



(10) **LT 3827 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3827**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 3/20,
A61K 37/02,
B01D 15/04**

(21) Paraiškos numeris: **IP1645**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 03 25**

(60) SU duomenys: **PCT/EP 90/00647, 1990 04 27 SU 5010237, 1991 10 25**

(31,32,33) Prioritetas: **8909836, 1989 04 28, GB**

(72) Išradėjas:
**Alan John Barrett, GB
David John Buttle, GB
Daniel Hulbert Rich, US**

(73) Patent savininkas:
THE BOOTS COMPANY PLC, 1 Thane Road West, Nottingham NG2 3AA, GB

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabalienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
**Chimopapainas, jo farmacinės kompozicijos, chimopapaino valymo būdas,
inhibuojantys peptidai ir afininės chromatografijos matricos**

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susietas su chimopapainu, pagerintomis chimopapainą turinčiomis farmacinėmis kompozicijomis, skirtomis pakenktų, išsikišusių arba turinčių kitą patologiją tarpslankstelių spinalinių diskų gydymui, chimopapaino gavimo būdais, inhibiciniais peptidais ir afininės chromatografijos matricomis, naudojamomis tokių būdų realizavimui, o taip pat su chimopapaino antikūnų kompozicijomis.

Šis išradimas susietas su chimopapainu, jo pagerintomis farmacinėmis kompozicijomis ir žinduolių, turinčių pakenktus, išsikišusius arba turinčius kitą patologiją tarpslankstelinius spinalinius diskus, gydymo būdas, 5
įskaitant pagerintos kompozicijos tirpalo injekcijavimą prie šių diskų. Toliau išradimas susietas su paraiškoje pateikiamo chimopapaino gavimo būdais, peptidais ir afininės chromatografijos matricomis, naudojamomis tokių būdų realizavime, o taip pat su chimopaino antikūnų kompozicijomis. 10

Chimopapainas yra proteinazė, esanti paw-paw (*Carica papaya*) augale. Buvo nustatyta, kad jis gali būti naudojamas klinikinėje praktikoje, būtent, gydant išsmukusius arba išsikišusius diskus arba išialgiją metodu, 15
kuris vadinamas "chemonukleozė" (L. Smith, 1964, J. Amer. Med. Assoc. 187, 137-140).

Pirmą kartą išvalyti ir identifikuoti chimopapainą pabando Jansen ir Bolls (1941, J. Biol. Chem., 137, 405-417), kurie šio fermento gavimui naudojo rūgštinio nusodinimo ir išsūdymo metodus. Vėliau valymui buvo naudojami metodai, besiremiantys jonų mainų chromatografija. Taip, pavyzdžiui, Didžiosios Britanijos patentuose Nr. 2098897 (Smith Laboratories Inc.) ir 25
Nr. 2156821 (Simmons) aprašytas katijonitinių dervų panaudojimas chimopapaino atskyrimui nuo kitų žinomų cisteino proteinazių. Abu šiuose patentuose aprašyti metodai buvo naudojami chimopapaino gavimui pramoniniu būdu. Tačiau buvo nustatyta, kad gautos medžiagos aktyvumas yra santykinai mažesnis už chimopapaino, kuri gavo 30
Buttle ir Barret (1984, Biochem. J., 223, 81-88) nedideliais kiekiais daugiastadijiniu būdu, į kuri įeina būtent katijoninė chromatografija. Nors ši medžiaga pasižymėjo aukštu aktyvumu, tačiau ji buvo gauta su labai žema išeiga, ir šis būdas nėra tinkamas naudoti pramoniniu būdu. Buttle ir kt. (Biochem. J., 1989 35

- liepa, 261, 469-476) nustatė, kad tuo būdu gautas produktas yra užterštas neseniai išskirta ir identifikuota papajos proteinaze IV, kuri eliuuojasi kartu su chimopapainu iš katijonitinių dervų. Naudojant katijonitinę chromatografiją neįmanoma atskirti chimopapaino nuo papajos proteinazės IV iki tokio laipsnio, kad ji būtų galima naudoti chimopapaino, pratiškai neturinčio papajos proteinazės IV, gavimui.
- 10 Literatūroje taip pat yra duomenų apie būdus, kuriuose viena iš stadijų yra afininė chromatografija. Taip Biochem. Biophys. Acta 658, 262-269, 1981 aprašytas chimopapaino valymas, naudojant, šalia kitų metodų, afininę chromatografiją su gyvsidabrio-agarozės kolonėle, o Biol. Chem. Hoppe-Segler, 1988, 369, 733-740 Dubois ir kt. publikavo pranešimą apie cisteino proteinazės išskyrimą iš Carica papaya, panaudojant analogiškus metodus. Šis afininės chromatografijos tipas remiasi gyvsidabrio ligandų, surištu su inertine matrica, sąveika su ant jos užfiksuotų baltymų tiolinėmis grupėmis. To pasekoje visi kiti baltymai, išskyrus chimopapainą, ir būtent kitos cisteino proteinazės, pavyzdžiui, papajos proteinazė IV, gali būti surišti su medžiaga, kuria yra užpildyta kolonėlė, ir po to eliuoti kartu su chimopapainu.
- Neseniai moksliniuose straipsniuose buvo aprašytas afininės chromatografijos su imobilizuotais peptidų dariniais panaudojimas valymui atskirų baltymų, tokių kaip žmogaus katepsinas (Rich ir kt. 1986, Biochem. J. 235, 731-4) ir histolizinas iš Entamoeba histolytica (Luaces ir Barrett, Biochem. J. 250, 903-909). Iki šiol šis metodas nebuvo naudojamas chimopapaino valymui, ir chimopapaino patobulinimo valymo būdo, kurį galima būtų naudoti pramoniniu mastu, sukūrimo problema išlieka aktuali.

Kai kurie sintetiniai peptidų dariniai, kurie yra serino proteinazės chimotripsino inhibitoriai, aprašyti WO 84/00365.

5 Šio išradimo autoriai paruošė pasižyminčio aukštu aktyvumu chimopapaino, neturinčio priemaišų, būtent kitų papajos latekse esančių cisteino proteinazių, įskaitant papajos proteinazę IV, naują valymo ir išskyrimo būdą.

10 Šio išradimo produktas yra praktiškai švarus chimopapainas, turintis didelį šio fermento aktyvios formos kiekį.

Pagal šį išradimą chimopapainas praktiškai neturi imunologiskai skirtingų proteinazių, aptinkamų papajos latekse, ir būtent: papaino, papajos proteinazės III (PPIII) (šios dvi proteinazės aprašytos (Buttle ir Barrett (1984), Biochem. J., 223, 81-88) ir ypatingai neseniai atrastos papajos proteinazės IV (PPIV). Todėl

15 šiame išradime naudojama išsireiškima "praktiškai švarus" reikia suprasti kaip "praktiškai imunologiskai švarus" ir jis reiškia, kad praktiškai nėra kryžminių reakcijų tarp chimopapaino pagal šį išradimą ir specifinių antikūnių, indukuojamų prieš švarią PPIV, kurią

20 išskyrė ir identifikavo Buttle ir kt. (Biochem. J., 1988 liepa, 261, 469-476) ir kuri yra trumpai aprašyta žemiau, o taip pat nėra kryžminių reakcijų su specifiniais antikūniais prieš papainą ir PPIII, kuriuos

25 anksčiau aprašė Buttle ir Barrett (1984) (žr. aukščiau cituotą šaltinį). Reikia atskirai pažymėti, kad taip vadinamas švarus chimopapainas, gautas pagal Buttle ir Barrett aprašytą būdą, turi, kaip tai buvo nustatyta, žymų kiekį PPIV (apie 14%) ir todėl kompozicija, turinti jo indukuotus antichimopapaininius antikūnius,

30 pasižymi specifiškumu kaip ir išvalyto šį išradimą atitinkančio chimopapaino, taip ir išvalytos PPIV at-

žvilgiu. Pagal šią išradimą chimopapainas turi mažiau 0,2%, geriau mažiau 0,1 %, PPIV, PPIII ir papaino.

5 Kryžminė reakcija tarp antigeno ir antikūnio gali būti aptikta įprastiniais žinomais metodais. Prie tokių metodų priklauso, pavyzdžiui, lydalo raketinė imuno-
elektroforezė ir dviguba imunodifuzija (aprašyta Buttle ir Barrett (1984) aukščiau cituotame šaltinyje, vien-
radialinė imuno analizė, radioimunoanalizė (RIA) ir
10 kietafazė imunofermentinė analizė (ELISA).

Paprastai aktyvaus fermento, esančio fermentinėje kompozicijoje, kiekis yra charakterizuojamas jo specifiniu aktyvumu tam tikro substrato atžvilgiu konkrečiose analizės atlikimo sąlygose. Šiame aprašyme naudojamas iš-
15 sireiškimas "specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu" reiškia proteinazinį aktyvumą pikomoliais p-nitroanilino, susidarančio per sekundę vienam mg sauso produkto (pM/s/mg), atliekant analizę standartinėse sąly-
20 gose ir substratu naudojant N- α -benzoil-DL-arginino p-nitroanilidą (BAPNA).

Standartinės analizės sąlygos, kuriomis tiriamos žinomos farmacinės chimopapaino kompozicijos, detaliai
25 aprašytos žemiau skyriuje "BAPNA analizė, I metodika" ir "Analizė Smito metodu".

Šiuo metodu nustatyti specifiniai aktyvumai yra išreiškiami specifinio aktyvumo vienetais BAPNA atžvilgiu
30 (1 mM), esant 37°C ir pH=6,0. Pagal šią išradimą chimopapainas charakterizuojamas specifiniu aktyvumu BAPNA atžvilgiu (1 mM, esant 37°C ir pH=6,0, lygiu 800-1700, geriau 1000-1700, pavyzdžiui, 1200-1500 vnt./mg (atliekant analizę 37°C temperatūroje ir pH=6,0). Pir-
35 menybę turinčiame išradimo realizavimo variante gaunamo chimopapaino specifinis aktyvumas BAPNA (1 mM) atžvilgiu, esant 37°C ir pH=6,0, yra mažiausiai 1300 vnt./mg.

Kadangi gausioje su chimopapainu ir kitomis cisteino proteinazėmis susietoje literatūroje proteinazinis aktyvumas labai dažnai yra išreiškiamas kaip p-nitroanilino, laisvame pavidale išsiskyrusio iš sintetinio BAPNA substrato, kiekis, tai iškyla šiuose darbuose pateiktų specifinio aktyvumo reikšmių betarpiško palyginimo problema. Tikslios reikšmės priklauso nuo eilės faktorių, konkrečiai nuo analizės atlikimo sąlygų, pavyzdžiui pH, temperatūros, buferio sudėties ir naudoto substrato koncentracijos. Buttle ir Barrett (1984, aukščiau cituotas darbas) gauto chimopapaino, pagal šiame darbe pateiktus duomenis, specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu yra $0,154 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ arba $2567 \text{ pM}/\text{s}/\text{mg}$. Tačiau sąlygos, kuriomis analizę vykdė Buttle ir Barrett, skyrėsi nuo žinomos farmacinės kvalifikacijos chimopapaino sąlygų ir todėl tiesiogiai palyginti jų specifinius aktyvumus yra neįmanoma.

Kadangi laikoma, kad Buttle ir Barrett gautas chimopapainas turi didžiausią specifinį aktyvumą iš visų tuo metu žinomų medžiagų, tai pradiniam šio išradimo kūrimo etape analizė buvo atliekama nurodytame darbe aprašytais sąlygomis.

Ši analizės atlikimo metodika toliau vadinama "BAPNA analizė, metodika Nr. 2". Jos pagalba nustatyti specifiniai aktyvumai BAPNA atžvilgiu ($-2,5 \text{ mM}$), esant 40°C ir $\text{pH}=6,8$, šios sąlygos tikrai skiriasi nuo sąlygų, kuriomis atliekama chimopapaino farmacinių kompozicijų analizė. Naudojant šią metodiką gautų rezultatų dydžiai 2-3 kartus viršija dydžius, gautus naudojant įprastą farmacinę BAPNA analizę pagal 1 metodiką, nors žiūrint iš mokslinės pusės rezultatų, gautų dviem skirtingais analizės metodais, palyginimas pasinaudojant paprastu perskaičiavimo koeficientu yra nekorektiškas. Tačiau kaip rodo rezultatai, gauti pradinėje šio išradimo realizavimo stadijoje, ši išradimą atitinkančio chimo-

papaino specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu ($2,5 \mu\text{M}$), esant 40°C ir $\text{pH}=6,8$, yra 3000-4500 ribose, pavyzdžiui, 3500-4500 vnt./mg.

5 Šio išradimo autoriai neseniai publikuotame (1989 m. liepa, žr. aukščiau cituojamą darbą) ir žemiau trumpai aprašytame darbe išvalė ir identifikavo anksčiau nežinomą priemaišą chimopapainę, gautame žinomais būdais, ir būtent papajos proteinazę IV (PPIV). PPIV yra neaktyvi BAPNA atžvilgiu, tačiau pasižymi aktyvumu azokazeino atžvilgiu. Be to, buvo nustatyta, kad vištų cisteino koncentracijos iki 1 mM labai mažai įtakoja PPIV aktyvumą azokazeino atžvilgiu. Tačiau šį išradimą atitinkančio chimopapaino aktyvumas azokazeino atžvilgiu, esant šioms vištų cisteino koncentracijoms, inhibuojamas mažiausiai 95 %. Šiame išradime naudojamas išsireiškimas "aktyvumas azokazeino atžvilgiu" reiškia proteazinį aktyvumą, apibūdinamą kaip sauso svorio vienetui per laiko vienetą susidarantis trichloracto rūgštyje tirpių peptidų produkto kiekis, naudojant derivatizuotą baltyminių substratą azokazeiną standartinėmis analizės sąlygomis, aprašytais žemiau. Šį išradimą atitinkantis chimopapainas geriausiai turi aktyvumą azokazeino atžvilgiu, kuris bent 97 %, geriau 25 98-100 %, yra inhibuojamas vištų cisteinu, kurio koncentracija neviršija $1 \mu\text{M}$.

Šio išradimo autoriai mano, kad jų pareiškiamas chimopapainas yra pirmą kartą gautas praktiškai švarus produktas, neturintis baltymų priemaišų ir turintis didelį kiekį nurodyto fermento aktyvios formos. Šis pasiekimas tapo įmanomu tik suprantant, kad jį užtersiantis baltymas, naudojant žinomus būdus, buvo valomas kartu su chimopapainu, šiam tikslui panaudojant, pavyzdžiui, jonitines ir žinomas afinines kolonėles. Tolimesnių tyrimų pasekoje buvo išskirtas ir identifikuotas šis taršalas, kaip nustatyta PPIV. PPIV ga-

vimui naudotas būdas netinka švaraus chimopapaino gavimui, tačiau PPIV gavimas leido išaiškinti du svarbius parametrus, kurių pagalba gali būti charakterizuojamas švarus chimopapainas. Šie parametrai yra: 1) švaraus chimopapaino kryžminio reakcingumo su specifiniais PPIV antikūniais nebuvimas, 2) švaraus chimopapaino ir PPIV skirtingas aktyvumas azokazeino atžvilgiu, esant vištų cisteinui. Šie du ypatumai yra esminiai faktoriai chimopapaino valymo būdo paruošimui.

Akivaizdu, kad šį išradimą atitinkantis chimopapainas yra beveik visais atžvilgiais pranašesnis už kitus žinomus produktus. Švaraus fermento kompozicijos yra svarbios tyrimams, kurių tikslas yra detalus visų fermento charakteristikų tyrimas, pavyzdžiui, jos sudėtis ir katalizinės savybės.

Toliau šio išradimo objektas yra kompozicija, turinti savo sudėtyje pareiškiamą chimopapainą. Tokioje kompozicijoje praktiškai nėra PPIV. Joje esančio chimopapaino specifinis aktyvumas BAPNA (1 mM) atžvilgiu, esant 37°C ir pH-6, yra 800-1700 vnt./mg. Siūlomos kompozicijos gali būti išleidžiamos kaip atskiros atitinkamo svorio dozės, pavyzdžiui, kaip alikvotiniai chimopapaino kiekiai, hermetizuoti nepatenkant drėgmei, pavyzdžiui, bonkutėse ir ampulėse su išsiurbtu oru. Be to, tokios kompozicijos gali turėti reduktorių, pavyzdžiui, ditiotreitolą, cisteiną laisvos bazės arba jo rūgšties konjugacinės druskos pavidale, kurių paskirtis yra užkirsti kelią fermento aktyvumo sumažėjimui dėl oksidacijos. Pagal kitą variantą siūlomos kompozicijos gali toliau turėti cisteino proteinazės grįžtamą inhibitorių druskos pavidale, pavyzdžiui, natrio tetrationatą arba gyvsidabrio chloridą. Tokie grįžtami inhibitoriai blokuoja fermento aktyvius centrus, dėka to užkertamas kelias fermento aktyvumo sumažėjimui, šiuo atveju oksiduojasi reduktorius, kuris reaktyvuoja fer-

mentą. Kiti įprastiniai priedai, kurie norint gali
įeiti į kompozicijos sudėtį, yra, pavyzdžiui, konser-
vantai, konkrečiai, natrio bisulfitas, kompleksonai,
konkrečiai EDTA, ir nešėjai, konkrečiai, natrio chlo-
ridas.

Švaraus fermento kompozicijos konkrečiai turi didelę
reikšmę chimopapaino klinikiniam naudojimui, pavyz-
džiui, esant chemonukleozei, kadangi, kaip rodo lite-
ratūriniai duomenys, naudojant šį gydymo metodą pas 3 %
pacientų gali atsirasti alerginės reakcijos. Miltelių
pavidalo papajos ekstraktas plačiau naudojamas maisto
pramonėje, ir laikoma, kad daugelis chemonukleozei
alerginių reakcijų atsiranda dėl priešsensibilizacijos
tokiomis kompozicijomis. Tačiau gerai žinoma, kad sve-
timkūnių baltymų antigenų injekcija žinduoliams visada
yra pavojinga dėl galimo anafilaktinio šoko. Medi-
cininėje praktikoje priimta naudoti labiausiai švarius
ir labiausiai aktyvius iš turimų baltyminių preparatų,
tai leidžia pasiekti optimalų procedūros efektą ir iki
minimumo sumažinti alerginių reakcijų riziką.

Todėl šio išradimo objektas taip pat yra farmacinė
kompozicija, turinti savo sudėtyje pareiškiamą chimo-
papainą. Siūlomoje kompozicijoje praktiškai nėra PPIV.
Jos sudėtyje esančio chimopapaino specifinis aktyvumas
BAPNA (1 mM) atžvilgiu, esant 37°C ir pH=6, yra 800-
1700 vnt/mg. Siūloma farmacinė kompozicija be to geriau
turi farmaciškai netoksišką reduktorių, tokį kaip cis-
teinas, laisvos bazės arba rūgšties konjugacinės drus-
kos pavidale, pavyzdžiui, L-cisteino hidroklorido mo-
nohidratą. Paprastai kompozicijoje reduktoriaus kiekis
yra apie 0,5-3 mg 4000 chimopapaino vienetų, tai ati-
tinka, pavyzdžiui, 15-90 svorio %, skaičiuojant chimo-
papainui. Šį išradimą atitinkančiose farmacinėse kompo-
zicijose, be to, gali būti bet koks įprastinis far-
maciškai priimtinas skiediklis, užpildas arba nešėjas,

pavyzdžiui, konservantai, konkrečiai natrio bisulfitas, kompleksonai, konkrečiai EDTA, ir nešėjai, konkrečiai natrio chloridas.

5 Farmacinės kompozicijos, turinčios šią išradimą atitinkanti chimopapainą, gali būti naudojamos oftalmologijoje, pavyzdžiui, gydant akių ligas arba chirurgiškai apdorojant audinius, pavyzdžiui, nudegimo žaizdas, opas, nekrozės pasekoje atmirusius audinius, pragulas
10 ir kitas žaizdas su audinių atmirimu. Paprastai tokios kompozicijos yra išleidžiamos vietinio panaudojimo formoje, pavyzdžiui, sterilių tirpalų, gelių, suspensijų arba tepalų pavidale, kurie gali būti naudojami betarpiškam žaizdų apdorojimui arba užnešami ant žaizdų per
15 jais sumirkytus raiščius.

Šią išradimą atitinkanti chimopapainą geriausia naudoti kompozicijų jo pagrindu paruošimui ortopediniams tikslams. Paprastai tokios farmacinės kompozicijos yra iš-
20 leidžiamos vienkartinėmis dozėmis, skirtų parenteraliniam įvedimui, pavidale, pavyzdžiui, sterilių, neturinčių pirogenų, tirpalų arba suspensijų tinkamame nešėjuje pavidale, arba koncentratų, tinkamų rekonstruoti prieš vartojimą, pavidale. Atskirų dozių pavidalo kompo-
25 zicijose, tinkamos patologinių arba pažeistų tarpslankstelinio diskų pulpozinių branduolių ištirpinimui arba gydymui, įvedant jas į šiuos diskus, gali turėti 500-5000 BAPNA vienetų (analizė atliekama, esant BAPNA koncentracijai 1 mM, 37°C temperatūrai ir pH=6) išra-
30 dimą atitinkančio chimopapaino ir reduktorių, pavyzdžiui, natrio cisteinato hidrochloridą, kurie yra atskiroje ampulėje. Pirmenybę turinti vienkartinė dozė turi 2000 arba 4000 BAPNA vienetų (1 mM BAPNA, 37°C, pH=6) chimopapaino. Atskiroje dozėje gali būti, pavyz-
35 džiui, 2-5, geriau 2,5-3,5 mg chimopapaino ir 0,2-3, geriau 1,0-2,0 natrio cisteinato hidrochlorido, esant

norui, mišinyje su tinkamu nešėju, pavyzdžiui, natrio chloridu, kurie yra atskiroje ampulėje.

