



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

211176

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 29 05 80
(21) (PV 3770-80)

(40) Zverejnené 30 06 81

(45) Vydané 15 03 84

(51) Int. Cl.³

C 12 N 11/14

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEDNICA, NOVÁK IVAN ing. CSc., BEREK DUŠAN ing.
CSc., KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy nosičov biologicky aktívnych látok o vysokej väzobnej kapacite

Vynález sa týka spôsobu prípravy nosičov biologicky aktívnych látok o vysokej väzbovej kapacite. Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa xerogél kyseliny kremičitej, vzniknutý polymerizáciou okyslených vodných roztokov kremičitanov alkalických kovov upraví v prvom stupni anorganickými kyselinami, v druhom stupni sa získaný xerogél premyje vodou a postupne rozpúšťadlami s klesajúcou polaritou, v treťom stupni sa zbaví organických rozpúšťadiel, vysuší a vyžíha na čo sa v štvrtom stupni nechá vysušený xerogél reagovať s aminoalkylsilánom a získaný aminoalkylsilán sa aktivuje pre reakciu s biologicky aktívnymi látkami. Biologicky aktívne látky imobilizované na nosičoch o vysokej väzbovej aktivite majú použitie na prípravu imobilizovaných enzýmov, na imobilizáciu afinitných sorbentov, buniek, lektínov a imunochemicky aktívnych látok, vhodných pre použitie v analytike, medicíne a katalýze enzýmových procesov.

Vynález sa týka spôsobu prípravy enzýmových nosičov, nosičov afinantov a ďalších biologicky aktívnych látok s vysokou väzobnou aktivitou.

Príprava nosičov biologicky aktívnych látok za účelom imobilizácie enzýmov a kovalentného viazania afinantov je dôkladne opísaná napr. v *Methods in Enzymology* Vol. XLIV, *Immobilized Enzymes*, Ed. Klaus Morbach, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976 alebo Jaroslava Turková: *Affinity Chromatography*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York, 1978. Organické látky, napr. celulóza, polyamidy, polyakrylamid a pod. majú ako nosiče isté nevýhody, nakoľko nemajú dostatočnú mechanickú stabilitu, sú stlačiteľné a nemôžu sa použiť za vyšších tlakov a sú citlivé na zmeny rozpúšťadiel, voči zmenám pH a ionovej sily a sú biodegradabilné. Z toho dôvodu sa častokrát uprednostňujú látky anorganického pôvodu s biologicky aktívnymi látkami viazanými kovalentnou väzbou pomocou špecifických funkčných skupín.

Z anorganických materiálov ako nosiče sú popisované kysličníky hliníka, niklu, titánu, železa, zirkonu, ďalej hydroxyapatit, kremičitany a porézne sklo /*Methods in Enzymology*, Vol. XLIV, uvedené z hora/. Nevýhodou uvedených materiálov je ich pomerne nízky merný povrch /do 100 m²/g/, v prípade kysličníkov kovov neinertnosť povrchu a konečne pomerne vysoké výrobné náklady, ktoré nosiče na báze skla o kontrolovanej veľkosti pórov robia ťažko prístupnými pre širšie technologické využitie. Nakoľko nosiče anorganického pôvodu nemajú funkčné skupiny schopné bezprostrednej chemickej reakcie s enzýmom, afinantom a ďalšími biologicky aktívnymi látkami, je nutná ich úprava, napr. pomocou aminoalkylsilánov, čím sa na povrch generujú organické funkčné skupiny /napr. alkylamín/. Stupeň substitúcie nosičov anorganického pôvodu organickými funkčnými skupinami je závislý od počtu reakcijschopných anorganických funkčných skupín. Počet reakcijschopných anorganických funkčných skupín je úmerný mernému povrchu enzýmového nosiča. Tak napr. stupeň alkylaminosilánu u /CPG 10-2 000/, skla s kontrolovanou veľkostí pórov o mernom povrchu 12,5 m² a strednej veľkosti pórov 120 nm je 80 mol/kg. Je však dôležité, aby nedošlo u nosičov s vysokým špecifickým povrchom ďalšou úpravou k zhoršeniu mechanických vlastností natoľko, aby sa nedali uplatniť v rámci technologického procesu.

