

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-2723**
(22) Přihlášeno: **29.01.1999**
(30) Právo přednosti: **06.02.1998 DE 19981/9804815**
(40) Zveřejněno: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)
(47) Uděleno: **02.12.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.01.2009**
(Věstník č. 2/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1999/000599**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/040216**

(11) Číslo dokumentu:

300 009

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12P 17/02 (2006.01)
C12P 15/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C07D 305/14 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Zocher a kol. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229, 16-20.

(73) Majitel patentu:

INDENA S. P. A., Milan, IT

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT
Menhard Birgitta, Monheim, DE
Zenk Meinhart Hans, Munich, DE

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Způsob přípravy baccatinu

(57) Anotace:

Způsob přípravy baccatinu a/nebo baccatinových derivátů reakcí 10-desacetyl baccatinu nebo jeho derivátu s acetylovým donorem v přítomnosti enzymu, kterým je acetyltransferáza z *Taxus chinensis* o molekulové hmotnosti od 70 do 72 kD, stanoveno SDS-PAGE, s izoelektrickým bodem při pH 5,4 až 5,8 a konstantou K_M Michaelise a Mentenové pro acetylkoenzym A 55 až 65 μM . Způsob izolace a přípravy enzymu, který uvedenou acetylační reakci katalyzuje. Způsob přípravy taxolu a/nebo taxolových derivátů acetylací desacetyl baccatinu nebo jeho derivátu a následnou esterifikací vzniklého baccatinu nebo jeho derivátu.

CZ 300009 B6

Způsob přípravy baccatinu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy baccatinu a/nebo baccatinových derivátů selektivní acetylací odpovídajících desacetylsloučenin, izolovaného enzymu, který tuto acetylační reakci katalyzuje, jakož i způsob přípravy tohoto enzymu.

Dosavadní stav techniky

Taxol (paclitacel) je slibný prostředek k léčení rakoviny, který vykazuje antileukemickou a tumorinhibující aktivitu (viz například: Suffnes et al., in „The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology, A. Brossi, Hrsg. Academic press: Orlando, FL, 1985, Vol XXV, Kapitál 1). Původně se taxol získával z kůry určitého druhu (*Taxus Taxaceae*). Izolování taxolu z kůry je však obtížné i nákladné a získají se jenom velmi malé výtěžky žádaného taxolu z kůry (40 až 165 mg/kg) viz například: R. W. Miller et al., J. Org. Chem. 46 (1981) 1469–1474; V Sényl et al., J. nat. Procl. 47 (1984) 131 – 137; N. Magri et al., J. Org. Chem. 51 (1986) 797 – 802). Mimo to vede používání kůry k odumírání tisíců, které rostou velmi pomalu, takže výchozí materiál je k dispozici jenom ve velmi omezeném rozsahu.

Po objevení vlastností taxolu, pro které se doporučuje jako chemoterapeutický prostředek proti rakovině, byla řada snah připravit ho syntetickým nebo polosyntetickým způsobem. Zkoušelo se tak připravit strukturu taxolu organickou syntézou (viz například. W. F. Berkowitz et al., J. Org. Chem. 52 (1987) 1119–1124). Na základě složitosti této molekuly se však dodnes nepodařilo připravit taxol v prakticky použitelných množstvích úplnou organickou syntézou. Další cesta, která byla navržena, aby si získal taxol, vychází z částečné syntézy předchozí látky získatelné lehko a ve velkých množstvích. Jeden z těchto přístupů vychází z 10–desacetyl baccatinu III, který lze snadno a ve velkých výtěžcích extrahovat z listu *Taxus baccata* L (G. Chauviere et al., Seances Acad. Sci., Ser. 2, 1981, 293,– 501–503). Při tom je možné izolovat asi 1 g 10–desacetyl baccatinu III na kg listů, přičemž listy rychle dorůstají. Tak může být získáno velké množství předchozího 10–desacetyl baccatinu III.

Z této předchozí sloučeniny získané z biologického materiálu se může potom parciální syntézou připravit žádaná účinná látka taxol. Avšak ukázalo se, že jakkoli se zdají struktury 10–desacetyl baccatinu III a taxolu podobné, tato parciální syntéza zahrnuje ještě velké obtíže a může být provedena úspěšně jenom za použití specifických chránících skupin, přičemž žádaný produkt taxol se nakonec získá v malých výtěžcích.

Denis et al., (J. Am. Chem. Soc. 110 (1988), 5917–5919) popisuje reakci 10–desacetyl baccatinu III na taxol ve dvou krocích. V prvním kroku se acetyluje 10–desacetyl baccatin III chemicky v poloze 10. Ve druhém kroku se provádí převedení baccatinu na taxol. První krok však není regiospecifický, takže acetylace 10–desacetyl baccatinu III probíhá zejména také do polohy 7. Je tudíž nutné hydroxyskupinu v této poloze pro acetylaci znepřístupni chránicí skupinou. Pouze za použití chránicí skupiny mohlo být dosaženo acetylování v poloze 10. Použití chránicí skupiny však zahrnuje dva další kroky postupu (připojení a odstranění chránicí skupiny), což je jednak nákladné a jednak jsou výtěžky produktů podstatně sníženy. Další nevýhoda při použití chránících skupin spočívá v tom, že zejména aplikace produktu jako farmaceutické účinné látky musí mít dále zařazeny nákladné čistící a analytické metody, aby byla jistota, že se v produktu již nenachází žádná molekula opatřená chránicí skupinou.

Zocher et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 299 (1996), 16–20) popisují biosyntézu taxolu. V mezikroku byla přitom provedena acetylace 10–desacetyl baccatinu III na baccatin III pomocí surových rostlinných extraktů z kořenů *Taxus baccata*. Nepodařilo se však izolovat substance,

5 které způsobují acetylaci, nebo je charakterizovat. Nevýhodou při použití surového extraktu je skutečnost, že další četné reakce, zejména acetylace do dalších poloh, mohou být vyvolány nebo ovlivněny rovněž látkami existujícími v surovém extraktu. Dále rostlinný extrakt nevykazuje žádné definované a reprodukovatelné složení, takže použití surových rostlinných extraktů vede k nekontrolovatelným a rozmanitým reakcím, a výtěžkům.

10 Úkolem předkládaného vynálezu bylo proto dát k dispozici způsob, kterým může být připraven baccatin a baccatinu podobné baccatinové deriváty selektivní acetylací odpovídajících 10-desacetyl sloučenin v poloze 10. Další úloha spočívá v tom, dát k dispozici izolovanou látku, která tuto reakci specificky katalyzuje.

Podstata vynálezu

15 Tyto úkoly se podle vynálezu řeší způsobem přípravy baccatinu nebo baccatinových derivátů, vyznačujícím se tím, že 10-desacetylbaccatin nebo 10-desacetylbaccatinový derivát reaguje v přítomnosti izolovaného enzymu a acetylového donoru, přičemž jako enzym se používá acetyltransferáza a molekulové hmotnosti od 70 do 72 kD, stanovené SDS-PAGE (natrium-dodecylsulfát-polyakrylamid-gelovou elektroforézou), která se získá z buněčné kultury *Taxus Chnensis*.
20 Bylo zjištěno, že regioselektivní acetylace v poloze 10 je katalyzována izolovaným enzymem, který může být získán z buněčné kultury *Taxud chinensis*.

