(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 820 048**

(51) Int. CI.:

C12N 9/88 (2006.01)
C12Q 1/527 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2015 PCT/CN2015/079704**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2016 WO16138700**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2015 E 15883757 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3266868**

(54) Título: **Heparinasas obtenidas de *Sphingobacterium daejeonense,* su preparación y su aplicación**

(30) Prioridad:

05.03.2015 CN 201410839278

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2021

(73) Titular/es:

SHENZHEN HEPALINK PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (100.0%)
No. 21 Langshan Road, Songpingshan, Nanshan District
Shenzhen, Guangdong 518057, CN

(72) Inventor/es:

BAI, JIAKE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Heparinasas obtenidas de *Sphingobacterium daejeonense*, su preparación y su aplicación

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas heparinasas que aún no se han presentado y, más particularmente, a dos nuevas heparinasas SDhep I y SDhep II derivadas de *Sphingobacterium daejeonense,* que se han preparado mediante fermentación bacteriana, disrupción celular y cromatografía en columna de múltiples etapas, y a un procedimiento de preparación de estas dos enzimas y sus aplicaciones en la prueba de calidad de heparina y heparinas de bajo peso molecular.

Técnica anterior

Las heparinasas se refieren a una clase de enzimas que pueden escindir específicamente los enlaces glucosídicos de la cadena principal de heparina y heparán, que tienen amplias aplicaciones, tales como la eliminación de heparina residual en la sangre, la preparación de heparinas de bajo peso molecular, el estudio de la estructura de heparina y las pruebas de calidad de heparina. Las heparinasas se encuentran originalmente y se aíslan de *flavobacterium heparinum* y también se encuentran en algunos tejidos microbianos y animales. Hay más de 10 heparinasas presentadas en trabajos académicos, tales como las heparinasas I, II, III encontradas y aisladas de *flavobacterium heparinum* por Yang V.C.; una heparinasa producida extracelularmente que se encuentra en *Bacillus BH100* (FERM BP-2613) por Robert W. Bellamy y col.; una heparinasa que se encuentra en *Fusarium oxysporum* HJ-15 por Wan-Seok Kim y col. [Carbohydrate Research, 2012, 359: 37-43].

Las heparinasas más ampliamente estudiadas y utilizadas son la heparinasa I, la heparinasa II y la heparinasa III, derivadas de *flavobacterium heparinum,* que son proteínas monoméricas con pesos moleculares de aproximadamente 43, 78, 66 kDa, respectivamente y con puntos isoeléctricos de aproximadamente 9.0. El descubrimiento de las heparinasas ha desempeñado un papel importante en el estudio de la estructura y las pruebas de calidad de las heparinas, donde las enzimas I, II, III derivadas de *flavobacterium heparinum* se han utilizado para pruebas de calidad de heparina y producción de heparinas de bajo peso molecular.

Yapeng C. y col. (2012) y CN 1429913 describen heparinasas que se han aislado de Sphingobacterium. Yapeng C. y col. (2012), así como Tripathi CKM. y col., los documentos US 5169772 y WO 94/12618 describen procedimientos para purificar heparinasas.

Las heparinasas de la invención son heparinasas innovadoras, que aún no se han presentado, tienen propiedades fisicoquímicas diferentes de las heparinasas conocidas actualmente, y tienen sitios de escisión enzimática altamente selectivos, por lo que tienen una buena posibilidad de aplicación.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona dos nuevas heparinasas intracelulares SDhep I y SDhep II purificadas de una bacteria *Sphingobacterium daejeonense,* y describe un procedimiento de purificación y propiedades de las enzimas obtenidas. El peso molecular de SDhep I es 74692 Da, su constante de Michaelis es 0,5738 mol/L, y su punto isoeléctrico es 5,64. El peso molecular de SDhep II es 94716 Da, su constante de Michaelis es 0,0052 mol/L y su punto isoeléctrico es 5,76. Las dos heparinasas son las nuevas heparinasas que aún no se han presentado.

La cepa de bacterias utilizada para implementar la presente invención es una cepa (No. Z4-2) aislada del suelo de las tierras de cultivo del oeste de la ciudad de Chengguan, condado de Yunmeng, provincia de Hubei, China, que puede producir heparinasas cuando se cultiva con medio que contiene heparina. La cepa se cultivó en un medio inclinado y se almacenó a -70 °C, y se identificó como *Sphingobacterium daejeonense* por el Centro Provincial de Análisis y Análisis Microbiológicos de Guangdong. Esta bacteria fue presentada en 2006 [Int J Syst Evol Microbiol., 2006, 56 (Pt 9): 2031-6.] pero no hay ningún informe sobre la producción de heparinasa por la cepa.

Las heparinasas se preparan del modo siguiente.

