

**Metoda noua de separare a
compusilor enantiopuri
utilizand anticorpi selectivi**


ANTISEL

Informatii despre proiect

- **Tip proiect: PED**
- **Parteneri:**
 - **Institutul de cercetari pentru Instrumentatie analitica, ICIA, Cluj-Napoca**
 - **Universitatea Babes-Bolyai, UBB, Cluj-Napoca**

Obiectiv general

Realizarea unei metode noi de separare a compusilor enantiopuri utilizand anticorpi selectivi



- Abordarea unei directii practic neexplorata in utilizarea anticorpilor si anume, in separarea racemicilor, ca alternativa la rezolutia cinetica chemo- sau biocatalitica.

- Separarea: prin cromatografia de afinitate urmarindu-se trecerea de la scara analitica initiala la scara preparativa, cu evidentierea posibilitătilor de scaling-up.

Obiective masurabile

- ④ **Obtinerea anticorpilor selectivi;**
- ④ **Imobilizarea anticorpilor;**
- ④ **Separarea amestecului racemic;**
- ④ **Elaborare metoda de separare**
- ④ **Manual de prezentare**
- ④ **Diseminare rezultate**

Rezultate estimate

- **Dezvoltarea metodelor chimice neconventionale**
- **Obtinerea anticorpilor selectivi;**
- **Imobilizarea anticorpilor;**
- **Separarea amestecului racemic;**
- **Elaborare metoda de separare**
- **Manual de prezentare**
- **Diseminare rezultate**

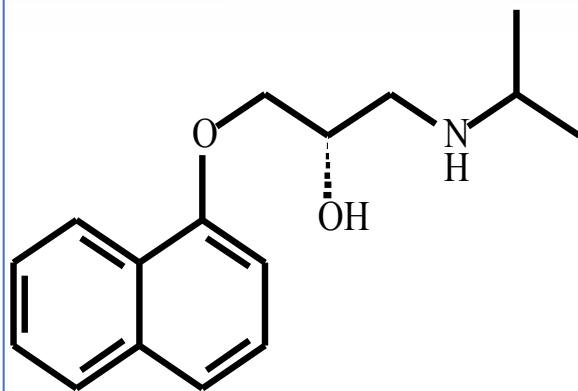
Metoda ANTISEL

Noutate si originalitate

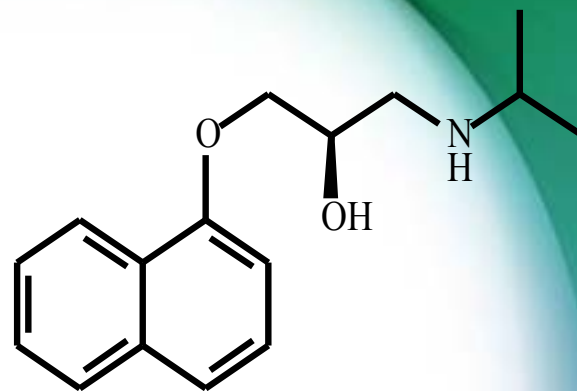
- **Elaborarea si optimizarea unei noi metode de separare, biochimice si analitice, care sa permita obtinerea unui enantiomer pur din amestecul racemic, cu ajutorul anticorpilor**

- **Se deschide o perspectiva avantajoasa pentru separarea si/sau modificarea unor structuri chirale si/sau sensibile. Posibilitatea utilizarii lor la asistenta unor reactii inalt selective, fara analog in lumea vie, este o contributie romaneasca la arsenalul procedeeelor sintetice cu aplicabilitate in industria biocompusilor**

Metoda a fost elaborata pentru propranolol



(S) - propranolol (Eutomer)



(R) - propranolol (Distomer)

Observatie:

Eutomerul, S-Propranololul, este activ,
Distomerul, R-Propranololul, nu este activ

