



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231239

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 07 D 473/34

(22) Přihlášeno 09 12 82
(21) (PV 8920-82)

(40) Zveřejněno 13 01 84

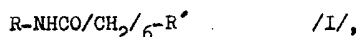
(45) Vydáno 15 06 86

(75)
Autor vynálezu

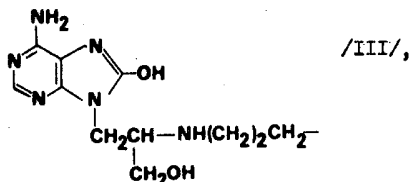
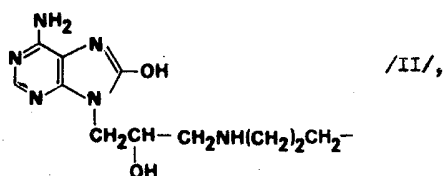
HOLÝ ANTONÍN RNDr. CSc., VOTRUBA IVAN RNDr. CSc.,
ROSENBERG IVAN ing., PRAHA

(54) Afinitní nosiče na bázi dextranových gelů a způsob jejich přípravy

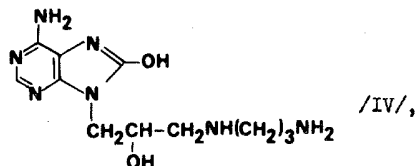
Předmětem vynálezu jsou afinitní nosiče
na bázi dextranových gelů obecného vzorce I



kde R' je zbytek makromolekulárního dextra-
nového gelu a R je zbytek vzorce II ne-
bo III



dále způsob jejich přípravy, spočívající
v reakci omega-karboxyalkylderivátu makro-
molekulárního nosiče s 9-/RS/-[3/2/-/3-ami-
nopropylamino/-2/3/-hydroxypropyl]-8-hydro-
xyadeniny obecného vzorce IV



kde R¹ a R² jsou střídavě hydroxy- a 3-amino-
propylaminoskupina, v přítomnosti rozpust-
ného karbodiimidu.

Uvedené nosiče slouží zejména pro čiště-
ní a izolaci S-adenosyl-L-homocysteinhydro-
láz z biologických extraktů.

Vynález se týká afinitních nosičů na bázi dextranových gelů a způsobu jejich přípravy.

Makromolekulární nosiče s kovalentně vázanými nízkomolekulárními sloučeninami /ligandy/ mají široké uplatnění ve výzkumných laboratořích i v provozech pro zvýšení účinnosti izolací, čištění nebo naopak odstranění biokatalyzátorů /enzymů/ z přirozených zdrojů. Jejich použití je založeno na principech tzv. afinitní chromatografie, tj. specifických interakcích /vazbě/ příslušných enzymů s nízkomolekulárním zbytkem vázaným na pevném nosiči.

Tím se z roztoků odstraní ostatní /i bílkovinné/ složky, které se na ligand neváží a specificky vázané bílkoviny se potom uvolní zvýšením iontové síly eluentu, zvýšením teploty nebo elucí roztokem substrátu, produktu či inhibitoru příslušného enzymu. Pro úspěšné provedení takového čistícího postupu je rozhodující chemická struktura ligandu, který je obvykle analogem substrátu, produktu nebo inhibitoru příslušného enzymu.

V regulaci základních procesů metabolismu živé hmoty hrají důležitou úlohu enzymy S-adenosyl-L-homocysteinhydrolázy /dále SAH-hydrolázy/, které katalyzují hydrolýzu přirozeného metabolitu - S-adenosyl-L-homocysteinu - na adenosin a L-homocystein. Nedostatečná hladina tohoto enzymu v organismu může souviset se vznikem určitých vrozených metabolických onemocnění; z údajů literatury /např. E. N. Orlov, J. V. Bukin: *Voprosy med. chim.* **26**, 699 (1980)/ vyplývá rovněž vztah mezi hladinou tohoto enzymu a růstem experimentálních nádorů pokusných zvířat. Proto nabývá na významu izolace, čištění a stanovení obsahu tohoto enzymu ve vzorcích biologického materiálu, s potenciálním využitím v klinické biochemii.

