

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-3097

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :
C 12 N 9/68

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.05.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.05.2001 21.06.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/291968 2001/01115157**
(33) Země priority: **US EP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 6/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/005462**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/095019**

(71) Přihlašovatel:
OMRIX BIOPHARMACEUTICALS S.A., Rhode-St-Genése, BE

(72) Původce:
Nur Israel, Timorim, IL
Bar Liliana, Rehovot, IL
Azachi Malkit, Rehovot, IL

(74) Zástupce:
Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob odstranění plasmin(ogenu) z proteinových roztoků

(57) Anotace:
Způsob specifického odstranění nebo izolace plasmin(ogenu) nebo plasminu v přítomnosti fibrinogenu ze směsi obsahující plasminogen nebo plasmin uvedením směsi do kontaktu s rigidní aminokyselinou, ve které je aminoskupina aminokyseliny odsazena od karboxylové skupiny aminokyseliny o 0,6 nm až 0,8, výhodně o 0,7 nm tato rigidní aminokyselina je kovalentně navázána na nosič přes aminoskupinu aminokyseliny.

CZ 2003 - 3097 A3

Způsob odstranění plasmin(ogenu) z proteinových roztoků

Oblast techniky

Vynález se týká pryskyřice a způsobu pro specifické odstranění plasmin(ogenu) a jeho derivátů z proteinových roztoků, přičemž výsledný proteinový roztok lze použít pro intravenózní podání a pro lokální aplikace, tj. jako nosnou matrici pro dlouhodobé uvolňování a hojení ran, buď jako jedinou účinnou složku, nebo v kombinaci s dalšími farmaceuticky přijatelnými účinnými látkami. Odstranění plasmin(ogenu) by zajistilo integritu a funkci proteinového roztoku při delších inkubačních periodách. Vynález se rovněž týká výroby vysoce purifikovaného plasmin(ogenu) pro terapeutické použití.

Dosavadní stav techniky

Plasmin(ogen) nebo jeho aktivní molekula plasmin (dále jen plasmin(ogen)) velmi často kontaminuje proteinové roztoky, a zejména ty proteinové roztoky, které jsou extrahovány z tekutin nebo z orgánů živočichů. Přítomnost plasmin(ogenu) v proteinovém roztoku představuje několik hrozeb pro přijatelnost proteinového roztoku jako stabilního farmaceutického produktu, v důsledku známé proteolytické aktivity této molekuly na různé proteiny a peptidy na arginylpeptidových a lysylpeptidových vazbách (Weinstein M.J., Doolittle R.F. Differential specificities of the thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors RF Biochim. Biophys. Acta 1972; 258: str. 577 až 590 a Ling C.M.,

Summaria L., Robbins K.C.; Mechanism of formation of bovine plasmin(ogen) activator from human plasmin; J. Biol. chem. 1965; 240: str. 4212-B); a na bazických aminokyselinách, pro jeho stimulační aktivitu na různé tkáně, zejména na centrální nervovou tkáň a pro jeho roli při navázání (Chen Z.L., Strickland S., Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasminocatalyzed degradation; Liminin. Cell. 1997; 91: str. 917 až 925) a pravděpodobně při přenášení prionů v krvi savců (Fischer M.B., Roeckl C., Parizek P., Schwarz H.P., Aguzzi A. Binding of disease associated prion protein to plasmin(ogen); Nature 2000; 408: str. 479 až 483).

Pro purifikaci plasmin(ogenu) z proteinových roztoků, a tedy pro odstranění plasmin(ogenu) z proteinového roztoku, bylo vyvinuto několik chromatografických způsobů.

Tyto způsoby jsou v podstatě založeny na dvou principech. Podstatou první skupiny způsobů je několik po sobě jdoucích purifikačních kroků, které využívají různé rozpustnosti, isoelektrického bodu nebo distribuce molekulových hmotností (Alkjaerisig N.; The purification and properties of human plasmin(ogen); Biochem. J. 1963; 93: str. 171 až 182). Protože základním cílem těchto způsobů je purifikace plasmin(ogenu), dochází k tomu, že se při jejich provádění zcela zbortí původní složení proteinového roztoku. Druhá skupina způsobů je založena na jednostupňové afinitní purifikaci. Základem purifikace je navázání plasmin(ogenu) na různé syntetické ligandy na bázi ω -aminokarboxylové kyseliny, které se mohou vázat na lysinová vazebná místa na těžkém řetězci plasmin(ogenu). Tato místa, která sestávají z pěti struktur vzájemně propojených třemi disulfidickými můstky s vnitřní sekvenční homologií, známých jako tzv. plasmin(ogenové) „kringles“

(smyčky), které jsou umístěny na NH_2 plasmin(ogenovém) těžkém řetězci a daleko od katalytického místa umístěného na COOH lehkém řetězci, vážou fibrin(ogen). Další možností pro afinitní chromatografii je navázání plasmin(ogenu) přes katalytické místo, které je místem potenciálně méně specifického navázání, protože může vázat mnoho proteinů, jakými jsou například serinproteázy mající podobnou nebo nižší afinitu k arginylpeptidové a lysylpeptidové vazbě a bazickým aminokyselinám. Souhrnem lze vyvodit závěr, že obecně je plasmin(ogenová) afinitní chromatografie prováděna za použití ligandu, který je chemicky a iontově podobný ω -aminokarboxylové kyselině neboli substrátu plasminového katalytického místa. Ligand se naváže na pryskyřici přes odpovídající distanční člen neboli linker. Nicméně ideální afinitní pryskyřice pro odstranění plasmin(ogenu) není v podstatě stejnou pryskyřicí, o které se zjistilo, že je ideální pryskyřicí pro purifikaci plasmin(ogenu). Takové pryskyřice by měly obsahovat ligand, který váže plasmin(ogen) při vysoké afinitě a má velmi nízkou afinitu k ostatním proteinům, jakými jsou další serinproteázy, a zejména má velmi nízkou afinitu pro fibrinogen, který je hlavním proteinem v Cohnově frakci plasmy I nebo v kryoprecipitátu. Rovněž je důležité, že odstranění plasmin(ogenu) použitím dané afinitní chromatografie může být prováděno v širokém rozsahu pufrů a není omezeno pouze na určitý pufr, který může znamenat nebezpečí pro stabilitu a integritu proteinů v roztoku, přičemž cílem zájmu není plasmin(ogen), ale právě tyto proteiny.

Antifibrinolytická schopnost (schopnost inhibovat navázání plasmin(ogenu) na fibrinogen s vysokou afinitou) těchto ω -aminokarboxylových kyselin závisí na přítomnosti

volné aminoskupiny a karboxylové skupiny a na vzdálenosti mezi COOH-skupinou a atomy uhlíku, na které se váže NH₂-skupina (Markwardt 1978). Například, pokud jde o kyselinu ε-aminokapronovou (EACA) a p-aminobenzamidin (PAMBA), ukázalo porovnání antifibrinolytických aktivit EACA a PAMBA, že druhá jmenovaná je přibližně třikrát aktivnější. Shimura a kol. (1984) navrhl pryskyřici, ve které byl p-aminobenzamidin navázán na mikročástice hydrofilního vinylpolymeru přes část distančního členu (linkeru). Při použití této pryskyřice byl Shimura a kol. schopen separovat plasmin a plasmin(ogen) pomocí vysokovýkonné afinitní chromatografie. Skutečnost, že se plasmin(ogen) nemohl eluovat kyselinou 6-aminohexanovou a že do elučního pufru musela být zahrnuta 3M močovina, naznačila dvoumístnou interakci plasminu s tímto imobilizovaným ligandem, tj. s místy vážícími lysin na těžkém řetězci a s katalytickým místem na lehkém řetězci. To může vysvětlit zjištění dalších vědců, podle kterých p-aminobenzamidin odstraňuje rovněž některé další proteiny.

Pro afinitní purifikaci plasmin(ogenu) se vyrábí a používá další pryskyřice, kterou je lysinová pryskyřice. Nicméně antifibrinolytická schopnost lysinu je velmi nízká, a nízká je tedy i jeho vazebná afinita. Váže se rovněž na další proteiny a jeho specifita je závislá na pufru.

Moroz L.A., Gilmore N.J. Fibrinolysis in normal plasma and blood: evidence for significant mechanisms independent of the plasminogen-plasmin system, Blood 1976, 48, str. 531 až 545 popisuje přípravu plasmin(ogenu) prosté plasmy afinitní chromatografií. Pokud jde o použité způsoby, byly zveřejněny výsledky pozorování naznačující, že způsoby, které kulminují v generaci fibrinolytického enzymu plasmin, sehrávají nejvýše minimální úlohu při spontánní nebo

bazální fibrinolytické aktivitě měřitelné v normální lidské plasmě. Pro měření fibrinolytické aktivity se použila kyselina tranexamová společně s dalšími inhibitory proteáz, jakými jsou například inhibitory plasminu. Pro přípravu plasmin(ogenu) prosté plasmy se použil způsob Deutsch a Meltz, Science 170; str. 1095 až 1096, 1997.

