

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

205 149 B

(21) A bejelentés száma: 3085/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 06. 14.
(30) Elsőbbségi adatok:
207 415 1988.06.16. US

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 15/08

C 07 K 7/10

A 61 K 37/64

(40) A közzététel napja: 1989. 12. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 03. 30. SZKV 92/03

(72) Feltaláló:

Cardin, Alan Douglas, Cincinnati, Ohio (US)

(73) Szabadalmas:

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati,
Ohio (US)

(54) Eljárás antikoaguláns hatóanyag *Haementeria ghilianii* piócából történő kivonására és tisztítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás Xa faktort gátló hatású fehérjeszerű anyagnak *Haementeria ghilianii* pióca nyálából vagy nyálmirigyeiből történő izolálására és tisztítására. A nyálat vagy nyálmirigy kivonatot DE-AE cellulóz és heparin-agaróz kromatográfia alkalmazásával, gyanta-oszlopon bontják komponenseire;

az eluálást növekvő sókoncentráció-grádienssel hajtják végre. A kivonatot additáskromatográfiának vetik alá, oly módon, hogy az eluálást benzamidint tartalmazó HEPES pufferrel végzik, majd fordított fázisú kromatográfiával tisztítják az anyagot.

A találmány tárgya eljárás antikoaguláns, azaz X_a faktort gátló hatású, fehérje szerű új anyagnak *Haementeria ghilianii* pióca nyálából vagy nyálmirigyeiből történő elkülönítésére és tisztítására kromatográfias elválasztási technikák alkalmazásával.

Az antikoagulánsok hasznos gyógyszerek pl. a következő betegségek gyógyszeres kezelésében: akut mélyvénás trombózis, tüdőembólia, a végtagok akut arteriális embóliája, szívizominfarktus és a szétszórt intravaszkuláris koaguláció. Feltételezések szerint az antikoagulánsok profilaktikus adagolása megelőzi az embóliás állapot visszatérését reumatikus vagy arterioszklerotikus eredetű szívbetegségben szenvedő betegekben és megakadályozza bizonyos tromboembóliás szövödmények fellépését sebészeti beavatkozások esetén. Antikoagulánsok bevitelére javasoltnak látszik az arteria coronaria és az agyi érrendszer betegségeinek kezelésében. Az arteriális trombózis, különösen a szívizmot és az agyat ellátó artériákban, az egyik vezető elhalálozási ok.

A véralvadás sikere számos enzim és kofaktor függvénye és két, egymástól elkülönült úton megy végbe; ezek: a belső (intrinsic) és a külső (extrinsic) út. A belső (vagy kaszkád) út esetében valamennyi tényező jelen van a keringő vérben, de ezen mechanizmus szerint a már megindult alvadás befejeződéséhez több percre van szükség. A külső út esetében egyes lipoproteinek, pl. a III. faktor (amelyek a keringő vérben normális körülmények között nincsenek jelen) szabadulnak fel, károsodott sejtekből, és másodperceken belül megkezdődik az alvadás. Ezek az utak az alvadási folyamatban egy ponton találkoznak, amikor is az X_a faktor – az V. faktorttal és a kalcium-ionnal együtt – a protrombináz komplexet képezi, a protrombin trombinná való átalakításának katalizálására. Így az X_a faktor létfontosságú mindkét koagulációs út szempontjából és gátlása – az októl függetlenül – csökkentené a véralvadás intenzitását. Több X_a faktor inhibitor ismert, ezek azonban vagy a klór-ke-ton típushoz tartoznak, amelyek teljesen toxikusak, vagy nem-specifikus szerinprotaáz inhibitorok. Így egy olyan anyag, amely az X_a faktor specifikus és nem-toxikus inhibitora, jelentős terápiás értékkel rendelkezik.

A piócákat az ókortól kezdve használják a gyógyászatban. A pióca gyógyászati alkalmazása a 19. század elején olyan mértékűvé vált, hogy a *Hirudo medicinalis* faj csaknem kipusztult és Oroszország ennek folytán kénytelen volt export-kvótákat meghatározni. Újabban tudományosabb alapokon tanulmányozzák a pióca által kiválasztott anyagokat és azt találták, hogy ezek számos különböző biológiai terméket tartalmaznak, amelyek széles spektrumú biokémiai és farmakológiai aktivitást (pl. antikoaguláns, áttétel-képződés elleni, érzéstelenítő, antibiotikus és értágító hatást) mutatnak. A *Hirudo medicinalis* pióca nyálmirigyéből elkülönített hirudin pl. a legspecifikusabb és leghatásosabb ismert trombin inhibitor. A hementin viszont, amelyet a *Haementeria ghilianii* pióca nyálmirigyéből izoláltak, állítólagosan magas molekulású fibrin(ogen)olitikus enzim (4,390,630 számú ame-

rikai szabadalmi leírás). Közismerten ez az említett pióca antikoaguláns hatóanyaga. Ez az enzim inkább oly módon hat, hogy lebontja a fibrinogént és a fibrint, mint oly módon, hogy aktiválná a gazdaszervezet fibrinolitikus rendszerét vagy gátlólná a koagulációs rendszert. Vizsgálataink során olyan fehérje-természetű anyagot azonosítottunk és különítettünk el a *Haementeria ghilianii* pióca nyálából és nyálmirigy-szövet kivonataiból, amely specifikus X_a faktor inhibitor és felhasználható a véralvadás gátlására.

A találmány szerinti eljárás során a *Haementeria ghilianii* pióca nyálát vagy nyálmirigyeinek kivonatát kromatográfias szétválasztási műveletnek vetjük alá, anioncserélő gyanta felhasználásával, és növekvő sógrádienssel eluálunk. Ezután a magas X_a -faktor-gátló és alvadásgátló aktivitással rendelkező frakciókat fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiának (HPLC) vetjük alá, az X_a faktort gátló hatást mutató anyag további tisztítására.

A találmány szerinti eljárással előállított fehérje-természetű anyag több, hasonló szekvenciájú fehérjéből áll, és ezek közül legalább 2 fehérje tehető alapvetően felelőssé az X_a faktort gátló aktivitásért, mely fehérjék, illetve peptidek jelentős X_a faktort gátló aktivitást mutatnak, azaz IC_{50} értékük legalább 1000 pM.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a találmány szerinti fehérjeszerű anyag olyan peptideket tartalmaz, melyek molekulatömege kb. 18 kdal és ezek nem nagymértékben glikozilezettek, továbbá azt, hogy míg egyes cukor-csoportok jelen lehetnek ugyan, a látszólagos molekulatömeg nem váltakozik jelentősen az SDS PAGE meghatározása során a poliakrilamid gél koncentrációval, ez arra mutat, hogy a peptideken nincs jelen nagyszámú glikozil-csoport. Ugyancsak megállapítottuk, hogy mindegyik peptid kb. 6 alanin csoportot, 5 metionin csoportot, 12–14 lizin csoportot, 18–21 arginin csoportot és 16–17 prolin csoportot tartalmaz és az aromás csoportok valamilyen nagyobb mennyiségben vannak jelen (pl. 4 fenil-alanin és 6 tirozin csoport határozható meg).

A leírásban a következő ismert rövidítéseket alkalmazzuk az aminosavak jelölésére:

- Ala (vagy A) – alanin
- Arg (vagy R) – arginin
- Asn (vagy N) – aszparagin
- Asx – aszparagin és/vagy aszparaginsav
- Asp (vagy D) – aszparaginsav
- His (vagy H) – hisztidin
- Ser (vagy S) – szerin
- Gln (vagy Q) – glutamin
- Pyr-E – piroglutaminsav
- Glu (vagy G) – glicin
- Glx – glutaminsav és/vagy glutamin
- Leu (vagy L) – leucin
- Ile (vagy I) – izoleucin
- Lys (vagy K) – lizin
- Cys (vagy C) – cisztein
- Met (vagy M) – metionin
- Phe (vagy F) – fenil-alanin

Pre (vagy P) – prolin
 Thr (vagy T) – treonin
 Tyr (vagy Y) – tirozin
 Val (vagy V) – valin

A találmány szerinti eljárással előállított fehérje-természetű anyagot alkotó peptidok – mint általában a fehérjék/peptidok – bármely nem toxikus szerves vagy szervetlen savval gyógyászati szempontból elfogadható sókat képezhetnek.

A gyógyászatilag elfogadható sók előállításánál általában szem előtt tartani az „Alan G. Marshall, Biophysical Chemistry, Principles, Techniques and Applications, Page 58-63,” és „E. J. Cohn, Chem. Rec. 19, 241 (1936)” közleményekben a makromolekuláris oldhatóság fizikai tulajdonságaival és főbb jellemzőivel kapcsolatban leírtakat.

Jellegzetes szervetlen sav például, amellyel megfelelő só képezhető, a. sósav, hidrogénbromid, kénsav, foszforsav és a savas fém-sók, például a nátrium-monohidrogén-ortofoszfát és a kálium-hidrogén-szulfát. Jellegzetes szerves savak, amelyekkel megfelelő sók képezhetők, például a mono-, di- és trikarbonsavak. Jellegzetes ilyen savak például az ecetsav, glikolsav, tejsav, piroszőlősav, malonsav, borostyánkősav, glutársav, fumársav, almasav, bőrkősav, citromsav, aszkorbinsav, maleinsav, hidroxil-maleinsav, benzoosav, hidroxil-benzoosav, fenil-ecetsav, fahéjsav, szalicilsav, 2-fenoxi-benzoosav és a szulfonsavak, például a metán-szulfonsav és a 2-hidroxil-etán-szulfonsav. A karboxi-terminális aminosav-maradék sói a bármely megfelelő szervetlen vagy szerves bázissal képzett nem-toxikus karbonsav-sókat jelentik. Ilyen sók jellegzetesen például a következők: alkálifém-, például nátrium- és kálium-sók, alkáli-földfém-, például kalcium- és magnézium-sók, a IIIA csoportba tartozó könnyűfémek, ideértve az alumínium-sók, a IIIA csoportba tartozó könnyűfémek, ideértve az alumíniumot is, sói; és a szerves primer, szekunder és terciér aminokkal – amilyen például egy tri-alkil-amin, mint a trietilamin, prokain, dibenzil-amin, L-etén-amin, N,N'-dibenzil-etilén-diamin-dihidro-abietil-amin, N-(rövidszénláncú)-alkil-piperidin és bármely más megfelelő amin – alkotott sók.