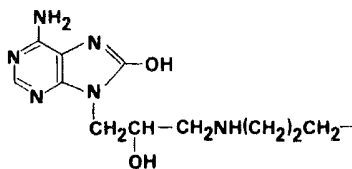
Izolace SAH-hydroláz byla dosud popsána pro enzymy z nejrůznějších zdrojů, jako telecích jater /H. H. Richards, P. K. Chiang, G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* **253**, 4476 (1978)/, hovězích jater /Palmer J. L., Abeles R. H.: *J. Biol. Chem.* **254**, 1217 (1979)/, myších jater /P. M. Ueland, J. Saeb: *Biochemistry* **18**, 4130 (1979)/, krysího mozku R. A. Schatz, C. R. Vunnam, O. Z. Sellinger: *Transmethylation* /Usdin E., Borchardt R. T., Creveling C. R., Eds/, str. 143; Elsevier, New York 1979/, intaktních lymfocytů /T. P. Zimmerman, G. Wolberg, G. S. Duncan, G. B. Elion: *Biochemistry* **19**, 2252 (1980)/ a semen lupinu /A. Guranowski, J. Pawalkiewicz: *Eur. J. Biochem.* **80**, 517 (1977)/, vesměs obvyklými způsoby čištění bílkovin, které zahrnují postupy jako frakční srážení, chromatografii na ionexech a gelové filtrace. Tyto postupy jsou pracné, časově náročné a poskytnou enzymové preparáty o nízkém celkovém výtěžku.

Byla popsána i afinitní chromatografie SAH-hydrolázy z krysích jater na nosiči s vázaným 8-/3-aminopropylamino/-adenosinem /E. O. Kajander, A. M. Raina: *Biochem. J.* **193**, 503 (1981)/. Tato metoda je nedostatečně účinná pro izolaci uvedeného enzymu ze surového extraktu.

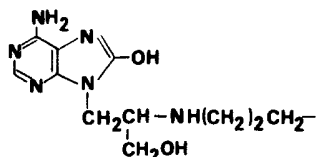
Tuto nevýhodu odstraňuje vynález, jehož podstatou je nový typ afinitních nosičů na bázi dextranových gelů obecného vzorce I



kde R* je zbytek makromolekulárního dextranového gelu a R je zbytek vzorce II nebo III

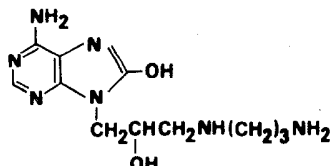


/II/,



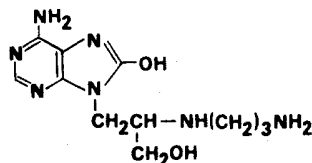
/III/,

Dále je předmětem vynálezu způsob přípravy látek vzorce I, spočívající v tom, že se dextranový gel nesoucí omega-karboxyalkyl, s výhodou 6-karboxyhexyl, uvede do reakce s 9-/RS/-[3-/3-aminopropylamino/-2-hydroxypropyl]-8-hydroxyadeninem vzorce IV



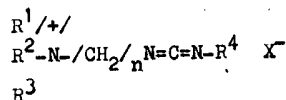
/IV/,

nebo 9-/RS/-[2-/3-aminopropylamino-3-hydroxypropyl]-8-hydroxyadeninem vzorce V



/V/,

v poměru 1 až 10 molárních ekvivalentů na počet karboxylových skupin dextranového gelu a soli rozpustného karbodiimidu obecného vzorce VI



/VI/,

kde n je 2 až 4, R^1 až R^3 jsou methylskupiny, nebo R^1 a R^2 spolu tvoří skupinu $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ a R^3 je methyl- nebo ethylskupina, R^4 je cyklohexyl- nebo ethylskupina a X je chloridový nebo p-toluensulfonový aniont a to ve vodném roztoku při pH 5 až 6 a při teplotách 0 °C až 30 °C, po skončení reakce se nerozpustný materiál odsaje, promyje vodou a roztoky neutrálních pufrů.

