



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

232957

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/60

(22) Přihlášeno 10 06 83
(21) (RV 4183-83)

(40) Zveřejněno 17 07 84

(45) Vydáno 15 07 86

(75)

Autor vynálezu

ALACHOV JULIJ BORISOVIČ DrSc., PUŠČINO (SSSR), ČEŘOVSKÝ VÁCLAV RNDr.,
ČOUPEK JIRÍ ing. CSc., FRYDRYCHOVÁ ANNA ing., PRAHA (ČSSR),
KORSAKA MARITE CSc., OLAINÉ, MAKSIMOV JEVGENIJ JEVGRAFOVIČ CSc.,
MOTUS LUDMILA CSc., PUŠČINO, STENGREVICS OLAFS CSc., OLAINÉ (SSSR)
TURKOVÁ JAROSLAVA ing. CSc., ČESKÝ BROD, VIKOVÁ JIŤKA, PRAHA (ČSSR)

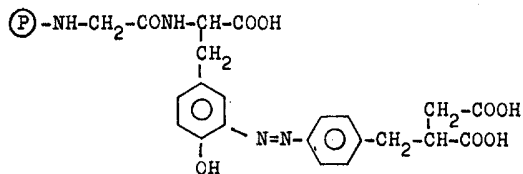
(54) Způsob přípravy karboxypeptidázy Y

Způsob přípravy karboxypeptidázy Y afinitní sorpcí a desorpcí, vyznačený tím, že se extrakt z droždí uvede do styku s afinitním sorbentem sestávajícím z makropórního kopolymeru 2-hydroxyethylmetakrylátu s 10 až 90 % mol etyldimetakrylátu s kovalentně navázanou glycyl-glycyl-D,L-p-aminobenzyljantarovou kyselinou promyje a pak se roztokem tlumiče desorbuje. Pro vyloučení deaktivace enzymu kationty těžkých kovů obsahují všechny roztoky používané při procesu podle vynálezu včetně výchozího extraktu droždí přísadky kyseliny etyldiaminotetraoctové (0,002 mol/l). S výhodou lze způsob podle vynálezu realizovat ve sloupcovém uspořádání.

Způsobu podle vynálezu lze využít při výrobě enzymu s tou výhodou, že proti známému postupu se zvýší kvalita produktu a 3 až 3,5krát se zkrátí doba výroby. Uplatnění nachází způsob podle vynálezu v biotechnologii a v biochemii.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytického enzymu karboxypeptidázy Y a nachází využití v oblasti biotechnologie a biochemie. Způsob podle vynálezu může být využit i pro izolaci dalších karboxypeptidáz, které jsou inhibovány benzyljantarovou kyselinou.

Je znám způsob přípravy karboxypeptidázy Y z předem aktivovaného extraktu droždí (J. T. Johansen, K. Breddam and O. Ottensen: Isolation of carboxypeptidase Y by affinity chromatography; Carlsberg Res. Commun. 41 (1) (1976) 1-14.), spočívající v tom, že se extrakt zavede na kolonu obsahující afinitní sorbent se strukturou:



kde $\textcircled{P}$ je matrice na bázi polysacharidu Sepharosy (Pharmacia Uppsala). Kolona se promyje roztokem pufru pH 4,3 obsahujícího 0,01 M NaOAc a 1 M NaCl. Karboxypeptidáza se desorbuje elucí 0,01 M fosfátovým pufrům při pH 7,0.

Citovaný známý způsob má některé nedostatky:

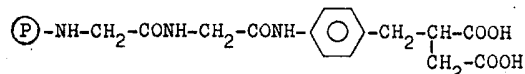
a) Používá se kolony s afinitním sorbentem na bázi měkkého polysacharidového bobtnacího gelu Sepharosy, který může být štěpen enzymy přítomnými v autolyzátu droždí nebo v jiných mikrobiálních kapalinách. Použití měkkého gelu limituje rychlost průtoku eluentu. Autoři známého způsobu uvádějí maximální rychlost průtoku 240 ml/h u kolony s průměrem 50 mm.

b) Popsaný způsob využívá afinitního sorbentu obsahujícího C-terminální aminokyselinu tyrosin. Tento ligand je substrátem karboxypeptidáz, takže dochází k postupnému odštěpování vázaného tyrosinu za současného poklesu kapacity sorbentu. Tyrosin je dále afinitním ligandem proteáz chymotryptického typu, což vede ke znečištění konečného produktu endoproteázami. Přítomnost karboxylové skupiny mimo afinitní centrum vede též k nespecifické sorpci neaktivních doprovázejících bílkovin.

c) Je známo, že karboxypeptidáza Y je rychle a nevratně inaktivována ionty těžkých kovů například Fe^{3+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} atd. Stopové množství těchto kationtů ani ve výchozím extraktu droždí ani v tlumivých roztocích není prakticky možno vyloučit. Důsledkem je pak snížená kvalita získaného enzymu.

Cílem způsobu izolace karboxypeptidázy Y podle vynálezu je podstatné zkrácení procesu a zlepšení kvality konečného produktu.

Toho se dosáhne tím, že způsob izolace karboxypeptidázy Y afinitní chromatografií podle vynálezu spočívá v tom, že jako afinitního sorbentu se použije sorbent podle vzorce



kde $\textcircled{P}$ je rigidní makroporézní hustě zesíťovaný kopolymer 2-hydroxyethylmetakrylátu s 10 až 90 % mol etyléndimetakrylátu (Spheron, Separon HEMA).

