

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203539
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 06 11 78
(21) {PV 7229-78}

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 01 83

(51) Int. Cl.³
A 61 K 37/32

(75)

Autor vynálezu

KROJIDLO MILAN prom. chem. CSc., FLEGEL MARTIN RNDr. CSc. a
KOLÍNSKÝ JIŘÍ ing., PRAHA

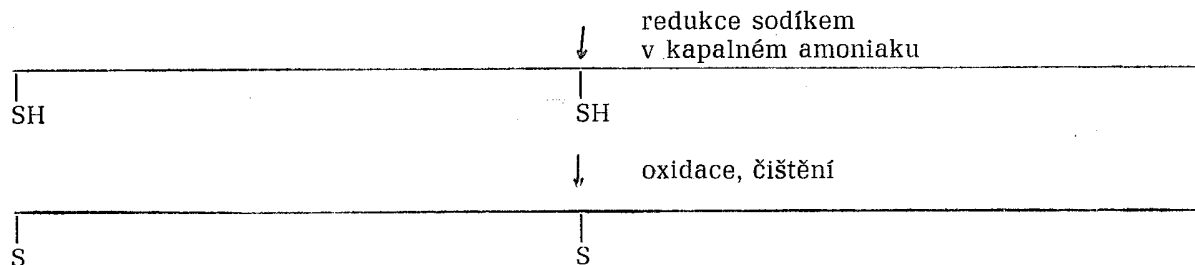
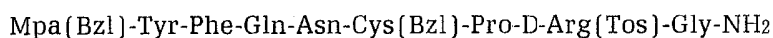
(54) Způsob čištění neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů

1

Vynález se týká způsobu čištění neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů. Jak známo, využívá se těchto novodobých léčiv ve stále širší míře v humánním i veterinárním lékařství, a to ve formě preparátů připravovaných ze substancí získaných metodami syntézy peptidů. Jedním z kvalitativních požadavků je standardní čís-

2

tota. Syntéza neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů je mnohastupňový proces, v jehož závěru jsou z chráněného prekursoru odštěpeny chránicí skupiny a je proveden oxidativní uzávěr disulfidického můstku podle následujícího schématu (závěrečné stupně syntézy 1-desamino-8-D-arginin-vasopressinu):



Závěrečný stupeň je v principu u všech látek uvedeného typu stejný nebo velmi podobný.

Při procesu probíhá obvykle i řada vedlejších reakcí a surový produkt bývá kontaminován velkým množstvím solí. K čištění produktů byla dosud používána beznosičová elektroforéza, protiproudne roztřepávání a různé způsoby gelové chromatografie.

Nevýhodou elektroforetických postupů je zatím jejich poměrně malá kapacita, nezbytnost pracovat v nepřetržitém provozu, potřeba speciálně školených pracovníků, kteří jsou vystaveni riziku práce s vysokým napětím (4000 V). Při poruše přístroje může dojít ke ztrátě velmi drahého materiálu.

Technika protiproudneho roztřepávání

vyžaduje použití obtížně dostupného a velmi drahého přístroje. Čištění trvá značně dlouho, zejména při práci ve velkém objemu. Po provedené operaci je nutno průběh čištění komplikovaným způsobem vyhodnotit.

Při využití gelové filtrace dochází za obvykle užívaných podmínek k částečné (někdy ireverzibilní) adsorpci materiálu na sloupci gelu. Provádí-li se gelová chromatografie ve dvoufázovém systému, jsou produkty obvykle kontaminovány pyridinacetátem, který je možno dokonale odstranit jen zařazením další čisticí operace. Postup je sice účinný, vyžaduje však náročnou přípravu gelového sloupce. Vyhodnocení průběhu čištění je pracné a výtěžky jsou nízké.

Ve všech případech, s výjimkou protiproudného roztřepávání, je jednou z podmínek úspěchu při čištění dokonale odsolení surového materiálu. To se provádí obvykle buď na sloupci gelu, nebo pomocí ionexu. Při odsolení na sloupci gelu je nutno produkt rozpuštěný ve velkém objemu vody nejprve izolovat odpařením. U některých peptidů je tento způsob odsolení výhodnější než ionexová chromatografie, jejíž použití je omezeno adsorpčními schopnostmi látek a velmi závisí na přesném dodržení pracovního postupu.

