



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 851

(21) PV 273-85
(22) Přihlášeno 14 01 85

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 17/08

(40) Zveřejněno 13 06 89
(45) Vydáno 14 12 90

(75)
Autor vynálezu

RYBÁK MIROSLAV ing. CSc., ČOUPEK JIŘÍ ing. CSc., PRAHA

(54)

**Sorbent heparinu a látek obsahujících struktury heparinu a způsob jejich
přípravy**

(57) Sorbent heparinu a látek obsahujících struktury heparinu, komplexy bílkovin s heparinem a další látky anionické povahy, jehož podstata spočívá v tom, že na hydrofilní makroporezní trojrozměrné kopolymery hydroxyalkylakrylátů, případně hydroxyalkylmetakrylátů s alkylendiakryláty nebo alkylendimetakryláty je imobilizován protaminsulfát, protaminchlorid, poly-L-lysin nebo jiný oligopeptid a polypeptid obsahující v převážně arginin, histidin a lysin. Imobilizace je uskutečněna kovalentní vazbou polypeptidu na aktivované hydroxyalkylakrylátové nebo hydroxyalkylmetakrylátové nosiče. Tyto kopolymerní nosiče se aktivují reakcí s epichlorhydrinem a produkt této reakce se ponechá reagovat s roztokem polypeptidu v tlumivém roztoku pH 8 až 12 obsahujícím 1,5 až 1,8 mol/l síranu amonného při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin. Po skončení reakce se eventuálně nezreagované epoxidové skupiny ponechají spontánně zhydrolyzovat. Sorbované molekuly protaminu se odstraní afinitní elucí roztokem heparinu. Sorbenty nacházejí uplatnění v separační technice a technologii v analytickém i preparativním měřítku.

Vynález se týká sorbentu heparinu a látek obsahujících struktury heparinu, který je tvořen protamin-sulfátem, protaminchloridem nebo poly-L-lysinem a dalšími oligopeptidy nebo polypeptidy obsahujícími převážně arginin, histidin a lysin, imobilizovanými na trojrozměrných makroporézních hydrofilních kopolymerech hydroxyalkylakrylátů, případně hydroxyalkylmetakrylátů s alkylendiakryláty nebo dimetakryláty a způsobu jeho přípravy.

Hydrofilní trojrozměrné makroporézní kopolymer hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmetakrylátů s alkylendimetakryláty nebo alkylendimetakryláty a způsob jejich přípravy řízenou suspenzní kopolymerizací v přítomnosti inertních organických sloučenin ve vodném nebo organickém dispersním prostředí jsou známy z čs. autorských osvědčení č. 148 828 a 150 819. Kopolymer se vyznačuje velmi dobrými mechanickými vlastnostmi a jejich sférický tvar a makroporézní struktura je předurčují k celé řadě aplikací při dělení složitých směsí přírodního i syntetického původu. Hydroxylové funkční skupiny lze chemicky přeměnit řadou substitučních reakcí, oxidací apod. Polymeranalogickými reakcemi modifikované kopolymer byly využity jako nosiče ionogenních skupin (čs. autorské osvědčení č. 171 963, 177 307 a 173 201) nebo jako specificky účinné sorbenty v afinitní chromatografii (čs. autorské osvědčení č. 167 530, 175 047 a 193 845).

