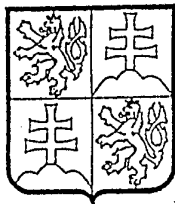


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

276 775

(21) Číslo přihlášky : 63-90.S

(22) Přihlášeno : 05 01 90

(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 13 08 91

(47) Uděleno : 24 06 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 12 08 92

(13) Druh dokumentu : D6

(51) Int. Cl.⁵ :

A 61 K 43/00

A 61 K 49/00

(73) Majitel patentu : ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ FARMAKOLÓGIE SAV,
BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : ŠOLTÉS LADISLAV ing. CSc.,
CHABREČEK PETER RNDr. CSc.,
KÁLLAY ZOLTÁN MUDr. CSc.,
GUTTMANN MICHAL JUDr. ing., BRATISLAVA,
HRADEC HYNEK ing.,
FILIP JIŘÍ ing. CSc., PRAHA

(54) Název vynálezu : Spôsob prípravy (³H) rádioizotopom znače-
ných frakcií kyseliny hyalurónovej alebo jej
solí

(57) Anotace :

Riešenie sa týka spôsobu prípravy (³H) rádioizotopom značených frakcií kyseliny hyalurónovej (HA) alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti. Postup spočíva v tom, že sa natívna HA alebo jej soľ označí (³H) rádioizotopom, zmeria sa rádioaktivita odobratej vzorky metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie (LSC). Následne sa HA alebo jej soľ nechá prechádzať cez vrstvu kationomeniča, s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelyulózy, a potom sa rozdelí na frakcie metódou vysokoúčinnnej gélovej permeačnej chromatografie a potom sa zmeria rádioaktivita odobratej vzorky príslušnej frakcie HA alebo jej solí metódou LSC. Produkt má vysokú rádiochemickú čistotu a vysokú mernú rádioaktivitu.

Vynález sa týka spôsobu prípravy (^3H) rádioizotopom značených frakcií kyseliny hyaluronovej alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti a hodnotenia kvality týchto látok.

Kyselina hyaluronová /HA/ a jej deriváty sú polysacharidy glykózaminoglykány zložené z opakujúcich sa jednotiek glukuronátu a N-acetylglukozamínu. Narastajúci záujem o výskum HA a jej derivátov je spôsobený rozširujúcim sa uplatnením radu preparátov s obsahom HA v oftalmológii, reumatológii, dermatológii a v ďalších odboroch medicínskej praxe. Možnosti rozšírenia aplikácii HA a jej derivátov závisia tiež od ďalšieho poznania ich biochémie v organizme živočíchov. Pre in vivo štúdie sa s výhodou používa rádioizotopom značená HA resp. jej deriváty. Tieto látky musia mať vysokú $\approx 95\%$ rádiochemickú čistotu a vysokú mernú rádioaktivitu. HA resp. jej soli je možné získať z tkaniva kohútich hrebienkov, z ľudskej pupočnej šnúry, zo sklovca alebo z priedušnice hovädzieho dobytku, ale z baktérií *Streptococcus zooepidemicus*. HA izolovaná z ktoréhokoľvek zdroja je štruktúrne identická, môže však byť izolovaná s variabilným stupňom čistoty i polymerizačného stupňa.

Na prípravu rádioaktívne značenej HA a jej derivátov sa využívajú dva spôsoby:

1. K danému biosyntetizujúcemu systému /bunky, tkaninové kultúry/ produkujúcemu HA sa pridávajú rádioaktívne prekursor /napr. (^3H)-, (^{14}C)- glukóza, N-acetylglukozamín/. Týmto spôsobom sa pripravila (^3H)- i (^{14}C)- značená HA s molekulovou hmotnosťou rádovo až 10^6 Da /Gallagher J.T. + kol.: Biochem. J. 148, 187, /1975/; Winterbourne D. J. + kol.: Biochem. J. 182, 707, /1979/; Underhill C.B., Toole B.P.: J. Cell Biol. 82, 475, /1979/).

Výhodou tejto metódy je, že sa získa HA s vysokou molekulovou hmotnosťou a použitím špecificky značených prekursorov môže byť rádioaktivita zavedená na špecifické miesto v molekule HA.

Nevýhodou tohto spôsobu prípravy rádioaktívnej HA je prácnosť izolácie značenej HA z reakčnej zmesi, potreba jej dočistenia od balastných rádioizotopom značených endogénnych látok, pomerne nízky rádiochemický výťažok, často nízka alebo neznáma merná rádioaktivita, prístrojová náročnosť.