Iwamoto v Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.), 1975, 33, str. 573 popisuje specifické navázání kyseliny tranexamové na plasmin. Přesto, že je kyselina tranexamová identifikována jako účinný ligand plasminu, se ukazuje, že antifibrinolytický účinek kyseliny tranexamové je výsledkem nejen navázání na plasmin(ogen), ale rovněž zesílení kooperace přírodních antiplasminů. Z toho plyne závěr, že navázání kyseliny tranexamové na pevný nosič odstraní z plasmy kromě plasmin(ogenu) i přírodní antiplasminy. Rovněž by se dalo usuzovat, že tranexamové kyseliny mohou způsobovat tvorbu agregátů (konglomerátů) s inhibitory plasminu. Tento postřeh je založen na diskrepanci, kterou lze odhalit, pokud se porovná antifibrinolytická aktivita kyseliny ϵ -aminokapronové a kyseliny tranexamové vedoucí k 98% a 91% inhibici v urokinázou stimulované plasmě vs. plasmě, kterou byla heparinizovaná orální krev (65 % a 39 % pro kyselinu ϵ -aminokapronovou, resp. kyselinu tranexamovou - srovnávací tabulky 2 a 7 v odkazu Moroz a kol.). Dalo by se očekávat, že díky svému vysokému vazebnému poměru budou kyselina tranexamová a kyselina ϵ -aminokapronová dobrými kandidáty pro vysoce afinitní ligandy. Nicméně rovněž by se dalo očekávat, že tyto ligandy budou blokovat afinitní kolonu v důsledku navázání komplexů plasminu a inhibitoru plasminu.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 znázorňuje gradientovou gelovou SDS-PAGE (5% až 12% polyakrylamid) 7 µg proteinů eluovaných dvěma způsoby (popsanými v odstavci „Materiál a metoda“) se třemi různými pryskyřicemi: TEA-sefaróza, Lys-Ceramic Hyper DF a Lys-sefaróza 4B. Pásky: 1 - Glu plasminogen; 2 - fibrinogen; 3 - albumin; 4 - imunoglobulin G; 5 - molekulový hmotn. marker; eluční píky: 6 - TEA za použití metody 1; 7 - TAE za použití metody 2; 8 - lysin-Ceramic Hyper D za použití metody 1; 9 - lysin-sefaróza za použití metody 1; 10 - lysin-Ceramic Hyper D za použití metody 1; 11 - lysin-sefaróza za použití metody 1.

Podstata vynálezu

Vynález je založen na zjištění, že je rigidní aminokyselina schopna specificky vázat plasmin(ogen). Výrazem „specifické navázání“ se v kontextu popisu přihlášky vynálezu rozumí, že se ze směsi obsahující proteiny, jakými jsou například plasmin(ogen) a fibrinogen, odstraní v podstatě pouze plasmin(ogen), zatímco fibrinogen zůstane ve směsi téměř nedotčen. Výhodně se odstraní alespoň 85 % až 99 % plasmin(ogenu) a alespoň 85 % fibrinogenu zůstane ve směsi. Výhodněji se odstraní alespoň 98,0 % až 99,9 % plasmin(ogenu) neboli ve směsi zůstane 95 % až 99 % fibrinogenu.

Aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny jsou od sebe odsazeny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm, a rigidní aminokyselina je kovalentně navázána na nosič přes aminoskupinu aminokyseliny. Jako zvláště výhodná se jeví kyselina tranexamová ve své trans

konfiguraci a kyselina 4-aminomethylbicyklo[2.2.2.]oktan-1-karboxylová (EMBOCA).

Překvapivě se zjistilo, že kyselina ϵ -aminokapronová nefunguje tak dobře jako kyselina tranexamová a že potom, co se kyselina tranexamová naváže na pevný povrch, ztrácí veškerou svou mimoplasmin(ogenovou) vazebnou kapacitu (takzvaná kooperace) a pryskyřice odstraní z plasmy nebo produktů plasmy pouze plasmin(ogen). I po navázání na kolonu si kyselina ϵ -aminokapronová zachová svou mimoplasmin(ogenovou) aktivitu a stále na sebe váže fibrinogen a další proteiny přítomné v plasmě, zatímco mimoplasmin(ogenová) aktivita kyseliny tranexamové podle vynálezu je zcela eliminována. Nicméně afinita pryskyřice na bázi kyseliny tranexamové ku plasmin(ogenu) není nikterak ovlivněna.

Rigidní aminokyselina je přichycena ke vhodnému distančnímu členu, v podstatě delšímu než 3 atomy uhlíku, a nosič a afinitní materiál tedy mohou odstranit plasmin(ogen) ze směsi obsahující proteiny bez další změny složení proteinového roztoku. Odstranění lze realizovat v přítomnosti různých pufrů. Způsob podle vynálezu je rovněž vhodný pro výrobu čistých frakcí plasmin(ogenu) po eluci z afinitního nosiče.

Vynález se týká způsobu specifického odstranění nebo izolace plasmin(ogenu) v přítomnosti fibrinogenu ze směsi obsahující plasmin(ogen), přičemž tento způsob spočívá v uvedení směsi do kontaktu s rigidní aminokyselinou, přičemž aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny jsou od sebe vzdáleny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně

přibližně o 7 nm, a rigidní aminokyselina je kovalentně navázána na nosič přes aminoskupinu aminokyseliny.

Výhodně se směs u způsobu podle vynálezu zvolí z množiny sestávající z tělesných tekutin, jakými jsou například krev, krevní frakce, kryoprecipitát, buněčné kultury, extrakty zvířecích tkání, například bovinní plíce, bovinní střevo nebo želatina z extraktů zvířecích kostí, albumin bovinního séra, a stejně tak živočišné s vodou nemísitelné tuky, jako například lanolin (PC-fosfatidylcholin).

Způsob podle vynálezu lze použít pro získání vysoce purifikovaného plasmin(ogenu) z příslušných směsí. Po uvedení směsi do kontaktu, například s chromatografickým materiálem, na který je navázána rigidní aminokyselina, lze plasmin(ogen) eluovat z pevného afinitního materiálu. Rovněž zde lze použít takzvané principy extrakce pevné fáze. Plasmin(ogen) lze eluovat roztokem obsahujícím ligand, který konkuruje vazebným místům rigidní aminokyseliny, například kyseliny tranexamové v proteinu plasmin(ogenu). Těmito ligandy jsou zpravidla ϵ -aminokyseliny, výhodně lysin. Lysin lze například použít v koncentracích 0,85 % hmotn. až 0,99 % hmotn. Možné jsou i další koncentrace, zejména pokud je iontová síla elučního média vyvážená dalšími přísadami, například elektrolyty.

Eluci plasmin(ogenu) z pevné fáze lze provádět za absence elučního pufru způsobem, který extrahuje pufové složky, například dialýzou. Plasmin(ogen), který lze získat způsobem podle vynálezu, je charakteristický velmi vysokou čistotou. Tato jedinečná vlastnost je zřejmá z následujících údajů.

Souhrnná tabulka 1: Srovnání specifické aktivity, purifikačního faktoru a izolace plasmin(ogenu) z kryo-deficitní FFP plasmy za použití výhodného zatížení a elučních podmínek pro každou z pryskyřic

Použitá pryskyřice	Metoda	Specifická aktivita (mg plasmin(ogenu) /mg proteinu)	Purifikační faktor	Izolace
TEA-sefaróza 4B	2	0,794	567	91,6
Lysin-Ceramic Hyper DF	2	0,444	444	10,9
Lysin-sefaróza 4B	1	0,121	101	11,6

Souhrnná tabulka 2: Srovnání odstranění plasmin(ogenu) z kryo-deficitní FFP plasmy za použití výhodných podmínek zatížení pro každou pryskyřici

Použitá pryskyřice	Metoda	Odstranění (%)
TEA-sefaróza 4B	1 a 2*	99,5
Lysin-Ceramic Hyper DF	1	54,6
Lysin-sefaróza 4B	1	58,0

*Oba způsoby jsou identické a zahrnují sbírku nenavázaného píku

Jak je patrné ze souhrnné tabulky, pokud se použily komerčně dostupné pryskyřice s imobilizovanými lysinovými ligandy a TEA pryskyřice za optimalizovaných chromatografických podmínek, potom byla izolace a specifická aktivita plasmin(ogenu) vyšší v případě TEA pryskyřice (souhrnná tabulka 1). Za zmínku rovněž stojí zjištění, že TEA pryskyřice je mnohem účinnější při odstraňování plasmin(ogenu) (jak naznačil test v případě Glu-plasmin(ogenu)) z kryo-deficitní plasmy, než lysinová pryskyřice (souhrnná tabulka 2).