A találmány szerinti, X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyagok alvadásgátló dózisa 0,2 mg/kg – 250 mg/kg testtömeg/nap, pl. a beteg állapotának és a kezelendő trombotikus betegség súlyosságának függvényében. Egy adott beteg esetében a megfelelő dózis könnyen meghatározható. Előnyösen napi 1–4 dózist viszünk be, amelyek jellegzetes esetben 5–100 mg/dózis aktív vegyületet tartalmaznak. A szakember könnyen meghatározhatja a találmány szerinti, X_a faktort gátló aktivitással rendelkező anyag ahhoz szükséges koncentrációját, hogy a véralvadás gátlására való felhasználás esetén gátolja az X_a faktort, vagy valamely közegben, pl. tárolt vérben gátolja az X_a faktort.

Az antikoaguláns terápia javallt számos trombotikus állapot, különösen az arteria coronaria és az agyérrendszer betegségeinek kezelésére és megelőzésére. A szakember számára könnyen felismerhetők azok a

körülmények, amelyek antikoaguláns terápia alkalmazását igénylik. A „beteg” kifejezést itt olyan értelemben használjuk, hogy az emlősöket, közelebbről főemlősöket jelent, ideértve az embert, valamint olyan emlősöket, mint a juh, ló, szarvasmarha, sertés, kutya, macska, patkány és egér. Az X_a faktor gátlása nemcsak azoknak az embereknek az antikoaguláns terápiaja esetében hasznos, akik trombotikus betegségekben szenvednek, hanem minden olyan esetben is, amikor a vér alvadásának gátlására van szükség (pl. a teljes vér koagulációjának megelőzésére tárolás közben és a koaguláció megakadályozására más, vizsgálat vagy tárolás céljából levett biológiai mintákban). Így a találmány szerinti, X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyag hozzáadható valamely olyan közeghez (vagy ezzel érintkezésbe hozható), amely X_a faktort tartalmaz (vagy feltehetően tartalmaz) és amelyben a véralvadást meg kívánjuk gátolni.

Bár a találmány szerinti, X_a faktort gátló fehérjeszerű anyag elkerülheti a bomlást az orális bevitt követően a bélrendszeren való áthaladás során, előnyben részesítjük a nem-orális, hanem pl. a következő úton történő bevitt: szubkután, intravénás, intramuszkuláris vagy intraperitoneális; bevitt depó-injekcióval vagy beültetett készítménnyel.

Parenterális bevittéhez a találmány szerinti, X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyag injektálható dózisok alakjában készíthető ki, oldatként vagy szuszpenzióként, amely az anyagot egy fiziológiai szempontból elfogadható hígítóban tartalmazza – amilyen egy steril folyadék, pl. a víz és az olajok –, felületaktív anyag és más, gyógyászati szempontból elfogadható hatásfokozók adott esetben való hozzáadásával. Az ilyen készítményekben alkalmazható olajok közé tartozik az ásványolaj, az állati és növényi eredetű vagy szintetikus olajok, pl. a mogyoróolaj, szójaolaj. Folyékony hordozóként, különösen injektálható oldatok esetében általában a következőket részesítjük előnyben: víz, sóoldat, vizes dextróz és hasonló cukor-oldatok, etanol és glikolok, pl. a propilénglikol vagy a polietilénglikol.

A találmány szerinti, X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyag bevitt depó-injekció vagy beültetett készítmény alakjában is. Ezek oly módon készíthetők ki, hogy lehetővé tegyék az aktív komponens késleltetett felszabadulását. Az aktív komponens pelletekké vagy kis hengerekké sajtolható és szubkután vagy intravénásan beültethető depó-injekció vagy beültetett test alakjában. A beültetett készítményekben közbömbös anyagokat, így biológiai úton lebontható polimereket vagy szintetikus szilikonokat alkalmazhatunk. Ilyen, pl. a Silastic, a szilikon-gumi vagy más polimer, amelyeket a Dow-Corning Co. állít elő.

A találmány szerinti fehérjeszerű anyagot a pióca nyálából vagy nyálmirigyeiből nyerjük ki. Többféle módon juthatunk a nyálmirigy-kivonathoz, amely a *H. ghilianii* elülső vagy hátsó (vagy mindkét) nyálmirigyéből származik és amelyet a találmány szerinti fehérjeszerű anyag előállítására és tisztítására felhasználunk. Ilyen megoldás pl. a mirigyek sebészeti eltávo-

lítása és homogenizálása; a szövet-homogenizátum extrakciója HEPES pufferrel és az extraktum betöményítése vagy vízmentesítése; vagy a szövet-homogenizátum ultracentrifugálása. A kapott nyers nyálmirigykivonatot ezután a szokásos kromatográfias eljárással dolgozzuk fel, az X_a faktort gátló és alvadásgátló aktivitással rendelkező frakció elkülönítésére. A kromatografáláshoz DEAE-cellulózt, anioncserélő gyantát és heparin-agaróz gyantát alkalmazunk és az eluálást lineárisan növekvő nátrium-klorid koncentráció alkalmazásával végezzük.

A kapott tisztított nyálmirigy-kivonatot ezután egy affinitás-kromatográfias műveletnek vetjük alá, egy kromatográfias gyantához kötött X_a faktor, pl. szarvasmarha- X_a faktor felhasználásával. Az affinitás-kromatográfias általában alkalmazott gyantákat használhatjuk fel, amelyek rendelkeznek hozzáférhető csoportokkal az X_a faktor kémiai megkötéséhez. Affi-Gel-15-oszlopot alkalmazunk e célra: ez egy N-szukcimidil-észter tartalmazó gyanta, amely a Bio-Rad Co-tól szerezhető be. Az X_a faktor úgy köthető meg ezzel a gyantával, hogy a gyantát és az X_a faktort 4-morfolino-propán-szulfonsavval, majd etanol-amminnal inkubáljuk. A tisztított nyálmirigy-kivonatot ezen gyanta alkalmazásával kromatografáljuk; az eluálást 0,05 mólos HEPES-sel [4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsav] végezzük, amely 0,1 mól benzamidint – az aktív helyet tekintve reverzibilis szerin-proteáz-inhibitor – tartalmaz, és felfogjuk azt a frakciót, amely alvadásgátló és amidolitikus aktivitást mutat. A szakember számára nyilvánvaló, hogy az affinitás-kromatográfias technika tekintetében különböző szokásos változtatások hajthatók végre.

Az X_a faktort gátló aktivitással rendelkező, kapott nyers fehérjeszerű anyagot ezután tovább tisztítjuk. Ez a tisztítás bármely szokásos módon végezhető, pl. fordított fázisú kromatográfiaival; ez olyan típusú kromatográfia, amelyben az álló fázis nempoláris és az eluáló fázis poláris. A stacionárius fázis jellegzetesen egy szénhidrogén lánc, amelyet kémiai kötással rögzítünk egy közömbös felülethez, pl. üveghez. Az eluáló fázis vizes metanol, acetonitril és propanol. Hidrofób interakciós kromatográfia esetében a stacionárius fázis nempoláris, és az eluáló fázis poláris, pl. víz vagy vizes puffer.

A találmány szerinti eljárás során C-18 típusú gyantát használunk, vagyis egy olyan gyantát, amelyben a szilárd gyantához kötött szénhidrogén lényegében egy 18 szénatomot tartalmazó szénhidrogén, pl. az Aquapore RP-300. A C-18 gyanta eluálását lineáris, növekvő, trifluor-ecetsavat tartalmazó vizes acetonitril oldat grádienssel végezzük.

A találmányt a következő, nem-korlátozó jellegű példával szemléltetjük.

Az X_a faktort gátló hatású anyag előállítása H. ghilianii nyálmirigy kivonatából és jellemzése

Alvadási, kromogén és fibrin/ogen/olitikus vizsgálatok

A protrombin-időket (véralvadási időt, melyet az alábbiakban ismertetünk) egyfázisú alvadásos vizsgá-

latokkal határozzuk meg és spektrofotometrikan követjük Electra 800 automatikus alvadási idő mérővel (Medical Laboratory Automation, Inc.) a gyártó által ajánlott standard programok és reagensek alkalmazásával. Röviden összefoglalva: különböző mennyiségű

(i) nyers kivonatot, amelyet a *Haementeria ghilianii* nyálmirigy szövetéből nyerünk ki, 20 mmól HEPES-t, 0,15 mól NaCl-t és 2,5 mmól $CaCl_2$ -t tartalmazó, pH 7,4 oldatban, vagy

(ii) a H. ghilianii nyálmirigy kivonat kromatográfias frakcióit, az oszlop eluálásához használt pufferben, vagy

(iii) a H. ghilianii nyálmirigyéből kapott tisztított X_a faktor inhibitor 20 mmól HEPES-t, 0,5 mól NaCl-t, 2,5 mmól $CaCl_2$ -t tartalmazó pH 7,4 oldatban

hozzáadunk 100 μ l normál, citrátos emberi plazmához, 200 μ l $CaCl_2$ -re 11,6 mmól töménységű – trombolasztin reagens (DADE^R) hozzáadása után meghatározzuk az alvadási időket. Az X_a faktor kromogén meghatározását és a trombin amidolitikus aktivitás meghatározását 96 helyes mikrotitráló lemezek (Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NY) végezzük, metoxikarbonil-D-ciklohexil-glicil-glicil-arginin-p-nitroanilid-acetát ill. H-D-hexahidrotirozil-L-alanil-L-arginin-p-nitroanilid-acetát alkalmazásával. Ezen vizsgálatok során 0,15–16 ng enzimet, 25 μ l pH 7,4 pufferben (20 mmól HEPES, 0,15 mól NaCl) hozzáadunk 25 μ l ugyanilyen pufferhez, majd 50 μ l megfelelő inhibitor mintát adagolunk. Az oldatokat 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk és a meghatározást 100 μ l kromogén szubsztrát hozzáadásával kezdjük meg, $2,425 \times 10^{-4}$ mól végkoncentrációban. Az inhibitor távollétében ill. jelenlétében megfigyelhető amidolitikus aktivitást spektrofotometrikan követjük 405 nm-en, a p-nitroanilid abszorpció 1 perces időközökkel történő leolvásával, EL309 Microplate Autoreader (BIO-TEK Instruments) alkalmazásával.