2. Chemická metóda prípravy rádioaktívne značenej HA bola prvýkrát publikovaná v r.1982 /Hook M. + kol.: Anal. Biochem. 119, 236, /1982/, keď autori pripravili hyaluronovú kyselinu N-deacetyláciou natívnej HA hydrazinom a následnou N(^3H)-acetyláciou s (^3H)-acetanhydridom. Izolácia vysokomolekulovej frakcie (^3H)-hyaluronovej kyseliny od nízkomolekulových frakcií sa robila rovnovážnou dialýzou a gélovou chromatografiou. Touto metódou sa pripravila HA s mernou rádioaktivitou $(3-4) \times 10^5$ cpm/ μg kyseliny urónovej.

Nevýhodou tohto postupu je, že celý proces prípravy a izolácie (^3H)-hyaluronovej kyseliny je náročný vzhľadom na materiálne vybavenie i čas a poskytuje derivát s pomerne nízkou mernou rádioaktivitou.

Ďalšiu metódu na prípravu vysokomolekulovej HA /o mol. hmot. 3×10^5 Da/ značená trícium vypracovali Orlando a kol. /Orlando P. + kol.: J. Label, Comp. Radiopharm. 22, 961, /1985/). HA sa oxidovala jodistanom sodným a po vyčistení oxidačného produktu ultrafiltráciou a rovnovážnou dialýzou sa spätne redukovala s (^3H)- NaBH_4 . Po dočistení produktu rovnovážnou dialýzou a ultrafiltráciou sa získala (^3H)-hyaluronová kyselina s rádiochemickou čistotou 95 % a s mernou rádioaktivitou $\sim 5,55$ MBq/mg.

Nevýhodou tejto metódy je, že pri oxidácii sa znižuje molekulová hmotnosť HA a že ultrafiltrácia nie je najvhodnejšia, keďže biomakromolekuly často upchávajú póry v ultrafiltračných membránach.

Metóda, pri ktorej sa zachováva integrita molekuly HA po zavedení izotopu s vysokou mernou rádioaktivitou pozostáva z redukcie oligosacharidov HA pomocou NaBH_4 /modifikuje sa

iba koncový redukujúci cukor/, oxidácie vicinálnych hydroxylových skupín a reakcie s alkyldiamínmi a s Bolton-Hunterovým reagensom /N-sukcinimidyl-3-(4-hydroxyfenyl)propionát/. Výsledný hydroxyfenyl derivát HA sa ľahko rádioiodiduje s Na^{125}I na redukujúcom konci reťazca. Touto metódou možno získať oligosacharidy HA s mernou rádioaktivitou až 1000krát vyššou (Raja R.J. + kol.: Anal. Biochem. 139, 168, /1984/) ako udávajú autori vyššie opísaných metód.

Nevýhodou metódy je, že nie je vhodná pre polymérnu, ale iba pre oligomérnu HA.

Kyselinu hyalurónovú možno jednoducho previesť na kyselinu (^3H)-hyalurónovú izotopovou výmenou vodíkov za trícium vo vodnom roztoku za katalýzy Pd/CaCO_3 .

Derivát (^3H)-hyalurónovej kyseliny možno tiež pripraviť alkyláciou natívneho biopolyméru s (^3H)-metylbromidom s vysokou mernou rádioaktivitou /1,5 TBq/móll/, v prostredí kvapalného amoniaku pri nízkej teplote ($-33,5^\circ\text{C}$) bez špeciálnej úpravy východiskovej HA. Týmto spôsobom sa pripraví reakčná zmes s vysokou mernou rádioaktivitou, z ktorej sa vysokomolekulový derivát ^3H -hyalurónovej kyseliny, resp. jeho frakcie ďalej vyizolujú niektorou vhodnou metódou a charakterizujú.

