HU000228899B1

(19) **HU**

(11) Lajstromszám: **228 899**

(13) **B1**

MAGYARORSZÁG
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 06 00110**
(22) A bejelentés napja: **2002. 05. 17.**

(40) A közzététel napja: **2006. 05. 29.**
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 06. 28.**

(51) Int. Cl.: ***A61K 35/14*** *(2006.01)*
A61K 35/16 *(2006.01)*
C07K 1/22 *(2006.01)*
C07K 14/75 *(2006.01)*
C12N 9/68 *(2006.01)*

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/EP 02/05462
(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 02095019

(30) Elsőbbségi adatok:

60/291,968	**2001. 05. 21.**	**US**
01115157.8	**2001. 06. 21.**	**EP**

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

(73) Jogosult(ak):
Omrix Biopharmaceuticals S.A.,
Rhode-St-Genése (BE)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **A plazmin(ogén) eltávolítása protein oldatokból**

(57) Kivonat

Plazmin(ogén)t vagy plazmint tartalmazó keverékből plazmin(ogén) vagy plazmin fibrinogén jelenlétében való specifikus eltávolítására szolgáló módszer, melynek során a keveréket egy szilárd aminosavval hozzuk kapcsolatba, ahol az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 — 8 Angstrom, előnyösen 7 Angstrom távolságra vannak, és a szilárd aminosav kovalensen kötődik a támasztékhoz az aminosav aminocsoportján keresztül.

P06 00110

NYOMDAPÉLDÁNY

77.832/SZE

A PLAZMIN(OGÉN) ELTÁVOLÍTÁSA PROTEIN OLDATOKBÓL

Az alábbiakban bemutatjuk a jelen találmány hátterét.

A jelen találmány egy gyantával és a plazmin(ogén) és származékainak protein oldatokból való specifikus eltávolítására szolgáló módszerrel kapcsolatos, ahol a kapott protein oldat intravénás és lokális például a hosszantartó felszabaduláshoz és sebkezeléshez való mátrix támasztékhoz megfelelő alkalmazáshoz használható akár egyedüli aktív komponensként, akár más gyógyszerészeti szempontból elfogadható szerekkel kombinációban. A plazmin(ogén) eltávolítása hosszabb inkubációs időszak alatt is megőrzi a protein oldat integritását és funkcióját. A jelen találmány még a terápiás alkalmazáshoz való nagy tisztaságú plazmin(ogén) előállításával is kapcsolatos.

A plazmin(ogén) vagy aktív molekulája a plazmin (a következőkben plazmin(ogén)) nagyon gyakran szennyezi a protein oldatokat, különösen az állati folyadékokból vagy állati szervekből kivont protein oldatokat. A plazmin(ogén) jelenléte a protein oldatban sokoldalú veszélyt jelent a stabil gyógyszerészeti termékként való elfogadásával szemben a

molekula különböző proteinekre és peptidekre az arginil és lizil kötéseknél (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. Bioplys. Acta, 1972, 258:577-90 és Ling C.M., Summaria, L., Robbins K.C., Mechanism of formation of bovine plasmin(ogen) activator from human plasmin, J. Biol. Chem. 1965. 240:4212-B); és a bázikus aminosavakra kifejtett ismert proteolitikus aktivitásának köszönhetően, a különböző szövetekre, különösen a központi idegszövetre kifejtett stimuláló aktivitásának köszönhetően, és a kötésben való szerepe miatt (Chen, Z.L., Strickland S., Neuronal death int he hippocampus is promoted by plasmincatalyzed degradation of liminin, Cell, 1997. 91:917-25) és talán mivel priont vihetnek az emlősök vérében (Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwartz, H.P., Aguzzi, A., Binding of disease associated prion protein to plasmin(ogen) , Nature, 2000, 408:479-83).

Számos kromatográfiás módszert kifejlesztettek már a plazmin(ogén) protein oldatokból való tisztításához, és ezáltal a plazmin(ogén) protein oldatból való eltávolításához.

Ezek a módszerek lényegében két elméletre alapulnak. Az első csoport számos egymást követő tisztítási lépésre alapul, melyek eltérő oldhatóságot, izoelektromos pontot vagy molekula méret eloszlást használnak (Alkjaerisig, N., The purification and properties of human plasmin(ogen), Biochem.J. 1963, 93:171-182). Mivel fő céljük a plazmin(ogén) tisztítása volt, ezek a módszerek tökéletesen eltorzították a protein oldat összetételét. A másik módszer csoport az egy lépéses affinitás tisztításra alapul. A tisztítás arra épül, hogy a plazmin(ogén) különböző szintetikus ω-aminokarboxilsav ligandumokhoz kötődik, mely a plazmin(ogén) nehéz lánc lizin kötő helyeihez képes kötődni. Ezek a helyek őt három diszulfid hidas hurkot tartalmaznak, melyek belső szekvencia homológiája plazmin(ogén) kringleként ismert, az NH_2

