

(19)



(10) **LT 3424 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3424**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 9/22**

(21) Paraiškos numeris: **IP595**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 06 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 12 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 09 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 90/00141, 1990 01 08**

(72) Išradėjas:
Peter Herrmann, CH
Peter Klein, CH

(73) Patento savininkas:
NIKA HEALTH PRODUCTS LTD., Steadtle 36, 9490 Vaduz, LI

(74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Ribonukleazės dimerų gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas apima išvalytų ribonukleazės dimerų gavimo būdą, į kurį įeina monomerinės ribonukleazės dimerizacijos stadija, panaudojant suberimidatinį sujungiantįjį reagentą, nedimerizuotų monomerų ir oligomerų nufiltravimo iš tirpalo stadija, panaudojant keletą chromatografinių etapų per jonitines dervas, reakcijos eigos kontrolė, panaudojant gel-elektroforezę, ir išvalyto ribonukleazės dimerinio produkto surinkimas. Gavimo būdo privalumai yra tokie, kad efektyviai ir palyginus nebrangiai galima gauti didelius produkto kiekius, ir tai, kad ribonukleazės dimerai dėl jų tinkamo poveikio gali būti naudojami kovai su virusinėmis ir bakterinėmis infekcijomis. Jie neturi citotoksinio poveikio, paprastai būdingo ribonukleazės monomerams.

Išradimas apima ribonukleazės dimerą, kuris gali būti naudojamas gydant virusines ir bakterines infekcijas, gavimo ir valymo būdą.

- 5 Kaskart vis didėjantis bakterinių ir virusinių, ligas sukeliančių kamienų, atsparių antibiotikams, skaičius reikalauja, kad žmonių gydymui būtų naudojami naujo tipo vaistai. Tarp šiuo metu taikomų naujų gydymo metodų ir įvairiomis ligomis sergantiems ligoniams
- 10 gydyti skirtų vaistų tam tikrą pripažinimą įgijo fermentų monomerai. Kai kuriais atvejais fermentų taikymas būtinas todėl, kad, esant kai kuriems susirgimo simptomams, pastebimas fermentų aktyvumo sumažėjimas. Fermentai priskiriami katalitiškai aktyvių baltymų
- 15 grupei, ir jie dalyvauja visuose organizme vykstančiuose gyvybiškai svarbiuose procesuose. Kadangi fermentai pasižymi fizikocheminiu, fiziologiniu arba biologiniu veikimu, daug jų yra išskirta tiek individualioje būsenoje, tiek ir tam tikruose deriniuose.
- 20 Prie tokių fermentų, kurie turi gydantįjį efektą, arba kurių aktyvumas sumažėja, esant kai kuriems susirgimo simptomams, priklauso ir ribonukleazės. Ribonukleazės sudaro grupę nukleininų fermentų, paprastai randamų daugelyje gyvūnų ir augalų organizmų. Ribonukleazės savybių ir jos išskirimo metodų tyrimą pradėjo Schmidt ir McDonald 50-ųjų metų viduryje. Tarp daugelio
- 25 atradimų, susijusių su šiuo fermentu, buvo ir tai, kad vėžiniame audiniui yra charakteringas labai sumažintas jo ribonukleazės aktyvumas. Vienu atveju buvo rasta, kad leukocitų pelės turi labai sumažintą rūgštinės ribonukleazės aktyvumą, stebimą, tarp kitko, mitochondrijų ir mikrosomų frakcijose, gautose iš gyvuliukų blužnies. Panašūs tyrimai rodo, kad ribonukleazę galbūt galima taikyti profilaktikai arba kovai su virusine
- 30 leukemija.
- 35

Deja, ribonukleazės pritaikymo potencialios galimybės nebuvo realizuotos pirmiausia dėl to, kad šio fermento monomerinė forma buvo labai citotoksiška. Pavyzdžiui, bandymuose su kultivuojamais fibroplastais pastebėtas
 5 citotoksinis poveikis, įvedus netgi ypač mažus monomerinės ribonukleazės kiekius. Iš to, kas pasakyta, seka, kad būtinai reikalinga maksimaliai išnaudoti potencialias ribonukleazės galimybes, tuo pačiu metu suvedant į minimumą jos monomerinės formos citotoksiinį
 10 poveikį.

Neseniai rasta, kad iš ribonukleazės galima pagaminti priešvirusinę arba antibakterinę kompoziciją, neturinčią citotoksinio poveikio, jei tokią kompoziciją
 15 padaryti iš fermento dimerinės formos. Buvo nustatyta, kad ribonukleazės dimero kompozicijos taikymas yra efektyvus, gydant eilę infekcinių susirgimų, ir ši kompozicija neturi stipraus citotoksinio poveikio, paprastai susijusio su ribonukleazės monomeru. Ribonukleazės dimerų taikymas įvairiuose gydymo kursuose aprašytas šiuo metu nagrinėjamoje paraiškoje PCT /US 88/ 01785.

Nors ribonukleazės dimerinės formos gavimo iš jos monomerinės formos būdai ir yra žinomi, didelę reikšmę
 25 turi didelių dimerinės formos kiekių gavimas nebrangiu ir efektyviu būdu. Taigi, labai pageidautina sukurti tokią didelių išvalyto ribonukleazės dimero kiekių gavimo ir analizės sistemą, kad ribonukleazės dimere būtų minimalūs priemaišų, tokių kaip monomerai, multimerai arba kitos užteršiančios medžiagos, kiekiai.
 30

Pagal šį išradimą, ribonukleazės dimero galutiniam produktui gauti numatomos šios stadijos:

35 a) ribonukleazės tirpalo paruošimas, tirpinant ribonukleazę buferiniame tirpale ir nustatant pH lygų mažiausiai 9;

b) suberimidatinės (turinčios suberino rūgšties imidatą) sujungiančios medžiagos, tokios kaip dimetil-suberimidatas, pridėjimas, kad įvyktų ribonukleazės monomerų dimerizacija tirpale, palaikant tirpalo pH 9
5 arba didesnę;

c) pH sumažinimas apytikriai iki 7, kad dimerizacijos reakcija sustotų šiame lygyje;

10 d) dimerizuotos ribonukleazės tirpalo gryninimas, panaudojant pirmą filtravimo etapą, kuriame tirpalas leidžiamas per jonitinę dervą ir surenkamos frakcijos, turinčios didelį ribonukleazės dimerinės formos kiekį;

15 e) antrasis filtravimo etapas, kuriame pirmajame filtravimo etape surinktos frakcijos leidžiamos per jonitinę dervą;

20 f) didelio švarumo laipsnio ribonukleazės dimero, gauto iš antrojo filtravimo etapo, surinkimas.