- 5 Žemiau aprašytų eksperimentų eigoje buvo rasti 26 pavyzdžiai individualių serumų, turinčių natūraliu būdu
- 10 igtų IgE antikūnių prieš išleidžiamą chimopapaino kompoziciją Chymodiactin^R, kuri gaunama pagal Didžiosios Britanijos patente Nr. 2098997 aprašytą būdą. Šiuose bandymuose eksperimentiškai parodyta, kad šiuose
- 15 serumuose yra IgE antikūniai prieš išradimą atitinkanti chimopapainą, o taip pat prieš tris kitas cisteino proteinazes, rastas papajos latekse, būtent, papainą, PPIII ir PPIV. Tačiau vidutiniai IgE kiekiai, rasti chimopapaine, PPIII ir PPIV, liudija apie tai, kad
- 20 PPIII ir PPIV, kartu paėmus, yra atsakingi už 75% rasto IgE. Iš šių rezultatų nenuginčijamai seka, kad nurodyti baltymai turi esminį imonogeninį charakterį ir gali sudaryti didžiąją dalį antigeninių determinančių, esančių šiuo metu išleidžiamose chimopapaino kompozicijose, ir suteikia nepaprastai plačias antigenines galimybes. Todėl ši išradimą atitinkančios farmacinės kompozicijos turi didelius privalumus prieš žinomas kompozicijas.
- 25 Šio išradimo chimopapainas taip pat yra skirtas chemonukleoze pažeistų, išsikišusių arba turinčių kitus susirgimus žinduolių tarpslankstelinį spinalinių diskų gydymui.
- 30 Šis išradimas taip pat susietas su chimopapaino valymo būdu, kuris apima:

- 35 a) vandeninio neapdoroto chimopapaino inkubaciją su afininės chromatografijos matrica su aktyviais centrais, kuri turi pagrindą, kuris yra kovalentiškai surištas, esant reikalui, per speiserinę grupę su chimopapainą grįžtamai inhibuojančio peptido galiniu N

atomu: to pasekoje nurodytas peptidas susijungia su chimopapaino molekulės aktyviu centru, ir

b) chimopapaino eliuavimą tinkamu eliuentu.

5

Neapdirbtu chimopapainu, naudojamu kaip pradinė medžiaga chimopapaino valymui pagal šį išradimą, gali būti šviežio papajos latekso ekstraktas, tirpalas, gautas iš pramonėje gaminamo latekso po džiovinimo išpurškimu, 10 papaino koncentratas arba iš dalies išvalytas chimopapainas, o taip pat gaminamo preparato, taip vadinamo "švaraus % chimopapaino tirpalas". Tačiau specialistai puikiai supranta, kad turintys labai sudėtingą sudėtį papajos ekstraktai, pavyzdžiui, papajos 15 lateksas, turi didokus kiekius kitų komponentų, kuriuos pageidautina pašalinti iš jų. Geriausiai pagrindinių tokių komponentų kiekį pašalinti iki neapdirbto chimopapaino tirpalo inkubacijos su afininės chromatografijos matrica, tam naudojamas filtravimas arba cent- 20 rifugavimas, kurių pagalba yra pašalinama netirpi medžiaga. Tačiau mes nustatėme, kad efektyvesnis yra rūgštinis nusodinimas, kuri atliekant nusėda pagrindinis priemaišų kiekis.

25 Rūgštinio nusodinimo procedūra, kai neapdirbto chimopapaino tirpalo pH sumažina iki 2 ir duoda tirpalui pastovėti, o po to atskiria chimopapaino tirpalą, chimopapaino valymui naudojama jau 50 metų. Visai netikėtai šio išradimo autoriai nustatė, kad pH reikšmė, 30 kuri nustatoma atliekant šį procesą, turi lemiamos įtakos gaunamo chimopapaino tirpalo užterštumui PPIV. Kaip parodė šio proceso, į kuri anksčiau buvo žiūrima kaip į išankstinę chimopapaino grubaus valymo stadiją, tyrimas, kruopštaus dozavimo ir kontrolės pasekoje ryškiai sumažėja PPIV priemaišos kiekis, baltymo, kuris, 35 kaip dabar nustatyta, naudojant įprastus būdus yra va-

lomas kartu su chimopapainu. Tuo būdu šio išradimo objektas yra chimopapaino valymo būdas, apimantis

5 1. nusodinimą iš vandeninio mišinio, turinčio neapdirbtą chimopapainą, esant pH 1,2-1,8;

2. neapdirbto chimopapaino vandeninio tirpalo atskyrimą nuo šio mišinio; ir

10 3. neapdirbto chimopapaino tirpalo neutralizavimą ir, esant norui, išsūdymą.

Geriausiai iš tokios kompozicijos pašalinti visas joje likusias baltymų priemaišas, įtraukiant į valymo procesą bent vieną įprastos jonitinės chromatografijos stadiją, kaip tai yra aprašyta pas Buttle ir Barrett, 15 1984 (žr. anksčiau cituotą publikaciją). Tam tikslui geriausia naudoti, būtent paskutinei stadijai, aukštos skiriamosios galios chromatografiją, pavyzdžiui FPLC^R (skystinę baltymų ekspres-chromatografiją) su tokia katijonitine derva, kaip turinčia prekybinį pavadinimą Mono-S arba S-Sepharose^RHP (Pharmacia).

25 Pagal pirmenybę turintį variantą išradimo objektas yra chimopapaino valymo būdas, apimantis

I) nusodinimą vandeninio mišinio, turinčio neapdirbtą chimopapainą, esant pH reikšmei, žemesnei už 2,0;

30 II) neapdirbto chimopapaino vandeninio tirpalo atskyrimą nuo nurodyto mišinio;

III) neapdirbto chimopapaino tirpalo neutralizavimą ir, esant norui, išsūdymą;

35

IV) III stadijoje gauto tirpalo inkubaciją su afininės chromatografijos matrica su aktyviais centrais, kuri

turi pagrindą, kuris yra kovalentiškai surištas, esant norui per speiserinę grupę, su chimopapainą grįžtamai inhibuojančio peptido galiniu azoto atomu, to pasekoje peptidas susijungia su chimopapaino molekulės aktyviais centrais; ir

V) chimopapaino eliuavimą tinkamu eliuentu.

Specialistui akivaizdu, kad nurodytą pirmenybę turinčią katijonitinės chromatografijos stadiją galima vykdyti alternatyviai arba papildomai prieš arba afininės chromatografijos stadiją.

Vandeninis mišinys, turintis neapdirbtą chimopapainą, gali turėti savo sudėtyje, pavyzdžiui, šviežią papajos lateksą, papajos lateksą, išdžiovintą išpurškimo džiovvykloje, arba papaino koncentratą (pavyzdžiui, išpurškimo džiovvykloje išdžiovintą lateksą, kuri gamina firma Powell and Scholefield, Didžioji Britanija arba Siebels, JAV) suspenduotą vandenyje arba vandeniniame buferyje, pavyzdžiui, fosfatiname arba acetatiname. Prieš rūgštinį nusodinimą geriausia yra pašalinti mišinio visą joje netirpią medžiagą, tam yra naudojamas įprastas būdas, pavyzdžiui, filtravimas arba centrifugavimas. Tam, kad sumažinti terpės pH iki 1,0-2,0, geriau iki 1,2-1,8, dar geriau iki maždaug 1,5, ją galima parūgštinti palaipsniui pridedant organinę arba neorganinę rūgštį, geriau vandeninį neorganinės rūgšties tirpalą, konkrečiai druskos rūgšties tirpalą. Nusodinta medžiaga gali būti pašalinta įprastu būdu, pavyzdžiui, filtruojant arba centrifuguojant. Buvo nustatyta, kad gautas rūgštus neapdirbto chimopapaino tirpalas turi žymiai mažiau PPIV, papaino ir mažiau PPIII.

Bet kuriam specialistui suprantama, kad prieš vykdant vėlesnę chromatografinio valymo stadiją, rūgštų neapdirbto chimopapaino tirpalą reikia neutralizuoti šar-

miniu reagentu, pavyzdžiui, vandeniniu natrio hidroksido tirpalu, ir geriausia iš jo pašalinti druskų perteklių, pavyzdžiui, naudojant gel-filtravimo arba dializės būdus. Bet kokios tuo būdu susidariusios nuosėdos gali būti pašalintos filtruojant arba centrifuguojant.

Gera žinoma, kad cisteino proteinazių aktyvumas gali būti apčiuopiamai padidintas aktyvuojant jas reduktoriumi, pavyzdžiui, ditioneitolu arba cisteinu, o taip pat išvalant jas nuo tokių sunkiųjų metalų, kaip gyvsidabris, pėdsakų, panaudojant kompleksonus, pavyzdžiui EDTA, arba chlatinėmis savybėmis pasižyminčias dervas, pavyzdžiui, prekybinį pavadinimą Chelex (firma Bio-Rad, Didžioji Britanija) turinčią dervą. Tokių priemonių pagalba pavyksta pasiekti optimalų kiekį laisvų tiolilinių grupių, kurios, kaip yra žinoma, cisteino proteinazių aktyvių centrų skiriamasis bruožas, o jų buvimas yra būtinas paskutiniųjų aktyvumo pasireiškimui. Geriausiai sunkiųjų metalų priemaišos pašalinamos dializuojant buferyje, kuriame yra EDTA. Pagal kitą variantą (naudojant katijonitinę chromatografiją) sunkiųjų metalų pašalinimui galima įvykdyti chimopapaino aktyvavimą, panaudojant reduktorių. Šiuo atveju chimopapainas susijungia su katijonitine derva ir po to yra išplaunamas iš kolonėlės. Norint gauti maksimalų aktyvių centrų kiekį, neapdoroto chimopapaino tirpalą, gautą po neutralizacijos, apdorojant reduktoriumi, pavyzdžiui, cisteinu, ir praskiedžia iki reikiamos baltymo koncentracijos, pavyzdžiui, iki 30 g/l koncentracijos. Po to neutralizuotas neapdoroto chimopapaino tirpalas yra inkubuojamas su šiais aktyviams centrams jautria afininės chromatografijos matrica, to pasekoje chimopapainas per aktyvius centrus specifiskai susijungia su inhibuojančia matricos peptidine jungtimi. Chimopapaino tirpalą per afininės chromatografijos kolonėlę su matrica galima leisti, pavyzdžiui, 35-40 ml/val/cm² greičiu. Vienas litras afininės

chromatografijos matricos gali surišti maždaug 1-4 g chimopapaino.

5 Afininės chromatografijos matrica turi pagrindo matri-
cą, pavyzdžiui, gelio arba membraninę matricą, su kuria
yra kovalentiškai susijungęs, ir tuo būdu imobili-
zuotas, inhibitorinis peptidas. Geriausia pagrindo mat-
rica yra agarozės gelis, pavyzdžiui gelis, išleidžiamas
10 prekybiniu pavadinimu Sepharose^R (Pharmacia), nors gali
būti vartojamos ir derivatizuotos celiuliozinės membra-
ninės matricos, pavyzdžiui matricos, išleidžiamos pre-
kybiniu pavadinimu Zeta (Anachem). Peptido galinis
azoto atomas gali būti susijungęs su pagrindo matrica
arba betarpiškai, arba per speiserinę grupę, pavyz-
15 džiui, speiserinę grupę iš devynių anglies atomų, kaip
tai yra pirmenybę turinčios gelio matricos, kuri
išleidžiama prekybiniu pavadinimu ECH Sepharose^R
(Pharmacia) atveju. Ryšys tarp šios gelio matricos
karboksilinių grupių ir inhibitorinio peptido laisvomis
20 amino grupėmis, ko pasekoje susidaro peptidinis ryšys,
gali būti gautas įprastu būdu, pavyzdžiui, konden-
sacijos būdu, kuri vykdoma esant rūgštiniam katali-
zatoriui, ir kurios vyksmui padeda vandenyje tirpaus
karbodiimido, pavyzdžiui N-etil-N'-(3-dimetilaminopro-
25 pil)karbodiimido hidroklorido (EDC), priedas. Papras-
tai prijungimo reakcija yra vykdoma vidutiniškai mai-
šant gelio matricą su inhibitorinio peptido tirpalu,
esant EDC, pavyzdžiui, 24 valandas kambario tempe-
ratūroje. Santykis tarp reagentų gali būti, pavyzdžiui,
30 3-4 g peptido 1 litrui gelio.

Afininės chromatografijos matrica gali būti įdėta į
kolonėlę prieš naudojimą. Tačiau naudojant gelio mat-
ricą kaip chromatografijos matricą, inkubaciją galima
35 vykdyti ir periodiniu būdu ir, esant norui, įdėti mat-
ricą į kolonėlę, norint po to eliuuoti fermentą. Prieš
naudojimą geriausia matricą kruopščiai praplauti van-

deniniu buferiu, norint pašalinti nesurišto peptido ir katalizatoriaus pėdsakus. Vykdamt procesą pramoniniu būdu, koloną su afininės chromatografijos matrica geriausia apdoroti sanitariškai in situ, pavyzdžiui, vandiniu etanolio tirpalu, ir tuo būdu padaryti ją tinkama pakartotiniam panaudojimui.

Peptidai, grįžtamai inhibuojantys chimopapainą, yra peptidai, kurie, būdami imobilizuoti ant pagrindo matricos, sugeba susijungti su aktyviais chimopapaino centrais stipriau, negu su kitų cisteinų, esančių neapdoroto chimopapaino preparatuose, konkrečiai PPIV, aktyviais centrais, tačiau kurie po to gali būti išstumti iš šių centrų. Tinkamiausia inhibitorinių peptidų grupė yra aminorūgštys su galiniais anglies atomais, turinčiais tokius aldehydinius darinius, kaip semikarbazonai, fenilalanino metoksiiminai arba oksimai, arba jo analogai. Labiausiai tinkamos aminorūgštys su galiniais anglies atomais yra tokie fenilalanino dariniai, kaip D arba L-fenilalanino semikarbazonai (PheSc), metoksiiminai (PheMo) arba oksimai (PheOx), arba tokie fenilalanino alanogų dariniai, kaip D arba L-alaninsemikarbazonai (AlaSc), D arba L-cikloheksilalaninsemikarbazonai (ChaSc), arba D arba L-leucinsemikarbazonai (LeuSc). Buvo nustatyta, kad kaip chimopapainą inhibuojantys peptidai, su pasisekimu gali būti naudojami šie dipeptidai su galiniu anglies atomu: L-Ala-L-PheSc, L-Ala-D-PheSc, L-Phe-D-PheSc, L-Phe-L-PheSc, L-Phe-L-PheMo, L-Phe-L-PheOx, L-Tyr-L-PheSc, L-Ala-L-ChaSc ir L-Ala-L-LeuSc. Dipeptidą L-Phe-L-PheSc aprašė Luaces ir Barrett (1988), 250, 903-909. Pirmybę turintys peptidai yra, konkrečiai, dipeptidai, ypač L-Ala-L-PheSc, L-Ala-D-PheSc ir L-Phe-D-PheSc. Savime patys inhibuojantys peptidai ir naujos afininės chromatografijos matricos, turinčios šiuos peptidus, taip pat yra šio išradimo objektas.

Prieš eliuuojant chimopapainą iš afininės chromatografijos matricos, geriausia praplauti ją, norint pašalinti nespecifiškai surištą medžiagą. Praplaunama, pavyzdžiui, vandeniniu buferiu, pavyzdžiui, acetatiniu buferiu su pH 4-5. Buvo nustatyta, kad į plovimui arba eliuavimui naudojamą buferį tikslinga yra pridėti reagentus, kurie neleidžia vykti hidrofobinėms sąveikoms ir kitoms nespecifinėms jungimosi reakcijoms tarp matricos ir neapdorotame chimopapaine esančių komponentų. Tokie reagentai yra, būtent, EDTA, izopropanolis ir etandiolis.

Po to surištą chimopapainą gali būti eliuotas iš matricos, panaudojant tinkamą eliuentą, kuris suardo ryšį tarp imobilizuoto inhibuojančio peptido ir su juo susijungusio chimopapaino, sumažindamas aktyvių centrų giminingumą inhibuojančiam peptidui, tai gali būti pasiekta, pavyzdžiui, pakeičiant aktyvių centrų charakteristikas, panaudojant tokią denatūruojantį agentą, kaip izopropanolį, arba eliuentą, kurio pH yra žemiau ar aukščiau pH intervalo, kuriame vyksta chimopapaino surišimas. Tačiau, reikia pažymėti, kad tam tikslui tinkami eliuentai yra tik tokie, kurie neiššaukia chimopapaino negrižtamo inaktyvavimo. Pagal kitą variantą chimopapainas gali būti selektyviai išstumtas iš imobilizuoto inhibuojančio peptido panaudojant eliuentą, kuriame yra perteklius komponento, patvariai susijungiančio su inhibuojančiu peptidu. Tuo būdu šiuo komponentu gali būti, pavyzdžiui, kita cisteino proteinizė.

Tačiau pagal pirmenybę turintį šio išradimo realizavimo variantą toks eliuentas turi cisteino proteinizės grįžtamą inhibitorių, kuris konkurentiškai susijungia su chimopapaino aktyviais centrais ir tuo būdu išstumia jį iš imobilizuoto inhibuojančio peptido. Tinkami yra žinomi inhibitoriai, pavyzdžiui, tokie nedidelės mole-

kulinės masės disulfidai, kaip 2,2'-dipiridilsulfidas, oksietildisulfidas, metil-2-piridildisulfidas ir natrio tetrathonatas, o taip pat tokie gyvsidabrio reagentai, kaip gyvsidabrio chloridas, p-chlormerkurilbenzoatas ir mersalilas. Specialistui akivaizdu, kad chimopapaino giminingumas imobilizuotam inhibitoriniam peptidui priklausys nuo naudojamo peptido prigimtės, pH, joninės jėgos ir eliuavimui naudojamo buferio sudėties, o taip pat nuo temperatūros. Todėl, priklausomai nuo šių parametų, keisis chimopapaino eliuavimui naudojamos inhibuojančios proteinazės ir prigimtis, ir koncentracija. Toliau reikia pažymėti, kad gyvsidabrio reagentų atveju pusiausvyrinė būseną su surištu chimopapainu nusistovi greičiau, negu disulfidinių reagentų atveju, ir todėl tokius inhibitorius galima naudoti eliuavimo vykdymui nepertraukiamu metodu. Naudojant inhibitorius, kurių pusiausvyros su surištu chimopapainu susidarymas yra lėtas, prieš chimopapaino eliuavimą gali prireikti matricos su inhibitoriumi, pavyzdžiui, 1-2 arba daugiau valandų inkubavimo. Tačiau baltymo kiekis ir proteinazės aktyvumas eliuato frakcijoje gali būti kontroliuojamas įprastu būdu, efektyviam ir selektyviam chimopapaino išstūmimui iš matricos galima keisti joninę jėgą arba eliuanto prigimtį ir matricos su inhibitoriumi inkubavimo trukmę.

Eliuento frakcijos su žemu baltymo kiekiu arba su žemu chimopapaino aktyvumu po to gali būti atmestos.

Tam, kad būtų susilpninta chimopapaino ir inhibitorinio peptido tarpusavio sąveika, eliuento pH geriau palaikyti pakankamai žemame lygyje, pavyzdžiui, 4-5 ribose, geriausia kad pH būtų lygus 4,5. Buvo nustatyta, kad tinkami eliuantai yra, pavyzdžiui, oksietildisulfidas (100 mM) vandeniniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM) ir kurio pH=4,5; dipiridilsulfidas (30 mM) vandeniniame etan-

diolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM) ir kurio pH=4,5; metilpiridildisulfidas (30 mM) vandeniniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM) ir kurio pH=4,5; mersalilo rūgštis (10 mM) vandeniniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio hidroksidą (50 mM) ir EDTA (25 mM) ir kurio pH nustatomas acto rūgšties pagalba iki 4,5; ir gyvsidabrio chloridas (10 mM) vandeniniame etandiolio tirpale, turinčiame natrio acetatą (50 mM) ir kurio pH=4,5). Geriausiu grįžtamu proteinazės inhibitoriumi yra gyvsidabrio chloridas.

