



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 467

(21) PV 6233-88.R
(22) Přihlášeno 20 09 88

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 10 02 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 7/18

(75) Autor vynálezu

SIMONIANOVÁ EVA ing. CSc., RYBÁK MIROSLAV ing. CSc.,
KOŠTÁLOVÁ ALENA, ULRYCH STANISLAV RNDr., PRAHA

(54)

Způsob přípravy standardních koncentrátů prekallikreinu
a fragmentu Hagemanova faktoru z krevní plasmy

(57)

Řešení se týká způsobu přípravy standardních koncentrátů prekallikreinu a fragmentu Hagemanova faktoru z krevní plasmy, zejména z intaktní citrátové lidské krevní plasmy, a to k diagnostickým účelům, především při kontrole kvality intravenosně aplikovaných krevních derivátů. Podstata řešení spočívá ve způsobu zpracování krevní plasmy na koncentrát prekallikreinu sorpcí na ekvilibrovaný sorbent na bázi dietylaminoethyl-derivátů polysacharidů nebo hydroxyalkylmetakrylátového nebo glykolmetakrylátového gelu v prostoru prostém povrchového elektrického náboje a na koncentrát fragmentu Hagemanova faktoru, který se získá desorpcí bílkoviny ze sorbentu obohacením eluátu proteolýzou o fragment Hagemanova faktoru po odsolení a následující frakcionaci na katexu na bázi karboxymetyl-derivátů dextranu nebo celulosy. Způsob usnadňuje a zrychluje proces přípravy koncentráту prekallikreinu a koncentráту fragmentu Hagemanova faktoru.

Vynález se týká způsobů přípravy standardních koncentrátů prekallikreinu a fragmentu Hagemanova faktoru z krevní plasmy, zejména z intaktní citrátové krevní plasmy, a to k diagnostickým účelům.

Plasmatický prekallikrein slouží jako jediné specifické agens k laboratornímu průkazu přítomnosti fragmentu Hagemanova faktoru (aktivátoru prekallikreinu, také Hff) v preparátech připravovaných z krevní plasmy. Hff je iniciátorem pochodů, které v krevním oběhu vedou k uvolnění kininů z plasmatických kininogenů známým mechanismem. Kontaminace fragmentem Hagemanova faktoru u intravenosně podávaných krevních derivátů znamená tedy pro příjemce ohrožení, spočívající v prudkém poklesu krevního tlaku, vedoucím až k cirkulačnímu kolapsu. Dosavadní výrobní postupy pro přípravu stabilního plasmatického roztoku, albuminu nebo intravenosního gama-globulinu nezabraňují tomu, aby Hff, přítomný ve výchozím materiálu buď jako takový, nebo v podobě prekurzoru, nepřecházel jako kontaminující složka do konečného preparátu. Stanovení hladiny Hff, jehož hypotenzivní účinky jsou známy, může být ukazatelem případné reaktivity derivátů krevní plasmy při klinických aplikacích.

Průkaz fragmentu Hagemanova faktoru v klinicky používaných preparátech je založen na tom, že preparát, který tento faktor obsahuje, je schopen aktivovat prekallikrein na enzym kallikrein, jehož uvolněné množství je úměrné přítomnému aktivátoru prekallikreinu a stanoví se pomocí specifického substrátu. Někteří autoři používají substrátů na bázi esterů bázeických aminokyselin (cit. lit. 1, 2), v pozdější době jsou však vesměs užívány specifičtější chromogenní oligopeptidické deriváty p-nitroanilinu (cit. lit. 3). Aby bylo možno standardizovat metodu stanovení Hff v preparátech připravených z krevní plasmy, je nutno mít k dispozici standardní prekallikrein a k jeho přípravě standardní aktivátor prekallikreinu.

Jsou známy způsoby oddělování prekallikreinu z krevní plasmy sloupcovou chromatografií na sorbentech typu diethylaminoethylderivátů dextranu, které jsou všeobecně známé a komerčně dostupné (cit. lit. 4). Protože povrchový elektrický náboj prekallikreinu je blízký povrchovému elektrickému náboji imunoglobulinu G, lze pro tyto účely použít i postupy popsané pro izolaci této frakce z krevní plasmy (cit. lit. 5). Nevýhodou těchto postupů, založených na sloupcové chromatografii, je především několikahodinové trvání separačního procesu, při kterém ve zpracovávané plazmě může docházet k aktivaci prekallikreinu v enzym kallikrein vlivem kofaktorů aktivace přítomných v krevní plazmě a vlivem negativního elektrického náboje povrchu skleněného separačního zařízení. Je znám způsob, jak zabránit nežádoucí aktivaci prekallikreinu: Pro jeho separaci z plasmy je nutno používat chromatografických trubic s intaktním povrchem, tj. prostých elektrického náboje, nebo skleněných trubic potažených uvnitř vrstvou silikonu.