A ^{125}I -dal jelzett (emberi) fibrinogént a Knight et al. által leírt módon (Thromb. Haemostas., Stuttgart, 46, 593-596, (1981) határozzuk meg, 5 mg fibrinogént 5 ml 50 mmól Tris-HCl-t, 0,1 mól NaCl-t és 0,025 M nátrium-citrátot tartalmazó, pH 7,9 pufferben összekeverünk 500 μ Ci Na ^{125}I -dal (New England Nuclear, Boston, MA) és 5 μ l 0,045% NaI hordozóval egy műanyag kémcsőben és a mintát jégbe hűtjük be. A reakció megindításához a mintát átvisszük egy lehűtött kémcsőbe, amelyet 100 μ g jodogénnel vontunk be és jégfürdőben 1 órán át lassan keverjük. A radiojódos reakció leállítására a fehérje-oldatot egy műanyag kémcsőbe dekantáljuk, annak érdekében, hogy a jodogént elkülönítsük a reagensektől. Ezután 5 mg BSA-t adunk a mintához és az oldatot 0,5 x 12 ml-es BioGel P-2 oszlopon frakcionáljuk – amelyet 0,05 mól Tris-HCl + 0,1 mól NaCl-ot tartalmazó pH 7,9 pufferrel ekvilibráltunk –, az esetleg visszamaradt szabad ^{125}I és a ^{125}I -dal jelzett fibrinogén szétválasztására. A fajlagos radioaktivitás $1,9 \times 10^8$ dpm/mg.

A fibrinogenolitikus vizsgálat a kromatográfiás frakciókban jelenlevő hementin azon képességén alapul /S.M. Malinconico et al., J.Lab.Clin.Med. 103, 44-58 (1984)/, hogy a ^{125}I -dal jelzett fibrinogént triklór-ecetsavban oldható ^{125}I -dal jelzett fibrinogénnel inkubálunk 227 μl 50 mmól Tris-HCl-t és 0,1 mól NaCl-t tartalmazó pH 7,9 oldatban. A minta CaCl_2 koncentrációját 10 mmól-ra állítjuk be, majd egy éjjelen át 37 °C-on inkubáljuk. Ezután hozzáadunk 100 μl BSA-t (3 mg/ml az inkubáláshoz használt pufferben oldva), majd 427 μl jég hideg 20%-os triklór-ecetsavat (TCA). A mintákat 2 órára jégbe tesszük, centrifugáljuk és gamma-számlálással meghatározzuk a pelleték és a felülúszók radioaktivitását.

A fibrinogenolitikus aktivitást úgy fejezzük ki, mint a TCA-ban oldható frakció számlálási eredménye és a TCA-ban oldhatatlan frakció számlálási eredménye arányát (TCA sol/TCA ppt).

A nyálmirigy-kivonat előállítása

A H. ghiliani nyálmirigyait, olyan mennyiségben, amely 50 egység hementin-aktivitásnak – 49 egység/mg fehérje – felel meg /S.M. Malinconico et al., J.Lab.Clin.Med. 103, 44-58 (1984)/ üvegbotlaldörzsöljük egy 3 ml-es Reacti-fiólaban (Pierce Chemical Co.), amely 2 ml pH 7,8 20 mmól HEPES-t (extrakciós puffer) tartalmaz. A fiolát jégre helyezzük és tartalmát mikrokémcsőnek megfelelő hegygel ellátott ultrahang-berendezéssel (Branson Sonic Power Supply) kezeljük (négy, 3 energia-szintű 30 másodperces energiasókkal, a ciklus 30%-os kapacitás-kihasználásával). A fiolát 5 percen át centrifugáljuk 3750 ford./perc sebességgel; a felülúszót összegyűjtjük, majd 8500 ford./perc sebességgel Eppendorf-f. asztali centrifugával újra centrifugáljuk. Az első centrifugálási lépésben kapott pelleteket 2 ml extrakciós pufferben újra szuszpendáljuk és megismételjük az előbbi eljárást. A két ultrahangos extrakcióból származó felülúszót egyesítjük és azonnal felhasználjuk a tisztítási lépésben.

Az X_a faktort gátló hatású, antikoaguláns anyag tisztítása

A nyálmirigy-kivonatot, amely 4 mg oldható fehérjét tartalmaz 4 ml extrakciós pufferben, felvisszük egy DEAE-5PW (Waters Associates) anioncserélő oszlopra (0,46 x 7,5 cm), amelyet 20 mmól HEPES-sel (4 puffer, pH 7,8) hoztunk egyensúlyba. A fehérjéket lineáris NaCl gradiens alkalmazásával eluáljuk, amely 60 perc alatt 100% A puffertől (kiindulási körülmények) 100% B pufferig (0,5 mól NaCl-ot is tartalmazó A puffer) terjed. Az áramlási sebesség 1 ml/perc. A 0,1–0,2 mól NaCl koncentráció között eluált frakciókat, amelyek antikoaguláns és X_a faktort gátló aktivitású anyagokat egyaránt tartalmaznak, egyesítjük (2. ábra), A pufferrel 10 mS/cm vezetőképességig hígítjuk és felvisszük egy 0,5 x 5 cm-es heparin-agaróz oszlopra (Bethesda Research Laboratories Life Technologies Inc.)

A 2. ábra az oldható protein extrakt DEAE anioncserélő gyantán végzett kromatográfiás vizsgálati eredményeit mutatja. A 30–35 frakciók tartalmazzák

az antikoaguláns és X_a faktort gátló hatású anyagot 0,1–0,16 mólos NaCl-dal eluálva (A rész). A 37–44. frakciók pedig a fibrinogenolitikus aktivitású és X_a faktort gátló aktivitás nélküli anyagot tartalmazzák 0,20 mólosnál töményebb NaCl-dal eluálva (B rész). Ez az anyag elősegíti a fibrin-lizist, degradálja az I¹²⁵ fibrinogént (2. ábra, B rész) továbbá a tisztított fibrinogén α , β és γ láncot is degradálja (nincs jelezve). Ennek a frakciónak a fibrinogenolitikus működése a hementinnek tulajdonítható. Az X_a faktort gátló aktivitással rendelkező frakciók nem rendelkeznek fibrinogenolitikus aktivitással. Az 1. és 2. ábra szerint a 0,1–0,16 mólos NaCl-dal eluált inhibitor sem a Hirudo medicinalis-ból származó hirudin (J. Dodt, et al., Bio Chem. Hoppe-Syler 366, 379-385 (1985)), sem a hementin, amely a Heamenteria ghiliani fibrinogenolitikus komponensé (S.M. Malinconico, et al., J. Lab. Clin. Med. 103, 44-58 (1984)). A görbén csúcsot mutató frakciók 25 μ -e meghosszabbítja a protrombin időt 16 másodperccel és teljesen gátolja 17 ng X_a faktort gátló hatású anyag működését az amidolitikus vizsgálatban. A DEAE frakcionált extrakciós vizsgálatok alapján az X_a faktort gátló hatású anyag tekinthető a fő antikoaguláns anyagnak.

Heparin affinitás kromatográfia

A DEAE frakciók további tisztítását, az antikoaguláns hatású anyag dúsítására, heparin-agarózon a 3. ábrán mutatjuk be. Az oszlopot alaposan mossuk A pufferrel, majd lineáris só-gradienssel eluáljuk. A gradiens 100% A puffertől 75 perc alatt 100% B pufferig (A puffer + 1 mól NaCl) terjed. Az áramlási sebesség 1 ml/perc.

A DEAE oszlopról nyert, X_a faktort gátló aktivitással rendelkező, antikoaguláns frakciókat egyesítjük, majd a frakciókat heparin-agarózon kromatografáljuk (3. ábra). Az antikoaguláns és X_a faktort gátló amidolitikus hatású anyagok 0,45–0,55 mólos NaCl-dal koeluálódnak. A görbén csúcsot mutató, antikoaguláns aktivitású frakciók 25 μ -e meghosszabbítja a protrombin időt 17 másodperccel és 16 ng tisztított X_a faktort gátló hatású anyag a kromogén szubsztrát hidrolízisét teljesen gátolja.

FX_a affinitás kromatográfia

Egyes fogantatási módok esetében az X_a faktort gátló aktivitású anyagot úgy nyerjük ki, hogy a fehérjéket szarvasmarha- X_a -faktor-Affi-Gel-15-öt tartalmazó oszlopon frakcionáljuk (4. ábra). A nyers nyálmirigy-kivonatot vagy bármely, a tisztítási folyamat során nyert, antikoaguláns aktivitással rendelkező kromatográfiás frakciót 0,1% Tween-20 töménységre állítjuk be és affinitás-kromatográfiával frakcionáljuk egy oszlopon, amely 2 ml ágy-térfogatú, szarvasmarha- X_a faktor-Affi-Gel-15-öt tartalmaz. Az oszlopot alaposan mossuk 0,1% Tween-20-at tartalmazó 0,05 mólos HEPES-sel, amely 0,1 mól NaCl-ot is tartalmaz (pH 7,5), majd a fehérjét 0,1% Tween-20-at és 0,1 mól benzamidot tartalmazó 0,05 mólos HEPES-sel (pH 7,5) 4 ml/óra áramlási sebességgel eluáljuk. Az alvadási és az amidolitikus meghatározásokat az összegyűjtött frakciók 1/500-szeres hígításával végez-

zük.

A szarvarmarha X_a faktort úgy kapcsoljuk az Affi-Gel-15-höz, hogy 2 ml tisztított enzimet 2 ml 4-morfolino-propán-szulfonsavban (MOPS) (PH 7,4; kapcsoló puffer) 2,5 ml gyantával egy éjén át 4 °C-on inkubálunk. A gyöngyöket alaposan mossuk, majd 3 ml kapcsoló pufferben újra szuszpendáljuk. A gyöngyöket ezután 0,3 ml 1 mólos (pH 8,0) etanol-aminnal reagáltatjuk 4 °C-on egy éjén át, majd alaposan mossuk 0,1% Tween-20-at tartalmazó 0,05 mólos HEPESES-sel, mely 0,1 mól NaCl-ot is tartalmaz (pH 7,5).

