ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 13

Přihlášeno 07. 03. 75 (PO 19-75)

Právo přednosti od 07. 03. 75

Zveřejněno FEBS Letters 51, 133 (1975); Collection Czechoslov. Chem. Commun. 41, 1096 (1976); Z. Physiol. Chem. 357, 345 (1976)

Uděleno 05. 12. 78

Vydáno 15. 06. 79

MDT
577.15.024
577.15.07

Autor objevu: ČIHÁK ALOIS, RNDr., CSc., PRAHA

Název objevu: **Thermostabilní preparát uridinkinasy, získaný precipitací frakce celulárních bílkovin účinkem iontů těžkých kovů**

Předmět objevu:

1. Jev spočívající ve vzniku precipitované formy uridinkinasy, přítomné ve frakci celulárních bílkovin, účinkem iontů těžkých kovů (Pb^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}).
2. Vlastností precipitované formy uridinkinasy, vzniklé podle bodu 1, je enzymatická aktivita, která se zachovává u lyofilisovaného preparátu při zahřátí na 100 °C.

Objev se týká enzymu uridinkinasy, který se účastní synthesy pyrimidinových nukleotidů, nezbytných pro tvorbu nukleových kyselin. Zvýšená aktivita tohoto enzymu je přítomna v rychle proliferujících tkáních a slouží k zajištění zvýšeného přísunu pyrimidinových nukleotidů. Vzhledem k tomu, že uridinkinasa využívá jako substrát nejenom přirozené nukleosidy, uridin a cytidin, ale i syntheticky připravená analoga těchto látek (5-azacytidin, 6-azauridin, 5-fluoruridin a další), která mají cytostatické účinky a užívají se k léčbě neoplasií, má tak uridinkinasa klíčový význam. Cytostaticky účinná pyrimidinová analoga působí inhibičně až po přeměně na příslušné 5'-monofosfáty, kteroužto reakci právě katalysuje uridinkinasa. Význam uridinkinasy v chemotherapii nádorových onemocnění zvyšuje dále skutečnost, že vznik resistence organismu na cytostatika z řady pyrimidinových analog je provázen poklesem aktivity uridinkinasy, katalysující jejich prvou a pro biologický účinek nezbytnou transformaci.

Studie o uridinkinase se zabývají jednak jejím významem v chemotherapii nádorových onemocnění [např. Veselý, J., Čihák, A.: Oncology **28**, 204 — 226 (1973), Brockman, R. W.: Handbook Exptl. Pharmacol. **38/1**, 352 — 410 (1974)], jednak isolací a její fysikálně chemickou charakterisací [např. Sköld, O.: J. Biol. Chem. **235**, 3273 — 3279 (1960), Lee, T., Karon, M., Momparler, R. L.: Cancer Res. **34**, 2482 — 2488 (1974)]. Molekula uridinkinasy je značně veliká [Orengo, A.: J. Biol. Chem. **244**, 2204 — 2209 (1969), Roux, J. M., Hoogenraad, N. J., Kretchmer, N.: J. Biol. Chem. **248**, 1196 — 1202 (1973)] a v některých tkáních se může vyskytovat ve dvou formách [Keefer, R. C., Morris, H. P., Webb, T. E.: Cancer Res. **34**, 2260 — 2265 (1974)]. Isolace uridinkinasy v čistém stavu se dosud nepodařila. Podání některých metabolických inhibitorů vede ke zvýšení její aktivity v jaterní tkáni [Čihák, A., Veselý, J., Harrap, K. R.: Biochem. Pharmacol. **23**, 1087—1094 (1974)], avšak molekulární podstata tohoto jevu není známa. Shrnutí údajů o uridinkinase, pokud jde o její vlastnosti, isolaci a biologický význam je provedeno v přehledné práci [Čihák, A., Rada, B.: Neoplasma **23**, 233 — 248 (1976)].

Podstatou objevu je precipitace uridinkinasy, přítomné v částečně purifikovaném celulárním extraktu, pomocí dvojmocných iontů různých těžkých kovů (Pb^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}). Vzniklá, irreversibilně precipitovaná uridinkinasa si i ve formě sraženiny podržuje enzymatickou aktivitu. Lyofilisovaný preparát takto vzniklé sraženiny je thermostabilní a podržuje si enzymatickou aktivitu i při zahřátí na 100 °C.