Naudojant aukščiau aprašytą metodą, galima pagaminti didelius kiekius ribonukleazės dimero, kaip galutinio produkto, kuris yra ypatingai naudingas gydant įvairius
25 virusinius ir bakterinius susirgimus.

Trumpas diagramų paaiškinimas

1 ir 2 brėž. grafiškai pavaizduota šio išradimo jonų
30 mainų chromatografijos eliuavimo charakteris.

Smulkus išradimo aprašymas

35 Pagal šį išradimą gaminant ribonukleazės dimerinę formą, kaip pradiniai produktai gali būti naudojami bet kokie šiuo metu prieinami ribonukleazės monomerai. Šiame išradime buvo naudojami ribonukleazės monomerai,

gauti iš firmos Serva Feine Biochemica, GmbH, Heidelberg ir turintys kataloginį Nr. 28260. Gali būti naudojami ribonukleazės A arba bet kokios iš prieinamų ribonukleazių monomerai. Ribonukleazės monomerai paruošiami sujungimo reakcijai, tirpinant juos fosfatiname buferyje kambario temperatūroje; taip gaunamas ribonukleazės monomero tirpalas. Rekomenduojama naudoti 0,1 M buferinį dinatrio hidrofosfato dihidrato tirpalą, kuriame ištirpinamas monomeras, nepertraukiamai maišant tirpalą mažiausiai 2 valandas. Tinkamas buferinis tirpalas buvo gautas, tirpinant apie 70 g dinatrio hidrofosfato dihidrato apytikriai 1000 ml vandens. Nors tikslūs reagentų ir tirpalų, naudojamų šiame išradime aprašytame gavimo būde, kiekiai gali skirtis, šio išradimo dimerizacijos reakcija vykdoma tirpale, kur 40-60 g ribonukleazės monomero ištirpinta 5 l dinatrio hidrofosfato dihidrato buferio. Be to, rekomenduojama nustatyti monomero tirpalo pH mažiausiai 9, geriau 10. pH nustatymui galima naudoti 0,1 N NaOH.

Dimerizacijos reakcija inicijuojama, pridedant kaip sujungiančios medžiagos, tam tikrą suberimidato kiekį į ribonukleazės monomero tirpalą ir nustatant pH reikšmę mažiausiai 9 arba didesnę, geriau 10 ($\pm 0,2$). Sujungiančia medžiaga šiame išradime rekomenduojama naudoti dimetilsuberimidatą, bet gali būti naudojami ir kiti suberimidatiniai sujungiantys reagentai. Į monomero tirpalą, pagamintą pagal aukščiau duotą aprašymą, rekomenduojama pridėti 4-6 g dimetilsuberimidato, kuris ištirpsta per 1 min. Nepertraukiamai maišant magnetiniu maišikliu arba kitoku prietaisu, kambario temperatūroje ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$) reakcija vyksta 30-60 minučių. Reakciją galima nutraukti, sumažinant tirpalo pH, pridėjus HCl tirpalo, kad pH pasidarytų 7 ($\pm 0,2$). Po to, rekomenduojama koncentruoti gautą mišinį, panaudojant tangentinio srauto sistemą, kuri detaliam aprašymui žemiau.

Tam tikrais laiko tarpais nuo sujungimo reakcijos pradžios rekomenduojama imti iš tirpalo mėginius analizei ir juos analizuoti naudojant gel-elektroforezę. Gel-elektroforezės tyrimai parodė, kad nors monomerinė fermento forma ir aiškiai matoma beveik visuose analizuojamuose mėginiuose, juostelė, atitinkanti ribonukleazės dimerinę formą, jau matoma, praėjus 10 min. nuo reakcijos pradžios. Fermento dimerinę formą atitinkanti juostelė aiškiai matoma apytikriai po 15 min., ir ji vis ryškėja, vykstant reakcijai. Be to, maždaug po 30 min., skaičiuojant nuo sujungiančio reagento pridėjimo momento, galima pastebėti fermento oligomerinių formų susidarymą. Monomerinė ribonukleazės forma turi molekulinę masę 15000, o dimerinė forma - dvigubai didesnę.

Norint gauti didelius išvalytos ribonukleazės dimero kiekius, rekomenduojama dimerizuotos ribonukleazės tirpalą filtruoti mažiausiai dviem etapais, kad būtų išskirti ribonukleazės dimerai ir pašalinta monomerinė arba polimerinė ribonukleazė. Atskirti nedimerizuoti ribonukleazės monomerai gali būti surinkti, ir šiame išradime rekomenduojama vėl juos leisti į procesą, kad dar labiau būtų padidintas fermento dimerinės formos gavimo efektyvumas.

Oligomerams atskirti iš dimerizuotos ribonukleazės tirpalo rekomenduojama tirpalą filtruoti per jonitinę dervą. Šiame išradimo realizavimo variante filtruojama per kolonėlę, užpildytą jonitine derva Sefadeks. Kolonėlė su Sefadeksu turi apie 25 cm diametrą ir apie 120 cm aukštį. Ji perplaunama maždaug 60 litrų 50 mM amonio hidrokarbonato tirpalu, kurio pH 8,6. Toks karbonatinis buferis gaminamas iš 4 g amonio hidrokarbonato ir 1000 ml vandens. Visas aukščiau aprašytu būdu gautas ribonukleazės tirpalas supilamas į kolonėlę ir eliuuojama reguliuojančiu buferiu. Frakcijos

renkamos frakcijų kolektoriumi, pvz. LKB 2211 Suprec; tirpalo tekėjimo greitis apie 80 ml/min. Eliuavimo charakteris registruojamas registruojančiu prietaisu, tokiu kaip saviraštis LKB 2210, matavimo greitis 5 0,5 mm/min, o absorbcija gali būti nustatyta KB UVICOR SII prietaisu, kai $\lambda=280$ nm.

Eliuavimo charakteris šiame filtravimo etape paprastai išreiškiamas trimis pikais: pirmą piką duoda ribonukleazės polimerai, antrasis pikas atitinka dimerus ir paskutinytis atitinka likusio monomerinio fermento kiekį. Šiame etape taip pat rekomenduojama analizuoti atskiras surinktas frakcijas gel-elektroforezės metodu. Panaši analizė gali būti atlikta SDS-poliakrilamidinio gelio elektroforezės (PAGE) metodu pagal Thomas ir kt. PNAS, 72, 2626 (1975) metodiką. Pagal šią metodiką rekomenduojama maždaug 50 μ l mėginį iš kiekvienos surinktos frakcijos sumaišyti su apytikriai 50 μ l dengiančio buferio ir šildyti apie 10 min. 95°C temperatūroje. Tada maždaug 25 μ l gauto mišinio įpilama į gelio duobutę. Elektroforezė vykdoma maždaug 4 val., esant 20-35 mA srovei; taip išsiskirsto atskiros fermento formos. Baltymo juostelės tampa matomos, dažant tokiais dažais, kaip Cumassi mėlynasis R 250 (Merck).

