

Винахід відноситься до біохімітехнологічних процесів, спрямованих на отримання ферментних препаратів, і може бути використаний як хімічною, так і фармацевтичною промисловістю при виробництві афінних сорбентів, призначених для виділення ферментів певної групи.

Найбільш близьким за технічною суттю і практичним призначенням є відомий спосіб отримання нерозчинного гранульованого кополімеру (матриці) при кополімеризації N-вінілпіролідону з малеїновим ангідридом шляхом термохімічного ініціювання, наступного гранулювання (зшивки), що здійснюється в двох незмішуваних між собою рідинах органічної (диметилформамід) і кремнійорганічної (поліетиленилсилоксанова рідина) природи при 70-80°C протягом 2-3 год. і, нарешті, приєднання ліганду, що і означає утворення, власне, сорбенту [1].

Недоліком найбільш близького з відомих способів отримання афінного сорбенту є малий ступінь відтворюваності властивостей кополімеру на основі N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду, що є наслідком термохімічного радикально-ланцюгового методу. Так, наприклад, не спостерігається постійності у відтворенні такого параметру, як молекулярна маса від одного напрацювання до іншого, що характерно для термopolімеризації за рахунок локальних областей перегріву реакційної маси в об'ємі [2]. Цей недолік є типовим для термохімічної (~60-80°C, ~6-8 год.), гомо- і кополімеризації різних ненасичених мономерів (табл.1).

Вказана мета досягається тим, що процес кополімеризації N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду в мольному співвідношенні 4:1 відповідно здійснюється методом фотохімічного ініціювання при кімнатній температурі 18-25°C протягом (6±1) год.

Таблиця 1

Умови термохімічного синтезу кополімерів* і їх фізико-хімічна характеристика

Умовне позначення кополімеру	Реакційне середовище (розчинник) синтезу фото-кополімеру	Середня $[\eta]$, г/дл	Середня молекулярна маса кополімеру	Час синтезу (УФ-опромінення), год	Вихід кополімеру, α , %
КП-1	діоксан	0,82	307000	7	65
КП-2	діоксан	0,60	183200	7	70
КП-3	діоксан	1,14	521100	7	63

*Співвідношення N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду 4:1;
термоініціатор - динітрил-азо-біс-ізомасляної кислоти;
температура кополімеризації 70°C.

Сутність винаходу пояснюється прикладами виконання.

Приклад 1. а) Фотохімічний спосіб отримання лінійного фотокополімеру на основі N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду.

У плоскодонну колбу ємністю 0,1л, забезпечену мішалкою, завантажують 10г (0,091моля) N-вінілпіролідону, 2,23г (0,023моля) малеїнового ангідриду, 0,45г (0,0027моля або 2,0мас.%) фотоініціатора (Дарокурі 173) і 10мл розчинника (діоксана).

Вміст колби ретельно перемішують до повного розчинення і гомогенізації всіх компонентів реакційного середовища. Потім отриману реакційну масу піддають УФ-опроміненню при $\lambda_{\text{макс.}}=300-400\text{нм}$ у режимі періодичного перемішування протягом 6 год. при температурі 18-25°C.

У результаті фотокополімеризації отримують лінійний термопластичний фотокополімер (ФКП-1) на основі N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду в діоксані. Фотокополімер з розчину діоксана висаджують сумішшю розчинників ацетон:гексан=2:4. Декантацією видаляють розчинники (ацетон, гексан) від ФКП-1, додатково промивають діетиловим ефіром і висушують на повітрі. Після цих операцій отримують ФКП-1 у вигляді пластівцеподібного порошку білого кольору. Вихід ФКП-1 за початковою сировиною становив 11,62г (95мас.%). Молекулярна маса ФКП-1, визначена за величиною характеристичної в'язкості $[\eta]=0,69\text{г/дл.}$ (табл.2) і становить 233900.

б) Гранулювання (поперечна зшивка) ФКП-1.

У тригорлий реактор ємністю 0,5л, забезпечений механічною мішалкою, зворотним холодильником і термометром, завантажують 0,3л поліетиленилсилоксану (ПЕС-5) і при інтенсивному перемішуванні практично одночасно додають розчин-1 (10г ФКП-1 в 60мл диметилформаміду) і розчин-2 (0,52г або 5,2мас.% від ваги ФКП-1 4,4'-діамінодифенілметана в 3мл диметилформаміду). Протягом 1 год температуру підвищують від 18-25°C до 70-75°C і при цій температурі реакційну масу витримують ще протягом 1 год., після чого протягом 2 год. температуру в реакторі підвищують до 80-85°C. Потім нагрів припиняють і реакційну масу повільно охолоджують протягом 2,5 год. при постійному перемішуванні.

Отриманий зшитий гранульований фотокополімер ФКП-1 (ГФКП-1) відділяють фільтруванням від поліетиленилсилоксану і диметилформаміду і промивають спочатку декількома порціями гексану, а потім, для повного видалення залишків поліетиленилсилоксанового масла (ПЕС-5), сірчанним ефіром. ГФКП-1 сушать при температурі 25-30°C і зберігають в герметичному посуді. Вихід гранульованого фотокополімеру ГФКП-1 - 93мас.% (9,8г) (табл.3).

