



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206546

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 C 103/52

/22/ Přihlášeno 01 02 80
/21/ /PV 709-80/

(40) Zveřejněno 29 08 80

(45) Vydáno 15 01 83

(75)
Autor vynálezu

NOVÁK MIROSLAV ing. CSc., FLEGEL MARTIN RNDr. CSc., KRÍŽ JOSEF ing. CSc.,
VODIČKA LUDĚK ing. CSc., BŘEZINA MILAN ing., KOLÍNSKÝ JIŘÍ ing.
a KROJIDLO MILAN CSc., PRAHA

(54) Způsob čištění peptidů kapalinovou chromatografií

1

Vynález se týká způsobu čištění peptidů kapalinovou chromatografií.

Syntetické peptidy se používají jako léčiva v řadě indikací v humánní i veterinární medicíně. Jejich účinky jsou velmi výrazné a často značně specifické. Protože působí intenzivně ve velmi malých množstvích, je důležité při výrobě zaručit vysokou čistotu a v maximální míře odstranit ty látky, které by mohly mít nežádoucí nebo nekontrolovatelné vlivy na živý organismus.

Čištění peptidů obsahujících v sekvenci 10 až 20 aminokyselin představuje komplikovaný problém. V průběhu syntézy vzniká řada vedlejších produktů s velmi podobnými strukturálními rysy a často s molekulovou hmotností blízkou žádané látce.

Pro čištění peptidů uvedeného typu je stále ještě používán způsob protiproudého roztrpávání. Způsob je však pracný a zdlouhavý a má omezenou kapacitu. Při separaci dochází často k tvorbě emulsí, což velmi komplikuje separační proces. Čistota získaných peptidů činí zpravidla 90 %.

Čištění peptidů elektroforesou je pomalé, má i v případě použití komplikované přístrojové techniky nedostatečnou kapacitu. Pro separaci látek s nepříliš rozdílným isoelektrickým bodem je nutné používat značně vysoké napětí, někdy 4 až 5 kV, což zvyšuje pracovní riziko a představuje i určitý energetický problém. Čistota peptidů čištěných elektroforesou je do 90 %.

Nejužívanějším postupem dělení peptidů je v současné době jejich gelová chromatografie na látkách polymerního charakteru. Gelově chromatograficky lze však separovat pouze

látky, jejichž molekulová hmotnost se dostatečně liší (např. peptid a sůl nebo peptid a výšemolekulární vedlejší produkt). Čištění pouze touto technikou nemůže tedy v řadě případech zaručit požadovanou čistotu produktu.

Proto je nutné kombinovat několik způsobů čištění, např. gelovou a ionexovou chromatografii, případně použít ještě další separační techniku. Tím se stává separace peptidů značně časově náročnou a ztrátovou operací. Podmínky čištění se nedají v řadě případů reprodukovat.

V současné době se začíná pro čištění peptidů používat vysokotlaké kapalinové chromatografie s kolonami plněnými chemicky vázanými fázemi na silikagelu. Jako mobilní fáze se používají směsi metanol-voda, které mají často upravené pH na požadovanou hodnotu. Výhodou je vysoká čistota takto získaných peptidů. Nevýhodou zůstává vysoká cena chemicky vázaných fází.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob čištění peptidů kapalinovou chromatografií podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se peptidy podrobí působení kapalinové chromatografie, jejíž stacionární fáze je tvořena silikagelem velikosti částic 2 až 200 μm , s výhodou 5 až 25 μm , a mobilní fáze obsahuje směs alkoholu nebo acetonitrilu s vodou v poměru 95:5 až 10:90, s výhodou 90:10, případně směs alkoholu, acetonitrilu a vody s obsahem vody od 5 do 90 % hmot., výhodně 10 až 20 % hmot.

Podle dalšího významu vynálezu se jako alkohol použije metanol a/nebo etanol a/nebo propanol a/nebo isopropylalkohol. Je výhodné použít v mobilní fázi pufr o pH 3 až 8, s výhodou pH 4,4 až 4,8. Jako pufr je možno použít látky na bázi fosfátů alkalických kovů a kyseliny fosforečné. Konečně je možno přidávat látky na bázi solí organické kyseliny v množství od stopového množství do 5 % hmot., tvořící s peptidy iontové páry.