25 Toks metodas, kaip SDS-PAGE elektroforezė, leidžia identifikuoti ir surūšiuoti frakcijas, kuriose yra monomerinės, dimerinės ir oligomerinės ribonukleazės formos arba jų mišiniai. Išsiaiškinus frakcijų sudėtį, 30 tos frakcijos, kuriose pagrindinai yra dimerinė forma, yra atskiriamos ir supilamos kartu. Šias dimero frakcijas rekomenduojama vėl sukonzentruoti iki 800 ml, panaudojant tangentinio srauto sistemą. Tangentinio srauto sistemos membraninė diafragma gali būti vėl 35 perplauta atitinkamu tirpikliu, ir taip gali būti sulaikyti dideli dimero kiekiai. Rekomenduojama sukonzentruotą tirpalą liofilizuoti ir laikyti apie 4°C

temperatūroje iki papildomo apdirbimo. Idealiu atveju liofilizuojama supilant apie 200 ml tirpalo porciją į 500 ml talpos apvaliadugnę kolbą, kuri skysto azoto atmosferoje patalpinama į rotorinį garintuvą. Kolba
5 gerai užkemšama ir išlaikoma 30 min. -30°C temperatūroje, po to liofilizuojama.

Kadangi pradinės medžiagos dažniausiai yra brangios, ypatingai rekomenduojama nufiltruotus ankstesnėse
10 filtravimo stadijose monomerus vėl gražinti į šiame išradime pasiūlytą dimerizacijos procesą. Tai gali būti padaryta, surenkant frakcijas, kuriose yra didesni monomerinės ribonukleazės kiekiai, jas koncentruojant tangentinio srauto sistemos pagalba ir pridėdant
15 sujungiantįjį reagentą. Sujungimo reakcija vyksta taip pat kaip aprašyta aukščiau, ir lygiai taip pat rekomenduojama filtruoti. Po antrojo liofilizacijos ciklo gauti ribonukleazės dimerai kruopščiai sumaišomi su dimerizuotu produktu, gautu pirmajame cikle. Panaudojant tokias recirkuliavimo priemones, galima padidinti dimerinio produkto išeigą iki 30%.

Aukščiau aprašytu būdu gauti tirpalai, kuriuose pagrindinai yra dimeras, toliau valomi antrą kartą
25 filtruojant, kad būtų geriau atskirti dimerai nuo monomerų ir oligomerų ir padidintas galutinio produkto švarumas. Šiuo atveju rekomenduojama liofilizuotą fermentų mišinį perleisti per jonitinę dervą, pvz., per kolonėlę užpildytą Sefadeksu G 50F. Be to, rekomenduojama, kad kolonėlė su jonitine derva turėtų pH
30 apie 5; toks pH gali būti gaunamas, panaudojant 0,2 M natrio acetato buferį. Natrio acetato buferis, kurio pH 5, ruošiamas tirpinant apie 25 g natrio acetato trihidrato 1000 ml vandens.

35 Surinktos frakcijos, kurios pirmajame filtravimo etape atitiko antrąjį piką, supilamos į kolonėlę su

Sefadeksu. Antrajame filtravimo etape rekomenduojama naudoti tas pačias medžiagas ir filtravimo sąlygas, kaip ir pirmajame etape. Vėl registruojamas eliuavimo charakteris ir jis naudojamas identifikuoti ir atskirti reikalingas antrojo filtravimo etapo frakcijas. Šiuo atveju užrašytas eliuavimo charakteris rodo labai didelį dimero pagrindinį piką ir du mažus antrinius pikus.

Ir vėl rekomenduojama analizuoti surinktas ribonukleazės fermentų frakcijas aukščiau aprašytu SDS-PAGE metodu. Ši analizė rodo, kad frakcijos, atitinkančios pagrindinį eliuavimo kreivės piką, turi labai švarų ribonukleazės dimerą. Dabar pagrindinio piko frakcijos sujungiamos, ir rekomenduojama jas koncentruoti, panaudojant tangentinio srauto sistemą. Be to, dabar rekomenduojama atskirti druskas, praleidžiant frakcijas per kolonėlę su Sefadeksu G 25. Druskų atskyrimui naudojama kolonėlė yra apie 25 cm diametro ir 65 cm aukščio; jos tūris - 32 litrai, srauto greitis - 15 l/val. Be to, naudojamas amonio hidrokarbonato 50 mM buferis.

Taip gautas produktas yra labai švari ribonukleazės kompozicija. Tačiau, norint paversti liofilizuotą ribonukleazės dimerą į farmaciškai tinkamą formą, rekomenduojama atskirti iš jo endotoksinus. T.y. rekomenduojama gautą aukščiau aprašytu būdu išvalytą dimerinį produktą papildomai chromatografuoti, pvz., praleidžiant jį per Detoksigelį, kuris turi savybę surinkti endotoksinus. Detoksigelio endotoksinų surišamoji galia yra maždaug 2 mg/ml. Kadangi galimas ir nespecifinis kitų komponenčių, kaip pvz. baltymų dimerai, surišimas, maksimaliai regeneruoti dimerinį produktą galima panaudojant buferius, turinčius fiziologinį pH reikšmių intervalą. Pridėjus 0,1-0,5 M druskos (pvz. NaCl) tirpalo, gaunamas reikiamas pH reikšmių intervalas ir pasiekama maksimali dimero išeiga. Kaip taisyklė, chromatografuojant tirpalą, turintį 1500 EU/ml per

detoksikacinę kolonėlę, EU kiekį galima sumažinti iki mažiau negu 1 EU/ml.

Pašalinus endotoksinus iš ribonukleazės dimerų tirpalo, 5
tirpalas surenkamas, filtruojamas steriliose sąlygose ir patalpinamas į sterilią apvaliadugnę liofilizacijos kolbą. Endotoksinų kiekis galutiniam produkte gali būti nustatytas, panaudojant diagnostinį rinkinį, pvz. 10
tokį kaip "Coatest R", išleidžiamą firmos Kabi-Vitrum, Miunchenas. Analizė paremta amebocitų (karduodegio) lizato (LA) aktyvavimu, veikiant endotoksiniams. Aktyvuotas LA iš chromogeninio substrato S-2423 atskelia geltoną dažą - p-nitroaniliną - kurio kiekio 15
kitimas, atspindintis endotoksinų lygį, matuojamas spektrofotometru, esant $\lambda=405$ nm. Jei endotoksinų yra mažiau negu 0,1 ng/ml, dimero tirpalas supilamas į apvaliadugnę kolbą ir liofilizuojamas.

