

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 6 a, 22/07

Zgłoszono: 23. V. 1967 (P 120 715)

Pierwszeństwo: 26. V. 1966 Niemiecka
Republika
Federalna

MKP A 61 k, 19/02

Opublikowano: 25.IX.1971

UKD

Właściciel patentu: Farbenfabriken Bayer A. G., Leverkusen (Niemiecka
Republika Federalna)**Sposób wyodrębniania inaktywatora kalikreiny
z zanieczyszczonych roztworów wodnych**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania zanieczyszczonych roztworów wodnych inaktywatora kalikreiny, polipeptydu zwanego również inhibitorem Kunftza i inhibitorem trypsyny z trzustki bydła.

Wiadomo, że enzymy jak i związki białkowe łączą się z substancjami spolimeryzowanymi. Tak np. trypsyna łączy się z kopolimerem bezwodnika maleinowego i etylenu (E. Katchalski i in. Biochem 3(1964)1905). W powstających przy tym związkach addycyjnych enzymy zachowują w mniejszym lub większym stopniu swoją aktywność.

Wiadomo również, że można dezaktywować enzym związany w taki sposób z polimerem za pomocą inhibitora (E. Katchalski i in. patrz wyżej).

Inaktywator kalikreiny inaktywuje różne enzymy np. kalikreinę, trypsynę, chymotrypsynę i fibrynoinę (plazminę) i trombinę.

Dane literaturowe nie wskazywały dotychczas na możliwość wykorzystania powyższych danych w celu prostego i taniego wyodrębnienia inaktywatora kalikreiny z zanieczyszczonych roztworów otrzymywanych w toku produkcji.

Stwierdzono, że istnieje możliwość wyodrębnienia i tym samym wzbogacenia inaktywatora kalikreiny na drodze połączenia kowalencyjnego w postaci związku addycyjnego jednego z enzymów dezaktywowanych przez inaktywator kalikreiny z nierozpuszczalnym lub rozpuszczalnym

2

polimerem. Otrzymuje się wtedy nierozpuszczalny związek albo związek rozpuszczalny, który następnie przeprowadza się w postać nierozpuszczalną przez usieciowanie.

5 Jako polimer stosuje się kopolimer, bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu korzystnie tak zwane żywice EMA-31 do EMA-91 firmy Monsanto.

Są to żywice o ciężarze cząsteczkowym 20 000—90 000 i cząsteczkach liniowych nieusieciowanych, 10 których jedyną grupą funkcyjną jest grupa bezwodnikowa, o ogólnym wzorze 1, które reagują w roztworze wodnym z wolnymi grupami aminowymi enzymów, tworząc związki o wzorze 2, zawierające grupy amidowe i wolne grupy karboksylowe. Przy tym następuje częściowe osieciowanie łańcuchów kopolimeru, ponieważ enzymy zawierają więcej niż jedną wolną grupę aminową. Jeżeli jest pożądane dalsze usieciowanie, to uży- 15 skuje się je korzystnie przez dodatek dwuaminy, np. sześciometylenodwuaminy. Dwuaminę dodaje się kilka minut po dodaniu enzymu, co powoduje usieciowanie pozostałych wolnych grup bezwodnikowych i zwiększenie nierozpuszczalności otrzymanej żywicy enzymowej.

25 Wyżej wymienione nierozpuszczalne pochodne enzymów są czynne enzymatycznie. Wiążą one inaktywator podobnie jak wolne enzymy, wytwarzając nierozpuszczalne związki kompleksowe. Zaletą tych nierozpuszczalnych kompleksów jest 30 łatwość wydzielenia ich z roztworów, zawierają-

cych zanieczyszczenia, przez zwykle odsączenie na kolumnie lub na nuczycy. Przez wymycie wodą lub roztworem buforowym usuwa się resztki towarzyszących inaktywatorowi zanieczyszczeń. Ten prosty sposób oczyszczania i tym samym wzbogacania nie był dostępny dopóki dysponowało się tylko rozpuszczalnymi enzymami i rozpuszczalnymi kompleksami enzym-inaktywator.