Protaminsulfát je polypeptid s vysokým obsahem argininu molekulární hmotnosti do 5 000, izolovaný z mlíčí ryb. Jeho schopnosti stechiometricky reagovat s heparinem za současné inaktivace jeho antikoagulačních vlastností je využíváno v medicíně. Poly-L-lysin je syntetický polypeptid basické povahy. Guanidylové a NH_2 - skupiny těchto látek mohou vhodných podmínek reagovat s epoxidovou skupinou hydroxyalkylakrylátů nebo hydroxyalkylmetakrylátů aktivovaných reakcí s epichlorhydrinem, za tvorby kovalentní vazby. Takto vzniklé látky mají povahu sorbentů pro heparin, heparinu podobné látky, komplexy heparinu s dalšími látkami, ev. jiné látky anionické povahy. Této vlastnosti lze využít k separaci heparinu, k separaci komplexu heparin-antitrombin III z bílkovinných směsí, k separaci heparinu z krve za účelem jeho stanovení apod. Na Sepharosu imobilizovali Piepkorn a spolupracovníci protamin (Tromb. res. 13, 1 077, 1978) a Mohammad a spolupracovníci imobilizovali poly-L-lysin (Tromb. res. 20, 599, 1980). Použití agarosu pro tyto účely má však mnohé nevýhody pro navrhované účely, tj. separaci heparinu a látek obsahujících struktury heparinu, ať již pro účely preparativní nebo analytické. Sorbenty na bázi hydroxyalkylakrylátů a hydroxyalkylmetakrylátů jsou chemicky stálé, odolné bakteriální kontaminaci a jejich fyzikální vlastnosti se nemění pod vlivem běžně používaných tlaků. To umožňuje jejich opakované použití, použití tlakových čerpadel v technologii separace a automatizace separačního procesu. Provedení imobilizace je jednoduché a technologicky nenáročné. Afinanty neztrácí

po imobilizaci svoji biospecifickou aktivitu. Pro dosažení dobré mechanické a hydrolytické stability imobilizovaného protaminu nebo poly-L-lysinu k použití v laboratorní, případně v průmyslové biospecifické chromatografické separační technice je žádoucí volit nosič na bázi rigidního makroporézního materiálu s pravidelným tvarem částic, který má vhodné hydrodynamické vlastnosti při sloupcovém uspořádání procesu a je dostatečně hydrofilní. Provedení vazby bazických polypeptidů musí být jednoduché, technologicky nenáročné a musí zaručit dostatečnou stabilitu afinantu vůči hydrolyze bez ztráty jeho biochemické aktivity. Této vlastnosti je dosaženo imobilizací protaminsulfátu (poly-L-lysinu) na hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmetakrylátových nosičích.

Předmětem vynálezu je sorbent heparinu a látek obsahujících struktury heparinu, například glykosaminoglukanů, komplexů bílkovin s heparinem a dalších látek anionické povahy, který je tvořen protaminsulfátem, protaminchloridem, poly-L-lysinem nebo dalšími oligopeptidy a polypeptidy obsahujícími v převážné míře arginin, histidin a lysin, molekulární hmotnosti 5 až 10 000, které jsou vázány na makroporézní, trojrozměrné, hydrofilní kopolymer hydroxyalkylakrylátů, případně hydroxyalkylmetakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo alkylendimetakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku. Dále je předmětem vynálezu způsob výroby uvedených materiálů, který spočívá v tom, že se makroporézní trojrozměrné hydrofilní kopolymer hydroxyalkylakrylátů, případně hydroxyalkylmetakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo alkylendimetakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku, aktivují reakcí s epichlorhydrinem. Produkt aktivace se ponechá reagovat s roztokem polypeptidu v tlumivém roztoku obsahujícím 1,5 až 1,8 mol/l sulfátu amonného, při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin a popřípadě nezreagované epoxidové skupiny se nechají hydrolyzovat spontánně a sorbované, ale nevázané částice polypeptidu jsou odstraněny promytím roztokem heparinu. Jako tlumivý roztok je s výhodou použit borátový pufr s pH 8 až 10.

