

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **220318**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **401771**

(22) Data zgłoszenia: **26.11.2012**

(51) Int.Cl.  
**C07K 14/465 (2006.01)**  
**C07K 14/81 (2006.01)**  
**C07K 1/00 (2006.01)**

(54)

**Sposób stabilizacji monomerycznej cystatyny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**25.11.2013 BUP 24/13**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.10.2015 WUP 10/15**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JAKUB GBUREK, Wrocław, PL**  
**KRZYSZTOF GOŁĄB, Wrocław, PL**  
**KATARZYNA JUSZCZYŃSKA, Wrocław, PL**  
**ANTONI POLANOWSKI, Wrocław, PL**  
**TADEUSZ TRZISZKA, Trzebnica, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Olszewska**

**PL 220318 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób stabilizacji monomerycznej cystatyny.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym przy formułacji leków i przemyśle spożywczym do ochrony produktów przed drobnoustrojami.

Cystatyny są niskocząsteczkowymi białkami wykazującymi wiele aktywności biologicznych, które mogą mieć zastosowanie praktyczne. Należą do nich działanie bakteriobójcze, grzybobójcze, przeciwwirusowe i przeciw pasożytnicze. Rozważa się także ich zastosowanie w stanach nowotworowych i chorobach otępiennych u ludzi. (Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B.: Emerging Roles of Cysteine Cathepsins in Disease and their Potential as Drug Targets, *Curr. Pharm. Des.*, 2007, 13, 385-401).

Aktywność biologiczna cystatyn jest przede wszystkim związana z ich aktywnością inhibitorową wobec proteaz cysteinowych należących do rodzin C1 i C13. (Rawlings N. D., Morton F. R., Kok Ch. Y., Kong J., Barrett A. J.: MEROPS; the peptidase database, *Nucl. Acids Res.*, 2008, 36, 320–325). Ze względu na dostępność surowca i niską immunogenność najbardziej obiecujące wydają się badania nad cystatyną białka jaja drobiu użytkowego. Inhibitor ten, zwany również owocystatyną, jest pierwszym wyizolowanym i najlepiej scharakteryzowanym białkiem nadrodziny cystatyn. Występuje ona w dwóch postaciach: nieufosforylowanej o pI 6,5 oraz ufosforylowanej o pI 5,6. Częsteczkę owocystatyny buduje pojedynczy łańcuch polipeptydowy, składający się ze 116 reszt aminokwasowych o masie 13.131 Da, pozbawiony komponenty węglowodanowej.

Cystatyna wyizolowana z białka jaja cechuje się niską stabilnością. Procesy takie jak zamrażanie czy liofilizacja powodują nieodwracalną utratę właściwości inhibitorowych cystatyny. Ulega ona również stopniowej inaktywacji podczas przechowywania zarówno w temperaturze pokojowej jak i w lodówce. Spontaniczna utrata aktywności cystatyny jest wynikiem zachodzących procesów autoagregacji jej cząsteczek.

Praktyczne zastosowanie cystatyny z białka jaja wymaga opracowania metod jej stabilizacji. Problematykę stabilizacji cystatyn podejmowano już wcześniej. Z opisów patentowych US 6,534,477 B2 oraz US 7,078,488 B2 znane są rekombinowane cystatyny, które były stabilizowane przez glikozylację w wyniku wprowadzenia do genów cystatyn sekwencji nukleotydowych kodujących kompatybilne z systemem ekspresji miejsca N-glikozylacji.

Powszechnie znaną metodą stabilizowania struktury cząsteczki cystatyny jest przechowywanie jej w temperaturze poniżej 253K, w obecności 20% glicerolu (Anastasi A., Brown M. A., Kembhavi A. A., Nicklin M. J. H., Sayers Ch. A., Sunter D. C., Barrett A. J.; Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum, *Biochem. J.*, 1983, 211, 129–138).

Cystatynę można stabilizować również poprzez dobór odpowiedniej kompozycji roztworu buforującego oraz dodatek, różnych od glicerolu, stabilizatorów takich jak monosacharydy, poliole oraz albuminy kręgowców (zgłoszenie patentowe P-396028).

Nieoczekiwanie okazało się, że cystatynę można również stabilizować przez dodatek do jej roztworów alkoholu pierwszo- lub drugorzędowego, w tym: etanolu, propanolu izopropanolu, butanolu, alkoholu benzyloвого, glikolu propylenowego.

