

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 9/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02129203.5

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1478899A

[22] 申请日 2002.8.27 [21] 申请号 02129203.5

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

共同申请人 鞍山天物生制药有限公司

[72] 发明人 侯立向

[74] 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司

代理人 侯蔚寰

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种磷酸肌酸的生产方法

[57] 摘要

本发明的名称是：一种磷酸肌酸的生产方法。属于酶法生产磷酸肌酸的技术领域。目的在于：提供一种磷酸肌酸的生产方法，生产过程可以监控，成本低，产率高，产物分离纯化容易，不对环境造成污染。本发明的步骤包括：①制备肌酸激酶酶制剂；②配制反应物溶液；③将反应物溶液在 15℃ - 45℃ 保温；④加酶进行酶促合成反应；⑤磷酸肌酸的分离纯化。本发明利用从动物肌肉提取的肌酸激酶，以三磷酸腺苷和肌酸在最适酶反应条件下生产磷酸肌酸。方法可操作性强，磷酸肌酸产率高，产物分离纯化容易，无污染。

1. 一种磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：包括下述步骤：
 - ①制备肌酸激酶酶制剂；
 - ②配制反应物溶液：反应物溶液中 ATP 的浓度为 15—30mM，肌酸的浓度为 ATP 浓度的 2—10 倍，镁离子的浓度是 ATP 浓度的 1—5 倍，加入缓冲剂后调 pH 至 7.5—10；
 - ③将反应物溶液在 15°C—45°C 保温；
 - ④加酶进行酶促合成反应：在上述反应物溶液中加入浓度为 10^{-5} - 10^{-3} mM 的肌酸激酶，酶反应过程中不时加入稀碱，测定 pH 值并维持其恒定，当反应液的 pH 不再发生变化时，终止反应；
 - ⑤磷酸肌酸的分离纯化：用离子交换树脂吸附并洗脱磷酸肌酸。
2. 根据权利要求 1 所述的磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：所述酶反应过程中步骤②中反应物溶液中加入的缓冲剂为氨基乙酸，其浓度为 10 mM。
3. 根据权利要求 1 所述的磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：所述酶反应过程中步骤③中的反应物溶液在 25°C—40°C 保温。
4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：所述酶反应过程中步骤④中加入稀碱后维持 pH 值在 8-10.5。
5. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：所述酶反应过程中步骤⑤采用的是阴离子交换树脂吸附及洗脱，洗脱以 0.01—0.05 ml / ml 树脂 / min 的流速通过上述阴离子树脂交换柱，采用电解质盐类作为洗脱剂进行梯度洗脱并收集磷酸肌酸组分。
6. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的磷酸肌酸的生产方法，其特征在于：所述酶反应中还可以包括下述步骤⑥：将磷酸肌酸从大体积洗脱剂中分离并制备成磷酸肌酸钠盐。

一种磷酸肌酸的生产方法

技术领域

本发明涉及一种磷酸肌酸的生产方法，特别是一种酶法生产磷酸肌酸的方法。

技术背景

磷酸肌酸是脊椎动物体内的一种生物活性物质。对哺乳动物而言，它主要存在于心肌、骨骼肌、脑等器官或组织。在这些器官或组织的细胞内，它的生理作用是：1.它对能量物质 ATP 起到缓冲作用，上述器官或组织在其生命活动过程中所消耗的大量 ATP 就由它来补充，以避免 ATP 供应的波动；2.它是能量物质 ATP 分子中高能磷酸基团传递的载体，线粒体所生成 ATP 分子的高能磷酸基团在细胞浆中向耗能部位传递就是以胞浆中的磷酸肌酸为载体，并通过胞浆中磷酸肌酸—肌酸激酶系统来实现的。

近年来，人们发现磷酸肌酸具有重要的药理作用，它是一种重要的心肌保护剂。大量的动物模型和临床实验已经证明它可以用于治疗心肌梗死，以及在心脏外科手术中减轻手术给病人心肌功能带来的损伤。因此，磷酸肌酸对改善病人心肌的能量代谢有重要意义。

目前磷酸肌酸的制备有合成和从肌肉提取两种方法。就合成法而言，化学合成法条件苛刻，成本高、产率低，而且由于大量使用酸碱等化学试剂会对环境造成破坏。就生物合成的酶法而言，则具有反应条件温和、反应速度快和专一性强等优点。在用酶法制备磷酸肌酸过程中，曾有用粗酶制剂作为酶原的发明，参见专利号为 IT 1044765 的专利文献。该发明由于采用糖酵解中的某一物质，例如 3-磷酸甘油酸，作为反应起始底物来生产磷酸肌酸，因此用的是包括肌酸激酶在内的复合酶体系，即动物肌肉细胞浆的粗抽提液。使用这样的粗酶体系，由于参与反应的酶较多，各种酶所要求的最适条件不同，因此不能保证同时满足所有酶的最适条件。最终结果是影响磷酸肌酸的产率。另外，用动物肌肉细胞浆制备的粗酶体系作为酶源，势必要加入较多的酶蛋白到反应体系中，这些酶蛋白在提纯时则成为一种必须分离除去的杂质，这给分离纯化带来困难。