Ve srovnání s polypeptidy vázanými na polysacharidové nosiče je při srovnatelné měrné aktivitě podstatný rozdíl ve vlastnostech sorbentů podle tohoto vynálezu, jsou-li v kontaktu s vodnými roztoky separovaných složek. Makroporézní charakter hydroxyalkylakrylátových a hydroxyalkylmetakrylátových nosičů zaručuje stálost objemů sorbentů při změně pH a iontové síly. Při změně pH mezi hodnotou 5,5 a 8,5 nedochází k měřitelné změně objemu, zvýšení koncentrace chloridu sodného z 0,1 na 2,0 mol/l znamená kontrakci sloupce o méně než 1 %, zvýšením tlaku o 100 kPa dojde ke stlačení sloupce o 0,4 %. Sférický tvar a mechanická pevnost částic těchto sorbentů umožňuje vysoké průtokové rychlosti kapalného média ve sloupcovém uspořádání; makroporézní charakter struktury dovoluje penetraci molekul

s molekulovou hmotností do cca $2 \cdot 10^6$ do vnitřní domény sorbentů bez podstatných omezení způsobených zpomalením difúze, která je často pozorována u homogenních xerogelů polysacharidového typu. Sorbenty umožňují práci za vysokého tlaku nebo ve vysokých preparativních sloupcích bez nebezpečí jejich sesedání a ucpávání. Syntetická matrice nosiče zaručuje odolnost proti působení mikroorganismů.

Aktivace akrylátových a metakrylátových nosičů přímou reakcí s epichlorhydrinem je technologicky nenáročná a poskytuje reaktivní produkt, který je v suchém stavu vysoce stabilní. Důležitou skutečností je, že aktivace nosiče probíhá pouze na vnitřním hydrofilním povrchu pórů, nikoli ve hmotě, takže po následné vazebné reakci s protaminem je eliminace zbylých reaktivních skupin úplná, poměrně rychlá a konečná.

Vlastní vazba protaminu (poly-L-lysinu) se uskutečňuje adicí primárních skupin afinantů na epoxidový kruh aktivovaného kopolymeru. Nutnou podmínkou je, aby aminoskupiny nebyly protonizovány, proto je nutno upravit alkalitu roztoku protaminu (poly-L-lysinu) vhodným pufrům na hodnotu pH 8 až 12. S výhodou lze použít 0,1 mol/l borátových pufrů pH 8,7 až 9,4. Teplota a čas reakce určují stupeň konverze, s výhodou lze provádět při teplotách 10 až 43 °C po dobu 10 až 100 hodin při mírném míchání suspenze. Stanovení obsahu vázaného protaminu (poly-L-lysinu) bylo provedeno stanovením dusíku podle Kjeldahla.

Účinek sorbentů podle vynálezu byl prokázán při jejich použití k odstraňování heparinu od antitrombinu, při přípravě vysoce purifikovaného plasmatického antitrombinu. Z lidské krevní plasmy byl komplex antitrombinu s heparinem připraven sorpcí na heparin-Separon a afinitní elucí heparinem (vedle dalších). Za specifických podmínek lze na sloupci protamin- nebo poly-L-lysin-Separonu uskutečnit sorpci tohoto komplexu, jeho disociaci a separaci antitrombinu od heparinu. Získaný antitrombin měl původní antikoagulační vlastnosti, byl imunochemicky a elektroforeticky homogenní. Získaný heparin měl původní vlastnosti a lze jej opakovaně použít. Tyto sorbenty dále umožňují odstranění heparinu z krevní plasmy nebo testovaných roztoků a analýzu deheparizované plasmy na přítomnost koagulačních faktorů. Sorbovaný heparin je pak možno po eluci kvantifikovat. Sorbenty podle vynálezu umožňují frakcionaci fragmentů heparinu po jeho hydrolýze a separaci vysoce biologicky účinných podílů. Dále jsou vhodné pro separaci semisyntetických a syntetických sulfonovaných polysacharidů s vlastnostmi heparinu. Ve všech uvedených případech použití sorbentů podle vynálezu probíhá za fyziologických podmínek pH a iontové síly, eluci lze uskutečnit zvýšením koncentrace solí a posunem pH na kyselou nebo alkalickou stranu. Při koncentraci 0,1 mol/l hydroxidu sodného je heparin kvantitativně odstraněn z těchto sorbentů, aniž by došlo k poškození matrice nebo afinantu.