K zajištění standardní čistoty syntetických substancí neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů bylo zapotřebí nalézt a vypracovat čisticí postup dostatečně šetrný a jednoduchý a se zřetelem na objem výroby s velikou a plynule měnitelnou kapacitou, jenž by ovšem neměl nevýhody čisticích metod dosavadních.

Zmíněným požadavkům odpovídá způsob čištění neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů, obsažených v reakčním roztoku po odštěpení chránicích skupin a po oxidaci, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se reakční roztok nejprve zbaví solí, s výhodou stykem s karboxylátovým katexem na bázi kopolymeru styrenu s divinylbenzenem nebo s prokřídleným dextranem nesoucím karboxylové skupiny, potom se žádaný produkt vymývá koncentračním gradientem kyseliny octové od 0,25 až do 60% hmot., frakce obsahující produkt se zbaví vody, s výhodou lyofilizací, získaný produkt se opět rozpustí v 5 až 20% kyselině octové na roztok o koncentraci 3 až 5% hmot. a tento roztok se po odstranění mechanických nečistot zbaví nežádoucích podílů adsorpční rozdělovací chromatografií na molekulárním síti, s výhodou typu zesíťovaného dextranu, s dělicí schopností pro látky s molekulární hmotností od 100 do 1500, načež se frakce eluuje zředěnou kyselinou octovou v koncentraci 5 až 60% hmot., s výhodou 20% hmot. a frakce obsahující produkt se zpracují, například lyofilizací.

Způsob podle vynálezu v sobě spojuje

výhody ionexové chromatografie a molekulárních sítí typu dextranového gelu, zejména při použití diskontinuálního koncentračního gradientu kyseliny octové po odsolení a čištění. Hustě síťované gely obsahují větší množství karboxylových skupin (některé druhy představují slabě kyselý katex obsahující na dextranové matici vázané methylenkarboxylové skupiny), které látky uvedeného typu silně adsorbují. Při frakcionaci lze této vlastnosti využít a pracovat za podmínek, kdy se adsorpcí a síťovací schopností materiálů vhodně doplňují. Je to patrné u některých typů dextranových gelů v oblasti pH, kdy se již prakticky neuplatňují jejich ionexové vlastnosti (oblast pH 1,5 až 2,5), při použití 15 až 30% kyseliny octové k eluci peptidu. Jde tedy v tomto případě o adsorpční rozdělovací chromatografii.

Při kombinaci ionexové chromatografie a adsorpční chromatografie na molekulárním síti způsobem podle vynálezu, je odstraněna většina nevýhod výše zmíněných postupů. Způsob podle vynálezu je šetrný, má značnou, plynule měnitelnou kapacitu, je velmi jednoduchý, jeho pracnost je ve srovnání s ostatními postupy zanedbatelná a je maximálně sníženo riziko ztráty materiálu. Další předností je bezpečnost, nízké nároky na kvalifikaci obsluhy a na energii.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou patrné z příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklady provedení

Příklad 1

Odsolení a čištění 1-desamino-8-D-arginin-vasopressinu

a) Reakční roztok po oxidaci, který obsahuje 1-desamino-8-D-arginin-vasopressin, smích vedlejších produktů a solí ve 30 litrech vody (pH asi 4,5), se přečerpává přes kolonu slabě kyselého katexu v H^+ -cyklu (objem katexu 2,0 až 2,5 litru). Při této operaci se látka zachytí na sloupci, soli protékají a odvádějí se do odpadu. Kolona se pak promývá koncentračním gradientem kyseliny octové od 0,25 až do 60 procent hmotn. Sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát obsahující produkt se zbaví vody, nejlépe lyofilizací. Získá se asi 10 g odsoleného produktu.

b) Reakční roztok jako výše se na odparce zahustí na objem 2,5 až 5,0 litru a lyofilizuje. Získaná směs peptidů a solí (150 až 300 g) se rozmíchá se 400 až 600 mililitry 50% kyseliny octové, zfiltruje se a filtrát se nanese na kolonu molekulárního síto sypu dextranového gelu (objem gelu 7 litrů), ekvilibrovaného v 50% kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou

rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát se lyofilizuje. Získá se asi 10 g odsoleného produktu.