Způsobem podle vynálezu se získá vysoká čistota peptidů, většinou vyšší než 95 až 99 %, přičemž jako stacionární fáze je použit namísto drahých ionexů a/nebo chemicky vázaných fází čistý silikagel, který je podstatně lacinější a ve větším množství dostupnější.

Způsob podle vynálezu je dále blíže popsán podle několika konkrétních příkladů provedení.

P ř í k l a d 1

1,0 g surového peptidu ([1-kyselina-3-merkaptopropionová, 8-D-arginin] vasopressin) rozpuštěného v mobilní fázi byl nanesen na chromatografickou kolonu průměru 40 mm, délky 270 mm, jejíž náplň tvořil silikagel pro chromatografii o velikosti částic 10 až 25 μm . Látka byla eluována, za zvýšeného tlaku, mobilní fází tvořenou 90 % metanolu, 10 % vodného fosfátového pufru o pH 4,6. Retenční čas čištěného peptidu byl 15 min. Bylo získáno 0,72 g peptidu o čistotě 98 %. Čistota byla ověřena vysokotlakou kapalinovou chromatografií s použitím dvou různých kolon.

P ř í k l a d 2

0,1 g (8-D-arginin) vasopressinu byla rozpuštěna v 1 ml směsi obsahující 50 % metanolu a 50 % vody a nastříknuta na kolonu světlosti 8 mm, délky 250 mm, plněnou silikagelem pro chromatografii, velikosti částic 7,5 μm . Průtok mobilní fáze, obsahující 90 % metanolu a 10 % vodného fosfátového pufru o pH 4,6, byl 100 ml/hod. Retenční čas čištěného peptidu byl 30 minut, celková délka dělení byla 45 minut. Bylo získáno 0,8 g peptidu čistoty 98 %.

P ř í k l a d 3

0,1 g (2-0-methylthirosin) oxytocinu bylo rozpuštěno v mobilní fázi a nastříknuto na

kolonu světlosti 8 mm, délky 250 mm, plněnou silikagelem o velikosti částic 10 μm . Mobilní fázi je směs 80% metanolu a 20 % vody, průtok 50 ml/hod. Celková doba čištění byla 25 minut, retenční čas čištěného peptidu 10 minut. Bylo získáno 0,7 g peptidu čistoty vyšší než 98 %.

P ř í k l a d 4

Byl čištěn LHRH - releasing factor pro luteinizační a folikuly stimulující hormon. 0,08 g této látky bylo nastříknuto na kolonu jako v případě 2 a eluováno mobilní fází obsahující 80 % metanolu, 7 % acetonitrilu a 13 % vody. Bylo získáno 0,055 g hormonu čistoty vyšší než 99 %.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob čištění peptidů kapalinovou chromatografií vyznačený tím, že se peptidy podrobí působení kapalinové chromatografie, jejíž stacionární fáze je tvořena silikagelem velikosti částic 2 až 200 μm , s výhodou 5 až 25 μm , a mobilní fáze obsahuje směs alkoholu nebo acetonitrilu s vodou v poměru 95:5 až 10:90, s výhodou 90:10, případně směs alkoholu, acetonitrilu a vody s obsahem vody od 5 do 90 % hmot., výhodně 10 až 20 % hmot.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že se jako alkohol použije metanol a/nebo etanol a/nebo propanol a/nebo isopropylalkohol.

3. Způsob podle bodů 1 a 2 vyznačený tím, že v mobilní fázi se použije pufr o pH 3 až 8, s výhodou pH 4,4 až 4,8.

4. Způsob podle bodů 1 až 3 vyznačený tím, že se používají pufrů na bázi fosfátů alkalických kovů a kyseliny fosforečné.

5. Způsob podle bodů 1 až 4 vyznačený tím, že se přidávají látky, tvořící s peptidy iontové páry, například na bázi solí anorganických a organických kyselin v množství od stopového množství do 5 % hmot.