



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **40396** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 9/50
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 ОДЕРЖАННЯ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А

1

(21) u200811881
(22) 06.10.2008
(24) 10.04.2009
(46) 10.04.2009, Бюл. № 7, 2009 р.
(72) ВОВЧУК ІРИНА ЛЕОНІДІВНА, UA
(73) ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА, UA
(57) Спосіб одержання карбоксипептидази А, який полягає в тому, що тканину яєчників тварин, яка містить карбоксипептидазу А, гомогенізують, потім карбоксипептидазу А екстрагують охолодженим ацетоном, отриманий екстракт центрифугують, осад ресуспендують та екстрагують охолодженим ацетоном, потім отриманий екстракт центрифугують, надосадкові рідини об'єднують, висушують

2

при кімнатній температурі, потім з ацетонового порошку готують водний екстракт карбоксипептидази А, котрий додатково очищують від білкових та небілкових домішок, який **відрізняється** тим, що першу екстракцію охолодженим ацетоном проводять у співвідношенні 1:10 (тканина/ацетон) протягом 60 хв. при +4 °С, осад отримують центрифугуванням при 12000 об/хв. протягом 45 хв., ресуспендування та екстракцію охолодженим ацетоном проводять у співвідношенні 1:5 (тканина/ацетон) протягом 45 хв. при +4 °С, потім отриманий екстракт центрифугують 45 хв. при 12 000 об/хв., а як екстрагуючий розчин ацетонового порошку використовують дистильовану воду.

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. Одержаний за пропонуванням способом 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-аспаргінова 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., Mumane M. J. Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal 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 Кірстена мишей. Тканину саркоми Кірстена гомогенізують з ацетоном, висушують за кімнатних умов, потім з ацетонового порошку готують водний екстракт. Водний екстракт карбоксипептидази А потім активують в присутності трипсину, а потім піддають афінній хроматографії на сефарозі 4В. В якості специфічного ліганду використовують інгібітор карбокси-пептидази А з картоплі [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 (1 г 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 0,1 М фосфатний буфером рН 7,4 у співвідношенні 1:10 (тканина/фосфатний буфер), потім гомогенат центрифугують 20 хв при 46 000 g, потім супернатант, що

(19) **UA** (11) **40396** (13) **U**

містить прокарбоксипептидазу А активують на протязі 1 години в присутності трипсину у співвідношенні 100 мкг трипсину до 1 мл супернатанта), потім супернатант, який містить активовану карбоксипептидазу А хроматофокусують на PBE94 та елююють PB74 буфером (Pharmacia). Фракцію, що отримують після хроматофокусування і яка містить карбоксипептидазу А додатково очищують на фенол-Сепарозе [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].

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

Відомий спосіб очистки карбоксипептидази А з підшлункової залози свині за допомогою аніонообмінної хроматографії [Folk J.E., Schirmer E. W. The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. - J. Biol. Chemistry. - 1963. - Vol. 238, № 12. - P. 3884 - 3894]. Спосіб полягає в тому, що прокарбоксипептидазу А гомогенізують, потім екстрагують з тканини підшлункової залози охолодженням ацетоном у співвідношенні 1:5 (тканина/ацетон), потім екстракт фільтрують крізь паперовий фільтр. Отриманий таким чином осад ресуспендують з охолодженням ацетоном у співвідношенні 1:2 (тканина/ацетон), потім фільтрують, фільтрати об'єднують та висушують при кімнатній температурі. З ацетонного порошку на протязі 45 хв при 0-2 °С готують водний екстракт проферменту, який центрифугують 30 хв при 14,6 г, потім екстракт фракціонують сульфатом амонію при 0,35 М насиченні, потім центрифугують 30 хв при 14,6 г. Супернатант фракціонують сульфатом амонію при 0,6 М насиченні, потім центрифугують 30 хв при 14,6 г. Осад, отриманий при 0,6 М сульфатом амонію, обезсолюють на сефадексі G-25 з 0,005 М Трис-HCL pH 8,0 в якості елююючого буферу, а потім 300-400 мл елюату фракціонують на DEAE-целюлозі з 0,005 М Трис-HCL pH 8,0 в якості елююючого буфера та елююють лінійним градієнтом від 0 до 0,45 М NaCl у 0,005 М Трис-HCL буфері pH 8,0. Фракції, що містять прокарбоксипептидазу А повторно фракціонують сульфатом амонію при 43% насиченні та діалізують проти дистильованої води. Фракцію ферменту піддають повторної хроматографії на DEAE-целюлозі у 0,005 М Трис-ацетатному буфері pH 6,0 та ілюструють лінійним градієнтом від 0 до 0,45 М NaCl у 0,005 М Трис-ацетатному буфері pH 6,0. Отриманий препарат прокарбоксипептидази А не втрачає ферментної активності на протязі 3 місяців під час зберігання при 0° С. Вихід ферменту становить 15 %.