Az antikoaguláns/ X_a faktort gátló aktivitású anyagnak FX_a-Affi-Gel-15 oszlopon, affinitás kromatográfiával végezett frakcionálását a 4. ábra mutatja. Az antikoaguláns és X_a faktort gátló aktivitású anyag az oszlopról együtt eluálható, ha az eluálásnál 0,1 mól benzamidint tartalmazó eluálószeret alkalmazunk.

Revers fázisú HPLC

A végső frakcionálást, ami az antikoaguláns és az amidolitikus aktivitás elkülönítését illet, egy 2,1x30 mm-es Aguapore RP-300, C-18 fordított fázisú oszlopon végezzük (Applied Biosystems 130., fehérje/peptid elválasztásra szolgáló rendszer). A fehérjéket lineáris acetónitril grádienssel eluáljuk, a gradiens 100% A puffertől (0,1% trifluor-ecetsav vízben) 100% B pufferig (0,07% trifluor-ecetsav/70% acetónitril/29,93% H₂O) terjed, 40 perc alatt. A fehérjét tartalmazó frakciókat (5. ábra) egy éjjelen át a Savant speed vac rendszerben szárítjuk. A mintákat 0,1%-os vizes trifluor-ecetsavban újra feloldjuk és különböző mennyiségű mintákat elemzésnek vetünk alá (SDS poliakrilamid gél-elektroforézis, gázfázisú szekvencia-meghatározás mikroméretben, aminosav-meghatározás, az antikoaguláns és az amidolitikus aktivitás meghatározása).

Az inhibitorot mikrobor reverz fázisú HPLC-vel tovább frakcionáljuk, melynek eredményét a kis 5. ábra mutatja. A görbén többek között két fő és 4 kisebb csúcs látható. Újbóli frakcionálás után hat (P_0 - P_5) diszkrét csúcs látható, melyek közül a P_4 és P_5 mutatja a fő, míg a P_1 - P_3 a kisebb antikoaguláns és X_a faktort gátló aktivitást. A P_0 -nál nem tapasztaltunk aktivitást.

Szekvencia analízis

Az 50,65-53,65 perc közötti, P_5 aktivitási csúcsot mutató eluátum frakciót piridil-etilezzük és sómentesítjük mikrobor (mikrobore, kisszemcsés 7 µ-os szilikagél, gyártja az Applied Biosystem-hez tartozó Brownlee) nagynyomású folyadékkromatográfiás módszer alkalmazásával. A piridil-etilezett anyag terminális aminocsoportját piroglutamát-aminopeptidázal blokkoljuk oly módon, hogy az enzim/peptid arány 1:10. Az emésztést 10 mmól EDTA-t, 5 mmól ditiotreitolt és 5% glicerint tartalmazó 0,1 mólos Na₂HPO₄-ban (pH 8,0), 24 órán át, szobahőmérsékleten végezzük. A szekvencia-analízis előtt a polipeptidet ezután mikrobor nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel sómentesítjük.

Az automatizált Edman-lebontásokat az Applied Biosystems, Inc. 470A fehérje-peptid szekvencia vizsgáló berendezésével határozzuk meg azokkal a reagen-

sekkel és azon utasítások és standard programok szerint, amelyeket a gyártó bocsát rendelkezésre. A feniltio-hidantoin származékká átalakított aminosavak mindegyik ciklusban az Applied Biosystems, Inc. 120 PTH elemzőberendezésével határozzuk meg, amely közvetlen on-line kapcsolatban áll a 470A gázfázisú szekvencia-meghatározó berendezéssel.

A kvantitatív aminosav analízist Hewlett Packard Aminosav analízatorra (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) végezzük.

A vizsgált fehérje – melyet ghilanten-nek nevezünk – szekvenciája a következő:

pyr-EGPFGPGCEE AGCPEGSACN IITDRCTC-PE VRCRVYCSHG FQRSRYGCEV CRCRTEPM-
KA TCDISECPEG MMCSRLTNKC DCKIDINCRK
TCPNGLKRDK LGCEYCECKP KRKLVPRLS
(119),

pyr-E jelentése piroglutaminsav.

Analitikai poliakrilamid gél-elektroforézis

8x8 cm méretű, 1 mm vastagságú poliakrilamid gél lemezeket 20% és 12% akrilamidban, 3% tömörítő gél alkalmazása mellett (Heefer Sci. Co.) és 10 mA/gel intenzitású egyenáram hatásának tesszük ezeket ki. A gélek 0,25 mól Tris-HCl-t és 0,1% nátrium-dodecilszulfátot tartalmaznak (SDS), pH 9,0. Az elektroforézist 25 mmól Tris-HCl-t, 0,2 mól glicint és 0,1% SDS-t tartalmazó pH 8,4 oldattal végezzük. A szárított mintákat 35 µl pH 6,8 oldatban oldjuk, amely a következőket tartalmazza: 10 mmól Tris-HCl, 1% SDS, 20% szacharóz, 1 mmól EDTA, 6 mól karbamid, 1% 2-merkaptó-etanol és 0,03% brómfenolkék. Az elektroforézis előtt a mintákat 15 percen át 60 °C-on tartjuk. A géleket Merrill et al. ezüst festékes eljárásával rögzítjük és kimutatjuk a fehérjéket (Anal. Biochem. 105, 361, 1980). A fehérjék látszólagos molekulásúlyát extrapolálással határozzuk meg egy standard görbéből, amely a molekulásúlyok logaritmusát standard fehérjék elektroforetikus mozgékonyágával szemben tünteti fel. A standard fehérjék a következők: foszforilát N (94,000), szarvasmarha-szérumalbumin (67,000), ovalbumin (43,000), szénsav-anhidráz (30,000), alfa-kimotripszinogén (35,700), szójabab-tripszininhibitor (20,000) béta-laktoglobulin (18,400), alfa-laktalbumin (14,400), lizozim (14,300), szarvasmarha-tripszininhibitor (6,200) és inzulin (3,000).

Aminosav-elemzés

A hidrolízishez felhasznált mikro-ampullákat (Hewlett Packard automatikus mintavevő) metanolban ultrahang-kezelésnek vetjük alá, majd 4 órán át egy kemencéhez 500 °C-on tartjuk. A peptidokat gázfázisban hidrolizáljuk egy Picetag Workatation-ban (Waters Associates) 105 °C-on, 20 órán át, 200 µl állandó forrásban levő HCl-lel (Pierce Chemical Co.), amely néhány mikroliter cseppfolyósított fenolt (MCB) tartalmaz. A hidrolizált mintákat speed vac concentrator-ban (Savant) szárazra pároljuk, majd a maradékot kistérfogató (általában 15-30 µ) 0,1 mól HCl-ban oldjuk és bevisszük egy Hewlett Packard 1090 HPLC automatikus mintavevőjébe. Az amino-

sav-elemzést úgy végezzük, hogy a Hewlett Packard cég Aminoquant elemzőberendezését használjuk, a nagyérzékenységű üzemmódban (fluoreszcenciás kimutatás). Az aminosavakat olyan körülmények között határozzuk meg, hogy az oszlopra való felvitelt megelőzően származékképzést hajtunk végre először 0-ftalaldehiddel (OPA) a primer aminosavak, majd klór-

hangyasav-9-fluorenil-metilészterrel (PMOC) a szekunder aminosavak átalakítására. A származékká alakított aminosavakat fordított fázisú HPLC-vel választjuk szét, a gyártó által rendelkezésre bocsátott oszlopokkal, reagensekkel és műveleti utasításokkal. Ez a rendszer alkalmas 1–500 pmól mennyiségű amino-acil-csoport pontos meghatározására.

TÁBLÁZAT

A. H. ghilianii nyálmirigy-kivonataiból mikropórusú HPLC-vel kapott P₀-P₅ frakció aminosav-elemzési eredményei^a

Aminosav	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₀
Asx	17	18	14	16	17	11
Glx	22	24	19	19	20	14
Ser	9	10	7	8	8	7
His	2	2	2	2	2	2
Gly	14	18	13	13	14	10
Thr	9	10	10	10	11	7
Ala	6	6	6	6	6	6
Arg	18	20	18	19	21	13
Tyr	6	6	6	6	6	5
Val	7	7	5	7	7	4
Met	5	5	5	5	5	3
Ile	8	8	7	7	8	5
Phe	4	4	3	4	4	3
Leu	9	9	10	11	1	9
Lys	12	14	7	5	6	4
Pro	17	16	6	6	6	3

^a"Maradék/mól fehérje" értékben kifejezve. Az értékeket 6 maradék/mól Ala-tartalomra normalizáltuk.

Az 1. ábra az X_a faktor ellenes aktivitást mutatja be a H. ghilianii nyers nyálmirigy kivonataiban. Az aktív anyag egyaránt gátolja az emberi (1. a külön bemutatott kis ábrát) és a szarvasmarha X_a faktort, de nem gátolja az emberi és a szarvasmarha trombint (ezeket az adatokat nem mutatjuk be).

A 2. ábra 4 mg oldható fehérjekivonat anioncserélő kromatográfiáját – DEAE-n – mutatja be. Az antikoaguláns és az X_a faktort gátló aktivitás együtt eluálódik, 0,1–0,16 mól NaCl töménység között (2/A ábra), a 30–35. frakció között. A fibronogenolitikus aktivitás – az X_a faktor elleni aktivitás nélkül – 0,20 mól NaCl felett eluálódik (2/B ábra), a 37–44. frakció között (vonalkázott terület). Ez az anyag elősegíti az olvadék (fibrin) lízisét, elbontja a ¹²⁵I-dal jelzett fibrinogént (2. ábra, B részábra) és kimutattuk, hogy elbontja a tisztított fibrinogén alfa-, beta- és gamma-láncát SDS-PAGE elemzés során (ezeket az adatokat nem közöljük). Ennek a frakciónak a fibrinogenolitikus aktivitása a hementinnek tulajdonítható. Az X_a faktor elleni aktivitással rendelkező frakciók nem mutatnak fibrin/ogen/olitikus aktivitást. Az 1. és a 2. ábra eredményei alapján úgy tűnik, hogy a

0,1–0,16 mól NaCl között eluálódó inhibitor nem függ össze a Hirude medicinalis hirudinjával (J. Dodt et al., Biol.Chem. Hoppe-Seyler 366, 379–385, 1985) vagy a hementinnel, a Haementeria ghilianii fibrin/ogen/olitikus komponensével (S.M. Malinconico et al., J.Lab.Clin.Mad. 103, 44–58, 1984). Mint a 2. ábrán bemutatjuk, a csúcs-aktivitású frakciókból 25 µl 16 másodperccel hosszabbítja meg a protromin időt és teljesen gátol 17 ng X_a faktort az amidolitikus vizsgálatban. A DEAE-n fracionált kivonatokkal végzett vizsgálatok alapján azt állíthatjuk, hogy az X_a faktort gátló hatás teszi ki az alvadésgátló aktivitás zömét.