Předmět vynálezu je objasněn v následujících příkladech provedení, aniž by však byl jimi jakkoli omezován.

Příklad 1

100 g kopolymeru etyléndimetakrylátu s 2-hydroxyetylénmetakrylátem o vylučovacím limitu 10^6 s velikostí sférických částic 100 až 300 μm je nabito v 500 ml 50% hydroxidu draselného po dobu 15 hodin při teplotě 5 °C. Takto zbitý nosič se odfiltruje a za stálého míchání se vnese do reaktoru opatřeného zpětným chladičem a teploměrem, ve kterém bylo předloženo 400 ml epichlorhydrinu. Asi po 1 hodině vystoupí teplota reakční směsi na teplotu varu epichlorhydrinu. Po odeznění reakce se přidá 100 ml nasyceného roztoku bromidu draselného a reakční směs se zahřívá k varu po dobu 3 hodin. Po skončení se aktivovaný sorbent odfiltruje, na filtru se promyje 3×500 ml acetonu, rychle $2 \times 1\,000$ ml vody do neutrální reakce filtrátu, znova 3 acetonem, éterem a vysuší se ve vakuové sušárně při 20 °C po dobu 24 hodin. Obsah epoxidových skupin se stanovuje titračně: 0,420 mol/g suchého kopolymeru.

10 g aktivovaného nosiče připraveného podle uvedeného postupu se ponechá za občasného míchání 30 až 56 hodin v 50 ml destilované vody. Nato se voda odfiltruje a vlhký nosič se promyje borátovým pufrům (0,1 mol/l, pH 8,7, který obsahuje 1,8 mol/l síranu amonného). Vlhký nosič je převrstven 30 ml borátového pufru pH 8,7 obsahujícího 1,8 mol/l síranu amonného a 1 g protaminsulfátu je sledován kontrolou protaminsulfátu v roztoku (např. jako antiheparin). Imobilizace je ukončena, když nedochází ke snižování koncentrace protaminsulfátu v roztoku nad nosičem. Pokud se zjistí nulová nebo nízká koncentrace protaminsulfátu, je přidán další podíl. Po skončení imobilizace je nosič promyt vodou, pak pufrům pH 6,0 až 6,5 s přísadkou NaCl (2 mol/l), pak znovu vodou a pufrům. Sorbent je ponechán 2 až tři dny při teplotě místnosti k hydrolýze, eventuálně nezreagovaných epoxidových skupin, nebo se hydrolýzuje 0,1 M roztokem kyseliny chloristé po dobu 3 hodin při normální teplotě. Nato je sorbent promyt pufrům pH 6,0 až 6,5 obsahujícím 1 mg/100 ml heparinu, pufrům s NaCl (2 mol/l), vodou a pufrům, ve kterém má proběhnout separace. Účinek takto připraveného sorbentu byl ověřen izolací a stanovením heparinu z vodného roztoku, z lidské plasmy a z lidské krve (za přítomnosti hemoglobinu). Obsah vázaného protaminsulfátu byl 16 až 25 mg/g suchého nosiče.

Příklad 2

Aktivace kopolymeru 2-hydroxyetylmetakrylátu s etylénglykoldimetakrylátem se provádí analogicky jako v příkladu 1. Na místě protaminsulfátu je použit poly-L-lysin. Reakční podmínky pro imobilizaci jsou stejné jako při protaminsulfátu. Při promývání není nutné používat heparinových roztoků k odstranění ne-

zreagovaných molekul poly-L-lysinu. Obsah vázaného poly-L-lysinu byl 5,6 až 8 mg/g suchého nosiče a řídil se stupněm polymerizace afinitu.