Afininė chromatografija, naudojama pirmenybę turinčiame būdo realizavimo variante pagal šią išradimą chimopapaino valymui, žymiai padidina chimopapaino specifinį aktyvumą, kuris nustatomas kaip aktyvumas BAPNA atžvilgiu, arba titruojant reagentų aktyvius centrus E-64 arba jodacto rūgštimi. Aktyvi chimopapaino forma yra surišama pirmiausia ir eliuuojasi, ir tuo būdu skiriasi nuo neaktyvios formos ir kitų cisteino proteinazių, esnčių pradiniam produkte. Šią išradimą atitinkantis šviežiai pagamintas chimopapainas, išvalytas panaudojant afininę chromatografiją, paprastai turi ne mažiau 70, geriau ne mažiau 80, geriausia ne mažiau 90 % aktyvaus fermento.

Paprastai išvalytą chimopapainą prieš laikymą arba naudojimą išskiria iš eliuato. Tinkamiausiu atveju eliuotą chimopapainą papildomai valo, kad iš aktyvių fermentų centrų būtų išstumtas cisteino proteinazės inhibitorius. Inhibitorius gali būti išstumtas pridėdant reduktoriaus, pavyzdžiui, cisteino, perteklių, ir po to, esant norui, pašalintas įprastais būdais, pavyzdžiui, gel-filtravimu arba dialize. Pagal kitą variantą inhibitorius gali būti pašalintas adsorbcijos ant tam tikros dervos būdu. Taip, pavyzdžiui, nedidelės

- molekulinės masės disulfidai gali adsorbuotis ant afininės chromatografijos galiutaciono kolonėlės, o gyvsidabrio reagentai - ant dervų, pasižyminčių kompleksinančiomis savybėmis. Pagal pirmenybę turintį variantą
- 5 inhibitorių pašalina aktyvuojant fermentą reduktoriumi, pavyzdžiui cisteinu, kuris katijonitinėje kolonėlėje yra surištame būvyje, ir po to išplaunant inhibitorių iš kolonėlės.
- 10 Tinkamiausiu atveju išskirtą išvalytą chimopapainą prieš laikymą liofilizuoja, pavyzdžiui, sublimacinio džiovinimo būdu.
- Ši išradimą atitinkančio chimopapaino charakteristikos
- 15 gali būti nustatytos žinomais metodais. Tokiems metodams priklauso, pavyzdžiui, aminorūgščių analizė (aminorūgščių su galiniu azoto atomu); aktyvių centrų titravimas reagentu E-64 (arba jodacto rūgštimi ir tuo pačiu metu inaktyvavimo greičio nustatymas; elekt-
- 20 roforezė natrio dodecilsulfate arba daugiazoninė kationinė elektroforezė poliakrilamido gelyje, o taip pat aktyvumo nustatymas įvairių proteinazių substratų atžvilgiu.
- 25 Ši išradimą atitinkantys nauji inhibitoriniai peptidai gali būti gauti analogiškais žinomais metodais. Taip, pavyzdžiui, dipeptidų dariniai gali būti gauti daugiaetadidinės sintezės keliu šiuo būdu:
- 30 a) galinis aminorūgšties (pirmos aminorūgšties) anglies atomas, kuris po to turi tapti inhibuojančio peptido galiniu C atomu, gali būti apsaugotas, pavyzdžiui, reaguojant su O,N-dimetilhidroksilamino hidrochloridu, esant izobutilchloroformiatui ir N-metilmorfolinui;
- 35 reakcijos pasekoje susidaro dimetilhidroksiamido darinys. Geriausia, kad pirmosios aminorūgšties galinis

atomas pradžioje būtų apsaugotas, pavyzdžiui, tretiniu butoksikarbonilu.

5 b) apsaugota pirmoji aminorūgštis, pavyzdžiui, jos dimetilhidroksamido darinys, gali po to reaguoti su stipria, pavyzdžiui, trifluoracto, rūgštimi, susidarant ketvirtinei amonio druskai.

10 c) po to apsaugota pirmosios aminorūgšties ketvirtinė amonio druska gali reaguoti su antrosios aminorūgšties dariniu, pavyzdžiui, su N-karbobenzoksi-dariniu, susidarant dipeptido dariniui;

15 d) gautas dipeptido darinys gali būti suredukuotas, reaguojant jam su švelniu reduktoriumi, pavyzdžiui, diizobutilaliuminio hidridu arba ličio aliuminio hidridu, susidarant laisvai aldehidinei grupei prie dipeptido galinio anglies atomo;

20 e) gautas aldehidas gali būti paverstas, pavyzdžiui, į semikarbazoną, reaguojant su semikarbazidu, į metoksiiminą, reaguojant su metoksiaminohidrochloridu, arba į oksimą, reaguojant su hidroksilaminu;

25 f) paskutinėje stadijoje nuo apsaugoto galinio azoto atomo gali būti pašalinta apsauginė grupė: pavyzdžiui, N-karbobenzoksigrupė gali būti pašalinta, katalitiškai redukuojant su 10 % paladžiu ant aktyvuotos anglies.

30 **Analizės metodų aprašymas**

Baltymo nustatymas

35 Tuo atveju, jei galima, baltymo koncentraciją nustatinėjame A_{280} metodu, naudojant $A_{280} 1\% = 20,0$ papajos latekso preparatų analizei ir $A_{280} 1\% = 18,3$ išvalyto arba iš dalies išvalyto chimopapaino produktų analizei

(Robinson, 1975, Biochemistry, 14, 3695-3700). Kai kurie tiolą turintys reagentai ir disulfidai pasižymi šviesos sugėrimu prie 280 nm, todėl, jei jie yra baltyme, tai baltymo koncentracijos nustatymui naudojame Bio-Rad analizę su dažo surišimu (Bio-Rad Laboratories, Didžioji Britanija). Standartais naudojami išpurškimo džiovynuose išdžiovinto papajos latekso tirpalai (A_{280} 1% = 20,)). Šis metodas mažiau jautrus priemonėms, negu A_{280} . Išvalyto fermento preparatuose baltymo kiekis buvo nustatomas, skaičiuojant bendram sausos medžiagos kiekiui.

Chimopapaino aktyvumo nustatymas

15 a) Aktyvumas BAPNA atžvilgiu (Metodika Nr. 1) - analizė Smito metodu

Tiriamą bandinį supildavo į "1 buferį", vandeninį natrio fosfato (0,1 M) tirpalą, kurio pH=6,0, ir kuriame yra EDTA (1mM) ir cisteino hidroklorido monohidratas (10 mM), su tokiu apskaičiavimu, kad galutinis tūris būtų 1 ml. Prieš reakcijos pradžią fermentą (jei jis yra bandinyje) aktyvavo 5 min 37°C temperatūroje, pridėdant 4 ml substrato N- α -benzoil-DL-arginino p-nitroanilido (BAPNA) (1,25 mM) tirpalo, prieš tai pašildyto iki 37°C.

Pastaba: substrato tirpalą gaminome ištirpinant 300 mg BAPNA šiltame dimetilsulfoksido, po to gautą tirpalą lėtai supylėme į 450 ml, prieš tai iki 37°C pašildyto, 1 buferio tirpalą ir pylėme 1 buferį iki bendro 500 ml tūrio; tam, kad neiškristų į nuosėdas BAPNA, substrato tirpalo temperatūrą palaikėme virš 30°C.

35 Inkubaciją 37°C temperatūroje tęsėme 30 minučių, po to reakciją nutraukdavome 1 ml acto rūgšties (4 N) pridėjimu į reakcijos mišinį. Išsiskyrusį 4-nitroaniliną

nustatydavome matuojant ΔA_{410} . Vienas aktyvumo vienetas šiomis sąlygomis atitiko 1 pikomolio 4-nitroanilino išsiskyrimui ($\epsilon=8800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) per sekundę.

5 Pateiktos analizės atlikimo sąlygos atitiko sąlygas, aprašytas Didžiosios Britanijos patente Nr. 2098997, pateiktame Smith Laboratories Inc. Šiomis sąlygomis yra analizuojami chimopapaino preparatai visame pasaulyje, pavyzdžiui, chimopapainas, išleidžiamas firmos The Boots
10 Company PLC su prekybiniu pavadinimu Chymodiactin, ir chimopapainas, išleidžiamas Pietų Korėjos firmos Sinpoong su prekybiniu pavadinimu Disken. Šie aktyvumo vienetai yra tarptautiškai pripažinti ir paprastai vadinami "Smith BAPNA Assay Units".

15

b) Aktyvumas BAPNA atžvilgiu (Metodika Nr. 2)

Tiriamą bandinį supildavo į vandeninį buferinį natrio fosfato tirpalą (0,10 M), kurio pH=6,8 ir kuriame yra
20 EDTA (1 mM) ir ditiotreitolas (2 mM) arba cisteinas (4 mM), su tokiu apskaičiavimu, kad galutinis tūris būtų 0,975 ml. Prieš reakcijos pradžią fermentą (jei jis yra bandinyje) aktyvavo 40°C temperatūroje 5 minutes, pridėdant 25 μl N- α -benzoil-DL-arginino p-nitroanilido (BAPNA) tirpalo (100 mM) dimetilsulfoksido. In-
25 kubaciją 40°C temperatūroje tęsė 10 min, o po to reakciją nutraukdavome 1 ml (0,10 M) vandeninio buferinio tirpalo, turinčio natrio chloracetatą ir natrio acetatą (0,20 M) ir pH=4,3, pridėjimu į reakcijos mišinį. Iš-
30 siskyrusį 4-nitroaniliną nustatinėjome matuojant ΔA_{410} . Vienas aktyvumo vienetas šiomis sąlygomis atitiko 1 pikomolio 4-nitroanilino išsiskyrimui ($\epsilon = 8800 \text{ M}^{-1}, \text{cm}^{-1}$) per sekundę.

35 Chimopapaino aktyvumo absoliučios reikšmės, gautos pasinaudojant aprašytais Metodikomis Nr. 1 ir Nr. 2, skiriasi viena nuo kitos, ir būtent: reikšmės, gautos

pasinaudojant Metodika Nr. 2 maždaug 2-3 kartus didesnės, už reikšmės, gautas pagal Metodiką Nr. 1 (žr. 31 pavyzdį).

5 **c) Aktyvių centrų titravimas jodacto rūgštimi**

Chimopapaino aktyvių centrų titravimą jodacto rūgštimi vykdėme taip pat, kaip ir aktyvių centrų titravimą reagentu E-64, aprašytą Zucker ir kt. Biochim. Biophys. Acta (1985), 828, 196-204. Chimopapaino tirpalą skiedėme 10 1 buferyje, kaip tai aprašyta aukščiau esančiame skyriuje (a), gaudami tirpalą, kuriame yra 60 μM baltymo ($\epsilon_{280} = 4,3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, paskaičiuotą iš A_{280} , 1 % = 18,3, Robinson (1985) (žr. aukščiau cituotą darbą) ir MW (molekulinis svoris) = 23656, apskaičiuotas iš aminorūgščių sekos Jacquet ir kt. (1989 gegužė), Bio. Chem. Hoppe-Seyler, 370, 425-434). Alikvotines, po 20 ml chimopapaino tirpalo dalis patalpinome į titravimo mėgintuvėlius ir 5 min 37°C temperatūroje inkubavome su 20 μl 1 buferio (40 μl kontroliniame bandyme). Po to į kiekvieną mėgintuvėlį pridėjome 20 ml (atitinkamai 10, 20, 30, 40, 50 ir 60 μM) jodacto rūgšties ir mišinį palaikydavome 10-20 min 37°C temperatūroje, Reakciją inicijuodavome pridėdant į mišinį 25 4 ml BAPNA substrato tirpalo, aprašyto aukščiau esančiame skyriuje (a), ir iš anksto pašildyto iki 37°C. 37°C temperatūroje inkubaciją tęsėme 30 min, po to reakciją nutraukdavome, kaip tai yra aprašyta skyriuje (a), ir išsiskyrusio 4-nitroanilino kiekį nustatydavome 30 matuojant ΔA_{410} . Tuo būdu gautą aktyvaus chimopapaino molinę koncentraciją lygindavome su baltymo moline koncentracija, remiantis chimopapaino moliniu ekstinkcijos koeficientu, kuris lygus $4,3284 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Po to aktyvaus chimopapaino koncentraciją išreikšdavome 35 procentais nuo bendro baltymo kiekio.

d) Aktyvumas azokazeino atžvilgiu

Aktyvumą azokazeino atžvilgiu nustatinėjome pagal metodiką, aukščiau aprašytą Rowan ir kt. (1988), Arch. Biochem. Biophys. 267, 262-270, naudojant mažiau 1 μ M fermento (priimant molekulinį svorį 2400) ir, esant reikalui, 1 μ M vištų cisteino. Visos fermentų ir inhibitoriaus koncentracijos susijusios su aktyvių molekulių koncentracija.

10

Imunologinė analizė paprastos radialinės imunodifuzijos metodu

Paprasta radialinė imunodifuzija remiasi Mancini ir kt., 1965, Imunochem. 2, 235-254 metodu ir yra atliekama šiuo būdu. Agarozę (1 %), esančią vandeniniame natrio fosfato tirpale (10 mM), turinčiame NaCl (0,14 M) ir kurio pH=7,3 bei turinčią monospecifinio IgG preparatą, užpildavo ant Gel Bond^R (FMC Corporation, Maine, JAV) ir 1,5 cm plote išpjaudavo stačiakampės formos figūras (r=1 mm). Kontrolinius pavyzdžius ir tiriamus bandinius figūrose išdėstydamo atsitiktiniu būdu tam, kad minimizuoti kraštinį efektą. Po antigeno įnešimo į figūras, jas laikydavo 24 valandas precipitino žiedų susidarymui. Po to jas nuplaudavo, išdžiovindavo ir dažydavo. Antigeno priklausomybės nuo žiedo diametro kvadrato priklausomybės gavimui naudojome švarų, saikingai karboksimetilintą antigeną. Nustatymo intervalas buvo 25-300 ng antigeno vienai figūrai.

30

PPIV ir jos antikūnių gavimas

a) Afininės kolonėlės gavimas

35

Butiloksikarbonil-L-Phe-p-nitrofenilo esteris (10 mM) maišant buvo pridedamas į α -NH₂CH₂CN.HCl (20 mM) ir di-

izopropiletilamino (20 mM) mišinį dimetilformamide (20 ml). Mišinys 20°C temperatūroje buvo maišomas 2 valandas, po to praskiedžiamas etilacetatu (100 ml), 2 kartus praplaunamas vandeniu, 5 kartus vandeniniu trietilamino tirpalu, 3 kartus vandeniu, 2 kartus kalio bisulfito tirpalu, 3 kartus vandeniu, džiovinamas ir išgarinamas. Nuosėdas perkristalinome iš etilacetato ir heksano mišinio, gaudami Boc-L-Phe-NHCH₂CN, lyd. temp. 134,5-135°C. Ledu atšaldytą trifluoracto rūgštį (10 ml) pridėjome į Boc-L-Phe-NHCH₂CN (5 mM) tirpalą dichlorometane (10 ml). Reakcijos mišinį 30 min laikėme 20°C temperatūroje, po to tirpiklį pašalinome išgarinant 40°C temperatūroje. Liekaną tirpinome chloroforme, tirpalą išgarindavome ir aprašytą operaciją kartojome dar du kartus. Gautą neapdirbtą trifluoracetatinę druską ištirpinome diizopropiletilamino (7,5 mM) tirpale dimetilformamide (10 ml) ir pridėjome į paruoštą Boc-Gly-p-nitrofenilo eterio (6,25 mM) ir N-hidroksibenzotriazolo monohidrato (6,25 mM) tirpalą. Po to, p-nitrofenolio išskyrimui (auksinė spalva), į mišinį lašais buvo pridedamas pakankamas kiekis diizopropiletilamino ir mišinys buvo maišomas kambario temperatūroje 2 valandas. Po to į šį mišinį pridėjome N,N-dietiletilendiamino (1,5 ml), po 15 min etilacetato (60 ml), o po to mišinį plovėme vandeniu, vandeniniu trietilamino tirpalu, vandeniu, kalio bisulfito vandeniniu tirpalu, vandeniu, džiovinome ir išgarinome. Liekaną valėme chromatografijos ant silikagelio būdu, eliuavimas buvo atliekamas etilacetato ir heksano (20:1) mišiniu. Buvo gautas putų pavidalo Boc-L-Phe-NHCH₂CN.

Boc-Gly-L-Phe-NHCH₂CN (30 mg) tirpinome 1 ml trifluoracto, dichlormetano ir anizolo mišinio (25:65:10) ir tirpalą 30 min laikėme 0°C temperatūroje. Po to mišinį džiovinome rotaciniame garinimo aparate 34°C temperatūroje ir liekaną tirpinome metanolyje (1,5 ml) ir

vandeniniame NaHCO_3 tirpale (0,1 M, $\text{pH}=8,0$. 1,5 ml), gaudami ligando tirpalą.

5 Aktyvuotą CH-Sepharos^R4B (Pharmacia, 3 g sauso svorio) hidratavome per naktį vandeniniame druskos rūgšties tirpale (1 mM, 75 ml) 4°C temperatūroje, po to plovėme druskos rūgštimi (mM, 600 ml), o po to vandeniniu NaHCO_3 tirpalu (0,1 M, $\text{pH}=8,0$, 300 ml). Gelį suspendavome vandeniniame NaHCO_3 tirpale (0,1 M, $\text{pH}=8,0$, 30 ml),
10 pridėdami į suspensiją iš anksto paruoštą ligando tirpalą, ir mišinį atsargiai maišėme per naktį 20°C temperatūroje. Gautą gelį surinkome sukepto stiklo filtre, praplovėme vandeniniu metanolio tirpalu (50 tūrinių %, 180 ml), vandeniu ir suspendavome vandeniniame etanolamino tirpale (0,1 M, 30 ml), kurio pH buvo nustatytas lygiu 9, panaudojant druskos rūgštį. Suspensija buvo purtoma 4 val 20°C temperatūroje, po to gelį surinkome, praplovėme vandeniu (500 ml) ir laikėme "darbiniame" buferyje (natrio fosfatas (50 mM); EDTA
15 (1 mM); etandiolis (33 %), $\text{pH}=6,8$, 4°C).
20

b) PPIV valymas

Kolonėlę, užpildytą Sepharose^R-Ahx-Gly-L-Phe-NHCH₂CN, praplovėme "eliuuojančiu" buferiu (natrio citratas (50 mM); etandiolis (33 %), $\text{pH}=4,5$; 12 ml) ir po to darbiniu buferiu (žr. aukščiau, 12 ml).

Išpurškimo džiovvykloje išdžiovintą papajos lateksą (0,5 g)
30 ištirpinome darbiname buferyje (10 ml) ir tirpalą filtravome per filtrą, kurio porų diametras buvo 0,22 μM . Baltymo koncentraciją filtrate nustatinėjome pasinaudojant Bio-Rad dye-binding analize (Bio-Rad Laboratories, Didžioji Britanija). Į mišinį pridėjome
35 tokią ditiotreitolą kiekį, kad jo koncentracija būtų 2 mM, ir mišinį laikėme 20 min 0°C temperatūroje. Per kolonėlę praleidome 80 mg baltymo latekso (38 ml/val/cm²)

20°C temperatūroje, o po to darbinį (8 ml) ir eliuuojantį (8 ml) buferius. Po to pro ją praleidome 4 ml eliuuojančio buferio, turinčio oksietildisulfido (50 mM), po to tirpalų leidimą pro kolonėlę nutraukdavome ir palikdavome ją nakčiai 20°C temperatūroje. Po išlaikymo per naktį pratęsėme eliuavimą oksietildisulfida turinčiu eliuuojančiu buferiu (10 ml) ir surinkome eliuato frakcijas (po 1 ml). Frakcijas, aktyvias BAPNA atžvilgiu, surinkome į vieną vietą ir praleidome pro kolonėlę, užpildytą Mono HR 5/5^R (katijonitinė derva), kuri prieš tai buvo apdorota vandeniniu natrio acetato/acto rūgšties mišiniu (50 mM), kurio pH=5 ir kuriame buvo EDTA (1 mM). Po to kolonėlę plovėme tuo pačiu buferiu (1 ml/min) iki tol, kol A₂₈₀ vėl nerodė nulinės reikšmės. Po to pro kolonėlę leidome gradientą (21,5 mMNa⁺/ml) iki 1 M natrio acetato (Buttle ir Barrett, 1984, aukščiau cituotas darbas) ir surinkinėjome frakcijas po 1 ml. Eliuavome du pagrindinius baltymo pikus: pirmą piką, kurio eliuavimas vyko esant maždaug 0,17 M Na⁺, atitinkantį papainui, ir antrą piką, kurio eliuavimas vyko esant maždaug 0,38 M Na⁺, atitinkantį PPIV. Frakcijas su pikų, atitinkančių PPIV, apjungėme, dializavome vandeniniame EDTA tirpale (1 mM), džiovinoame sublimacinio džiovinimo būdu ir laikėme -20°C temperatūroje. Švari PPIV nepasižymėjo aktyvumu BAPNA atžvilgiu, tačiau pasižymėjo aktyvumu hidrolizuoto azokazeino atžvilgiu, šis aktyvumas nebuvo inhibuojamas 1 mM koncentracijos vištų cisteinu.