A DEAE oszlopról kapott, X_a faktor ellenes aktivitással rendelkező antikoaguláns frakciókat egyesítjük, majd heparin agaróz kromatográfiával fracionáljuk (3. ábra). Az alvadésgátló és az X_a faktor elleni ill. amidolitikus aktivitás együtt eluálódik 0,45–0,55 mól NaCl között. A csúcs-avadésgátló aktivitást mutató frakciókból 25 µl a protrombin-időt 17 másodperccel hosszabbítja meg és teljesen meggátolja 16 ng tisztított X_a faktornak a kromogén szubsztrát hidrolízisére kifejtett hatását.

Az alvadésgátló és az X_a faktor elleni aktivitás X_a faktor-Affi-Gel-15-ön végzett affinitás-kromatográ-

fiával való szétválasztását a 4. ábrán mutatjuk be. Mint látható, az alvadásgátló és az X_a faktor elleni aktivitás együtt eluálható az oszlopról 0,1 mól benzamidinnel, egy reverzibilis aktív helyű szerin-proteáz-inhibitorral.

Az inhibitor további frakcionálását – mikrobar fordított fázisú HPLC-vel – az 5. ábrán mutatjuk be. Mint látható, 4 kisebb és 2 nagyobb csúcs rezolválása eredményeként az alvadásgátló aktivitás számos csúcs között oszlik meg. Az újra-frakcionálás 6 elkülönült, P_0 - P_5 jelű csúcst eredményez (1. a beiktatott kis ábrát). Ezek közül a P_4 és a P_5 csúcs mutatja a nagyobb alvadásgátló és X_a faktor elleni aktivitást és a P_1 - P_3 csúcs valamivel kisebb aktivitású. Nem mutatható ki aktivitás a P_0 csúcsban.

A P_0P_5 frakció SDS PAGE elemzése (20% akrilamid) arra mutat, hogy ezek a fehérjék hasonló mozgékonyaságúak és virtuális molekulásúlyuk 18,000 (nem mutatjuk be). A 6. ábra a P_5 kromatográfiás profilját mutatja be mikropórusú fordított fázisú HPLC-vel. A kis ábra a P_5 12% akrilamiddal végzett SDS PAGE elemzése eredményeit mutatja be. Ennek a tiszta komponensnek a virtuális molekulásúlya 18,000, azaz a tisztított X_a faktor inhibitor látszólagos molekulásúlya nem változik jelentősen a poliakrilamid gél koncentráció 12 és 20% közötti változásával. Ez arra mutat, hogy nem nagy mértékben glikozilezett.

A 7. ábra a P_5 -nek az X_a faktorra kifejtett dóziszfüggő gátló hatását mutatja be. A P_5 -nek az a koncentrációja, amely a maximális gátlás felét eredményezi, 60 pmól.

A 27. oldalon levő táblázat a P_0P_5 frakció aminosav-összetételét mutatja be. A P_1 - P_5 komponens aminosav-tartalma a legtöbb maradék tekintetében nagyon hasonló, azzal az eltéréssel, hogy a P_4 és a P_5 Asx és Glx tartalma valamivel magasabb és Lys és Pro tartalma jóval magasabb. A P_0 jelentősen különbözik a P_1 - P_5 frakciótól, ami az Asx, Glx, Thr, Arg, Val, Met, Ile, Lys és Pro tartalmat illet. A P_1 , P_2 és P_3 csökkent aktivitása feltehetően a jelentősen csökkent Lys és Pro tartalommal függ össze. Az összetétel általános hasonlósága, a Lys és a Pro tartalomtól eltekintve, arra mutat, hogy a P_1 - P_5 hasonló szekvenciájú fehérje.

Az ábrák részletesebb magyarázata

1. ábra Az X_a faktor gátlása a Haementeria ghilianii nyálmirigye nyers kivonatával.

Kb. 11 μ g nyálmirigy-kivonatot (oldható fehérje) hozzáadunk 16 ng tisztított X_a faktorhoz. A mintát 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk és meghatározzuk az amidolitikus aktivitást, miután metoxikarbonil-D-ciklohexil-glicil-glicil-arginin-p-nitroanilid-acetátot adagoltunk. A p-nitroanilid képződését spektrofotometriásan követjük; 1 perces időközönként végzünk leolvasást 405 nm-en. Felső görbe: szarvasmarha X_a faktor és kromogén szubsztát; alsó görbe: szarvasmarha X_a faktor, nyálmirigy-kivonat és kromogén szubsztát. Kis ábra:

– felső görbe: emberi faktor és kromogén szubsztát;
– alsó görbe: emberi X_a faktor, nyálmirigy-kivonat és kromogén szubsztát.

A H. ghilianii nyálmirigy-kivonata nem gátolja a H-D-hexahidrotirozil-L-alanil-L-arginin-p-nitroanilid-acetát szarvasmarha és emberi trombin hatására végbemenő hidrolízisét (ezeket az adatokat nem mutatjuk be).

2. ábra. A nyers nyálmirigy-kivonat (4 mg oldható fehérje) frakcionálása egy 0,46 x 7,5 cm-es DEAE anioncserélő oszlopon.

A fehérjéket lineáris NaCl grádienssel – 20 mM HEPES-ben, pH 7,8 – eluáljuk (a részletek tekintetében 1. az eljárást). Az áramlási sebesség 1 ml/perc; 1 ml-es frakciókat fogunk fel.

A. részábra:

Az antikoaguláns aktivitást (körök) egyfázisú alvadási kísérletben határozzuk meg, mint a protrombin-idő meghosszabbodását. Az X_a faktort gátló hatást 405 nm-en mérjük, a p-nitroanilid képződés gátlásaként (négyzetek). Kromogén szubsztátként metoxikarbonil-D-ciklohexil-glicil-arginin-p-nitroanilid-acetátot alkalmazunk.

B. részábra:

Ez az ábra a H. ghilianii fehérje-eluciós görbét mutatja be, amelyet 280 nm-en mérhető abszorpcióval követünk. A fibrinogenolitikus aktivitást a vonalkázott terület mutatja be. Ez az aktivitás nem eluálódik együtt az X_a faktor elleni vagy nagyobb mértékű alvadásgátló aktivitással.

3. ábra: A részlegesen tisztított X_a faktor inhibitor frakcionálása heparin agaróz kromatográfiával.

A DEAE-ről levált frakciókat – amelyek az együtt eluálódó alvadásgátló és X_a faktor elleni aktivitást tartalmazzák – egyesítjük és felvisszük egy heparin agarózt tartalmazó 0,5 x 5 cm-es oszlopra. A fehérjéket 1 mól-ig terjedő lineáris NaCl grádienssel – 20 mM pH 7,8 HEPES-ben – eluáljuk. Az eluátumot folyamatosan átvezetjük egy olyan műszeren, amelyhez egy regisztráló berendezés csatlakozik. A műszer 405 nm-nél az oldat fényelnyelését regisztrálja, ami az ábrán a folyamatos vonallal van jelölve. A fényelnyelési arány a jobboldali ordinátán olvasható le (dimenzió nélküli szám). Az eluátum ezután a frakciógyűjtőbe kerül, ahol 1 ml-es frakciókat szerünk. Az alvadásgátló aktivitást (üres körök) egyfázisú alvadási kísérlettel határozzuk meg, a protrombin-idő meghosszabbításaként. Az X_a faktor gátlását 405 nm-en mérjük, a p-nitroanilid-képződés (üres négyzetek) gátlása alapján; kromogén szubsztátként metoxi-D-ciklohexil-glicil-glicil-arginin-p-nitroanilid-acetátot alkalmazva.

4. ábra. Az X_a faktor inhibitor frakcionálása szarvasmarha- X_a faktor-Affi-Gel-15-ön végzett affinitáskromatográfia segítségével

A fehérjéket 0,1 mól benzamidin-oldattal eluáljuk az oszlopról. Az áramlási sebesség 4 ml/óra; 1,2 ml-es frakciókat szedünk. A kromatográfiás frakciók 1/500-szoros hígítását használjuk fel az alvadásgátló (üres körök) és az X_a faktort gátló (fekete körök) aktivitásnak a leírt módon való meghatározására.

5. ábra. A H. ghilianii X_a faktort gátló komponense(i) tisztítása fordított fázisú HPLC-vel.

60 Az alvadásgátló és X_a faktort gátló aktivitás szem-

pontjából kiválasztott csúcs-frakciókat mikropórusú fordított fázisú HPLC-vel frakcionáljuk egy 2,1 x 30 mm-es Aquapore RP-300 oszlopon. Az árnyékolt terület arra mutat, hogy az antikoaguláns aktivitás megoszlik a csúcs-frakciók között. A kis ábra a kiindulási fordított fázisú szétválasztással kapott frakciók ugyanezen oszlopon való újra-kromatografálásának eredményeit mutatja be. Az újra-kromatografálással elkülönült, nem-átfedő csúcsokat kapunk. Az X_a faktort gátló aktivitás zömét a P_4 és a P_5 frakcióban találjuk (sötétebb szín); aktivitás mutatható ki a P_1 és a P_2 , valamint a P_3 frakcióban is (világosabb szín). Nem tartalmaz aktív anyagot a P_0 frakció (színtelen).

6. ábra. A P_5 frakció mikropórusú fordított fázisú HPLC-bel való vizsgálata.

A *h. ghiliani*-ből elkülönített P_5 fehérje frakció abszorpcióját 214 nm-en követjük. A kis ábra a mikropórusú fordított fázisú HPLC-vel elkülönített P_5 SDS PAGE (12% akrilamid) elemzési eredményeit mutatja be. Az a) sáv a standard molekulásúlyú fehérjéket, a b) sáv pedig a tisztított P_5 frakciót mutatja be. A fehérjéket az ezüst-festéses módszerrel mutatjuk ki, Merrill et al. fent idézett eljárása szerint.