W celu wydzielenia inaktywatora dysocjuje się jego związek kompleksowy przez zmianę wartości pH i/ albo zmianę stężenia jonów. Można też wyprzeć go za pomocą odpowiednich substratów, które po zetknięciu z enzymem ulegają przemianom i natychmiast dysocjują, lub substancji hamujących, jak w przypadku trypsyny, za pomocą tryptaminy, kwasu α -aminokapronowego lub n-butyloaminy, tworzących z enzymem kompleks, blokujący aktywne grupy enzymu, ewentualnie przez dodatek substancji, które jak np. moczyn, są w stanie rozluźnić międzycząsteczkowe siły wzajemnego oddziaływania, co następuje przez odwracalną denaturację biorącą udział proteiny.

Sposób według wynalazku umożliwia otrzymanie czystych inaktywatorów nawet z najbardziej zanieczyszczonych roztworów.

Niżej podane przykłady ilustrują wynalazek, nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. 5 g trypsyny rozpuszczonej w 500 ml 0,2 m — roztworu buforowego fosforanu potasu o wartości pH = 7,5 oraz 1 g kopolimeru bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu (DX 840—21, EMA-M) zawieszono w 1 l wymienionego buforu. Następnie dodano 100 ml 0,1% wodnego roztworu sześciometylenodwuaminy. Po zakończeniu reakcji produkt mieszało się z podwójną objętością odszlamowanego proszku celulozowego i wlewo do kolumny. Kolumnę przemyto 0,1 m buforem trójetanolaminowym o wartości pH = 7,8, zawierającym ponadto 0,1 m-NaCl i 0,01 m CaCl₂, do stwierdzenia braku w eluacji aktywnej trypsyny. Wszystkie operacje przeprowadzono przy chłodzeniu (4°C).

Zhomogenizowaną tkankę trzustki bydlęcej odbiałczono za pomocą kwasu nadchlorowego lub etanolu, zateżono pod próżnią i doprowadzono do wartości pH = 7,8 za pomocą podanego wyżej buforu. Roztwór podano bezpośrednio na kolumnę. Po przepuszczeniu przez kolumnę roztworu inhibitora z kolumny wymyto całkowicie proteiny za pomocą buforu i wody, następnie eluowano inhibitor buforem HCl(KCl/0,2 n-KCl) o wartości pH = 2. Po doprowadzeniu do wartości pH = 7,8 kolumnę można stosować do dalszych operacji. Przy stosowaniu chłodzenia (4°C, woda) kolumnę można używać do wydzielenia inaktywatora kalikreiny w ciągu miesięcy bez wyraźnego zmniejszenia sprawności. Przy oczyszczaniu w temperaturze 4—8°C wydajność preparatu o czystości około 80% wynosi 90—100%. Po zateżeniu kwaśny roztwór inhibitora odsolono za pomocą wymienniczy jonowych i zliofilizowano.

Przykład II. 200 mg kopolimeru bezwodnika kwasu maleinowego z etylenem zhomogenizowano krótko w temperaturze 0°C z 200 ml 0,2 m — roztworu buforowego fosforanu potasu o wartości pH = 7,5, po czym mieszało się w ciągu 3 minut

z 20 ml 0,1% roztworu sześciometylenodwuaminy, dodano do tego 1 g alfa-chymotrypsyny, rozpuszczonej w 100 ml 0,2-m-buforu fosforowego o wartości pH = 7,5 i otrzymaną mieszaninę mieszało się w ciągu nocy w temperaturze 0—4°C, przy utrzymywaniu wartości pH = 7,5 przez dodanie buforu.

Osad przemyto (wirowanie) kilkakrotnie trójetanolaminowym roztworem buforowym o wartości pH = 8,7 (0,1 m trójetanolaminy, 0,1 m-NaCl, 0,01 m-CaCl₂) po czym mieszało się z około trzykrotną objętością proszku celulozowego (Schleicher u. Schüll) i wlewo do kolumny chłodzonej wodą. Po około 6 godzinach kolumnę przemyto tym samym buforem.

100 mg wstępnie oczyszczonego preparatu inaktywatora kalikreiny z płuc bydlęcych o 50 000 KIE (jednostek międzynarodowych) rozpuszczonego w 0,2 m roztworze buforowym fosforanu potasu o wartości pH = 7,8 zaadsorbowano całkowicie na kolumnie. Inaktywator kalikreiny eluowano ilościowo za pomocą buforu 0,25 m KCl/HCl o wartości pH = 2, po czym czystość jego wzrosła od 7% do 90%.