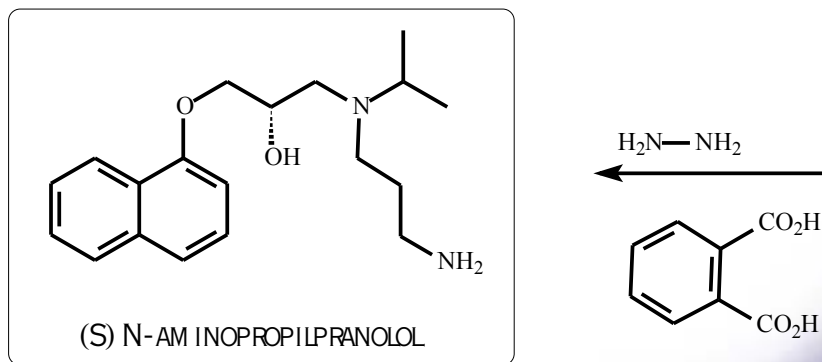
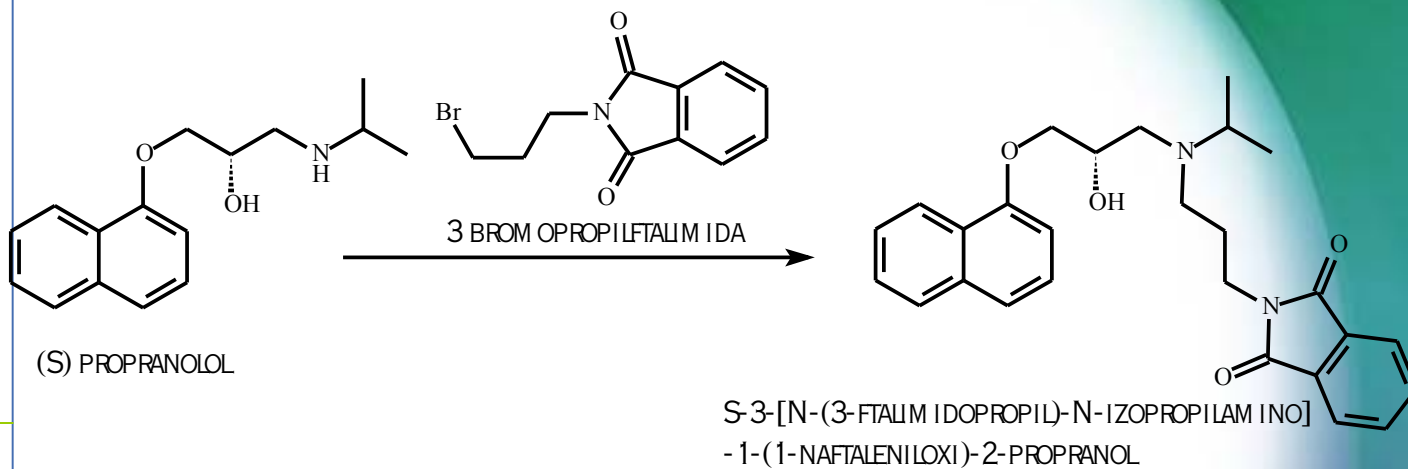
Etape

- **Sinteza haptenei**
- **Obtinerea imunogenului.**
- **Obtinerea anticorpilor**
- **Purificarea anticorpilor**
- **Prepararea de coloane cu anticorpi immobilizati**
- **Separarea amestecului de enantiomeri**

Sinteza haptenei

- ✱ Haptena se utilizeaza atat pentru obtinerea anticorpului cat si pentru imobilizare, in vederea purificarii anticorpului
- ✱ Reactie de substitutie la bromul 3-bromopropilftalimidei, urmata de hidrazinoliza intermediarului format.
- ✱ Pentru monitorizarea mersului reactiilor se urmaresc spectrele RMN ^1H respectiv, ^{13}C ale intermediarului ftalimidic precum si ale produsului de hidrazinoliza

