



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39128** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 9/50
C12N 9/52
C12N 9/64

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А

1

(21) u200809387
(22) 17.07.2008
(24) 10.02.2009
(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.
(72) ВОВЧУК ІРИНА ЛЕОНІДІВНА, UA
(73) ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.І.МЕЧНИКОВА, UA

2

(57) Спосіб отримання карбоксипептидази А, який полягає в тому, що карбоксипептидазу А екстрагують з тканини тваринного походження, потім карбоксипептидазу А додатково очищують від білкових та небілкових домішок, який **відрізняється** тим, що як тканину тваринного походження використовують яєчники тварин.

Корисна модель відноситься до галузі отримання ферментів і може бути використана для отримання карбоксипептидази А (КФ 3.4.17.1) з сировини тваринного походження на підприємствах хімічної та хіміко-фармацевтичної промисловості. Отриманий за пропонуванням методом препарат карбоксипептидази А може бути використаний в імунотерапії онкологічних захворювань та як складова частина моноклональних тіл в лікуванні онкологічних хворих для зниження цитотоксичності хіміопрепаратів, таких як метотрексат та його похідні метотрексат-фенілаланін, метотрексат-аланін, метотрексат-аспарагінова кислота [Kuefner U., Lohmann U., Montejano Y. et al. Chemotherapeutic potential of methotrexate peptides. - Adv. Enzyme Regul. - 1988. - Vol. 27. - P. 3-13; Sheahan K., Shuja S., Murnane M. J. Cysteine protease activities and tumor development in human colo-rectal carcinoma. - Cancer Res. - 1989. - Vol. 49, № 14. - P. 3809-3814; Shi P. T., Hao X. K., Chen Y. et al. The solid-phase synthesis of methotrexate-alphapeptides. - Yao Xue Xue Bao. - 1997. - Vol. 32, № 2. - P. 106-109; Craveiro R. B., Ramalho J. D., Chagas J. R. et al. High expression of human carboxypeptidase M in Pichia pastoris: purification and partial characterization. - Braz. J. Med. Biol. Res. - 2006. - Vol. 39, № 2. - P. 211-217].

Досягнутий рівень в даній галузі ілюструється наступними прикладами.

Відомий спосіб отримання карбоксипептидази А з клітин саркоми Кирстена мишів. Тканину саркоми Кирстена гомогенізують з ацетоном, потім висушують за кімнатних умов, потім з ацетонового порошку готують водний екстракт. Водний екстракт карбоксипептидази А потім активують в присутності трипсину, а потім піддають афінній хро-

матографії на сефарозі 4В. В якості специфічного ліганду використовують інгібітор карбоксипептидази А з картонлі [Reynolds D.S., Stevens R.L., Gurley D.S., Lane W.S., Austen F.K., Serafin W.E. Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. - J. Biol. Chemistry. - 1989. - Vol. 264, № 33. - P. 20094-20099].

Недоліками відомого способу є додаткове використання комерційного препарату трипсину для активування прокарбоксипептидази А, що призводить до подорожчання карбоксипептидази А (1г трипсину коштує 240,10 євро) та збільшує трудомісткість процесу.

Відомий спосіб отримання карбоксипептидази А з мозку щурів, який полягає в тому, що тканину мозку щурів гомогенізують з ОД М фосфатний буфером pH 7,4 у співвідношенні 1:10 (тканина/ фосфатний буфер), потім гомогенат центрифугують 20хв. при 46 000g, потім супернатант, що містить прокарбоксипептидазу А активують на протязі 1 години в присутності трипсину у співвідношенні 100мкг трипсину до 1мл супернатанта), потім супернатант, який містить активовану карбоксипептидазу А хроматофокусують на PBE94та елюїрують PB74 буфером (Pharmacia). Фракцію, що отримують після хроматофокусування і яка містить карбоксипептидазу А додатково очищують на фенол-Сефарозе [Normant E., Gros C, Schwartz J. Carboxypeptidase A isoforms produced by distinct genes or alternative splicing in brain and other extrapancreatic tissues. - J. Biol. Chemistry. - 1995. - Vol. 270, №35. - P. 20543 - 20549]. Цей спосіб взятий в якості прототипу.