c) Odsolený produkt se rozpustí na 3 až 5% roztok v 1 M kyselině octové, zfiltruje se a nanese na kolonu molekulárního síta (10×100 cm), ekvilibrovaného v 1 M kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se dále zpracují například lyofilizací. Získají se asi 3 g 100% peptidu.

d) Odsolený produkt se rozpustí na 3 až 5% roztok ve 20% kyselině octové a nanese se na 2 litry dextranového gelu ekvilibrovaného ve 20% kyselině octové. Kolona se eluuje buď 20% kyselinou octovou nebo koncentračním gradientem kyseliny octové od 20 do 70 % hmotn. Sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se dále zpracují například lyofilizací. Získají se asi 3 g 100% peptidu.

Stanovení obsahu:

a) z UV spektra minimálně 70 %

b) podle obsahu dusíku 13,5 — 18,34 % N

Optická otáčivost:

$(\alpha)_D^{20} - 62,0$ (c 0,1 M kys. octová)

Aminokyselinová analýza:

Phe 1,02, Tyr 0,84, Gly 1,00, Pro 0,95,

Glu 1,04, Asp 0,98, Arg 1,01,

Cys — nestanovuje se

Příklad 2

Odsolení a čištění oxytocinu

a) Reakční roztok po oxidaci, který obsahuje směs oxytocinu, peptidů a solí ve 2 litrech vody (pH asi 4,5), se zahustí na objem 200 ml a lyofilizuje. Získaná směs peptidů a solí (7 g) se rozmíchá s 20 až 30 ml 50% kyseliny octové, zfiltruje a filtrát se nanese na 500 ml dextranového gelu, ekvilibrovaného v 50% kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 60 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát obsahující produkt prostý solí se lyofilizuje. Získá se 1 g odsoleného produktu. Ten se rozpustí na 3 až 5% roztok v 1 M kyselině octové, který se zfiltruje a nanese na kolonu dextranového gelu (3×100 cm) ekvilibrovaného v 1 M kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 15 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se lyofilizují. Získá se 0,65 g produktu.

Stanovení obsahu:

a) UV spektra 89 % (e 15,76, voda pH 3,3, HCl)

b) podle obsahu dusíku 13, 63 %

Optická otáčivost:

$(\alpha)_D^{20} - 23,4$ (c 0,1 1 M kys. octová)

Aminokyselinová analýza:

Gly 0,93, Leu 0,97, Pro 0,97, Asp 1,00,

Glu 1,05, Ile 1,05, Tyr 0,93, 1/2 Cys 1,93

Příklad 3

Odsolení a čištění metyloxytocinu

a) Reakční roztok po oxidaci, který obsahuje směs metyloxytocinu, peptidů a solí ve 20 litrech vody (pH asi 4,5) se přecherpává přes kolonu slabě kyselého katechu v H^+ -cyklu (objem 2 až 3 litry). Při této operaci se látka zachytí na sloupci, soli protékají a odvádějí se do odpadu. Kolona se pak promývá koncentračním gradientem kyseliny octové od 0,25 až do 60 % hmotn. Sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát obsahující produkt se dále zpracuje například lyofilizací. Získají se asi 4 g produktu prostého solí.

b) Reakční roztok po oxidaci, který obsahuje metyloxytocin, různé vedlejší produkty a soli v 60 litrech vody (pH asi 4,5) se zahustí na objem 2,5 až 5,0 litrů a lyofilizuje. Získaná směs látek (150 až 300 g) se rozmíchá se 400 až 800 ml 50% kyseliny octové, zfiltruje se a filtrát se nanese na kolonu s obsahem 7 litrů dextranového gelu, ekvilibrovaného v 50% kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát obsahující odsolený produkt se lyofilizuje. Získá se 20 g odsoleného produktu. Celé toto množství se rozpustí na 3 až 5% roztok v 1 M kyselině octové, zfiltruje se a nanese se na kolonu dextranového gelu (10×100 cm), ekvilibrovaného v 1 M kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se pak zpracují například lyofilizací. Získá se asi 6 g produktu.