技术内容

本发明的目的在于：提供一种磷酸肌酸的生产方法，生产过程可以监控，成本低，产率高，产物分离纯化容易，不对环境造成污染。

本发明是这样实现的：一种磷酸肌酸的生产方法，包括下述步骤：

①制备肌酸激酶酶制剂；

②配制反应物溶液：反应物溶液中 ATP 的浓度为 15—30mM，肌酸的浓度为 ATP 浓度的 2—10 倍，镁离子的浓度是 ATP 浓度的 1—5 倍，加入缓冲剂后调 pH 至 7.5—10；

③将反应物溶液在 15°C—45°C 保温；

④加酶进行酶促合成反应：在上述反应物溶液中加入浓度为 10^{-5} - 10^{-3} mM 的肌酸激酶，酶反应过程中不时加入稀碱，测定 pH 值并维持其恒定，当反应液的 pH 不再发生变化时，终止反应；

⑤磷酸肌酸的分离纯化：用离子交换树脂吸附并洗脱磷酸肌酸。

所述酶反应过程中步骤②中反应物溶液中加入的缓冲剂为氨基乙酸，其浓度为 10 mM。

所述酶反应过程中步骤③中的反应物溶液在 25°C—40°C 保温。

所述酶反应过程中步骤④中加入稀碱后维持 pH 值在 8-10。

所述酶反应过程中步骤⑤采用的是阴离子交换树脂吸附及洗脱，洗脱以 0.01—0.05 ml / ml 树脂/ min 的流速通过上述阴离子树脂交换柱，采用电解质盐类作为洗脱剂进行梯度洗脱并收集磷酸肌酸组分。

所述酶反应中还可以包括下述步骤⑥：将磷酸肌酸从大体积洗脱剂中分离并制备成磷酸肌酸钠盐。

本发明是利用从动物肌肉提取的肌酸激酶，以三磷酸腺苷和肌酸在最适酶反应条件下生产磷酸肌酸的过程。针对粗酶体系的缺点，我们采用较为纯净的肌酸激酶制剂作为酶原，以它的直接底物三磷酸腺苷作为初始底物，不仅保留了酶法的优点，而且使纯化和对反应的控制都更为便利。

肌酸激酶在哺乳动物肌肉细胞浆中的含量是很高的。我们进行生产磷酸肌酸的酶反应，由于反应体系只含一种生成磷酸肌酸的酶，因此容易控制酶反应条件，保证了磷酸肌酸的产率；由于我们所用酶的纯度较高，因此酶的用量较少，减少了杂蛋白混入产品的可能性，提高了产品的纯度。

ATP的制备在中国已是成熟的技术，ATP是一容易开发和找到的产品，使用ATP比使用其它物质，如三磷酸甘油酸，作为肌酸的磷酸源成本更低。由于ATP是经肌酸激酶反应使肌酸磷酸化的直接底物，所以反应完成后的产物分离便变得相对简单，这样也有利于提高产品的纯度。

本发明生产过程使用了监测酶反应程度的监测手段。由于在肌酸激酶反应过程中不断地放出 H^+ ，这给整个酶反应过程的监测提供了条件。根据酶反应过程中pH的变化，随时加入稀碱液以便保持酶反应在恒定的碱性条件下进行。根据稀碱液耗量的多少及反应过程中pH的变化，可以判断反应是否完成及完成的程度。

本发明在操作过程中省去了使酶失活这一通常步骤，从而避免了磷酸肌酸在该处理过程中的分解。

上述特点使本发明大大不同于以前的相关发明。按照本发明制备磷酸肌酸，不仅使得磷酸肌酸的生产能够在温和和可调控的条件下进行，而且产率稳定，生产规模可以根据需要自行确定。

为实施本发明的方法，肌酸激酶可来源于哺乳动物的肌肉。为了得到高活力的酶制剂，应该使用新鲜的动物肌肉。酶的制备和测活方法请参照“Methods in Enzymology” II. pp605-610。