25 Překvapivě bylo zjištěno, že za použití izolovaného a vyčištěného enzymu může být obdržena vysoká regiospecifita co se týče acetylace v poloze 10. Tato specifita je preferována > 80 %, více preferována > 90 % a nejvíce preferována > 95 %. Bylo zjištěno, že použitý enzym může získat specifitu > 99 %. Specifita > 80 % přitom znamená, že acetylace se konala na více jak 80 % v poloze 10 a méně než 20 % v jiných polohách výchozí sloučeniny. Následkem toho další hydroxylové skupiny, které existují ve výchozí látce, nemůže být blokovány chránicí skupinou, protože acetylace těchto dalších hydroxyskupin při použití enzymu podle vynálezu se nevyskytuje, nebo existuje jen ve velmi malém rozsahu.
30

Překvapivě bylo zjištěno, že enzym použitý podle vynálezu vykazuje vysokou substrátovou specifitu. Tak byly podrobeny reakci jenom 10-desacetylbaccatinu respektive deriváty 10-desacetylbaccatinu, které v poloze C 10 a jejím okolí vykazují konfiguraci podobnou 10-desacetylbaccatinu III. Zejména nebyly acetylovány deriváty baccatinu, u nichž je blokován přístup k poloze 10 prostorově náročnými substráty, jako možná 10-desacetyltaxol a 10-desacetylcefalomannin. Předpokladem pro to, aby byl derivát baccatinu rozpoznán enzymem podle vynálezu, je tudíž, aby tyto deriváty, které vykazují cyklickou strukturu taxanu, v polohách 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 13 v podstatě odpovídají 10-desacetylbaccatinu III, to znamená neměly v této poloze žádné jiné substituenty nebo pouze substituenty, které mají malý objem. S výhodou se tento působ hodí pro baccatinové deriváty, které mají v poloze 7 až 13 stejné substituenty jako 10-desacetylbaccatinu III nebo alespoň zčásti substituenty s menším objemem než substituenty 10-desacetylbaccatinu III, obzvláště vodík. Objemné substituenty v ostatních polohách reakci neruší. Zvláště výhodně se způsob používá k acylaci 10-desacetylbaccatinu III. Dále se způsob obzvláště používá k selektivní acetylaci 14-hydroxy-10-desacetylbaccatinu III v poloze 10.
45

Naproti tomu se deriváty 10-desacetylbaccatinu III, jejichž hydroxylové skupiny jsou v poloze 7 blokovány objemnou skupinou, je třeba 7-TEC-10-DAB-III nebo 7-BOC-10-DAB-III, nejsou enzymem podle vynálezu jako substrát rozeznány. Takové blokování však není nutné, protože regioselektivní acetylace v poloze 10 probíhá také při existenci dalších hydroxyskupin v jiných polohách.
50

Způsobem podle vynálezu je možné acetylovat taxanové deriváty selektivně v poloze 10, a to takové, které mají stejné, menší nebo méně objemné substituenty v polohách 7 až 13 nebo 10-desacetylbaccatinu III. Takové taxanové deriváty, u nichž jsou substituenty existující
55

v 10-desacetylbaecatinu III (to je OH v poloze 7, CH₃ v poloze 8, =O v poloze 9, OH v poloze 10, CH₃ v poloze 12 a OH v poloze 13) nebo jsou nahrazeny podobně objemným nebo menším zbytkem, zejména vodíkem, spadají pod pojem deriváty 10-desacetylbaecatinu a mohou být rovněž regiospecificky acetylovány, pokud vykazují v poloze 10 skupinu OH. Příklady takových derivátů jsou 10-desacetyltauyunnanin-C, 10,14-desacetyltauyunnanin-C, 2,10,14-desacetyltauyunnanin-C, 5,10,14-desacetyltauyunnanin-C a 2,5,10,14-desacetyltauyunnanin-C.

S výhodou se způsob podle vynálezu připravuje baecatin-III z 10-desacetylbaecatinu III, 14-hydrobaecatin III z 14-hydroxy-10-desacetylbaecatinu III, nebo tauyunnanin C z 10-desacetyltauyunnaninu C.

Způsob podle vynálezu se provádí v přítomnosti acetylodonoru. Jako acetylodonor se v podstatě hodí každá substance, která má při katalytické reakci k dispozici acetylskupinu. S výhodou se provádí reakce v přítomnosti acetylkoenzymu A jako acetylodonoru.

Použití izolovaného enzymu podle vynálezu nabízí technicky mnoho předností. Reakci lze zejména s ohledem na reakční rychlost a reprodukovatelnost při použití izolovaného enzymu snadno kontrolovat.

Výhodný je izoelektrický bod pH 5,4 až 5,8, s výhodou 5,5 až 5,7 a zvláště výhodně pH 5,6. Dále bylo zjištěno, že enzym použitý podle vynálezu vykazuje konstantu Michaelise a Mentenové K_M pro acetylkoenzym A 55 až 65 μM, s výhodou 59 až 63 μM a zvláště výhodně 61 μM.

Dalším předmětem vynálezu je izolovaný enzym, vyznačující se tím, že

- a) 10-desacetylbaecatin-III acetyluje za přítomnosti acetylodonoru, zejména acetylkoenzymu A v poloze 10 selektivně
- b) vykazuje molekulovou hmotnost 70 až 72 kD, stanovenou SPD-PAGE a
- c) získá se z buněčné kultury *Taxus chinensis*.

Enzym podle vynálezu je v čistotě > 50 %, obzvláště > 80 % a výhodněji > 90 % a nejvýhodněji > 95 %. Enzym podle vynálezu se vyznačuje tím, že 10-desacetylbaecatin-III v přítomnosti acetylodonoru, zejména acetyl-CoA selektivně acetyluje v poloze 10. To znamená, že acetylace zbylých hydroxyskupin 10-desacetylbaecatinu III se v polohách 1,7 a 13 prakticky nepozoruje. Acetylační reakce vykazuje zejména selektivitu > 50 % pokud jde o polohu 10, s výhodou > 80 %, výhodněji > 90 % a nejvýhodněji > 95 %. Izolovaný enzym je dále charakterizován molekulovou hmotností 70 až 72 kD, stanovenou SDS-PAGE. Pro stanovení molekulových hmotností byly chromatografovány 0,3 μg homogenního proteinu v 10% denaturovaném SDS-gelu paralelně s markerovým proteinem o známé molekulové hmotnosti (marker Rainbow). Barvení stříbrem byly proteiny zviditelněny, přičemž molekulová hmotnost byla určena srovnáním hodnot R_f kalibračního proteinu a enzymu podle vynálezu. Gelovou SDS-kalibračního proteinu a enzymu podle vynálezu. Gelovou SDS-elektroforézou stanovená molekulová hmotnost byla potvrzena gelovou filtrací na vhodném gelovém filtračním sloupci. Gelová filtrace se prováděla na sloupci Biosilect-SEC 250-5 (Biorad) ekvilibrovaném 50 mM Tris, pH 8,5, 20 mM 2-merkapt ethanolu v zařízení FPLD (BioLogic Workstation, Biorad), a sice při průtokové rychlosti 0,2 ml/min. Přitom byl sloupec nejprve kalibrován proteiny o známé molekulové hmotnosti. Za identických podmínek se sloupcem vedlo 50 μg proteinu podle vynálezu. Eluát byl shromážděn ve frakcích po 250 μl a byla určována aktivita eluátu, jak je popsáno níže. Molekulová hmotnost byla získána porovnáním s elučními dobami známých standardů.

Enzym podle vynálezu může být izolován z buněčné kultury *Taxus chinensis*. Vykazuje izoelektrický bod při pH 5,4 až 5,8, s výhodou při pH 5,5 až 5,7 a zejména pH 5,4 až 5,8, s výho-

dou při pH 5,5 až 5,7 a zejména pH 5,6. Dále vykazuje konstantu K_M Michaelise–Mentenové pro acetylkoenzym A 55 až 65 μM , s výhodou 59 až 63 μM , a obzvláště 61 μM .

5 U enzymu podle vynálezu se jedná o acetyltransferázu, zejména o acetyl–CoA–10–hydroxy–taxan–O–acetyltransferázu.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy výše popsaného enzymu, vyznačující se tím, že enzym izoluje ze zdroje obsahujícího enzym, přičemž se používají známé metody čištění, a po každém čištění se určují frakce, ve kterých se enzym vyskytuje tím, že se přidá 10–desacetyl–
10 baccatin nebo derivát 10–desacetylbaccatinu a acetyl–donor a dokazuje se vytvořený produkt acetylace.