Čistota eluátů byla testována pomocí SDS-gelové elektroforézy. Eluáty tří různých pryskyřic (TEA-sefaróza, Lys-Ceramic Hyper DF a Lys-sefaróza 4B) se podrobily SDS-PAG při zatížení a 5% až 12% gradientem akrylamidu a při zatížení 7 μ g proteinu na pás. Výsledný gel zabarvený Coomassie modří je znázorněn na obr. 1.

Obr. 1 znázorňuje gradientovou gelovou SDS-PAGE (5% až 12% polyakrylamid) 7 μ g proteinů eluovaných dvěma způsoby (popsanými v odstavci „Materiál a metoda“) se třemi různými pryskyřicemi: TEA-sefaróza, Lys-Ceramic Hyper DF a Lys-sefaróza 4B. Pásky: 1 - Glu-plasminogen; 2 - fibrinogen; 3 - albumin; 4 - imunoglobulin G; 5 - molekulový hmotn. marker; eluční píky: 6 - TEA za použití metody 1; 7 - TAE za použití metody 2; 8 - lysin-Ceramic Hyper D za použití metody 1; 9 - lysin-sefaróza za použití metody 1; 10 - lysin-Ceramic Hyper D za použití metody 1; 11 - lysin-sefaróza za použití metody 1.

Výsledné proteinové pásky a čistota produktu dobře korelují se specifickou aktivitou plasmin(ogenu), jak naznačuje souhrnná tabulka 1. Z toho vyplývá, že použití TEA-sefarózové pryskyřice vede k získání vysoce purifikovaného plasmin(ogenu) pouze s minimální kontaminací albuminem. Zdá se, že pro použití tohoto produktu pro klinické indikace není potřebná žádná další purifikace.

Předmětem vynálezu je rovněž přípravek obsahující plasmin(ogen).

Předmětem vynálezu je dále nosič mající na sobě kovalentně navázanu rigidní aminokyselinu, přičemž amino-skupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny jsou od sebe vzdáleny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm.

Nosičem pro provádění způsobu podle vynálezu je výhodně chromatografický materiál, který je schopen vázat rigidní aminokyselinu, kde jsou aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny od sebe vzdáleny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm. Vzdálenost mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou je udržována v podstatě konstantní rigidní konstitucí aminokyseliny. Rigiditu aminokyseliny lze generovat alicyklickými kruhy, výhodně cyklohexanovým kruhem, kde jsou aminoskupina a karboxylová skupina uspořádány v 1,4-poloze alicyklického kruhu. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají aromatické systémy, například substituované benzoové kyseliny nebo anilinem substituovaná kyselina octová.

Podle vynálezu má na sobě nosič výhodně navázány aminokyseliny zvolené z množiny sestávající z kyseliny tranexamové a EMBOCA.

Chromatografickým materiálem, který lze použít v rámci způsobu podle vynálezu, je například hydrofilní materiál, jakým je například agaróza, celulóza, sklo s řízenou velikostí pórů, silikagely, dextrany nebo organický uměle připravený polymer, například na bázi polyakrylamidů polystyrenů. Typické materiály jsou komerčně dostupné pod obchodními označeními Sephacryl (Pharmacia, Švédsko), Ultragel (Biosepara, Francie), TSK-Gel Toyopearl (Toso Corp., Japonsko), HEMA (Alltech Ass. (Deerfield, Il, USA), Eupergit (Rohm Pharma, Darmstadt, Německo). Rovněž lze použít materiály na bázi azlaktonů (3M, St. Paul, Minn, USA). Zvláště výhodným materiálem je agaróza nebo sefaróza. Tyto materiály jsou komerčně dostupné, například od společnosti Sigma, St. Louis.

U výhodného provedení se způsob podle vynálezu provádí za použití částicového chromatografického materiálu nebo materiálu, který má formu monolitického bloku. Částicový materiál lze suspendovat ve vhodném médiu a výslednou suspenzi lze použít například v chromatografické koloně. Nicméně způsob podle vynálezu lze rovněž provádět ve vsázce. Dále lze použít polymery ve formě částicového materiálu nebo rovněž ve formě membrán.

Kyselina tranexamová je vázána na nosič výhodně přes linker, zejména bifunkční linker, mezi nosičem a kyselinou tranexamovou. Pokud se použije bifunkční linker, potom může být zvolen z množiny sestávající z nosiče aktivovaného N-hydroxysukcinimidem, DAPA, CNBr, epoxy, diaminodipropylaminem (DADPA), 1,6-di-aminohexanem, kyselinou sukcinovou, 1,3-diamino-2-propanolem, ethylendiaminem (EDA), TNB, pyridyldisulfidem, jodacetamidem, maleimidem nebo jejich kombinací.

Nosič pro provádění způsobu podle vynálezu je výhodně modifikován zbytkem, který reaguje s primární nebo sekundární aminoskupinou.

Podle způsobu podle vynálezu se směs inkubuje s nosičem po dostatečnou časovou periodu a po uvedení směsi do kontaktu s nosičem, na kterém je navázána kyselina tranexamová, eluuje neutrálním vodným roztokem obsahujícím sodné soli, vápenaté soli a pufové soli. Následně lze plasmin nebo plasmin(ogen) eluovat vodným roztokem obsahujícím dostatečné množství lysinu nebo jeho ekvivalentu, který konkuruje kovalentně navázané kyselině tranexamové.

Předmětem vynálezu je směs odvozená z přírodních zdrojů, která je v podstatě prostá plasmin(ogenu) a plasminu.

Směsí podle vynálezu je zejména krev, krevní derivát nebo krevní frakce a kryoprecipitát.

Krevním derivátem podle vynálezu je zejména z plasmy odvozený faktor srážlivosti krve nebo směs faktorů srážlivosti krve, jakými jsou například FVIII, FIX, fibrinogen, fibronectin, α_1 -antitrypsin, antithrombin III, von Willebrandův faktor, albumin, imunoglobulin.

Předmětem vynálezu je dále nosič mající na sobě kovalentně navázanou kyselinu tranexamovou. Nosičem podle vynálezu je výhodně chromatografický materiál, výhodněji hydrofilní chromatografický materiál, jakým jsou například dextransy nebo výše zmíněný organický uměle připravený polymer. Zvláště výhodným nosičem jsou agaróza nebo sefaróza, na kterých je navázána kyselina tranexamová.

Chromatografický materiál, který tvoří nosič, může mít formu částicového materiálu nebo monolitického bloku. Druhý jmenovaný je popsán v Hermanson G.T., Mallia A.K. a Smith P.K. 1992 „Immobilization Affinity Ligand Techniques“ str. 454, Academic Press, Inc. San Diego, USA, jehož obsah je zde uveden formou odkazu.

U dalšího výhodného provedení podle vynálezu je kyselina tranexamová vázána na nosič přes linker mezi nosičem a kyselinou tranexamovou. Je výhodné, pokud nosič nemá funkční skupiny, které jsou schopné kovalentně vázat kyselinu tranexamovou. Potom se nosič nejprve funkcionalizuje a následně uvede do reakce s linkerem, který je schopen vázat kyselinu tranexamovou. Ramena neboli

řetězce distančního členu jsou molekulami s nízkou molekulovou hmotností, které se použijí jako vmezežené linkery mezi nosičem nebo matricí a afinitním ligandem, kterým je podle vynálezu aminokyselina mající rigidní strukturu, přičemž aminoskupina je o 0,6 nm až 0,7 nm odsazena od karboxylové skupiny. Pro snadné navázání na ligand a nosič obsahují distanční členy výhodně dvě funkční skupiny na obou koncích. Distančním členem je zpravidla uhlovodíková sloučenina mající na svých koncích dvě funkční skupiny. Jeden ze dvou konců se kovalentně naváže za použití konvenčních nebo o sobě známých reakcí na matrici. Druhý konec se kovalentně naváže na ligand za použití dalšího vazebného postupu.

Výhodně je linkerem bifunkční linker, jakým je například nosič aktivovaný *N*-hydroxysukcinimidem, DAPA, CNBr, epoxy, diaminodipropylaminem (DADPA), 1,6-diaminohexanem, kyselinou sukcinovou, 1,3-diamino-2-propanolem, ethylendiaminem (EDA), TNB, pyridyldisulfidem, jodacetamidem, maleimidem nebo jejich kombinací.