Sinteza haptenei

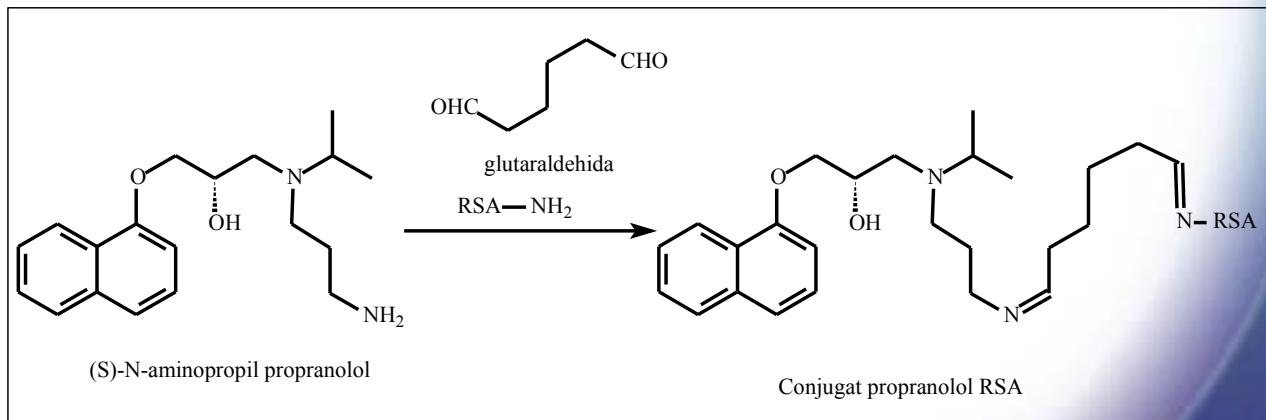


Rezultate / Sinteza haptenei

- **Atribuirea semnalelor intermediarului ftalimidic precum si ale produsului de hidrazinoliza a confirmat atat structura asteptata cat si gradul ridicat de puritate al intermediarilor dar si al produsului**

Obtinerea imunogenului

Atasarea N-propilaminopropranololului la albumina serica din iepure prin intermediul glutaraldehidei



Rezultate / Obținerea imunogenului

- Se recomandă utilizarea albuminei serice din aceeași sursă ca și specia generatoare de anticorpi pentru reducerea numărului determinantilor antigenici și astfel, spectrul anticorpilor. (s-a utilizat albumina serică de iepure (RSA)).
- Speciile moleculare formate au constituit un spectru format din conjugati ai albuminei serice cu una, două, trei... resturi de haptena, toate cu însușiri anticorpogenetice

Obtinerea de anticorpi

- **Utilizarea unui lot de min. 6 iepuri de greutate medie cca. 2,5 kg, care au fost supusi unor proceduri de imunizare repetata, o data pe saptamana timp de patru saptamani, apoi o data la 2 saptamani, timp de 8 saptamani.**
- **Amestec de imunizare: 1 mg de conjugat, dizolvat intr-un ml tampon fosfat salin la pH 7,4, emulsionat ulterior cu un volum egal de adjuvant Freund complet.**

Obtinerea de anticorpi

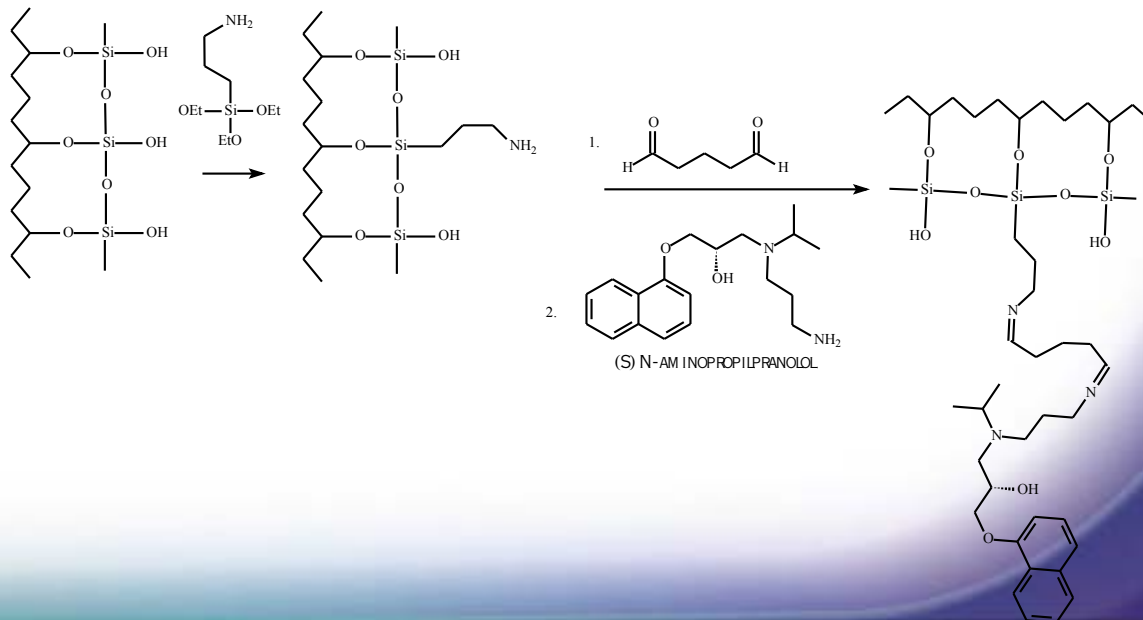
- Fiecare repriza de imunizare a constat in injectarea in ambele coapse ale iepurelui si subcutan in ambele parti ale abdomenului.
- Dupa cele 8 imunizari ale fiecarui iepure, s/a recoltat sangele prin punctie cardiaca
- Prin coagulare si centrifugare s-a recoltat antiserul, care va fi folosit apoi in procesele de separare enantioselectiva