Istotą wynalazku jest to, że do roztworu wyjściowego cystatyny o stężeniu poniżej 50  $\mu$ M dodaje się stabilizatora w postaci alkoholu lub wodnego roztworu alkoholu pierwszo- lub drugorzędowego, do uzyskania jego końcowego stężenia do 50%.

Korzystnie jest, gdy dodaje się alkoholu lub wodnego roztworu alkoholu do uzyskania jego końcowego stężenia na poziomie 30%.

Korzystnie także jest, gdy alkoholem jest etanol lub propanol izopropanol, lub butanol, lub alkohol benzyłowy, lub glikol propylenowy albo ich mieszaniny.

Korzystnie również jest, gdy stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu oczyszczania i/lub zagęszczania cystatyny albo przed rozpoczęciem procesu suszenia cystatyny.

Zaletą wynalazku jest, że otrzymuje się wolny od glicerolu lub innych stabilizatorów, alkoholowy roztwór cystatyny, o aktywności właściwej powyżej 10 U/mg białka, który jest stabilny przez okres co najmniej sześciu miesięcy.

Przedmiot wynalazku przedstawiono poniżej, w przykładach realizacji sposobu.

**P r z y k ł a d 1.** Do 5 ml roztworu cystatyny o stężeniu 50  $\mu$ M w PBS o pH 7,4 i aktywności specyficznej 30 U/mg dodano 5 ml 60% (v/v) etanolu w wodzie w temperaturze 25°C. Po dodaniu

roztworu etanolu preparat nie tracił aktywności i nie ulegał agregacji. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskany koncentrat cystatyn zawiera wyłącznie formy monomeryczne. Równolegle w analogiczny sposób sporządzono próbę kontrolną, która nie zawierała etanolu. Próby przechowywano w temperaturze 4°C. Stabilność prób cystatyny monitorowano przez okres 6 miesięcy za pomocą pomiaru aktywności antypapainowej. Aktywność próby kontrolnej zmalała o 30% w ciągu 72 h i zanikła całkowicie po 30 dniach. Aktywność próby stabilizowanej po 72 h pozostała na takim samym poziomie. Po okresie 6 miesięcy aktywność preparatu stabilizowanej cystatyny zmalała zaledwie o 10%.

**P r z y k ł a d 2.** Do 5 ml roztworu cystatyny o stężeniu 10  $\mu\text{M}$  w 50 mM węglanie amonu i aktywności specyficznej 30 U/mg dodano 5 ml 60% (v/v) glikolu propylenowego w wodzie w temperaturze 25°C. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

**P r z y k ł a d 3.** Do 5 ml roztworu cystatyny o stężeniu 1  $\mu\text{M}$  w 50 mM węglanie amonu i aktywności specyficznej 30 U/mg dodano 5 ml 60% (v/v) propanolu w wodzie w temperaturze 25°C. Preparat zagęszczono na błonie Amicon YM3. Otrzymano preparat cystatyny o stężeniu 100  $\mu\text{M}$  o takiej samej aktywności specyficznej. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskany koncentrat cystatyn zawiera wyłącznie formy monomeryczne. W tych warunkach preparat nie zawierający propanolu ulega znacznej agregacji i traci aktywność.

**P r z y k ł a d 4.** Cystatynę białka jaja izolowano tradycyjną metodą Anastasi i wsp. (Biochem J. 1983; 211:129–38) za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie z karboksymetylowaną papainą. Metodę zmodyfikowano zamieniając stabilizujący glicerol obecny w buforze elucyjnym w stężeniu 10% na etanol w stężeniu 30%. Otrzymany preparat cystatyny nie tracił aktywności i nie zawierał agregatów, jak wykazała analiza elektroforetyczna.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób stabilizacji monomerycznej cystatyny w roztworze, **znamienny tym**, że do roztworu wyjściowego cystatyny o stężeniu poniżej 50  $\mu\text{M}$  dodaje się stabilizatora w postaci alkoholu lub wodnego roztworu alkoholu pierwszo- lub drugorzędowego, do uzyskania jego końcowego stężenia do 50%.

2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodaje się alkoholu lub wodnego roztworu alkoholu do uzyskania jego końcowego stężenia na poziomie 30%.

3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że alkoholem jest etanol, propanol izopropanol, butanol, alkohol benzyłowy, glikol propylenowy albo ich mieszaniny.

4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu oczyszczania cystatyny.

5. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu zagęszczania cystatyny.

6. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesów oczyszczania i zagęszczania cystatyny.

7. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu suszenia cystatyny.