Недоліками відомого способу (найближчого аналога) є додаткове використання комерційного препарату трипсину для активування прокарбок-

(13) **U**
(11) **39128**
(19) **UA**

сипептидази А, що призводить до подорожчання карбоксипептидази А (1г трипсину коштує 240,10 євро) та збільшує трудомісткість процесу.

В основу корисної моделі поставлена задача: створити спосіб отримання карбоксипептидази А з отриманням технічного ефекту, що полягає в виключенні процесу активації карбоксипептидази А трипсином.

Поставлена задача досягається тим, що карбоксипептидазу А екстрагують з тканини тваринного походження, потім карбоксипептидазу А додатково очищують від білкових та небілкових домішок, який відрізняється тим, що які тканину тваринного походження використовують яєчники тварин.

Загальними ознаками найближчого аналога та способу, який пропонується, є те, що в обох випадках карбоксипептидазу А екстрагують з тканини тваринного походження, потім карбоксипептидазу А додатково очищують від білкових та небілкових домішок.

Відмінними ознаками способу, який пропонується, є те, що як тканину тваринного походження використовують не тканину мозку, як у найближчому аналозі, а яєчники тварин.

Запропонований спосіб ілюструється наступним прикладом.

Пропонується спосіб отримання карбоксипептидази А реалізується наступним чином. Тканину яєчників тварин гомогенізують з ацетоном, потім гомогенат центрифугують, потім осад ресуспендують, екстрагують та повторно центрифугують, після того осади об'єднують, висушують, потім з ацетонового порошку готують екстракт, який потім очищають від білкових та небілкових домішок відомими способами.

Встановлено, що до 95% активності карбоксипептидази А екстрагується під час першої екстракції, що свідчить на користь того, що фермент не є мембранозв'язаний (табл. 1).

Таблиця 1

Екстрагуємость карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинних тканин яєчника ($M \pm m$, $n=3$)

Екстракція	Яєчник					
	Немалігнізована тканина		Доброякісна пухлина		Злоякісна пухлина	
	ПА	%	ПА	%	ПА	%
I	57,12±5,54	94,08%	98,03±9,63	95,52%	81,43±7,81	94,38%
II	3,62±3,46	5,92%	4,59±4,41	4,48%	4,85±4,67	5,62%
Усього:	60,71±5,87	100,0%	102,63±9,87	100,0%	86,28±8,54	100,0%

Примітка:

ПА - питома активність карбоксипептидази А в мМ фенілаланіну / мг білка за 1хв. інкубації при

37°C; % - остаточна активність ферменту у % по відношенню до показників суми.

Таблиця 2

Вплив трипсину на активність карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинних тканин яєчника ($M \pm m$, $n=3$)

Яєчник					
Немалігнізована тканина		Доброякісна пухлина		Злоякісна пухлина	
Без трипсина	Активність трипсина	Без трипсина	Активність трипсина	Без трипсина	Активність трипсина
0,270±0,03	0,280±0,03	1,400±0,13	1,430±0,13	1,200±0,11	1,220±0,11

Інкубація гомогенатів тканини яєчника з трипсином (у співвідношенні 1мл гомогенату 100мг трипсину) на протязі 45хв. не збільшувала активність карбоксипептидази А, що свідчить про присутність карбоксипептидази А в тканині яєчників в активній формі (табл. 2). Отримані результати свідчать про те, що використання трипсину для активації карбоксипептидази А недоцільне і може бути виключено.

Таким чином, запропонований спосіб у порівнянні з найближчим аналогом забезпечує виключення

операції активації карбоксипептидази А трипсином, що дозволяє виключити затрати на трисин та скоротити трудомісткість процесу отримання карбоксипептидази А. Це досягається завдяки тому, що як тканину тваринного походження використовують яєчники тварин, а не тканину мозку.

Спосіб, що пропонується, надається промисловим підприємствам для промислового використання.