Způsobem podle vynálezu se podařilo odstranit popsané nevýhody dosavadních postupů, především tedy dlouhotrvající separaci a značné nároky na speciální úpravu aparatury a současně využít zbytků krevní plasmy po izolaci prekallikreinu k přípravě koncentráту fragmentu Hagemanova faktoru. Jeho podstata spočívá v tom, že se výchozí surovina s přísadou látky neutralizující negativní elektrické náboje, například hexadimethrinbromidu, předem ekvilibrovaná pufrům s hodnotou pH 6,3 až 8,0 a molarity 0,0175 až 0,1, uvádí v zařízení prostém povrchového elektrického náboje, za stálého pohybu ve styk s anexem, zejména na bázi diethylaminoethylderivátů polysacharidů, například dextranu nebo celulosy, nebo na bázi hydroxyalkylmetakrylátového nebo glykolmetakrylátového gelu, předem promýtným ekvilibračním pufrům, po ukončené sorpci se roztok nesorbovaných bílkovin, obsahující koncentrát prekallikreinu, oddělí, například filtrací, a to opět v zařízení prostém povrchového elektrického náboje, potom se podíl bílkovin, sorbovaný na anexu a obsahující prekurzor fragmentu Hagemanova faktoru, uvolní elucí pufrům s hodnotou pH ekvilibračního pufru a s obsahem chloridu sodného nejméně 1,0 mol/l, získaný eluát se odsolí, například dialýzou, a podrobí proteolýze, například kallikreinem, a uvolněný Hff se izoluje na katexu, například na bázi karboxymethylderivátu dextranu nebo celulosy, po ekvilibraci eluátu i katexu pufrům s hodnotou pH 5,5 až 6,0 elucí solným gradientem, například v koncentra-

ci od 0 do 1,0 mol/l chloridu sodného.

Při provedení způsobu podle vynálezu spočívá základní opatření v uvedení krevní plasmy do styku s anexem v nádobě s intaktním povrchem, tzn. proutým elektrického náboje, za přesně definovaných podmínek pH a iontové síly, za kterých se prekallikrein spolu s imunoglobulinovou frakcí nesorbuje na anex. Nesorbovaný podíl slouží jako koncentrát prekallikreinu. Podíl bílkovin, vázaný na anex, obsahující prekurzor fragmentu Hagemanova faktoru, se uvolní elucí roztokem se zvýšenou iontovou silou a slouží k přípravě koncentráту HFf. Získaná frakce se po odstranění solí podrobí proteolytickému štěpení, čímž se obohatí o fragment Hagemanova faktoru, který se potom dále za definovaných podmínek separuje sloupcovou chromatografií na katexu. Koncentrát HFf se zpracuje známým způsobem, uvedeným pro ilustraci v příkladu 2, na standard aktivátoru prekallikreinu.

Způsob podle vynálezu aplikací vsádkového postupu v nádobě (respektive v zařízení) prosté povrchového elektrického náboje umožnil zkrácení přípravy koncentráту prekallikreinu na dobu nejvýše 30 min. a tím i podstatně snížil nebezpečí vzniku autoaktivačních nebo proteolytických pochodů v plasmě. Nevyžaduje žádné speciální chromatografické aparatury a současně využívá sorbované frakce bílkovin k přípravě koncentráту HFf. Při dodržení doporučených podmínek podle vynálezu jsou oba koncentráty stále kvality.

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že umožňuje velmi jednoduchou, rychlou a hospodárnou přípravu složek plasmy nutných pro kontrolu přítomnosti fragmentu Hagemanova faktoru v preparátech získávaných z lidské krevní plasmy.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení, které předmět vynálezu pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

a) Příprava koncentráту prekallikreinu

Ke 100 ml intaktní lidské citrátové plasmy se přidá 5 mg hexadimethrinbromidu (syntetický antagonist heparinu, Polybren) a potom se plasma ekvilibruje dialýzou při 4 °C proti pufru Tris-HCl (0,1 mol/l, pH 8,0) s přísadou hexadimethrinbromidu v koncentraci 50 mg/l. K ekvilibrované plasmě se přidá 8 g diethylaminoethylderivátu dextranu s velikostí částic 40 až 120 μm nebo 10 g diethylaminoethylderivátu celulosy nebo 8 g diethylaminoethylderivátu hydroxyethylmetakrylátu, předem promytých ekvilibračním pufrem a směs se míchá za mírného otáčení 20 minut v polyetylenové nádobě. Po skončené sorpci se sorbent odsaje na odsávačce opatřené rychle tekoucím filtračním papírem a filtrát se jímá do polyetylenového sáčku nebo nádoby. Získaný filtrát je koncentrát prekallikreinu. Popsaným postupem se získá veškerý prekallikrein přítomný ve výchozí plasmě, spolu s IgG tvoří 95 až 98 % bílkoviny koncentráту. Počet mezinárodních jednotek prekallikreinu se stanoví aktivací standardním aktivátorem prekallikreinu.

