

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **226075**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **396028**

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

(22) Data zgłoszenia: **19.08.2011**

(54)

Sposób otrzymywania koncentratu monomerycznej cystatyny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

30.01.2012 BUP 03/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.06.2017 WUP 06/17

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Olszewska

PL 226075 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania koncentratu monomerycznej cystatyny.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

Proteazy są enzymami katalizującymi hydrolityczny rozkład wiązań peptydowych w cząsteczkach białek. Różnice w budowie miejsca katalitycznego pozwoliły wyodrębnić następujące klasy: aspartylowe, cysteinowe, glutaminowe, serynowe, treoninowe i metaloproteiny. Aktywność enzymatyczna proteaz cysteinowych jest uwarunkowana obecnością reszt Cys i His w centrum katalitycznym. W organizmie ludzkim obecnych jest 11 katepsyn cysternowych zlokalizowanych głównie w lizosomach (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).

Fizjologiczną rolą katepsyn jest proteolityczny rozkład białek, prowadzący do ich degradacji lub powstania form aktywnych w przypadku prohormonów i proenzymów. Katepsyny zaangażowane są również w procesy prezentacji antygenów MHC klasy II, przebudowy tkanki kostnej, różnicowania keratynocytów, reprodukcji oraz apoptozy. Niekontrolowana aktywność katepsyn może prowadzić do hydrolizy białek prawidłowych i w ten sposób przyczyniać się do powstawania stanów patologicznych takich jak: inwazja nowotworów i powstawanie przerzutów, reumatoidalne zapalenie stawów i kości, osteoporoza, choroby przyzębia, demencja starcza, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane (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 proteaz cysternowych jest regulowana przez kontrolę ich syntezy na poziomie transkrypcji, aktywacji zymogenu oraz działanie specyficznych endogennych inhibitorów – cystatyn (Grzonka Z., Jankowska E., Kasprzykowski F., Kasprzykowska R., Łankiewicz L., Wiczek W., Wieczerek E., Ciarkowski J., Drabik P., Janowski R., Kozak M., Jaskólski M., Grubb A.: Structural studies of cysteine proteases and inhibitors, *Acta Bioch. Pol.*, 2001, 48, 1–20).

Rozważa się strategie terapeutyczne oparte na hamowaniu katepsyn cysternowych za pomocą inhibitorów pozyskiwanych metodami chemicznymi bądź biotechnologicznymi. 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. Cząsteczkę owocystatyny buduje pojedynczy łańcuch polipeptydowy, składający się ze 116 reszt aminokwasowych o masie 13131 Da, pozbawiony komponenty węglowodanowej. Cystatyna wykazuje wysoką termostabilność i pH-stabilność. Inkubacja w temperaturze 373 K lub w roztworach zasadowych i kwaśnych przez 30 minut, nie powoduje utraty jej aktywności. Procesy takie jak zamrażanie czy liofilizacja powodują nieodwracalną utratę właściwości inhibitorowych cystatyny. Ich niekorzystny wpływ na aktywność białka można ograniczyć poprzez dodatek do roztworu 20% glicerolu. Ten sposób stabilizacji jest jednak skuteczny tylko dla preparatów o stężeniu mniejszym niż 10 pM. Podczas zagęszczania do wyższych stężeń cystatyna ulega procesom agregacji do nieaktywnych polimerów (Saxena L., Tayyab S.: Protein proteinase inhibitors from avian egg whites, *Cell Mol. Life Sci.*, 1997, 53, 13–23).

Badania nad zastosowaniem cystatyny białka jaja drobiu hodowlanego w terapii nowotworów i choroby Alzheimera są już zaawansowane (Gołąb K., Borowski A., Warwas M.: Kurza cystatyna jako białko modelowe w medycynie, *Farm. Pol.*, 2008, 64, 759–769). Jednak zastosowanie cystatyny w leczeniu wymaga opracowania skoncentrowanych preparatów tego białka cechujących się wysoką aktywnością i stabilnością.

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 253 K, 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). Obecność glicerolu, z uwagi na jego toksyczność, uniemożliwia prowadzenie badań wpływu aktywności cystatyny na izolowanych hodowlach komórkowych.

Wynika z tego, że glicerol musi być usunięty z roztworu cystatyny, przed rozpoczęciem badań, co sprawia, że cystatyna pozbawiona ochrony, polimeryzuje i traci aktywność antypapainową.

Nieoczekiwanie okazało się, że cystatynę można stabilizować poprzez dobór odpowiedniej kompozycji roztworu buforującego oraz dodatek, różnych od glicerolu, stabilizatorów.