Przykład III. Wyciąg trzustki bydlęcej odbiałczony kwasem nadchlorowym i odsolony za pomocą Sephadex G-25 zawierał 200 000 I mU dla trypsyny z czego około 50% wynika z obecności inaktywatora kalikreiny. Wyciąg po dodaniu NaCl (0,2 m) i buforu o wartości pH 8 wprowadzono do kolumny EM-chymotrypsynowej otrzymanej według przykładu II. W przesączu z kolumny stwierdzono 100 000 I mU dla trypsyny, z których tylko mniej niż 1% tłumaczy się obecnością inaktywatora kalikreiny. Po eluowaniu kolumny kwaśnym roztworem według przykładu II otrzymano inaktywator kalikreiny w czystej postaci.

Przykład IV. 400 mg kopolimeru bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu zhomogenizowano w 200 ml 0,2 m-buforu fosforowego o wartości pH = 7,5 w temperaturze 0°C, mieszaninę zadano w celu dalszego usieciowania 2 ml 1% roztworu sześciometylenodwuaminy, mieszało się w ciągu 3 minut w temperaturze 0°C, po czym dodano 100 000 IKE (2 μ g proteiny (KE) rozpuszczonej w 20 ml 0,2 m-buforu fosforanowego o wartości pH = 7,5 i otrzymaną zawiesinę mieszało się w ciągu nocy w temperaturze 0—4°C.

EM-kalikreinę (kopolimer bezwodnika kwasu maleinowego z etylenem związano z 99 500 JKE) mieszało się z około 4-krotną objętością proszku celulozowego i wlewo do kolumny wypełnionej warstwą Sephadex G-25 o wysokości 1 cm i chłodzonej wodą. Po przemyciu kolumny EM-kalikreiny 1,0 m-buforem trójetanolaminowym (+ 0,2 m NaCl) o wartości pH = 7,8 wprowadzono 80 000 KIE inaktywatora kalikreiny. Z tego adsorbowano na kolumnie 75 000 KIE. 40 000 KIE eluowano za pomocą roztworu buforowego octanu amonu o wartości pH = 2. Kolumnę EM-kalikreiny przy wartości pH = 7,8, można ponownie załadować inaktywatorem kalikreiny, ponieważ związana kalikreina nie została uszkodzona przez bufor eluacyjny o wartości pH = 2.

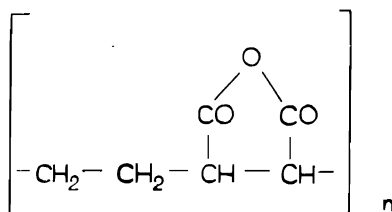
Przykład V. Z kolumny według przykładu IV załadowanej inaktywatorem kalikreiny eluowano

go przy obojętnej wartości pH roztworem 8 m-mocznika (+ 0,1 m bufor trójetanolaminowy o wartości pH = 7,8). Wydajność inaktywatora kalikreiny (po oddzieleniu mocznika za pomocą kolumny Sephadex G-25) wyniosła około 100%.

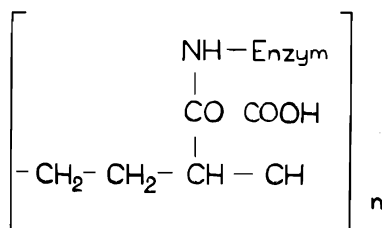
Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyodrębniania inaktywatora kalikreiny z zanieczyszczonych roztworów wodnych, **znamienny**

tym, że na ten roztwór działa się związkiem kowalencyjnym o wzorze 2, otrzymywanym z kopolimeru bezwodnika kwasu maleinowego i etylenu o wzorze 1 i ciężarze cząsteczkowym 20 000-90 000 z enzymem ulegającym inaktywującemu działaniu inaktywatora kalikreiny, ewentualnie dodatkowo usieciowanym za pomocą dwuaminy, po czym otrzymany nierozpuszczalny w wodzie związek kompleksowy polimer — enzym — inaktywator, odsącza się i przemywa, a następnie poddaje się go dysocjacji i eluuje inaktywator kalikreiny.



WZÓR 1



WZÓR 2