30 c) PPIV antikūnių gavimas

Švarų PPIV antigeną prieš naudojimą minkštai karboksimetilinoje pagal Zucker ir kt. metodą, 1985, Biochim. Biophys. Acta, 828, 196-204. Po to PPIV antiserumą inicijavome triušyje, darydami 360 mg karboksimetilinto baltymo pilname Freund adjuvante injekciją į raumenis, bei darydami po 2 savaitių 100 mg nepilname adjuvante

poodinę injekciją. IgG iš dalies valėme nuo serumo frakcionuojant su amonio sulfatu, kaip tai aprašė Heide ir Schwick (1978) Handbook of Experimental Immunology (Weir, D. M. ed.). Vol. 1, 7.1-7.11, Blackwell, Oxford, bei po to dializuoiant vandeniniame natrio fosfato tirpale (10 mM), turinčiame NaCl (0,14 M) ir kurio pH=7,3.

PPIV analizei paprastos radialinės imunodifuzijos būdu (žr. aukščiau) naudojome specifinį PPIV atžvilgiu paratą IgG.

Atskiri šio išradimo aspektai nuodugniau iliustruojami žemiau pateiktų pavyzdžių pagalba, tačiau kurie yra tik išimtinai iliustracinė medžiaga ir jokių būdu neapriboja patentu ginamo išradimo turinio.

Panaudotų abreviatūrų reikšmės yra šios: ABTS, 2,2'-azinobis(3-etilbenztriazolino sulforūgštis); Ahx, 6-aminoheksanoilas; Ala, alaninas; BAPNA, N- α -benzoil-DL-arginino p-nitroanilidas; Boc, butiloksikarbonilas; CBZ, karbобензокси; Cha, cikloheksilalaninas; DMF, N,N-dimetilformamidas; E-64, L-3-karboksi-2,3-trans-epoksi-propionilleucilamido-4(-guanidino)butanas; EDC, N-etil-N'-(2-dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochloridas; EDTA, etilendiamintetraacto rūgštis (dinatrio druska); Gly, glicinas; Leu, leucinas; Mo, metoksiiminas; OBZ, oksibenzilas; Ox, oksimas; Phe, fenilalaninas; Sc, semikarbazonas; THF, tetrahidrofuranas; ir Tyr, tirozinas.

Bio-Rad, Chelex, Chymodiactin. Ch-Sepharose 4B, Chymofast, Disken, ECH-Sepharose, Enzifitter, FPLC, Gel Bond, Mono SHR, S-Sepharose HP, Tween, Zeta ir Zetaffinity yra prekybiniai pavadinimai.

Visos stadijos, jei tai nepaminėta atskirai, buvo vykdomos kambario temperatūroje.

1 PAVYZDYS - L-alanil-L-fenilalanil semikarbazonas

5

a stadija

10 A) Į sausą N,N-dimetilformamidą (DMF) (100 ml) maišant kambario temperatūroje pridėjome 0,N-dimetilhidroksilamino hidrochlorido. Po to į mišinį per 5 minutes buvo pridedamas N-metilmorfolinas (10,6), palaikant temperatūrą žemiau 30°C. To pasekoje iškrito baltos nuosėdos ir mišinį atšaldėme iki 0°C.

15 B) N-t-Boc-L-Phe (26,5 g) ištirpinome sausame tetrahidrofurane (THF) (200 ml) ir atšaldėme tirpalą iki -10°C, po to per 5 minutes į jį pridėjome izobutilchloroformatą (14,38 g), palaikant temperatūrą -10°C. Po to į mišinį per 10 min pridėjome N-metilmorfoliną
20 (10,6 g), palaikant mišinio temperatūrą -10°C, ir maišymą tęsėme dar 10 minučių.

C) Į suspensiją B per 15 min buvo pridedama suspensija A, palaikant temperatūrą -10°C. Mišiniui leidome
25 sušilti iki kambario temperatūros ir po to maišėme jį 3 valandas. Gautą mišinį atšaldėme iki 0°C ir per 5 min pridėjome 3-dimetilaminopropilaminą (10,2 g). Po to pridėjome vandenį (200 ml) ir etilacetatą (200 ml), atskyrėme viršutinį organinį sluoksnį ir nuosekliai
30 plovėme jį (a) vandeniu (200 ml), (b) vandeniniu KHCO₃ tirpalu (5 %, 200 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 200 ml) ir (d) vandeniu (3x200 ml). Po to tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei 30°C temperatūrai, ir gavome N-t-Boc-L-Phe-
35 O,N-dimetilhidroksamatą.

b stadija

N-t-Boc-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato (2,9 g) ir trifluoracto rūgšties (8 ml) mišinį maišėme keturias valandas kambario temperatūroje. Po to trifluoracto rūgšties perteklių pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei 30°C temperatūrai. Prie liekanos pridėjome dietilo eterį (30 ml) ir gavome tirpalą, po to eterį nudistiliavome vakuume. Apdorojimą eteriu kartojome iki tol, kol prasidėjo kristalizacija. Kietą medžiagą nufiltravome, praplovėme eteriu ir džiovinome vakuume virš P₂O₅, gavome L-Phe-O,N-dimetildichroksamato trifluoracetato druską.

c stadija

A) L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską (7,15 g) ištirpinome sausame DMF (30 ml) maišant kambario temperatūroje, po to į tirpalą per 5 min pridėjome N-metilmorfolino (2,35 g), palaikydami žemesnę nei 30°C temperatūrą. Gautą mišinį atšaldėme iki 0°C.

B) CBZ-L-Ala (4,96 g) maišant ištirpinome sausame THF (55 ml) ir mišinį atšaldėme iki -10°C. Po to į mišinį per 5 min pridėjome izobutilchloroformiatą (3,05 g) -10°C temperatūroje, N-metilmorfoliną (2,35 g) per 10 min ir reakcijos mišinį po to dar maišėme 10 min -10°C temperatūroje.

C) A tirpalą per 15 min pridėjome prie B tirpalo -10°C temperatūroje, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme dar 3 valandas. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C, per 5 min pridėjome 3-dimetilaminopropilaminą (2,27 g) ir po to maišėme dar 5 min. Po to į mišinį pridėjome vandenį (50 ml) ir etilacetatą (50 ml), viršutinį organinį sluoksnį atskyrėme ir nuosekliai plovėme jį (a) vandeniu (50 ml) ir

sočiu vandeniniu NaCl tirpalu (5 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 50 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 50 ml) ir (d) vandeniu (3x50 ml). Po to tirpiklį nugarinome vakuume rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, prie liekanos pridėjome šviežio etilacetato (50 ml) ir pašalinome jį išgarinant, gavome CBZ-L-Ala-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.

10 d stadija

CBZ-L-Ala-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (27,8 g) ištirpinome sausame THF (280 ml) ir atšaldėme tirpalą iki -70°C azoto atmosferoje. Po to per 60 min, -70°C temperatūroje ir azoto atmosferoje į šį tirpalą pridėjome diizobutilaliuminio hidrido tirpalo THF (1 M, 372 ml) ir maišymą tęsėme dar 60 min -70°C temperatūroje. Reakcija būdavo užbaigiama maišant supilant mišinį 0°C temperatūroje ir N_2 atmosferoje į sotų vandeninį NaCl tirpalą (400 ml) ir Segneto druskos tirpalą (600 ml). Po to mišiniui buvo leidžiama sušilti iki kambario temperatūros ir į jį pridėjome etilacetatą (600 ml). Po to mišinį filtravome, atskyrėme vandeninį sluoksnį ir jį ekstrahavome etilacetatu (200 ml). Sujungtas organines fazes tris kartus plovėme vandeniu (600 ml) ir sočiu vandeniniu NaCl tirpalu (400 ml). Tirpiklį pašalinome vakuume rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Liekaną perkristalinome iš toluolo ir džiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome CBZ-L-Ala-L-Phe-aldehidą.

e stadija

A) CBZ-L-Ala-L-Phe-aldehidą (3 g) ištirpinome techniniame metilo spirite (20 ml). Tirpalą pašildėme iki 50°C ir filtravome, norint pašalinti netirpią medžiagą.

B) Semikarbazido hidroklorido (1,3 g) tirpalą vandenyje (10 ml) pridėjome į KHCO_3 (1,1 g) vandenyje (10 ml).

5 C) Tirpalą B pridėjome į tirpalą A ir gautą mišinį maišėme 2 val 50°C temperatūroje, po to į jį pridėjome etilacetatą (50 ml) ir vandenį (100 ml), vandeninį sluoksnį atskyrėme, ekstrahavome jį etilacetatu (2x20 ml) ir sujungtas organines fazes nuosekliai plovėme (a) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 50 ml), (b) vandeniniu
10 HCl tirpalu (0,5 N, 50 ml) ir (c) vandeniu ir sočiu vandeniniu NaCl tirpalu (50 ml/20 ml x 3). Po to tirpiklį išgarindavome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant temperatūrai žemesnei nei 30°C. Gavome CBZ-L-Ala-L-PheSc.

15

f stadija

CBZ-L-Ala-L-PheSc (680 mg) ištirpinome metanolyje (90 ml) ir netirpią liekaną atskyrėme filtruojant. Aparatą, ku-
20 riame buvo CBZ-L-Ala-L-PheSc metanolis tirpalas, prapūtėme N_2 ir pridėjome į jį katalizatorių - 10 %-nį paladij ant aktyvuotos anglies (100 mg). Į uždara sistemą 75 min leidome H_2 . Po to katalizatorių nufiltravome ir metanolį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate
25 vakuume, esant temperatūrai žemesnei nei 30°C. Iš liekanos stovint išsikristalindavo kristalinės nuosėdos, kurias džiovinome vakuume virš P_{205} . Gavome L-alanil-L-fenilalanil semikarbazoną (L-Ala-L-PheSc).

30 **2 PAVYZDYS L-fenilalanil-L-fenilalanil semikarbazonas**

a ir b stadijos

35 L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską sintezavome taip pat, kaip 1 pavyzdžio a ir b stadijose.

c stadija

- 5 A) L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską (1,932 g) ištirpinome sausame DMF (8 ml) maišant kambario temperatūroje. Į gautą tirpalą per 5 min pridėjome N-metilmorfoliną (0,606 g), palaikant temperatūrą žemiau nei 30°C, ir gautą mišinį atšaldėme iki 0°C.
- 10 B) CBZ-L-Phe (1,794 g) maišant ištirpinome sausame THF (15 ml) ir mišinį atšaldėme iki -10°C, po to į mišinį per 5 min -10°C temperatūroje pridėjome izobutilchloroformiatą (0,822 g), ir per 10 min N-metilmorfoliną (0,606 g), ir gautą reakcijos mišinį maišėme dar 10 min -10°C temperatūroje.
- 20 C) Per 15 min tirpalą A pridėjome į tirpalą B -10°C temperatūroje, leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme dar 3 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C, per 5 min pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilaminą (0,612 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min. Po to į mišinį pridėjome vandenį (20 ml) ir etilacetatą (30 ml), atskyrėme organinę fazę ir nuosekliai plovėme ją (a) vandeniniu KHCO₃ tirpalu (5 %, 20 ml,) (b) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 20 ml) ir (c) vandeniu (2x30 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame džiovinimo aparate vakuume žemesnėje nei 35°C temperatūroje. Liekaną perkristalinome iš izopropilo spirito. Gavome CBZ-L-Phe-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.
- 30

d stadija

- 35 CBZ-L-Phe-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (4,89 g) ištirpinome sausame THF (40 ml). Į sausą kolbą (azoto atmosferoje) idėjome ličio-aliuminio hidridą (0,493 g) ir sausą THF (20 ml) ir maišėme gautą mišinį 10 min, o po to gautą mišinį atšaldėme iki -10°C. Po to į šitą mi-

šinių N_2 atmosferoje ir $-50^{\circ}C$ temperatūroje pridėjome hidroksamato tirpalą sausame THF ir maišymą tęsėme dar 20 min $0-5^{\circ}C$ temperatūroje.

5 Po to reakcijos mišinį atšaldėme iki $-50^{\circ}C$ temperatūros ir azoto atmosferoje pridėjome į jį sotų Segneto druskos tirpalą (60 ml). Leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros, pridėjome į jį HCl (konc., 10 ml) ir nustatėme vandeninės fazės $pH=3$, netirpią dalį nu-
10 filtravome. Po to į nufiltruotą tirpalą pridėjome etilacetatą (50 ml), organinę fazę atskyrėme ir nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (50 ml), (b) vandeniniu $KHCO_3$ tirpalu (5 %, 50 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 50 ml) ir (d) vandeniu (3x50 ml). Po to etilacetatą pa-
15 šalinome rotacinio išgarinimo aparate vakuume žemesnėje nei $30^{\circ}C$ temperatūroje. Liekaną palikome nakčiai, po to džiovinome vakuume virš P_2O_5 ir kristalinome iš toluolo. Gavome CBZ-L-Phe-L-Phe aldehydą.

20 e stadija

A) CBZ-L-Phe-L-Phe aldehydą $70^{\circ}C$ temperatūroje ištirpinome techniniame metilo spirite (10 ml).

25 B) Į semikarbazido hidroklorido (0,183 g) tirpalą vandenyje (3 ml) ir techninį metilo spiritą (2 ml) pridėjome natrio acetato trihidratą (0,224) ir tirpalą pašildėme iki $60^{\circ}C$.

30 c) Tirpalą A pridėjome į tirpalą B, kolbą nuo A tirpalo praplovėme techniniu metilo spiritu, praplovimo skystį pridėjome prie mišinio ir $60-70^{\circ}C$ temperatūroje maišėme jį 30 min. Po to leidome mišiniui lėtai atšalti, palikome stovėti jį ant ledo dar valandą ir po to pa-
35 likome nakčiai $4^{\circ}C$ temperatūroje. Kieta produktą atskyrėme filtruojant, praplovėme jį techninio metilo

spirito ir vandens mišiniu (4:1, 3 ml), išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome CBZ-L-Phe-L-PheSc.

f stadija

5

CBZ-L-Phe-L-PheSc (2,1 g) ištirpinome metanolyje (315 ml) 30°C temperatūroje ir netirpią liekaną pašalinome nufiltruojant. Prietaisą, kuriame buvo metanolinis semikarbazono tirpalas, prapūtėme azotu, įdėjome katalizatorių - 10 %-nį paladij ant aktyvuotos anglies (0,35 g) ir į uždara sistemą 30 min leidome vandenį. Po to katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Liekaną išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome L-fenilalanil-L-fenilalanil semikarbazoną (L-Phe-L-PheSc).

3 PAVYZDYS L-fenilalanil-L-fenilalanil metoksiiminas

20 **a-d stadijos**

CBZ-L-Phe-L-Phe aldehydą sintetavome taip pat, kaip tai aprašyta 2 pavyzdžio a-d stadijose.

25 **e stadija**

A) CBZ-L-Phe-L-Phe aldehydą (0,645 g) ištirpinome techniniame metanolyje (35 ml) 60-65°C temperatūroje ir netirpią liekaną nufiltravome.

30

B) Į metoksilamino hidrochlorido (0,138 g) tirpalą vandenyje 60°C temperatūroje pridėjome natrio acetato trihidratą (0,224 g).

35

C) Į tirpalą A pridėjome tirpalą B, B medžiagos kolbą praplovėme 60°C vandeniu (10 ml), praplovimo vandenį apjungėme su mišiniu ir jį kaitinome pusę valandos 60°C

temperatūroje, po to palikome 2 valandas atvėsti iki kambario temperatūros. Kietą produktą nufiltravome, praplovėme techninio metanolio mišiniu su vandeniu (1:1, 6 ml) ir džiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome CBZ-L-Phe-L-Phe metoksiiminą.

f stadija

CBZ-L-Phe-L-Phe metoksiiminą (550 mg) ištirpinome metanolyje ir netirpią liekaną nufiltravome. Prietaisą, kuriame buvo metanolinis metoksiimino tirpalas, prapūtėme azotu, įdėjome katalizatorių - 10 %-nį paladij ant aktyvuotos anglies (100 mg). Po to į hermetizuotą indą pūtėme vandenilį, esant reikalui, pūtimą tęsėme 4,5 valandos. Po to katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant ne didesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome L-fenil-alanil-L-fenilalanil-metoksiiminą (L-Phe-L-Phe-Mo).

4 PAVYZDYS L-fenilalanil-D-fenilalanil semikarbazonas

a stadija

A) O,N-dimetilhidroksilamino hidrochloridą (3,891 g) suspendavome sausame DMF (40 ml) kambario temperatūroje. Į paruoštą suspensiją per 5 min pridėjome N-metilmorfoliną (4,032 g), mišinio temperatūrą palaikant žemiau 30°C, po to mišinį maišant atšaldėme iki 0°C.

B) N-t-Boc-D-Phe (10,08 g) ištirpinome sausame THF (80 ml) ir gautą tirpalą atšaldėme iki -10°C. Po to į jį, palaikant tą pačią temperatūrą, per 5 min pridėjome izobutilchloroformatą (5,47 g). Po to palaikant tą pačią temperatūrą per 10 min pridėjome N-metilmorfoliną (4,032 g) ir maišymą tęsėme dar 10 min.

C) Per 15 min esant -10°C temperatūrai, suspensiją A pridėjome į suspensiją B, leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros, o po to maišėme jį dar 3 valandas. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C , per 5 min pridėjome 3-dimetilaminopropilamino (3,88 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min. Po to į mišinį pridėjome vandenį (60 ml) ir etilacetatą (60 ml), organinį sluoksnį atskyrėme ir nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (60 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 60 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 M, 60 ml) ir (d) vandeniu (3 x 60 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo prietaise vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome N-t-Boc-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.

15 **b stadija**

N-t-Boc-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (11,3 g) atšaldėme ledu, pridėjome į jį trifluoracto rūgštį (30 ml) ir mišinį maišėme kambario temperatūroje 3 valandas. Trifluoracto rūgšties perteklių pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, liekaną ištirpinome dietilo eteri (100 ml). Tirpiklį nudistiliavome vakuume ir operaciją kartojome tol, kol prasidėjo kristalizacija. Kietą nuosėdą nufiltravome, praplovėme dietilo eteri ir džiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome D-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską.

c stadija

30

A) D-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracto druską (10,1 g) maišant ištirpinome sausame DMF kambario temperatūroje. Į gautą tirpalą per 5 min pridėjome N-metilmorfoliną (3,155 g), palaikant temperatūrą žemiau nei 30°C , po to mišinį atšaldėme iki 0°C .

B) CBZ-L-Phe (9,4 g), maišant ištirpinome sausame THF (80 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -10°C . Po to į tirpalą -10°C temperatūroje pridėjome per 5 min izobutil-chloroformiatą (4,307 g), per 10 min N-metilmorfoliną (3,155 g) ir reakcijos mišinį maišėme dar 10 min -10°C temperatūroje.

C) Per 15 min į tirpalą B pridėjome A tirpalą -10°C temperatūroje, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme 3 valandas. Mišinį atšaldėme iki 0°C , per 5 min pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilamino (3,20 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min, po to į jį pridėjome vandenį (60 ml) ir etil-acetata (60 ml), atskyrėme organinę fazę ir nuosekliai plovėme ją (a) vandeniu (60 ml) ir sočiu NaCl tirpalu (60 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 60 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 60 ml) ir (d) vandeniu (3x60 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo prietaise vakuumė, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Prie liekanos pridėjome šviežią etilacetatą ir po to jį pašalinome išgarinant. Liekaną perkristalinome iš izopropanolio. Gavome CBZ-L-Phe-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.

25 d) stadija

Į azotu prapūstą kolbą įdėjome diizobutilaliuminio hidridą dichlormetane (1 M, 10 ml). Kolbą pašildėme iki 50°C , kol pasišalino visas dichlormetanas, ir visą vėl prapūtėme azotu. Po to į kolbą pridėjome sausą THF (10 ml) ir mišinį atšaldėme iki -70°C . CBZ-L-Phe-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (0,978 g) ištirpinome sausame THF (10 ml) ir paruoštą tirpalą per 10 min -70°C temperatūroje pridėjome į diizobutiloaliuminio hidrata, po to maišymą tęsėme dar 10 min -70°C temperatūroje. Po to reakcijos mišinį išpylėme į metanolio (30 ml) ir sočios Segneto druskos (30 ml) tirpalą -60°C temperatūroje,

reakcijos mišiniui leidome sušilti iki kambario temperatūros, po to į jį pridėjome vandenį (50 ml) ir etilacetatą (50 ml), atskyrėme organinę fazę, o vandeninę fazę ekstrahavome etilacetatu (50 ml). Apjungtas organines fazes praplovėme vandeniu (2x200 ml) ir nufiltravome. Organinę fazę atskyrėme ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo prietaise vakuumė, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome CBZ-L-Phe-D-Phe aldehydą.

10

e stadija

A) CBZ-L-Phe-D-Phe aldehydą ištirpinome metilo spirite (10 ml) 60°C temperatūroje.

15

B) Natrio acetato trihidrato (0,298 g) tirpalą vandenyje (3 ml) pridėjome prie semikarbazido hidrochlorido (0,244 g) tirpalo vandenyje (3 ml) 60°C temperatūroje.