Na charakterizáciu molekulových hmotností HA boli použité nasledujúce techniky:

- viskozimetria (H. Bothner, T. Waaler, O. Wik: Int. J. Biol. Macromol. 1988, 10, 287-291; E. Shimada, G. Matsumura: J. Biochem. 78, 513-517, 1975);
- rozptyl svetla (H. Bothner, T. Waaler, O. Wik: Ing. J. Biol. Macromol. 1988, 10, 287-291; R. L. Cleland: Arch. Biochem. Biophys. 1977, 180, 57-68; Barret T.W., Baxter J. E.: Physiol. Chem. Phys. 1982, 14, 19-29);
- sedimentačná analýza (Swann D. A.: Biochem. Biophys. Acta 1968, 156, 17-30; T. C. Laurent, M. Ryan, A. Pietruszkiewicz: Biochim. Biophys. Acta 1960, 42, 476-485);
- rovnovážna ultracentrifugácia (E. Shimada, G. Matsumura: J. Biochem. 78, 513-517, 1975);
- gélková chromatografia (N. Motohashi, I. Mori: J. Chromatogr. 1984, 299, 508-512; M. Torbojevich, A. Cesani, M. Palumbo: Carbohydr. Res. 1983, 157, 269-272; Beatty N. B., Tew W. P., Mello R. J.: Anal. Biochem. 1985, 147, 387-395).

Zásadnou nevýhodou viskozimetrie a rozptylu svetla je, že sa týmito metódami stanoví len priemerná molekulová hmotnosť (viskozitný, $\bar{M}_v$, resp. hmotnostný, $\bar{M}_w$, priemer) a polyméry s rozdielnou distribúciou molekulových hmotností môžu byť považované v dôsledku rovnakých hodnôt $\bar{M}_v$, či $\bar{M}_w$ za totožné látky. Sedimentačná analýza ako i rovnovážna ultracentrifugácia poskytujú síce širšiu výpoveď o tvare distribúcie molekulových hmotností analyzovaného polyméru, avšak prevládka týchto metód je cenovo neúmerne vysoká. Gélková chromatografia na rozdiel od jej vysokoúčinnnej modifikácie (HP GPC) je pomerne pomalá. Jedna analýza spravidla trvá niekoľko hodín až desiatok hodín.

Pre charakterizáciu distribúcie molekulových hmotností, ako aj jednotlivých definovaných priemerov molekulovej hmotnosti polymérov (biopolymérov) sa dnes vo svete najfrekvencovanejšie používa metóda vysokoúčinnnej gélovej permeačnej chromatografie (HP GPC).

Uvedené nevýhody známych postupov odstraňuje spôsob prípravy (^3H) rádioizotopom značených frakcií kyseliny hyalurónovej alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti podľa vynálezu. Jeho podstata je, že sa natívna kyselina hyalurónová alebo jej soľ označí (^3H) rádioizotopom a zmeria sa rádioaktivita odobranej vzorky metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie (LSS). Značená HA sa s výhodou robí tak, že sa na vodný roztok kyseliny hyalurónovej alebo jej soli pôsobí za prítomnosti katalyzátora Pd/CaCO_3 plynným trícium, odstráni sa rozpúšťadlo a labilná rádioaktivita. Iným vhodným spôsobom značenia HA je, že sa alkyluje s (^3H)-methylbromidom v prostredí kvapalného amoniaku, ktorý sa po neutralizácii odstráni. (^3H) rádioizotopom označená kyselina hyalurónová alebo jej soľ sa ne-

chá prechádzať cez vrstvu kationomeniča, s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelulózy. Následne sa HA alebo jej soľ rozdelí na frakcie a stanoví sa ich molekulová hmotnosť metódou vysokoúčinnnej gélovej permeačnej chromatografie (HP GPC). HP GPC izolácia a identifikácia frakcií (^3H)-HA ako aj soli sa robí pomocou chromatografických kolón naplnených hydroxyethylmetakrylátom. Ako mobilná fáza sa použije 0,1 M vodný roztok dusičnanu sodného, NaNO_3 . Nakoniec sa zmeria rádioaktivita odobratej vzorky príslušnej frakcie HA alebo jej soli metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie.

Prednosti navrhovaného spôsobu spočívajú predovšetkým v tom, že bez predchádzajúcej modifikácie východiskovej HA, ktorá často mala za následok zníženie molekulovej hmotnosti, sa dosiahne označenie HA trícium s mŕľovcou rádioaktivitou niekoľkonásobne vyššou ako pri doteraz používaných metódach. Ďalej izolácia (^3H)-hyalurónovej kyseliny alebo jej soli z reakčnej zmesi pomocnou GPC, ktorá je jednoduchá a nenáročná, je účinnejšia ako doteraz používané (dialýza resp. ultrafiltrácia); vysokoúčinná modifikácia GPC je aj podstatne rýchlejšia. Okrem vysokom mernej rádioaktivity sa spôsobom podľa vynálezu pripraví (^3H)-hyalurónová kyselina resp. jej soľ s vysokou rádiochemickou čistotou pričom kombináciou metód GPC a LSS možno okrem toho jednoducho charakterizovať ich molekulovú distribúciu a polymolekularitu a stanoviť mernú rádioaktivitu rôznych frakcií.