Таблиця 2

Умови фотохімічного синтезу фотокополімерів і їх фізико-хімічна характеристика

Умовне	Реакційне середовище	Середня	Середня	Час синтезу (УФ-	Вихід
--------	----------------------	---------	---------	------------------	-------

позначення фотокополімеру	(розчинник) синтезу фотокополімеру	$[\eta]$, г/дл	молекулярна маса фотокополімеру	опромінення), год.	фотокополімеру, α , %
ФКП-1	діоксан	0,69	233900	6	95
ФКП-2	діоксан	0,74	251200	6	97
ФКП-3	діоксан	0,68	232200	6	93

Таблиця 3

Деякі фізико-хімічні параметри фотокополімерів і афінних сорбентів (СФКП)

Умове позначення фотокополімеру	Концентрація іммобілізованого L- лізину у сорбенті, мас. %	Відносна ступінь набухання по об'єму, $1 \times G$ разів	Вихід, мас. %		
			фотокополімеру	гранульованого фотокополімеру	афінного сорбенту
СФКП-1	8,3	45	95	93	62
СФКП-2	7,9	70	97	90	65
СФКП-3	8,0	50	93	95	61

в) Іммобілізація L-лізину на гранульований фотокополімер-1.

Отримання сорбенту СФКП-1.

В круглодонну колбу ємністю 0,5л вносять 250 мл дистильованої води, 10г ГФКП-1 і 1,0г L-лізинхлоргідрату (10мас.% від маси фотокополімеру), підтримуючи при цьому рН=7,0-7,2. Прищеплення (Іммобілізація) L-лізинхлоргідрату до ГФКП-1 проводять при температурі 25°C і постійному перемішуванні, підтримуючи рН=7,0 протягом 4год. Через 14-16год., отриманий афінний сорбент відділяють фільтруванням і промивають 0,2М розчином NaHCO_3 , потім зливають розчин 0,2М NaHCO_3 і остаточно промивають сорбент дистильованою водою до рН=7,6-8,0.

В результаті мобілізації L-лізину отримано сорбент СФКП-1 на основі фотокополімеру (ФКП-1).

Дані аналізу першої промивної проби розчину після прищеплення L-лізину за методом реакції α -аміногрупи з нінгідрином показують, що концентрація прищепленого L-лізину на гранульованому фотокополімері дорівнює 8,3мас.%. Вихід сорбенту СФКП-1 після ретельної промивки складає 62мас.% (6,82г) (табл.3).

Приклад 2. а) Фотохімічний спосіб отримання лінійного фотокополімеру на основі N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду.

У плоскодонну колбу ємністю 0,25л, забезпечену мішалкою, завантажують 25г (0,228моля) N-вінілпіролідону, 5,6г (0,057моля) малеїнового ангідриду, 1,15г (0,007моля або 2,0мас.%) фотопініціатора (Дарокурі 173) і 25мл розчинника (діоксана).

Далі як в Прикладі 1а.

Вихід ФКП-2 за початковою сировиною становить 30,8г (97мас.%). Молекулярна маса ФКП-2, визначена по величині характеристичної в'язкості $[\eta]=0,74\text{г/дл}$, складає 251900 (табл.2).

б) Гранулювання (поперечна зшивка) ФКП-2.

Все, як в Прикладі 1б. Вихід гранульованого фотокополімеру-2 (ГФКП-2) складає 9,3г (93мас.%) (табл.3).

в) Іммобілізація L-лізину на гранульований фотокополімер-2.

Отримання сорбенту СФКП-2.

Все, як в Прикладі 1в. Дані аналізу першої промивної проби розчину після прищеплення L-лізину по методу реакції α -аміногрупи з нінгідрином показують, що концентрація прищепленого L-лізину на гранульованому фотокополімері дорівнює 7,9мас.%. Вихід сорбенту СФКП-2 після ретельної промивки складає 65мас.% (7,15г) (табл.3).

Приклад 3. а) Фотохімічний спосіб отримання лінійного фотокополімеру на основі N-вінілпіролідону і малеїнового ангідриду.

У плоскодонну колбу ємністю 0,5л, забезпечену мішалкою, завантажують 50г (0,45моля) N-вінілпіролідону, 11,18г (0,114моля) малеїнового ангідриду, 3,22г (0,02моля або 2,0мас.%) фотопініціатора (Дарокур 1173) і 100мл розчинника (діоксана).

Далі все, як в Прикладі 1а.

Вихід ФКП-3 по вихідній сировині становить 59,9г (93мас.%). Молекулярна маса ФКП-3, визначена по величині характеристичної в'язкості $[\eta]=0,68\text{г/дл}$, дорівнює 232200 (табл.2).

б) Гранулювання (поперечна зшивка) ФКП-3.

Все, як в Прикладі 1б. Вихід гранульованого фотокополімеру-3 (ГФКП-3) дорівнює 9,8г (95мас.%) (табл.3).