(1) Fermentación de cepa y preparación de solución de enzima bruta de *Sphingobacterium daejeonense*:

Los cuerpos bacterianos se toman dos veces de una placa o una pendiente con un asa de inoculación y se inoculan en un medio de semilla y se cultivan durante 1-2 días. A continuación, la cepa se inoculó en el medio de semilla líquido secundario con una cantidad de inóculo del 5-20 % y se cultivó durante 1-2 días. A continuación, la cepa se inoculó en medio de fermentación 2L con una cantidad de inóculo del 5-20 % y se cultivó durante 1-5 días. La solución bacteriana se recogió y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15-30 minutos a 4 °C. El precipitado se recogió, se suspendió en tampón Tris-HCl, se alteró durante 1-5 círculos en un homogeneizador de alta presión a 800 bares a 4 °C, y se centrifugó durante 30 minutos. A continuación, se toma el sobrenadante y se somete a precipitación con sulfato de amonio bajo baño de hielo, y se recoge el componente precipitado con una saturación del 35 %-85 %. El precipitado se disolvió a continuación en 100 ml de tampón Tris-HCl y se dializó durante la noche en el mismo tampón.

(2) Separación de enzimas brutas por columna Q:

La solución enzimática obtenida en la etapa (1) se carga en una columna Q preequilibrada con un tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el mismo tampón. La solución de efluente y la solución de equilibrio se recogen en tubos de ensayo para detectar la actividad de heparinasa; las fracciones activas se recogen y combinan, siendo una heparinasa no unida a la columna Q. Las fracciones recogidas, combinadas y dializadas que tienen actividad de heparinasa del eluyente son una heparinasa unida a la columna Q.

(3) Purificación de la enzima SDhepI:

La heparinasa no unida a la columna Q obtenida en la etapa (2) se carga en una columna CS preequilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el mismo tampón Las fracciones con actividad de heparinasa se recogen y se dializan. La solución de enzima dializada se carga en una columna SP preequilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en tampón Tris-HCl. Las fracciones activas se recogen y se concentran a 0,2 ml mediante un tubo de centrífuga de ultrafiltración que intercepta un peso molecular de 30 kD. La solución enzimática concentrada se carga en una columna Sephadex G-100 equilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se eluye con el mismo tampón, se recoge, se combina y se concentra.

(4) Purificación de la enzima SDhep II:

La heparinasa unida a la columna Q obtenida en la etapa (2) se carga en una columna CS preequilibrada con un tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0,1-0,6 M de NaCl en el mismo tampón. Las fracciones con actividad de heparinasa en la solución eluyente se detectan, se recogen, se combinan y se dializan. La solución enzimática obtenida se carga en una columna Q preequilibrada con tampón Tris-HCl y se eluye con 0,08 M de NaCl en el mismo tampón. Las fracciones activas se detectan, se recogen y se cargan en una columna CS preequilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se equilibran con el mismo tampón y, a continuación, se eluyen con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en el mismo tampón. Las fracciones activas se recogieron, combinaron y concentraron.

El tampón Tris-HCl descrito en cada una de las etapas (1), (2), (3) y (4) es preferiblemente una solución de Tris-HCl que contiene $CaCl_2$, pH 6.5-8.0. La concentración de Tris-HCl es preferiblemente 10-50 Mm, lo más preferiblemente 25 mM; el contenido de $CaCl_2$ es preferiblemente de 1 a 50 mM, lo más preferiblemente de 10 mM; el pH preferido está en el intervalo de 7.0 a 7.5, más preferiblemente 7.0.

La columna Q descrita en cada una de las etapas (2), (3) y (4) es preferiblemente Sepharose-Q de flujo rápido, alternativamente se puede seleccionar entre Q-Sepharose de perlas grandes, Q-Sepharose XL, Q-Sepharose de alto rendimiento y otras columnas de intercambio aniónico fuertes.

La columna CS descrita en cada una de las etapas (3) y (4) es preferiblemente sulfato de cellufina, alternativamente puede ser una columna de afinidad Sepharose-CL-4B activada por CNBr, etc., que se ha unido a heparina y puede unirse a heparinasa.

La columna SP descrita en la etapa (3) es preferiblemente Sepharose-SP de flujo rápido, alternativamente puede seleccionarse de otras columnas de intercambio catiónico fuertes.

La columna Sephadex G-100 descrita en la etapa (3) puede seleccionarse alternativamente de otras columnas de gel adecuadas para la separación y purificación de proteínas de 10-100 KDa.

La determinación de la actividad de heparinasa, heparán sulfato en el procedimiento se refiere a una Solicitud de Patente China N. º 201110241260.4 "Un procedimiento para producir heparinasa flavobacteria heparina I, II, III". La determinación del contenido de proteína y la pureza enzimática se refiere a [Carbohydrate Research, 2012, 359: 37-43] Ambos se incorporan en esta invención como referencia.

También se hace referencia a la composición del medio de cultivo de semillas descrito en la etapa (1) en CN 201110241260.4.

La composición (g/L) del medio de fermentación descrito en la etapa (1) es 2 partes de triptona, 8 partes de heparina, 5 partes de NaCl, 1 parte de $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 partes de KH_2PO_4, 0,5 partes de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.0.

3. Las propiedades de las heparinasas

(1) Los pesos moleculares de las heparinasas SDhep I y SDhep II de la presente invención determinadas por SDS-PAGE son aproximadamente 74700 Da y 94700 Da respectivamente. Los pesos moleculares exactos determinados por la espectrometría de masas MALDI-TOF-MS son 74692Da para SDhep I y 94716Da para SDhep II.