plazmin(ogén) nehéz láncon helyezkednek el, távol vannak a COOH könnyű láncon található katalitikus helytől, és kötik a fibrin(ogén)t. Az affinitás kromatográfia egy másik lehetősége az, hogy a plazmin(ogén)t katalitikus helyén keresztül kötjük ami potenciálisan kevésbé specifikus kötés, mivel az számos proteint képes kötni, például szerin proteázokat, melyek hasonló vagy kisebb affinitással rendelkeznek az arginil és lizil peptid kötésekkel és a bázikus aminosavakkal szemben. Összefoglalva, általánosságban azt a következtetést lehet levonni, hogy a plazmin(ogén) affinitás kromatográfiát egy olyan adott ligandummal végezzük el, mely kémiailag és ionok szempontjából a ω-amino-karboxilsavhoz, vagy a plazmin katalitikus hely szubsztrátjához hasonlít. A ligandum a gyantához egy megfelelő „spacer"-en vagy kötőn keresztül kapcsolódik. Azonban a plazmin(ogén) eltávolításához ideális affinitási gyanta nem a plazmin(ogén) tisztításához ideálisnak talált gyantával lényegében azonos gyantát jelenet. Az ilyen gyanták olyan ligandummal kell rendelkezzenek, melyek nagy affinitással kötik a plazmin(ogén)t és nagyon alacsony affinitást mutatnak az egyéb proteinekkel, például az egyéb szerin proteázokkal szemben, és főképp nagyon alacsony affinitást mutatnak a fibrinogénnel szemben, mely a Plazma Cohn-féle I-es frakcióban vagy a kriopreciptátum a fő protein alkotórészt jelenti. Az is lényeges, hogy a plazmin(ogén) egy adott affinitás kromatográfiával végzett eltávolítása elvégezhető számos pufferrel és nem korlátozódik egy bizonyos pufferre, mely esetleg veszélyezteti az oldatban levő proteinek stabilitását és integritását, mivel ezek az igazán fontosak, nem pedig a plazmin(ogén).

Az ω-amino-karboxilsavak antifibrinolitikus potenciája (az a képessége, hogy a plazmin(ogén)t nagy affinitással köti a fibrinogénhez) a szabad amino- és karboxilcsopotok jelenlététől függ, valamint a COOH-csoport és azon szénatomok közötti távolságtól, melyekhez az NH_2-csoport kapcsolódik (Markwardt, 1978), például az ε-amino-kaproinsav

(EACA) és a p-amino-benzamidin (PAMBA). Az EACA és a PAMBA antifibrinolitikus aktivitása közötti összehasonlítás azt mutatta, hogy ez utóbbi, körülbelül háromszor aktívabb. Shimura és munkatársai (1984) egy olyan gyantát terveztek, melyben a p-amino-benzamidin kötődött a hidrofil vinil polimer mikrorészecskéihez egy „spacer" (kötő) egységen keresztül. Ezt a gyantát használva, Shimura és munkatársai képesek voltak a plazmint és a plazmin(ogén)t szeparálni nagy teljesítményű affinitás kromatográfiával. A tény, hogy a plazmin(ogén) nem eluálható magában 6-amino-hexánsavval, és hogy 3M karbamidot kell felhasználni az elúciós pufferben, azt jelzi, hogy a plazmin „két-helyes" kölcsönhatásba lép ezzel az immobilizált ligandummal, azaz a lizin-kötő helyekkel a nehéz láncon és a katalitikus hellyel a könnyű láncon. Ez magyarázhatja más kutatók azon eredményét, hogy a p-amino-benzamidin eltávolít az egyéb proteinekből is valamennyit.

Egy másik gyantát, a lizin gyantát, a plazmin(ogén) affinitási tisztításához készítik és használják. Azonban a lizin antifibrinolitikus potenciája nagyon alacsony és így alacsony a kötési affinitása is. Ez kötődik egyéb proteinekhez is és specifitása puffer függő.

Moroz, L.A. és Gilmore, N.J. (Fibrinolysis in normal plasma and blood: evidence for significant mechanisms independent of the plasminogen-plasmin system, Blood, 1976, 48, 531-45) egy affinitás kromatográfiával elöállított plazmin(ogén)–mentes plazma készítményt írtak le. Az alkalmazott módszerekre alapozva a szerzők olyan megfigyelésekről számoltak be, melyek azt jelzik, hogy azok a folyamatok, melyek a plazmin fibrinolitikus enzim létrejöttében kulminálódnak, legfeljebb csak kisebb szerepet játszanak a normál humán plazmában mérhető spontán vagy alap fibrinolitikus aktivitásban. Tranexamin savat együtt használtak más proteáz inhibitorokkal, például plazmin inhibitorokkal, a fibrinolitikus aktivitás méréséhez. A

plazmin(ogén)-mentes plazma előállításához Deutsch és Meltz módszerét (Science, 170:1095-1096, 1997) alkalmazták.

Iwamoto (a Thrombos. Diathes. Heamorrh. (Stuttg.) 1975, 33, 573) a tranexamin sav plazminhoz való specifikus kötődését írta le. Bár a tranexamin savat a plazmin erőteljes ligandumaként azonosították, azt jelzik, hogy a tranexamin sav anti-fibrinolitikus hatása nem csupán a plazmin(ogén)hez való kötődés eredménye, hanem a természetes antiplazminok kooperációjának fokozásából is adódik. Ezért, levonható az a következtetés, hogy a tranexamin sav szilárd támasztékhoz való kötődése nemcsak a plazmin(ogén)t távolítja el a plazmából, hanem az antiplazminokat is. Az is feltételezhető, hogy a tranexamin sav a plazmin inhibítorokkal való aggregátumok (konglomerátumok) képződését idézheti elő. Ez az értelmezés arra az ellentmondásra épül, ami akkor tapasztalható, ha az ε-amino-kapronsav és a tranexamin sav anti-fibrinolitikus aktivitását összehasonlítjuk, ami 98 és 91%-os gátlást eredményez az urokináz-stimulálta plazmában az olyan plazmával szemben, mely heparinizált orális vérből származik (sorrendben 65 és 39% az ε-amino-kapronsav és a tranexamin sav esetében – lásd a 2. és 7. táblázatot a Moroz et al., irodalomban). Azt is várhatnánk, hogy nagy kötési arányuknak köszönhetően, a tranexamin sav és az ε-amino-kapronsav jó jelöltek a nagy affinitású ligandumok számára. Azonban azt is várhatnánk, hogy ezek a ligandumok gátolják az affinitási oszlopot, a plazmin és a plazmin inhibitor komplexek kötésének eredményeként.

Az alábbiakban röviden bemutatjuk a csatolt rajzokat.