Aktivní monomerní ligandy, které tvoří základní složku pro uvedenou afinitní chromatografii enzymů, jsou snadno dostupné z 9-/RS/-2,3-dihydroxypropyl/ derivátů 8-bromadeninu nebo 8-hydroxyadeninu (čs. autorské osvědčení č. 231 238). Jejich vazba na polymerní nosiče se provádí tvorbou amidové vazby z látek vzorce IV nebo V na karboxylové funkce polymeru prostřednictvím reakce s rozpustnými karbodiimidy ve vodném slabě kyselém prostředí.

Polymerní matrice může být např. Sepharóza, Agaróza, celulóza. Lze použít i jiný polymerní materiál, který obsahuje karboxylové skupiny kovalentně vázané prostřednictvím dostatečně dostatečně dlouhých řetězců /s výhodou hexamethylenových/. Takto získané polymerní materiály obecného vzorce I jsou stále po dobu několika měsíců při teplotách 0 °C až +10 °C ve vodě nebo s výhodou v nasycených roztocích chloridu sodného nebo draselného. Stálost a jednoduchost jejich přípravy dovoluje připravit potřebné objemy afinitních

nosičů bezprostředně před jejich použitím. Podle použitého molárního poměru ligandu IV nebo V vzhledem k počtu karboxylových skupin nosiče lze připravit látky vzorce I s různým množstvím navázaného ligandu.

Specificita takto připravených afinitních nosičů vzorce I vzhledem k SAH-hydrolázám je vysoká a umožňuje vysoké zatížení nosiče celkovou bílkovinou /až 100 mg/ml/. Inertní bílkoviny se snadno odstraní promytím roztoky inertních anorganických solí /chloridů, fosforečnanů, pufovaných podle povahy enzymu, nejlépe za chlazení na teploty pod $+10^{\circ}\text{C}$. SAH-Hydrolázy se pak eluují roztoky adenosinu, jejichž koncentrace se mění v závislosti na druhu /zdroji/ enzymu.

Malý použitý objem nosiče tak dovoluje eluovat SAH-hydrolázy malými objemy elučního roztoku. Celý postup je možno stejně dobře provést na sloupci nosiče, jakož i v suspenzi s následující filtrací po každém elučním kroku. Adenosin se z eluátu enzymu snadno odstraní gelovou filtrací /např. na Sephadexu G-25 nebo Biogalu/, přičemž se enzym eluuje jako první. Celý postup afinitního čištění SAH-hydroláz je časově nenáročný, což je zvlášť důležité vzhledem k omezené stálosti těchto enzymů. Tímto postupem je možné připravit SAH-hydrolázy prakticky homogenní podle kritérií elektroforézy v gelu, a to z různých /živočišných i rostlinných/ zdrojů.

V dalším je příprava afinitních nosičů vzorce I i jejich použití pro čištění SAH-hydroláz osvětleno na příkladech, aniž se tím jakkoliv omezuje.

P ř í k l a d 1

Suspenze 1 g /cca 4 ml vlhkého gelu/ lyofilizované CH-Sepharózy 4B v 50 ml $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ chloridu sodného se třepě 20 h při teplotě místnosti, odsaje, promyje $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ chloridem sodným /200 ml/ a vodou /200 ml/. Vlhký gel se suspenduje v 8 ml vody, krátce evakuuje při 2 kPa, přidá se 100 μmol látky vzorce IV, pH se nastaví na 5,0 kyselinou chlorovodíkovou a přidá se 1,1 mmol p-toluensulfonátu 1-cyklohexyl-3-/3-trimethylamoniumpropyl/karbodiimidu a směs se míchá 30 min za stálého udržování hodnoty pH mol.l^{-1} kyselinou chlorovodíkovou mezi 5,0 až 5,5. Přidá se dalších 1,1 mmol karbodiimidu, pH se upraví na 5,0, suspenze se míchá při teplotě místnosti 24 h. Pak se odsaje, promyje $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ chloridem sodným /500 ml/, 1 mol.l^{-1} chloridem sodným /500 ml/ a získaný materiál se suspenduje v téže roztoku a uchovává při $+4^{\circ}\text{C}$.