Jako zdroj obsahující enzym se může použít například rostlinný extrakt. Jako enzym obsahující zdroj se s výhodou používá buněčná kultura, zejména suspenzní buněčná kultura. Použití buněč–
15 né kultury je výhodné proto, poněvadž mohou být získána velká množství výchozího materiálu. Ve srovnání s použitím surového extraktu jako zdroje obsahujícího enzym je při použití buněčné kultury na základě velkého množství výchozího materiálu možné vyčistit enzym do vysoké čistoty. Zvláště výhodný je výchozí materiál pocházející z *Taxus chinensis*, například buněčná kultura z *Taxus chinensis*. K čištění enzymu z výchozího materiálu mohou být k získání enzymů
20 respektive proteinů použity známé metody čištění. S výhodou se používá srážení síranem amonným ze surového extraktu jakož i chromatografické metody čištění, jako použití sloupce Sephadexu G–25, aniontoměničové chromatografie například na DEAE–Sephacelu, gelové filtrace například na Ultrogelu AcA 44, aniontoměničové chromatografie například na HighQ, sloupcové chromatografie s hydroxyapatitem, barevné afinitní chromatografie například na High
25 Trap Blue, hydrofóbní interakční chromatografie například na Phenylsepharose a/nebo barevné afinitní chromatografie například na Mimetic–Grün 1A6XL. S výhodou zahrnuje čištění alespoň jeden krok za použití aniontoměničové chromatografie na HighQ. Sloupec HighQ je měnič aniontů se skupina $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ jako ligandy. Bylo zjištěno, že zejména tímto krokem čištění lze odstranit látky, které katalyzují acetylaci v jiných polohách než v poloze 10.

30 Při postupu podle vynálezu se po každém kroku čištění stanovuje enzymová aktivita frakcí, aby se zjistilo, ve kterých frakcích se enzym nachází. K tomu se podrobí reakci s acetyldonorem frakce respektive část frakce s 10–desacetylbaccatinem nebo derivátem 10–desacetylbaccatinu, jak byl výše definován. Ve frakcích, v nichž je žádaný enzym, se může dokazovat produkt acetylovaný v poloze 10. Pro tento důkaz se s výhodou používá 10–desacetylbaccatin–III nebo
35 10–desacetyltaxuyunannin–C. Důkaz vytvořeného acetylovaného produktu lze získat použitím vhodných značkových skupin ve výchozích substancích. S výhodou se používá značkování acetylodonoru. Takový označovaný acetylodonor zahrnuje značkovanou acetyllovou skupinu, s jejíž pomocí potom může být určen produkt acetylovaný v poloze 10. S výhodou se používá radioaktivně značkováný acetylodonor. Vhodné radioaktivní markerové skupiny jsou při tom
40 ^{13}C a ^{14}C . Zvláště výhodně se jako acetylodonor používá acetylkoenzym A, zejména $[2-^{14}\text{C}]$ –acetylkoenzym A.

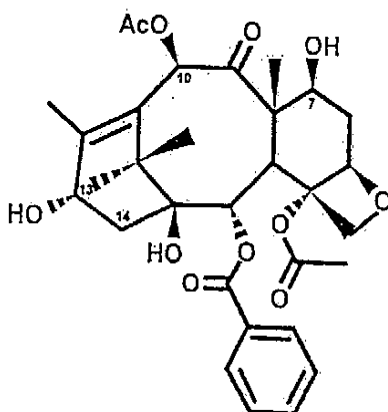
Důkaz je také možné provést značkováním těžkým izotopem. V tom případě se může reakční
45 produkt určit pomocí hmotnostní spektrometrie.

Způsobem přípravy baccatinu nebo derivátů baccatinu podle vynálezu za použití enzymu podle vynálezu je možné připravit sloučeniny baccatinu respektive taxanu specificky acetylované v poloze 10. O takové sloučeniny je zájem zejména jako o výchozí substance pro parciální synté–
50 zu taxolu. Dalším předmětem vynálezu je proto způsob přípravy taxolu a/nebo derivátů taxolu, vyznačující se tím, že baccatin nebo deriváty baccatinu, které byly připraveny shora popsaným způsobem, mohou být známou reakcí převedeny na taxol respektive deriváty taxolu. Parciální reakce baccatinu respektive baccatinových derivátů na taxol, respektive deriváty taxolu je podle stavu techniky známa a popsána a zahrnuje v principu přivedení vhodných substituentů

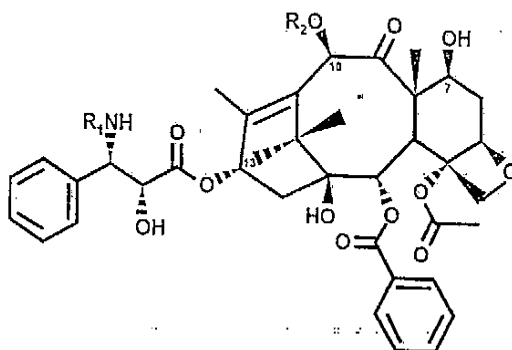
k hydroxylové skupině v poloze 13 baccatinového derivátu. Vhodným způsobem použité baccatinové deriváty vykazují proto minimálně v poloze 13 volnou skupinu OH.

- 5 Reakce přeměny baccatinových derivátů na taxol respektive deriváty taxolu se provádí esterifikací skupin OH v poloze 13 baccatinového derivátu vhodnou kyselinou. Takové postupy jsou v literatuře podrobně popsány, například v patentu US 4 814 470 (Colin et al.), v patentu US Re. 34 277 (Denis et al.), v EP 0 400 971 A2, v patentu US 4 924 011 (Denis et al.), v patentu US 5 476 954 (Bourzat et al.) jakož i Denis et al., J. Am. Chem. Soc. 110 (1988), 5917–5919.

- 10 Pro znázornění jsou dále uvedeny strukturní vzorce baccatinu–III a paclitaxelu:



baccatin III



paclitaxel $R_1 = \text{COC}_6\text{H}_5$; $R_2 = \text{CH}_3\text{CO}$

- 15 Vynález bude dále osvětlen následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

20

Příklad 1

Kultivace suspenzní buněčné kultury z *Taxus chinensis*

- 25 Byly použity suspenzní buněčné kultury z *Taxus chinensis* ze sbírky ústavu „Institut für Pharmazeutischer Biologie der Universität München“, které původně pocházejí z jehličí stromu *T. chinensis* (tis čínský). Kultury se ponechaly růst 14 dní při 24 °C, 100 U/min a 1500 lux. Potom se přeneslo 150 ml buněčné suspenze sterilní 50 ml pipetou do 250 ml média B5+ 1:

Složení média B5+1 (modifikovaného podle Gambora, Millera a Ojimy: Experimental Research, 1968, 50, 151–158).

5	Kyselina naftylová	10 μ M
	benzylaminopurin	0,2 μ M
		mg/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150
10	CaCl ₂ ·2H ₂ O	150
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250
	KNO ₃	2500
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	25,6
15	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	34,27
	KJ	0,75
	MnSO ₄ ·H ₂ O	10
	H ₃ BO ₃	3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3
20	Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
	kyselina nikotinová	1
	thiaminiumchlorid	10
25	pyridoxylhydrochlorid	1
	meso-inosit	1000
	D(+)-sacharóza	20000
	pH 5,6	
	NZ-aminy	1000
30	NZ-aminy byly přidávány k médiu po autoklávování a ochlazení za sterilních podmínek jako sterilní zásobní roztok (10 g/l)	

35 Třetí den po tomto přeočkování se přidalo 30 μ M methyljasmonátu (firmy Serva) a kultura se nechala růst další 4 dny (Grundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2389–2393). Potom se buňky oddělily od média vakuovou filtrací a po šokovém vymrazení kapalným dusíkem se použily pro vyloučení enzymu. Při –20 °C mohly být ale také skladovány až do jednoho měsíce, potom aktivita hledaného enzymu silně poklesla.

Příklad 2

40 Enzymový test k určení aktivity acetyltransferázy

Pro to, aby se enzym mohl vyčistit, charakterizovat a dokázat, je nezbytným předpokladem dostupnost přesných a dostatečně citlivých testovacích metod. Zde to bylo zjišťování vytvořeného produktu, například taxuyunnaninu C z 10–desacetyltaxuyunnaninu, pro což byla vyvinuta
45 jednoduše proveditelná a spolehlivá metoda.