Vzhledem ke komerční dostupnosti celé řady funkcionalizovaných nosičů může být výhodné použít jako výchozí produkt nosič, který je modifikován zbytkem, který reaguje s primárními nebo sekundárními aminoskupinami.

Způsob podle vynálezu je dále podrobněji popsán na příkladech přípravy v podstatě plasmin(ogenu) prostého kryoprecipitátu, který může být výchozím materiálem pro celou řadu produktů odvozených z krve.

Kryoprecipitát se podrobí afinitní chromatografii s imobilizovaným ligandem, čímž se získá adsorbovaná frakce a

neadsorbovaná frakce. Látka, kterou lze eluovat z adsorbované frakce, je plasmin(ogen).

Imobilizovaným ligandem může být libovolný analog, který může reagovat s lysinovými vazebnými místy plasmin(ogenu). Způsob přípravy imobilizovaných ligandů, které lze použít podle vynálezu, bude popsán níže. Následující příklady mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Imobilizace různých ligandů na bázi ϵ -aminokarboxylové kyseliny

Za účelem hodnocení odstraňování plasmin(ogenu) z roztoků odvozených z plasmy byla buď připravena, nebo zakoupena řada ligandů (pokud jsou komerčně dostupné) na bázi ϵ -aminokarboxylové kyseliny v kombinaci s různými distančními členy v několika pryskyřicích. Následující tabulka sumarizuje všechny studované kombinace (čísla pod pryskyřicemi se týkají odstavce, ve kterém je syntéza konkrétní kombinace popsána).

Tabulka 1

Ligand Linker	p-Benzamidin	Arginin	Kyselina tranexamová	Kyselina ϵ -amino- hexanová	Lysin
Kyselina N-hydroxy- sukcinová				Sefaróza 4B (1)	
DADPA	Agaróza 4 % (2)	Agaróza 4 % (3)	Agaróza 4 % (4)		
CNEr		Sefaróza 4B (5)	Sefaróza 4B (6)		
Epoxy	Sefaróza 6B (10)	Sefaróza 6B (7)	Sefaróza 6B (8)		Ceramic Hyper DF (9)

1) N-Hydroxysukcinimidester kyseliny ϵ -aminohexanové sefaróza 4B se zakoupila u společnosti Sigma.

2) Výroba p-aminobenzamidinu agarózy 4 %

Následující postup se použil pro imobilizaci diaminodipropylaminu (DADPA) na agaróze 4 % (Pierce), reakce se prováděla na gelu aminem zakončeného distančního členu, který se následně modifikoval anhydridem.

25 ml DADPA-Agarózového gelu se propláchno purifikovanou vodou a následně se gel suspendoval ve stejném objemu purifikované vody. Suspenzní směs se pozvolna míchala 1 h při teplotě místnosti a během této doby se přidalo 2,5 g anhydridu kyseliny sukcinové. Na konci míchání se sukcinovaný gel postupně propláchl purifikovanou vodou, 1M NaCl a opět purifikovanou vodou, s cílem odstranit přebytek nezreagované kyseliny sukcinové.

Negativní test s TNBS (Sigma) naznačil, že veškeré aminy DADPA byly úspěšně blokovány kyselinou sukcinovou.

Imobilizovaný sukcinilovaný DADPA se propláchl 250 ml purifikované vody, potom se přebytek vody odsál a mokrá koláč se přemístil do 500ml kádinky. Gel se resuspendoval ve 25 ml 0,1M MES pufru s pH hodnotou 4,7 a zatímco se pozvolna míchal, přidalo se 0,25 g *p*-aminobenzamidinu (Sigma) a 0,75 g EDC (Pierce). Po dobu 1 h se pH hodnota reakční směsi udržovala na 4,7 kontinuálním přidáváním 0,5M NaOH. Reakční směs se následně nechala stát přes noc při teplotě místnosti a za kontinuálního pomalého míchání.

Gel se postupně propláchl 0,5 l každé z následujících látek: purifikovanou vodou, 0,1M octanem sodným s hodnotou pH 4,7, 0,5M hydrogenuhličitanem sodným a purifikovanou vodou.

Imobilizovaný *p*-aminobenzamidin se skladoval až do následného použití v 0,02% azidu sodném při 4 °C.

3) Arginin-agaróza 4 %

Syntéza arginin-agarózy 4 % se výhodně prováděla výše popsaným postupem pro přípravu *p*-aminobenzamidin-agarózy 4 % (viz 2)).

4) Kyselina tranexamová (TEA)-agaróza 4 %

Syntéza kyseliny tranexamové (TEA)-agarózy 4 % se výhodně prováděla výše popsaným postupem pro přípravu *p*-aminobenzamidin-agarózy 4 % (viz 2).

5) Arginin-sefaróza 4B

Pro imobilizaci argininu nebo kyseliny tranexamové na CNBr-sefaróze 4B (Pharmacia) jako distančním gelu se použil následující postup. Syntézy dvou ligandů při dvou různých koncentracích (10 mmol/ml nebo 0,01 mmol/ml suchého gelu) byly podobné, jak je zmíněno v tomto a následujícím odstavci (5 a 6).

2,5 g CNBr-Aktivované sefarózy 4B se suspendovalo v 50 ml 1mM HCl. Gel se nechal 10 min bobtnat při teplotě místnosti a potom se 15 min proplachoval 500 ml 1mM HCl na skleněné fritě.

Arginin se rozpustil ve 12,5 ml vazebného pufru, 0,1M NaHCO₃ s pH hodnotou 8,3, který obsahoval 0,5M NaCl. Vazebný roztok obsahující ligand se v umělohmotné zkumavce smísil s gelem a tato zkumavka se následně udržovala přes noc při 4 °C za současného protřepávání nakláněním.

Na konci inkubace se z této směsi vypláchl přebytek ligandu desetinasobným objemem vazebného pufru, vztaženo k objemu gelu, přes skleněnou fritu. Proteinový roztok se ve třech cyklech propláchl 50 ml pufru při střídajících se pH hodnotách (0,1M acetátový pufr s pH hodnotou 4 obsahující 0,5M NaCl a následně 0,1M Tris-HCl pufr s pH hodnotou 8 obsahující 0,5M NaCl). Imobilizovaná arginin-sefaróza 4B se skladovala až do následného použití v 0,02% azidu sodném při 4 °C.

6) Kyselina tranexamová (TEA)-sefaróza 4B

Tato syntéza se prováděla výše popsáním postupem pro arginin-sefarózu 4B (viz odstavec 5).

7) Arginin-sefaróza 6B

Arginin se ve dvou různých koncentracích (2 mmol nebo 0,2 mmol/ml suchého gelu) navázal na komerčně dostupnou imobilizovanou epoxy-sefarózou 6B (Pharmacia) následujícím postupem:

2,5 g Epoxy-aktivované sefarózy 6B se suspendovalo ve 200 ml purifikované vody. Gel se nechal přibližně 5 min bobtnat při teplotě místnosti a následně se 1 h proplachoval 500 ml purifikované vody přidávané v alikvotních podílech přes skleněnou fritu.

20 ml Vazebného pufru (0,1M NaHCO₃ s pH hodnotou 9,3 a 0,5M NaCl) a zbobtnalý gel se nalilo do dvou zkumavek obsahujících arginin. Směsi se mísily v umělohmotné zkumavce přes noc při teplot místnosti.

Na konci inkubace se ze směsi vypláchl přebytek ligandu pětinasobným objemem vazebného činidla, vztaženo k objemu gelu, přes skleněnou fritu. Produkt se propláchl ve třech cyklech s měnicí se pH hodnotou (0,1M acetátový pufr s pH hodnotou 4,0 a 0,5M NaC pufr a následný průplach 0,1M Tris-HCl pufrem s pH hodnotou 8 a 0,5M NaCl). Imobilizovaná arginin-sefaróza 6B se skladovala až do následného použití v 0,02% azidu sodném při 4 °C.

8) Kyselina tranexamová (TEA)-sefaróza 6B

Tato syntéza se výhodně prováděla výše popsáním postupem pro arginin-sefarózu 6B (viz odstavec 7).

9) L-Lysin epoxy-aktivovaný Ceramic Hyper DF Hydrogel se zakoupil od společnosti Sigma.

10) p-Aminobenzamidin kovalentně navázaný na sefaróze 6B se zakoupil od společnosti Pharmacia.

Příklad 2

Sledování různých pryskyřic použitých při afinitní chromatografii při odstraňování plasmin(ogenu)

Pro následující studii se použil kryoprecipitát lidské plasmy obsahující 1 IU/ml plasmin(ogenu) a 50 mg/ml fibrinogenu.