Az 1. ábra két módszerrel (az anyagok és módszerek leírásakor mutatjuk be) eluált 7 µg protein grádiens gél SDS-PAGE-jét mutatja (5-12% poliakrilamid), a módszerekben három különböző gyantát használtunk – TEA-Sepharose, Lys-Ceramic Hyper DF és Lys-Sepharose 4B. Az 1-es sáv – Glu-plazminogén; a 2-es sáv – fibrinogén; a 3-as sáv

albumin; a 4-es sáv – Immunoglobulin G; az 5-ös sáv – molekulatömeg marker; az elúciós csúcsok: 6 – TEA a módszerrel; 7 – TEA a 2-es módszerrel; 8 – Lysin Ceramic Hyper D 1-es módszerrel; 9 – Lysine-Sepharose 1-es módszerrel; 10 – Lysine Ceramic Hyper D 1-es módszerrel; 11 – Lysine Sepharose 1-es módszerrel.

Az alábbiakban összefoglaljuk a jelen találmányt.

A jelen találmány arra az eredményre épül, hogy egy szilárd aminosav meglepő módon képes specifikusan kötődni a plazmin(ogén)hez. „Specifikus kötődésen" ebben a szövegösszefüggésben azt értjük, hogy egy proteineket, például plazmin(ogén)t és fibrinogént tartalmazó keverékből, lényegében a plazmin(ogén)t eltávolítjuk, miközben a fibrinogént majdnem érintetlenül a keverékben hagyjuk. Előnyösen a plazmin(ogén) legalább 85-99%-át eltávolítjuk, és a fibrinogén legalább 85%-a megmarad a keverékben. Még előnyösebben a plazmin(ogén)t legalább 98,0 – 99,9%-ban távolítjuk el, míg a fibrinogén 95-99%-a megmarad.

Az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 - 8 Angstrom, előnyösen körülbelül 7 Angstrom távolságra található, és a szilárd aminosav kovalensen kötődik egy támasztékhoz az aminosav aminocsoportján keresztül. Különösen előnyös a tranexamin sav transz konfigurációjában és a 4-amino-metil-biciklo-[2.2.2.]-oktán-1-karboxilsav (EMBOCA).

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy az első helyen az ε-amino-kapronsav nem működik ugyanolyan jól, mint a tranexamin sav, és ha a tranexamin sav egyszer kötődik a szilárd felszínhez, elveszíti extra plazmin(ogén) kötő kapacitását (az úgynevezett kooperációt) és a gyanta csak a plazmin(ogén)t távolítja el a plazmából vagy a plazma termékekből. Ha az ε-amino-kapronsavat kapcsoljuk az oszlophoz, extra plazmin(ogén) aktivitása továbbra is megmarad, és még mindig köti a

fibrinogént és egyéb proteineket a plazmából, míg a jelen találmány szerinti tranexamin sav extra plazmin(ogén) aktivitása teljesen megszűnik. Azonban, a tranexamin sav gyanta plazmin(ogén)nel szembeni affinitás érintetlen.

A szilárd aminosavat egy megfelelő „spacer"-rel kapcsoljuk, főleg egy 3 szénatomnál hosszabb „spacer"-rel, és a támaszték és az affinitási anyag felhasználhatja a plazmin(ogén)t a proteineket tartalmazó keverékből, anélkül, hogy a továbbiakban változtatna a protein oldat összetételén. Az eltávolítás elvégezhető különböző pufferek jelenlétében. A jelen találmány módszere alkalmas a plazmin(ogén) tiszta frakcióinak előállítására is az affinitási támasztékról való eluálás után.

Az alábbiakban részletesen bemutatjuk a jelen találmányt.

A jelen találmány egy olyan módszerrel kapcsolatos, mely fibrinogén jelenlétében a plazmin(ogén) specifikus eltávolítására vagy izolálására szolgál egy plazmin(ogén)t tartalmazó keverékből, a módszer során a keveréket egy szilárd aminosavval hozzuk kapcsolatba, melyben az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 - 8 Angstrom távolságra, előnyösen körülbelül 7 Angstrom távolságra található egymástól, és a szilárd aminosav kovalensen kötődik a támasztékhoz az aminosav aminocsoportján keresztül.

Előnyösen, a jelen találmány szerinti módszerben a keverék test nedveket, például vért, vér frakciókat, krioprecipitátumot, sejttenyészeteket, állati szövet kivonatokat, például szarvasmarha tüdő, szarvasmarha bél vagy állati csont kivonat zselatint, szarvasmarha szérum albumint, valamint állati eredetű, vízzel nem vegyíthető zsírokat, például lanolint (PC-foszfatidil-kolint) jelent.

A jelen találmány módszere felhasználható nagy tisztaságú plazmin(ogén) megfelelő keverékekből való kinyerésére. Miután a

keveréket kapcsolatba hoztuk egy szilárd aminosavhoz kötődő például kromatográfiás anyaggal, a plazmin(ogén) eluálható a szilárd affinitási anyagból. Mint ilyen, a szilárd fázisú extrahálás elmélete itt is alkalmazható. A plazmin(ogén) eluálható egy olyan ligandumot tartalmazó oldattal, mely versenyez a szilárd aminosav, például a tranexamin sav kötő helyeivel a plazmin(ogén) proteinen. Az ilyen ligandumok tipikusan az ε-aminosavak, előnyösen a lizin. Például, a lizin felhasználható 0,85 tömeg% - 0,99 tömeg% koncentrációkban. Egyéb koncentrációk is alkalmazhatók, különösen, ha az elúciós közeg ionerősségét az egyéb alkotórészek, például az elektrolitok egyensúlyban tartják.