в) Іммобілізація L-лізину на гранульований фотокополімер-3.

Отримання сорбенту СФКП-3.

Все, як в Прикладі 1в. Дані аналізу першої промивної проби розчину після прищеплення L-лізину за методом реакції α -аміногрупи з нінгідрином показують, що концентрація прищепленого L-лізину на гранульованому фотокополімері дорівнює 8,0мас.%. Вихід сорбенту СФКП-3 після ретельної промивки складає 61мас.% (6,71г) (табл.3).

Експериментальні результати, приведені в таблиці 2 і 3, свідчать про те, що в процесі фотохімічного ініціювання різних за концентраційним вмістом в реакційній масі комономерів отримані фотокополімери з хорошою відтворюваністю значень молекулярних мас і досить високим виходом кінцевого фотокополімеру з вузьким молекулярно-масовим розподілом, а також афінні сорбенти на їх основі.

Отримані афінні сорбенти випробовували на здатність виділяти з плазми людської крові такий фермент як плазміноген. Як приклад для виділення плазміногену з плазми взято сорбент СФКП-2.

Виділення плазміногену з пасти людської крові фракції III по Кону сорбентом СФКП-2.

До 200мл 0,14М розчину NaCl у 0,05М фосфатному буфері рН-7,4 суспендують 40г пасти фракції III по Кону і потім центрифугують протягом 30хв. при 8000g. Надосадову рідину збирають і суспендують в ній 4г (200мл) підготовленого сорбенту СФКП-2 при співвідношенні сировина:сорбент =10:1. Після перемішування протягом 7 год при 4°C сорбент відділяють декантуванням і переносять його у колонку. Неспецифічне адсорбовані білки виділяють 0,5М розчином NaCl в 0,05М фосфатному буфері рН-7,4 доти, поки поглинання (оптична густина) при $\lambda=280\text{nm}$ елюата не стане меншим за 0,05. Плазміноген елюють на колонці 0,2М розчином ϵ -амінокапронової кислоти в 0,05М фосфатному буфері рН-7,4. Видалення ϵ -амінокапронової кислоти здійснюють на холоді (4°C) осадженням білка з розрахунку 0,41г сульфату амонію на 1мл розчину білка. Після центрифугування протягом 15хв. при 8000g цільовий продукт (плазміноген) отримують шляхом розчинення осаду в 0,1М NH_4HCO_3 . Розчин діалізують при 4°C проти 0,0114М NH_4HCO_3 при рН=8,0. Отриманий розчин піддають ліофільній сушці. Вихід електрофоретично* гомогенного плазміногену складає 63мг або 15,8мг на 1г сорбенту СФКП-2 з активністю 17 казеїнолітичних одиниць (к.о.)* на 1мг плазміногену.

Результати біоспецифічної сорбції плазміногену з плазми людської крові афінними сорбентами, отриманими на основі фотокополімерів, наведені в таблиці 4. Ці афінні сорбенти характеризували кількістю іміобілізованого на них L-лізину, а також активністю, виходом виділеного плазміногену (табл.4). Виділений препарат проферменту має питому активність, що узгоджується з активністю препаратів плазміногену, отриманих на інших афінних сорбентах. Однак, позитивною характерною особливістю виділених новими сорбентами препаратів плазміногену є відсутність спонтанної активності. Крім того, сорбенти на основі СФКПТ можуть бути використані протягом тривалого часу, тобто можливе неодноразове регенерування сорбентів, при якому не втрачаються їх хроматографічні властивості.

Примітка:

* електрофорез ліофілізованих препаратів плазміногену проводять в гелі поліакриламіді в системі тріс-боратного буферу рН-7,4. Аналізували розчини, що містять 25-30мкг плазміногену.

** За 1к.о. приймають таку кількість ферменту, яка звільнює 450мкМ тирозину, розчиненого в 15%-ній трихлороцтовій кислоті в умовах аналізу.

Таблиця 4

Біоспецифічні сорбційні властивості сорбентів, отриманих на основі фотокополімерів, для виділення плазміногену з плазми крові людини

Умовне позначення сорбентів	Концентрація, мас.%		Відносна ступінь набрякання сорбенту за об'ємом, $1 \times G$ разів	Питома афінна ємність сорбенту, мг плазміногену на 1г сорбенту	Активність плазміногену, к.о./мг білка
	Імобілізованого L-лізину у сорбенті	зшиваючого реагенту (4,4-діаміно-дифенілметану)			
СФКП-1	8,3	5,2	45	21,7	8,17
СФКП-2	7,9	5,2	70	23,0	14,7
СФКП-3	8,0	5,2	50	15,8	16,0

Джерела інформації

1. Рогожин С.В., Давыдович Ю.А., Андреев С.М., Юртанов А.И. / Полимерный макросетчатый N-оксисуццинимид для синтеза пептидов // Докл. АН СССР, 1973. Т.2П.-№6. С.1356-1358.
2. С.Е. Бреслер, Б.Л. Ерусалимский. Физика и химия макромолекул. М.-Л.: Наука, 1965. 510с.