Aukščiau aprašytas procesas gali būti kartojamas tiek 20
kartų kiek reikia, kad būtų gaunamas reikiamas galutinio ribonukleazės dimero kiekis. Atskiros dimero partijos po valymo gali būti sterilizuojamos arba, jei reikia, papildomai liofilizuojamos ir taip gaunami vienalyčiai pavyzdžiai ribonukleazės dimero, kuris gali 25
būti ypatingai naudingas, gydant daugelį virusinės ir bakterinės kilmės susirgimų, tokių kaip nurodyti šiuo metu nagrinėjamoje paraiškoje PCT/US 88/01785. Be priešvirusinio ir antibakterinio veikimo, ribonukleazės dimerai gali duoti ir kitą gydantįjį efektą, pvz. juos 30
naudojant, kaip priešuždegiminius ir antihistamininius preparatus, kurie neturi potencialaus citotoksiškumo, surišto su fermento monomeringa forma. Šis būdas ypač patrauklus tuo, kad gali būti gaunami dideli išvalyto perspektyvaus ribonukleazės dimero kiekiai. Konkretūs 35
galutiniai ribonukleazės dimerai, gauti šiame išradime aprašytu būdu, gali būti analizuojami, nustatant jų fermentinį aktyvumą sąveikoje su ribonukleino rūgšties

tirpalais ir rezultatus registruojant spektrofotometru, pridėjus ribonukleazės dimero tirpalo. Taigi, šis būdas leidžia gauti labai švarų dimerinį fermentą, o taip pat ir nustatyti jo aktyvumą.

5

Žemiau duodami pavyzdžiai pateikti šio išradimo iliustracijos tikslais; jie jokių būdu neriboja išradimo apimtį.

10 1 pavyzdys

Ribonukleazės dimero gavimas

15 Į cheminę stiklinę su dangteliu, kurioje yra 5 l 0,1 M dinatrio hidrofosfato dihidrato, pridedama 0,1 N NaOH ir nustatomas tirpalo pH lygus 10. Dinatrio hidrofosfato dihidrato tirpalas gaunamas, tirpinant 70,98 g dinatrio hidrofosfato dihidrato 1000 ml vandens. Po to, 25°C (kambario) temperatūroje pridedama, kaip sujungiančiojo reagento, 5 g dimetilsuberimidato (Sigma, partijos Nr. 29_F 3687), kuris per 1 min. ištirpsta. Tirpalo pH visą laiką kontroliuojamas ir palaikomas lygus 10, pridedant 0,1 N NaOH. Tirpalas visą laiką maišomas magnetiniu maišikliu 45 minutes 25°C temperatūroje. Reakcija nutraukiama, sumažinant pH iki maž-
25 daug 7, pridėjus 1 M HCl.

Laikas nuo laiko iš reakcijos mišinio imami mėginiai ir analizuojami gel-elektroforezės metodu. Monomerai, 30 dimerai ir polimerai išsiskirsto SDS-gelyje. Naudojama monomerinė ribonukleazės forma turi molekulinę masę 15000, o dimerinė - dvigubai didesnę. Elektroforezės analizė parodė, kad dimero juostelė pastebima po 15 min. nuo sujungiančiojo reagento pridėjimo ir, reakcijai vykstant, ši juostelė tampa vis intensyvesnė. Be 35 to, po 30 min. susidaro ribonukleazės oligomerinės formos.

Dimerizuotos ribonukleazės tirpalas koncentruojamas iki 800 ml, panaudojant tangentinio srauto sistemą (Millipor). Į Millipor sistemą įeina: "Filtren Ausschluss 10000d" filtras, 7 barų slėgį atlaikanti olefininė membrana ir Werder 80 tipo 20-30 60079 siurblys. Įėjimo slėgis - 2 barai ir minimalus išėjimo slėgis - mažiau 0,2 barų. Sistemos našumas - 1 litras/val. Sistemos balastinis tūris yra 400 ml, todėl pabaigus koncentravimo procesą, sistema perplaunama 400 ml, todėl bendras tūris padidėja iki 1200 ml.

Norint atskirti dimerizacijos eigoje gautus oligomerus, sukongcentruotas ribonukleazės tirpalas filtruojamas per Sefadeksą G 50 F (Farmacia). Filtravimui skirta kolonėlė, kurios diametras 25,2 cm ir aukštis 120 cm, perplaunama 60 l 50 mM amonio hidrokarbonato tirpalo, kurio pH 8,6. 50 mM amonio hidrokarbonato tirpalas gaminamas iš 3,95 g amonio hidrokarbonato ir 1000 ml vandens. Po to, visas baltymo tirpalas (1200 ml) supilamas ant gelio sluoksnio, palaukiama kad susigertų ir plaunama reguliuojančiu buferiu. Frakcijos maždaug po 1000 ml surenkamos frakcijų kolektoriumi (LKB 2211 Suprec) maždaug 15 min. bėgyje; tai atitinka 80 ml/min. srauto greitį. Eliuavimo charakteris registruojamas saviraščiu LKB 2210, esant registravimo greičiui 0,5 mm/min., o absorbcija nustatoma prietaisu LKB 2238 UVICOR SII, esant $\lambda=280$ nm. Eliuavimo charakteris, kaip parodyta 1 brėž., turi tris pikus: pirmasis atitinka ribonukleazės polimerus, antrasis - dimerus ir paskutinis - fermento monomerinę formą. 1 brėž. stora linija atvaizduotas ribonukleazės tirpalų absorbcijos charakteris, esant jautresniam detektavimui, negu atvaizduota plona linija.

Po to, ribonukleazių mišinys atskirose frakcijose analizuojamas, panaudojant SDS-PAGE elektroforezę pagal Thomas ir kt. PNAS, 72, 2626 (1975) metodiką. Pagal šią

metodika, 50 μ l kiekvienos frakcijos sumaišoma su 50 μ l dengiančio buferio ir mišinys šildomas 10 min. 95°C temperatūroje. Po to, 25 μ l gauto mišinio įleidžiama į gelio duobutes. Analizės eigoje kaip standartas naudojamas standartinis baltymų mišinys IV (Merck), kuriame yra molekulinų masių 12300, 30000, 45000, 66200 ir 76000 baltymai. Naudojamas dengiantis buferis susideda iš šių komponentų:

- 10 0,72 g tris-HCl (0,06 M),
- 0,136 g EDTA (III) (5 mM),
- 0,18 g glicerino (10%),
- 5 g SDS, nustatomas pH=7,2 (pridedama 90 ml vandens),
- 10 ml β -merkaptetoetanolio (10%).

15

Gel-elektroforezei atlikti gaminamas 18% skirstantysis gelis, ant kurio uždedama 3,3% koncentruojančio gelio. 18% skirstančiojo gelio tirpalas susideda iš šių komponentų:

20

- 9 g akrilamido,
- 0,045 g bis-akrilamido,
- 0,13 g tris-HCl, kurio pH 8,8 (0,325 M),
- 0,03 g SDS,

25

- 200 μ l 10% amonio persulfato tirpalo,
- 20 μ l TEMED.