Dostatečné množství testovaného roztoku enzymu bylo připipetováno k 50 μ l pufru Tris (0,8 M, pH 8,5) v nádobkách Eppendorf. Potom se přidalo 30 μ l vyčištěného acetyl–CoA (5 nmol
50 neznačeného a 0,02 μ Ci–[2–¹⁴C]acetylkoenzymu–A) a 15 nmol základního, v DMSO rozpuštěného, 3 mM roztoku 10–desacetyltaxuyunnaninu C, při kontrole místo tohoto taxanu jen odpovídající množství DMSO. Po 3 minutové inkubaci při 35 °C byla usazenina okyselena 20 μ l 12 % H₂SO₄, vytvořený taxuyunnanin C byl vytřepán (10 minut dnem vzhůru na třepáče) s 600 μ l

tert-butylmethyletherem a usazenina se potom centrifugovala (4 minuty 14000 U/min, centrifuga Eppendorf). Ještě existující nerozložený $[2-^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA zůstal ve vodné fázi. 500 μl organické fáze bylo po probublávání vzduchem zahuštěno dosucha, čímž mohla být rovněž odstraněna eventuálně přítomná $[2-^{14}\text{C}]$ kyselina octová, která byla přítomna po předchozím
 5 okyselení jako těkavá kyselina. Pomocí scintilačního čítače (Multiple Purpose Scintillation Counter LS 6500, firma Beckmann) nebo radioscaneru pro tenké vrstvy (Automatic TLC Linear Analyzer, firma Berthold) byl určen druh a množství vytvořeného produktu. Tento první se použil, aby se s načtenými hodnotami cpm zjistila přeměna a tím i aktivita enzymů. Pomocí chromatografie na tenké vrstvě (DC) (LM: chloroform: acetonitril 7:3) a následným vyhodnocením
 10 radioscanerem se mohlo přezkoušet, zda-li radioaktivita změřená scintilačním čítačem skutečně také odpovídá piku ve výšce hodnoty R_f očekávaného produktu.

Příklad 3

Čištění acetyltransferázy

15

3.1. Získávání tkáňové kultury a odsolení na Sephadexu G25

K získávání surového extraktu proteinu byla použita sedm dní stará suspenzní kultura, která byla získána třetího dne po přeočkování s 30 μM MeJA. 200 gramů čerstvě odsátých buněk bylo
 20 vymrazeno kapalným dusíkem. V hmoždíři chlazeném ledem byla potom buňky smíchány s 20 gramy PVPP a s 400 ml standardního pufru A (100 mM kyseliny borité/NaOH, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu) a za míchání ponechány rozstát. PVPP váže část fenolů, rušících v dalším kroku čištění, mimo jiné tříslovin obsažených v extraktu. Homogenní buněčná kaše byla potom přes čtyřikrát přeložený mul filtrována a vylišována šťáva
 25 centrifugována při 15000 x g (10 minut, rotor SS34). Leden chlazený zůstatek byl smíchán s 50 ml kalciumfosfátového gelu suspendovaného ve standardním pufru A (100 mM kyseliny borité/NaOH, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu). Objemový údaj udává množství gelu, které se obdrží po desetiminutové centrifugaci při 2500 U/min a odpovídají 1,9 gramům $\text{TG Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Tato směs se ponechá 10 minut v ledové chladicí lázni za občasného
 30 míchání stát. Během této doby by se měly na gel adsorbovat průvodní látky, jako například třísloviny obsažené ve velkých množstvích. Acetyltransferáza zůstala v roztoku a mohla být následnou centrifugací (6.000 x g, 5 min, rotor GSA) oddělena od gelového materiálu.

Potom byl jako peleta přítomný gel ještě jednou zachycován v 75 ml standardního pufru A, míchán 5 minut skleněnou tyčinkou a ještě jednou centrifugován 5 minut při 6000 U/min (rotor GSA), aby se část acetyltransferázy adsorbovala na gel a tímto následným zpracováním se
 35 dostala do přebytku. Bez použití kalciumfosfátového gelu se vyskytovaly v dalším kroku čištění velké potíže, protože dosud obsažené průvodní látky velmi rychle ucpávaly membránu míchané kyvety a potom zabarvovaly použité sloupce tmavohnědé a tím rychle snižovaly jejich vazební
 40 kapacity.

Vyčištěný ledem chlazený zůstatek byl za pomalého míchání po částech podroben reakci s amonium sulfátem až do 70 % nasycení a po úplném přidání ještě dalších 30 minut pomalu míchán. Potom mohl být vypadnutý protein peletován při 15.000 U/min (10 min, rotor SS34). Sraženina
 45 byla opatrně resuspendována v 30 ml standardního pufru B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu) a roztok byl vysolen za použití tohoto pufru pomocí sloupce Sephadexu G25 (Pharmacia; 2,7 $\varnothing$ x 7 cm), přičemž současně bylo odděleno 60 % cizího protejnu.

50 [G25-eluat: 82 ml, 78 mg protienu]

3.2. Aniontoměničová chromatografie na Sephacelu DEAE

U Sephacelu DEAE se jedná o modifikovanou celulózu, na kterou jsou vázány kladně nabitě diethylaminoethylové zbytky. Je-li izoelektrický bod rozpuštěných proteinů kyselější než použitý pufr, existují jako anionty, a mohou být tudíž vázány na kladně nabitý materiál sloupce. Přídavkem silnějších aniontů, jako například Cl^- nebo SO_4^{2-} , se zeslabuje elektrostatická interakce adsorbovaného proteinu a skupin DEAE. Následkem toho se anionty proteinů vymění za anorganické anionty a enzym se tak eluuje.

Tímto krokem čištění bylo odděleno 24,4 % cizího proteinu jakož i zejména průvodní látky obsahující fenol, mimo jiné třísloviny. Materiál sloupce se barvil už při prvním použití silně hnědě, mohl však být čištěn 1 M NaOH. Znečištění sloupců, které mohou být později použity v čisticím procesu, mohlo být tímto krokem značně redukováno.

Průběh sloupce DEAE (2,5 cm Ø x 5 cm) včetně 30 ml standardního pufru B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu), který byl sloupec promýván, byl zahuštěn tlakovou filtrací v míchané kyvetě (Amicon, 400 ml, membrána PM10) na 5 ml.

[DEAE eluát: 110 ml, 59 mg proteinu]

3.3 Gelová filtrace na Ultrogeneru AcA 44

Princip gelové filtrace spočívá v tom, že makromolekuly, jako například proteiny, jsou distribuovány v závislosti na jejich velikosti a tvaru do matrice pórů definované velikosti (nabírací objemy) a do okolního kapalného prostoru. Molekuly, které jsou příliš velké, aby se mohly dostat do pórů gelu, putují okolo částic a jsou tak rychleji eluovány než středně velké proteiny, které jsou nejdříve z pórů retardovány, aniž by se do nich dostaly. Ještě menší molekuly, mimo jiné ionty solí, se dostávají nejprve do pórů, které opouštějí teprve po určité době prodlení, protože zůstávají na sloupci nejdéle.

Tato technika je velmi šetrná, poněvadž se nevyskytují prakticky žádné interakce mezi materiálem a proteinem a nemusí se užívat žádné speciální pufrы. Mimo to se provádí úplné odsolení eluátu, poněvadž menší ionty, v tomto případě sulfátové ionty, setrvávají na sloupci mnohem déle než aktivní protein.

Byl používán polyakrylamid-agarózový gel, pro který se udává frakcionační oblast 10–130 kD (Ultrogel AcA 44 firmy Serva).

Zahuštěný roztok proteinu byl přes noc rozdělen na ekvilibrovaném sloupci (2,8 cm Ø x 100 cm) se standardním pufrém B rychlostí 20 ml/h. 60 frakcí (á 6,5 ml) bylo testováno na obsah proteinu a aktivitu acetyltransferázy. Frakce s hlavní aktivitou byly spojeny a dále čištěny.

S tímto eluátem lze měřit specifickou aktivitu acetyltransferázy. Chromatogram na tenké vrstvě vykazoval kromě významného píku při nižší hodnotě R_f také pík ve výšce hodnoty taxuyun-naninu C. [AcA-eluát: 53 ml, 25,7 mg, celková aktivita 724 pkat byla použita jako 100 %]. Touto gelovou filtrací bylo separováno 57 % cizího proteinu.

3.4. Aniontoměničová chromatografie na HighQ

Stejně jako sloupec DEAE je také sloupec HighQ, který obsahuje skupinu $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ jako ligandy, aniontoměnič, v protikladu k prvnímu však silnější, to znamená, že se nemění v široké oblasti pH jeho ionizační stav. U slabých iontoměničů při různých hodnotách pH značně kolísá stupeň disociace a tudíž i výměnná kapacita. Protože materiál sloupců HighQ sestává z hustě uložených cca 10 μm malých částic pryskyřice a z toho vyplývá i vyšší protitlak, musí se provozovat na FPLC-zařízení (firmy Biorad).