b) Příprava koncentráту fragmentu Hagemanova faktoru

Anex, oddělený v předchozí operaci od kapalného podílu, na kterém je zachycena bílkovinná frakce obsahující prekurzor fragmentu Hagemanova faktoru, se eluuje dvakrát po 150 ml pufru o vysoké iontové síle, například pufrem Tris-HCl (0,1 mol/l, pH 8,0) s přísadou 2,0 mol/l chloridu sodného. Eluát o objemu zhruba 300 ml se zbaví solí dialýzou proti destilované vodě (nebo diafiltrací) a diafiltrací se zahustí na objem 50 ml. Přídatkem 10 ml roztoku aktivního enzymu kallikreinu (aktivita 80 až 100 U/ml) a minimálně 8 hodinovou inkubací při 25 °C se tento podíl obohatí o HFf. Směs se frakcionuje na sloupci katexu (CM Sephadex, velikost částic 40 až 120 μm, velikost sloupce 1,6 x 40 cm) solným gradientem od 0 do 1,0 mol/l chloridu sodného v acetátovém pufru (0,1 mol/l, pH 5,9). Podíly obsahující HFf se spojí a po odstranění solí dialýzou proti destilované vodě (nebo diafiltrací) se zahustí na takový objem, aby získaný koncentrát fragmentu Hagemanova faktoru vykazoval aktivitu nejméně 90 U/ml. Spolu s albuminem tvoří HFf více než 98 % bílkoviny.

Příklad 2

Příprava standardu aktivátoru prekallikreinu v albuminu

Pro přípravu standardu aktivátoru prekallikreinu se použije komerční albumin, ze kterého se odstraní popřípadě přítomné inhibitory kallikreinového systému vazbou na sorbent s afinitou ke glykoproteinům (například na síťované agarose s navázaným lektinem Concavalin A) a volný kallikrein postupem popsaným v příkladu 1, odst. a) pro separaci prekallikreinu. Sorbovaný albumin se eluuje pufrém o vysoké iontové síle postupem popsaným v příkladu 1, odst. b), stejným postupem se odstraní soli a roztok se zahustí ultrafiltrací. Koncentrát fragmentu Hagemanova faktoru se smísí s koncentrátem albuminu tak, aby výsledná koncentrace bílkoviny byla přibližně 5 % a aktivita fragmentu Hagemanova faktoru srovnatelná s mezinárodním standardem aktivátoru prekallikreinu (National Institute for Biological Standards and Control, London). Osmolalita roztoku se upraví na 300 mOs/kg přidávkem chloridu sodného.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy standardních koncentrátů prekallikreinu a fragmentu Hagemanova faktoru z krevní plasmy, zejména z intaktní citrátové lidské krevní plasmy za použití obecně známých postupů a materiálů jako je sloupcová chromatografie na sorbentech typu dietylaminoethylderivátů polysacharidů nebo na bázi hydroxyalkylmetakrylátového nebo glykolmetakrylátového gelu v zařízeních prostých elektrického náboje pro koncentrát prekallikreinu a na sorbentech typu karboxymethylderivátů s využitím eluce, odsolení a proteolýzy pro koncentrát fragmentu Hagemanova faktoru, vyznačující se tím, že se výchozí surovina s přísadou látky neutralizující negativní elektrické náboje, například hexadimethrinbromidu, předem ekvilibrovaná pufrém s hodnotou pH 6,3 až 8,0 o molaritě 0,0175 až 0,1, uvádí v prostoru prostém povrchového elektrického náboje, za stálého pohybu ve styk s anexem, zejména na bázi dietylaminoethylderivátů polysacharidů, například dextranu nebo celulozy, nebo na bázi hydroxyalkylmetakrylátového nebo glykolmetakrylátového gelu, předem promytým ekvilibračním pufrém, po ukončené sorpci se roztok nesorbovaných bílkovin, obsahující koncentrát prekallikreinu oddělí, například filtrací, a to opět v prostoru prostém povrchového elektrického náboje, potom se podíl bílkovin, sorbovaný na anexu a obsahující prekursor fragmentu Hagemanova faktoru, uvolní elucí pufrém s hodnotou pH ekvilibračního pufru a s obsahem chloridu sodného 1,0 až 2,0 mol/l, získaný eluát se odsolí, například dialýzou a podrobí proteolýze, například kallikreinem a uvolněný fragment Hagemanova faktoru se izoluje na katexu, například na bázi karboxymethylderivátu dextranu nebo celulosy, po ekvilibraci eluátu i katexu pufrém s hodnotou pH 5,5 až 6,0, elucí solným gradientem, například v koncentraci od 0 do 1,0 mol/l chloridu sodného.