3,9% akrilamido koncentruojančio gelio tirpalas susideda iš šių komponentų:

30

- 0,39 g akrilamido,
- 10,4 mg bis-akrilamido,

0,125 g tris-HCl, kurio pH 6,8,
10 mg SDS,
100 μ l 10% amonio persulfato tirpalo,
10 μ l TEMED.

5

SDS-PAGE gaunamas taip. Imama dvi stiklo (20x20 cm) plokštelės, gerai nuvalomos, nuplaunamos etanolium ir padedamos viena ant kitos. Dviem 1 mm storio (ilgis 20 cm, plotis 1 cm) juostelėmis padaromas tarpas tarp plokštelių, kuris bus užpildytas geliu. Skiriančiosios juostelės įtvirtinamos kairiajame ir dešiniajame plokštelių kraštuose. Apatinis kraštas užtaisomas lipnia audinio juostele, ir visi trys kraštai sutvirtinami spaustukais. Kraštai papildomai hermetizuojami 1% agarozės tirpalu. Kai agarozė sukietėja, tarpas tarp plokštelių, pastatytų vertikaliai, užpildomas aukščiau aprašytu skirstančiojo gelio tirpalu, kad liktų maždaug 3 cm iki stiklo plokštelės viršutinio krašto, ir Pastero pipete ant viršaus įleidžiama vandens. Maždaug po 30 min. gelis susipolimerina. Vandens sluoksnis pašalinamas, ir gelio viršus nuplaunamas aukščiau aprašytu koncentruojančio gelio tirpalu.

Po to, likęs tarpas iki pat krašto užpildomas koncentruojančio gelio tirpalu, įstatomos mėginių rinkimo šukos, padarytos iš teflono taip, kad apatinis pavidžio duobutės kraštas būtų 1 cm aukščiau, negu skirstančiojo gelio paviršius. Maždaug po 15 min. koncentruojantis gelis susipolimerina, ir šukos ištraukiamos. Tada nuimama lipni audinio juostelė ir vertikaliai pastatytas gelis prijungiamas prie elektroforezės prietaiso. Buferių kameros užpildomos elektroforezės buferiu (6 g tris-bazės (0,05 M), 28,5 g glicino (0,38 M), 1 g SDS (0,1%) ir 1000 ml H₂O), o duobutės vieną sykį apipurškiamos buferiu. Ribonukleazės dimero mėginiai pašildomi maždaug 10 min. 95°C

temperatūroje su buferiu, ir jais užpildomi konteineris arba duobutės, skirtos mėginiams įvesti.

5 Elektroforezė vykdoma maždaug 4 val., esant 20 mA srovei. Tačiau, jei norima pratęsti elektroforezę, tarkim, per naktį, srovė sumažinama iki 6-8 mA. Judantis frontas tampa matomas, jei į buferinį tirpalą pridedama 0,02% bromfenolio mėlio. Elektroforezė nutraukiama, kai judantis frontas pasiekia viršutinį gelio kraštą.

10 Skirstantysis gelis nupjaunamas, laikomas maždaug 30 min. fiksavimo tirpale ir išblukinamas, laikant 2 val. išblukinimo tirpale, į kurią įeina 400 ml etanolio, 140 ml acto rūgšties ir 2000 ml vandens. Fiksuojantis tirpalas gaminamas, sumaišant 500 ml

15 išblukinančio tirpalo su 12 ml dažo tirpalo, kuriame yra 1 g Kumassi mėlynojo (P 250, Merk), 50 ml vandens ir 50 ml metanolio. Baltymo juostelės tampa matomos, nes jas nudažo aukščiau minėto dažo tirpalas. Baltymų pėdsakų nustatymas, naudojant SDS-PAGE, parodė, kad

20 dimerizuotos ribonukleazės kiekis mėginiuose laipsniškai didėja, bet juose yra ir polimerų.

Visos frakcijos, kuriose pagrindinai yra dimerinė ribonukleazės forma, sujungiamos ir koncentruojamos iki

25 800 ml tangentinio srauto sistemoje (Millipor). Membrinė diafragma vėl plaunama 400 ml tirpalo, praėjusio per membraną, ir rezultate bendras dimero tirpalo kiekis išsilaiko 1200 ml. Gautas tirpalas liofilizuojamas ir laikomas 4°C temperatūroje iki kito

30 etapo. Tirpalas išdalinamas po 200 ml į 500 ml talpos apvaliadugnes kolbas ir liofilizuojamas. Kolbos patalpinamos į skystą azotą ir laikomos rotoriniame garintuve (Hedolf W 60). Po to, kolbos gerai uždaromos ir laikomos 30 min. -30°C temperatūroje. Gautas pro-

35 duktas toliau liofilizuojamas, panaudojant standartines darbo metodikas.

Prieš kitą proceso etapą monomerinė ribonukleazė, nufiltruota pirmajame filtravimo etape, surenkama ir vėl leidžiama į dimerizacijos procesą. Tam tikslui nufiltruotos frakcijos, kuriose pagrindinai yra monomerinės formos ribonukleazė, sujungiamos ir koncentruojamos iki 4 l, panaudojant aukščiau minėtą tangentinio srauto sistemą. Po to, monomerinės frakcijos dimerizuojamos, panaudojant sujungiantį reagentą pagal aukščiau aprašytą metodiką. Sujungus recirkuliuotus monomerus pagal aukščiau aprašytą metodiką, jie vėl filtruojami pagal jau aprašytą metodiką ir vėl gaunama dimerinė forma. Liofilizacijos produktai, gauti pirmajame dimerizacijos procese, sujungiami su produktais, gautais iš recirkuliacinių monomerų.

Norint geriau atskirti dimerus nuo monomerų ir oligomerų, sujungtas liofilizuotos ribonukleazės mišinys, gautas pagal nurodytas operacijas, vėl chromatografuojamas per Sefadeksą G 50F. Chromatografijai naudojama kolonėlė su Sefadeksu G 50F (Farmacia) ir 0,2 M natrio acetato buferis, kurio pH 5. 0,2 M natrio acetato buferis gaunamas, tirpinant 27,22 g natrio acetato trihidrato 1000 ml vandens. Chromatografuojama tomis pačiomis sąlygomis ir ta pačia aparatūra, kaip ir pirmajame filtravimo etape.

Šiuo atveju gautas eliuavimo charakteris pavaizduotas 2 brėž. Diagramoje stora linija pavaizduota ribonukleazės absorbcija, esant didesniam detektavimo jautrumui, negu plona linija parodytu atveju. Esant didesniam detektavimo jautrumui, viduryje parodytas didelis pagrindinis pikas, kuris atitinka dimerą, šalia jo yra tik du silpni antriniai pikai. Fermentų, atrinktų iš pagrindinio piko frakcijų, analizė SDS-PAGE metodu rodo, kad pagrindiniame pike susikaupia didelis

dimerų kiekis, palyginus su pirmojo filtravimo etapo eliuavimo charakteriu.