Purificarea anticorpilor: 2 etape

- **Prima etapa:** Purificare cu solutie de sulfat de amoniu, precipitare, centrifugare, resuspendare, dializa, urmata de purificarea finala pe coloana de afinitate.
- **Etapa a 2-a:** Solutia de anticorp prepurificata prin secventa precipitare cu sulfat de amoniu - solubilizare, se trece peste coloana de afinitate, care retine anticorpul dorit.
- **Obs.** Se foloseste ca eluent o solutie tampon fosfat (Na_2HPO_4) de concentratie 0.2M la pH=7. Solutia de anticorp purificata obtinuta se utilizeaza ca atare pentru imobilizare in vederea separarii compusilor enantiopuri.

Purificarea anticorpilor: activitati intermediare

Obtinerea coloanei de afinitate:
imobilizarea (S) 3-N-
propilaminopropranololului (haptenei)
pe silicagelul activat cu gama
aminopropil trietoxi silan urmata de
tratamentul cu glutaraldehida..



Purificarea anticorpilor: activitati intermediare

Imobilizarea haptenei: se recomanda o solutie 10% v/v de gamaaminopropil trietoxisilan in toluen care se utilizeaza in raport de 50 ml la 1 g silice. Totul se refluxeaza peste noapte, dupa care se filtreaza, si se spala initial cu toluen, iar apoi cu acetona. Dupa aceea se usca, initial in curent de aer, iar apoi in etuva la 115°C peste noapte.

Purificarea anticorpilor: activitati intermediare

Activarea suportului: se adauga 25 ml solutie glutaraldehida de 2,5% in tampon fosfat Na_2HPO_4 0,05M ajustat la $\text{pH}=7$. Reactia decurge o ora la temperatura camerei dupa care se spala cu apa distilata si se pune in contact cu solutia 5% haptena in raport de 30 mg la gram de silice activata. Amestecul se mentine sub agitare la temperatura camerei 3 h dupa care se spala cu apa si se usca la vid.

Prepararea coloanelor cu anticorpi immobilizati

- Se utilizeaza acelasi tip de faza stationara care se activeaza cu gama aminopropil trietoxi silan apoi se trateaza cu glutaraldehida dupa acelasi protocol, iar peste aceasta coloana activata se trece solutia purificata de anticorp, in aceleasi rapoarte masice ca si la immobilizarea haptenei.
- Amestecul rezultat, dupa uscare la vid, se foloseste pentru ultima faza de separare a compusilor enantiopuri. In acest scop anticorpul immobilizat se trece intr-o coloana se afinitate

Separarea compusilor enatiopuri

- Pentru separarea compusilor enatiopuri se trece amestecul racemic comercial in tampon fosfat 0,05 M pH 7 prin coloana de afinitate, cu anticorpul purificat
- Mersul separarii se monitorizeaza polarimetric

Verificare metoda

- Pentru verificarea metodei s-a trecut peste o coloana de *Sepharose* activata cu *Bromocian*. un amestec racemic de propanolol; analizele efectuate au evidenciat faptul ca a fost retinut mai mult enantiomerul (S) decat (R).
- Din rotatia optica inregistrata s-a calculat ca excesul enantiomeric obtinut a fost de 10,1% ceea ce corespunde la o fractie molară a enantiomerului (R), de 0,556 in amestecul rezultat initial din coloana