Značná časť - SiOH skupín je pre viazanie enzýmov nevyužiteľná z priestorových dôvodov lebo sa nachádza v mikropóroch. Objem pórov nosičov na báze silikagelu alebo pórovitého skla málokedy presahuje 1 cm³/g. Z uvedených dôvodov je väzbová kapacita anorganických nosičov pre enzýmy obvykle pomerne nízka. Príprava anorganických nosičov biologicky aktívnych látok o vysokej väzbovej kapacite, ktorá odstraňuje zhora uvedené nedostatky nosičov anorganického pôvodu je zahrnutá v predkladanom vynáleze.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa vlhký xerogél kyseliny kremičitej, vzniknutý polymerizáciou okyslených vodných roztokov kremičitanov alkalických kovov upravuje v prvom stupni anorganickými kyselinami, s výhodou kyselinou sírovou, alebo kyselinou chlór vodíkovou alebo kyselinou dusičnou alebo kyselinou fosforečnou alebo organickými kyselinami, ako napr. kyselinou trichlór octovou a v druhom stupni sa získaný xerogél premýva najprv vodou a postupne rozpúšťadlami s klesajúcou polaritou s výhodou etanolu a acetónu, načo sa produkt v treťom stupni zbaví organických rozpúšťadiel, vysuší a vyžiha pri teplotách 200 až 900 °C, s výhodou pri teplote 700 až 750 °C, načo sa v štvrtom stupni vysušený xerogél nechá reagovať s aminoalkylsilánom /s výhodou gama-aminopropyltriethoxysilánom/ pri teplote 100 až 110 °C, po dobu 2 až 10 hodín a získaný aminoalkylsilán sa aktivuje známymi postupmi pre reakciu s biologicky aktívnymi látkami.

Výhodou postupu prípravy nosičov biologicky aktívnych látok podľa uvedeného vynálezu je:

- vysoký objem pórov a koncentrácia - SiOH skupín, ktoré rezultujú vo
- vysoký stupeň substitúcie silikagelu organickými funkčnými skupinami /až 1,76 mol/kg/
- vyhovujúce mechanické vlastnosti pre násadové aj kolónové použitie, včítane vysokotlakových kolón
- nízke výrobné náklady a tomu zodpovedajúca nízka cena pripraveného nosiča.

Príklady prevedenia

P r í k l a d 1

200 ml vodného roztoku kremičitanu sodného /vodného skla/ o obsahu 9,20 % hmot. SiO_2 sa zmieša so 130 ml 3 % hmot. kyseliny dusičnej a zhomogenizuje sa. Vzniknutá zatuhnutá masa hydrogél kyseliny kremičitej sa mechanicky rozruší a rozmieša s 250 ml 65%-nej kyseliny dusičnej alebo 180 ml konc. kyseliny sirovej alebo 300 ml 55 % hmot. kyseliny fosforečnej alebo 200 g kyseliny trichlóroctovej a ponechá sa za občasného zamiešania do druhého dňa, keď sa zmes zriedi destilovanou vodou, sfiltruje a dokonale premyje destilovanou vodou do neutrálnej reakcie, načo sa ďalej premýva postupne etylakoholom a nakoniec acetónom. Materiál sa zbaví zvyšku organických rozpúšťadiel vysušením a stabilizuje sa pri teplotách 200 až 900 °C, s výhodou pri 700 až 750 °C.