P ř í k l a d 2

Reakce se provede s 1 g CH-Sepharózy 4B a 0,1 mmol látky vzorce V s p-toluensulfonanem 1-cyklohexyl-3-N-methylmorpholinium-methylkarbodiimidu /2 x 1,1 mmol/. Dále se postupuje podle příkladu 1.

Dále jsou uvedeny příklady použití látek podle vynálezu.

SAH-Hydroláza z krysích jater

Částečně purifikovaná frakce SAH-hydrolázy z krysích jater, získaná podle popsaného postupu /I. Votruba, A. Holý: Collect. Czech. Chem. Commun. 45, 3039 (1980)/ /20 ml, 1,8 g bílkovin, spec. aktivita 0,3 I. U./mg proteinu/ /I. U. = mezinár. jednotka enzym. aktivity/ se nanese na sloupec 3 x 0,8 cm nosiče podle příkladu 1 a sloupec se postupně promývá při 4°C /a 4 ml/: $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ Sørensenův pufr - pH 7,4 obsahující $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitol, 1 mol.l^{-1} KCl, $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl, 2 mol.l^{-1} KCl /všechny s obsahem $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitolu/. Enzymová aktivita se eluuje roztokem $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ adenosinu v $0,75 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl a jímají se frakce objemu 2 ml. V těchto frakcích se stanoví aktivita SAH-hydrolasy dále uvedenou metodou. Frakce s aktivitou, která poskytuje více než 50% konverzi substrátu se spojí a okamžitě nanese na sloupec 1,2 x 60 cm Sephadexu G-25M v $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ Sørensenově pufru pH 7,4 s obsahem $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitolu a sloupec se eluuje tímž puforem

frakce 2 ml, rychlost eluce 18 ml/h. Eluční objem enzymu 39 ml, adenosinu 137 ml. Enzymová aktivita jednotlivých frakcí se stanoví dále uvedenou metodou, frakce s konverzí substrátu vyšší než 50% se spojí a stanoví v nich celková enzymová aktivita a obsah proteinu. Získá se 0,425 mg proteinu o specifické aktivitě 0,615 I. U./mg, podle gelové elektroforézy je protein homogenní.

SAH-Hydroláza z krysích jater

40 ml částečně čištěné frakce SAH-hydrolázy z krysích jater se míchá s 2 ml nosiče podle příkladu 2 20 min při 0 °C /v supernatantu je pak nulová enzymová aktivita/, filtruje se a nosič postupně suspenduje a odsává s promývacími roztoky stejně jako v předchozím případě. Poté se nalije na sloupec a eluuje $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ adenosinu v $0,75 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl a zpracuje dále podle předchozího postupu. Získá se 0,8 mg proteinu /homogenního podle gelové elektroforézy, specifická aktivita 0,60 I. U./mg.

SAH-Hydroláza z hmyzích ovaríí

10 kusů ovaríí třídenních samic *Pyrrhocoris apterus* se desintegruje ultrazvukem /1 min, 22 kC, amplituda 7,5/ v 1 ml $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ Sørensenově pufru pH 7,4 obsahujícím $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitol, odstředí se při 30 000 g /25 min, při 4 °C/, k supernatantu se přidá 60 μl 15% streptomycinsulfátu a znovu se odstředí při 26 000 g /20 min při 4 °C/. Extrakt se zředí výše uvedeným pufrům do 5 ml /35 mg proteinu spec. aktivita 0,13 I. U./mg a přidá se 2 ml nosiče podle příkladu 1. Další zpracování se provede podle předchozího postupu. Získá se 1,1 I. U. SAH-hydrolasy ovaríí *Pyrrhocoris apterus*, homogenní podle gelové elektroforézy.