Ďalej uvedené príklady ozrejmujú navrhovaný postup, pričom však nijako neobmedzujú rozsah ochrany vynálezu.

Príklad 1

Do reakčnej banky o objeme 1,0 ml sa odváži 10 mg katalyzátora (10% PdO/CaCO_3) a pripipetuje sa 0,5 ml vodného roztoku kyseliny hyalurónovej (10 mg). Reakčná banka sa potom pripojí k titračnej aparatúre. Jej obsah sa ochladí kvapalným dusíkom a titračná aparatúra sa evakuuje. Do reakčnej banky sa za pomoci Toeplerovej pumpy privedie do zásobníka 200 GBq trícia bez nosiča. Reakčná zmes sa premiešava elektromagneticky pri teplote 295 K. Po 100 min. sa reakcia ukončí, obsah reakčnej banky sa zmrazí a zostatkové trícium sa prevedie do zásobníka. Mrazovou sublimáciou v uzavretom systéme sa odstráni rozpúšťadlo a labilná rádioaktivita. Odparok sa rozpustí v 2 ml redestilovanej vody a katalyzátor sa oddelí odstredením. Zbytky labilne viazaného trícia sa odstránia opakovanou mrazovou sublimáciou v uzavretom systéme. Vzorka reakčnej zmesi sa nastrekne do HP GPC systému a na kolónach naplnených hydroxyethylmetakrylátom (Separon HEMA S-1000 a Separon HEMA S-300) zapojených v sérii sa reakčná zmes rozdelí do frakcií o rôznej molekulovej hmotnosti. Mobilnú fázu tvorí 0,1 M vodný roztok dusičnanu sodného, NaNO_3 . K izolovaným frakciám (^3H) hyalurónovej kyseliny sa pridá alikvotné množstvo kvapalného scintilátora a ich rádioaktivita sa zmeria metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie na prístroji Packard 300 CD.

Z vysokomolekulových frakcií (^3H)-HA s vysokou rádioaktivitou sa alikvotná časť (100 μl) opätovne nastrekne do HP GPC systému a stanoví sa molekulové charakteristiky (^3H)-hyalurónovej kyseliny. Zo získaných hodnôt boli vypočítané nasledovné charakteristiky:

- priemerná molekulová hmotnosť M_p (^3H)-HA = $2,28 \times 10^5$ Da
- polymolekularita vzorky $D = 1,98$
- merná rádioaktivita čistej (^3H)-HA = 8,3 MBq/mg

Príklad 2

K vodnému roztoku kyseliny hyalurónovej (5 mg v 0,5 ml redestilovanej vody) sa pridá 0,6 ml etanolu a 9 ml éteru. Vzniknutý roztok s bielou suspenziou sa odparí na vákuovej odparke a odparok sa vysuší do konštantnej hmotnosti. Reakčná aparatúra so spätným chladičom sa vypláchnie suchým amoniakom. K odparke v reakčnej banke o objeme 10 ml sa pridajú 3 ml suchého amoniaku. Reakčná zmes sa mieša 10 min za varu amoniaku a k reakčnej zmesi sa pridajú 2 mg sodíka. Vzniknutý modrý roztok sa za minútu odfarbí. Pridá

sa 0,5 ml toluénu, v ktorom je rozpustených 5 GBq (^3H)-metylbromidu. Reakčná zmes sa refluxuje 1 hodinu pri elektromagnetickom miešaní. Kvapalný amoniak sa po neutralizácii (4 mg HN_4Cl) nechá odpariť. Odparok sa rozpustí v redistilovanej vode a znova odparí. Po rozpustení odparku sa čistá (^3H)-hyalurónová kyselina izoluje zo zmesi pomocou gélovej permeačnej chromatografie na kolóne Superose 6 (sieťovaná agaróza) tak, že zmes sa rozdelí do frakcií podľa molekulových hmotností, v ktorých sa zmeria rádioaktivita metódou LSS. Vysokomolekulové frakcie čistej (^3H)-HA s vysokou mernou rádioaktivitou sa spoja a opätovne analyzujú gélovou permeačnou chromatografiou na prístroji FPLC Pharmacia a kvapalinovou scintilačnou spektrometriou na prístroji Packard 300 CD. Z nameraných hodnôt boli vypočítané nasledovné charakteristiky:

- priemerná molekulová hmotnosť M_p (^3H)-HA = $3,92 \times 10^5$ DA
- polymolekularita vzorky D = 1,55
- merná rádioaktivita (^3H)-HA = 37,2 MBq/mg.