(2) Los puntos isoeléctricos de las heparinasas SDhep I y SDhep II según la presente invención, medidos por

electroforesis de enfoque isoeléctrico, son 5,64 y 5,76, respectivamente.

(3) Las heparinasas SDhep I y SDhep II según la presente invención tienen ambas un pH de reacción óptimo de 8.0, con HEP o HS como sustrato.

(4) La temperatura de reacción óptima de la heparinasa SDhep I, con HEP o HS como sustrato, es 47 °C o 45 °C, respectivamente. La temperatura de reacción óptima de SDhep II es 43 °C, tanto para HEP como para HS como sustratos.

(5) Para las heparinasas SDhep I y SDhep II en la presente invención, K^+, Mg^{2+}, Na^+, Mn^{2+} y Ca^{2+} tienen todos un efecto promotor de la actividad enzimática, donde Ca^{2+} tiene el efecto más fuerte, mientras que Cu^{2+}, Fe^{2+} y Fe^{3+} tienen un efecto inhibitorio

La presente invención proporciona dos heparinasas derivadas de *Sphingobacterium daejeonense,* que se obtienen por fermentación bacteriana, disrupción celular, precipitación con sulfato de amonio y aislamiento y purificación por cromatografía en columna de múltiples etapas. Las propiedades fisicoquímicas de las dos heparinasas SDhep I y SDhep II, incluido el peso molecular y el punto isoeléctrico, son diferentes de cualquiera de las heparinasas conocidas actualmente. Las dos heparinasas pueden hidrolizar HEP y HS, y el disacárido resultante tiene una composición específica, respectivamente. Las enzimas pueden usarse para analizar las estructuras de las heparinas y sus análogos, pueden usarse para la detección de la calidad de la heparina y para la preparación de heparinas de bajo peso molecular.

Descripción de las figuras

Figura 1. Mapas SDS-PAGE de las enzimas SDhepI y SDhepII.

Figura 2. Mapa SAX-HPLC del producto de la enzimólisis de HEP por SDhep I.

Figura 3. Mapa SAX-HPLC del producto de la enzimólisis de HEP por SDhep II

Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, pero no debe interpretarse como limitante de la presente invención.

Ejemplo 1: preparación de SDhep I

a) Fermentación de cepa de *Sphingobacterium daejeonense* y preparación de solución de enzima bruta:

Los cuerpos bacterianos se tomaron dos veces de una placa o una pendiente con un asa de inoculación y se inocularon en 50 ml de medio de siembra, se cultivaron con agitación a 30 °C y 150 rpm durante 12 horas y, a continuación, se inocularon en 200 ml de medio de siembra líquido secundario con una cantidad de inóculo del 10 % y se cultivaron con agitación a 30 °C y 150 rpm durante 24 horas y, a continuación, se introdujeron en 2 l del medio de fermentación con una cantidad de inóculo del 10% y se cultivaron con agitación a 30 °C y 150 rpm durante 24 horas. Se extrajo 1 l de solución bacteriana y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado se recogió y se suspendió en 100 ml de solución de tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0) y se interrumpió en tres ciclos usando un homogeneizador de alta presión a 4 °C y 800 bares, a continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, siendo el sobrenadante una solución de enzima bruta. La precipitación con sulfato de amonio se realizó para recoger precipitados con un 35 % a un 85 % de saturación de sulfato de amonio. El precipitado se disolvió en 100 ml de tampón Tris-HCl y se dializó durante la noche en el mismo tampón.

b) Separación de columna Q:

La solución enzimática obtenida en la etapa a) se cargó en una columna Q con un tamaño de 2,5 x 30 cm preequilibrado con tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0) y, a continuación, se equilibró con 3 volúmenes de columna en el mismo tampón. El efluente de carga y el efluente de equilibrio se examinaron para determinar la actividad de heparinasa, y las fracciones con actividad se recogieron y combinaron.

c) Purificación de columna CS:

El efluente de carga y la solución de equilibrio recogidos en la etapa b) se cargaron en una columna CS con un tamaño de 2,5 x 30 cm preequilibrado con tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0). La columna se equilibró con 3 volúmenes de columna en el mismo tampón y, a continuación, se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en el tampón. Las fracciones activas se recogieron y se dializaron en 2 l de 25 mM de Tris-HCl que contenía un tampón de 10 mM de $CaCl_2$, con pH 7.0 durante la noche.

d) Purificación de columna SP:

La solución de enzima dializada obtenida en la etapa c) se cargó en una columna SP con un tamaño de 2,5 x 30 cm

preequilibrado con un tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0), a continuación se equilibró con 3 volúmenes de columna en el mismo tampón y, a continuación, se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el tampón. Las fracciones activas se recogieron y se concentraron en 200 µl con tubos de centrífuga de ultrafiltración a más de 30 KD.

e) Purificación de columna Sephadex G100:

La muestra concentrada obtenida en la etapa d) se cargó en una columna Sephadex G-100 con un tamaño de 1,0 x 100 cm preequilibrado con un tampón de 25 mM de Tris-HCl que contenía 10 mM de $CaCl_2$, con pH 7.0 y, a continuación, se eluyó con la misma solución de tampón, en la que se usó una bomba peristáltica para controlar un caudal de aproximadamente 2 ml/h. Las fracciones se recogieron en tubos, 1 ml por tubo, y se determinó la actividad de las fracciones. Las fracciones con actividad enzimática se recogieron y se concentraron a 200 µL por tubo de centrífuga de ultrafiltración de 30 KD, y se colocaron en un tubo EP de 1,5 ml. 300 µL de un tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0) y, a continuación, se añadieron 500 µL de glicerol a un volumen de 1 ml. La actividad enzimática y el contenido de proteínas para cada etapa del procedimiento de purificación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Actividad enzimática y contenido de proteínas para cada etapa en la purificación SDhep I

Etapas de purificación de SDhep I	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad de la enzima HEP (IU/ml)	Actividad total (IU)	Actividad específica (IU/mg)	purificación múltiple	Rendimiento (%)
Enzima bruta	150	76,65	2,41	361,5	4,72	/	/
Precipitación de tiamina	135	37,80	2,60	351,0	9,29	1,97	97,10
Columna Q	135	12,82	1,22	164,7	12,85	2,72	45,56
Columna CS	75	2,47	1,38	103,5	41,90	8,88	28,63
Columna SP	62	0,81	1,03	63,9	78,84	16,70	17,67
Sephadex G-100	1	0,278	50,6	50,6	182,01	38,56	14,00

Ejemplo 2: estudio sobre las propiedades de SDhep I

El peso molecular de SDhep I fue de aproximadamente 74700 Da por SDS-PAGE, como se muestra en la figura 1, y su peso molecular exacto fue de 74692 Da por análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF-MS.

El punto isoeléctrico de SDhep I era 5,64 por electroforesis de enfoque isoeléctrico.

Las velocidades iniciales de reacción enzimática se determinaron bajo diversas concentraciones de sustrato para obtener la constante de Michaelis, la constante de Michaelis de la SDhep I fue de 0,5738 mol/L y 0,0418 mol/L respectivamente, siendo HEP o HS el sustrato.

La actividad de la heparinasa SDhep I se determinó como HEP o HS siendo el sustrato respectivamente, y el pH del sustrato siendo 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0 respectivamente. Los resultados mostraron que el intervalo de pH con actividad enzimática fue de 6.5-9.5 siendo HEP el sustrato, y el pH óptimo fue de 8.0. Siendo HS el sustrato, el intervalo de pH con actividad enzimática fue de 5.5-9.0, y el pH óptimo fue de 8.0.

La actividad de heparinasa SDhep I se determinó como HEP o HS siendo el sustrato respectivamente, y siendo las temperaturas del sustrato 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49 °C, respectivamente. Los resultados mostraron que la temperatura óptima fue de 47 °C siendo HEP el sustrato, y la temperatura óptima fue de 45 °C siendo HS el sustrato.

Efectos de las especies de iones metálicos en SDhep I: efecto en SDhep I de añadir 10 mM Mg^{2+}, Mn^{2+} y Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}o Mn^{2+} respectivamente en el sustrato HEP o HS, con 25 mM de Tris-HCl (pH 7.0) como tampón, se probó, sin la adición de ningún ion metálico como grupo de control en blanco. Los resultados mostraron que la actividad enzimática mejorada de K^{+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Mn^{2+} y Ca^{2+}, donde Ca^{2+} tuvo los mejores efectos sobre la mejora de la actividad enzimática, promovió en gran medida la actividad enzimática. Mg^{2+} y Na^{+} tuvieron obviamente la mejora de las actividades enzimáticas. Sin embargo, Cu^{2+}, Fe^{2+} y Fe^{3+} tuvieron un efecto inhibitorio, que inactivó la enzima.

Efectos de las concentraciones de iones metálicos en SDhep I: se examinó el efecto del Mg^{2+}, Na^{+} o Ca^{2+} a 0, 1, 10,

50, 100, 500 y 1000 mM, respectivamente en la actividad enzimática, siendo HEP o HS el sustrato. Los resultados mostraron que la concentración óptima de Mg^{2+} para mejorar la actividad de SDhep I era 100 mM, siendo HEP o HS el sustrato. Siendo HEP el sustrato, la concentración óptima de Na^{+} era de 500 mM. Siendo HS el sustrato, la concentración óptima de Na^{+} para SDhep tenía 50 mM. La concentración óptima de Ca^{2+} era de 100 mM, siendo HEP o HS el sustrato.

Efectos de los desnaturalizantes en SDhep I: se examinó el efecto de los desnaturalizantes en la actividad de heparinasa SDhep I tomando H_2O_2, acetonitrilo, SDS, clorhidrato de guanidina o urea como desnaturalizante respectivamente, siendo las concentraciones respectivas 1 mM y 10 mM para H_2O_2, 1 % y 10 % para acetonitrilo, SDS al 1 %, 1 M de clorhidrato de guanidina y 1 M de urea, y estableciendo un grupo de control en blanco sin ningún agente desnaturalizante. En presencia del agente desnaturalizante anterior, 1 % y 10 % de acetonitrilo y 1 M de urea tuvieron un pequeño efecto sobre SDhep I, mientras que 1 mM y 10 mM H_2O_2, SDS al 1 % y 1 M de clorhidrato de guanidina tuvieron un efecto inhibidor significativo sobre SDhep I.