Alikvotní podíly zamrazeného kryoprecipitátu se nechaly roztát při 37 °C a dialyzovaly proti pufru BN1 (0,12 M NaCl, 10 mM Tri Na-citrát, 1 mM CaCl₂ při pH hodnotě 7,0). Tento proteinový roztok se přefiltroval přes filtr mající hloubku 5 µm, čímž se získal čistý roztok. 5ml Válec injekční stříkačky o průměru 8,36 mm se naplnil 1,5 ml (objem za mokra) následujících afinitních pryskyřic popsaných v příkladu 1: imobilizovaná kyselina ε-amino-hexanová (sefaróza 4B využívající CNBr jako distanční člen), imobilizovaný p-aminobenzamidin/arginin/TEA (agaróza 4 % používající DADPA jako distanční člen), imobilizovaný arginin/TEA (sefaróza 4B používající CNBr jako distanční člen), imobilizovaný arginin/TEA (sefaróza 6B používající epoxy jako distanční člen) a imobilizovaný L-lysin (Ceramic Hyper DF Hydrogel používající epoxy jako distanční člen). Gelová náplň se optimalizovala následujícím postupem: gelová náplň se propláchla čtyřmi objemy i) purifikované

vody, ii) 1 M NaCl, iii) purifikované vody, iv) TLN 0,1 pufru (Tris 0,05 M lysin 0,02 M, 0,1 M NaCl, pH hodnota 9,0), v) TLN 1 pufru (Tris 0,05 M, lysin 0,02 M a 1 M NaCl, pH 9,0) a vi) purifikované vody. Všechny vzorky, koncentrace a průplachové pufrы se aplikovaly na válec stříkačky po 1 min odstředování při frekvenci otáčení 1000 min^{-1} při $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Vyvážení se provedlo čtyřmi objemy BN1 a předfiltrovaný zahuštěný kryoprecipitát se nanese na pryskyřici (2:1 obj./obj.) a tato směs se potom 1 h inkubovala při teplotě místnosti. Alikvotní podíly nenavázaných „spin“ průplachů se po každém odstředování shromažďovaly v umělohmotných zkumavkách. Pryskyřice se propláchla alespoň 13 objemy kolony BN1 pufru až do dosažení O.D_{280} 0,02. Eluce plasmin(ogenu) se prováděla za použití TLN 1 pufru a následným propláchnutím čtyřmi objemy vrstvy 3 M NaCl. Minikolony se těsně uzavřely a skladovaly při $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pryskyřice, které během procesu degradovaly nebo které odstranily méně než 50 % plasmin(ogenu), se ze studie brzy vyloučily. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Odstranění plasmin(ogenu) v navázaném materiálu využívajícím různé imobilizované ligandy BN1 puřrem

Imobilizované ligandy	Odstranění plasmin(ogenu) (%)
Kyselina ϵ -aminohexanová využívající CNBr jako distanční člen	13,36
p-Aminobenzamidin využívající DADPA jako distanční člen	Žádné (kolona byla ucpaná)
p-Aminobenzamidin využívající epoxy jako distanční člen	19,78
Arginin využívající DADPA jako distanční člen	6,04*
TEA (vysoká konc.) využívající CNBr jako distanční člen	0
TEA (nízká konc.) využívající CNBr jako distanční člen	0
Arginin (nízká konc.) využívající CNBr jako distanční člen	23,25
Arginin (nízká konc.) využívající epoxy jako distanční člen	0
Arginin (vysoká konc.) využívající epoxy jako distanční člen	5,61

* Tento údaj je průměrnou hodnotou tří měření

Výše uvedená tabulka ukazuje, že nejlepší ligandy pro odstranění plasmin(ogenu) z kryoprecipitátu obsahovaly afinitní gely, které byly dostatečně objemné proto, aby odolaly sledu nanesení, průplachů a eluce bez zborcení nebo gely, které zachytily více než 50 % použitého fibrinogenu.

Tabulka 3 ukazuje jak účinnost různých typů gelů při odstraňování plasmin(ogenu), tak jejich účinnost při zachycení fibrinogenu v zahuštěném kryoprecipitátu.

Reziduální plasmin(ogen) přítomný v kryoprecipitátu se adsorboval pryskyřicemi, zatímco fibrinogen nikoliv, a tak se získal výsledný supernatant v podstatě prostý plasmin(ogenu).

Obsah fibrinogenu se měřil testem doby srážlivosti, zatímco obsah plasmin(ogenu) se měřil chromogenním testem.

Vypočtená množství plasmin(ogenu) a fibrinogenu izolovaná z lysinových gelů sloužila jako zlatý standard pro všechny další použité gelové ligandy. Výsledky obsažené v tabulce 2 naznačují, že pouze TEA ligandy s epoxy distančním členem poskytly vynikající výsledky při odstraňování plasmin(ogenu) a při izolaci fibrinogenu (viz tabulka 3).

Vysoká koncentrace imobilizované TEA poskytla vynikající výsledky při odstranění plasmin(ogenu) a podobně dobré výsledky při izolaci fibrinogenu jako ligand navázaný na lysin: 89 % vs. 92 % pro izolaci fibrinogenu a 89 % vs. 56 % pro odstranění plasmin(ogenu). Účinnost všech ostatních pryskyřic, jak při odstraňování plasmin(ogenu) tak při izolaci fibrinogenu byla mnohem nižší.

Tabulka 3: Souhrn dat získaných pro izolaci fibrinogenu a odstranění plasmin(ogenu) v navázaném materiálu používajícím různé imobilizované ligandy BN1 puřrem

Imobilizované ligandy	Odstranění plasmin(ogenu) (%)	Izolace fibrinogenu (%)
Lysin používající epoxý jako distanční člen	56*	92*
TEA používající DADP jako distanční člen	49	84
TEA (nizká konc.) používající epoxý jako distanční člen	44,35	88,62
TEA (vysoká konc.) používající epoxý jako distanční člen	89	89
Arginin (vysoká konc.) používající CNBr jako distanční člen	91,26	49

* Tato hodnota je průměrem tří měření

Příklad 3

Vliv puřrového fosfátu a BNI na profil afinitní chromatografie lysinem a TEA-imobilizované pryskyřice

Kryoprecipitát se ošetřil hydroxidem hlinitým s cílem adsorbovat faktory srážlivosti závislé na vitaminu K a následně se 4 h inkuboval se směsí detergentních rozpouštědel (SD-1 % Tri (n-butyl)fosfát, 1 % Triton X-100) při 30 °C, čímž se inaktivovaly viry s lipidovou obálkou. SD Reakční činidla se odstranila extrakcí ricinovým olejem a hydrofobní interakční chromatografií a přípravek se následně pasterizoval (10 h při 60 °C) v přítomnosti sacharózy a glycinu jako stabilizátorů.

Po pasterizaci se sacharóza a glycin odstranily diafiltrací. Před sterilní filtrací se přidala kyselina tranexamová (TEA) a arginin hydrochlorid jako stabilizační činidla. Alikvotní podíly stabilizovaného produktu se udržovaly až do svého použití při $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Alikvotní podíly zamrazeného virově inaktivovaného kryoprecipitátu se nechaly roztát při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dialyzovaly proti pufru BN1 (pufr byl tvořen $0,12\text{ M NaCl}$, $0,01\text{ M Tri Na-citrát}$, 1 mM CaCl_2 při pH hodnotě $7,0$) nebo alternativně proti 25 mM fosfátového pufru. Druhý zmiňovaný roztok se přefiltroval přes filtr s hloubkou $5\text{ }\mu\text{m}$ a poskytl čirý roztok.

Kolona o průměru 10 mm (Biorad, USA) se naplnila 6 ml (objem za mokra) imobilizované TEA (TEA sefaróza 6B) nebo imobilizovaného lysinu (Ceramic Hyper DF/sefaróza 4B) a propláchla čtyřmi objemy každého z následujících roztoků v daném pořadí: i) purifikovaná voda, ii) 1 M NaCl , iii) purifikovaná voda, iv) TLN $0,1$ pufr ($0,1\text{ M NaCl}$, lysin $0,02\text{ M}$, Tris $0,05\text{ M}$ při pH hodnotě $9,0$), v) TLN 1 pufr (1 M NaCl , lysin $0,02\text{ M}$, Tris $0,05\text{ M}$ při pH hodnotě 9) a vi) purifikovaná voda. Rovnováhy se dosáhlo použitím čtyř objemů BN1 nebo alternativně fosfátového pufru. Přefiltrovaný kryoprecipitát se zaváděl do kolony rychlostí $100\text{ }\mu\text{l/min}$.

Vzorky nenavázaného materiálu se jímaly do umělohmotných zkumavek a pryskyřice se propláchla 16 objemy kolony BN1 pufru nebo fosfátového pufru. Eluce plasmin(ogenu) se prováděla za použití TLN 1 pufru a za následného propláchnutí čtyřmi objemy 3 M roztoku NaCl , čtyřmi objemy purifikované vody a čtyřmi objemy 25% roztoku ethanolu obohaceného 1 M NaCl .