Uridinkinasa byla 10krát purifikována z homogenátu telecího mozku 20 — 40% vysycením síranem amonným. Získaný podíl bílkovin byl rozpuštěn ve vodě a přítomná uridinkinasa byla vysrážena za chlazení pomalým přidáváním roztoku dvojmocných iontů různých těžkých kovů. Jako nejvhodnější se ke srážení ukázaly zinečnaté a olovnaté ionty, přidávané ve formě chloridu či acetátu do konečné koncentrace 3 až 5×10^{-3}M. Za těchto podmínek nebyla v supernatantu prokázána uridinkinasová aktivita a z celkové aktivity enzymu se kolem 60 — 70 % nacházelo v precipitované formě. Současně došlo k dvojnásobnému zvýšení specifické aktivity vysráženého enzymu. Sraženina bílkovin byla oddělena za chlazení odstředěním a opakovaně promyta ledovou vodou, aby došlo k odstranění volně adsorbovaných iontů těžkých kovů. Takto promytá sraženina byla suspendována ve vodě a lyofilisována. Vznikl bílý, případně lehce zbarvený prášek, který se nerozpouští ve vodě ani v pufrech, avšak vykazuje vysokou uridinkinasovou aktivitu. Uvedený postup je naprosto reprodukovatelný.

Aktivita enzymu byla ověřena jak za použití přirozených radioaktivních substrátů uridinu a cytidinu, tak synthetických pyrimidinových analog s cytostatickým účinkem, tj. 6-azauridinu s 5-fluoruridinu. V případě 6-azauridinu došlo za 30 min inkubace při 37 °C k 80% přeměně nukleosidu na příslušný 5'-monofosfát, aniž by došlo k jeho značnějšímu rozštěpení na výchozí nukleosid. Precipitovaná forma enzymu je stejně jako solubilní uridinkinasa citlivá k inhibici cytidin 5'-trifosfátem, a to i po zahřátí lyofilisovaného preparátu na 100 °C. Hodnoty zdánlivých K_m' konstant olovnatými a zinečnatými ionty precipitované uridinkinasy jsou prakticky stejné, avšak dvakrát nižší než u rozpustného enzymu (1.0, 1.0 a 2.0 mM). Elementární analysou precipitovaných a lyofilisovaných preparátů uridinkinasy bylo zjištěno, že na molární bázi je obsah Zn^{2+}- a Pb^{2+}-iontů v obou preparátech stejný. Lyofilisovaný preparát olovnatého a především zinečnatého komplexu uridinkinasy a přítomných balastních bílkovin je vysoce thermostabilní. Částečně purifikovaný preparát uridinkinasy precipitovaný za shora uvedených podmínek 5 mM Zn^{2+}-ionty snesl v lyofilisovaném stavu jednohodinové zahřátí na 100 °C bez výraznějšího poklesu enzymatické aktivity. Údaje o thermostabilitě obou preparátů, umožňující sterilisaci Zn-precipitované formy uridinkinasy, jsou patrny z následující tabulky.

Tabulka

Thermostabilita lyofilisátu uridinkinasy z telecích mozků precipitované Zn^{2+} a Pb^{2+}-ionty

Aktivita enzymu je udána v % kontrolních nezahřívaných preparátů.

Teplota zahřívání °C	Délka zahřívání	
	1 hod	3 hod
	Zn-Precipitát	
60	98	85
80	92	76
100	90	42
	Pb-precipitát	
60	84	57
80	76	42
100	61	30

Uvedené vlastnosti, tj. aktivita uridinkinasy v precipitované formě a vysoká thermostabilita lyofilisovaného preparátu naznačují, že lze předpokládat jeho praktické použití. V tomto případě lze přednostně uvažovat o zinečnatém komplexu uridinkinasy, neboť Zn^{2+}-ionty jsou pro organismus v nízkých dávkách přímo nezbytné. Uridinkinasa v precipitované formě je v podstatě vázána na pevný nosič, kteroužto úlohu v tomto případě plní fysiologický substrát, tj. přítomné balastní bílkoviny. Nabízí se chemotherapeutické využití schopnosti precipitovaného enzymu katalysovat přeměnu cytostaticky účinných pyrimidinových analog. Pro výrobní účely lze uvažovat o využití preparátu pro průmyslovou preparativní přípravu radioaktivních nukleotidů z příslušných nukleosidů.

Severografia, n. p., provozovna 32, Most