Ejemplo 3: estudio sobre la especificidad de los productos de la enzimólisis de HEP por SDhep I.

a) estudio sobre la especificidad del sustrato SDhep I: la actividad de SDhep I se determinó tomando heparina (HEP), heparán sulfato (HS), sulfato de condroitina (CS) o dermatán sulfato (DS) como el sustrato respectivamente. Se encontró que no hubo actividad enzimática con CS o DS siendo el sustrato; y hubo actividad enzimática con HEP o HS siendo el sustrato, y su relación de actividad fue aproximadamente HEP: HS = 1: 1.3.

b) composición de disacárido después de la enzimólisis de HEP por SDhep I: se añadieron 3 IU de SDhepI (con heparina como sustrato) a 50 mg de heparina, equilibrando el volumen a 500 µL con tampón de 25 mM de Tris-HCl que contenía 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0, y se hidrolizó a 37 °C durante 24 h, a continuación se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 5 min para la inactivación. La muestra se sometió a análisis de fase líquida para la composición de disacárido, y los resultados se mostraron en la figura 2. Los principales productos después de la hidrólisis de HEP por SDhep I fueron IVA, IVS, IIA, IIS e IS, en los que IIA e IIS representaron el 15,35 % y el 12,2 % y el área del pico de IS solo representó el 5,29 %. Hubo numerosos tipos de componentes de tetrasacáridos además de los diversos disacáridos anteriores.

Ejemplo 4: preparación de SDhep II

a) la fermentación de bacterias y la preparación de enzimas brutas fueron las mismas que en el Ejemplo 1.

b) la etapa de separación de enzimas brutas por columna Q fue la misma que en el Ejemplo 1. Después de equilibrar con tampón de 3 volúmenes de columna, la muestra se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el tampón. Las fracciones activas de eluyente se recogieron y se dializaron durante la noche.

c) Purificación de la columna CS: la solución enzimática obtenida en la etapa b) se cargó en una columna CS preequilibrada con tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0), a continuación se equilibró con el mismo tampón de 3 volúmenes de columna y, a continuación, se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en el tampón, y las fracciones activas se recogieron y se dializaron durante la noche con un volumen de 2 l de tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0).

d) Purificación de la columna Q: la solución enzimática obtenida en la etapa c) se cargó en una columna Q preequilibrada con tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0) y, a continuación, se eluyó con 800 ml de 0,080 M de NaCl en el mismo tampón. Se recogieron las fracciones activas de eluyente.

e) Purificación de la columna CS: se añadió un volumen igual de tampón a las fracciones con actividad enzimática recogida en la etapa d) y la mezcla se cargó en una columna CS preequilibrada con 25 mM de Tris-HCl (que contenía 10 mM de CaCl2 10 mM, pH 7.0), a continuación se equilibró con el mismo tampón de 3 volúmenes de columna y, a continuación, se eluyó con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en el mismo tampón. Las fracciones activas se recogieron y se sometieron a un SDS-PAGE. Las fracciones activas que muestran una sola banda en electroforesis se recogieron y se concentraron a 200 µL con un tubo de centrífuga de ultrafiltración de 30 KD. La concentración se extrajo y se colocó en un tubo EP de 1,5 ml, añadiendo 300 µL de tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contenía 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0), añadiendo a continuación 500 µL de glicerol y equilibrando a continuación el volumen a 1 ml. La actividad enzimática y el contenido de proteínas para cada etapa del procedimiento de purificación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. La actividad enzimática y el contenido de proteínas en la purificación de SDhepII

Etapa de purificación de SDhep II	Volumen total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad de la enzima HEP (IU/ml)	Vitalidad total (IU)	Actividad específica (IU/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Enzima bruta	150	76,65	2,41	361,5	4,72	/	/
Precipitación de tiamina	135	37,80	2,60	351,0	9,29	1,97	97,10
Columna Q	54	10,69	2,82	152,2	14,25	3,02	42,12
Columna CS	120	3,96	0,82	98,4	24,85	5,26	27,22
Columna Q II	300	2,10	0,18	54,0	25,71	5,45	14,94
Columna CS II	1	0,29	29,6	29,6	102,07	21,62	8,19

Ejemplo 5: estudio sobre las propiedades de SDhep II

Los resultados se mostraron en la figura 1, el peso molecular de SDhep II fue de aproximadamente 94700 Da por análisis SDS-PAGE, y su peso molecular exacto fue de 94716 Da según el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF-MS.

El punto isoeléctrico de SDhep II fue 5,76 por análisis de electroforesis de enfoque isoeléctrico.

Las velocidades iniciales de reacción enzimática se determinaron bajo diversas concentraciones de sustrato para obtener la constante de Michaelis. Se determinó que la constante de Michaelis de SDhep II era 0,0052 mol/L y 1,6618 mol/L respectivamente para HEP o HS como sustrato.