A szilárd fázisból eluáló plazmin(ogén) kiszabadítható az elúciós pufferből egy olyan módszer alkalmazásával, mely extrahálja a puffer komponenseket, például dialízissel. A jelen találmány módszere szerint kinyerhető plazmin(ogén)t nagyon nagy tisztaság jellemzi. A sajátos tulajdonság egyértelmű az adatokból:

1. összefoglaló táblázat

A plazmin(ogén) specifikus aktivitása, tisztítási faktora és krio-szegény FFP plazmából való kinyerése előnyös felviteli és elúciós körülményeket használva, az egyes gyanták esetében

Használt gyanta	Módszer	Specifikus aktivitás (mg plazmin(ogén) /mg protein)	Tisztítási faktor	Kinyerés (%)
TEA-Spehyarose 4B	2	0,794	567	91,6
Lysin-Creamic Hyper DF	2	0,444	444	10,9
Lysine-Sepharose 4B	1	0,121	101	11,6

2. összefoglaló táblázat

A krio-szegény FFP plazmából való plazmin(ogén) eltávolítás összehasonlítása előnyösen felviteli körülményeket használva az egyes gyanták esetében

Alkalmazott gyanta	Módszer	Eltávolítás (%)
TEA-Spehyarose 4B	1 és 2*	99,5
Lysin-Creamic Hyper DF	1	54,6
Lysine-Sepharose 4B	1	58,0

* Mindkét módszer azonos a nem kötött csúcs összegyűjtéséig és összegyűjtésében.

Amint az az összefoglaló táblázatokból látható, ha a kereskedelemben kapható immobilizált-Lysine ligandumokat és a TEA gyantát tartalmazó gyantákat használjuk optimalizált körülmények között, a plazmin(ogén) specifikus aktivitása és kinyerése nagyobb TEA gyantával (1. összefoglaló táblázat). Megjegyzésre érdemes az is, hogy a TEA gyanta sokkal hatékonyabb a plazmin(ogén) krio-szegény plazmából való eltávolításában (amint azt a Glu-plazmin(ogén)hez való teszt jelzi), mint a lizin gyanta (2-es összefoglaló táblázat).

Az eluátumok tisztaságát SDS-gél elektroforézissel értékeljük. A három különböző gyanta (TEA-Sepharose, Lys-Ceramic Hyper DF és Lys-Sepharose 4B) eluátumait SDS-PAG-nek vetjük alá oly módon, hogy 5-12% akrilamid grádienst viszünk fel és 7 µg proteint sávonként. A kapott Coomassie Blue-val megfestett gélt az 1. ábra mutatja.

Az 1. ábra a proteinek 7 µg mennyiségeinek grádiens gél SDS-PAGE (5-12% poliakrilamid) vizsgálatát mutatja be, amit két módszert használva végeztünk el (a későbbiekben írtuk le), három különböző gyantát – TEA-Sepharose, Lys-Ceramic Hyper DF, és Lys-Sepharose 4B – használva. Az 1-es sáv – Glu plazminogén; 2-es sáv: fibrinogén; 3- sáv: albumin; 4-es sáv: Immunoglobulin G; 5-ös sáv: molekulatömeg marker; Elúciós csúcsok: 6-os sáv: TEA módszerrel; 7-es sáv: TEA 2-es módszerrel; 8-as sáv: Lysin Ceramic Hyper D 1-es módszerrel; 9-es sáv: Lysine Sepharose 1-es módszerrel; 10-es sáv: Lysine Ceramic Hyper D, 1-es módszerrel; 11-es sáv Lysine Sepharose 1-es módszerrel.

A kapott protein sávok és a termék tisztasága jó korrelációban van a plazmin(ogén) specifikus aktivitásával, amint azt az 1-es összefoglaló táblázat mutatja. Ez azt jelzi, hogy a TEA-Sepharose gyanta használata erősen tisztított plazmin(ogén)t eredményez, csupán kis albumin szennyezettséggel. Úgy tűnik, nincs további tisztításra szükség ezen termék klinikai indikációkban való felhasználásához.

Ezért egy plazmin(ogén)t tartalmazó készítmény szintén a jelen találmány részét képezi.

A jelen találmány tárgyát képezi egy olyan támaszték is, mely kovalensen kötődik egy szilárd aminosavhoz, ahol az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 - 8 Angstrom távolságra, előnyösen körülbelül 7 Angstrom távolságra található.

A jelen találmány módszerének elvégzéséhez való támaszték előnyösen egy kromatográfiás anyag, mely képes kötni egy szilárd aminosavat, ahol az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 - 8 Angstrom távolságra, előnyösen körülbelül 7 Angstrom távolságra található. Az aminocsoport és a karboxilcsoport közötti távolságot lényegében állandó szinten tartjuk az aminosav szilárd felépítésének köszönhetően. Az aminosav szilárdsága aliciklikus gyűrűkkel, előnyösen ciklohexán gyűrűvel érhető el, ahol az aminocsoportot és a karboxilcsoportot az aliciklikus gyűrű 1,4 pozíciójában rendezzük el. Aromás rendszerek, például helyettesített benzoesavak vagy alanin helyettesített ecetsav – szintén a jelen találmány körébe tartoznak.

A jelen találmánynak megfelelően, a támaszték előnyösen kötött aminosavakkal rendelkezik, melyek tranexamin savat vagy EMBOCA-t jelentenek.

A jelen találmány módszere szerint alkalmazandó kromatográfiás anyag, például egy hidrofil anyag, lehet például agaróz, cellulóz, szabályozott pórusú üveg, lehetnek szilikagélek, dextránok vagy egy szerves mesterséges polimer, például poliakrilamidokra polisztirénekre alapozott polimer. A tipikus anyagok beszerezhetők a kereskedelemben az alábbi márkaneveken: Sephacryl® (Pharmacia, Sweden), Ultragel® (Biosepara, France), TSK-Gel Toyopearl® (Toso Corp. Japan), HEMA (Alltech Ass. (Deer-field, Il, USA), Eupergit® (Rohm Pharma, Darmstadt,

Germany). Aztaktonokra alapozott anyagok is alkalmazhatók (3M, St. Paul, Minn. USA). Különösen előnyös az Agarose® vagy a Sepharose®. Ezek az anyagok beszerezhetők a kereskedelemben, például a Sigma-tól (St. Louis).