Даний спосіб обрано в якості прототипу.

Недоліками способу є невисокий ступінь очистки (14,23 раз), процент виходу фермента (15 %)

та многостадійність способу, що передбачає тривалість процесу (6 діб).

В основу корисної моделі поставлена задача: створити спосіб одержання карбоксипептидази А з отриманням технічного ефекту, який полягає в збільшенні виходу ферменту.

Поставлена задача досягається тим, що тканину яєчників тварин, яка містить карбоксипептидазу А гомогенізують, потім карбоксипептидазу А екстрагують охолодженням ацетоном, отриманий екстракт центрифугують, осад ресуспендують та екстрагують охолодженням ацетоном, потім отриманий екстракт центрифугують, надосадкові рідини об'єднують, висушують при кімнатній температурі, потім з ацетонного порошку готують водний екстракт карбоксипептидази А, котрий додатково очищують від білкових та небілкових домішок, який відрізняється тим, що першу екстракцію охолодженням ацетоном проводять у співвідношенні 1:10 (тканина/ацетон) на протязі 60 хв при + 4 °С, осад отримують центрифугуванням при 12 000 об/хв на протязі 45 хв, ресуспендування та екстракцію охолодженням ацетоном проводять у співвідношенні 1:5 (тканина/ацетон) на протязі 45 хв при + 4 °С, потім отриманий екстракт центрифугують 45 хв при 12 000 об/хв, а в якості екстрагуючого розчину ацетонного порошку використовують дистильовану воду.

Загальними ознаками прототипу та способу, який пропонується, є те, що в обох способах карбоксипептидазу А екстрагують з тканини охолодженням ацетоном, осад ресуспендують, потім надосадкові рідини об'єднують, висушують при кімнатній температурі, отриману карбоксипептидазу А екстрагують з ацетонного порошку та додатково очищують від білкових та небілкових домішок.

Відмінними ознаками способу, який пропонується, є те, що екстракцію карбоксипептидази А охолодженням ацетоном проводять у співвідношенні 1:10 (тканина/ацетон) на протязі 60 хв при + 4 °С, а не у співвідношенні 1:5, як у прототипі, екстракт центрифугують 45 хв при 12 000 об/хв, а не фільтрують крізь папір, як у прототипі, потім осад ресуспендують та екстрагують охолодженням ацетоном у співвідношенні 1:5 (тканина/ацетон), на протязі 45 хв при + 4 °С, а не у співвідношенні 1:2, як у прототипі, потім отриманий екстракт центрифугують 45 хв при 12 000 об/хв, отриману карбоксипептидазу А додатково очищують від білкових та небілкових домішок.

Запропонований спосіб ілюструється наступним прикладом.

Пропонуємий спосіб одержання карбоксипептидази А багаторазово випробувався в лабораторії біохімії ОНУ імені І.І. Мечникова з доброю відтворюваністю результатів. Помилка не перевищувала 5% при проведенні понад 100 експериментів.

Результати досліджень з найкращою відтворюваністю результатів наведені в таблицях 1 та 2.