反应混合物中磷酸肌酸产率，通过液相色谱法测定。离子交换柱是Mono Q HR 5/5，缓冲液A是：10 mM K_2HPO_4 , pH8.0；缓冲液B是50 mM K_2HPO_4 , pH8.0，0.5M NaCl；梯度是30分钟达到0—75%缓冲液B。测试仪器可用AKTA液相色谱仪或其它HPLC谱仪。产物产率由所得分离图谱中ADP和ATP在260 nm峰的面积比来确定，参考文献：Proc. Natl. Acad. Sci.USA.,83,4162-4166, 1986.。

为了使酶反应能在一较为恒定的条件下进行，应该在酶反应液中加入少许缓冲物质，使其具备一定的缓冲能力。为此目的优选使用氨基乙酸-NaOH缓冲液。酶反应可在pH7.5—10间进行。合适的温度是15—45°C，优选25—40°C。酶反应时间可以根据反应条件来改变，但通常是30分钟—5小时，优选时间是1.5—3小时。

本发明获得的磷酸肌酸可以很容易地回收。例如，反应结束后，反应液可用离子交换树脂分离提取，所得磷酸肌酸组分可进一步从酒精和水的混合物中经重

结晶得到所需产品。

具体实施方式

下面结合下述非限定性实施例对本发明做进一步说明。

实施例 1.一种制备磷酸肌酸的方法，包括下述步骤：

(1)制备肌酸激酶酶制剂：原则上，哺乳动物的肌肉都可作为肌酸激酶制剂的来源。我们使用的是兔肌。制备步骤包括：1).使兔急性致死取兔肌。兔肌应尽量去除筋膜和结缔组织，并将其剪成碎块，应避免有水混入；2). 加入 10 mM KCl 溶液，用高速捣碎机将兔肌捣成匀浆并在低温下抽提搅拌 30 分钟，离心取上清液；3). 加入固体 NH_4Cl 使溶液浓度达到 100 mM；4).加入 95%冷乙醇使其终浓度达至 60%并在 20°C 下搅拌抽提 2 小时，使不耐受酒精的蛋白沉淀并离心除去；5).加入硫酸镁使肌酸激酶在酒精中沉出；6)用乙酸镁溶液抽提肌酸激酶的镁盐沉淀；7). 在肌酸激酶的乙酸镁抽提液中加入冷乙醇,收集 36-50%沉淀组分，溶于稀柠檬酸铵溶液中，分别对该溶液及稀 NH_4OH 透析，高速离心所得上清液就是肌酸激酶制剂。测定酶制剂的浓度和比活力，放入低温冰箱保存待用。

(2)配制反应物溶液：在含 1260ml 下述反应物的反应器中进行酶反应：ATP 20mM, 肌酸 58 mM, 乙酸镁 25 mM, 氨基乙酸 10 mM。

(3)将反应物溶液加温至 30°C。

(4)加酶进行酶促合成反应：在上述反应物溶液中加入肌酸激酶,使其浓度为 33.3×10^{-4} mM, 酶反应在 pH 9.0 下进行约 3 小时。为维持 pH 之恒定，应不时加入稀碱。反应进行中要不断搅拌。当反应液的 pH 不再发生变化时，停止反应。反应完毕后，用 AKTA 液相色谱仪给出的 260 nm 处 ADP 和 ATP 峰面积之比来确定反应产率。反应产率通常可达 80%左右。

(5)磷酸肌酸的分离纯化：反应完毕后，反应液通过 Dowex I 或相类似的强阴离子交换树脂。上述酶反应液为 1610 ml。该反应液通过一 12.5×5 cm 的层析柱，接着用上柱缓冲液冲洗该柱。按 260 毫微米处的光吸收变化计算，吸附率可达 99%；按 210 毫微米处的光吸收变化计算，吸附率是 85%。

实施例 2 上述实施例 1 制备磷酸肌酸的方法中，步骤(2)反应物溶液中 ATP 的浓度为 15mM, 肌酸的浓度为 30mM, 缓冲剂 Tris 5 mM, 其它条件同实施例 1。步骤(3)的温度为 25°C。步骤(4)中，调 pH 至 10 反应时间为 3 小时。该反应磷酸

肌酸产率为 77%。

实施例 3 上述实施例 1 制备磷酸肌酸的方法中，步骤(2)反应物溶液中 ATP 的浓度为 30mM, 肌酸的浓度为 300mM, 反应物溶液中镁离子的浓度是 50mM, 缓冲剂 Tris 15mM。步骤(3)的温度为 40°C。步骤(4)中，调 pH 至 8.0 反应时间为 1.5 小时。该反应磷酸肌酸产率为 78%。

实施例 4 制得的磷酸肌酸经过置换反应可获得磷酸肌酸钠盐。