Odsolený AcA-eluat (53 ml) byl čerpán průtokovou rychlostí 2 ml/min na připravený sloupec 5 ml HighW ekvilibrovaný standardním pufrem B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 02 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu) a tento sloupec se také tímto pufrem následně promýval. V bezbarvém průtoku se nacházela část inaktivního proteinu, s 0,07 M KCl ve standardním pufru B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu) byl odstraněn další cizí protein a žluté průvodní látky. Při dalším stupni gradientu, 0,14 M KCl v standardním pufru B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu), byl eluován aktivní protein a vedle toho také žluté průvodní látky. Také eluat získaný s 1 M KCl ve standardním pufru B (50 mM, Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu) byl žlutě zabarven a obsahoval 1/3 naneseného proteinu, avšak bez aktivity acetyltransferázy. Tímto posledním krokem se sloupec současně regeneroval.

Velká výhoda tohoto kroku čištění spočívala v tom, že velké objemy AcA-eluátu mohly být rychle a šetrně zahuštěny na 4 ml (4 frakce á 1 ml).

Gradient: Doba (min)	1 ml KCl v standardním pufru B (%)
0	0
35	0
35	7
45	7
45	14
55	14
55	100
70	100

[Eluat High-Q: 4 ml 8,8 mg proteinu, 796 pkat]

3.5 Hydroxyapatit

Byl použit sloupec CHT II (firma Biorad), který byl plněn sférickými částicemi hydroxyapatitu, $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$. Negativně nabitě proteiny se mohou v přítomnosti nízkomolárního fosfátového pufru nejprve vázat na kationty Ca^{2+} a potom mohou být vytěsněny vyššími koncentracemi fosfátů do elučního pufru.

Zásadité proteiny s vysokým pI mají vyšší afinitu k materiálu sloupce než ty s nižším pI. Struktura hydroxyapatitu s Ca^{2+} ionty v kladně nabitých centrech a PO_4^{3-} v negativně nabitých, má za následek smíšenou iontoměničovou separaci. HighQ-eluat byl čerpán rychlostí 0,5 ml/min na sloupec CHT II (5 ml) ekvilibrovaný fosfátovým pufrem (10 mM Na_2PO_4 , pH 6,8, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu) a promýván 12 ml tohoto pufru. Eluce aktivního proteinu se prováděla se 160 ml fosfátového pufru (20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptoethanolu). Také při dalším zvýšení koncentrace fosfátu na 400 mM nemohl být eluován další protein.

Gradient: Doba (min)	160 mM fosfátového pufru (%)
0	0
40	0
40	100
70	100

Zachycené frakce 0,5 ml byly zkoušeny na obsah proteinu a aktivitu acetyltransferázy.

[CHT II-eluat: 1,5 ml, 0,73 mg proteinu, 578 pkat]

Tímto krokem čištění bylo docíleno faktoru obohacení 8,7 oproti HighQ-eluátu, přičemž při 92 % separaci cizího proteinu byla zaznamenána ztráta aktivity 27 %.

3.6. Barevná afinitní chromatografie na High Trap Blue

HiTrapBlue 1 ml (firma Pharmacia) obsahuje syntetickou polycyklickou barevnou látku Cibacron Blue F3G-A, která je připojena na agarózovou matici. Tyto ligandy vykazují určitou strukturní podobnost s přirozeně se vyskytujícími molekulami, jako kofaktory NAD^+ a NADP^+ , což jim umožňuje vázat pevně a specificky proteiny, kromě jiného enzymy, které potřebují substance obsahující adenylát. Sloupcový materiál se proto označuje za „skupinospecifický“. Specifita je však relativizována tím, že až dosud katalogizované enzymy potřebují přibližně třetinu koenzymu, který obsahuje nukleotidovou komponentu. Proto se mohou proteiny vázat na aromatické ligandy také specificky elektrostatickými a/nebo hydrofobními interakcemi.

Eluce se provádí specificky s příslušným kofaktorem nebo nespecificky s roztoky solí.

Acetyltransferáza, která váže acetyl-CoA obsahující fosfoadenosyldifosfát, se adsorbovala na modrý sloupcový materiál a byla nespecificky eluována s lineárním KCl-gradientem. K tomu se nanášel CHT II-eluát na sloupci High Trap Blue ekvilibrovaném standardním pufrém B zařízením FPLC (firmy Biorad) průtokovou rychlostí 0,5 ml/min a tímto pufrém se následně promýval. Eluce proteinu vázaného na sloupec se prováděla při 0,5 ml/min s lineárním solným gradientem 0–1 M KCl ve standardním pufru B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu) po dobu 30 min.

Gradient: Doba (min)	1 M KCl standardního pufru B (%)
0	0
30	0
60	100

Velikost frakce činila 0,5 ml. Získané frakce, které vykazovaly aktivitu, byly spojeny.

[High Trap Blue eluát: 1,5 ml, 0,05 mg proteinu, 168 pkat]

Oproti CHT II-sloupci mohlo být tímto krokem čištění docíleno faktoru obohacení 4,2. Při 93 % separaci cizího proteinu byla zaznamenána ztráta celkové aktivity 71 %.

3.7. Hydrofobní interakční chromatografie na Phenylsepharose

Přidají-li se k proteinům rozpouštěným ve vodném prostředí určité neutrální sole, jako například $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo KCl, zvýší se iontová síla roztoku. Za těchto podmínek spolu asociují hydrofobní oblasti na povrchu proteinů. Právě tak se adsorbují také na materiálech sloupců s hydrofobními ligandy, čímž dochází k hydrofobním interakcím – (HIC = Hydrophobic Interactions Chromatography). Ty se potom mohou opět vymýt, přičemž se používá eluční pufr s nižší koncentrací soli. Tento čistící princip potom vyžadoval nastavit High Trap Blue eluát na koncentraci 0,5 M síranu amonného. To se provedlo velmi pomalým přidáváním po částech odpovídajícího množství ledem chlazeného roztoku 1 M síranu amonného ve standardním pufru B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu). Potom se nanasí roztok proteinu na minisloupec (1 cm $\varnothing$ x 1,3 cm) ekvilibrovaný 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve standardním pufru B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu). Po jeho proniknutí do gelového lože (Phenylsepharose firmy Pharmacia) se promývá se 7 ml 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve standardním pufru B (50 mM Tris/HLC, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu). K eluci vázaného proteinu se používá 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve standardním pufru (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkapt ethanolu). Eluát se sbírá ve frakcích po 0,5 ml a určuje se relativní koncentrace proteinu a enzymová aktivita. Nejaktivnější frakce se spojí a testují na aktivitu a obsah proteinu.

[Phenylsepharose-eluat: 2,5 ml 0,001 mg proteinu, 6,3 pka]

Jako faktor obohacení byla oproti HiTrapBlue-eluátu vyčíslena hodnota 1,9 při současné ztrátě aktivity 96 % a oddělení 98 % cizího proteinu.

3.8 Barevná afinitní chromatografie na Mimetic-Grün 1A-6 XL

Jak bylo vyvozeno u sloupce High Trap Blue, vyskytují se také u tohoto materiálu interakce mezi vazebnými místy kofaktoru enzymu s ligandy barevné látky. Jenom ty vázané enzymy, závislé na kofaktoru, se pak mohou eluovat s kofaktorem, v předkládaném případě acetylkoenzymem A. Nespecificky adsorbované proteiny zůstávají přitom ještě na sloupci.

Dříve než se mohl pipetovat Phenylsepharose-eluát na sloupec Mimetic-Grün (1 mc Ø 1,2 cm, Affinity Chromatography Ltd., Feepport, Ballasalla, Isle of Man), musel se nejdříve odsolit, což se stalo opět na sloupci PD10 (firma Pharmacia). K tomu byl nanesen Phenylsepharoseeluát na sloupec PD10 a ponechán pronikat. Eluce se prováděla standardním pufrům B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu), přičemž prvních 0,5 ml eluátu se vyhodilo a dalších 2,5 ml, které obsahovaly aktivní protein, se shromažďovalo.

