sa aktivita imobilizovaného enzýmu ako i koncentrácia bielkovín v supernatante po imobilizácii. Z úbytku bielkovín v supernatante po imobilizácii sa usúdilo, že na nosiči je naviazaných 25 mg bielkovín na 1 g nosiča (suchého) a enzýmová aktivita bola 469 nkat.mg⁻¹ imobilizovanej bielkoviny, t.j. účinnosť imobilizácie, vzťahnutá na enzýmovú aktivitu trypsínu bola 70 %. Imobilizovaný trypsin možno využiť na izoláciu jeho inhibitora zo séra cicavcov, alebo na špecifické štiepenie bielkovín, alebo na syntézu peptidickej väzby.

Nová chemická látka 2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného polyhydroxyetylmetakrylátu má použitie v biotechnológiach amedicíny pri väzbe biologicky aktívnych látok typu sacharidov alebo amínov v afinitnej chromatografii enzýmov, lektínov a nukleových kyselín a pri imobilizácii enzýmov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

2-hydroxy-3-chlórpropyl derivát sieťovaného poly-hydroxyetylmetakrylátu obsahujúci opakujúce sa jednotky vzorca I



(I).