Získaný silikagel /10 g/ s vysokýmmerným povrchom /500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ a s objemom pórov 2 až 3 ml g^{-1} / a s priemernými rozmermi pórov 20 nm, sa temperoval po dobu 10 hodín pri teplote 550 °C. Aktivovaný silikagel /10 g/ sa použil na silanizáciu, ktorá sa vykonala v 10%-nom roztoku gama-aminopropyltriethoxysilánu v toluéne /100 ml/, pri teplote 110 °C, po dobu 10 hodín. Produkt sa po silanizácii premýval nadbytkom toluénu /600 ml/ a v ďalšom nadbytku toluénu /400 ml/ sa získaný produkt zahrieval po dobu 4 hodín pri 110 °C za účelom dokonalejšej extrakcie nezreagovaného gama-aminopropyltriethoxysilánu. Premytý derivát silikagelu sa sušil cez noc pri teplote 100 °C a charakterizoval na obsah primárnych aminoskupín pomocou metódy využívajúcej 2,4,6-trinitrobenzénsulfonovú kyselinu /H. Wand, M. Rudel, H. Dantzberg, Z. Chemie, 18, 224, 1978/. Obsah primárnych aminoskupín bol 1,42 mol/kg. Silikagel s primárnymi aminoskupinami /10 g/ sa nechal ďalej reagovať s tiofosfénom. /Použil sa 10%-ný roztok tiofosfénu v 200 ml chloroformu/ pri teplote 100 °C cez noc. Derivatizovaný silikagel sa premyl nadbytkom 800 ml chloroformu a vysušil. Primárne aminoskupiny sa previedli kvantitatívne na izotio- kyanátové funkčné skupiny, čomu zodpovedá väzbová kapacita modifikovaného silikagelu voči /U- ^{14}C / L-cysteínu /1,41 mol/kg/ a /U- ^{14}C / L-valínu /1,36 mol/kg/.

Takto pripravený nosič možno použiť na imobilizáciu biologicky aktívnych látok, napr. enzýmov. Tak pseudocholinesteráza /acetylcholin acyl hydroláza, EC 3.1.1.8/ z konskej plazmy /0,5 g; 2 $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ / sa rozpustila v 200 ml 0,02 M borátového pufru /pH 8,5/ a pridalo sa 10 g polyizotio- kyanátového derivátu silikagelu. Imobilizácia sa vykonala za miešania po dobu 4 hodín pri teplote miestnosti. Nezreagovaný rozpustný enzým sa vymyl 2 M NaCl /500 ml/. Imobilizovaný enzým si podržal aktivitu 71 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ vo zvlhčenom stave pri teplote 4 °C po dobu 60 dní.

P r í k l a d 2

Silikagél /10 g/ obsahujúci primárne aminoskupiny, pripravený tak, ako je uvedené v príklade 1 sa homogénne zalial 2 ml vody a pridalo sa 10 ml 2-chlórmetylaxiránu. Reakcia prebiehala 3 hodiny pri izbovej teplote a potom 30 minút pri 40 °C. Reakčný produkt sa premyl etanolom, vysušil a charakterizoval sa obsah oxiranových funkčných skupín 1,2 mol/kg. Takto pripravený nosič /10 g/ sa použil k imobilizácii pseudocholinesterázy z konskej plazmy /0,5 g; 2 $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ / rozpustený v 200 ml 0,02 M borátového pufru /pH 8,5/. Imobilizácia sa vykonala za pretrepávania na mechanickej trepačke 4 hodiny pri teplote miestnosti. Nezreagovaný rozpustný enzým sa vymyl 2 M NaCl /500 ml/.

Imobilizovaný enzým si podržal aktivitu 67,5 $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ vo zvlhčenom stave pri 4 °C po dobu 90 dní.

P r í k l a d 3

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že reakcia silanizácie silikagélou pomocou gama-aminopropyltriethoxysilánu sa vykonala pri teplote 100 °C po dobu 2 hodín a získaný aminopropylderivát silikagélou s obsahom primárnych aminoskupín 1,76 mol/kg sa previedol v reakcii s tiofosfénom na polyizotiokyanát s obsahom izotiokyanátových skupín 1,66 mol/kg. Uvedený polyizotiokyanát silikagélou /1 g/ sa použil na reakciu s p-/omega-aminometyl/ fénylborónovou kyselinou /0,3 g/ a získaný borónový derivát silikagélou sa použil na afinitnú sorbciu enzýmov so serínom v aktívnom centre.