Tento roztok enzymu se pipetoval na sloupec Mimetic-Grün (1 cm Ø 1,2 cm) promytý standardním pufrům B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu). Poté, co pronikl do gelového lože, byl úspěšně bez pumpy eluován následujícími roztoky: 3 ml standardního pufru B (50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % glycerinu, 20 mM 2-merkaptioethanolu), 3 ml 0,5 mM acetylkoenzymu ve standardním pufru B, 3 ml 1 M KCl ve standardním pufru B. Přitom se jímaly frakce po 1 ml a kontrolovaly se na protein a aktivitu acetylkoenzymu A.

Acetylkoenzym A – eluát obsahoval jako jediná frakce aktivitu acetyltransferázy. Ani v průtoku ani v KCl-eluátu nemohla být aktivita změřena.

Před určením aktivity v acetyl-CoA-eluátu se musel nejprve odstranit kofaktor z roztoku. Velkým spojením dohromady neznačeného acetylkoenzymu A by byla nepatrná část ^{14}C označeného acetyl-CoA tak zředěna, že by radioaktivní substrát prakticky nemohl reagovat.

Téměř úplné odstranění acetylkoenzymu A se podařilo pomocí sloupce PD10, jak bylo výše popsáno. S takto získaným eluátem se mohl provádět obvyklý test na aktivitu. Poněvadž však v PD10-eluátu existovaly ještě stopy acetylkoenzymu A z elučního pufru, a tedy úplného odstranění nebylo možno dosáhnout, byl v materiálu shromážděném k aktivitnímu testu acetyl-CoA označený ^{14}C zředěn, a tím byla pro aktivitu a čistící faktor získána příliš malá hodnota.

[Grün-eluát: 2,5 ml, 0,001 mg proteinu, 0,7 pkat]

Tímto krokem čištění byl oddělen cizí protein a při 81 % ztrátě aktivity bylo dosaženo faktoru čištění 1,1.

3.9 Souhrnný popis čištění a dokumentace homogenity

Popsaný způsobem se získala žádaná acetyltransferáza ze surového extraktu vysrážením 70 % síranem amonným a 8 kroky sloupcové chromatografie. Tím se získala preparace acetyltransferázy, jejíž specifická aktivita dosahovala 280-násobné hodnoty AcA-eluátu, přičemž celkový výtěžek obnášel 0,1 %. Velká ztráta aktivity během čištění, i když se AcA-eluát zpracovával v jednom dni, lze vysvětlit velkou nestabilitou enzymu, jakož i jeho citlivostí na hodnoty pH pod pH 8 a vůči iontům solí, mimo jiné síranu amonného.

K překontrolování čistoty enzymové preparace byla použita denaturační disková elektroforéza za přítomnosti SDS. Po rozdělení koncentrovaného eluátu Mimetic-Grün-sloupce s SDS-PAGE a následným barvením stříbrem se objevil jen 1 pás.

Krok čištění	Objem (ml)	Celková aktivita (pkat)	Celkový protein (mg)	Specifická aktivita (pkat/mg)	Výtěžek (%)	Čištění (x-krát)
Surový extrakt	272	-	372	-	-	-
Ca ₃ (PO ₄) ₂	285	-	194	-	-	-
Sephadex G25- eluát	82	-	78	-	-	-
DEAE-eluat	110	-	59	-	-	-
ACA 44-eluat	53	724	25,7	28	100	1
HighQ-eluat	4	796	8,8	90,5	121	3,2
CHT II-eluat	1,5	578	0,73	792	80	43
High Trap Blue eluát	1,5	168	0,05	3360	23	120
Phenylsepharose -eluát	2,5	6,3	0,001	6300	0,87	225
Mimetic-Grün- eluát	2,5	0,7	0,0001	7000	0,1	280

Příklad 4

Charakterizace acetyltransferázy ze suspenzních kultur *Taxus chinensis*

5 4.1 pH Optimum

Hodnota pH má velký účinek na enzymovou aktivitu, protože se mění podle acidity enzymového roztoku náboje funkčních skupin určitých aminokyselin. To má dopad na konformaci aktivního centra enzymu a tím i na jeho aktivitu. Právě tak je model protonace určitého substrátu závislý na hodnotě pH a může právě tak ovlivňovat enzymovou aktivitu.

K zjištění optimální oblasti pH byl měřen přenos acetylkoenzymu A na 10-desacetyltaxuyunnanin C při různých hodnotách pH, od pH 5 do pH 11. K tomu byly použity 5,6 pkat (1,7 µg, 50 µl) 120 krát obohacené acetyltransferázy (High TrapBlue eluát) v následujících vsádkách:

Vsádky: 50 µl 0,8 M Tris, pH 8,ř
 50 µl acetyltransferázy (5,6 pkat 1,7 µg proteinu, obohaceno 120 krát)
 30 µl acetylkoenzymu A (5 nmol, včetně 0,02 µCi [2-¹⁴C]acetylkoenzymu A)
 5 µl 3 mM 10-desacetyltaxuyunnaninu C (15 nmol)
 50 µl vody Millipore
 Inkubace: 25 min při 35 °C

Vsádky byly přitom 5 minut předinkubovány bez acetylkoenzymu A, potom byla nastartována reakce přidáním kofaktoru. Po inkubační době 25 minut při 35 °C byla reakce zastavena okyselením a vytřepáním s terc.-butylmethyletherem. Radioaktivita obsažená v extraktu byla vyhodnocena scintilačním čítačem.

Aktivita acetyltransferázy se rozprostírá přes relativně úzkou oblast pH 8,5 až 9, přičemž optimum pH leží u pH 9. Poloviční maximální rychlosti konverze se nalézají při pH 6,8 a pH 10,8.

Čištění se provádělo při pH 8,5, protože se potom u afinitních sloupců nacházelo v proteklém materiálu méně aktivního proteinu než při pH 9.

35 4.2 Teplotní optimum

Vedle zřejmého účinku, který má hodnota pH na enzymovou aktivitu, ukazuje se také silná závislost enzymové aktivity na inkubační teplotě. Nejprve enzymatická aktivita vzrůstá se stoupající teplotou, od určité – pro každý enzym specifické – teploty však rychle klesá. Při těchto vysokých hodnotách teplot dochází k denaturaci a inaktivaci enzymu. Aby se stanovilo optimum teploty pro acetyltransferázu, bylo inkubováno 1,7 µg (5,6 pkat) 120-krát čištěného enzymu při teplotách od 0 do 50 °C nejprve 10 minut bez acetylkoenzymu A, potom dalších 25 minut po přidání kofaktoru. Zastavení reakce se provádělo přidáním 20 µl 12 % H₂SO₄. Potom byl vytvořený taxuyunnanin C vytřepán se 600 µl etheru. Vyhodnocení vytvořeného množství produktu bylo provedeno prostřednictvím scintilačního čítače.

Vsádky: 50 µl 0,8 M Tris, pH 8,5
 50 µl acetyltransferázy (5,6 pkat, 1,7 µg proteinu, obohacováno 120 krát)
 30 µl acetylkoenzymu A (5 nmol, včetně 0,02 µCi [2-¹⁴C]acetyl-CoA)
 5 µl 3 mM 10-desacetyltaxuyunnaninu C (15 nmol)
 50 µl vody Millipore
 Inkubace: 25 min při příslušné teplotě

Teplotní optimum acetyltransferázy leží u 35 °C.

4.3 Izoelektrický bod

Izoelektrický bod byl získán pomocí chromatofokusování. K tomu se použije speciální aniontoměnič, například Mono P HR 5/20 (firmy Pharmacia), na který se nanese žádaný enzym při hodnotě pH, při které existuje jako aniont. Za těchto startovacích podmínek se enzym váže na materiál sloupce a potom se může eluovat pufovací směsí obsahující amfolyt (Polybuffer 94 firmy Pharmacia), vytvářející gradienty pH přes sloupec. Enzym se odloučí od aniontoměniče právě tehdy, když hodnota pH poklesne natolik, aby enzym přešel z aniontového do formálně nenabitého stavu. Tato hodnota pH odpovídá izoelektrickému bodu (IEP).