La actividad de la heparinasa SDhep II se determinó siendo HEP o HS el sustrato y siendo el pH del sustrato 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0 respectivamente. Los resultados mostraron que el intervalo de pH con actividad fue de 6.5-9.0 siendo HEP el sustrato, y el pH óptimo fue de 8.0. Siendo HS el sustrato, el intervalo de pH fue de 6.5-9.0, y el pH óptimo fue de 8.0.

La actividad de heparinasa SDhep II se determinó como HEP o HS siendo el sustrato y siendo la temperatura del sustrato 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49 °C, respectivamente. Los resultados mostraron que la temperatura óptima era de 47 °C siendo HEP el sustrato, y la temperatura óptima era de 43 ° Cas, siendo HS el sustrato.

Efectos de las especies de iones metálicos en SDhep II: se examinaron los efectos sobre la enzima SDhep II al añadir 10 mM Mg^{2+}, Mn^{2+} y Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} y Mn^{2+} respectivamente al sustrato HEP o HS, respectivamente, con 25 mM de Tris-HCl (pH 7.0) como tampón, sin la adición de ningún ion metálico como grupo de control en blanco. Los resultados mostraron que K^{+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Mn^{2+} y Ca^{2+} mejoraron la actividad enzimática, en la que Ca^{2+} tuvo los mejores efectos para la mejora de la actividad enzimática, promovió en gran medida la actividad enzimática. Mg^{2+} y Na^{+} tuvieron obviamente la mejora de las actividades enzimáticas. Sin embargo, Cu^{2+}, Fe^{2+} y Fe^{3+} tuvieron un efecto inhibitorio, que inactivó la enzima.

Efectos de la concentración de iones metálicos en SDhep II: se examinó el efecto de Mg^{2+}, Na^{+} o Ca^{2+} a 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 mM, respectivamente en la actividad de la enzima SDhep II, siendo HEP o HS el sustrato. Los resultados mostraron que la concentración óptima de Mg^{2+} para mejorar la actividad de SDhep II fue 100 mM siendo HEP o HS el sustrato. Siendo HEP o HS el sustrato, la concentración óptima de Na^{+} para mejorar la actividad de SDhep II fue de 100 Mm y 50 mM. La concentración óptima de Ca^{2+} para mejorar la actividad de SDhep II fue de 100 mM o 50 mM.

Efectos de los desnaturalizantes en SDhep II: se examinó el efecto de los desnaturalizantes en la actividad de heparinasa SDhep II tomando H_2O_2, acetonitrilo, SDS, clorhidrato de guanidina o urea como desnaturalizante respectivamente, siendo las concentraciones respectivas 1 mM y 10 mM para H_2O_2, 1 % y 10 % para acetonitrilo, SDS al 1 %, 1 M de clorhidrato de guanidina y 1 M de urea, y estableciendo un grupo de control en blanco sin ningún agente desnaturalizante. En presencia del agente desnaturalizante anterior, el 1 % y el 10 % de acetonitrilo y 1 M de urea tuvieron un pequeño efecto en SDhep II, mientras que 1 mM y 10 mM H_2O_2, SDS al 1 % y 1 M de clorhidrato de guanidina tuvieron un efecto inhibidor significativo sobre SDhep II.

Ejemplo 6: estudio sobre la especificidad de los productos de la enzimólisis de HEP por SDhep II.

a) estudio sobre la especificidad del sustrato SDhep II: la actividad de SDhep II se determinó tomando heparina (HEP), heparán sulfato (HS), sulfato de condroitina (CS) o dermatán sulfato (DS) como sustrato respectivamente. Los resultados mostraron que no hubo actividad enzimática con CS o DS como sustrato; y hubo actividad enzimática con

HEP o HS como sustrato, y su relación de actividad fue aproximadamente HEP: HS = 1: 3.5.

b) análisis de composición de disacárido después de la enzimólisis de HEP por SDhep II: se añadieron 3 IU de SDhep II (con heparina como sustrato) a 50 mg de heparina, equilibrando el volumen a 500 µL con tampón de 25 mM de Tris-HCl (que contiene 10 mM de $CaCl_2$, pH 7.0), hidrolizado a 37 °C durante 24 h, colocado a continuación en un baño de agua a 100 °C durante 5 min para la inactivación. La muestra se sometió a análisis en fase líquida para la composición de disacárido; los resultados se mostraron en la figura 3. Los principales productos después de la hidrólisis de HEP por SDhep II fueron IIS e IS, en los que IS era mayoritario y representaba el 56,39 %. En comparación con SDhep I, los productos enzimáticos de SDhep II fueron menores y su hidrólisis enzimática fue más completa, muy diferente de los productos de SDhep I. Por lo tanto, SDhep I y SDhep II eran dos enzimas de heparina con propiedades enzimáticas muy diferentes, que tienen un valor de aplicación potencial en la detección de la calidad de heparina y la preparación de heparinas de bajo peso molecular.

