



URAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

215112  
(11) (B2)

[51] Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 37/48

- [22] Přihlášeno 08 12 78  
[21] (PV 8159-78)  
[32] [31] [33] Právo přednosti od 14 12 77  
(P 27 55 799.9)  
Německá spolková republika  
[40] Zveřejněno 30 10 81  
[45] Vydáno 15 10 84

[72]  
Autor vynálezu

THUM WALDEMAR, LANG GUNTER, VETTER HELLMUTH dr., NÄHER  
GOTTHILF dr., TUTZING (NSR)

[73]  
Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM (NSR)

## (54) Skladovatelný vodný cholesteroloxidázový preparát, obsahující pufr a stabilizační činidlo

1

Vynález se týká skladovatelného vodného cholesteroloxidázového preparátu, obsahujícího pufr a stabilizační činidlo. Oblastí použití tohoto preparátu podle vynálezu je analytické stanovení cholesterolu a esterů cholesterolu.

Enzymatická účinnost proteinu je určena prostorovým uspořádáním zbytků aminokyselin v jeho polypeptidových řetězcích. Tato „konformace“ je ve vodném roztoku ovlivněna přítomností elektricky nabitých nebo nenabitých anorganických i organických molekul. Proto jsou enzymy ve vodném roztoku zpravidla velmi citlivé a snadno u nich dochází ke snížení účinnosti. Vodné enzymatické preparáty musí být proto stabilizovány.

O účinku nízkomolekulárních anorganických solí je známo, že jejich aniontové i kationtové složky mohou působit na konformaci enzymu buď více stabilizačně, nebo více denaturačně. Takovéto anionty a kationty jsou podle tohoto účinku zařazeny v tak zvané Hoffmeisterově řadě („Structure and Stability of biological Macromolecules“ od Timasheffa a Fasmana, nakl. Mercel Dekker, Inc., New York, 1969, str. 427). Podle Hoffmeisterovy řady jsou anionty a kationty vždy nezávisle na sobě účinné buď více stabilizačně, nebo více denaturačně. V čele

2

stabilizačního účinku jsou přitom síranový anion a kvartérní amoniové ionty, za nimiž následuje amoniový ion. Je proto snadno vysvětlitelné, že převážná část komerčních enzymových preparátů obsahuje jako stabilizační činidlo síran amonný, samotný nebo popřípadě s dalšími specifickými stabilizačními činidly. I cholesteroloxidáza je v komerčním vodném roztoku až dosud stabilizována síranem amonným.

Ukázalo se však, že stabilita cholesteroloxidázy v roztoku síranu amonného skýtá podnět k výtkám. Nejlepšího stabilizačního účinku bylo dosaženo asi při 1 M roztoku síranu amonného; tento účinek se však při vyšší koncentraci síranu amonného snižuje. Již při 1 M koncentraci však někdy dochází k vylučování hrubě vločkových mastných sraženin enzymu, které jsou sice stále ještě enzymaticky účinné, avšak ovlivňují dávkování při plnění.

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že lze tuto obtíž odstranit a jednak zcela zabránit vylučování sraženin, jednak dosáhnout vynikající stabilizace, když se jako stabilizačního činidla použije chloridu sodného nebo chloridu draselného v koncentraci v rozmezí 2,0 až 3,5 M.

Předmětem vynálezu je proto skladovatelný vodný cholesteroloxidázový preparát,

obsahující pufr a stabilizační činidlo, který se vyznačuje tím, že v 1 litru obsahuje jakožto stabilizační činidlo 2 až 3,5 molu chloridu sodného nebo chloridu draselného. Výhodně obsahuje chlorid sodný v koncentraci 2,5 až 3,2 M.

Nadřazený stabilizační účinek uvedených solí nebylo možno očekávat, poněvadž podle Hoffmeisterovy řady draslík a sodík stabilizují značně méně, to znamená deaktivují silněji než amonium, a i chlorid deaktivuje podstatně silněji než síran. K tomu ještě přistupuje, že — jak známo — flavinové enzymy, k nimž patří i cholesteroxidáza, jsou deaktivovány chloridy alkalických kovů při vyšší koncentraci (Theorell, v časopisu Acta Chem. Scand. 3, 1954, str. 1649).

Za výše uvedených podmínek dochází k dobré stabilitě při hodnotách pH v rozmezí 4,5 až 8,5. Cholesteroxidázový preparát podle vynálezu má hodnotu pH výhodně v rozmezí 5,0 až 6,5. Molární koncentrace pufru je obecně v rozmezí 0,01 až 0,5 M/l, výhodné rozmezí je 0,01 až 0,1 M/l.

Jako pufrů je možno použít všech solí pufrujících ve výše uvedeném rozmezí, například fosforečnanu draselného, fosforečnanu sodného, směsi fosforečnanu drasel-

ného a kyseliny citrónové, dále octanu sodného atd.

V jednotlivých případech sice již byly enzymy skladovány v roztocích chloridů alkalických kovů, byly však pro to směrodatně provozní důvody, například lepší schopnost krystalizace papainu v chloridu sodném ve srovnání s chloridem amonným nebo čištění lectinů chromatograficky v roztocích chloridu sodného, takže bylo možno se smířit se zhoršenou stabilitou. Pro flavinové enzymy však nebyla taková forma skladování známa, poněvadž vede k odštěpení prostetické skupiny při hodnotách pH v kyselé oblasti.