Egy előnyös kiviteli alakban a jelen találmány szerinti módszert szemcsés kromatográfiás anyagot vagy egy monolitikus tömb-anyagot használva végezzük el. A szemcsés anyag szuszpendálható egy megfelelő közegben és a kapott szuszpenzió használható például egy kromatográfiás oszlopban. Azonban a jelen találmány módszere elvégezhető „batch" formátumban is. Ezen kívül, a polimerek használhatók szemcsés anyagként, vagy membránok formájában is.

A tranexamin sav előnyösen egy kötőn keresztül kötődik a támasztékhoz, előnyösen egy a támaszték és a tranexamin sav közötti kétfunkciós kötőn keresztül. Ha kétfunkciós kötőt használunk, az lehet N-hidroxi-szukcinimid, DAPA, CNBr, epoxi, diamino-dipropilamin (DADPA), 1,6 diaminohexán, borostyánkősav, 1,3-diamino-2-propanol, etilén-diamin (EDA), TNB, piridil-diszulfid, jód-acetamid, maleimid aktivált támaszték vagy ezek kombinációja.

A jelen találmány módszerének elvégzéséhez való támasztékot előnyösen egy olyan egységgel módosítjuk, mely a primer vagy szekunder aminocsoportokkal reagál.

A jelen találmány módszerének megfelelően, a keveréket a támasztékkal együtt inkubáljuk megfelelő ideig, majd nátrium sókat, kalcium sókat, puffer sókat tartalmazó semleges vizes oldattal eluáljuk, miután a keveréket kapcsolatba hoztuk a tranexamin savhoz kötött támasztékkal. Ezt követően, a plazmin vagy a plazmin(ogén) eluálható egy megfelelő mennyiségű lizint vagy a kovalensen kötött tranexamin savval versengő ekvivalens anyagot tartalmazó oldattal.

A jelen találmány tárgyát képezik a természetes forrásokból származó olyan keverékek, melyek lényegében plazmin(ogén) és plazmin mentesek.

Részletesen, a jelen találmány keveréke vér, vér származék, vagy vér frakció, vagy krioprecipitátum.

A jelen találmány szerinti vér származék főként plazma eredetű véralvadási faktor vagy véralvadási faktorok, például FVIII, FIX, fibrinogén, fibronektin, α_1-antitripszin, anti-thrombin III, von Willebrand faktor, albumin és immunoglobulin keveréke.

Ezen kívül, a tranexamin savat kovalens kötéssel tartalmazó támaszték is a jelen találmány tárgyát képezi. A jelen találmány támasztéka előnyösen egy kromatográfiás anyag, még előnyösebben egy hidrofil kromatográfiás anyag, például dextrán, vagy egy szerves mesterséges polimer, mint például a fent említett polimer. Nagyon előnyös támaszték az Agarose® vagy a Sepharose®, melyhez tranexamin sav kötődik.

A támasztékot létrehozó kromatográfiás anyag lehet szemcsés vagy monolitikus tömb-anyag. Ez utóbbit Hermanson és munkatársai írták le (Hermanson, G.T., Mallia, A.K., and Smith, P.K. 1992, „Immobilization Affinity Ligand Techniques" pp. 454, Academic Press, Inc., San Diego, USA), mely a hivatkozás révén részét képezi a jelen találmánynak.

A jelen találmány egy másik előnyös kiviteli alakjában a tranexamin sav a támasztékhoz egy a támaszték és a tranexamin sav közötti kötőn keresztül kapcsolódik. Ez előnyös, ha a támaszték nem rendelkezik olyan funkciós csoportokkal, melyek képesek a tranexamin sav kovalens megkötésére. Ekkor a támasztékot először funkcionalizáljuk, majd egy olyan kötővel reagáltatjuk, mely képes megkötni a tranexamin savat. A „spacer" karok vagy fonalak kis molakulatömegű molekulák, melyeket közvetítő kötőkként használunk egy támaszték vagy mátrix és egy affinitási ligandum között, mely a jelen találmány szerint, egy szilárd

szerkezettel rendelkező aminosavat jelent, és ahol az aminocsoport körülbelül 6 - 7 Angstrom távolságra van a karboxilcsoporttól. Előnyösen, a „spacer"-ek két funkciós csoporttal rendelkeznek mindkét végükön a ligandumhoz és a támasztékhoz való könnyű kapcsolódáshoz. A „spacer" tipikusan egy olyan szénhidrogén vegyületet jelent, mely két funkciós csoporttal rendelkezik a vegyület végein. A két vég egyike kovalensen kötődik a mátrixhoz, hagyományos vagy *per se* ismert reakciókat használva. A másik vég kovalensen kötődik a ligandumhoz egy másik kapcsolódási eljárást használva.

Előnyösen, a kötő egy bifunkcionális kötőt jelent, például N-hidroxi-szukcinimidet, DAPA-t, CNBr-t, epoxit, diamino-dipropilamint (DADPA), 1,6-diamino-hexánt, borostyánkősavat, 1,3-diamino-2-propanolt, etilén-diamint (EDA), TNB-t, piridil-diszulfidot, jódacetamidot, maleimid aktivált támasztékot vagy ezek kombinációját.

Mivel számos funkcionalizált támaszték kapható a kereskedelemben, előnyös lehet egy olyan támasztékkal kezdeni, melyet egy a primer vagy szekunder aminocsoportokkal reagáló egységgel módosítottak.

A jelen találmány módszere a továbbiakban részletesebben is leírásra kerül, például egy lényegében plazmin(ogén) mentes krioprecipitátum készítményének felhasználásával, mely kiinduló anyag lehet számos vér eredetű termékhez.

