



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(22) Přihlášeno 19 02 76
(21) (PV 1058-76)

(40) Zveřejněno 31 07 79
(45) Vydáno 30 06 82

196586

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/82

(75)

Autor vynálezu HOFFMAN JOSEF,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc. A
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob čištění enzymu L-asparaginázy s protinádorovou účinností

1

Vynález se týká způsobu čištění enzymu L-asparaginázy s protinádorovou účinností. Tento enzym zvaný též L-asparaginamidohydroláza, produkovaný při submerzní kultivaci některých bakterií, zejména *Escherichia coli*, nabyt nověji na významu pro svou terapeutickou účinnost při některých formách lidské leukemie, např. při akutní lymfoblastické leukemii.

Aktivita tohoto enzymu je určena mezinárodní jednotkou (IU), což je takové množství enzymu, které uvolní 1 μmol NH_4^+ hydrolýzou L-asparaginu za 1 minutu za optimálních podmínek, hodnoty pH a teploty. 1 mg nejčistšího, několikrát krystalovaného enzymu vykazuje aktivitu až 300 IU.

Čištění L-asparaginázy, která při mikrobiální kultivaci zůstává vázána na obsah buňky a musí být uvolňována destrukcí buněčné stěny, zahrnuje řadu technologických stupňů, které jsou obtížné a nákladné a poskytují jen velmi nízké výtěžky enzymu. Známé postupy pracují pomocí frakčního srážení buď síranem amonným nebo organickými rozpouštědly (US pat. spis č. 3 440 042, francouzský pat. spis č. 2 010 927) a vedou k preparátům o enzymové aktivitě nejvýše 50 IU/mg bílkovin. Proto je třeba získané preparáty dále čistit od průvodních cizorodých bílkovin, nejčastěji chromatografií na rozličných adsorbencích (A. Arens se sp., Z. Physiol. Chem. **351**, 197, 1970) nebo tepelnou denaturací (DOS 1 916 723, 1 927 517, francouzský pat. spis č. 2 010 963).

Bylo zjištěno, že lze L-asparaginázu s protinádorovou účinností podstatně zbavit původních cizorodých proteinů a endotoxinu, postupuje-li se způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na surový nebo částečně předčištěný enzym, získaný z desintegrováných buněk produkčního mikroorganismu působí ve vodném prostředí s hodnotou pH 3,9 až 5,5, s výhodou 4,2 až 4,5, kyselinou polymethakrylovou s průměrnou molekulovou vahou 10 000 až 30 000, s výhodou 15 000 až 20 000, vyloučené balasty se oddělí a z čirého roztoku se izoluje vyčištěný enzym, například srážením ethanolem.

Za uvedených podmínek odstraní kyselina polymethakrylová zcela selektivně cizorodé vysokomolekulární příměsi z roztoku, přičemž zůstává enzym zcela nedotčen. Karboxylové polykyseliny, například kyselina polyakrylová nebo polymethakrylová byly již využity pro selektivní izolaci některých bázeických antibiotik, například streptomycinu (čs. pat. spis č. 84779), avšak pro selektivní čištění L-asparaginázy nebylo použito těchto látek dosud popsáno ani v patentové ani v odborné literatuře.

Po oddělení vysrážených podílů se vyčištěný enzym získá z roztoku v pevné formě buď lyofilizací nebo srážením přídavkem organického, s vodou mísitelného rozpouštědla, nejčastěji ethanolu. Získá se tak již velmi čistá substance L-asparaginázy, vhodná k finální operaci – krystalizaci.

Podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklad provedení

Příklad 1

50,0 g izolované surové L-asparaginázy EC-2 o účinnosti 36 IU/mg bílkovin, získané po kultivaci kmene *Escherichia coli* uvolněním do vodného prostředí z mechanicky desintegrovaných oddělených buněk a vysrážením dvojnásobným objemem ethanolu, se rozpustí ve 350 ml destilované vody. K roztoku se přidá 40 ml 15 % roztoku draselné soli kyseliny polymethakrylové o průměrné molekulové hmotnosti 20 000. Za míchání se upraví pH směsi na hodnotu 4,2 přísadou asi 41 ml 10 % kyseliny octové. Po oddělení vysrážených doprovodných vysokomolekulárních látek se z čirého roztoku vysráží enzym 1,5násobným objemem ethanolu, oddělí, promyje ethanolem a vysuší. Výtěžek 8,5 g bílého prášku s účinností 151 IU/mg bílkovin, což odpovídá výtěžku 70 %.

Příklad 2

50,0 g surové L-asparaginázy jako v příkladu 1, se rozpustí ve 300 ml destilované vody, přidá se 30 ml 11 % vodného roztoku kyseliny polymethakrylové o průměrné molekulové hmotnosti 15 000. Reakční směs se okyselí kyselinou octovou na pH 4,5. Po oddělení vysrážených průvodních látek se získá enzym lyofilizací čirého supernatantu ve formě bílého prášku s účinností 130 IU/mg bílkovin, což odpovídá výtěžku 75 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob čištění enzymu L-asparaginázy s protinádorovou účinností, vyznačující se tím, že se na surový nebo částečně předčištěný enzym, získaný z desintegrovaných buněk produkčního mikroorganismu, působí ve vodném prostředí s hodnotou pH 3,9 až 5,5 s výhodou 4,2 až 4,5, kyselinou polymethakrylovou s průměrnou molekulovou hmotností 10 000 až 30 000, s výhodou 15 000 až 20 000, vyloučené balasty se oddělí a z čirého roztoku se izoluje vyčištěný enzym, například srážením ethanolem.