P r í k l a d 4

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že na reakciu silanizácie sa použil silikagél s merným povrchom 30 m²/g. Obsah primárnych aminoskupín v získanom alkylaminosiláne bol 0,22 mol/kg. Získaný aminoalkylsilikagél /10 g/ sa nechal reagovať s anhydridom kyseliny jantárovej /3 g/ v chloroforme /200 ml/ pri teplote 80 °C po dobu 2 hodín. Reakčný produkt sa premyl vo vode /500 ml/ a v acetóne /300 ml/ a vysušil. Ďalšia modifikácia silikagélou, obsahujúceho voľné karboxylové skupiny /0,19 mol/kg/ sa vykonala v 2%-nom vodnom roztoku 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoetyl)karbodiimidu o pH 4,8 za miešania pri izbovej teplote po dobu 1 hodiny. Získaný derivatizovaný silikagél sa premyl 4 razy vodou /500 ml/ a imobilizácia pseudocholínesterázy sa vykonala rovnako, ako je uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že teplota pri reakcii sa udržiavala v rozmedzí 0 až 2 °C.

Aktivita imobilizovanej pseudocholínesterázy bola 52 μ kat . g⁻¹.

P r í k l a d 5

Tak ako uvedené v príklade 1, s tým rozdielom, že namiesto pseudocholínesterázy sa použila glukooamyláza /alfa-1,4-glukan glukohydroláza, EC, 3.2.1.3/ z Endomycopsis bispora.

Aktivita imobilizovaného enzýmu bola 60,2 μ kat . g⁻¹.

Biologicky aktívne látky imobilizované na uvedených nosičoch o vysokej väzbovej kapacite vyznačené tým, že vlhký xerogél kyseliny kremičitej, vzniknutý polymerizáciou okyslených vodných roztokov kremičitanov alkalických kovov sa upravuje v prvom stupni anorganickými kyselinami, s výhodou kyselinou sírovou, alebo kyselinou chlorovodíkovou alebo kyselinou dusičnou alebo kyselinou fosforečnou alebo organickými kyselinami, s výhodou s kyselinou trichlóroctovou a v druhom stupni sa získaný xerogél premýva najprv vodou a postupne rozpúšťadlami s klesajúcou polaritou s výhodou etylalkoholu a acetónu, načo sa produkt v treťom stupni zbaví organických rozpúšťadiel, vysuší a vyžíha pri teplotách 200 až 900 °C, s výhodou pri teplote 700 až 750 °C, načo sa v štvrtom stupni vysušený xerogél nechá reagovať s aminoalkylsilánom s výhodou s gama-aminopropyltriethoxysilánom pri teplote 100 až 110 °C, po dobu 2 až 10 hodín a získaný aminoalkylsilán sa aktivuje známymi postupmi pre reakciu s biologicky aktívnymi látkami.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy nosičov biologicky aktívnych látok o vysokej väzbovej kapacite vyznačený tým, že vlhký xerogél kyseliny kremičitej, vzniknutý polymerizáciou okyslených vodných roztokov kremičitanov alkalických kovov sa upravuje v prvom stupni anorganickými kyselinami, s výhodou kyselinou sírovou, alebo kyselinou chlorovodíkovou alebo kyselinou dusičnou alebo kyselinou fosforečnou alebo organickými kyselinami, s výhodou s kyselinou trichlóroctovou a v druhom stupni sa získaný xerogél premýva najprv vodou a postupne rozpúšťadlami s klesajúcou polaritou s výhodou etylalkoholu a acetónu, načo sa produkt v treťom stupni zbaví organických rozpúšťadiel, vysuší a vyžíha pri teplotách 200 až 900 °C, s výhodou pri teplote 700 až 750 °C, načo sa v štvrtom stupni vysušený xerogél nechá reagovať s aminoalkylsilánom s výhodou s gama-aminopropyltriethoxysilánom pri teplote 100 až 110 °C, po dobu 2 až 10 hodín a získaný aminoalkylsilán sa aktivuje známymi postupmi pre reakciu s biologicky aktívnymi látkami.