Pagrindinio piko frakcijos sujungiamos ir koncentruojamos panaudojant tangentinio srauto sistemą. Kad būtų pašalintos druskos, surinktos frakcijos leidžiamos per kolonėlę su Sefadeksu G 25. Kolonėlės diametras - 25,2 cm, aukštis - 65 cm, bazinis tūris - 32 litrai, o kolonėlė dirba, esant 15 l/val. srautui. Visi antrojo filtravimo pagrindinio piko ribonukleazės tirpalai (maksimum 5 litrai) įleidžiami į kolonėlę su Sefadeksu. Druskų pašalinimui naudojamas 50 mM amonio hidrokarbonato buferinis tirpalas. Druskų pašalinimo ciklas trunka 90 min., kurio metu surenkama 5 litrai. Likę ciklo produktai išmetami. Registruojamas eliuavimo charakteris, ir į 5 l talpos šoto kolbą surenkamas vienintelio piko tirpalas. Išvalyto galutinio produkto pavyzdžių pėdsakai atidėti grafike β -merkaptioetanolio redukcijos sąlygomis ir kaip neredukuoti pavyzdžiai. Išvalyto galutinio produkto SDS-PAGE analizė rodo, kad jame yra tik dimerinė ribonukleazės forma.

Kad liofilizuotas baltymas būtų paverstas į farmaciškai tinkamą formą, reikia iš dimerinės ribonukleazės pašalinti endotoksinus. Tam tikslui išvalyti dimerai chromatografuojami per kolonėlę su Detoksigeliu. Kad būtų maksimaliai regeneruojamas ribonukleazės dimeras, reikia naudoti buferius, kurių pH būtų fiziologiniame intervale. Tai pasiekama naudojant druskų tirpalus. Fermento tirpalas įleidžiamas į kolonėlę su Detoksigeliu, kuris gali atskirti iki 1500 EU/ml. Prieš ir po kiekvieno ciklo Detoksigelis regeneruojamas 1% dezoksicholatu ir po to kruopščiai plaunamas vandeniu, kol ištekančiame vandenyje neberandama endotoksino. Kolonėlės tūris - 750 ml (diametras 9,5 cm, aukštis 14 cm), ir kolonėlė užpilama išlyginimui 0,1 M amonio hidrokarbonato tirpalu. Buferinis tirpalas, neturintis

endotoksino, sumaišomas su steriliu vandeniu. 2 l ribonukleazės tirpalo užpilama ant gelio sluoksnio ir paliekama, kol jis susigeria į gelį. Po to, baltymas eliuuojamas išlyginančiu buferiu, ir renkamas į sterilias chemines stiklines. Po to, tirpalas liofilizuojamas sterilioje apvaliadugnėje kolboje.

Endotoksinų kiekis preparate nustatomas, panaudojant diagnostinį rinkinį "Coatest R", gaminamą firmos Kabi-Vitrum, Miunchenas. Analizė paremta amebocitų lizato (LA) aktyvavimu endotoksinais (limulis-test). Aktyvuotas LA atskelia iš chromogeninio substrato (S-2423) geltoną dažą - p-nitroaniliną, ir spalvos pakitimas nustatomas spektrofotometriškai, esant $\lambda=405$ nm, kuris yra endotoksino kiekio matas. Gauta išvalyta dimerinė ribonukleazė, kurioje yra mažiau negu 0,1 ng/ml endotoksino, supilama į apvaliadugnę kolbą ir liofilizuojama. Gautas produktas yra didelio švarumo laipsnio liofilizuoto ribonukleazės dimero tirpalas, kuri galima laikyti, kol prireiks tolimesniam naudojimui.

2 pavyzdys

Fermentinio aktyvumo nustatymas

Dimerinės ribonukleazės, gautos šiame išradime aprašomu būdu, fermentinis aktyvumas gali būti nustatytas pagal Kunitz, J. Gen. Physiol. 24, 15 (1940) aprašytą aktyvumo nustatymo metodiką. Nustatymas paremtas tuo faktu, kad veikiant ribonukleazei ribonukleininę rūgštį, jos absorbcijos spektras UV srityje pasislenka į trumpųjų bangų sritį. 292-305 nm intervale nukleino rūgšties absorbcija mažėja, nes mažėja jos koncentracija dėl ribonukleazės sukeltos nukleino rūgšties hidrolizės. Reakcijos pradžioje šis mažėjimas yra tiesinis, ir jis gali būti panaudotas, kaip fermentinio aktyvumo matas.

Šiuo atveju nukleino rūgšties kiekio mažėjimas buvo matuojamas, kai $\lambda=300$ nm.

Analizė atliekama 25°C temperatūroje, naudojant termostatuojamą kiuvetę, ir visi tirpalai prieš naudojimą buvo termostatuojami 5 min. 25°C temperatūroje. Stebimi spektrofotometro parodymai, kai $\lambda=300$ nm. Reakcijos tūris buvo 3 ml, reakcija vykdoma 3 ml talpos kiuvetėje, kurios sluoksnio storis yra 1 cm.

10

Reakcijos mišinys ruošiamas, imant 1,5 ml ribonukleino rūgšties tirpalą, 0,05-0,5 ml tiriamo pavyzdžio, įskaitant ribonukleazės frakcijas, ir pridėdant vandens iki 10 ml. Ribonukleino rūgšties tirpalas gaminamas, ištirpinant 80 mg ribonukleino rūgšties natrio druskos (Boheringer) 50 ml acetatinio buferio. Acetatinis buferis yra 0,1 M buferis, kurio pH 5, gaunamas, sumaišant 0,57 ml ledinės acto rūgšties su apytikriai 80 ml distiliuoto vandens, o pH nustatomas lygus 5 su 0,1 N NaOH tirpalu, po to praskiedžiama iki 100 ml distiliuotu vandeniu ir filtruojama steriliose sąlygose. Tiriamo pavyzdžio, įskaitant ir ribonukleazės dimerus, tirpalai gaminami, tirpinant 5 mg ribonukleazės dimero 5 ml distiliuoto vandens, ir praskiedžiami taip, kad nustatomos hidrolizės greičio reikšmės būtų tinkamame intervale.