Stanovení SAH-hydrolázy

Inkubační směs sestává z 200 μl roztoku o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ hydrogenfosforečnanu draselného pH 7,37, $3 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitol, $3,75 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ L-homocystein, $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ adenosin a z 50 μl testovaného roztoku enzymu neředěného nebo vhodně ředěného $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ Sørensenovým pufrům pH 7,4 s obsahem $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dithiothreitolu. Směs se inkubuje 10 min při 37 °C a vzorky 10 μl směsi se dělí na sloupci Separonu SI C18 /5 μm / 3,3 x 150 mm/ elucí $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu draselného pH 2,8 obsahujícím 10 objemových procent methanolu.

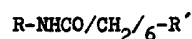
Rychlost eluce 0,4 ml/min, detekce při 254 nm /citlivost 0,01 až 0,04 AUFS/. Průběh eluce se kontinuálně registruje na registračním UV-detektoru a planimetricky se stanoví obsah ploch pík adenosinu a vzniklého S-adenosyl-L-homocysteinu, jejichž poloha byla předem určena pomocí srovnávacích sloučenin. Počet mezinárodních jednotek enzymové aktivity /1 I. U. je množství enzymu, které konvertuje 1 μmol substrátu za 1 min/ v 50 μl vzorku enzymu se vypočte podle vztahu

$$\text{I. U.} = 0,5 \times 10^{-5} K,$$

kde K je konverse adenosinu na S-adenosyl-homocystein vyjádřená v procentech.

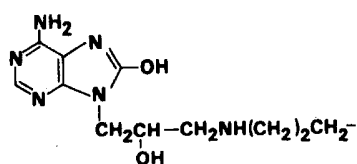
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Afinitní nosiče na bázi dextranových gelů obecného vzorce I

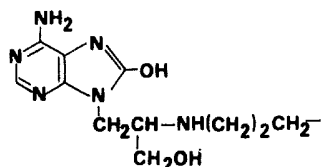


/I/,

kde R' je zbytek makromolekulárního dextranového gelu a R je zbytek vzorce II nebo III

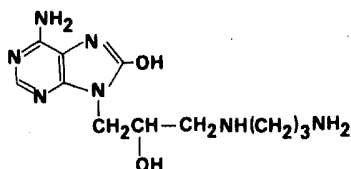


/II/,



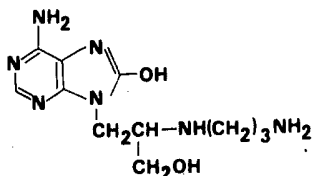
/III/,

2. Způsob přípravy afinitních nosičů obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačený tím, že se dextranový gel nesoucí omega-karboxyalkyl, s výhodou 6-karboxyhexyl, uvede do reakce s 9-/RS/-[3-aminopropylamino/-2-hydroxypropyl]-8-hydroxyadeninem vzorce IV



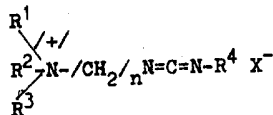
/IV/,

nebo 9-/RS/-[2-/3-aminopropylamino/-3-hydroxypropyl]-8-hydroxyadeninem vzorce V



/V/,

v poměru 1 až 10 molárních ekvivalentů na počet karboxylových skupin dextranového gelu, a soli rozpustného karbodiimidu obecného vzorce VI



/VI/,

kde n je 2-4, R¹ až R³ jsou methylskupiny, nebo R¹ a R² tvoří spolu skupinu -CH₂CH₂OCH₂CH₂- a R³ je methyl- nebo ethylskupina, R⁴ je cyklohexyl- nebo ethylskupina a X je aniont chloridový nebo p-toluensulfonanový, a to ve vodném roztoku při pH 5 a 6 a při teplotách 0 °C až 30 °C, načež po skončení reakce se nerozpustný materiál odsaje, promyje vodou a roztoky neutrálních pufrů.