Nadřazená stabilita při skladování cholesteroxidázových preparátů podle vynálezu oproti cholesteroxidázovým preparátům stabilizovaným síranem amonným vyplývá z těchto pokusů:

Dávka cholesteroxidázy s obsahem enzymu 450 j./ml v 0,05 M roztoku fosforečnanu draselného jakožto pufru, o pH 6, se nastaví na koncentraci soli uvedenou v následující tabulce I a udržuje se čtyři týdny při teplotě 4 °C, popřípadě +35 °C. Zbytková účinnost, zjištěná po uplynutí této doby, je patrná z tabulky (údaje po dvou týdnech jsou uvedeny v závorce).

Tabulka I

teplota, na níž se zkoušená oxidáza udržuje	druh koncentrace přísad		
	1 M síran amonný	3 M chlorid sodný	3 M chlorid draselný
+4 °C	(100 %)	(96 %)	(100 %)
	100 % kalný	96 % čirý	100 % čirý
+33 °C	(86 %)	(88 %)	(91 %)
	55 % kalný	88 % čirý	87 % čirý

Nadřazené stabilizace podle vynálezu se dosahuje nezávisle na koncentraci enzymu a na dávce enzymu (jednotlivé násady se často liší svou stabilitou) a stabilizace je ještě výraznější, když se porovná nikoliv s 1 M roztokem síranu amonného, nýbrž s 3 M roztokem síranu amonného.

Dvě různé dávky enzymu s výše uvede-

ným pufrům se nastaví na koncentraci 300 j./ml, popřípadě 30 g/ml, a pak se — jak výše popsáno — udržují čtyři týdny při teplotě 35 °C. V dále uvedené tabulce II jsou uvedeny zbytkové účinnosti měřené po čtyřech týdnech. V závorkách jsou uvedeny hodnoty po dvou týdnech.

Tabulka II

dávka	koncentrace enzymu	1 M síran amonný	3 M síran amonný	3 M chlorid sodný
1	300 j/ml	(73 %)	(68 %)	(100 %)
	30 j/ml	58 %		92 %
2	300 j/ml	(77 %)	(87 %)	(100 %)
	30 j/ml	67 %		96 %
2	300 j/ml	(73 %)	(87 %)	(100 %)
	30 j/ml	68 %		88 %
2	300 j/ml	(55 %)	(87 %)	(100 %)
	30 j/ml	55 %		88 %

Aby bylo doloženo, že nadřazená stabilizace podle vynálezu je omezena na určitý rozsah koncentrace, byl při dávce enzymu o koncentraci 30 j/ml proveden výše popsaný test stárnutí při teplotě 4 °C, popřípadě

35 °C, po dobu čtyř týdnů (dvou týdnů) s dvěma různými koncentracemi síranu amonného a čtyřmi různými koncentracemi chloridu sodného. Výsledky jsou uvedeny v tabulce III.

Tabulka III

teplota	síran amonný			chlorid amonný		
	1 M	3,2 M	2 M	3 M	4 M	5 M
+4 °C	(95 %)	100 % (100 %)	90 % (72 %)	95 % (64 %)	95 % (76 %)	80 % (100 %)
+35 °C	(72 %)	46 % (61 %)	45 % (88 %)	71 % (88 %)	77 % (26 %)	40 % (16 %) 0

Níže je uveden příklad výroby a složení skladovatelného vodného cholesteroxidázového preparátu podle vynálezu, stabilizovaného přidávkem chloridu sodného.

## Příklad 1

100 ml suspenze cholesteroxidázy v síranu amonném se dialyzuje proti nadbytku 0,07 molárního fosforečnanového pufru o pH 6,0. Dialyzát se zředí dialyzovým pufrům na enzymovou aktivitu 300 j. cholesteroxidázy/ml a po přidání tuhého chloridu sodného se upraví na konečnou koncentraci 3 molů NaCl.

Takto vyrobený skladovatelný cholesteroxidázový preparát má toto složení:

cholesteroxidáza	10 g
chlorid sodný	175 g
hydrofosforečnan dvojsodný	1,5 g
dihydrofosforečnan draselný	8,1 g
voda doplnit do	1000 g

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Skladovatelný vodný cholesteroxidázový preparát, obsahující pufr a stabilizační činidlo, pro stanovení hladiny cholesterolu v biologickém materiálu, vyznačující se tím, že v 1 litru obsahuje jakožto stabilizační činidlo 2 až 3,5 molu chloridu sodného nebo chloridu draselného, má hodnotu pH v rozmezí od 4,5 do 8,5 a koncentraci pufrovací soli v rozmezí od 0,01 do 0,5 M/l.

## Příklad 2

0,02 ml séra se přidá k 10,0 ml 0,5 M roztoku fosforečnanu draselného jakožto pufru, o pH 7,5, který obsahuje 0,4 % hydroxypolyethoxydodekanu. Ve spektrálním fotometru se odečte extinkce ( $E_1$ ) při 240 nm a zahájí se reakce přidáním 0,02 ml (což odpovídá 0,5 j.) cholesteroxidázy, obsahující 3,0 M chloridu sodného, 0,05 M fosforečnanu draselného, jakožto pufru, o pH 6,0.

Po 5 minutách se znovu odečte extinkce ( $E_2$ ). Koncentrace vzniklého  $\Delta^4$ -cholesten-3-onu a tím i volného cholesterolu vyplývá z rozdílu mezi prvním a druhým odečtením s přihlédnutím molárního extinkčního koeficientu pro  $\Delta^4$ -cholesten-3-on při 240 nm ( $\epsilon = 15,5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ).

2. Cholesterol-oxidázový preparát podle bodu 1, vyznačující se tím, že v 1 litru obsahuje 2,5 až 3,2 molu chloridu sodného.

3. Cholesteroxidázový preparát podle bodu 1, vyznačující se tím, že má hodnotu pH v rozmezí od 5 do 6,5.