Rezultate

Spectrul ^1H RMN al intermediarului ftalimidic

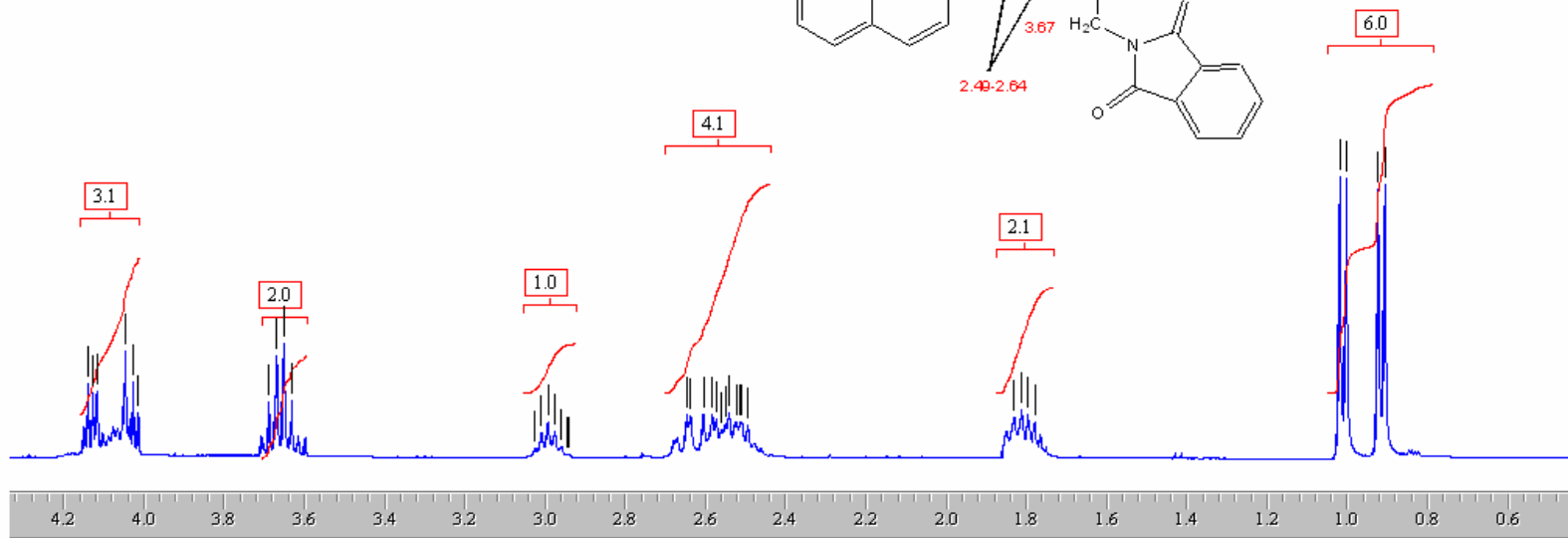
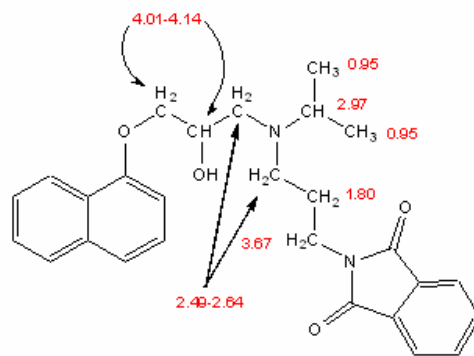
4.140
4.130
4.119
4.048
4.027
4.015