7. ábra.

Az X_a faktor (0,15 ng) dózis-függő gátlását tisztított P_5 frakció alkalmazásával a feltüntetett koncentrációkban vizsgáljuk a metoxikarbonil-D-ciklohexil-glicil-glicil-arginin-p-nitroanilid-acetát hidrolízisének gátlása alapján. A p-nitroanilid-képződést 405 nm-en követjük.

SZABADALMIIGÉNYPONTOK

1. Eljárás X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyagnak *Haementeria ghiliani* pióca nyálából vagy nyálmirigyeiből történő izolálására és tisztítására,

azzal jellemezve, hogy

1) a nyálmirigyet – célszerűen eldörzsöléssel és az ezt

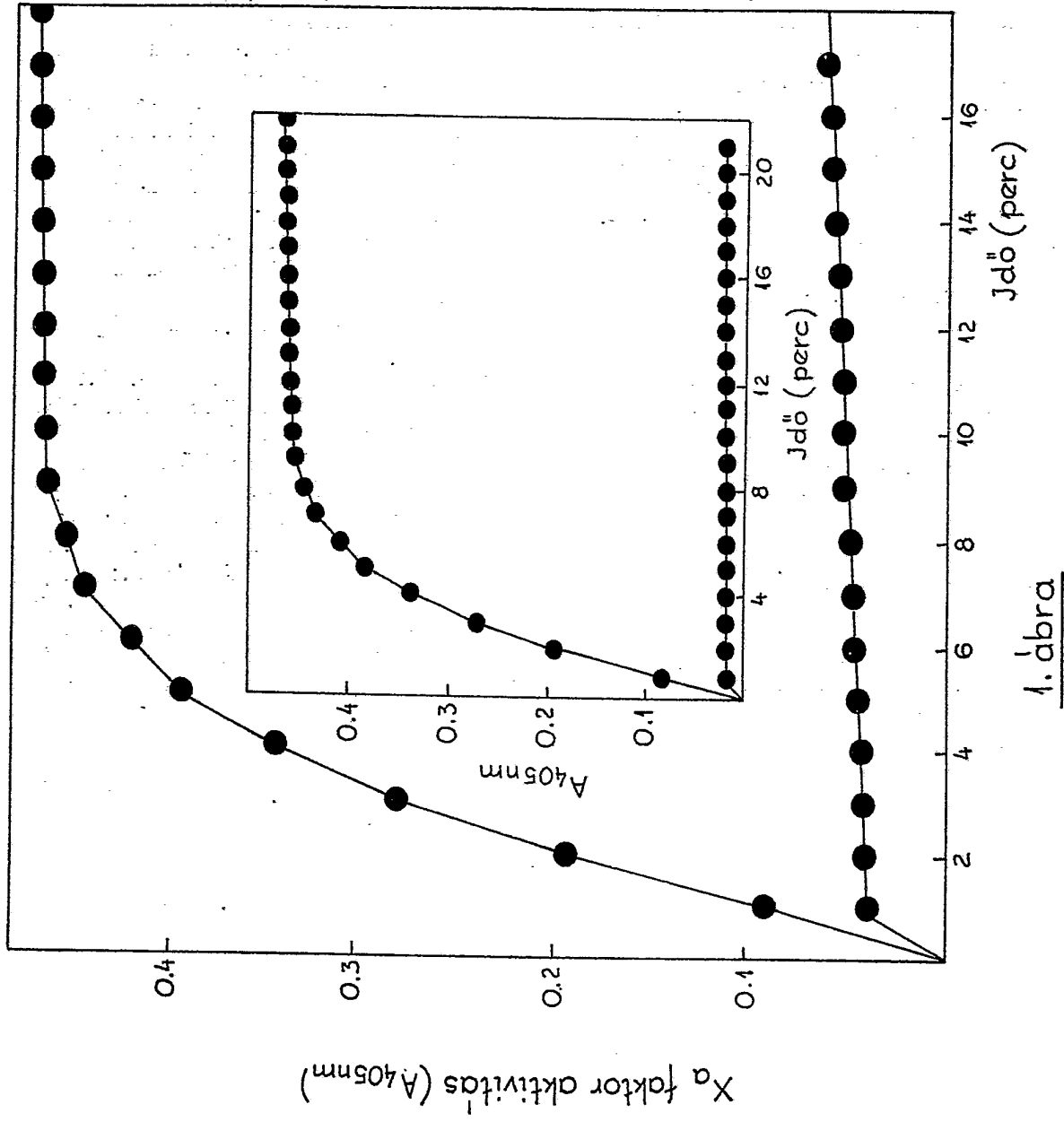
követő ultrahangos kezeléssel – 20 mmólos, 7,8 pH-jú 4-92-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsavval extraháljuk,

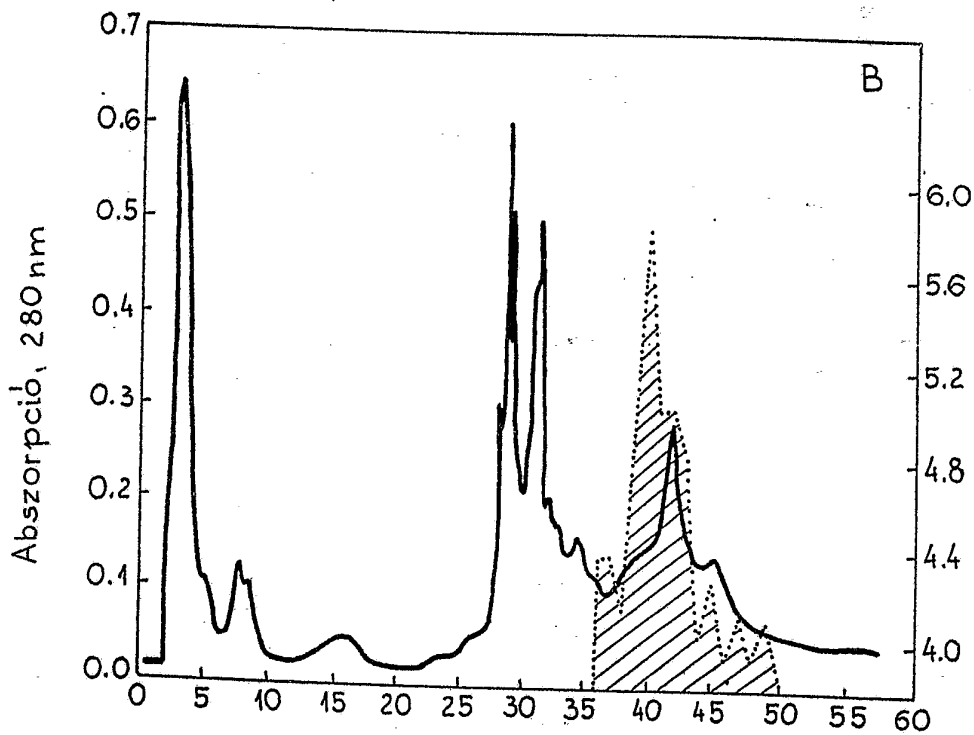
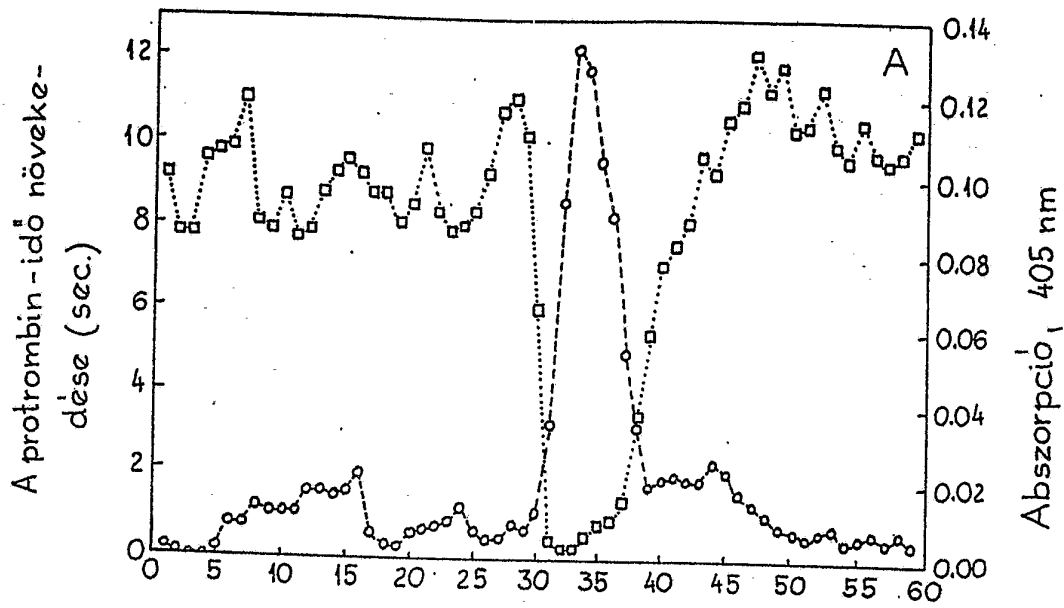
- 2) a kapott extraktumot vagy a nyálat egy DEAE cellulóz anioncserélő gyantán kromatografáljuk, eluensként 0,1–0,2 mólos NaCl-oldatot használva,
- 3) a kapott X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyagot tartalmazó frakciót affinitáskromatográfiának vetjük alá,
- 10 i) FX_a-Affi-Gél-15 alkalmazásával, eluensként 0,05 mólos 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsavat használva, mely 0,1 mól NaCl-ot, 0,1% Tween-20-at és 0,1 mól benzamidint tartalmaz, és amelynek pH-ja 7,5, és/vagy
- 15 ii) heparin-agaróz alkalmazásával, eluensként 0,45–0,55 mólos NaCl oldatot használva, majd
- 4) a kapott eluátumot egyszer vagy többször nagy nyomású folyadékkromatográfiának vetjük alá, egy C-18 típusú gyantát tartalmazó, reverz fázisú oszlop alkalmazásával és elkülönítjük az X_a faktort gátló hatású fehérjeszerű anyagot tartalmazó eluátum frakciókat.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás tiszta, X_a faktort gátló hatású

25 pyr-EGPFGPGCEE AGCPEGSACN LITDRCTC-PE VRRCRVYCSHG FQRSRYGCEV CRCRTEPM-KA TCDISECPEG MMCSRLTNKC DCKIDINCRK TCPNGLKRDK LGCEYCECKPKRKLCPRLS

aminosavszekvenciájú fehérjének – mely 60 pM koncentrációban az X_a faktort gátló hatás maximumának felét fejti ki, és amelynek 12%-os SDS-poliakrilamid gél-elektroforézissel mért molekulatömege 15.000–20.000 dalton – előállítására, azzal jellemezve, hogy a 4) eljárás lépésben a második nagynyomású folyadékkromatográfiás elválasztás során kapott P_5 aktivitási csúcsot mutató eluátum frakciót elkülönítjük.