Priklad 3

Z reakčnej zmesi, pripravenej podľa príkladu 2, sa alikvotná časť vysokomolekulového (^3H)-derivátu kyseliny hyalurónovej nastrekne do HP GPC systému, uvedeného v príklade 1 a frakcionuje sa na frakcie po 0,65 ml efluenta, v ktorých sa zmeria rádioaktivita metódou LSC uvedenou v príklade 1. Z frakcie s najvyššou rádioaktivitou sa do HP GPC systému opätovne nastrekne vzorka, kvôli charakterizácii distribúcie jej molekulových hmotností. Zistili sa tieto hodnoty (^3H)-derivátu kyseliny hyalurónovej: Priemerná molekulová hmotnosť M_p = $9,91 \times 10^4$ Da; polymolekularita D = 1,37; merná rádioaktivita 7,6 MBq/mg.

Obdobne možno danou metódou charakterizovať ktorúkoľvek frakciu vysokomolekulového (^3H)-derivátu kyseliny hyalurónovej.

Priklad 4

Čistá (^3H)-hyalurónová kyselina pripravená podľa príkladu 2 sa podrobila enzymatickej degradácii enzýmom hyaluronidázou EC 3.2.1.35 (Sevac, USOL Praha) pri 37°C . Množstvo pridaného enzýmu bolo 48 TRU/l mg (^3H)-HA. V časových intervaloch (0,2, 6, 10 a 24 h) sa odoberalo po 100 μl reakčnej zmesi, 10 minút sa nechalo povariť na inaktiváciu enzýmu a odcentrifugovalo pri 15 000 ot/min. HP GPC analýza, rovnako ako meranie distribúcie rádioaktivity jednotlivých vzoriek bolo robené ako v príklade 1. Z distribúcie rádioaktivity po 24 hod. digestií vyplynulo, že elučný objem je 14,4 ml, čo odpovedá hodnote M_w = 30 000 Da a rádioaktivita 19 693 dpm. Po 48 hod. digestií bol elučný objem 15 ml a rádioaktivita 21 183 dpm. Vzniklý pík rádioaktívnej (^3H)-HA sa už ďalším pôsobením enzýmu nezmenil. Výsledná frakcia nízkomolekulovej (^3H)-HA sa vyznačuje nízkou polydisperzitou, preto jej rádioaktivita narástla. Uvedená kinetika degradácie (^3H)-HA je totožná s kinetikou degradácie neznámej kyseliny hyalurónovej.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy (^3H) rádioizotopom značených frakcií kyseliny hyalurónovej alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti, vyznačujúci sa tým, že sa nativná kyselina hyalurónová alebo jej soľ označí (^3H) rádioizotopom, zmeria sa rádioaktivita odobratej vzorky metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie; rádioizotopom označená kyselina hyalurónová; alebo jej soľ sa nechá prechádzať cez vrstvu kationomeniča s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelulózy; následne sa kyselina hyalurónová alebo jej soľ rozdelí na frakcie metódou vysokoúčinnnej gélovej permeačnej chromatografie a potom sa zmeria rádioaktivita odobratej vzorky príslušnej frakcie kyseliny hyalurónovej alebo jej soli metódou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie.

2. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa natívna kyselina hyalurónová alebo jej soľ označí (^3H) rádioizotopom tak, že sa na vodný roztok kyseliny hyalurónovej alebo jej soli pôsobí za prítomnosti katalyzátora Pd/CaCO_3 plynným trícium, odstráni sa rozpúšťadlo a labilná rádioaktivita.
3. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa natívna kyselina hyalurónová alebo jej soľ označí (^3H) rádioizotopom tak, že sa alkyluje s (^3H)-metylbromidom v prostredí kvapalného amoniaku, ktorý sa po neutralizácii odstráni.