A krioprecipitátumot affinitás kromatográfiának vetjük alá egy immobilizált ligandummal, hogy egy adszorbeált frakciót és egy nem adszorbeált frakciót kapjunk. Az adszorbeált frakcióból eluálható anyag a plazmin(ogén).

Az immobilizált ligandum lehet bármely analóg, mely kölcsönhatásba léphet a plazmin(ogén) lizin kötő helyekkel. Az immobilizált ligandumok előállítására szolgáló eljárás, melyet a jelen

találmány szerint alkalmazunk, az alábbiakban kerül leírásra. A következő példák illusztrációként szolgálnak nem pedig korlátozó jellegűek.

1. példa

Különböző ε-amino-karboxilsav ligandumok immobilizálása

Különböző „spacer"-ekkel kombinált és különböző gyantákban levő ε-amino-karboxilsav ligandumok sorozatát állítjuk elő vagy vásároljuk meg (ha beszerezhető a kereskedelemben), hogy értékeljük a plazma eredetű oldatokból a plazmin(ogén) eltávolítást. A következő táblázat összefoglalja az összes vizsgált kombinációt (a gyanták alatti szám arra a szekcióra vonatkozik, ahol az egyes kombinációkhoz való szintézist az alábbiakban leírtuk):

1. táblázat

Ligandum / Kötő	p-benzamidin	Arginin	Tranex. sav	ε-amino-hexánsav	Lizin
N-hidroxi-szukcinimid				Sepharose 4B (1)	
DADPA	Agarose 4% (2)	Agarose 4% (3)	Agarose 4% (4)		
CNBr		Sepharose 4B (5)	Sepharose 4B (6)		
Epoxi	Sepharose 6B (10)	Sepharose 6B (7)	Sepharose 6B (8)		Ceramic Hyper DF (9)

1) az ε-aminohexánsav N-hidroxi-szukcinimid-észter Sepharose 4B-t a Sigma-tól vettük

2) a p-aminobenzamidin-Agarose 4% előállítása

A következő eljárást használjuk a diamino-dipropilamin (DADPA) Agarose 4%-on (Pierce) való immobilizálásához, a reakció egy amin-terminálló „spacer" gélen megy végbe, amit azután egy anhidriddel módosítunk. 25 ml DADPA-Agarose gélt mosunk tisztított vízzel, majd a gélt azonos térfogatú tisztított vízben szuszpendáljuk. A szuszpenzió keveréket lassan keverjük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, miközben hozzáadunk 2,5 g borostyánkősav anhidridet. A kevertetés végén a szukcinilált gélt egymás után tisztított vízzel, 1M NaCl-lel és ismét tisztított vízzel mossuk, hogy eltávolítsuk a feleslegben levő nem reagált borostyánkősavat.

A TNBS-sel (Sigma) végzett negatív teszt azt jelzi, hogy az összes DADPA amint sikeresen blokkoltuk borostyánkősavval.

Az immobilizált, szukcinilált DADPA-t 250 ml tisztított vízzel mossuk, majd a feleslegben levő vizet leszívatjuk, hogy nedves „pogácsát" kapjunk, és az anyagot egy 500 ml-es főzőpohárba tesszük. A gélt 25 ml 0,1M MES pufferben (pH 4,7) reszuszpendáljuk, és lassan kevertetjük, miközben 0,25 g p-aminobenzamidint (Sigma) és 0,75 g EDC-t (Pierce) adunk hozzá. A reakciókeverék pH-ját 4,7 értéken tartjuk 1 órán keresztül 0,5M NaOH folyamatos hozzáadásával. Ezután a reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten hagyjuk lassú, folytonos keverés mellett.

A gélt egymás után egyenként 0,5 L tisztított vízzel, 0,1M nátrium-acetáttal (pH 4,7), 0,5M nátrium-bikarbonáttal és tisztított vízzel mossuk.

Az immobilizált p-aminobenzamidint felhasználásig 0,02% nátrium-azidban tároljuk 4°C hőmérsékleten.

3) Arginin – Agarose 4%

Az Arginin-Agarose 4% szintézist előnyösen a fenti p-aminobenzamidin-Agarose 4% eljárásnak megfelelően állítjuk elő, (lásd 2.)

4) Tranexamin sav (TEA) – Agarose 4%

A tranexamin sav (TEA) – Agarose 4% szintézist előnyösen a fenti eljárásnak megfelelően állítjuk elő, p-aminobenzamidin-Agarose 4% (lásd 2.)

5) Arginin – Sepharose 4B

A következő eljárást használjuk az Arginin vagy a Tranexamin sav CNBr-Sepharose 4B-n (Pharmacia), mint „spacer" gélen való immobilizálásához. A két ligandum két különböző koncentrációban (10 vagy 0,01 mmól/ml száraz gél) való szintézise hasonló, ahogy azt ebben és a következő szekcióban (5-6) bemutatjuk.

CNBr aktivált Sepharose 4B 2,5 g mennyiségét szuszpendáljuk 50 ml 1 mM HCl-ben. A gélt 10 percig duzzasztjuk szobahőmérsékleten, majd 15 percig mossuk 500 ml 1 mM HCl-lel, zsugorított üveg szűrőn.

Arginint oldunk fel 12,5 ml párosító pufferben, 0,5M NaCl-t tartalmazó 0,1 M $NaHCO_3$-ban (pH 8,3). A ligandumot tartalmazó párosító oldatot összekeverjük a géllel egy műanyag kémcsőben, majd 1 éjszakán át forgatjuk 4°C hőmérsékleten.

Az inkubálás végén ebből a keverékből kimossuk a feleslegben levő ligandumot 10 gél térfogat párosító pufferrel, zsugorított üveg szűrőt használva. A protein oldatot 3 ciklusban mossuk 50 ml puffert használva változó pH értéken (0,5M NaCl-t tartalmazó 0,1M acetát pufferrel, pH 4; amit 0,5M NaCl-t tartalmazó 0,1M Tris-HCl pufferrel (pH 8) végzett mosás követ). Az immobilizált Arginin-Sepharose 4B-t a felhasználásig 4°C hőmérsékleten tároljuk 0,02% nátrium-azidban.