Tabulka 4 ilustruje účinnost při odstraňování plasmin(ogenu) různými druhy pryskyřic a účinnost při izolaci fibrinogenu. Obsah fibrinogenu se měřil testem doby srážlivosti (Claussův test), zatímco obsah plasmin(ogenu) se měřil chromogenním testem.

Porovnání různých pryskyřic naznačilo, že pokud se použije BN1 pufr, potom dochází k zachycení 95,4 % až 96,4 % obsahu fibrinogenu v nenavázaném píku. Naopak, pokud se použije fosfátový pufr, potom je množství izolovaného fibrinogenu nízké. Překvapivě se zjistilo, že pouze imobilizovaná TEA pryskyřice umožňuje jak vysoké odstranění plasmin(ogenu), tak vysokou izolaci fibrinogenu.

Výsledky získané při použití lysinové pryskyřice rovněž demonstrují zvýšení účinnosti při použití BN1 pufru v porovnání s fosfátovým pufrem.

Tabulka 4: Souhrn dat získaných při testování izolace fibrinogenu a plasmin(ogenu) za použití imobilizovaných pryskyřic a buď BN1 pufru, nebo fosfátového pufru

Imobilizované ligandy	Odstranění plasmin(ogenu) (%)	Izolace fibrinogenu (%)
TEA (vysoká konc.) epoxy + BN1 pufr	77,1	96,4
Lysin-epoxy + BN1 pufr	68,87	95,4
Lysin-epoxy + fosfátový pufr	100	66,9
Lysin CNBr + BN1 pufr	62,5	121,8
Lysin CNBr + fosfátový pufr	100	62,2

Příklad 4

Alikvotní podíly zamrazeného virově inaktivovaného kryoprecipitátu se nechaly roztát při 37 °C a dialyzovaly proti pufru BN1 (0,12 M NaCl, 0,01 M Tri Na-citrát, 1 mM CaCl₂ při pH hodnotě 7,0) nebo alternativně proti 25 mM fosfátového pufru. Druhý jmenovaný roztok se přefiltroval přes filtr o hloubce 5 µm, s cílem odstranit nerozpustné látky.

Kolona o průměru 26 mm (Pharmacia, Švédsko) se naplnila 50 ml (objem za mokra) imobilizované TEA (TEA sefaroza 6B) a propláchla čtyřmi objemy purifikované vody a stejným objemem TLN 0,1 pufru (0,1 M NaCl, lysin 0,02 M, Tris 0,05 M při pH hodnotě 9,0), TLN 1 pufru (1 M NaCl, lysin 0,02 M, Tris 0,05 M při pH hodnotě 9) a purifikované vody. Rovnováhy se dosáhlo čtyřmi objemy BN1 pufru (NaCl, Tri Na-citrát, CaCl₂ při pH hodnotě 7,0) a přefiltrovaný BAC se vedl kolonou rychlostí 700 µl/ml.

Vzorky nenavázaného materiálu se jímaly do umělohmotné nádoby a pryskyřice se propláchla alespoň třemi objemy BN1 pufru, vztaženo k objemu gelu. Eluce plasmin(ogenu) se prováděla za použití TLN 1 pufru a následného propláchnutí 3 M NaCl.

Nenavázané frakce získané ve dvou běžích se sloučily a udržovaly při 4 °C až do zahuštění. Nakonec se BAC zahustil přibližně na svůj původní objem diafiltrací za použití membrány 100 „cut-off“ a proti pufru B1 (glycin, NaCl, Tri Na-citrát, CaCl₂ při pH hodnotě 7) a následnou filtrací přes 0,45µm filtr. Do filtrátu se přidala 2 % argininu.

Pro účely stabilizačních testů se výsledný produkt sterilně přefiltroval přes 0,2 μ m filtr.

Jak naznačuje tabulka 5, použití větší a delší kolony zvýšilo účinnost TEA ligandu tak, že se izolovalo 100 % fibrinogenu a množství odstraněného plasmin(ogenu) bylo nižší než množství plasmin(ogenu) detekovatelné chromogenním testem.

Porovnání produktu před a po diafiltraci odhalilo ztrátu 33 % obsahu fibrinogenu. Tento jev lze vysvětlit technickými problémy, které se objevují pouze v laboratorním měřítku. Imobilizovaná TEA pryskyřice poskytla nepochybně vynikající výsledky jak při odstraňování plasmin(ogenu), tak při izolaci fibrinogenu.

Tabulka 5: Souhrn dat získaných při testování fibrinogenu a plasmin(ogenu) izolovaných v nenavázaném píku (každá hodnota je průměrem dvou měření)

Vzorek	Izolace fibrinogenu (%)	Izolace plasmin(ogenu) (%)
Po naplnění	100	0
Po naplnění a diafiltraci	66,2	0*

* Izolace plasmin(ogenu) po 3,7násobném zahuštění sloučených vzorků

Žádná reziduální TEA nebyla nalezena ani v eluovaném proteinovém roztoku ani v zahuštěném ultrafiltrovaném produktu. Analýza reziduální koncentrace kyseliny tranexamové se prováděla pomocí HPLC.

Za použití stejné pryskyřice a výše popsanych podmínek (příklad 4) se provedly čtyři další běhy odstraňování plasmin(ogenu). Obecně lze říci, že výsledky dosažené u

všech testovaných vzorků byly podobné prvním získaným a výše diskutovaným výsledkům.

Žádná reziduální TEA nebyla nalezena ani v eluovaném proteinovém roztoku ani v zahuštěném ultrafiltrovaném produktu. Analýza reziduální koncentrace kyseliny tranexamové se prováděla pomocí HPLC.

Při testování na krysím modelu nebyly u proužků před odstraněním plasmin(ogenu) ani po jeho odstranění pozorovány žádné adheze.

U kryoprecipitátu se před a po odstranění plasmin(ogenu) určovala degradace za inkubace při teplotě místnosti. Údaje uvádějící procenta srážlivých proteinů (pomocí UV absorbance) na různých vzorcích uvádí tabulka 6.

Tabulka 6: Procento srážlivého proteinu po inkubaci dvojité virově inaktivovaného zahuštěného kryoprecipitátu před a po odstranění plasmin(ogenu) epoxy sefarózou 6B ligovanou na kyselině tranexamové při teplotě místnosti

	Inkubační doba (týdny)						
	0	1	2	3	4	5	6
Před ošetřením	62,91	0	0	0	0	0	0
Po ošetření	73,44	70,80	68,24	65,69	63,69	63,84	62,46

Testy stability se prováděly za použití proužků připravených z kryoprecipitátu před a po odstranění plasmin(ogenu), které se inkubovaly při 37 °C v přítomnosti pufru. Tyto proužky se ošetřily přidáním nebo vypuštěním glycinu a/nebo argininu. Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce 7.

Tabulka 7: Degradační doba u proužků před a po odstranění plasmin(ogenu)

Formulace	Degradační doba proužku (dny)						
	0	1	2	3	4	5	6
Před ošetřením	+++						
Před ošetřením + 2% arginin	+++	-	-	-	-	-	-
Před ošetřením + 2% arginin + 1% glycin	+++	-	-	-	-	-	-
Po ošetření	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Po ošetření + 2% arginin + 1 % glycin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

+++ Tato data znamenají existenci proužku

- Tato data znamenají degradaci proužku

1. Studie popsané v následujících příkladech se prováděly na kryo-deficitní sloučené čerstvé zamražené plasmě odebrané normálním zdravým dárčům. V důsledku vysoké koncentrace antiplasminu a malého množství plasminu u normálních zdravých dárců (1) nelze plasmin detekovat pomocí funkčního (chromogenního) testu (Schreiber A.D., Kaplan A.P., Austen K.F. Plasma inhibitors of the components of the fibrinolytic pathway, *man. J. Clin. Invest* 52: str. 1394 až 1401, 1973). Je možné demonstrovat odstranění, purifikaci a izolaci plasminu vzorků plasmy zdravého dárce z TEA pryskyřice. Nicméně komerční ELISA kit pro detekci velmi nízkých množství Glu-plasmin(ogenu) a, jak se zjistilo v předcházejících studiích, i TEA pryskyřice má stejnou afinitu pro obě formy plasmin(ogenu), a stejně tak pro plasmin

(Fredenburgh J.P., Nesheim M.E. Lys-plasmin(ogen) is a significant intermediate in the activation of Glu-plasmin(ogen) during fibrinolysis in vitro, J. Biol. Chem. 267, str. 26150 až 26156, 1992 a Miyashita C., Wenzel E., Heiden M. Plasmin(ogen): a brief introduction into its biochemistry and function, Haemostasis 1: str. 7 až 13, 1988.)