Pro acetyltransferázu byl určen pomocí BioLogic FPLC Workstation (firmy Biorad) na sloupci Mono P HR 5/20 (0,5 cm Ø x 20 cm, firma Pharmacia) při průtoku 0,7 ml/min. Tento sloupec byl ekvilibrován puftrem 25 mM imidazolu/HCl pH 7,4 a nabíjen eluátem HighQ. K tomu byl 1 ml HighQ-eluátu zahušťován na 100 µl Centriprep-konzentrátory (30 kD) a zředěn shora zmíněným imidazolovým puftrem na 6 ml. Byl zde použit protein tohoto stupně čistoty, poněvadž se počítalo s vysokou ztrátou aktivity chromatofokusování, a v HighQ-eluátu byla nejvyšší aktivita (pkat/ml). Sloupec se promyl 10 ml startovacího pufru a se 40 ml pufru Polybuffer 74 (zředěným 1:8 vodou Millipore, pH 4) se protein eluoval ze sloupce. Byly zachycovány frakce 1 ml, přičemž k zachování aktivity při nízkých hodnotách pH bylo do každé druhé frakce předloženo 100 µl 0,8 M Tris pH 8,5. Ve frakcích mezi nimi byla měřena hodnota pH.

Aby se zjistila aktivní frakce, byla alikvotní část každé 2. frakce inkubována 30 min v následující vsádce:

Vsádky: 200 µl roztoku enzymu (pufrováno na pH 8,5)
 30 µl acetylkoenzymu A (5 nmol, v něm obsaženého
 0,02 µCi [2-¹⁴C]AcCoA)
 5 µl 3 mM 10-desacetyltaxuynnaninu C (15 nmol)

Inkubace: 30 min při 35 °C

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí scintilačního čítače po vytřepání s terc.-butylmethyletherem.

Hlavní aktivita se eluovala v oblasti pH od 5,7 a 5,47, takže izoelektrický bod acetyltransferázy mohl být určen u pH 5,6.

4.4 Stanovení molekulové hmotnosti

K určení molekulové hmotnosti acetyltransferázy byly použity dvě různé metody: gelová filtrace na kalibrovaném gelovém filtračním sloupci a SDS-gelový elektroforéza.

První se prováděla na ekvilibrovaném (50 mM Tris, pH 8,5, 10 mM 2-merkaptoethanol) sloupci Biosilect-SEC 250-5 (Biorad) v zařízení FPLC (Biologic Workstation, Biorad), průtokovou rychlostí 0,2 ml/min. Nejprve byl sloupec kalibrován proteiny, jejichž molekulová hmotnost byla známa. Za identických podmínek bylo potom 1,5 ml HighTrapBlue-eluátu, zahuštěného Centriprep-konzentrátory (2 ml, membrána 10 kD) na 100 µl (3360 pkat, 50 µg proteinu), eluováno přes sloupec. Velikost frakce obnášela 250 µl a byla zjišťována aktivita eluátu inkubací následujících vsádek (celkový objem 185 µl).

Vsádky: 50 µl 0,8 M Tris, pH 8,5
 100 µl eluátu
 30 µl acetyl-CoA (5 nmol, v něm navíc obsaženého
 0,02 µCi [2-¹⁴C]acetyl-CoA)

5 μM 10-desacetyltaxuyunnaninu C (15 nmol)

Inkubace: 30 min při 35 °C

- 5 Vyhodnocení radioaktivity bylo provedeno pomocí scintilačního čítače pro vytřepání s terc-butylmethyletherem.

Pro acetyltransferázu byla touto metodou vypočtena molekulová hmotnost 72 kD.

- 10 Ke kontrole této hodnoty byla použita denaturující SDS gelová elektroforéza. K tomu se chromatografovalo 0,3 μg homogenního proteinu v 10 % SDS-gelu paralelně s markerovým proteinem o známé molekulové hmotnosti (Rainbowmarker). Barvením stříbrem se proteiny zviditelnily, takže porovnáním hodnot R_f kalibračních proteinů a acetyltransferázy se pro ni mohla určit molekulová hmotnost 70,8 kD.

- 15 4.5 Stanovení hodnoty K_M

Stanovení hodnoty K_M pro 10-desacetyltaxuyunnanin C

- 20 Aby se dosáhlo informace a afinitě acetyltransferázy k 10-desacetyltaxuyunnaninu C, byla určena hodnota K_M s Phenylsepharose-eluátem.

Vsádky: 50 μl 0,8 M Tris, pH 8,5

100 μl acetyltransferázy (0,25 pkat, 40 ng proteinu, obohacováno 225 krát)

30 μl acetylkoenzymu A (5 nmol, v něm navíc 0,02 μCi [2- ^{14}C]acetyl-CoA)

- 25 10 μl 10-desacetyltaxuyunnaninu C

(konečná koncentrace: 0,1/0,3/1/3/5/10/30/50/100/200/300/500 μM)

Inkubace: 30 min při 35 °C, vyhodnocení radioaktivity bylo provedeno pomocí scintilačního čítače po extrakci s terc-butylmethyletherem.

- 30 Dvojím reciprokým vynášením naměřených hodnot podle LINEWEAVER a BURK mohla být graficky zjištěna hodnota K_M pro 10-desacetyltaxuyunnanin C 23 μM .

4.6 Stanovení hodnoty K_M pro acetylkoenzym A

- 35 Afinitu acetyltransferázy k acetylkoenzymu A lze popsat hodnotou K_M , která se zjistí s Phenylsepharose-eluátem.

Vsádky: 50 μl 0,8 M Tris, pH 8,5

100 μl acetyltransferázy (0,25 pkat, 40 ng proteinu, obohacováno 225 krát)

- 40 30 μl acetylkoenzymu A a H_2O

(konečná koncentrace 2,1/2,3/3/5/12/32/52/102/152/202/302/502 μM , přičemž každé byly obsaženy 2 μM (40 000 cpm) [2- ^{14}C]AcCoA)

5 μl 3 mM 10-desacetyltaxuyunnaninu C (15 nmol)

- 45 Inkubace: 30 min při 35 °C, potom bylo provedeno vyhodnocení vytřepáním s terc-butylmethyletherem a scintilačním čítačem.

Dvojím reciprokým vynášením naměřených hodnot podle LINEWEAVER a BURK mohla být graficky zjištěna hodnota K_M pro acetylkoenzym A 61 μM .

50

4.7 Číslo přeměny k_{cat}

Číslo přeměny („turnover“) popisuje reakční rychlost enzymatické reakce, v níž se udává, kolik molekul substrátu se přemění za sekundu jednou molekulou enzymu.

Ke stanovení „turnover“ se používal Phenylsepharose–eluát. V němž obsažená koncentrace acetyltransferázy byla určena pro rozdělení eluátu pomocí SDS–polytransferázy byla určena po rozdělení eluátu pomocí SDS–polyakrylamidové gelové elektroforézy a následným barvením stříbrem. Do sousedních proudů gelu se nanášela známá množství albuminu z hovězího séra jako srovnávací koncentrace.

S 300 μ l roztoku enzymu, odpovídající 18 ng acetyltransferázy, 10–desacetylaxuyunnanim C a acetylkoenzymem A byla zaznamenávána kinetika reakce, která probíhala lineárně v oblasti od 5 až do 30 min.

Vsádky: 50 μ l 0,8 M Tris, pH 8,5,
 300 μ l acetyltransferázy (18 ng acetyltransferázy, 0,76 pkat)
 30 μ l acetylkoenzymu A (5 nmol., v něm 0,02 μ Ci[2– ^{14} C]AcCoA)
 5 μ l 3 mM 10–desacetylaxuyunnanninu C (15 nmol)
 Inkubace: 30 min při 35 $^{\circ}$ C

Inkubační vsádky byly potom vytřepány s terc–butylmethyletherem a vyhodnoceny scintilačním čítačem. Z naměřených hodnot mohla být vypočítána přeměna (pmol). Vydělením molekulové hmotnosti (72 kD) množství enzymu (18 ng) se obdrží koncentrace enzymu 0,25 pmol ve vsádce.

Enzymová aktivita se vypočítá tak, že se zjistí přeměna za jednotku času (sec.). Kvocient enzymové aktivity (0,05 pmol/sec) a enzymové koncentrace (0,25 pmol) dává pro „turnover“ acetyltransferázy hodnotu 0,2 kat/mol homogenního enzymu (mol/sec/mol enzymu).

turnover = číslo přeměny k_{cat} :
 0,05 pmol/sec : 0,25 pmol = 0,2 kat/mol

To odpovídá přeměně 0,2 mol substrátu za sekundu na mol (72 kg) enzymu při 35 $^{\circ}$ C, pH 8,5 a optimálních množstvích substrátu (60 mol 10–desacetylaxuyunnanninu C, 20 mol acetyl–CoA).