20

C) Sumaišėme A ir B tirpalus ir gautą mišinį maišėme 5 val 60°C temperatūroje, po to jį palikome nakčiai 4°C temperatūroje. Iškritusias kietas nuosėdas nufiltravome ir džiovinome vakuumė virš P_2O_5 . Gavome CBZ-L-Phe-D-PheSc.

25

f stadija

CBZ-L-Phe-D-PheSc (600 mg) ištirpinome metanolyje (90 ml) ir netirpią liekaną nufiltravome. Prietaisą, kuriame buvo metanolinis semikarbazono tirpalas, prapūtėme azotu ir į jį įdėjome katalizatorių - 10 % paladi ant aktyvuotos anglies (100 mg). Į hermetizuotą indą 2 val leidome vandenilį, po to katalizatorių nufiltravome ir metanolį pašalinome rotaciniame išgarinimo prietaise vakuumė, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome

35

L-fenilalanil-D-fenilalanil semikarbazoną (L-Phe-D-PheSc).

5 PAVYZDYS L-fenilalanil-L-fenilalanil oksimas

5

a-d stadijos

CBC-L-Phe-L-Phe aldehydas buvo sintezuojamas kaip tai aprašyta 2 pavyzdžio a-d stadijose.

10

e stadija

A) CBZ-L-Phe-L-Phe aldehydą (0,645 g), gautą aukščiau aprašytu būdu, ištirpinome techniniame metilo spirite (35 ml) 60-65°C temperatūroje ir netirpios liekanos pašalinimui tirpalą filtravome.

15

B) Į hidrosilamino hidroklorido (0,144 g) tirpalą vandenyje (25 ml) 60°C temperatūroje pridėjome natrio acetato trihidratą (0,244 g).

20

C) Tirpalą B pridėjome į tirpalą A ir kolbą B tirpalo praplovėme vandeniu (10 ml), kurį pridėjome prie mišinio, mišinį maišėme 3-4 val 60-65°C temperatūroje, po to atšaldėme iki 4°C ir šioje temperatūroje laikėme 3-4 val. Iškritusias kietas nuosėdas nufiltravome ir praplovėme techninio metilo spirito ir vandens mišiniu (1:1; 5 ml), išdžiovinome vakuume virš P₂O₅. Gavome CBZ-L-Phe-L-PheOx sin- ir anti-izomerų mišinį.

25

30

f stadija

CBZ-L-Phe-L-PheOx (500 mg) ištirpinome metanolyje (130 ml) ir kietą netirpią nuosėdą atskyrėme filtruojant. Pritaikant, kuriame buvo metanolinis oksimo tirpalas, prapūtėme azotu ir į jį įdėjome katalizatorių - 10 % paladij ant aktyvuotos anglies (83 mg). Po to į her-

35

metizuotą indą 30 min leidome vandenilį, vėliau katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, žemesnėje nei 30°C temperatūroje. Tirpiklio liekanas pašalinome siurblio sudarytame aukštame vakuume. Liekaną džiovinome vakuume virš P₂O₅. Gavome L-fenilalanil-L-fenilalanil oksimą (L-Phe-L-PheOx).

6 PAVYZDYS. L-alanil-D-fenilalanil semikarbazonas

10

a ir b stadijos

D-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetatinė druska buvo sintezuojama taip pat, kaip tai nurodyta 4 pavyzdyje (a ir b stadijos).

15

c stadija

A) D-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetatinę druską (5,000 g) ištirpinome sausame THF (20 ml). Į gautą tirpalą lėtai pridėjome N-metilmorfoliną (1,578 g), palaikant žemesnę nei 30°C temperatūrą, gautą mišinį atšaldėme iki 0°C.

20

B) CBZ-L-Ala (3,463 g) maišant ištirpinome sausame THF (40 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -10°C, po to į jį pridėjome per 5 min -10°C temperatūroje izobutilchloroformiatą (2,158 g), per 10 min N-metilmorfoliną (1,578 g) ir reakcijos mišinį -10°C temperatūroje maišėme dar 10 min.

25

30

C) -10°C temperatūroje per 10 min sumaišėme A ir B tirpalus, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme dar 3 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C, pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilaminą (1,585 g) ir baigėme reakciją pridėdami vandenį (50 ml). Po to į reakcijos mišinį pridėjome etil-

35

acetatą (50 ml), atskyrėme organinę fazę ir vandeninį sluoksnį ekstrahavome etilacetatu (2x30 ml). Organinius sluoksnius apjungėme ir nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (50 ml) ir sočiu NaCl tirpalu (10 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 50 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 50 ml) ir (d) vandeniu (3x50 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume ir esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Kieta liekaną perkristalinome iš etilacetato. Gavome CBZ-L-Ala-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.

d stadija

CBZ-L-Ala-D-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (2,9 g) ištirpinome sausame THF (25 ml) ir tirpalą atšaldėme azoto atmosferoje iki -70°C. Po to į jį per 10 min -70°C temperatūroje pridėjome diizobutilaliuminio hidrido tirpalą (1 M, 37 ml) ir maišymą tęsėme dar 10 min.

Reakciją nutraukėme pildami mišinį į sotų Segneto druskos (125 ml) ir THF (125 ml) mišinį, prapučiant azotą ir maišant -30°C temperatūroje, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros. Pridėjome etilacetatą (100 ml) ir organinį sluoksnį atskyrėme. Vandeninį sluoksnį ekstrahavome etilacetatu (2x30 ml), organinius sluoksnius apjungėme ir praplovėme vandeniu (3x30 ml). Reakcijos mišinį filtravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Pridėjome šviežią etilacetatą ir po to vėl jį pašalinome. Gavome CBZ-L-Ala-D-Phe aldehidą.

e stadija

A) CBZ-L-Ala-D-Phe aldehidą (1,2 g) ištirpinome THF (20 ml) ir techniniame metilo spirite (20 ml), tirpalą pašildėme iki 50°C.

B) Karštą semikarbazono hidrochlorido (1,8 g) tirpalą vandenyje (15 ml) pridėjome į karštą KHCO_3 (1,5 g) tirpalą vandenyje (15 ml).

5 C) Tirpalą B maišant pridėjome į tirpalą A ir gautą mišinį maišėme 4 val 50°C temperatūroje. Po to tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Prie liekanos pridėjome vandenį (50 ml), kieta produktą nufiltravome, 10 praplovėme vandens ir techninio metilo spirito mišiniu (1:1) ir išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome CBZ-L-Ala-D-PheSc.

f stadija

15

CBZ-L-Ala-D-PheSc (750 mg) ištirpinome metanolyje (50 ml) ir netirpią liekaną nufiltravome. Prietaisą su metanoliniu tirpalu prapūtėme azotu ir įdėjome į jį katalizatorių - 10 % paladij ant aktyvuotos anglies 20 (100 mg). Į hermetizuotą sistemą 90 min leidome vandenilį. Po to katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Liekaną džiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome L-alanil-D-fenilalanil 25 semikarbazoną (L-Ala-D-PheSc).

7 PAVYZDYS L-tirozinil-L-fenilalanil semikarbazonas

a ir b stadijos

30

L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską sintetavome taip pat, kaip ir 4 pavyzdyje (a ir b stadijos).

c stadija

5 A) L-Phe-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetato druską (7.95 g) maišant kambario temperatūroje ištirpinome DMF (30 ml), po to į tirpalą per 5 min pridėjome N-metilmorfoliną (2,49 g), palaikant žemesnę nei 30°C temperatūrą, ir mišinį atšaldėme iki 0°C.

10 B) CBZ-OBZ-L-Tyr (10 g) maišant ištirpinome sausame DMF (60 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -10°C, po to, per 5 min toje pat temperatūroje pridėjome izobutilchloroformiatą (3,39 g). Po to per 10 min į mišinį pridėjome N-dimetilmorfoliną (2,49 g) ir maišėme jį dar 10 min -10°C temperatūroje.

15

C) Per 15 min tirpalą A pridėjome į tirpalą B -10°C temperatūroje, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme 3 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C ir per 5 min pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilaminą (2,52 g). Į gautą mišinį pridėjome vandenį (50 ml) ir etilacetatą (50 ml), viršutinį organinį sluoksnį atskyrėme ir nuosekliai praplovėme jį (a) vandeniu (50 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 50 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 M, 25 50 ml) ir (d) vandeniu (3x30 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, ir liekaną perkristalinome iš izopropilo spirito. Gavome CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą.

30

d stadija

35 CBZ-OBZ-Tyr-L-Phe-O,N-dimetilhidroksamatą (1,012 g) ištirpinome sausame THF (10 ml). Į gautą tirpalą per 10 min, esant -70°C, azoto atmosferoje pridėjome diizobutilaliuminio hidrido tirpalą THF (1 M, 8,5 ml) ir maišymą tęsėme dar 10 min.

Tęsdami reakciją, maišant, esant -60°C temperatūrai, azoto atmosferoje mišinį pylėme į metanolį (20 ml) ir Segneto druskos tirpalą (30 ml) ir leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros. Po to į jį pridėjome vandenį (50 ml) ir etilacetatą (50 ml), organinę fazę atskyrėme ir praplovėme ją vandeniu (200 ml). Po to reakcijos mišinį filtravome ir tirpiklį iš jo pašalinome rotaciniame aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Po to pridėjome šviežią etilacetatą ir vėl jį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate. Kietą liekaną išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 ir gavome CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe aldehydą.

e stadija

- 15 A) CBZ-OBZ-L-Tyr-L-Phe aldehydą (400 mg) ištirpinome techniniame metilo spirite (20 ml) ir THF (1 ml) ir tirpalą pašildėme iki 60°C .
- 20 B) Karštą semikarbazono hidrochlorido (600 mg) tirpalą vandenyje (5 ml) pridėjome į karštą KHCO_3 (500 mg) tirpalą vandenyje (5 ml).
- 25 C) B tirpalą pridėjome į A tirpalą ir mišinį maišėme 2 valandas 60°C temperatūroje, po to tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, liekaną užpylėme vandeniu. Kietą medžiagą nufiltravome, praplovėme vandeniu ir techniniu metilo spiritu ir išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome CBZ-OBZ-L-Tyr-L-PheSc.
- 30

f stadija

- 35 CBZ-OBZ-L-Tyr-PheSc (770 mg) ištirpinome sausame THF (70 ml), tirpalą filtravome ir į filtratą pridėjome metanolį (20 ml). Prietaisą su semikarbazono tirpalu prapūtėme azotu ir į jį įdėjome katalizatorių - 10 %

paladi ant aktyvuotos anglies (100 mg). Į hermetizuotą sistemą kelias valandas leidome vandenilį, po to katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį išgarinome. Gavome L-tironizil-L-fenilalanil semikarbazoną (L-Tyr-L-PheSc).

5

8 PAVYZDYS. L-alanil-L-cikloheksilalanil semikarbazonas

a stadija

10 A) Į sausą DMF (75 ml) maišant pridėjome O,N-dimetilhidroksilamino hidrochloridą (8,51 g), o po to per 5 min N-metilformaliną, palaikant žemesnę nei 30°C temperatūrą. Iškritusias baltas nuosėdas ir mišinį atšaldėme iki 0°C.

15

B) N-t-Boc-L-Cha (22,5 g) ištirpinome sausame THF (200 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -10°C. Po to per 5 min, palaikydami -10°C temperatūrą, į jį pridėjome izobutilchloroformiatą (11,94 g), o po to per 10 min toje pat temperatūroje pridėjome N-metilmorfoliną ir maišymą tęsėme dar 10 min.

20

C) Per 15 min, esant -10°C, suspensiją A pridėjome į suspensiją B, leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišėme jį 4 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C ir per 5 min pridėjome 3-dimetilamino-propilaminą (8,6 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min. Po to pridėjome vandenį (200 ml) ir etilacetatą (100 ml), vandeninį sluoksnį atskyrėme ir ekstrahavome jį etilacetatu (2x100 ml). Apjungtas organines fazes nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (100 ml) ir sočiu NaCl tirpalu (20 ml), (b) vandeniniu KHCO₃ tirpalu (5 %, 100 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 100 ml) ir (d) vandeniniu (3x100 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome N-t-Boc-L-Cha-O,N-dimetilhidroksamatą.

25

30

35

b stadija

5 min 0°C temperatūroje maišėme N-t-Boc-L-Cha-O,N-dimetilhidroksamato (26 g) ir trifluoracto rūgšties (65 ml) mišinį, po to leidome jam sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme 3 val. Trifluoracto rūgšties perteklių pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate vakuume, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Prie liekanos pridėjome dietilo eterį ir iš gauto tirpalo vakuume nudistiliavome eterį. Eterinį apdirbimą kartojojome, kol gavome aliejinio skysčio pavidalo L-Cha-N,O-dimetilhidroksamato trifluoracetatinę druską.

c stadija

15

A) L-Cha-O,N-hidroksamato trifluoracetatinę druską (17 g) ištirpinome sausame THF (50 ml). Į gautą tirpalą per 5 min pridėjome N-metilmorfoliną (3,95 g), palaikant temperatūrą žemiau nei 30°C, ir po to mišinį atšaldėme iki 0°C.

20

B) CBZ-L-Ala (9,25 g) maišant ištirpinome sausame THF (100 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -10°C. Po to per 5 min, esant -10°C temperatūrai, pridėjome į jį izobutilchloroformiatą (5,85 g), ir per 10 min N-metilmorfoliną (3,95 g) ir po to reakcijos mišinį maišėme dar 10 min -10°C temperatūroje.

25

C) Per 15 min -10°C temperatūroje tirpalą A pridėjome į tirpalą B, leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme 3 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C per 5 min, pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilaminą (3,98 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min. Po to pridėjome vandenį (150 ml) ir etilacetatą (150 ml), atskyrėme vandeninę fazę ir ekstrahavome ją etilacetatu (2x75 ml). Apjungtas organines fazes nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (125 ml), (b) vande-

30

35

niniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 125 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 125 ml) ir (d) vandeniu (3x125 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Pridėjome šviežią
 5 etilacetatą ir po to jį nudistiliavome. Gavome CBZ-L-Ala-L-Cha-O,N-dimetilhidroksamatą.

d stadija

10 CBZ-L-Ala-L-Cha-O,N-dimetilhidroksamatą (7,22 g) ištirpinome azoto atmosferoje sausame THF (160 ml) ir tirpalą atšaldėme iki -70°C , po to per 20 min azoto atmosferoje ir -70°C temperatūroje į jį pridėjome diizobutilaliuminio hidrato tirpalą THF (1 M, 86 ml) ir maišymą tęsėme dar 20 min.
 15

Reakciją baigėme 0°C temperatūroje ir azoto atmosferoje supildami maišant į Segneto druskos tirpalą (400 ml), po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros. Po to į jį pridėjome etilacetatą ir maišėme
 20 5 min bei filtravome, atskyrėme organinį sluoksnį ir vandeninę fazę ekstrahavome etilacetatu (2x50 ml). Apjungtas organines fazes plovėme vandeniu (3x200 ml), paskutiniame praplovime pridėjome sotų NaCl tirpalą.
 25 Tirpiklį pašalinome rotaciniame išdžiovinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome CBZ-L-Ala-L-Cha aldehidą.

e stadija

30 A) CBZ-L-Ala-L-Cha aldehidą (8 g) ištirpinome techniniame metilo spirite (50 ml) ir tirpalą pašildėme iki 50°C .
 35 B) Į karštą tirpalą KHCO_3 (2,67 g) tirpalą vandenyje pridėjome karštą semikarbazido hidrochlorido (3,0 g) tirpalą vandenyje (25 ml).

C) Tirpalą B pridėjome į tirpalą A ir 50°C temperatūroje mišini maišėme 3 val, po to mišinį atšaldėme ir palikome stovėti per naktį 4°C temperatūroje. Didžiąją dalį techninio metilo spirito pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, ir prie liekanos pridėjome etilacetatą (50 ml). Organinę fazę atskyrėme ir praplovėme ją nuosekliai (a) vandeniu, (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 30 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 30 ml) ir (d) vandeniu (2x50 ml), esant reikalui, pridodant sotaus NaCl tirpalo fazių atskyrimo palengvinimui. Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Kietą liekaną perkristalinome iš izopropanolio. Gavome CBZ-L-Ala-L-ChaSc.

f stadija

CBZ-L-Ala-L-ChaSc (900 mg) azoto atmosferoje ištirpinome metanolyje (30 ml) ir į tirpalą pridėjome katalizatorių - 10 %-nį paladi ant aktyvuotos anglies. Į hermetizuotą sistemą 6 val leidome vandenilį, po to katalizatorių nufiltravome, tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, o kietą liekaną praplovėme eteriu ir išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome L-alanil-L-cikloheksilalanil semikarbazoną (L-Ala-L-ChaSc).

9 PAVYZDYS. L-alanil-L-leucinil semikarbazonas

a stadija

A) O,N-dimetilhidroksilamino hidrochloridą (9,17 g) maišant kambario temperatūroje pridėjome į sausą DMF (110 ml), po to per 5 min, palaikydami žemesnę nei 30°C temperatūrą, į mišinį pridėjome N-metilmorfoliną (9,51 g). Susidariusias nuosėdas ir mišinį atšaldėme iki 0°C.

B) N-t-Boc-L-Leu (23,3) ištirpinome sausame THF (220 ml) ir atšaldėme tirpalą iki -10°C , po to per 5 min, palaikant mišinio temperatūrą -10°C , pridėjome izobutilchloroformiatą. Po to per 10 min, palaikant -10°C temperatūrą, pridėjome N-metilmorfoliną, ir maišymą tęsėme dar 10 min.

C) Per 15 min -10°C temperatūroje suspensiją A pridėjome į suspensiją B. Mišiniui leidome sušilti iki kambario temperatūros ir maišėme jį 3 val, po to atšaldėme iki 0°C ir per 5 min pridėjome 3-dimetilaminopropanaminą (9,13 g) ir maišymą tęsėme dar 5 min. Po to į mišinį pridėjome etilacetatą (110 ml) ir vandenį (110 ml), organinį sluoksnį atskyrėme ir nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (2x100 ml), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 100 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 100 ml) ir (d) vandeniu (3x100 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Gavome N-t-Boc-L-Leu-O,N-dimetilhidroksamatą.

b stadija

N-t-Boc-L-Leu-O,N-hidroksamato (23,4 g) ir trifluoracto rūgšties (165 ml, atšaldyta iki 0°C) mišinį 18 val maišėme kambario temperatūroje. Trifluoracto rūgšties perteklių pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, prie liekanos pridėjome dietilo eterį ir eterį iš gauto tirpalo pašalinome vakuume. Šią operaciją kartojome tol, kol prasidėjo kristalizacija 4°C temperatūroje. Gavome L-Leu-O,N-dimetilhidroksamato trifluoracetatinę druską.

c stadija

35

A) L-Leu-O,N-dimetilhidroksamatą (1,8 g) maišant kambario temperatūroje ištirpinome sausame THF (10 ml). Po

to mišinį atšaldėme iki 0°C ir per 5 min į jį pridėjome N-metilmorfoliną (0,695 g).

5 B) CBZ-L-Ala (1,40 g) ištirpinome sausame THF (20 ml) ir gautą tirpalą atšaldėme iki -10°C , po to toje pačioje temperatūroje per 5 min į jį pridėjome izobutilchloroformiatą (0,869 g), per 10 min N-metilmorfoliną (0,635 g) ir toje pat temperatūroje mišinį maišėme dar 10 min.

10

C) Per 15 min, -10°C temperatūroje tirpalą A pridėjome į tirpalą B, po to leidome mišiniui sušilti iki kambario temperatūros ir maišymą tęsėme dar 18 val. Po to mišinį atšaldėme iki 0°C , pridėjome į jį 3-dimetilaminopropilaminą (0,64 g) ir reakciją baigėme pridėdami vandenį (25 ml) ir etilacetatą (25 ml). Vandeningą fazę atskyrėme ir ekstrahavome ją etilacetatu (2x25 ml). Apjungtas organines fazes nuosekliai praplovėme (a) vandeniu (50 ml) ir sočiu vandeniniu NaCl tirpalu (perskyrimo palengvinimui), (b) vandeniniu KHCO_3 tirpalu (5 %, 30 ml), (c) vandeniniu HCl tirpalu (0,5 N, 30 ml) ir (d) vandeniu (3x30 ml). Tirpiklį pašalinome rotaciniame aparate, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, ir kietą liekaną džiovinome vakuume virš P_2O_5 .
25 Gavome CBZ-L-Ala-L-Leu-O,N-dimetilhidroksamatą.

d stadija

30 CBZ-L-Ala-L-Leu-O,N-dimetilhidroksamatą (1,9 g) azoto atmosferoje ištirpinome sausame THF (40 ml) ir gautą tirpalą atšaldėme iki -70°C , po to, taip pat azoto atmosferoje ir -70°C temperatūroje, per 10 min į jį pridėjome diizobutilaliuminio hidrido tirpalą THF (1 M, 29,5 ml) ir maišymą tęsėme dar 10 min.