2. Měření Glu-plasmin(ogenu) lze tedy použít jako indikátor celkového množství plasmin(ogenu) v plasmě.

Příklad 5

Chromatografický krok

Tyto studie se prováděly ve snaze stanovit účinnost imobilizované TEA na sefaróze 4FF při odstraňování plasmin(ogenu) z kryo-deficitní čerstvě zamražené plasmy (FFP) obsahující 1 IU/ml plasmin(ogenu). Alikvotní podíly kryo-deficitní čerstvě zamražené plasmy se nechaly roztát při 37 °C a filtrovaly přes filtr mající hloubku 3 µm ve snaze odstranit nerozpustné proteiny.

Kolona o průměru 10 mm (Pharmacia, Švédsko) se naplnila 2 ml (objem za mokra) imobilizované TEA a propláchla čtyřmi objemy purifikované vody a stejným objemem TLN-0,1 pufru (0,1M NaCl, lysin 0,02M, Tris 0,05M při pH hodnotě 9,0), TLN-1 pufru (1M NaCl, lysin 0,02M, Tris 0,05M při pH hodnotě 9,0) a purifikované vody. Rovnováha se vytvořila použitím čtyř objemů BN1 pufru (0,12M NaCl, 0,01M Tri Na-citrát, 1mM CaCl₂ při pH hodnotě 7,0) a přefiltrovaná plasma (přibližně 20 IU

plasmin(ogenu)) se vedla skrze kolonu při rychlosti 1 ml/min.

Protékající materiál se jímá a zamrazí v umělohmotné lahvi a pryskyřice se propláchla alespoň třemi objemy BN1 pufru, vztaženo k objemu kolony. K eluci plasmin(ogenu) se použil TLN-1 pufr a následný průplach přibližně třemi objemy 3M NaCl-roztoku, dvěma objemy purifikované vody a dvěma objemy 20 % ethanolu + 1 M NaCl (metoda 1). U druhé metody (metoda 2) se použil stejný postup jako v případě metody 1, ale doplnil se dalším průplachem 3 M NaCl, který předcházela eluci plasmin(ogenu).

Analytické testy

Test detekce Glu-plasmin(ogenu)

Imunclone Glu-plasmin(ogen) ELISA kit (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA), použitý v těchto experimentech, je enzym vážící sendvičový imunotest specifický pro detekci přirozených hladin lidského Glu-plasmin(ogenu). Kvantitativní mezní hodnota tohoto testu (podle nejnížší standardní kalibrační křivky) v plasmě nebo v derivátech plasmy je 0,063 µg/ml.

Aktivita plasminu

Fibrinolytický test se prováděl s cílem semi-kvantifikovat aktivitu plasminu v eluátech. Stručně řečeno, plasmin(ogenu) prostý fibrinogen (Enzyme Research) se inkuboval s různými koncentracemi normální odebrané plasmy (Unicalibrator, Stago) nebo purifikovaného plasmin(ogenu)

eluovaného z afinitních kolon v přítomnosti přebytku streptokinázy. Čas, po kterém byla degradace sraženiny kompletní, se zaznamenal a porovnal s časem kompletní degradace sraženiny vzorku.

Určení proteinu

Celkový protein se testoval za použití Bradfordovy metody (Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: str. 248 až 254, 1976). Tabulky 8a a 8b ukazují výsledky chromatografického odstranění a purifikace Glu-plasmin(ogenu) TEA ligandem. Tabulka 8a shrnuje získané výsledky týkající se purifikace plasmin(ogenu). Tato tabulka ukazuje, že metoda 2 má o něco lepší výsledky při purifikaci plasmin(ogenu) než metoda 1 při 567násobné purifikaci a výtěžku 91,6 %. Tabulka 8b ukazuje, že se z nenavázané frakce odstranilo průměrně 99,5 % plasmin(ogenu), což většinou odpovídá množství izolovanému v eluátu (tabulka 8a).

Tabulka 8a: Vliv dalšího průplachu TEA pryskyřice 3M chloridem sodným (metoda 1 vs. metoda 2) na specifickou aktivitu, purifikaci a izolaci plasmin(ogenu) z plasmy

	Metoda 1	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 2
Frakce	Výchozí materiál	Eluát	Výchozí materiál	Eluát
Objem (ml)	40	13,2	40	20
Protein (mg/ml)	46,96	0,291	55,41	0,180
Glu-plasmin(ogen)	65,4	18,2	78,0	142,9
Plasmin(ogen) (IU/ml)	neprováděno		~0,5	~1
Specifická aktivita (mg plasmin(ogenu) /mg proteinu)	0,0014	0,625	0,0014	0,794
Purifikační faktor	446		567	
Izolace plasmin(ogenu)	91,8		91,6	

Tabulka 8b: Odstranění plasmin(ogenu) z plasmy (průměr výsledků pro dvě metody) *

Metoda	Chromato- grafická frakce	Glu-plasmin(ogen) (průměr, µg/ml)	Objem (průměr, ml)	Odstranění plasmin(ogenu) (%)
1 & 2*	Plasma	71,7	40,0	99,5
	Nenavázaná frakce	0,18	83,5	

* Metody 1 a 2 jsou identické a zahrnují jímání nenavázané (protékající) frakce.

Příklad 6

Vliv chromatografických podmínek na účinnost imobilizovaného-lysinového ligandu při afinitní purifikaci plasmin(ogenu)

Chromatografický krok

Afinitní purifikace používající pryskyřici s imobilizovaným-lysinovým ligandem se testovala za použití dvou komerčně dostupných lysinových pryskyřic. Použila se chromatografická metoda zdokumentovaná v literatuře (viz Robbins K.C., Summaria L. Plasmin(ogen) and Plasmin. Methods Enzymol. 45: str. 257 až 273, 1976., pro níže popsanou metodu 2) a rovněž metoda, která byla vyvinuta v laboratoři vynálezců (níže popsaná metoda 1).

Do kolon o průměru 10 mm (Pharmacia, Švédsko) se umístily dvě imobilizované lysinové pryskyřice (Ceramic Hyper DF vyráběná společností Biosepra a sefaróza 4B vyráběná společností Pharmacia). Každá kolona obsahovala 2 ml (objem za mokra) pryskyřice.

Alikvotní podíly kryo-deficitní čerstvé zamražené plasmy se nechaly roztát při 37 °C a přefiltrovaly přes filtr mající hloubku 3 µm za vzniku čirého roztoku.

Chromatografický krok se prováděl za použití jedné z následujících metod.

Metoda 1

Kolona se propláchla čtyřmi objemy každého z následujících roztoků: 1) purifikovanou vodou, 2)

TLN-0,1, 3) TLN-1 a 4) purifikovanou vodou. Rovnováha se vytvořila pomocí čtyř objemů BN1. Přefiltrovaná plasma (40 ml) se do kolony zaváděla rychlostí 1 ml/min. Vzorky protékajícího materiálu se jímaly do umělohmotných lahví a pryskyřice se propláchla BN1 pufrem. Eluce plasmin(ogenu) se prováděla pomocí TLN-1 pufru a pomocí následného průplachu 3 M NaCl roztokem, dvěma objemy purifikované vody a dvěma objemy 20 % ethanol + 1 M NaCl.

Metoda 2 (ref. 5)

Alikvotní podíly kryo-deficitní čerstvé zamrazené plasmy (40 ml) se přefiltrovaly přes filtr mající hloubku 3 μ m. Do 40 ml přefiltrované plasmy se přidaly 4 ml 0,5M Tris, 0,2M lysinu, 1M NaCl pufru při pH hodnotě 9.

Kolona se propláchla čtyřmi objemy purifikované vody a rovnováhy se dosáhlo přidáním 0,1 M fosfátového pufru při pH hodnotě 7,4. Naředěná plasma protékala pryskyřicí rychlostí 1 ml/min. Vzorky nenavázaného materiálu se jímaly v umělohmotných lahvích a pryskyřice se proplachovala 0,1M fosfátovým pufrem při pH hodnotě 7,4 až do okamžiku, kdy absorbance vytékajícího proudu při 280 nm dosáhla základní linie. Plasmin(ogen) se následně eluoval 0,2M kyselinou ϵ -aminokapronovou rozpuštěnou v 0,1M fosfátovém pufru při pH hodnotě 7,4 a jímaly do umělohmotné nádoby. Po eluci následoval průplach přibližně dvěma objemy 3M NaCl roztoku a purifikované vody.