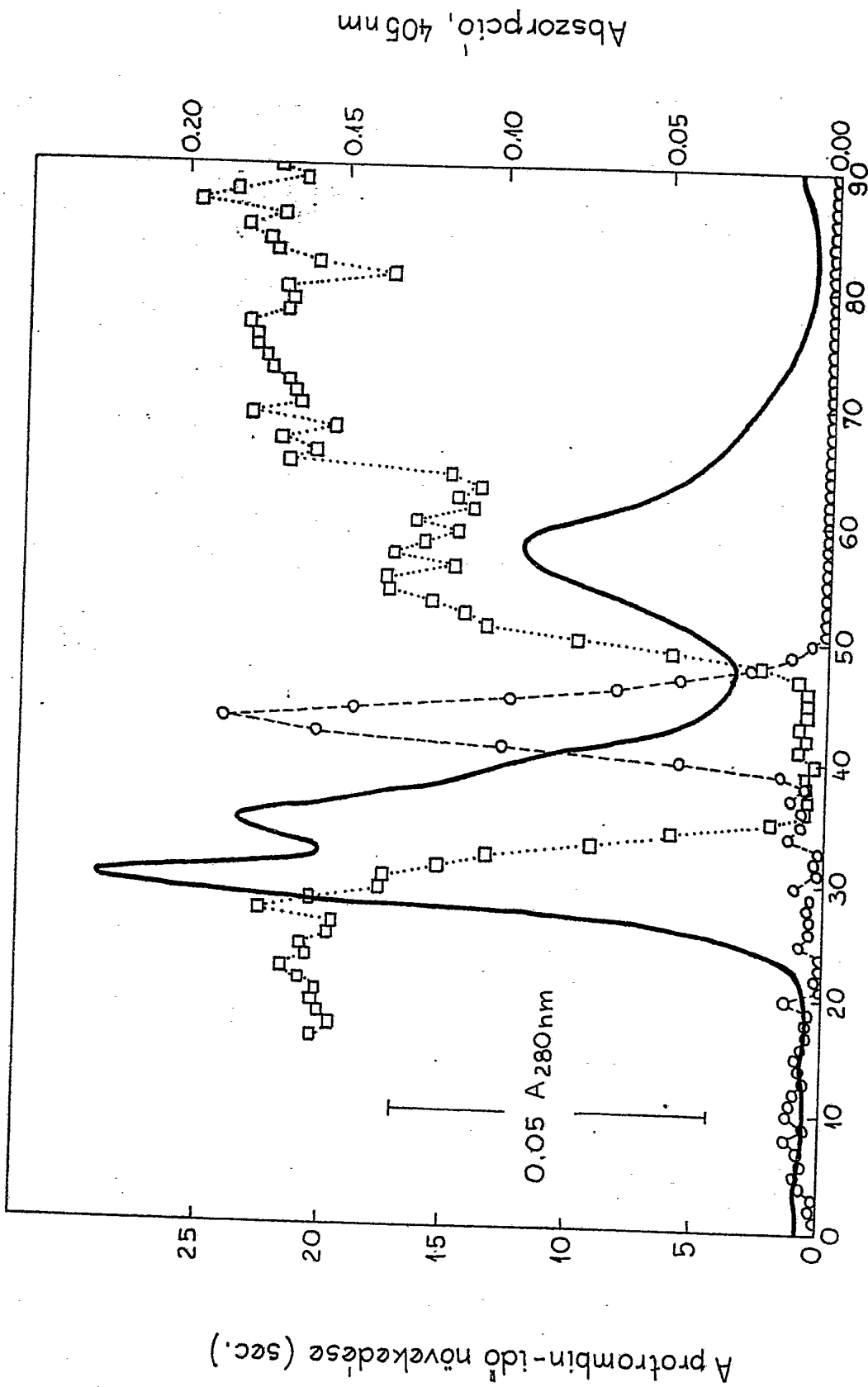




A frakció sorszáma

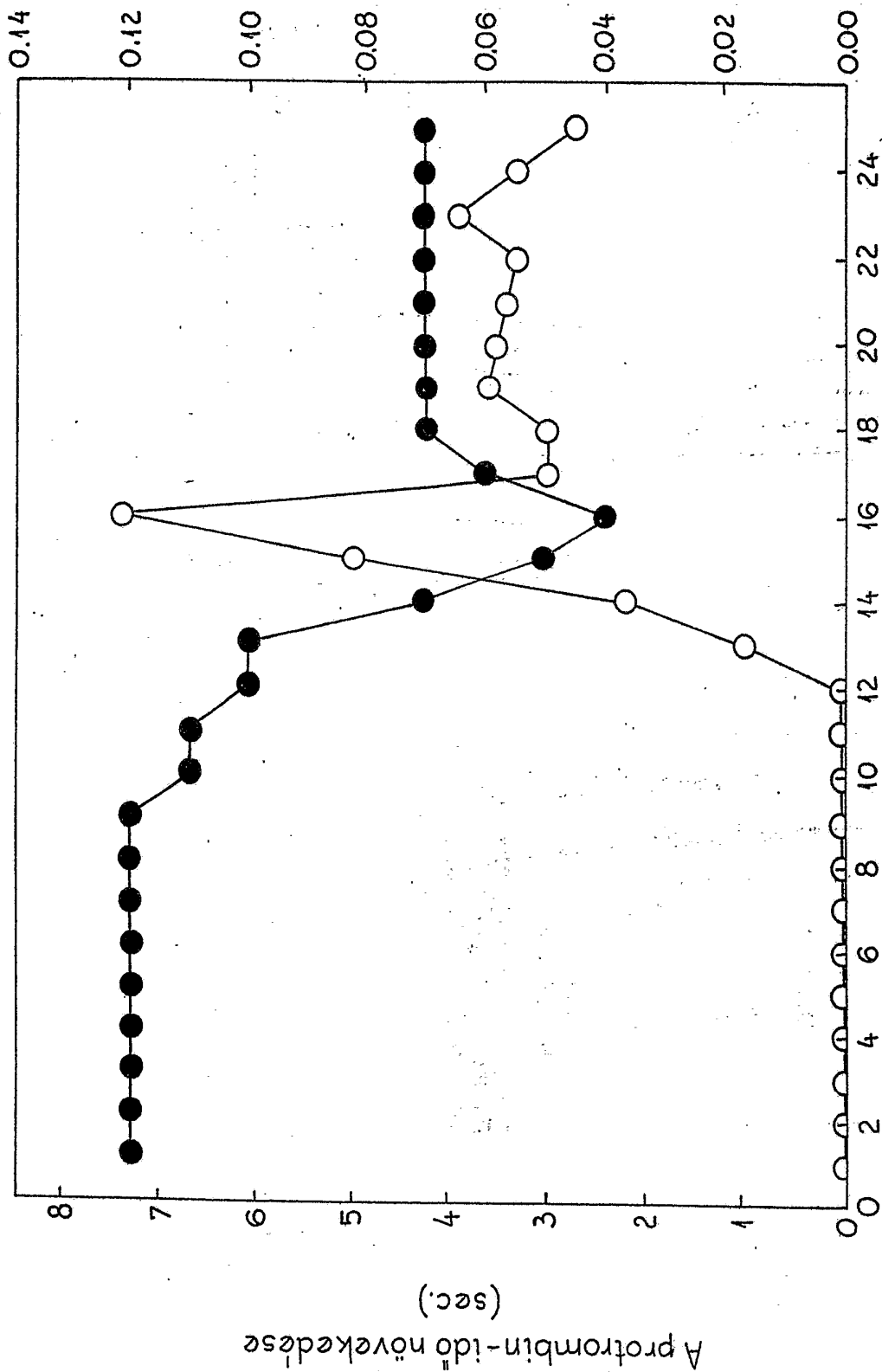
2. ábra

dpm arány (TCA old./TCA kicsap.)