4.8 Kinetické optimum

Za fyziologických podmínek je koncentrace substrátu v poměru ke koncentraci enzymu velmi malá. Jenom malá část aktivních center enzymu je obsazena, takže množství enzymy neobsazených substrátů [E] přibližně odpovídá celkovému množství enzymu [E₀].

Je-li koncentrace substrátu [S] daleko pod K_M , tj. pod koncentrací, při které je počáteční rychlost reakce polovinou maximální rychlosti, probíhá enzymatická reakce značně pomaleji, než vyjadřuje číslo přeměny k_{cat} .

K charakterizaci enzymu za těchto podmínek se používá kvocient k_{cat}/K_M . Násobí-li se tato hodnota koncentrací substrátu [S] a celkovým množstvím enzymu [E₀], obdrží se reakční rychlost.

$$v = (k_{cat} / K_M [S] [E_0])$$

Přitom je třeba dbát, aby rychlost difúze molekul rozpuštěných ve vodném prostředí mohla obnášet maximálně 10^8 až 10^9 . Také u velmi rychlých enzymů je tím omezena reakční rychlost, protože substrát nemůže rychleji dospět k enzymu.

Pro acetyltransferázu se vypočítá kinetické optimum následovně:

$$K_M(10\text{--desacetylaxuyunnannin C}) = 23 \mu\text{M}, k_{cat} = 0,2 \text{ kat/mol } k_{cat}/K_M = 0,2 \text{ mol s}^{-1} \text{ mol}^{-1} / 23 \cdot 10^{-3} [\text{M}] = 8,7 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$$

Příklad 5

Specifita substrátu

5

Pro přezkoušení specifity substrátu vyčištěnou acetyltransferázou byly použity různé sloučeniny se základním skeletem taxanu jako substrátu:

- 10-desacetyltaxuyunnanin C
 10 14-desacetyltaxuyunnanin C
 10,14-desacetyltaxuyunnanin C
 2,10,14-desacetyltaxuyunnanin C
 5,10,14-desacetyltaxuyunnanin C
 2,5,10,14-desacetyltaxuyunnanin C
 15 2,14-desacetyltaxuyunnanin C
 5,14-desacetyltaxuyunnanin C
 2,5-desacetyl-10,14-desacetyltaxuyunnanin C
 10-desacetylbaecatin III (=10-DAB III)
 10-desacetyltacol
 20 10-desacetylcefalomanin
 10-epi-10-DAB-III
 19-hydroxy-10-DAB-III
 14-hydroxy-10-DAB-III
 7-TES-10-DAB-III
 25 7-BOC-10-DAB-III

Ukázalo se, že z používaných substrátů mohou reagovat jenom taxany s hydroxylovou skupinou v poloze C-10. Taxonové deriváty s acetylovanou polohou C-10 však nebyly volnými hydroxylovými skupinami na jiných atomech uhlíku akceptovány jako substrát vyčištěné acetyltransferázy. Je-li však přístup k C-10 blokován objemnými substituenty, jako v případě 10-desacetyl-
 30 taxolu a 10-desacetylcefalomanninu, k acetylaci nedochází.

Při výpočtu míry konverze, vztaženo na míru konverze 10-desacetyltaxuyunnaninu C, se ukázalo, že deriváty taxanuyunnaninu C reagovaly s volnými skupinami ve stejném rozsahu.
 35 10-DAB reagoval s konverzí 85 % ve srovnání s 10-desacetyltaxuyunnaninem C k baecatinu III.

Konverze různých substrátů, vztažená na konverzi desacetyltaxuyunnaninu C je znázorněna v následující tabulce:

40 Konverze různých substrátů, vztažená na konverzi 10-desacetyltaxuyunnaninu C
 10-desacetyltaxuyunnanin C

Enzym: Phenylsepharose-eluat (225 krát čištěný)

45

Substrát	Konverze (%)	p _{kat}
10-desacetyltaxuyunnanin C	100	1,12
10-desacetylbaecatin III	80	0,9
10,14-desacetyltaxuyunnanin C	102	1,14
2,10,14-desacetyltaxuyunnanin C	81	0,91
5,10,14-desacetyltaxuyunnanin C	88	0,99
2,5,10,14-desacetyltaxuyunnanin C	53	0,59
10-epi-10-DAB III	0	0
19-hydroxy-10-DAB III	38	0,43
14-hydroxy-DAB III	97	1,09
7-TES-10-DAB III	0	0
7-BOC-10-DAB III	2	2

5

PATENTOVÉ NÁROKY

- 10 1. Způsob přípravy baecatinu a/nebo baecatinových derivátů, **v y z n a ě n ý t í m**, že reaguje 10-desacetylbaecatin nebo jeho derivát, tvořený taxonovou sloučeninou, která nese stejné substituenty jako 10-desacetylbaecatin-III v polohách 7 až 13 nebo nese alespoň některé substituenty mající menší objem než substituenty 10-desacetylbaecatinu-III, v přítomnosti izolovaného enzymu a acetylového donoru, přičemž jako enzym se používá acetyltransferáza
15 o molekulové hmotnosti od 70 do 72 kD, stanovené SDS-PAGE, s isoelektrickým bodem pH 5,4 až 5,8 a konstantou K_M Michaelise a Mentenové pro acetylkoenzym A 55 až 65 μ M, která se získá z *Taxus chinensis*.
- 20 2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se baecatin-III připravuje z 10-desacetylbaecatinu.
3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se 14-hydroxybaecatin připravuje z 14-hydroxy-10-desacetylbaecatinu-III.
- 25 4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se taxuyuannin C připravuje z 10-desacetyltaxuyunnaninu C.
5. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **v y z n a ě n ý t í m**, že se reakce provádí za přítomnosti acetylkoenzymu A jako acetyldonoru.
- 30 6. Enzym, který
 - a) acetyluje 10-desacetylbaecatin-III za přítomnosti acetyldonoru, zejména acetylkoenzymu A, selektivně v poloze 10,
 - 35 b) vykazuje molekulovou hmotnost 70 až 72 kD, stanovenou SDS-PAGE a

- c) vykazuje izoelektrický bod při pH 5,4 až 5,8,
- d) vykazuje konstantu K_M Michaelise a Mentenové pro acetylkoenzym A 55 až 65 μM ,
- 5 e) je to 10-hydroxytaxa-O-acetyltransferáza a
- f) získá se z buněčné kultury *Taxus chinensis*.

7. Způsob přípravy enzymu podle nároku 6, **vyznačený tím**, že se enzym izoluje z
 10 *Taxus chinensis* čištěním a po každém čištění se určují frakce, ve kterých se enzym vyskytuje,
 tím, že se přidá 10-desacetylbaccatin nebo derivát 10-desacetylbaccatinu, tvořený taxanovou
 sloučeninou, která nese stejné substituenty jako 10-desacetylbaccatin-III v polohách 7 až 13
 nebo nese alespoň některé substituenty mající menší objem než substituenty 10-desacetyl-
 baccatinu-III, a acetyldonor a dokazuje se vytvořený produkt acetylace.

15 8. Způsob podle nároku 7, **vyznačený tím**, že metoda čištění zahrnuje použití High-Q.

9. Způsob podle některého z nároku 7 nebo 8, **vyznačený tím**, že se používá 10-des-
 20 acetylbaccatin nebo 10-desacetyltaxuyunnanin C pro důkaz frakcí obsahujících enzym.

10. Způsob podle některého z nároků 7 až 9, **vyznačený tím**, že se acetylkoenzym A
 používá jako acetyldonor.

11. Způsob podle některého z nároků 7 až 10, **vyznačený tím**, že důkaz vytvořeného
 25 produktu acetylace se provede radioaktivním značkováním.

12. Způsob podle některého z nároků 7 až 9, **vyznačený tím**, že důkaz vytvořeného
 produktu acetylace se provádí radioaktivním značkováním těžkým izotopem.

30 13. Způsob přípravy taxolu a/nebo taxolových derivátů, **vyznačený tím**, že se nejdříve
 připravuje baccatin nebo baccatinový derivát podle některého z nároků 1 až 5 a ten esterifikací
 skupin OH v poloze 13 baccatinového derivátu s vhodnou kyselinou reaguje na taxol nebo taxo-
 lový derivát.

35

Konec dokumentu

40