Ribonukleino rūgšties ir tiriamojo pavyzdžio tirpalai sumaišomi kiuvetėje ir nukleino rūgšties kiekio mažėjimas sekamas apie 20 min., panaudojant Spectronik 1001 (Bosh and Lomb) spektrofotometrą. Registruojama absorbcija; tiesinis jos kitimas tęsiasi apie 8 minutes. 25°C temperatūroje reakcija vykdoma iki pabaigos; tai užtrunka apie 3 valandas. Po to, tirpalai vėl analizuojami, kad būtų gautos galutinės absorbcijos reikšmės. Matavimas kartojamas du kartus, ir iš gautų rezultatų vedamas vidurkis.

- Fermentiniam aktyvumui išskaičiuoti reikia nustatyti nukleino rūgšties koncentracijos mažėjimą reakcijos pradžioje (E_0) ir gale (E_g) per laiko vienetą, $\Delta E/\text{min.}$, tiesiniame pradiniam intervale. Tiriamo ribonukleazės dimero pavyzdžio praskiedimą reikia parinkti taip, kad $\Delta E/\text{min.}$ neviršytų 0,007. Kontroliniai dydžiai gaunami iš reakcijos mišinio, pagaminto iš ribonukleazės ir vandens, ir juos reikia atimti iš nustatytų dydžių. Fermentiniu vienetu laikomas kiekis fermento, kuriam esant reakcijos tirpale šiomis sąlygomis, substrato, kurio koncentracija yra 25%, kiekio sumažėjimas per minutę sudaro 100% dydžio $E-E_g$. Didžiausia galima sumažėjimo reikšmė, kai matuojama, esant $\lambda=300 \text{ nm}$, lygi $E-E_g$. Santykinis fermento aktyvumas išskaičiuojamas iš šio santykio:

$$\frac{(3 \times \Delta E/\text{min}) \text{ Praskiedimo daugiklis}}{(E_0 - R_g) \times \text{Pavyzdžio tirpalo tūris (ml)}}$$

20

Šio išradimo dimerinės ribonukleazės turėjo didelį fermentinį aktyvumą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išvalyto ribonukleazės dimero gavimo būdas, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš šių
5 stadijų:

- a) ribonukleazės dimero tirpalo gavimo, pridėdant
ribonukleazės monomerą į buferinį tirpalą, kurio pH
reikšmė nustatoma lygi mažiausiai 9;
- 10 b) suberimidato, kaip sujungiančiojo reagento, pridėjimo
į tirpalą, palaikant tirpalo pH lygų mažiausiai 9,
kad ribonukleazės monomerai dimerizuotųsi;
- c) dimerizacijos reakcijos nutraukimo reikiamu momentu,
sumažinant pH reikšmę iki apytikriai 7;
- 15 d) dimerizuotos ribonukleazės tirpalo pirmojo filtravimo
etapo, kuriame tirpalą leidžia per katijonitinę dervą
ir renka frakcijas, turinčias pagrindinai dimerizuotą
ribonukleazės formą;
- e) antrojo filtravimo etapo, kuriame pirmajame filt-
20 ravimo etape surinktas frakcijas leidžia per kati-
jonitinę dervą, ir
- f) didelio švarumo laipsnio dimerinės ribonukleazės
produkto surinkimo iš antrojo filtravimo etapo.

25 2. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad ribonukleazės monomero tirpalo pH
nustato apie 10.

30 3. Gavimo būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad monomerinės ribonukleazės tirpalo pH,
lygų apytikriai 10, nustato pridėdant NaOH.

35 4. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad monomerinės ribonukleazės tirpinimui
naudojamas buferis yra dinatrio hidrofosfato dihidrato
buferinis tirpalas.

5. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad sujungiantįjį reagentą prideda į
ribonukleazės monomero tirpalą, palaikant tirpalo pH
lygų apytikriai 10.
- 5
6. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad suberimidatinis sujungiantysis
reagentas yra dimetilsuberimidatas.
- 10
7. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad dimerizacijos stadiją atlieka kambario
temperatūroje.
- 15
8. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad dimerizacijos stadiją atlieka visą
laiką maišant tirpalą.
- 20
9. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad nutraukia dimerizacijos reakciją,
pridedant HCl.
- 25
10. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad prieš filtravimo etapus
koncentruoja dimerizuotos ribonukleazės tirpalą, panau-
dojant tangentinio srauto sistemą.
- 30
11. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad atlieka pirmąjį filtravimo
etapą, panaudojant susiūtą dekstraną, kaip jonitinę
dervą.
- 35
12. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad ribonukleazės monomero tirpale
yra 40-60 g ribonukleazės monomero ir 4,6 l buferio, o
sujungiančiojo reagento prideda 4-6 g.
13. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad pirmajame filtravimo etape

surinktas frakcijos analizuoja gel-elektroforezės metodu.

5 14. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad pirmajame filtravimo etape
surinktas frakcijos liofilizuoja.

10 15. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad frakcijos, surinktas pirmajame
filtravimo etape, kuriose yra pagrindinai monomerinė
ribonukleazė, vėl leidžia į dimerizaciją.

15 16. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad atlieka antrąjį filtravimo
etapą, panaudojant susiūtą dekstraną kaip jonitinę
dervą.

20 17. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad atlieka antrąjį filtravimo
etapą, esant pH apie 5.

25 18. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad pH nustato antrajame filtravimo
etape, naudojant natrio acetato buferį.

30 19. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad antrajame filtravimo etape
surinktas frakcijos analizuoja gel-elektroforezės
metodu.

20. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad po antrojo filtravimo etapo
atlieka druskų pašalinimą.

35 21. Gavimo būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad druskas pašalina, panaudojant
kolonėlę su susiūtu dekstranu G 25.

22. Gavimo būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad turi papildomą endotoksinų
pašalinimo iš gauto išvalyto ribonukleazės dimero
produkto stadiją.

5

23. Gavimo būdas pagal 22 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad endotoksinius pašalina,
leidžiant per kolonėlę su detoksigeliu.