Způsob podle vynálezu se odlišuje od známého postupu také tím, že se do všech tlumivých roztoků používaných při izolaci karboxypeptidázy Y přidává 0,002 mol/l kyseliny etyléndiaminotetraoctové, která s kationty těžkých kovů vytváří komplexy. Její přítomnost nemá vliv na interakci enzymu s afinitním sorbentem ani na aktivitu enzymu. Takto se

dosahuje zvýšení kvality finálního produktu. Způsob podle vynálezu popsany v příkladu 2 byl za analogických podmínek porovnán se známým postupem podle Johansena.

Použití kopolymerního makroporézního nosiče s kovalentně vázaným afinitním ligandem glycyl-glycyl-D,L-p-aminobenzyljantarovou kyselinou a eluce roztoky obsahujícími přídavek EDTA dovoluje vyloučit nespecifickou sorpci na karboxylových skupinách nepatřících do aktivního centra ligandu a konečně vyloučit i deaktivaci enzymu kationty těžkých kovů, které jsou přítomny v činidlech, případně které se uvolňují z kovových částí aparatury.

Předmět vynálezu je v dalším vysvětlen na příkladech, aniž by však byl jimi jakkoli omezován.

Příklad 1

Příprava autolyzátu droždí byla provedena podle Johansena a spolupracovníků (Carlsberg Res. Commun. 41 (1) (1976) 1-14). Z 550 g droždí bylo získáno 975 ml extraktu.

50 ml autolyzátu bylo aplikováno na kolonu o průměru 0,8 cm o objemu 5 ml obsahující sférický sorbent (velikost částic 100 až 200 μm) 2-hydroxyethylmetakrylát-co-etylendimetakrylát s vylučovacím limitem molekulové hmotnosti 10^6 daltonů (Separon HEMA 1000) s navázanou gly-gly-aminobenzyljantarovou kyselinou (10 uekv./g suchého nosiče). Kolona byla ekvilibrována 0,01 M octanem sodným obsahujícím 1,0 M NaCl byla karboxypeptidáza Y desorbována 0,01 M fosfátovým pufrem pH 7,0. Bylo získáno 204 jednotek (jednotka je definována jako množství enzymu, které hydrolyzuje 1,0 mikromolu karbobenzoxy-L-fenylalanin-L-alaninu za 1 minutu při 25 °C, pH je 6,7; aktivita byla stanovena podle Johansena a spolupracovníků) což představuje 1,36 mg enzymu o specifické aktivitě 150 g/mg bílkoviny.

Příklad 2

Kolona průměru 5 cm o délce 10 cm byla naplněna afinitním sorbentem podle příkladu 1 a promyta 1 000 ml roztoku pufru (0,05 M murfolinpropansulfokyselina - NaOH) pH 5,0 rychlostí 1 400 ml/h.

Ke 4 000 ml zakoncentrovaného aktivovaného extraktu droždí pH 5,0 se přidá 2 mmol/l kyseliny etyléndiaminotetraoctové (EDTA). Získaný roztok se čerpá kolonou s afinitním sorbentem rychlostí 750 ml/h. Při této operaci dochází k selektivní sorpci karboxypeptidázy Y na afinitním sorbentu. K odstranění neaktivních balastních bílkovin se kolona promyje 0,01 M acetátovým pufrem pH 4,3 obsahujícím 1 mol/l NaCl a 2 mmol/l EDTA. Promývání se provádí tak dlouho, až se dosáhne absorbance menší než 0,005 AUFS při 280 nm.

Karboxypeptidáza Y se desorbuje promytím kolony 0,01 M fosfátovým pufrem pH 7,0 obsahujícím 2 mmol/l EDTA rychlostí 750 ml/h. Eluát se zkoncentruje ultrafiltrací a skladuje při -20 °C. Aktivita enzymu byla zjišťována spektrofotricky podle rychlosti štěpení Z-Phe-Ala-OH při pH 6,75. Specifická aktivita je o 8 % vyšší než aktivita enzymu připraveného známým dříve citovaným způsobem. 2,5 až 5krát vyšší průtoková rychlost činidel umožněná mechanickou stabilitou makroporézního-sorbentu dovoluje zkrátit celkovou dobu procesu 3 až 3,5krát.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy karboxypeptidázy Y z extraktu, vyznačený tím, že se extrakt z droždí uvede do styku se sorbentem sestávajícím z makroporézního nosiče na bázi kopolymeru 2-hydroxyethylmetakrylátu s 10 až 90 % mol etyléndimetakrylátu s kovalentně navázaným afinitním ligandem glycyl-glycyl-D,L-p-aminobenzyljantarovou kyselinou, promyje se a pak se desorbuje roztokem tlumiče, přičemž všechny kapaliny používané při tomto procesu včetně výchozího extraktu obsahují přídavek etyléndiaminotetraoctové kyseliny.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že koncentrace etyléndiaminotetraoctové kyseliny v roztocích používaných při procesu činí 0,002 mol/l.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se sorpce, promývání a desorpce karboxypeptidázy Y na makroporézním sorbentu na bázi kopolymeru 2-hydroxyethylmetakrylátu s 10 až 90 % mol etyléndimetakrylátu s kovalentně vázanou glycyl-glycyl-D,L-p-aminobenzyljantarovou kyselinou provádí ve sloupcovém uspořádání.