35

Reakciją užbaigėme, maišant -60°C temperatūroje ir azoto atmosferoje, pridedant metanolį (50 ml) ir Segneto

druskos tirpalą (50 ml). Mišiniui leidome sušilti iki kambario temperatūros, pridėjome į jį vandenį (50 ml) ir etilacetatą (50 ml), nufiltravome, atskyrėme vandeninį sluoksnį ir ekstrahavome jį etilacetatu (2x50 ml).
5 Apjungtas organines fazes praplovėme vandeniu (3x100 ml) ir sočiu NaCl tirpalu (atskyrimo palengvinimui). Po to tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo prietaise, esant žemesnei nei 30°C temperatūrai, pridėjome šviežią etilacetatą ir jį pašalinome rotaciniame išgarinimo
10 aparate. Gavome CBZ-L-Ala-L-Leu aldehydą.

e stadija

15 A) CBZ-L-Ala-L-Leu aldehydą (6,7 g) ištirpinome techniniame metilo spirite (50 ml) ir pašildėme iki 50°C.

B) Į karštą semikarbazido hidrochlorido (10,8 g) tirpalą vandenyje (30 ml) pridėjome karštą KHCO₃ tirpalą (9 g) vandenyje (30 ml).

20

C) Tirpalą B pridėjome į tirpalą A ir mišinį maišėme 50°C temperatūroje 3 val, po to jį palikome nakčiai kambario temperatūroje. Po to kietas iškritusias nuosėdas nufiltravome, praplovėme techninio metilo spirito
25 ir vandens mišiniu (1:1) ir džiovinome vakuume virš P₂O₅. Gavome CBZ-L-Ala-L-LeuSc.

f stadija

30 CBZ-L-Ala-L-LeuSc (950 mg) ištirpinome metanolyje (100 ml) ir netirpią liekaną nufiltravome. Į tirpalą pridėjome dar 50 ml metanolio ir prietaisą prapūtėme azotu, po to azoto atmosferoje į jį idėjome katalizatorių - 10 %-nį paladij ant aktyvuotos anglies (100 mg) ir į hermetizuotą sistemą 135 min leidome vandenilį. Po to katalizatorių nufiltravome ir tirpiklį pašalinome rotaciniame išgarinimo aparate, esant žemesnei nei 30°C
35

esant žemesnei nei 30°C temperatūrai. Kieta liekana išdžiovinome vakuume virš P_2O_5 . Gavome L-alanil-L-leucinil semikarbazoną (L-Ala-L-LeuSc).

5 **10 PAVYZDYS. Afininės chromatografijos matricos ECH-Sepharose 4B su aktyviais L-Ala-L-PheSc centrais gavimas**

10 ECH-Sepharose ^RAB (3 g drėgno svorio) sukepto stiklo
filtre praplovėme vandeniniu NaCl tirpalu (0,5 M, 240 ml)
ir po to vandeniu (120 ml). Paruošėme 0,1 M N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimido hidrochlorido (EDC) tirpalą vandenyje ir, pridėdami į jį druskos rūgštį arba kieta natrio acetatą, nustatėme jo pH=4,5. L-Ala-L-PheSc (10 mg), gautą pagal 1 pavyzdžio aprašymą, ištirpinome metanolyje (400 ml), ir paruoštą tirpalą, kartu su vandeniniu EDC tirpalu (0,1 M, 2,4 ml) pridėjome į praplautą gelį. Mišinį 20°C temperatūroje atsargiai maišėme vieną valandą, esant reikalui, koregavome pH reikšmę iki aukščiau nurodyto dydžio ir maišymą tęsėme dar 23 val 20°C temperatūroje. Po to į jį pridėjome L-gliciną iki 1 M galutinės koncentracijos ir maišymą tęsėme dar 3 val. Gautą afininės chromatografijos gelį nuosekliai praplovėme vandeniniu metanolio tirpalu (50 %, 60 ml), vandeniu (60 ml) ir darbinio buferiu (60 ml) ir iki naudojimo laikėme 4°C temperatūroje.

30 **11-18 PAVYZDŽIAI. Afininės chromatografijos matricos gavimas**

35 Kiekvieną iš dipeptidų darinių, gautų pagal 2-9 pavyzdžius, jungėme su gelio matrica tuo pačiu būdu, kaip tai aprašyta 10 pavyzdyje. Gavome afininės chromatografijos gelius (atitinkamai 11-18 pavyzdžiai).

19 PAVYZDYS. Afininė chromatografija

Išpurškimo džiovintuve išdžiovintą papajos lateksą (0,03 g baltymo) (firma Powel and Scholefield, Didžioji Britanija) "darbiniam" buferyje (natrio fosfatas (50 mM): EDTA (1 mM); etandiolis (33 %), pH=6,8) su ditiotreitolu (2 mM) arba cisteino (4 mM) (1,5 ml) priedais praleidome pro afininės chromatografijos matricos kolonėles (1 ml), atitinkančias 10-18 pavyzdį. Naudojome bent vieną iš žemiau pateiktų penkių eliuentų:

Eliuentas A = hidroksietildisulfidas (100 mM) vandeniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM), pH=4,5; naktį prieš eliuavimą kolonėlę pervesdavome į pusiausvyrinį būvį.

Eliuentas B = 2,2'-dipiridildisulfidas (30 mM) vandeniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM), pH=4,5; naktį prieš eliuavimą kolonėlę pervesdavome į pusiausvyrinį būvį.

Eliuentas C = metilpiridildisulfidas (30 mM) vandeniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio citratą (50 mM) ir EDTA (1 mM), pH=4,5; naktį prieš eliuavimą kolonėlę pervesdavome į pusiausvyrinį būvį.

Eliuentas D = mersalilo rūgštis (10 mM) vandeniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio hidroksidą (50 mM) ir EDTA (25 mM), pH=4,5, nustatomas acto rūgštimi; nepertraukiamas eliuavimas.

Eliuentas E = HgCl_2 (10 mM) vandeniniame etandiolio (33 %) tirpale, turinčiame natrio acetatą (50 mM), pH=4,5; nepertraukiamas eliuavimas.

- 5 Eliuavimą kiekvienu eliuentu tikrinome nustatant A_{280} pėdsakus eliuatė po standartinės ir Mono S (Pharmacia) chromatografijos. Rezultatai pateikti žemiau pateiktoje 1 lentelėje.

10 **1 lentelė**

Chimopapaino surišimas ir eliuavimas

Inhibuojantis peptidas	Matrica Pavyzdžio Nr.	Eliuentas				
		A	B	C	D	E
L-Ala-L-PheSc	10	-	N	+	+	+
L-Phe-L-PheSc	11	-	+	+	+	+
L-Phe-L-PheMo	12	-	+	N	N	N
L-Phe-D-PheSc	13	-	N	+	+	+
L-Phe-L-PheOx	14	+	+	N	N	N
L-Ala-D-PheSc	15	+	N	N	+	N
L-Tyr-L-PheSc	16	+	N	N	+	N
L-Ala-L-ChaSc	17	+	N	N	N	+
L-Ala-L-LeuSc	18	+	N	N	N	+

- 15 + suriša ir eliuuoja chimopapainą

- nesuriša ir/arba neeliuoja chimopapaino

N - nenustatinėjome

20 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas

(I) Prekyboje esanti išpurškimo džiovintuve išdžiovintą Carica papaya lateksą (1 g) (gaminamą firmos Powell and Scholefield, Didžioji Britanija) vieną valandą maišėme su distiliuotu vandeniu (5 ml). Neištirpusią liekaną atskyrėme centrifuguojant 30 min esant 9000 x g ir 4°C. Virš nuosėdų buvusio skysčio pH=1,8 reikšmę nustatėme per 20 min pridėdami druskos rūgštį (1 M). Maišymą 4°C temperatūroje tęsėme dar 60 min ir, esant reikalui, koregavome pH dydį iki nurodytos reikšmės.

(II) Mišinį centrifugavome 30 min, esant 9000xg ir 4°C, ir granules atmetėme.

(III) (a) Virš nuosėdų buvusio skysčio pH=6,8 nustatėme per 10 min pridėdami lašais į jį NaOH (5 M). Tirpalas nusidažydavo mėlynai-violetine spalva.

(b) Gautą mėlynai-violetinį tirpalą dializavome su 10 tūrių "darbinio" buferio (natrio fosfatas (50 mM); EDTA (1 mM); etandiolis (33%), pH=6,8, triskart keisdami buferį. Dializatą centrifugavome 10 min, esant 4000 x g, nudekantavus virš nuosėdų buvusį skystį, turintį chimopapainą, jame nustatėme baltymų kiekį apie 30 mg/l. Chimopapaino tirpalą aktyvavome pridėdami į jį cisteiną iki 4 mM koncentracijos ir palikome stovėti 15 min 0°C temperatūroje.

(IV) Aktyvuotą chimopapaino tirpalą praleidome pro 8 ml kolonėlę su ECH-Sepharose^R, kuri buvo surišta su L-Ala-L-PheSc, kuri buvo gauta, kaip tai aprašyta 10 pavyzdyje); kolonėlė prieš tai buvo pervesta į pusiausvyrinį būvį su darbiniu buferiu, greitis 36 ml/cm²/val. Po to kolonėlę nuosekliai praplovėme darbiniu buferiu (jo kiekis buvo lygus dvigubam gelio tūriui kolonėlėje), vandeniniu natrio citrato (50 mM) tirpalu

etandiolyje (33%), pH=4,5 (kiekis buvo lygus dvigubam gelio kiekiui kolonėlėje) ir vandeniniu natrio acetato (50 mM), EDTA (25 mM), mersalilo (10 mM) tirpalu etandiole (33%), pH=4,5 (kiekis buvo lygus dvigubam gelio tūriui kolonėlėje) ir po to laikėme 2 val kambario temperatūroje.

(V) Chimopapainą eliuavome vandeniniu natrio acetato (50 mM) tirpalu, turinčiu mersalilą (10 mM) (kiekis lygus trigubam gelio tūriui kolonėlėje), atrinkome frakcijas po 4 ml, fermentinį aktyvumą atrinktose eliuato frakcijose nustatinėjome matuojant išdžiovintų pavyzdžių specifinį aktyvumą BAPNA atžvilgiu.

15 Aktyvias frakcijas apjungėme ir toliau valėme katijoninės chromatografijos pagalba kolonėlėje, kuri buvo užpildyta Mono-S HR^R 10/10 (Pharmacia). Eliuavimą atlikome panaudodami "pradinį" fosfatinį buferį (Na^+ (50 mM); EDTA (1 mM), NaN_3 (0,01%), pH=7,2, ir "galutinį" fosfatinį buferį (Na^+ (800 mM), EDTA (1 mM), NaN_3 (0,01%) ir pH=7,2). Eliuavimą vykdėme esant druskos gradientui 2,7 mM/ml ir tekėjimo greičiui 2 ml/min. Atrinkome frakcijas po 4 ml ir baltymų koncentraciją jose nustatėme pagal sugerimą prie 280 nm, o fermentinį aktyvumą - pagal BAPNA hidrolizę.

30 Frakcijas, turinčias chimopapainą, apjungėme ir dializavome distiliuotame ir dejonizuotame vandenyje arba vandeniniame EDTA tirpale (1 mM). Po to atlikome sublimacinį džiovinimą ir produktą laikėme tokia pa-
vidale.

21 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas - BAPNA analizės rezultatai

35

(I) Prekyboje esantį išpurškimo džiovintuve išdžiovintą Carica papaya (1 g) lateksą (gaminamą formos Powell and

Scholefield, Didžioji Britanija) 60 min maišė su vandeniu (5 ml). Neištirpusią liekaną atskyrėme centrifuguojant 30 min, esant 900 x g ir 4°C, ir atmetėme. Virš nuosėdų buvusio skysčio pH=1,8, nustatėme per 20 min pridėdami druskos rūgštį (1 M). Maišymą 4°C temperatūroje tęsėme 15 min, kas 5 min tikrindami pH reikšmę ir, esant reikalui, ją koreguodami.

(II) Iškritusias nuosėdas atskyrėme centrifuguojant 30 min, esant 9000 x g ir 4°C.

(III) (a) Virš nuosėdų buvusio skysčio pH=7,0 nustatėme maišant ir lašais pridėdant vandeninį natrio hidroksido tirpalą (5 M). Iškritusias nuosėdas atskyrėme centrifuguojant 30 min, esant 9000 x g ir 4°C.

(b) Virš nuosėdų buvusį skystį praleidome pro kolonėlę, užpildytą katijonitine derva Mono S HR 10/10 (Pharmacia), kuri prieš tai buvo pervesta į pusiausvyrinį būvį vandeniniu $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (50 mM Na^+) tirpalu, turinčiu EDTA (1 mM), kurio pH=7,2 (buferis A). Po to kolonėlę plovėme buferiu A (tekėjimo greitis 2 ml/min) iki tol, kol A_{280} dydis pasidarė lygus 0. Po to pro kolonėlę praleidome $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ iki 0,80 M Na^+ koncentracijos, esant gradientui 2,7 mM Na^+/ml ir atrinkome frakcijas po 4 ml. Buvo tikrinamas frakcijų aktyvumas BAPNA atžvilgiu. Didysis chimopapaino pikas, nustatytas imunologiškai, eliuavosi esant 0,17-0,28 Na^+ . Aktyvias BAPNA atžvilgiu frakcijas atrinkome ir apjungėme bei pridėjome tokį etandiolio kiekį, kad jo koncentracija būtų 33 tūrio %. Visas kitas frakcijas, įskaitant aktyvias BAPNA atžvilgiu, kurios buvo surinktos paskutinėse eliuavimo stadijose (0,47-0,59 M Na^+) su proteinazės III piku, atmetėme.

(IV) Kolonėlę (sluoksnio tūris 15 ml) su ECH-Sepharose^R, kuri buvo sujungta su L-Ala-L-PheSc (kai buvo

gauta, kaip tai aprašyta 10 pavyzdyje) praplovėme vandeniniu $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tirpalu, turinčiu EDTA (1 mM) etandiolyje (33 tūrio %), kurio $\text{pH}=6,8$ (darbinis buferis). Tekėjimo greitis buvo 39 ml/val/cm^2 . Apjungtas chimopapainą turinčias (žr. aukščiau) frakcijas aktyvavome pridėdami cisteiną laisvos bazės formoje (galutinė koncentracija 4 mM) ir palikome stovėti 15 min 0°C temperatūroje. Po to tirpalą praleidome pro kolonėlę, o vėliau pro kolonėlę praleidome 60 ml darbinio buferio.

(V) Po to pro kolonėlę praleidome natrio acetato buferį (50 mM), $\text{pH}=4,5$, turintį HgCl_2 (10 mM, 45 ml). Atrinkome frakcijas po 5 ml. Atrinktose frakcijose nustatėme aktyvumą BAPNA atžvilgiu.

Frakcijas su aktyvumo piku, kurios buvo sulaikomos kolonėlėje ir eliuuojamos su buferiu, turinčiu HgCl_2 , apjungėme ir vėl praleidome pro Mono-S užpildytą kolonėlę. Po to kolonėlę praplovėme buferiu A, po to pro ją praleidome buferį A, turintį cisteiną laisvos bazės formoje (4 mM) (tūris buvo lygus septyngubam smalos sluoksnio tūriui). Praleidimą nutraukėme 30 min, kad susidarytų sąlygos išstumti gyvsidabrį iš fermento. Po to praleidimą tęsėme ir dar kartą praplovėme buferiu A (prieš tai pro kolonėlę praleidome $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ gradientą iki $0,80 \text{ M Na}^+$, kaip tai aprašyta aukščiau). Aktyvias BAPNA atžvilgiu frakcijas apjungėme, pridėjome į jas cisteiną laisvos bazės formoje (galutinė koncentracija 4 mM) ir palikome stovėti 15 min 0°C temperatūroje.

Į kolonėlę idėjome Chelex smalą (Bio-Rad, Didžioji Britanija; 0,5 g) ir praplovėme ją buferiu A. Apjungtas chimopapainą turinčias frakcijas praleidome pro Chelex užpildytą kolonėlę ir iš kolonėlės išėjusį tirpalą

dializavome vandeniniame EDTA (1 mM) tirpale. Džiovinome sublimacinio džiovinimo būdu.

5 Chimopapaino išvalymo efektyvumą iliustruoja 2 lentelės duomenys.

2 lentelė

Chimopapaino valymas

	Baltymas (mg)	Aktyvumas* BAPNA atžvilgiu (vienetai)	Santykinis aktyvumas* BAPNA atžvilgiu (vienetai mg ⁻¹)	Išeiga** (%)	Išvalymo laipsnis
Išpurškimo džiovintuve išdžiovintas lateksas	441	493,712	1,120	100	1
Apdorojimas rūgštimi	361	238,636	661	48	0,59
Katijonitinė chromatografija	58	133,748	2,306	27	2,06
Sepharose-L-Ala-L-PheSc	27,5	112,475	4,090	23	3,65
Katijonitinė chromatografija	11	44,687	4,062	9	3,63
Chelex	10,5	43,301	4,124	9	3,68

* BAPNA analizė, Metodika Nr. 2

** pateikta išeiga yra aktyvumo BAPNA atžvilgiu išeiga (įskaitant papaino ir papajos proteinazės III substratą)

22 PAVYZDYS. Specifinių chimopapaino atžvilgiu IgG antikūnų, inicijuotų triušiuose, gavimas

Švarų chimopapainą, gautą pagal 21 pavyzdžio aprašymą, prieš jo panaudojimą metode, aprašytame Zucker ir kt. (1985) (žr. aukščiau cituotą darbą), karboksimetilino švelniomis sąlygomis. Chimopapaino antiserumą triušyje inicijavome įveddami į raumenis 360 µg karbometilinto baltymo pilname Freund'o adjuvante, dvi savaitės prieš tai po oda buvome įvedę 100 µg nepilname adjuvante. IgG iš dalies valėme nuo serumo frakcionuojant su amonio sulfatu, kaip tai aprašyta Heide ir Schwick (1978) (žr. aukščiau cituotą darbą), o po to dializavome vandeniniame natrio fosfato tirpale (10 mM), turinčiame NaCl (0,14 M), pH=7,3.

23 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas ir kiekybinė imunologinė chimopapaino ir PPIV analizė

(I-III) Prekyboje esantį išpurškimo džiovvykloje išdžiovintą Carica Papaya lateksą (gaminamą firmos Powell and Scholefield, Didžioji Britanija) gaminome ir apdirbome prie pH=1,8 pagal 21 pavyzdžio aprašymą (I-IIIa).

(IV) Kolonėlę (sluoksnio tūris 15 ml), užpildytą ECH-Sepharose^R, kuri surišta su L-Ala-L-PheSc (paruošta pagal 10 pavyzdyje aprašytą metodiką) praplovėme pagal 21 pavyzdžio aprašymą (IV). Po apdirbimo prie pH=1,8 virš nuosėdų gautą skystį dializavome vandeniniame NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM Na⁺) tirpale, turinčiame EDTA (1 mM) etandiolyje (33 tūrio %), kurio pH=6,8 (darbinis buferis), 10 min centrifugavome, esant 4000x g) ir aktyvavome per 20 min pridėdami ditiotreitolą (galutinė koncentracija 2 mM) 20°C temperatūroje. Po to praleidome pro afininės chromatografijos kolonėlę (39 ml/val/cm²) ir vėliau praleidome dar 60 ml darbinio buferio. Po to pro kolonėlę praleidome natrio citrato buferį (50 mM), kurio

pH=4,5 ir kuris turi EDTA (1 mM) ir metilpiridilsulfidą (30 mM, 15 ml) (gautą pagal metodiką, kuri aprašyta Salih ir kt. Biochem. J. (1987), 247, 181-193). Tirpalo praleidimą sustabdėme ir disulfidą turintis buferis buvo paliktas kolonėlėje per naktį (18 val) 20°C temperatūroje.

(V) Praleidimą pro kolonėlę tęsėme, leisdami pro ją 45 ml to paties buferio, turinčio metilpiridildisulfidą, o po to 30 ml darbinio buferio, atrinkdami frakcijas po 5 ml.

Analizavome atrinktų frakcijų aktyvumą BAPNA atžvilgiu. Frakcija su aktyvumo pikų, kurios sulaikomos kolonėlėje ir eliuuojamos metilpiridildisulfidą turinčių buferiu, apjungėme ir praleidome pro Sephadex^R LH-20 (Pharmacia) kolonėlę (40 ml/val/cm²), kuri prieš tai buvo pervesta į pusiausvyrinį būvį vandeniniu EDTA (1 mM) tirpalu etandiolyje (33 tūrio %). Chromatografinį perskyrimą tęsėme leisdami pro kolonėlę 300 ml to paties buferio, atrinkdami frakcijas po 8 ml, kurias kontroliavome pagal ΔA_{271} ir nustatinėjome jų aktyvumą BAPNA atžvilgiu.

Frakcijas, turinčias aktyvumo piką BAPNA atžvilgiu (po kurio eina dar vienas pikas su A_{271}), apjungėme ir praleidome pro katijonitinę kolonėlę, užpildytą Mono S HR 10/10 derva, tolesnį apdirbimą atlikome taip pat, kaip tai aprašyta 21 pavyzdyje (III b). Frakcijas, pasižymėjusias aktyvumu BAPNA atžvilgiu, apjungėme.