REIVINDICACIONES

1. Una heparinasa de *Sphingobacterium daejeonense,* en la que la heparinasa es heparinasa SDhep I o heparinasa SDhep II;

en la que el peso molecular de la heparinasa SDhep I es 74692 Da y el peso molecular de la heparinasa SDhep II es 94716 Da;

en la que el punto isoeléctrico de la heparinasa SDhep I es 5,64 y el punto isoeléctrico de la heparinasa SDhep II es 5,76;

en la que la constante de Michaelis de la heparinasa SDhep I es 0,5738 mol/L y 0,0418 mol/L respectivamente para heparina (HEP) y HS (sustrato de heparina) siendo el sustrato y la constante de Michaelis de la heparinasa SDhep II es 0,0052 mol/L y 1,6618 mol/L respectivamente para HEP y HS siendo el sustrato.

2. Un procedimiento para obtener heparinasa SDhep I y heparinasa SDhep II de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

(1) el *Sphingobacterium daejeonense* se inocula en el medio inclinado;

(2) la cepa obtenida en la etapa (1) se inocula en el medio de cultivo de semillas y se cultiva durante 1-2 días, se inocula en un medio de semillas líquido secundario y se cultiva durante 1-2 días y, a continuación, se inocula en medio de fermentación de 2 l y se cultiva durante 1-5 días, después, se recogen las células;

(3) las células obtenidas en la etapa (2) se suspenden en el tampón Tris-HCl, se rompen con un homogeneizador de alta presión, a continuación, se centrifugan para el sobrenadante y se someten a precipitación con sulfato de amonio en un baño de hielo para recoger el componente precipitado con una saturación del 35 %-85 % y, a continuación, el precipitado se disolvió en el tampón Tris-HCl y se dializó para obtener una solución enzimática;

(4) la solución enzimática obtenida en la etapa (3) se carga en una columna Q preequilibrada con un tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y se eluye con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el mismo tampón; la fracción con actividad enzimática recogida del efluente y la solución equilibrada es heparinasa SDhep I, que no está unida a la columna Q; la fracción con actividad de heparinasa recogida del eluato es heparinasa SDhep II, que está unida a la columna Q, a continuación la fracción con actividad de heparinasa recogida del eluato se combina y dializa;

(5) la fracción SDhep I obtenida en la etapa (4) se carga en la columna CS preequilibrada con un tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl en el mismo tampón; las fracciones con actividad de heparinasa se recogen, se dializan y se cargan en la columna SP preequilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se equilibran con el mismo tampón y, a continuación, se equilibran con tampón Tris-HCl con un gradiente lineal de 0-0,5 M de NaCl; las fracciones se recogen y se concentran a 0,2 ml mediante un tubo de centrífuga de ultrafiltración que intercepta un peso molecular de 30 kD; la enzima concentrada se carga en una columna Sephadex G-100 preequilibrada con un tampón Tris-HCl y, a continuación, se eluye con el mismo tampón; las fracciones con actividad se recogen, se combinan y se concentran para obtener SDhep I purificado;

(6) la fracción SDhep II obtenida en la etapa (4) se carga en una columna CS preequilibrada con tampón Tris-HCl, a continuación se equilibra con el mismo tampón y, a continuación, se eluye con un gradiente lineal de 0,1-0,6 M de NaCl en el mismo tampón; las fracciones con actividad de heparinasa en solución de eluyente se prueban, se recogen, se combinan y se dializan; la solución enzimática se carga en una columna Q preequilibrada con tampón Tris-HCl y se eluye con un gradiente lineal de 0,08 M de NaCl en el mismo tampón; las fracciones se prueban, se recogen y se cargan en una columna CS preequilibrada con un tampón Tris-HCl, a continuación se equilibran con el mismo tampón y, a continuación, se eluyen con un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl en el mismo tampón; las fracciones con actividad se recogen, se combinan y se concentran para obtener SDhep II purificado.

3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el tampón Tris-HCl para las etapas (3), (4), (5), (6) es Tris-HCl que contiene $CaCl_2$, pH 6.5-8.0, en el que la concentración de Tris-HCl es 10-50 mM y la concentración de $CaCl_2$ es de 1-50 mM.

4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la columna Q descrita en cada una de las etapas (4) y (6) es una columna de intercambio aniónico fuerte Sepharose-Q de de flujo rápido.

5. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la columna CS descrita en cada una de las etapas (5) y (6) es una columna de afinidad con sulfato de Cellufine.

6. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la columna SP descrita en cada una de las etapas (4) y (6) es una columna de intercambio catiónico fuerte SP-Sepharose de flujo rápido.

7. La heparinasa de la reivindicación 1, para su uso en pruebas de calidad de heparina, heparinas de bajo peso molecular y heparinas de peso molecular ultra bajo.

8. La heparinasa de la reivindicación 1, para su uso en la producción de heparinas de bajo peso molecular y heparinas de peso molecular ultra bajo.