3.690
3.670
3.654
3.634

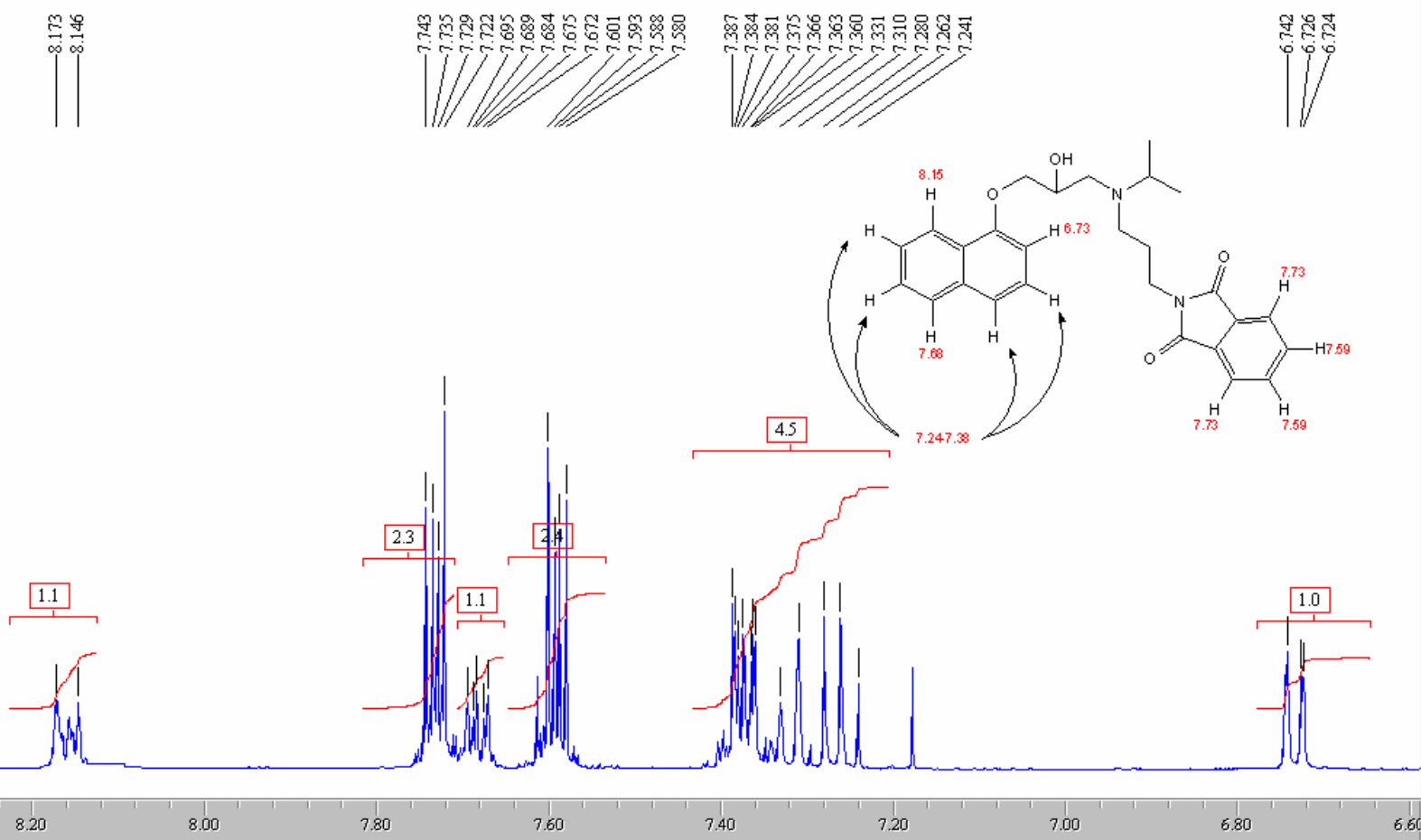
3.027
3.011
2.995
2.977
2.961
2.945
2.942
2.648
2.639
2.607
2.585
2.575
2.562
2.552
2.544
2.525
2.515
2.511
2.496