Išpurškimo džiovykloje išdžiovintą lateksą ir medžiagą, gautą po apdirbimo prie pH=1,8 bei afininės chromatografijos ir katijonitinės chromatografijos, analizavome, norėdami nustatyti PPIV buvimą, paprastos radialinės imunodifuzijos metodu (žr. aukščiau). Tą patį metodą naudojome nustatant chimopapainą monospecifiniuose chimopapaino atžvilgiu antikūniuose, inicijuo-

tuose triušiuose, kurie buvo gauti pagal 22 pavyzdyje -
aprašytą metodiką. Kalibracinio grafiko sudarymui nau-
dojome chimopapainą, išvalytą pagal aukščiau aprašytus
metodus ir neturinti (pagal paprastos radialinės imu-
nodifuzijos duomenis) PPIV ir PPIII. Gauti rezultatai
5 pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė

Chimopapaino valymas ir chimopapaino ir PPIV kiekybinė imunologinė analizė

	Baltymas (mg)	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu* (vienetai mg ⁻¹)	Chimopapainas mg	PP(IV) (% nuo bendro baltymo kiekio)
Išpurškimo džiovvykloje				
išdžiovintas lateksas	468	1,000	144	18,7
Rūgštinis apdirbimas	157	1,433	92	<0,1
Sepharoze-L-Ala-L-PheSc	24	4,000	28	-
Katijonitinė chromatografija	15	3,533	14	-
				66

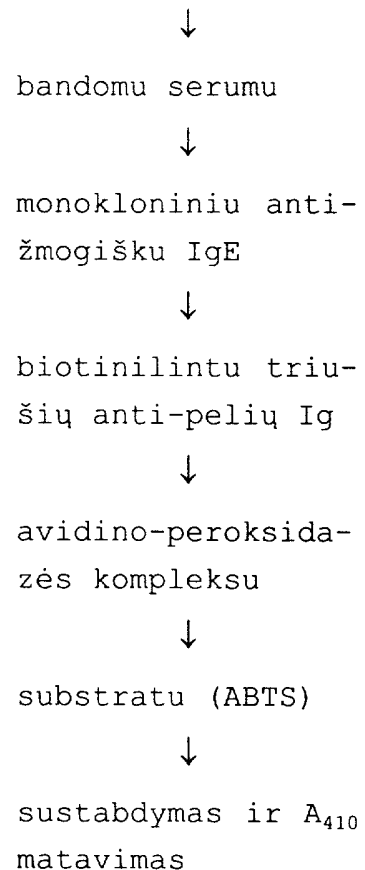
- = nenustatyta

* BAPNA analizė, Metodika Nr. 2

24 PAVYZDYS. Chimopapaino alergiško veikimo tyrimas

Iš 3M Diagnostic Systems, JAV gavome 40 žmogaus serumo pavyzdžių, su kuriais buvo atlikti komerciniai bandymai, žinomi Chymofost pavadinimu, su IgE, norint nustatyti prekyboje esančios chimopapaino formos Chymodiactin^R poveikį. Iš 40 pavyzdžių, išbandytų šiuo metodu, 20 buvo teigiami, o 20 - neigiami. Visi gauti pavyzdžiai buvo "akli" ir išbandyti natūralaus IgG antikūnio prieš Chymodiactin^R, PPIII, PPIV ir išvalytą chimopapainą įgavimo atžvilgiu (chimopapainas buvo išvalytas šiame išradime aprašytu būdu ir, pagal paprastos radialinės imunodifuzijos duomenis, neturėjo PPIV ir PPIII). Išbandymą atlikome modifikuotos kietafazės imunofermentinės analizės metodu (ELISA), panaudojant šios schemos biotino-avidino sistemą:

Mikrotitravimo plokštelės padengtos Bandomu antigenu



Naudojome Chymodiactin^R su nepasibaigusiu galiojimo terminu, PPIV valėme šioje paraiškoje aprašytu metodu, o PPIII-metodu, aprašytu Buttle ir Barrett (1984) (žr. aukščiau cituotą darbą). Visi antigenai prieš vartojimą
5 buvo inaktyvuoti švelniai karbosimetilinant jodacto rūgštimi (10 mM) pagal metodą, aprašytą Buttle ir Barrett (1984) (žr. aukščiau cituotą darbą).

Ant mikrotitravimo plokštelių figūrų užnešėme bandomo
10 antigeno dangą, tai buvo atliekama inkubuojant kiekvieną figūrą su 100 µl antigeno (10 mg/ml) ir natrio karbonato buferiu (0,05 M, pH=9,6). Nespecifinio surišimo sumažinimui vėlesnėse stadijose naudojome donorinį arklių serumą (4%). Po 4 val inkubacijos 37°C temperatūroje su tiriamu serumo tirpalu (skiedimas 1/20)
15 ir PBS (0,1% Tween, 2% arklių serumo, 10 mM EDTA, 50 µg/ml heparino, pH=7,2 (100 µl/figūrai), figūras laikėme dar 3 val 37°C temperatūroje su monokloniniu žmogaus IgE (gautu pagal metodiką, aprašytą Kemeny and
20 Richards, J. Immunol. Methods (1988), 108, 105; 1 µg/ml, 100 µl/figūrai), o po to per naktį kambario temperatūroje su biotilintu triušių antipelių imunoglobulinu (išleidžiamu firmos Dakopatts, Danija; 1 µg/ml, 100 µl/figūrai). Po to figūras inkubavome 30 min 37°C
25 temperatūroje su avidinperoksidaze (10 µl/ml, 100 µl/figūrai), pridėjome /2,2'-azinobis(3-etilbenztiazolino sulfoninės rūgšties)/, ABTS, 0,5 mg/ml/ buferyje (100 mM citrinos rūgšties, 200 mM Na₂HPO₄, pH=4,2, aktyvavimas 1 µl/ml H₂O) ir 30 min laikėme kambario temperatūroje.
30 Reakciją baigėme pridėdami 100 µl/figūrai 100 mM citrinos rūgšties, 0,01% NaNO₃. Matavome kiekvienos figūros absorbciją prie 410 nm, pasinaudodami Micro ELISA reader (Dynatech). Tuo pat metu analizavome IgE standartus 0,075-4,8 ng/ml koncentraciją intervale (2,4 ng
35 IgE koncentracija ekvivalentiška tarptautiniam IgE vienetui). IgE koncentracijų kiekvienos iš keturių antigeninių kompozicijų (Chimodiactin^R, PPIII, PPIV ir chi-

mopapainas, gautas pagal 23 pavyzdžio būdą) atžvilgiu skaičiavimui naudojome Enzfitter programą (Leatherbarrow, R.J., 1985, Enzfitter for IBM PC, Elsevier-Biosoft, 68 Hills Road, Cambrige CB2. 1LA, Didžioji Britanija).

5

26 iš 40 išbandytų serumo pavyzdžių turėjo IgE Chymodiactin^R antikūnius. Reikšmės, gautos 12 pavyzdžių su PPIII, PPIV ir chimopapainu, kurie pasižymėjo didžiausiu aktyvumu Chymodiactin^R atžvilgiu, pateiktos 4 lentelėje. Vidutinės reikšmės ir standartinės paklaidos apskaičiuotos 9 nustatymams.

10

Iš pateiktų duomenų matome, kad tik dviejuose iš šių 12 pavyzdžių, turinčių chimopapaino antikūnių, chimopapainas duoda pagrindinę IgE reakciją, ir kad PPIII ir PPIV antikūniai yra atsakingi už maždaug 75% rasto IgE.

15

25 PAVYZDYS. Chimopapaino ir PPIII mišinių inhibavimas vištų cistatinu

20

Chimopapainą valėme 23 pavyzdyje aprašytu būdu ir standartizavome titruodami aktyvius centrus reagentu E-64, substratu naudodami BAPNA (Zucker ir kt., 1985, Biochem. Biophys. Acta, 828, 196-204). Aukščiau aprašytu būdu valytą PPIV taip pat titravome reagentu E-64 (pagal modifikuotą metodiką, naudojant substratu azokazeiną).

25

2 formos vištų cisteiną valėme pagal metodiką, aprašytą Anastasi ir kt., 1983, Biochem. J., 211, 129-138, ir standartizavome titruojant papainu, kurį prieš tai nufiltravome reagentu E-64.

30

Azokazeino hidrolizės analizę vykdėme Rowan ir kt., 1988 (žr. aukščiau cituotą darbą) metodu su tuo skirtumu, kad, prieš pridėdami fermento substratą ir inhibitorių, tirpalą 15 min laikėme 40°C temperatūroje.

35

4 lentelė

IgE specifinės koncentracijos (IU/ml) serumo pavyzdžiuose, turinčiuose Chymodiactin^R IgE antikūnius

Pavyzdys	PPIV		PPIII		Chimopapainas		Bendras	Chimopapaino
	vidurkis	standartinis nuokrypis	vidurkis	standartinis nuokrypis	vidurkis	standartinis nuokrypis	kiekis	%
1	19,9	1,7	18,8	1,7	8,2	1,3	46,9	18
2	5,1	0,3	4,0	0,1	3,2	0,4	12,3	26
3	5,9	0,4	2,7	0,3	1,2	0,3	9,8	12
4	1,8	0,1	2,3	0,2	1,7	0,1	5,8	29
5	3,4	0,2	2,0	0,2	1,6	0,3	7,0	23
6	3,1	0,2	0,3	0,01	0,3	0,03	3,7	8
7	2,6	0,2	1,6	0,2	0,9	0,2	5,1	18
8	2,0	0,1	1,1	0,1	1,3	0,2	4,4	30
9	1,5	0,2	0,3	0,07	1,7	0,2	3,5	49
10	1,0	0,1	0,3	0,09	0,5	0,1	1,8	28
11	3,6	0,4	1,4	0,2	0,7	0,07	5,7	12
12	0,6	0,1	0,4	0,09	2,3	0,2	3,3	70
Bendras	50,5		35,2		23,6		109,3	Vidurkis 22

Emėme dvi serijas mėgintuvėlių, po 9 mėgintuvėlius
 kiekvienoje serijoje, ir į kiekvieną mėgintuvėlį pri-
 dėjome po 125 μ l 0,40 M fosfatinio buferio, turinčio 4
 mM EDTA ir 16 mM cisteino laisvos bazės formoje, kurio
 5 pH=6,8. Po to į mėgintuvėlius pridėjome įvairiais
 santykiais chimopapainą ir PPIV tokiu kiekiu, kad galų
 gale proteinazės koncentracija būtų 100 nM. Į vienos
 serijos mėgintuvėlius dėjome vištų cistatiną iki 1 μ M
 koncentracijos, o į kitos serijos mėgintuvėlius – toki
 10 patį tūrį vandens. Po to mėgintuvėlius inkubavome ir
 analizavome juose azokazeino hidrolizės rezultatus.

Vištų cistatino įtaką azokazeino hidrolizei, kurią su-
 kelia nurodytų fermentų mišiniai, išreiškėme aktyvumo
 15 inhibavimo procentais, lyginant su tų pačių fermentų
 mišinių aktyvumu nesant cisteinui. Gauti rezultatai pa-
 teikti 5 lentelėje.

5 lentelė

20

Chimopapaino ir PPIV mišinių inhibavimo vištų cistatinu procentas

PPIV (nM)	Chimopapainas (nM)	λ_{366} - cistatinas	λ_{366} + cistatinas	Inhibavimo %
100	0	0,092	0,094	0
80	20	0,158	0,102	35,4
70	30	0,191	0,088	54,0
60	40	0,316	0,06	80,0
50	50	0,347	0,058	83,3
40	60	0,428	0,066	84,5
30	70	0,543	0,028	94,5
20	80	0,588	0,033	94,4
0	100	0,733	0,008	98,9

Iš pateiktų rezultatų matome, kad inhibavimo vištų cistatinu laipsnis yra atvirkščiai proporcingas PPIV koncentracijai.

5 **26 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas rūgštinio nusodinimo prie pH 2,2-1,2 būdu**

10 I) Komerčinį džiovinimo išpurškiant būdu išdžiovintą Carica papaya lateksą (išleidžiamą firmos Powell and Scholfield, Didžioji Britanija) skiedėme distiliuotu vandeniu iki 20 svorio % koncentracijos ir maišėme valandą. Netirpią liekaną pašalinome centrifuguojant 30 min 4°C temperatūroje, esant 9000 x g, o virš nuosėdų buvusio skysčio pH mažinome 4°C temperatūroje maišant
15 ir lašais pridėdant druskos rūgštį (1 M), pridėjimo greitis - 40 µl/min/ml. Mišinio pH nepertraukiamai sekėme su kombinuotu elektrodu (tipas GK 2401C), kuris buvo nukalibruotas su standartiniais buferiniais tirpalais, kurių pH=4,01 ir 1,09 (Radiometer, 25°C). Nuo
20 pH=2,2 iki pH=1,2 kas 0,2 pH vienetus rūgšties pridėjimą nutraukdavome ir atitinkamą pH reikšmę 4°C temperatūroje palaikydavome pastovia, tęsdami maišymą. Alikvotinę tirpalo dalį (ekvivalentiškų 10 ml pradinio tirpalo) paimdavome ir laikydavome atskirai, o į liku-
25 sią tirpalo dalį pridėdavome rūgštį iki sekančios pH reikšmės sumažėjimo.

30 II) Visus atrinktus bandymus 30 min centrifugavome 4°C temperatūroje, esant 9000 x g, ir netirpią liekaną atmesdavome.

35 III) Visų virš nuosėdų buvusių skysčių pH reikšmes nustatėme lygias 6,8, lašais pridėdami į šiuos bandinius NaOH tirpalą (1 M), greitis 400 µl/min. Nuosėdų pašalinimui visus bandinius vėl 30 min centrifugavome, esant 9000 x g.

Kitame bandyme rūgštinį nusodinimą prie pH=1,8 atlikome 25°C temperatūroje.

5 Galų gale gautus virš nuosėdų buvusio skysčio bandinius analizavome, norėdami nustatyti aktyvumą BAPNA at-
žvilgiu bei PPIV ir šį išradimą atitinkančio chimo-
papaino kiekius aukščiau aprašytu paprastos radialinės
imunodifuzijos metodu). 6 lentelėje pateikti duomenys
10 liudija, kad rūgštinis nusodinimas prie pH=1,8 ir 4°C temperatūroje leidžia sumažinti PPIV kiekį iki mažiau nei 0,1% nuo bendro baltymo kiekio, o nusodinimas prie pH=1,8 ir 25°C temperatūroje - iki mažiau nei 0,5%.

15 **27 PAVYZDYS. Monospecifinių IgG antikūnų, inicijuotų avyse, gavimas**

Švarų chimopapainą, gautą pagal 21 pavyzdyje aprašytą metodą, prieš naudojimą karboksimetiliname švelniomis sąlygomis pagal metodą, aprašytą Zucker ir kt., 1985
20 (žr. aukščiau cituotą darbą) ir dializavome vandeni-
niame natrio fosfato (10 mM) tirpale, kurio pH=7,3 ir kuriame buvo NaCl (0,14 M). Chimopapaino antiserumą avyje inicijavome atlikdami 100 µg karboksimetilinto baltymo pilname Freund adjuvante injekciją į raumenis,
25 ir po to po mėnesio atlikdami tokią pačią 50 µg injekciją. IgG iš dalies valėme frakcionuodami su amonio sulfatu, kaip tai aprašė Heide ir Schwick (1978) (žr. aukščiau cituotą darbą), o po to dializuodami van-
deniniame natrio fosfato tirpale (10 mM), turinčiame
30 NaCl (0,14 M), pH=7,3.

Papaino (papajos), proteinazės III, ir papajos protei-
nazės IV IgG antikūnius ruošėme tokiu pačiu būdu.

35 Kiekvieną atskirą individualų karboksimetilintą anti-
geną imobilizavome pagal pridedamas instrukcijas ko-
lonėlėse, kurias su Zetaffiniti pavadinimu išleidžia

firma Anachem. Prieš tai kolonėlės buvo pervestos į pusiausvyrinę padėtį apdorojant vandeniniu natrio fosfato tirpalu (10 mM), turinčiu NaCl (0,14 M), pH=7,3.

6 lentelė

Salygos	Temperatūra (°C)	Baltymas (mg)	Aktyvumas BAPNA atžvilgiu* (vienetai $\times 10^5$)	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu*	Chimopapainas (mg)	PPIV (% nuo bendro baltymo kiekio)
Pradinis tirpalas	-	946	15,8	1670	208	20,30
pH=2,2	4	846	9,5	1120	231	7,56
pH=2,0	4	865	9,1	1052	230	1,20
pH=1,8	4	796	9,0	1131	199	0,09
pH=1,6	4	828	7,7	930	224	0,06
pH=1,4	4	869	7,8	898	225	0,05
pH=1,2	4	784	7,1	906	166	0,03
pH=1,8	20	925	8,3	897	269	0,43

*BAPNA analizė, Metodas Nr. 2

Galimus užteršimus ir antikūnus, kurie gali duoti kryžmines reakcijas, iš IgG preparatų atskyrėme absorbcijos būdu, tam tikslui preparatus praleidome pro kolonėlę. Gauti IgG preparatai davė nusodinimo reakciją su savo atitinkamu antigenu ir, tuo pat metu, nedavė kryžminės reakcijos su kitais antigenais. Kolonėlės su joje nusodintu antigenu regeneraciją, norint pakartotinai naudoti kolonėlę, vykdėme vandeniniu dietilamino tirpalu (0,05 M), pH=11,5, po to ją iš karto pervesdavome į pusiausvyrinę padėtį, apdorodami fosfatinio buferiu.

Gavome chimopapaino, PPIII, PPIV ir papaino monospecifinius IgG preparatus, kuriuos galima naudoti kiekybiniam kiekvieno antigeno nustatymui aukščiau aprašytu paprastos radialinės imunodifuzijos metodu.

28 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas rūgštiniu nusodinimu prie pH=1,5

I) Komercinį džiovinimo išpurškimo metodu išdžiovintą Carica papaya lateksą (20 g), kuri išleidžia firma Siebels, JAV, 0°C temperatūroje 60 min maišėme dejonizuotame vandenyje (prieš tai atšaldytame iki 4°C; 250 ml). 10 µl/min/ml greičiu pridėdami HCl (1 N) nustatėme pH reikšmę, lygią 1,5. pH reikšmę nepertraukiamai kontroliavome kombinuotu Radiometer elektrodu (tipas GK 2401C), kuris buvo nukalibruotas standartiniais buferiniais tirpalais pH=4,01 ir pH=1,09 (Radiometer, 25°C). Pasiekus pH=1,5, tirpalą laikėme 10 min, norėdami stabilizuoti pH, ir, esant reikalui, koreguodami jo reikšmę.

II) 4°C temperatūroje mišinį centrifugavome 30 min, esant 12000xg, ir liekaną atmetėme.

III) (a) 10 µl/min/ml greičiu pridėdami NaOH tirpalą (1 M) nustatėme virš nuosėdų buvusio tirpalo pH=7,0, pH reikš-

mę nepertraukiamai kontroliavome Radiometer elektrodu, nukalibruotu su standartiniu buferiu pH=7,01 (Radiometer, 25°C). Tirpalo pH reikšmei pasiekus 7, tirpalą laikėme dar 10 min stabilizavimuisi, esant reikalui, koregavome jo reikšmę. Po to 30 min 4°C temperatūroje centrifugavome, esant 12000 x g, ir nuosėdas atmesdavome.

b) Virš nuosėdų buvusį tirpalą 4°C temperatūroje dializavome su 30 tūrių dejonizuoto ir distiliuoto vandens, kurią du kartus keitėme kas 12 valandų.

Dializatą valėme katijonitinės chromatografijos būdu su aukštos skiriamosios galios S-Sepharose 35/100 kolonėlėje (Pharmacia). Per vieną kartą naudojome ne daugiau 3 g baltymo (A_{280} analizė). Prieš tai kolonėlę pervesdavome į pusiausvyrinį būvį 4°C temperatūroje vandeniniu EDTA (1 mM) tirpalu. Praleidus bandinį pro kolonėlę, ją plovėme vandeniniu EDTA tirpalu (1 mM) iki tol, kol A_{280} pasidarydavo vėl lygi 0.

Po to pro kolonėlę praleidome tirpalą su K^+ gradientu nuo 0,175 mM iki 0,5 M atrinkdami frakcijas po 25 ml. Frakcija su sugerimo piku analizavome BAPNA aktyvumo atžvilgiu.

Frakcijas, turinčias chimopapainą su maksimaliu specifiniu aktyvumu BAPNA atžvilgiu (besieliuujančias esant 0,17-0,22 MK^+ koncentracijai) apjungėme. Apjungtas frakcijas 4°C temperatūroje dializavome su dejonizuotu ir distiliuotu vandeniu, kurią keitėme 5 kartus kas 12 valandų. Dializatą džiovinome sublimacinio džiovinimo būdu ir laikėme -20°C temperatūroje.