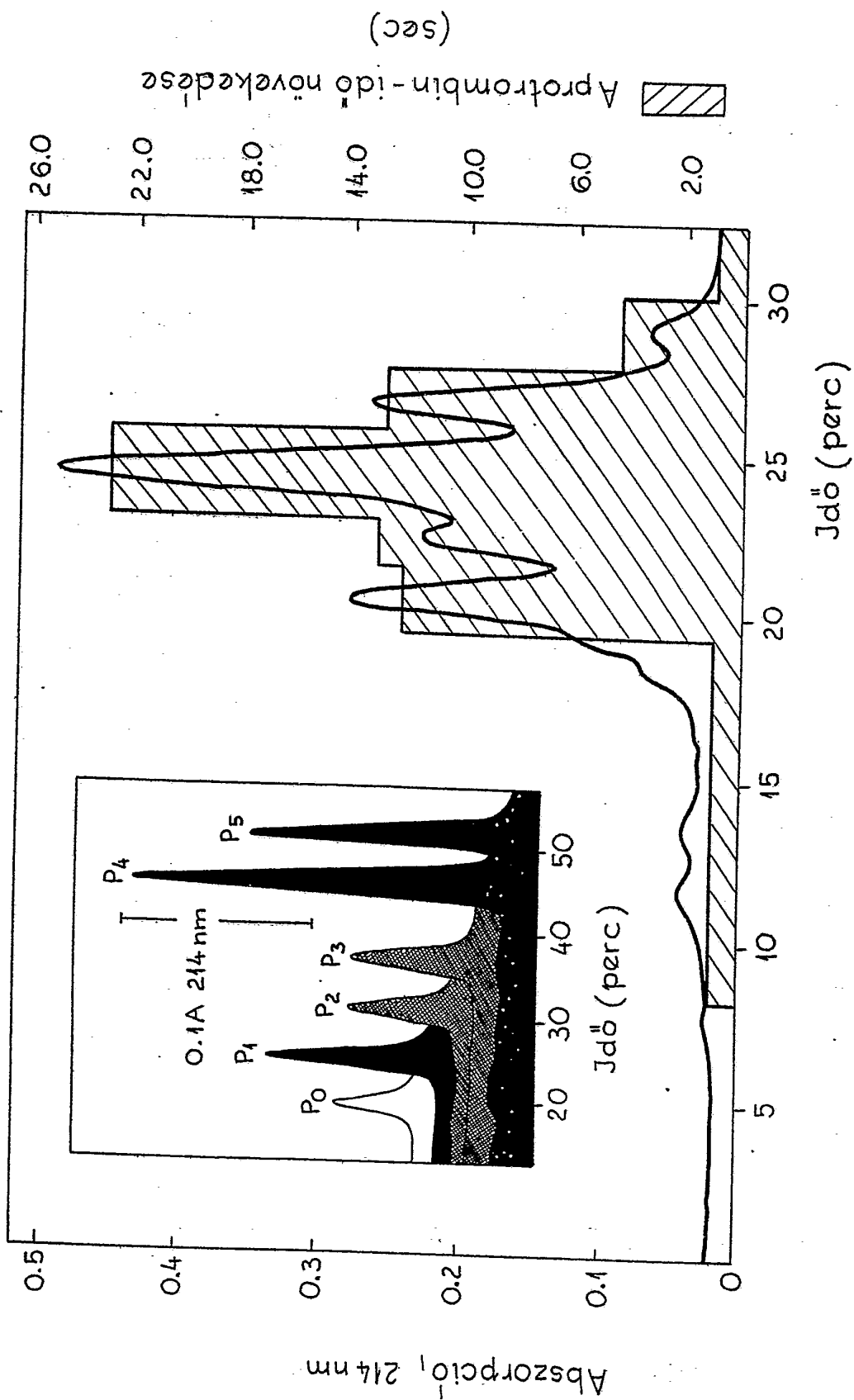
3. dbra

Abszorpció, 405 nm

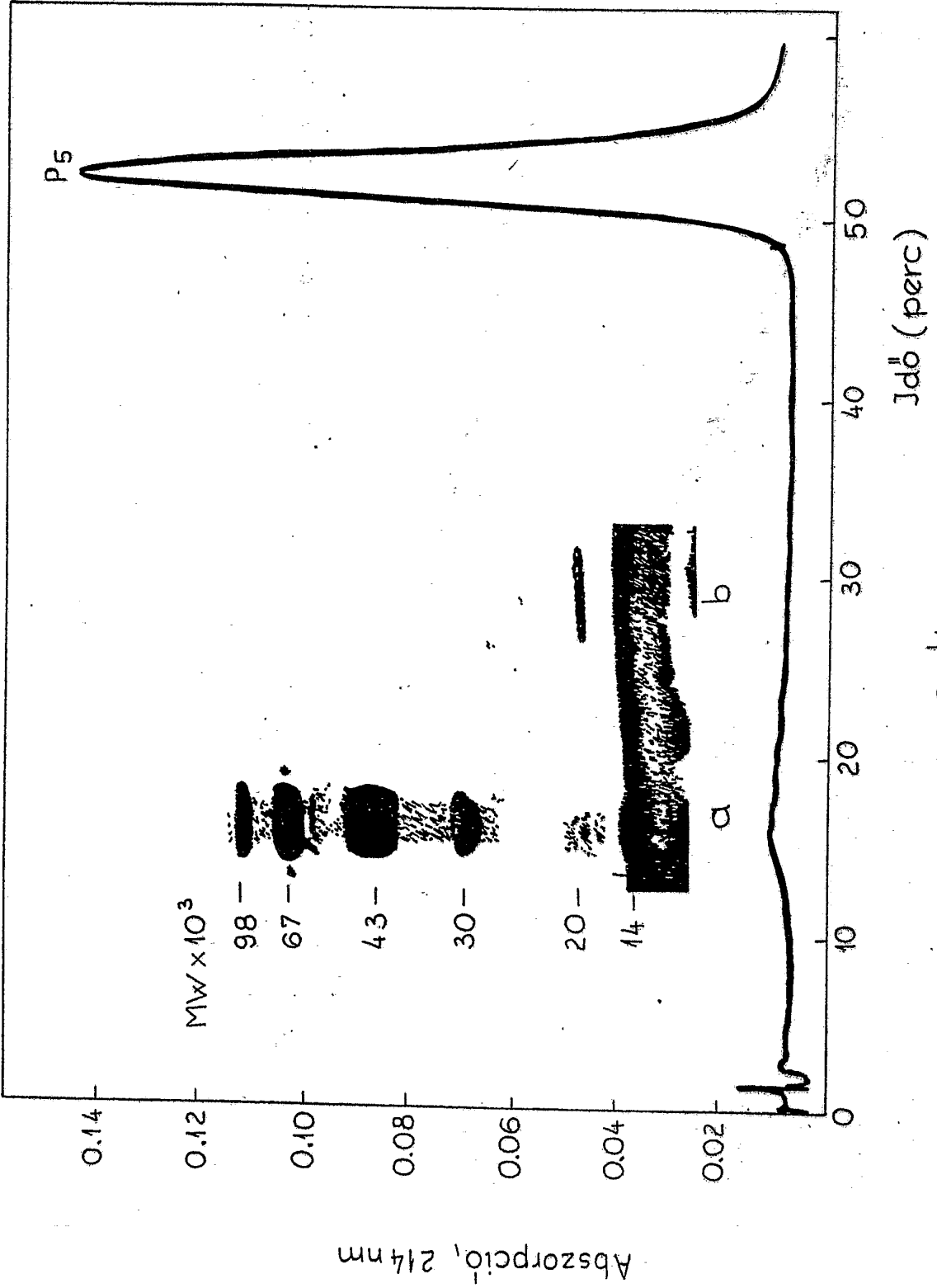


A frakció sorszáma

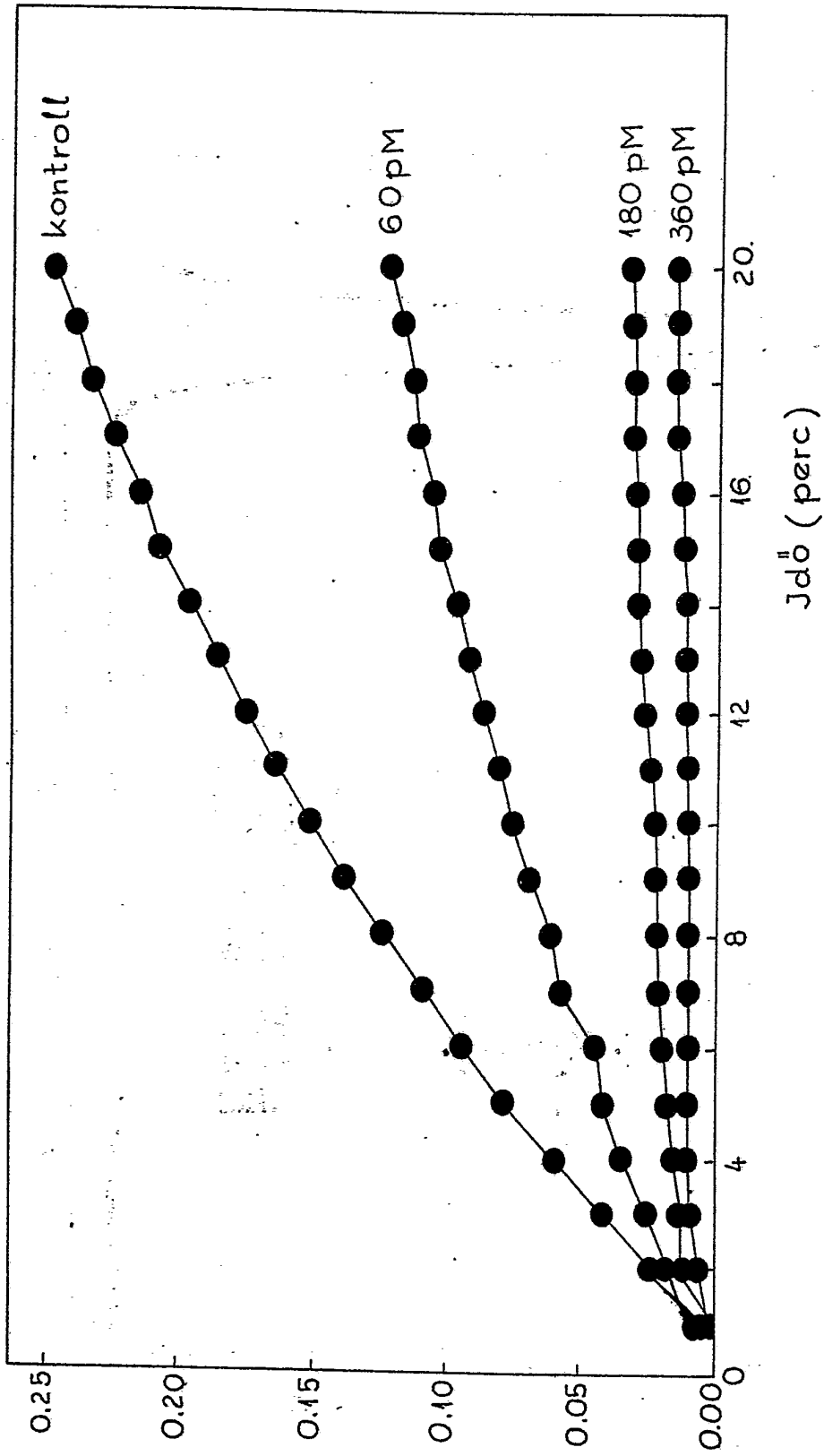
4. ábra



5. ábra



6. dbra



7. ábra

Abszorpció, 405 nm
Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
Felelős kiadó: dr. Szvoboda Gabriella