1.832
1.813
1.797
1.781

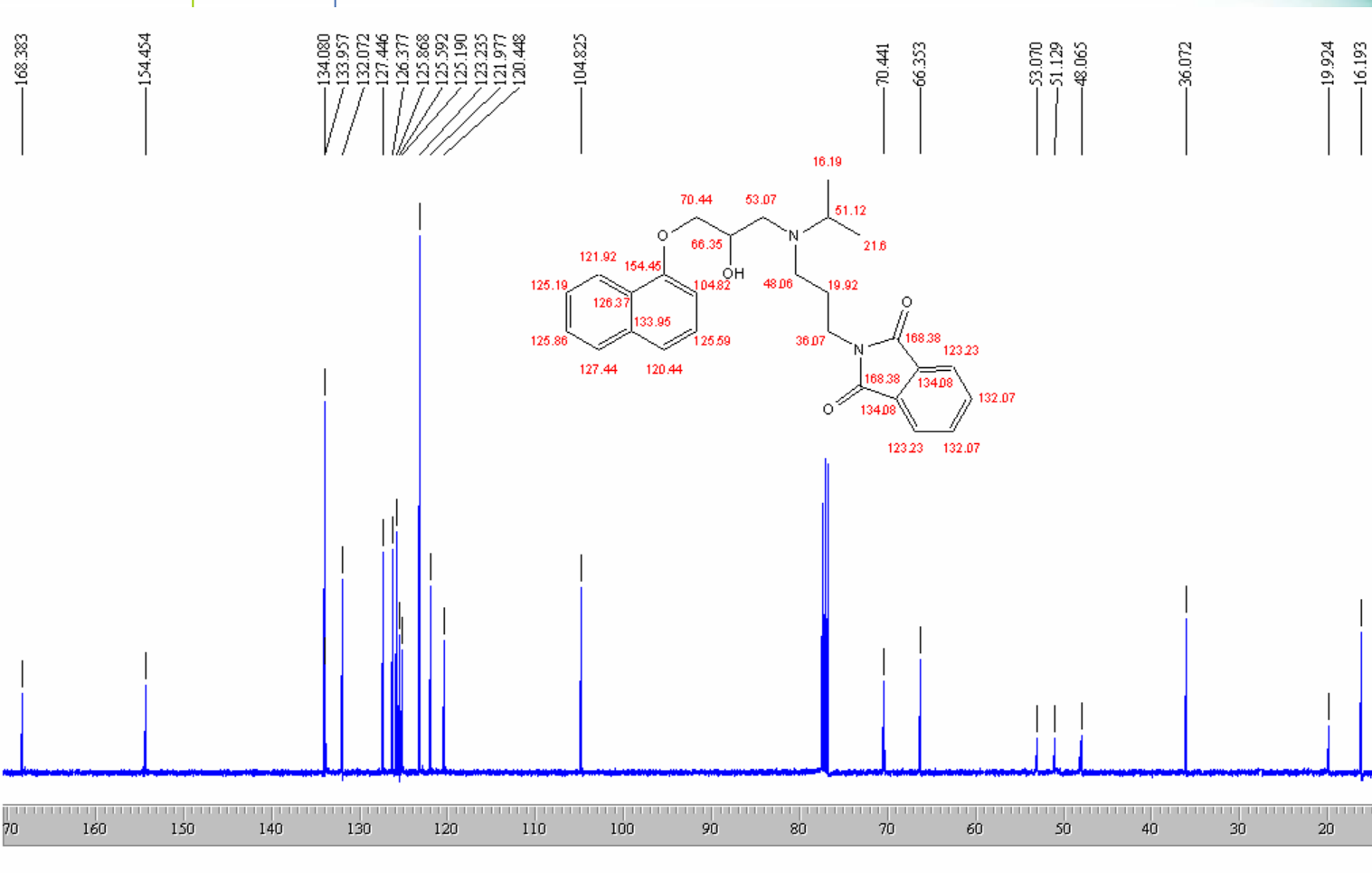
1.021
1.004
0.925
0.908



Spectrul ^1H RMN al intermediarului ftalimidic, detalii ale zonei aromatice



Spectrul ^{13}C RMN al derivatului ftalimidic



Spectrul ^1H RMN al (S) -N - propilaminopropranololului (detaliata zona alifatica)

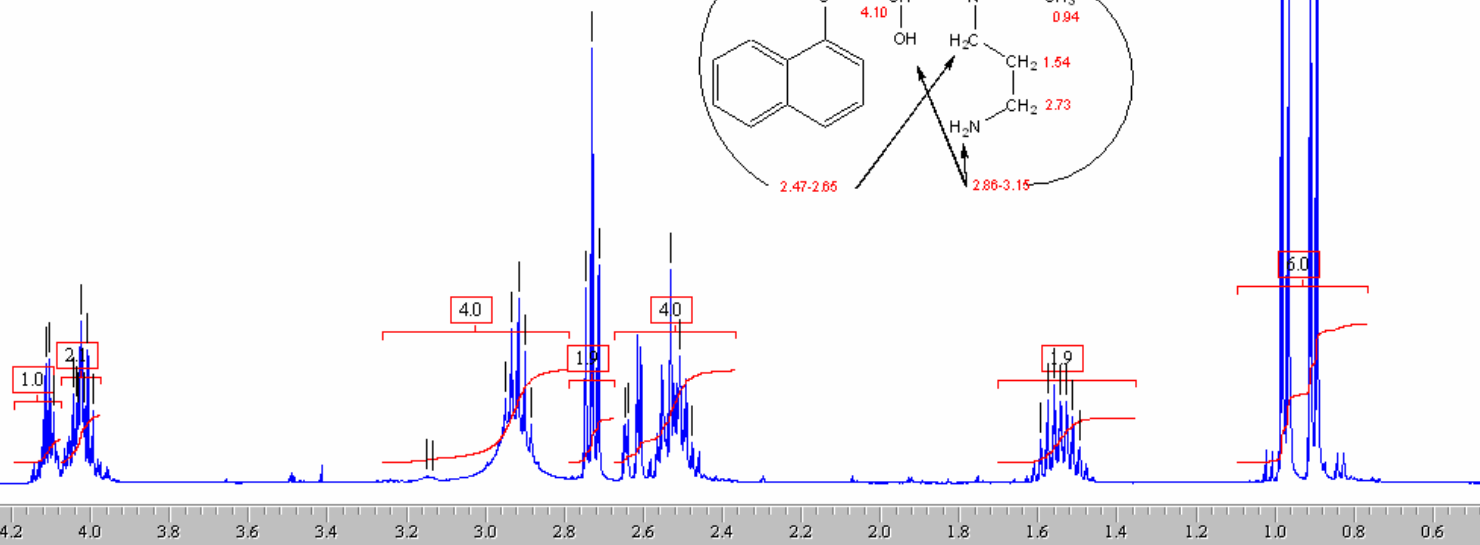
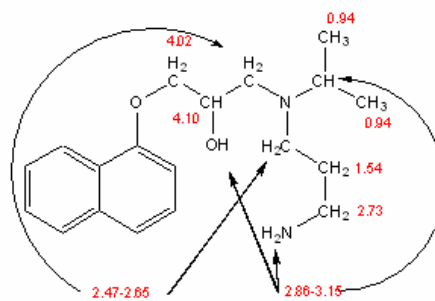
4.115
4.105
4.094
4.045
4.036
4.033
4.024
4.019
4.008
3.995