Tabulky 9a a 9b porovnávají odstranění a purifikaci plasmin(ogenu) pomocí dvou různých komerčně dostupných imobilizovaných-lysinových pryskyřic a dvou různých purifikačních metod. Ačkoliv byl zjištěn relativně malý

rozdíl při izolaci plasmin(ogenu) z eluátů (tabulka 9a), je patrné, že při použití metody 2 a pryskyřice Ceramic Hyper DF se dosáhlo mnohem vyšší purifikace plasmin(ogenu).

Výsledky ukazují, že použití pryskyřice Lys-Ceramic Hyper DF a chromatografické metody 2 poskytuje 444násobnou purifikaci. Navíc většina plasmin(ogenu) se izolovala v píkových frakcích (76,5 % v nenavázané frakci + 10,9 % v eluátu a pouze přibližně 10 % zavedeného plasmin(ogenu) nebylo započteno). Nicméně z nenavázané frakce se odstranilo pouze 23,5 % plasmin(ogenu).

Tabulka 9a: Specifická aktivita, purifikační faktor a izolace plasmin(ogenu) z plasmy za použití dvou různých komerčně dostupných imobilizovaných-lysinových pryskyřic a dvou různých chromatografických metod

Frakce	Metoda 1			Metoda 2		
	Náplň	Eluát		Náplň	Eluát	
		Ceramic Hyper DF	Sefaróza 4B		Ceramic Hyper DF	Sefaróza 4B
Objem (ml)	40	8,1	7,2	40	8,2	9,8
Protein (mg/ml)	55,94	0,347	0,345	60,05	0,0719	0,672
Glu-plasmin(ogen) (µg/ml)	65,4	40,3	41,9	60,8	32,2	19,9
Specifická aktivita (mg plasmin(ogenu) / mg proteinu)	0,0012	0,116	0,121	0,001	0,444	0,030
Purifikační faktor		97	101		444	30
Izolace (%)		12,5	11,6		10,9	8,2

Tabulka 9b: Odstranění plasmin(ogenu) z nenavázaných píků pro obě metody

Metoda	Použitá pryskyřice	Chromato- grafická frakce	Objem (ml)	Glu- -plasmin (ogen) μg/ml	Celkem Glu- -plasmin (ogen) (μg)	Odstranění plasmin (ogenu) (%)*
1	Ceramic	Plasma	40	65,4	2616	54,6 (45,4)
	Hyper DF	Nenavázaná	72	16,5	1188	
	Sefaróza	Plasma	40	65,4	2616	58,0 (42,0)
	4B	Nenavázaná	82	13,4	1099	
2	Ceramic	Plasma	40	60,8	2432	23,5 (76,5)
	Hyper DF	Nenavázaná	89	20,9	1860	
	Sefaróza	Plasma	40	60,8	2432	33,0 (67,0)
	4B	Nenavázaná	91	17,9	1629	

* Hodnoty v závorkách reprezentují plasmin(ogen) izolovaný z nenavázaného píku

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob specifického odstraňování nebo izolace plasmin(ogenu) nebo plasminu v přítomnosti fibrinogenu ze směsi obsahující plasmin(ogen) nebo plasmin, **vyznačující se tím**, že se směs uvede do kontaktu s rigidní aminokyselinou, kde jsou aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny od sebe odsazeny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm, a rigidní aminokyselina je kovalentně navázána na nosič přes aminoskupinu aminokyseliny.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že směs se zvolí z množiny sestávající z tělních tekutin, jakými jsou například krev, krevní frakce, kryoprecipitát, buněčné kultury, extrakty živočišných tkání, jakými jsou například bovinní plíce, bovinní střevo nebo želatina extrahovaná ze zvířecích kostí, albumin bovinního séra, a stejně tak živočišné s vodou mísitelné tuky, jakým je například lanolin (PC-fosfatidylcholin).

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nosičem je chromatografický materiál.

4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že na nosič je navázána rigidní aminokyselina, kde jsou aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny vzájemně odsazeny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm.

5. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je hydrofilní materiál, jakým jsou například agaróza, celulóza, sklo s kontrolovanými póry, silikagely, dextransy nebo organický uměle připravený polymer, například na bázi polyakrylamidů polystyrenů.

6. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je agaróza nebo sefaróza.

7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je částicový materiál nebo materiál ve formě monolitického bloku.

8. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že rigidní aminokyselina je navázána na nosič přes linker nosičem a kyselinou tranexamovou.

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že linkerem je bifunkční linker.

10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že se bifunkční linker zvolí z množiny sestávající z nosiče aktivovaného *N*-hydroxysukcinimidem, DAPA, CNBr, epoxy, diaminodipropylaminem (DADPA), 1,6-diaminohexanem, kyselinou sukcinovou, 1,3-diamino-2-propanolem, ethylendiaminem (EDA), TNB, pyridyldisulfidem, jodacetamidem, maleimidem nebo jejich kombinací.

11. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nosič je modifikován zbytkem, který reaguje s primární nebo sekundární aminoskupinou.

12. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že po uvedení směsi do kontaktu s nosičem, na kterém je navázána kyselina tranexamová, se směs inkubuje s nosičem po časovou periodu dostatečnou pro navázání plasmin(ogenu) nebo plasminu a eluuje neutrálním vodným roztokem obsahujícím sodné soli, vápenaté soli a puřrové soli.

13. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že po kontaktování směsi se plasmin nebo plasmin(ogen) eluuje vodným roztokem obsahujícím dostatečné množství ligandu konkurujícího plasmin(ogenu) vazebným místům na rigidní aminokyselině navázané na nosiči.

14. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že ligandem je lysin.

15. Směs odvozená z přírodních zdrojů, která je v podstatě prostá plasmin(ogenu).

16. Směs podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že je krevním derivátem, krví nebo krevní frakcí nebo kryoprecipitátem.

17. Směs podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že krevním derivátem je z plasmy odvozený faktor srážlivosti krve nebo směs faktorů srážlivosti krve, albumin, imunoglobulin, fibrinogen, fibronectin, α_1 -antitrypsin, anti-thrombin III a von Willebrandův faktor.

18. Frakce obsahující plasmin(ogen) a/nebo plasmin získatelná způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 14.

19. Nosič, **vyznačující se tím**, že má na sobě kovalentně navázanou rigidní aminokyselinu, kde jsou aminoskupina aminokyseliny a karboxylová skupina aminokyseliny od sebe vzdáleny o 0,6 nm až 0,8 nm, výhodně o 0,7 nm.

20. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že se aminokyselina zvolí z množiny sestávající z kyseliny tranexamové a kyseliny 4-aminomethylbicyklo[2.2.2]oktan-1-karboxylové.

21. Nosič podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím**, že je vyroben z chromatografického materiálu.

22. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je hydrofilní materiál, jakým je například agaróza, celulóza, sklo s řízenými póry,

silikagely, dextrany nebo organický uměle připravený polymer, například na bázi polyakrylamidů polystyrenů.

23. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je agaróza nebo sefaróza.

24. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že chromatografickým materiálem je částicový materiál nebo materiál ve formě monolitického bloku.

25. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že kyselina tranexamová je navázána na nosič přes linker mezi nosičem a kyselinou tranexamovou.

26. Nosič podle nároku 25, **vyznačující se tím**, že linkerem je bifunkční linker.

27. Nosič podle nároku 26, **vyznačující se tím**, že bifunkční linker se zvolí z množiny sestávající z nosiče aktivovaného *N*-hydroxysukcinimidem, DAPA, CNBr, epoxy, diaminodipropylaminem (DADPA), 1,6-diaminohexanem, kyselinou sukcinovou, 1,3-diamino-2-propanolem, ethylendiaminem (EDA), TNB, pyridyldisulfidem, jodacetamidem, maleimidem nebo jejich kombinací.

28. Nosič podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že je modifikován zbytkem, který reaguje s primární nebo sekundární aminoskupinou.

29. Směs odvozená z přírodních zdrojů, **vyznačující se tím**, že je v podstatě prostá plasmin(ogenu) a plasminu.

30. Směs podle nároku 29, **vyznačující se tím**, že přírodním zdrojem je krev, krevní derivát nebo krevní frakce, kryoprecipitát, buněčné kultury, extrakty živočišných tkání, jakými jsou například bovinní plíce, bovinní střeva nebo želatina extrahovaná ze zvířecích kostí, albumin bovinního séra, a stejně tak živočišné s vodou mísitelné tuky, jakým je například lanolin (PC-fosfatidylcholin).

31. Směs podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že krevním derivátem je zejména z plasmy odvozený faktor srážlivosti krve nebo směs faktorů srážlivosti krve, jako například FVIII, FIX, fibrinogen, fibronectin, α_1 -anti-trypsin, anti-thrombin III, von Willebrandův faktor, albumin a imunoglobulin.

Zastupuje:

Obr. 1