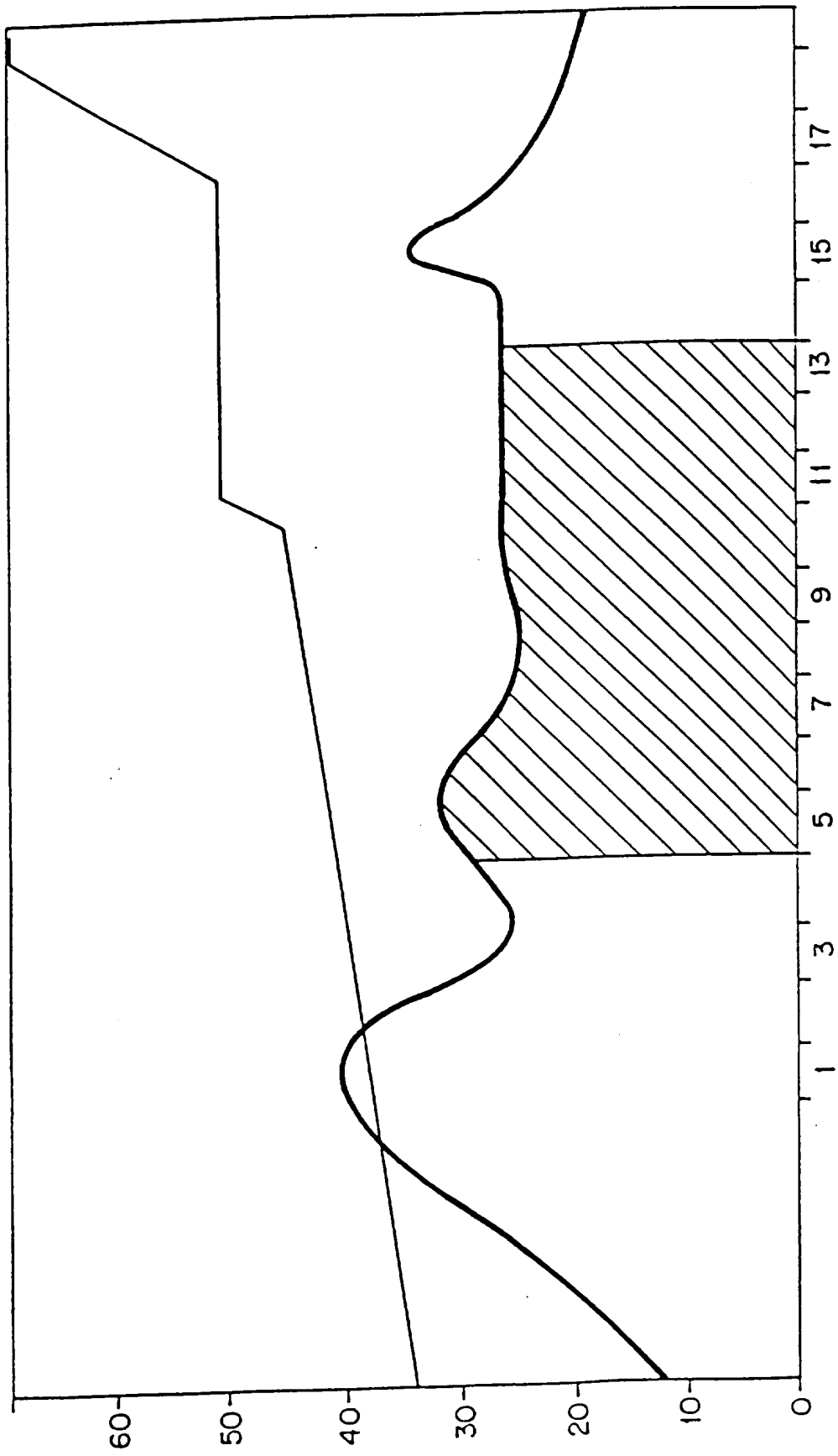


FIG. 1

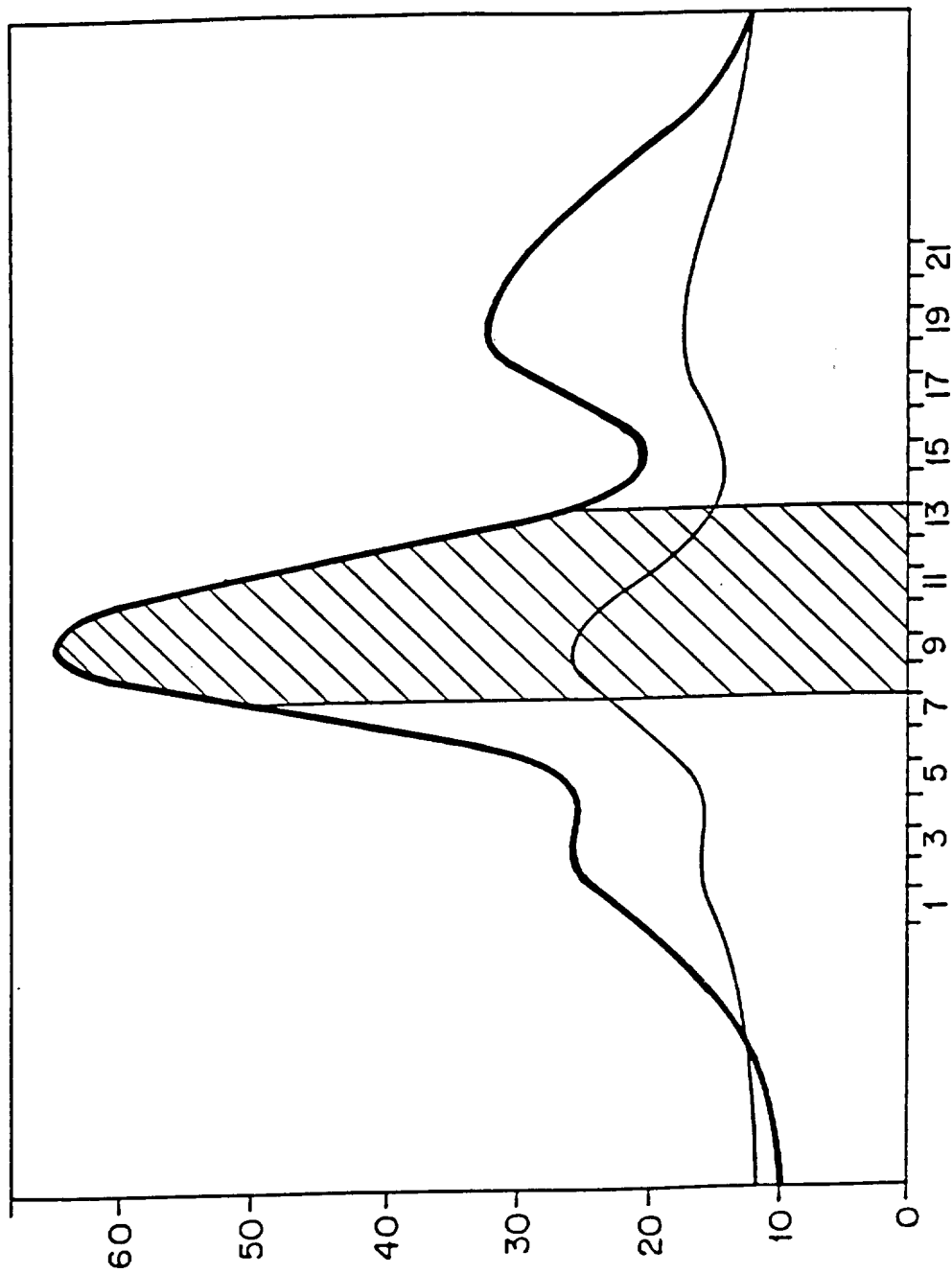


FIG. 2