Istotą wynalazku jest to, że z rozcieńczonego roztworu wyjściowego cystatyny, pochodzącej z białka jaja drobiu, o stężeniu poniżej 50 μM , usuwa się glicerol wprowadzając do roztworu bufor o pH powyżej 7,0 i sile jonowej poniżej 0,5 M, po czym dodaje się stabilizatora jakim jest albumina wołowa albo glukoza do uzyskania jego końcowego stężenia od 1% do 5%.

Korzystnie jest gdy glicerol z roztworu usuwa się poprzez dializę.

Korzystnie także jest, gdy buforem jest TRIS, albo węglan amonu albo kwaśny węglan amonu albo ich mieszaniny.

Korzystnym jest dodatkowe wprowadzenie procesów oczyszczania i/lub zagęszczania i/lub zamrażania lub zamrażania i liofilizacji lub suszenia cystatyny po dodaniu stabilizatora.

Podstawową zaletą wynalazku jest to, że otrzymuje się wolny od glicerolu, stabilny preparat cystatyny, o aktywności właściwej powyżej 10 U/mg białka i o stężeniu do 5 mM.

Przedmiot wynalazku przedstawiono poniżej, w przykładach realizacji sposobu.

P r z y k ł a d 1. 10 ml roztworu cystatyny o stężeniu 10 μM w PBS z dodatkiem 20% glicerolu o aktywności specyficznej 30 U/mg poddaje się dializie do 50 mM kwaśnego węglanu amonu przez 48 godzin w temperaturze 277 K. Bufor dializacyjny zmienia się trzykrotnie. Do wydializowanego roztworu cystatyny dodaje się albuminy wołowej do stężenia 0,1%. Roztwór ten zagęszczano 10-krotnie poprzez ultrafiltrację na błonie Amicon YM3. Otrzymano preparat cystatyny o stężeniu 100 μM o takiej samej aktywności specyficznej. Preparat nie zawierał agregatów. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskany koncentrat cystatyn zawiera wyłącznie formy monomeryczne.

P r z y k ł a d 2. Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że dializie poddaje się roztwór cystatyny o stężeniu 40 μM a jako bufor stosuje się 50 mM węglan amonu. Do wydializowanego roztworu cystatyny dodano glukozy do stężenia 0,5%. Roztwór ten zagęszcza się do stężenia 100 μM i zamraża w temperaturze 193 K po czym rozmraża się. Cykl powtarza się 4-krotnie. Aktywność specyficzna badanego preparatu nie różniła od aktywności preparatu wyjściowego. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskany koncentrat cystatyn zawiera wyłącznie formy monomeryczne.

P r z y k ł a d 3. Postępuje się jak w przykładzie 2, przy czym roztwór po zamrożeniu, poddaje się liofilizacji. Otrzymany liofilizat rozpuszcza się do uzyskania 100 μM roztworu. Aktywność specyficzna otrzymanego preparatu była o 10% niższa od aktywności preparatu wyjściowego. Preparat był całkowicie rozpuszczalny i nie zawierał agregatów. Analiza elektroforetyczna wykazała, że uzyskany koncentrat cystatyn zawiera wyłącznie formy monomeryczne.

P r z y k ł a d 4. Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że jako bufor stosuje się 50 mM IRIS o pH 1,0, zaś do wydializowanego roztworu cystatyny dodaje się albuminy wołowej do stężenia 0,5%. Roztwór ten zagęszczano 10-krotnie poprzez ultrafiltrację na błonie Amicon YM3. Otrzymany preparat cystatyny o stężeniu 100 μM o takiej samej aktywności specyficznej, zamraża się w temperaturze 250 K. Po rozmrożeniu, preparat w obecności albuminy, nie zmienił aktywności specyficznej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania koncentratu monomerycznej cystatyny z roztworu wyjściowego, stabilizowanej glicerolem, **znamienny tym**, że z rozcieńczonego roztworu wyjściowego cystatyny pochodzącej z białka jaja drobiu, o stężeniu poniżej 50 μM , usuwa się glicerol wprowadzając do roztworu bufor o pH powyżej 7,0 i sile jonowej poniżej 0,5 M, po czym dodaje się stabilizatora, jakim jest albumina wołowa albo glukoza, do uzyskania jego końcowego stężenia od 1% do 5%.

2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że glicerol usuwa się poprzez dializę.

3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że buforem jest TRIS, albo węglan amonu albo kwaśny węglan amonu albo ich mieszaniny.

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

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 a następnie zagęszczania cystatyny.

7. Sposób, według zastrz. 1 albo 4, albo 5, albo 6, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu zamrażania nystatyny.

8. Sposób, według zastrz. 1 albo 4, albo 5, albo 6, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu zamrażania i liofilizacji cystatyny.

9. Sposób, według zastrz. 1 albo 4, albo 5, albo 6, **znamienny tym**, że stabilizator dodaje się przed rozpoczęciem procesu suszenia cystatyny.