6) Tranexamin sav (TEA)-Sepharose 4B

Ezt a szintézist a fenti Arginin-Sepharose 4B eljárásnak megfelelően végezzük el (lásd az 5) részt).

7) Arginin-Sepharose 6B

Az arginint két különböző koncentrációban (2 mmól vagy 0,2 mmól/ml száraz gél) a kereskedelemben kapható immobilizált Epoxy Sepharose 6B-hez (Pharmacia) kapcsoljuk az alábbiak szerint:

Epoxy aktivált Sepharose 6B 2,5 g mennyiségét szuszpendáljuk 200 ml tisztított vízben. A gélt körülbelül 5 percig duzzasztjuk szobahőmérsékleten, majd 1 órán keresztül mossuk aliquot részenként hozzá adott 500 ml tisztított vízzel, zsugorított üveg szűrőn keresztül.

Húsz ml párosító puffert (0,1M $NaHCO_3$, pH 9,3 és 0,5M HCl) és a duzzasztott gélt Arginint tartalmazó két kémcsőbe öntjük. A keverékeket két műanyag csőben kevertetjük egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten.

Az inkubálás végén ebből a keverékből kimossuk a feleslegben levő ligandumot 5 gél térfogat párosító pufferrel, zsugorított üvegszűrőt használva. A terméket 3 ciklusban mossuk változó pH értéken (0,1M acetát pufferrel, pH 4; és 0,5M NaCl pufferrel, amit 0,1M Tris-HCl pufferrel (pH 8) és 0,5M NaCl-lel végzett mosás követ). Az immobilizált Arginin-Sepharose 6B-t a felhasználásig 4°C hőmérsékleten tároljuk 0,02% nátrium-azidban.

8) Tranexamin sav (TEA)-Sepharose 6B

Ezt a szintézist előnyösen a fenti Arginin-Sepharose 6B eljárásnak megfelelően végezzük el (lásd a 7) részt).

9) L-Lizin epoxi aktivált Ceramic HyperDF Hydrogelt a Sigma-tól vásárolunk.

10) A Sepharose 6B-hez kovalensen kapcsolódó p-aminobenzamidint a Pharmacia-tól vásárolunk.

2. példa

A különböző affinitás kromatográfiás gyanták szkrínelése plazmin(ogén) eltávolításra

1 IU/ml plazmin(ogén)t és 50 mg/ml fibrinogént tartalmazó humán plazma összegyűjtött krioprecipitátumot használunk a következő vizsgálathoz.

Fagyasztott krioprecipitátum aliquot mennyiségeit kiolvasztjuk 37°C hőmérsékleten és BN1 pufferrel szemben dializáljuk (0,12M NaCl, 10mM Tri Na-citrát, 1 mM $CaCl_2$, pH 7,0). Ezt a protein oldatot egy 5 µm Depth szűrőn átszűrjük, hogy tiszta oldatot kapjunk. Egy 5 ml-es, 8,36 mm-es átmérőjű fecskendő hengert megtöltünk az 1. példában leírtak szerinti 1,5-1,5 ml (nedves térfogat) affinitási gyantával: immobilizált ε-aminohexánsav (Sepharose 4B CNBr-t használva „spacer"-ként), immobilizált p-aminobenzamidin/Arginin/TEA-val (Agarose 4%, DADPA-t használva „spacer"-ként), immobilizált Arginin/TEA-val (Sepharose 4B CNBr-t használva „spacer"-ként), immobilizált Arginin/TEA-val (Sepharose 6B epoxit használva „spacer"-ként), és immobilizált L-Lizinnel (Ceramic HyperDF Hydrogel epoxit használva „spacer"-ként). Az optimalizált gél elhelyezési eljárás a következő: az elhelyezett gélt az alábbiakkal mossuk: 4 - 4 térfogat i) tisztított vízzel; ii) 1M NaCl-lel; iii) tisztított vízzel; iv) TLN 0,1 pufferrel (Tris 0,05M, Lysine 0,02M, 0,1M NaCl, pH 9,0), v) TLN 1 pufferrel (Tris 0,05M, Lysine 0,02M és 1M NaCl, pH 9,0) és vi) tisztított vízzel. Az összes mintát, felvivő és mosási puffert a fecskendő hengerbe adjuk 1000 rpm fordulatszámon 1 percig tartó, 25°C hőmérsékleten végzett centrifugálás után. Az ekvilibrálást 4 térfogat BN1-gyel végezzük és az előszűrt, koncentrált krioprecipitátumot

felvisszük a gyantára (2:1 térfogat/térfogat, sorrendben), majd ezt a keveréket 1 órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten. A nem kötött „centrifugás" mosások aliquot részeit műanyag kémcsövekben gyűjtjük össze az egyes centrifugálások után. A gyantát legalább 13 oszlop térfogat BN1 pufferrel mossuk, míg az $O.D._{280}$ eléri a 0,02 értéket. A plazmin(ogén) eluálását TLN 1 pufferrel végezzük, amit 4 ágytérfogat 3M NaCl-lel végzett mosás követ. A mini oszlopokat szorosan lezárjuk és 4°C hőmérsékleten tároljuk.