Stanovení obsahu:

a) UV spektrum 88,6 % (e 15,76, voda, pH 3,3, HCl)

b) podle obsahu dusíku 15,0 %

Optická otáčivost:

$(\alpha)_D^{20} - 18,9$ (c 0,15, 1 M kys. octová)

Aminokyselinová analýza:

Asp 0,98, Glu 1,02, Pro 1,04, Gly 0,93,

Ile 0,93, Leu 1,02, Tyr 0,92, 1/2 Cys 1,90

Příklad 4

Odsolení a čištění (Gly.Gly.Gly.Cys¹.Lys¹)-vasopressinu

a) Reakční roztok po oxidaci s obsahem produktu, směsi peptidů a solí ve 30 litrech vody (pH asi 4,5) se přečerpává přes kolonu slabě kyselého katexu v H^+ —cyklu (objem katexu 2,0 až 2,5 litru). Při této operaci se žádaná látka zachytí na sloupci, soli protékají a odvádějí se do odpadu. Kolona se pak promývá koncentračním gradientem kyseliny octové od 0,25 až do 60 % hmotn. Sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát obsahující produkt se zpracuje lyofilizací. Získá se asi 10 g odsoleného produktu.

b) Reakční roztok jako výše se zahustí na objem 2,5 až 5,0 litrů a lyofilizuje. Získaná směs peptidů a solí (150 až 300 g) se rozmíchá se 400 až 600 ml 50% kyseliny octové, zfiltruje a filtrát se nanese na kolonu obsahující 7 litrů dextranového gelu ekvilibrovaného v 50% kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Eluát se lyofilizuje a získá se asi 10 g odsoleného produktu.

c) Odsolený produkt, získaný podle a) nebo b) se rozpustí v 1 M kyselině octové na 3 až 5% roztok, zfiltruje se a na-

nese na kolonu dextranového gelu (10 × 100 cm) ekvilibrovaného v 1 M kyselině octové. Eluuje se 20% kyselinou octovou rychlostí 300 až 500 ml/h a sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se dále zpracuje lyofilizací. Získají se asi 3 g 100% peptidu.

d) Odsolený produkt, získaný podle a) nebo b), se rozpustí ve 20% kyselině octové na 3 až 5% roztok a nanese se na kolonu obsahující 2 litry dextranového gelu ekvilibrovaného ve 20% kyselině octové. Kolona se eluuje buď 20% kyselinou octovou, nebo koncentračním gradientem kyseliny octové od 20 do 70 % hmotn. Sleduje se absorpce při 280 nm. Frakce obsahující dostatečně čistou látku se lyofilizují. Získá se kolem 3 g 100% peptidu.

Stanovení obsahu:

podle obsahu dusíku 13,5 — 18,25 % N

Optická otáčivost:

$(\alpha)_D^{20} = 95,0$ (c 0,2 1 M kys. octová)

Aminokyselinová analýza:

Lys 0,99, Phe 1,04, Tyr 0,90, Cys 1,72, Gly 4,03, Glu 1,01, Pro 1,06, Asp 0,98

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob čištění neurohypofyzárních hormonů a jejich analogů, obsažených v reakčním roztoku po odštěpení chránicích skupin a po oxidaci, vyznačující se tím, že se reakční roztok nejprve zbaví solí, s výhodou stykem s karboxylátovým katexem na bázi kopolymeru styrenu s divinylbenzenem nebo s zesíťovaným dextranem nesoícím karboxylové skupiny, potom se žádaný produkt vymývá koncentračním gradientem kyseliny octové od 0,25 až do 60 procent hmot. frakce obsahující produkt se zbaví vody, s výhodou lyofilizací, získaný

produkt se opět rozpustí v 5 až 20% kyselině octové na roztok o koncentraci 3 až 5 % hmot. a tento roztok se po odstranění mechanických nečistot zbaví nežádoucích podílů adsorpční rozdělovací chromatografií na molekulárním síti, s výhodou typu zesíťovaného dextranu, s dělicí schopností pro látky s molekulární hmotností od 100 do 1500, načež se frakce eluují zředěnou kyselinou octovou v koncentraci 5 až 60 % hmot., s výhodou 20 % hmot. a frakce obsahující produkt se zpracuje, například lyofilizací.