3.148
3.134

2.951
2.934
2.918
2.901
2.885
2.747
2.730
2.714
2.649
2.640
2.532
2.510
2.477

1.594
1.577
1.561
1.544
1.531
1.514
1.497

0.983
0.967
0.911
0.895



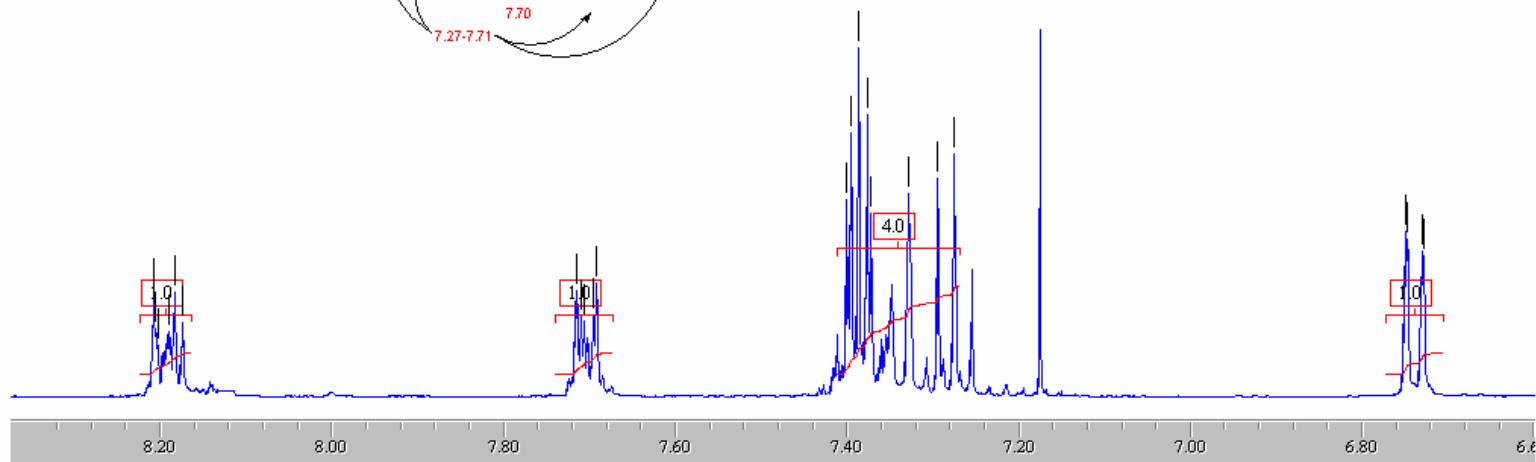
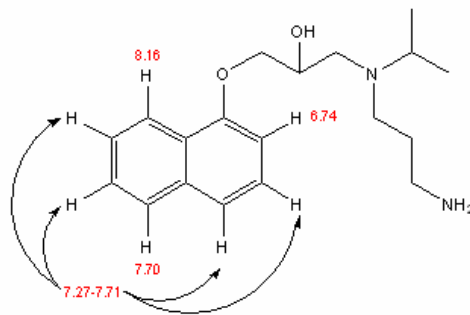
Spectrul ^1H RMN al (S) -N - propilaminopropranololului (detaliata zona aromatica)

8.207
8.206
8.202
8.190
8.183
8.174

7.716
7.710
7.707
7.695
7.692

7.401
7.396
7.387
7.376
7.372
7.328
7.294
7.276

6.750
6.748
6.731
6.729



Spectrul ^{13}C RMN al (S) -N - propilaminopropranololui