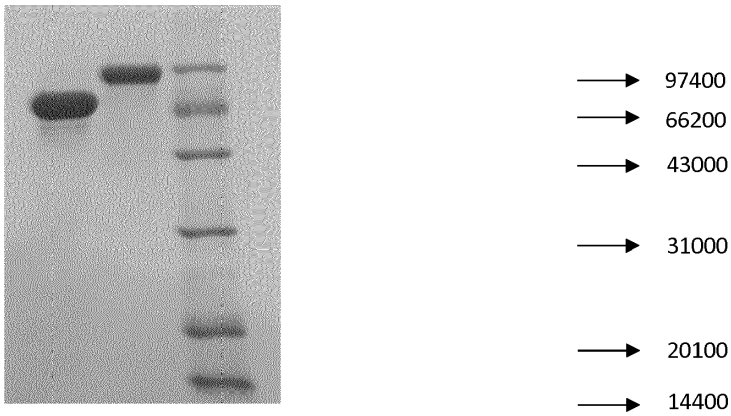
97400
66200
43000
31000
20100
14400

Fig. 1

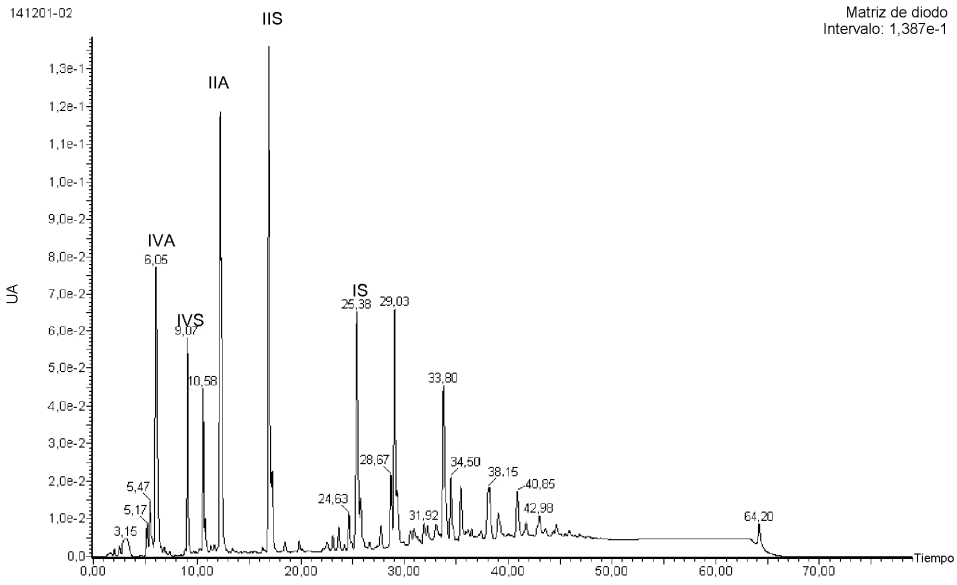
141201-02
Matriz de diodo
Intervalo: 1,387e-1
UA
Tiempo
IIS
IIA
IVA
IVS
IS
6,05
9,07
10,58
25,38
29,03
33,80
5,47
5,17
3,15
24,63
28,67
31,92
34,50
38,15
40,65
42,98
64,20

Fig. 2

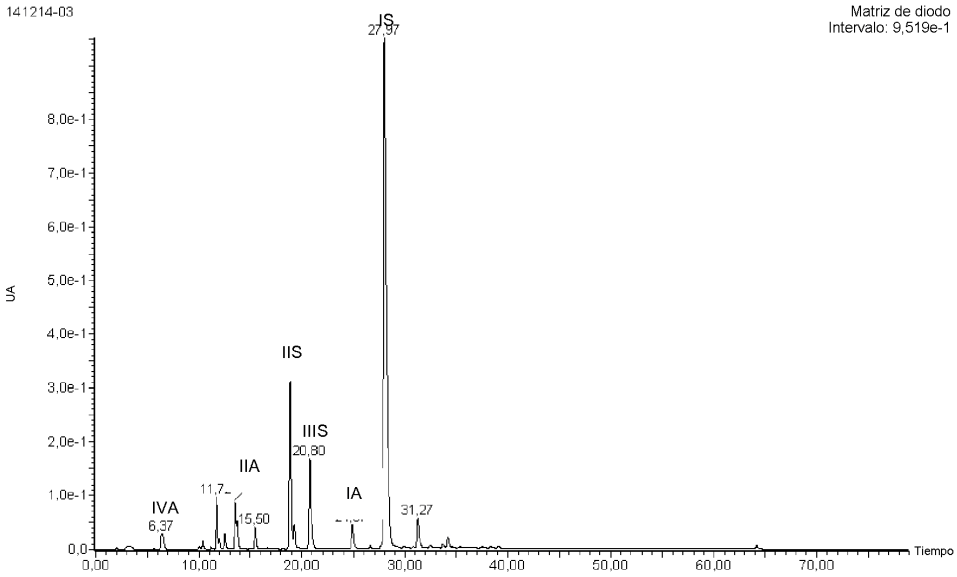
141214-03
Matriz de diodo
Intervalo: 9,519e-1
UA
8,0e-1
7,0e-1
6,0e-1
5,0e-1
4,0e-1
3,0e-1
2,0e-1
1,0e-1
0,0
IS
27,97
IIS
IIIS
20,80
IIA
11,7
15,50
IVA
6,37
IA
31,27
0,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
70,00
Tiempo

Fig. 3