Таблиця 1

Вплив умов одержання карбоксипептидази А на питому активність та процент виходу ферменту (n=100)

Співвідношення тканина/ ацетон	Тривалість екстракції (хв)	Тривалість центрифугування (хв)	Температура °С	Питома активність	% виходу
1:8	45	45	2	52,07 ± 5,03	91,16%
1:10	60	60	4	57,12 ± 5,54	94,08 %
1:15	90	90	10	48,27 ± 4,73	79,50 %

Питому активність карбоксипептидази А вимірювали в мМ фенілаланіну на мг білка за 1 хв інкубації при 37 °С.

Нами визначено, що співвідношення 1:10 (тканина/ацетон) - є оптимальним, тому що за цей час досягається максимальний процент виходу ферменту (94,08 %) з максимальною питоною активністю (57,12). Зменшення або збільшення співвідношення тканина/ацетон недоцільно внаслідок зменшення питомої активності та втрати до 5 % ферменту. Встановлено, що оптимальною є екстракція на протязі 60 хвилин, тому що за цей час досягається максимальний процент виходу ферменту (94,08 %) з максимальною питоною активністю (57,12). Зменшення тривалості екстракції до 45 хвилин недоцільно тому, що при-

зводить до втрати 15,5 % ферменту. Збільшення тривалості екстракції до 90 хвилин практично не впливає на процент виходу ферменту та його питому активність, але є недоцільним тому, що збільшує тривалість процесу. Оптимальною температурою екстракції є + 4 °С, тому що за цей час досягається максимальний процент виходу ферменту з максимальною питоною активністю. Збільшення, або зменшення температури недоцільно тому, що призводить до втрати від 1,7 % до 12,5 % ферменту.

В таблиці 2 наведені дані щодо впливу умов ресуспендування та повторної екстракції карбоксипептидази А на питому активність та процент виходу ферменту.

Таблиця 2

Вплив умов ресуспендування та повторної екстракції на питому активність та процент виходу карбоксипептидази А (n=100)

Співвідношення тканина/ ацетон	Тривалість ресуспен (хв)	Тривалість центрифугування (хв)	Питома активність	% виходу
1:2	15	30	3,06 ± 2,94	5,00 %
1:5	30	45	3,62 ± 3,46	5,92 %
1:10	45	60	3,60 ± 3,52	5,88 %

Питому активність карбоксипептидази А вимірювали в мМ фенілаланіну на мг білка за 1 хв інкубації при 37°С.

Нами встановлено, що процес ресуспендування та повторної екстракції є оптимальним на протязі 30 хвилин, тому що за цей час досягається максимальний процент виходу ферменту (5,92 %) з максимальною питоною активністю (3,62). Зменшення тривалості процесу до 15 хвилин недоцільно тому, що призводить до втрати 15,0 % ферменту. Збільшення тривалості екстракції до 45 хвилин практично не впливає на процент виходу ферменту та його питому активність, але є недоцільним тому, що збільшує тривалість процесу.

Центрифугування є оптимальним на протязі 45 хв, тому що за цей час досягається максимальний процент виходу ферменту з максимальною

питоною активністю. Зменшення тривалості процесу центрифугування до 30 хвилин недоцільно тому, що призводить до втрати 11,5 % ферменту. Збільшення тривалості центрифугування до 60 хвилин практично не впливає на процент виходу ферменту та його питому активність, але є недоцільним тому, що збільшує тривалість процесу.

Експериментальні дослідження запропонованого способу підтвердили, що поставлена задача успішно вирішується завдяки експериментальне встановленим оптимальним умовам процесу одержання карбоксипептидази А: співвідношенню наважки тканини та охолодженого ацетону, тривалості та умов процесу екстракції, умов процесу Центрифугування, умов ресуспендування та повторної екстракції, тривалості процесу ресус-

пендування та повторної екстракції, умов центрифугування повторного екстракту.

Таким чином, запропонований спосіб у порівнянні з прототипом забезпечує отримання препарату ферменту з 94,5 % виходу при незнач-

них матеріальних витратах, трудоемкості та малостадійності процесу.

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