Aprašytą valymo procedūrą kartojo keletą kartų. Ši išradimą atitinkančio chimopapaino, PPIII, PPIV kiekį nustatinėjome aukščiau aprašytu paprastos radialinės imunodifuzijos metodu, o avyse pasigaminusių antikūnų -

kaip tai aprašyta 27 pavyzdyje. Aktyvumą BAPNA atžvilgiu ir aktyvių centrų titravimą jodacto rūgštimi atlikome pagal BAPNA Metodiką Nr. 1. Išvalymo efektyvumą iliustruoja vidutinės reikšmės, pateiktos 7 lentelėje.

7 lentelė

	Bendras baltymo kiekis (mg)	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvil- giu (vienetai mg ⁻¹)	Aktyvūs centrai (%)	Chimopapainas (% nuo bendro baltymo kiekio)	PPIV (%) nuo bendro baltymo kiekio)	PPIII (%) nuo bendro baltymo kiekio)	Papainas (%) nuo bendro baltymo kiekio)
Pradinė medžiaga	10203	572	30	25	22	14	5
pH=1,5	8168	461	28	30	0,1	14	<0,1
Dializė	4351	674	42	59	0,1	24	<0,1
Katijonitinė chromatogra- fija	948	1079	72	100	0,1	<0,1	<0,1
Dializė	767	1098	89	100	0,1	<0,1	0,1
Po sublimacinio džiovinimo	N	905*	N	N	N	N	N

N - nebuvo nustatomas

* baltymo kiekis, nustatytas iš sausos medžiagos svorio

29 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas rūgštinio nusodinimo prie pH=1,5 ir afininės chromatografijos metodais

I-III) Komerčinį džiovinimo išpurškimu metodu išdžiovintą Carica papaya lateksą (50 g), išleidžiamą firmos Siebels, JAV, preparavome ir apdorojome rūgštimi prie pH=1,5 tuo pačiu būdu, kuris aprašytas 23 pavyzdyje (I-III). Virš nuosėdų likusią skystį 4°C temperatūroje dializavome su 30 tūrių dejonizuoto ir distiliuoto vandens, kuri du kartus keitėme kas 12 valandų.

IV) Kolonėlę (sluoksnio tūris 350 ml), užpildytą ECH-Sepharose^R, kuri surišta su L-Ala-L-PheSc (kuri paruošta pagal 10 pavyzdžio aprašymą), pervedėme į pusiausvyrinį būvį apdorojant per naktį vandeniniu etandiolio (33 tūrio %) tirpalu, turinčiu natrio acetatą (50 mM), ir kurio pH=4,5, o po to vandeniniu NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tirpalu (50 mM Na⁺), turinčiu EDTA (1 mM) etandiolyje (33 tūrio %), ir kurio pH=6,8 (darbinis buferis).

Dializuotą virš nuosėdų buvusį tirpalą (žr. aukščiau) filtravome per filtrą su porų diamatru 0,2 μm ir į filtrą pridėjome etandiolį iki 33 tūrio % koncentracijos. Tikrinome tirpalo pH ir, esant reikalui, jo reikšmę nustatėme lygią 7. Po to į jį pridėjome šviežiai pagamintą L-cisteino tirpalą (200 mM) iki 4 mM koncentracijos, gerai sumaišėme, 4°C temperatūroje laikėme 15 min ir 4°C temperatūroje praleidome pro afininės chromatografijos kolonėlę 40 ml/val/cm² greičiu. Kolonėlę praplovėme darbinio buferio, jo kiekis buvo lygus dešimteriopam adsorbento sluoksnio tūriui.

V) Chimopapainą eliuavome vandeniniu HgCl₂ (10 mM) tirpalu etandiolyje (33 tūrio %), kuriame buvo natrio acetatas (50 mM) ir pH=4. Tirpalo tūris buvo lygus trigubam adsorbento sluoksnio tūriui. Rinkome frakcijas po

25 ml, frakcijas, pasižyminčias aktyvumu BAPNA atžvilgiu, apjungėme ir toliau valėme katijonitinės chromatografijos būdu su 35/100 kolonėle, kuri buvo užpildyta didelės skiriamosios galios S-Sepharose (Pharmacia).

5

Kolonėlę iš anksto apdorojome 4°C temperatūroje EDTA tirpalu (1 mM), po to pro ją praleidome tiriamą bandinį ir 10 ml/min greičiu plovėme vandeniniu EDTA tirpalu (1 mM) iki tol, kol A_{280} reikšmė vėl pasidarė lygi 0. Po to pro kolonėlę praleidome vandeninį K_2HPO_4/KH_2PO_4 tirpalą (50 mM K^+), pH=7,2, kuriame buvo EDTA (1 mM) ir L-cisteinas (500 mM). Tirpalo tūris buvo lygus trigubam adsorbento sluoksnio tūriui. Tirpalo praleidimą nutraukėme 30 min, po to pro kolonėlę praleidome toki patį kiekį šviežiai pagaminto cisteininio buferio ir praleidimą nutraukėme 30 min. Po to kolonėlę praplovėme cisteininio buferiu (jo tūris buvo lygus šešiagubam adsorbento sluoksnio tūriui). Po to kolonėlę pervedėme į pusiausvyrinį būvį, apdorodami ją vandeniniu K_2HPO_4/KH_2PO_4 tirpalu (50 mM K^+), pH=7,2, kuriame buvo EDTA (1 mM).

Po to pro kolonėlę praleidome tirpalą su K^+ koncentracijų gradientu nuo 0,175 mM iki 0,5 M ir surinkome frakcijas po 25 ml. Frakcijas su chromatografiniu pikų analizavome norėdami nustatyti aktyvumą BAPNA atžvilgiu. Pirmas pikas, pasirodantis esant K^+ koncentracijai eliuente 0,2-0,25 M, atitiko chimopapainą. Antras pikas, pasirodantis esant K^+ koncentracijai eliuente apie 0,45 M, atitiko papajos proteinazę III.

Frakcijas, turinčias chimopapainą su maksimaliu specifiniu aktyvumu, apjungėme ir 4°C temperatūroje dializavome su 50 tūrių dejonizuoto ir distiliuoto vandens, kuri keitėme 5 kartus kas 12 valandų.

Chimopapainą, eliuotą iš katijonitinės kolonėlės, aktyvavome cisteininiu buferiu, ir todėl jis pasidarė jautrus inaktyvacijai oksidacijos pasekoje. Norėdami išvengti arba sumažinti aktyvaus fermento inaktyvacijos oksidacijos pasekoje tikimybę, ją turinčias frakcijas supylėme į mėgintuvėlius su natrio tetrathonato suspensija (200 mM) tokiu būdu, kad galutinė $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ koncentracija frakcijoje būtų 5 mM. Pagal kitą variantą, apjungtas chimopapainą turinčias frakcijas dializavome vandenyje azoto atmosferoje. Vanduo nuo deguonies buvo išvalytas 30 min 0,1 l/min greičiu leidžiant pro jį azotą.

Gautą dializatą džiovinome sublimacinio džiovinimo būdu ir laikėme -20°C temperatūroje.

Aprašytą valymo procedūrą kartojome kelis kartus. Išvalymo efektyvumą kontroliavome vykdydami analizę, kuri buvo atliekama pagal 28 pavyzdžio aprašymą. Išvalymo efektyvumą iliustruoja vidutinės reikšmės, pateiktos 8 lentelėje.

30 PAVYZDYS. Chimopapaino valymas rūgštinio nusodinimo prie $\text{pH}=1,5$ ir afininės chromatografijos metodais

I-III) Komercinį džiovinimo išpurškimu metodu išdžiovintą Carica papaya lateksą, gaminamą firmos Siebels, JAV, preparavome, apdorojome rūgštimi prie $\text{pH}=1,5$, dializavome ir apdorojome katijonitinės chromatografijos su S-Sepharose^R metodu tokiu pat būdu, kaip tai yra aprašyta 28 pavyzdyje.

8 lentelė

	Bendras baltymo kiekis (mg)	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvil- giu (vienetai mg ⁻¹)	Aktyvūs centrai (%)	Chimopapainas (% nuo bendro baltymo kiekio)	PPIV (%) nuo bendro baltymo kiekio)	PPIII (%) nuo bendro baltymo kiekio)	Papainas (%) nuo bendro baltymo kiekio)
Pradinė medžiaga	25508	572	30	25	22	14	5
pH=1,5	20421	401	28	30	<0,1	14	<0,1
Dializė	10877	674	42	59	<0,1	24	<0,1
Sepharose-L- Ala-L-PheSc	1673	1446	86	66	<0,1	13	<0,1
Katijonitinė chromatografija	951	1625	100	100	<0,1	<0,1	<0,1
Dializė	828	1743	100	N	N	N	N
Po sublimaci- nio džiovavimo	N	1320*	N	N	N	N	N

N - nebuvo nustatomas

* baltymo kiekis, nustatytas iš sausos medžiagos svorio

9 lentelė

	Bendras baltymo kiekis (mg)	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvil- giu (vienetai mg ⁻¹)	Aktyvūs centrai (%)	Chimopapainas (% nuo bendro baltymo kiekio)	PPIV (%) nuo bendro baltymo kiekio)	PPIII (%) nuo bendro baltymo kiekio)	Papainas (%) nuo bendro baltymo kiekio)
Pradinė medžiaga	28795	632	31	27	25	16	6
pH=1,5	23257	458	24	28	<0,1	13	<0,1
Dializė	8319	916	57	75	0,2	25	<0,1
Katijonitinė chromatografija	3102	1103	72	91	<0,1	<0,2	<0,1
Sepharose-L- Ala-L-PheSc	947	1245	89	N	N	N	N
Dializė	858	1587	88	100	N	<0,1	<0,1
Po sublimaci- nio džiovinimo	972	1265*	69	N	<0,1	N	N

N - nebuvo nustatomas

* baltymo kiekis, nustatytas iš sausos medžiagos svorio

IV) Frakcijas, turinčias chimopapainą su maksimaliu specifiniu aktyvumu BAPNA atžvilgiu, apjungėme ir pridėjome etandiolį iki 33 tūrio % koncentracijos. Po to į apjungtas frakcijas pridėjome šviežiai pagamintą vandeninį L-cisteino tirpalą (200 mM) iki 4 mM koncentracijos, ir tirpalą praleidome pro kolonėlę, užpildytą ECH-Sepharose^R, surišta su L-Ala-L-PheSc, taip, kaip tai aprašyta 29 pavyzdyje (IV).

V) Chimopapainą eliuavome vandeniniu HgCl₂ tirpalu (10 mM) etandiolyje (33 tūrio %), pH=4,5, turinčiame natrio acetatą (50 mM). Tirpalo tūris buvo lygus trigubam adsorbento tūriui. Rinkome frakcijas po 25 ml. Frakcijas, pasižyminčias aktyvumu BAPNA atžvilgiu, apjungėme ir 4°C temperatūroje dializavome su 30 tūrių dejonizuoto ir distiliuoto vandens, kuri keitėme 5 kartus kas 12 valandų. Dializatą džiovinome sublimacinio džiovinimo būdu ir laikėme -20°C temperatūroje.

31 PAVYZDYS

Du ši išradimą atitinkančio chimopapaino preparatus analizavome pasinaudodami BAPNA analize pagal Metodikas Nr. 1 ir Nr. 2. Baltymo kiekį nustatinėjome iš bendro sauso bandinio svorio. Chimopapaino A preparatas buvo gautas valant pagal 28 pavyzdžio metodiką. Chimopapaino B preparatas buvo gautas valant pagal 29 pavyzdžio metodiką (paskutinės frakcijos surinktos natrio tetrationate). Kiekvieną nustatymą kartojome 3 kartus. Gauti rezultatai pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė

Chimopapaino preparatas	Specifinis aktyvumas BAPNA atžvilgiu (vienetai mg^{-1})	
	Metodika Nr. 1	Metodika Nr. 2
A	855	2227
B	1261	3591

32 PAVYZDYS

- 5 Chimopapainą, išvalytą pagal 29 pavyzdžio aprašymą ir dializuotą azoto atmosferoje aukščiau aprašytu būdu, džiovinome sublimacinio džiovinimo metodu ir laikėme -20°C temperatūroje.
- 10 Tuo būdu pagaminto chimopapaino specifinis aktyvumas BAPNA (1 mM) atžvilgiu, esant 37°C ir pH=6, buvo 1345 vienetai miligramui.
- 15 Norėdami paruošti 100 buteliukų su chimopapainą turinčia kompozicija, žemiau aprašytu būdu ruošėme 43,75 g pradinio tirpalo. Dirbant su šiuo tirpalu jo temperatūrą palaikėme 4-12°C ribose.
- 20 L-(+)-cisteino hidrochloridą (166 mg) pridėjome į maždaug 30 g vandens, skirtą injekcijoms taip, kad gautume 22 mM koncentraciją. Pasinaudodami NaOH (1 M) arba HCl (0,1 M) nustatėme tirpalo pH reikšmę 5-5,5. Paruoštą cisteino tirpalą pridėjome prie išvalyto chimopapaino (358 mg) taip, kad galų gale gautume 10000 vienetų/ml koncentraciją. Pasinaudodami NaOH (1 M) arba HCl (0,1 M) nustatėme maišomo tirpalo pH reikšmę 5,9-6,1 ir vandeniu, skirtu injekcijoms, praskiedėme iki 43,75 g. Paruoštą tirpalą sterilizavome, nuosekliai praleisdami jį pro du filtrus, kurių porų diametrai buvo 0,2 μm . Į 100 5ml tūrio stiklinių buteliukų įpylėme po 0,4 g tirpalo. Buteliukus užkimšome kamščiais,
- 30

vandenį pašalinome sublimacinio džiovinimo sumažintame slėgyje būdu, ir buteliukus su liofilizuotu produktu hermetizavome vakuume.

- 5 Kiekviena buteliuke buvo balti amorfiniai milteliai, turintys 3,27 mg chimopapaino ir 1,52 mg natrio cisteinato hidrochlorido (nominalus aktyvumas 4000 vienetų, atitinkamai 8 μ m, leidžiamas 10 % viršijimas). Betarpiškai prieš naudojimą į kompoziciją, esančią buteliuke, pridėjome 2 ml vandens, skirtą injekcijoms.
- 10 Gavome paruoštą injekcijoms tirpalą, nominaliai turintį 4000 vienetų chimopapaino ir 4 mM L-cisteino.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Chimopapainas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo aktyvumas N- α -benzoil-DL-arginino p-nitroanilido (BAPNA) (1 mM) atžvilgiu 37°C temperatūroje ir esant pH 6,0, yra 800-1700 vienetų miligrame ir turi mažiau nei 0,2 % kiekvieno iš šių komponentų: papajos proteinazės III (PPIII), papaino ir papajos proteinazės IV (PPIV).
2. Chimopapainas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas BAPNA (1 mM) atžvilgiu 37°C temperatūroje ir esant pH 6,0 yra 1000-1700 vienetų miligrame.
3. Chimopapainas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas BAPNA (2,5 mM) atžvilgiu 40°C temperatūroje ir esant pH 6,8, yra 3000-4500 vienetų miligrame, ir turi mažiau nei 0,2 % kiekvieno iš šių komponentų: PPIII, papaino ir PPIV.
4. Chimopapainas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo specifinis aktyvumas BAPNA (2,5 mM) atžvilgiu 40°C temperatūroje ir esant pH 6,8, yra 3500-4500 vienetų miligrame.
5. Chimopapainas pagal vieną iš prieš tai buvusių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra aktyvus azokazeino atžvilgiu, ir jį bent 95 % inhibuoja mažesnės nei 1 μ M vištų cistatino koncentracijos.
6. Chimopapainas pagal vieną iš prieš tai buvusių punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi bent 70 % aktyvaus fermento.
7. Kompozicija, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į ją įeina chimopapainas pagal vieną iš prieš tai buvusių punktų.

8. Kompozicija pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir nešiklis.

5 9. Kompozicija pagal 7 arba 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra hermetiškai išfasuota nepatenkant drėgmei į atskirus buteliukus arba ampules.

10 10. Kompozicija pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir reduktorius.

11. Kompozicija pagal vieną iš 7-10 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir cisteino proteinazės grįžtamas inhibitorius.

15 12. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina chimopapainas pagal vieną iš 1-6 punktų.

20 13. Farmacinė kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir farmaciškai priimtinas skiediklis, užpildas arba nešiklis.

25 14. Farmacinė kompozicija pagal 12 arba 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra hermetiškai išfasuota nepatenkant drėgmei į atskirus buteliukus arba ampules.

30 15. Farmacinė kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad į ją įeina dar ir farmaciškai priimtinas reduktorius.

16. Farmacinė kompozicija pagal vieną iš 12-15 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra pagaminta kaip vienkartinė dozė, skirta parenteriniam vartojimui.

17. Chimopapainas pagal vieną iš 1-6 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra skirtas naudoti,
esant chimonukleozei.
- 5 18. Chimopapainas pagal vieną iš 1-6 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra skirtas me-
dikamento, naudojamo esant chimonukleozei, gavimui.
- 10 19. Chimopapainas pagal vieną iš 1-6 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra skirtas chi-
monukleozės pakenktų, išsikišusių arba kitą patologiją
turinčių žinduolių tarpslankstelių spinalinių diskų
gydymui.
- 15 20. Chimopapaino valymo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis apima:
- a) vandeninio neapdoroto chimopapaino tirpalo inkubavimą
su selektyvius centrus turinčia afininės chromatogra-
20 fijos matrica, turinčia matricą-pagrindą, kovalen-
tiškai surištą (esant reikalui, per speiserinę grupę)
su chimopapainą grižtamai inhibuojančio peptido gali-
niu azoto atomu, to išdavoje nurodytas peptidas susi-
jungia su chimopapaino molekulės aktyviu centru, ir
- 25 b) chimopapaino eliuavimą tinkamu eliuentu.
21. Chimopapaino valymo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jis apima:
- 30 1) vandeninio mišinio, turinčio neapdorotą chimopapainą,
nusodinimą, esant pH 1,2-1,8;
- 2) neapdoroto chimopapaino vandeninio tirpalo išskyrimą
35 iš nurodyto mišinio;

3) neapdoroto chimopapaino tirpalo neutralizavimą ir, esant reikalui, nudruskinimą.

22. Chimopapaino valymo būdas, b e s i s k i r i a n -
5 t i s tuo, kad jis apima:

I) vandeninio mišinio, turinčio neapdorotą chimopapainą, nusodinimą, esant žemesniems pH nei 2,0;

10 II) neapdoroto chimopapaino vandeninio tirpalo išskyrimą iš nurodyto mišinio;

III) neapdoroto chimopapaino tirpalo neutralizavimą ir, esant reikalui, nudruskinimą;

15

IV) III-je stadijoje gauto tirpalo inkubavimą su selektyvius centrus turinčia afininės chromatografijos matrica, turinčia matricą-pagrindą, kovalentiškai surištą, esant reikalui per speiserinę grupę, su chimopapainą grįžtamai inhibuojančio peptido galiniu azoto atomu, to išdavoje nurodytas peptidas susijungia su chimopapaino molekulės aktyviu centru, ir

20

25 V) chimopapaino eliuavimą tinkamu eliuentu.

23. Būdas pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad rūgštinių nusodinimą atlieka esant pH 1,2-1,8.

30 24. Būdas pagal vieną iš 20-23 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra bent viena katijoninės chromatografijos stadija.

25. Chimopapainą grįžtamai inhibuojantis peptidas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį pasirenka iš L-Ala-L-PheSc, L-Ala-D-PheSc, L-Phe-D-PheSc, L-Phe-L-PheMo,

35

L-Phe-L-PheOx, L-Tyr-L-PheSc, L-Ala-L-ChaSc ir L-Ala-L-LeuSc.

26. Chimopapainą grįžtamai inhibuojantis peptidas pagal
 5 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra
 dipeptidas, pasirinktas iš L-Ala-L-PheSc, L-Ala-D-
 PheSc, L-Phe-D-PheSc, L-Phe-L-PheMo, L-Phe-L-PheOx, L-
 Tyr-L-PheSc, L-Ala-L-ChaSc ir L-Ala-L-LeuSc.
- 10 27. Afininės chromatografijos matrica su chimopapaino
 atžvilgiu aktyviais centrais, b e s i s k i r i a n t i
 tuo, kad ji turi matricą-pagrindą, kovalentiškai su-
 rištą, esant reikalui per speiserinę grupę, su galiniu
 15 azoto atomu chimopapainą grįžtamai inhibuojančio pep-
 tido, turinčio fenilalanino darinius su galiniais ang-
 lies atomais arba fenilalanino analogų darinius, su
 sąlyga, kad tokiu inhibuojančiu peptidu negali būti L-
 fenilalanil-L-fenilalanino semikarbazonas.
- 20 28. Afininės chromatografijos matrica su chimopapaino
 atžvilgiu aktyviais centrais pagal 27 punktą, b e s i -
 s k i r i a n t i tuo, kad inhibuojantį peptidą
 pasirenka iš L-Ala-L-PheSc, L-Ala-D-PheSc, L-Phe-D-
 PheSc, L-Phe-L-PheMo, L-Phe-PheOx, L-Tyr-L-PheSc, L-
 25 Ala-L-ChaSc ir L-Ala-L-LeuSc.