Příklad 3

Aktivace kopolymeru 2-hydroxyetylmetakrylátu s etyléndimetakrylátem o vylučovacím limitu $2 \cdot 10^6$ se provádí stejně jako v příkladu 1. Reakce s protaminsulfátem je analogická jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že pH borátového pufru je 9,4; reakční teplota je 40 až 45 °C a doba reakce je 12 až 16 hod. Spontánní hydrolýza nezreagovaných epoxidových skupin probíhá při teplotě 40 °C 24 hod. Obsah vázaného protaminsulfátu byl 18 až 26 mg/g suchého nosiče.

Příklad 4

Imobilizace protaminu sulfátu byla provedena analogicky jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že jako nosiče bylo použito kopolymeru 2-hydroxymetakrylátu s 1,4-butyldimetakrylátem o velikosti částic 50 až 80 μm a vylučovacím limitu 900 tisíc daltonů pro lineární polydextraci. Koncentrace e-protaminsulfátu činila 0,1 g ve 30 ml (tj. 3,3 g/l) borátového pufru, pH 8,7 obsahujícího 2,0 mol/l síranu amonného. Obsah vázaného protaminu sulfátu činil 8,5 mg/g suchého nosiče.

Příklad 5

Aktivace nosiče byla provedena analogicky jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že k imobilizaci bylo použito kopolymeru 4-butyldiglykolmonometakrylátu s etyléndimetakrylátem o vylučovacím limitu 10^6 daltonů a koncentrace protaminsulfátu byla 5 g ve 30 ml borátového pufru o pH 8,7 (tj. 166 g/l).

Příklad 6

Aktivace kopolymeru 2-hydroxyetylakrylátu a etyléndiglykoldimetakrylátu byla provedena analogicky jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že k imobilizaci bylo místo protaminsulfátu použito molekulárních fragmentů histonu z telecího thymu bohatého lysinem, o molekulární hmotnosti menší než 20 tisíc daltonů. Při odstraňování nadbytku histonových fragmentů není použito heparinového roztoku jako v příkladu 1. Obsah fragmentů histonu vázaných na matici byl 4,4 až 7,2 mg/10 g suchého nosiče.

Příklad 7

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 a 6 s tím, že na místě protaminsulfátu nebo histonu je použit syntetický polymer peptidu $(\text{Ala-Lys-Lys.Pro-Lys})_n$ molekulární hmotnosti 13 tisíc daltonů, kde $n = 9$. Obsah vázaného polymerizovaného peptidu byl 2,5 až 7,2 mg/g suchého nosiče.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Sorbent heparinu a látek obsahujících struktury heparinu, například glykosaminoglykanů, komplexů bílkovin s heparinem a dalších látek anionické povahy, vyznačený tím, že je tvořen protaminsulfátem, protaminchloridem, poly-L-lysinem nebo dalšími oligopeptidy a polypeptidy obsahujícími v převážné míře arginin, histidin a lysin, molekulární hmotnosti 5 až 10 000, které jsou vázány na makroporézní, trojrozměrné, hydrofilní kopolymery hydroxyalkylakrylátů, případně hydroxyalkylmetakrylátů, ve kterých alkyl obsahuje 1 až 4 atomy uhlíku, s alkylendiakryláty nebo alkyléndimetakryláty, ve kterých alkylen obsahuje 2 až 4 atomy uhlíku.

2. Způsob výroby sorbentu podle bodu 1, vyznačující se tím, že kopolymery definované v bodě 1 se aktivují epichlorhydrinem, načež se nechají reagovat s polypeptidem v tlumivém roztoku obsahujícím 1,5 až 1,8 mol/l sulfátu amonného, při teplotě 10 až 45 °C po dobu 10 až 100 hodin a popřípadě nezreagované epoxidové skupiny se nechají hydrolyzovat spontánně a sorbované, ale nevázané částice protaminu se odstraní promytím roztokem heparinu.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že jako tlumivý roztok se užívá borátový pufr pH 8 až 10, obsahující 1,5 až 1,8 mol/l sulfátu amonného.