Azokat a gyantákat, melyek az eljárás alatt tönkremennek, vagy melyek a plazmin(ogén) kevesebb, mint 50%-át távolítják el, korán kizárjuk a vizsgálatból. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

Plazmin(ogén) P eltávolítás a nem kötött anyagban, különböző immobilizált ligandumot használva BN1 pufferrel

Immobilizált ligandumok	A plazmin(ogén) eltávolítás (%)
ε-amino-haxánsav CNBr-t használva „spacer"-ként	13,36
p-Amino-benzamidin DADPA-t használva „spacer"-ként	Nincs (az oszlop nem sikerült)
p-Amino-benzamidin Epoxy-t használva „spacer"-ként	19,78
Arginin, DADPA-t használva „spacer"-ként	6,04*
TEA (nagy konc.) CNBr-t használva „spacer"-ként	0
TEA (kis konc.) CNBr-t használva „spacer"-ként	0
Arginin (kis konc.) CNBr-t használva „spacer"-ként	23,25
Arginin (kis konc.) Epoxy-t használva „spacer"-ként	0
Arginin (nagy konc.) Epoxy-t használva „spacer"-ként	5,61

* Ez az adat három futtatás átlaga

A fenti táblázat azt mutatja, hogy a plazmin(ogén) krioprecipitátumból való eltávolításához legjobb ligandumok olyan affinitási géleket tartalmaznak, melyek elég robusztusak ahhoz, hogy megtartsák a szekvenciát a felvitelekor, a mosásokkor, és az eluáláskor anélkül, hogy összeomlanának, vagy olyan gélek, melyek a felvitt fibrinogén több, mint 50%-át megtartják.

A 3. táblázat a különböző gél típusok hatékonyságát mutatja a plazmin(ogén) eltávolításban, valamint fibrinogén megtartó kapacitásukat egy koncentrált krioprecipitátumban.

A krioprecipitátumban jelen levő maradék plazmin(ogén) adszorbeálódik a gyantákon, miközben a fibrinogén nem, és így a kapott felülúszót lényegében plazmin(ogén) mentessé teszi.

A fibrinogén tartalmat alvadási idő teszttel mérjük, míg a plazmin(ogén) tartalmat kromogén vizsgálattal határozzuk meg.

A plazmin(ogén) és fibrinogén lizin gélekből való számított kinyerései arany standardként szolgálnak az összes egyéb használt gél ligandumhoz. A 2. táblázatban bemutatott eredmények azt jelzik, hogy ezek az epoxi „spacer"-rel rendelkező TEA ligandumok biztosítanak kiváló plazmin(ogén) eltávolítását és magas fibrinogén kinyerést (lásd a 3. táblázatot).

Az immobilizált TEA magas koncentrációja a plazmin(ogén) jobb eltávolítását, és hasonló fibrinogén kinyeréseket eredményezett a lizin kötött ligandumokhoz viszonyítva: sorrendben 89% versus 92% a fibrinogén, és 89% versus 56% a plazmin(ogén) eltávolítás esetében. Az összes többi gyanta sokkal kevésbé hatékony a plazmin(ogén) eltávolításban vagy a fibrinogén kinyerésben.

3. táblázat

Nem kötött anyagban, BN1 pufferrel és különböző immobilizált ligandumokkal végzett fibrinogén kinyerésekkel és plazmin(ogén) eltávolítással kapott adatok összefoglalása

Immobilizált ligandumok	Plazmin(ogén) eltávolítás (%)	Fibrinogén kinyerés (%)
Lizin, „spacer"-ként epoxit használva	56*	92*
TEA, „spacer"-ként DADP-t használva	49	84
TEA (alacsony konc.), „spacer"-ként Epoxy-t használva	44,35	88,62
TEA (nagy konc.), „spacer"-ként Epoxy-t használva	89	89
Arginin (nagy konc.) „spacer"-ként CNBr-t használva	91,26	49

* Ezek az adatok három futtatás átlagát jelentik.

3. példa

A foszfát puffer és a BN1 hatása a lizin és TEA immobilizált gyanta affinitás kromatográfiás profiljára

A krioprecipitátumot alumínium-hidroxiddal kezeljük, hogy adszorbeáljuk a K vitamin-függő véralvadási faktorokat, majd egy oldószer detergens keverékkel (SD-1% Tri (n-butil)foszfát, 1% Triton X-100) inkubáljuk 4 órán keresztül 30°C hőmérsékleten, hogy inaktiváljuk a

lipidbe burkolt vírusokat. Az SD reagenst eltávolítjuk kasztorolajos extrahálással és hidrofób kölcsönhatású kromatográfiával, majd a készítményt pasztörizáljuk (10 óra, 60°C) stabilizátorként szacharóz és glicin jelenlétében.

Pasztőrözés után, a szacharózt és glicint diaszűréssel eltávolítjuk. Tranexamin savat (TEA) és arginin-hidrokloridot adunk hozzá stabilizátorként a sterilszűrés előtt. A stabilizált termék aliquot részeit -30°C hőmérsékleten tartjuk a felhasználásig.

A fagyasztott, vírus inaktivált krioprecipitátum aliquot részeit megolvasztjuk 37°C hőmérsékleten és BN1 pufferrel szemben (0,12M NaCl-t, 0,01M Tri Na-citrátot, 1 mM $CaCl_2$-őt, pH 7,0) vagy másik lehetőségként 25 mM foszfát pufferrel szemben dializáljuk. Ez utóbbi oldatot egy 5 µm-es Depth szűrőn engedjük át, hogy tiszta oldatot kapjunk.

A 10 mm átmérőjű oszlopot (Biorad, USA) 6 ml (nedves oszlop) immobilizált TEA-val (TEA Sepharose 6B) vagy immobilizált Lizinnel (Ceramic HyperDF/Sepharose 4B) töltjük fel, majd az alábbi oldatok 4-4 térfogatnyi mennyiségeivel mossuk egymás után: i) tisztított víz; ii) 1M NaCl; iii) tisztított víz; iv) TLN 0,1 puffer (0,1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9,0); v) TLN 1 puffer (1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9) és vi) tisztított víz. Az ekvilibrálást 4 térfogatnyi BN1-gyel vagy másik lehetőséggel foszfát pufferrel végezzük. A szűrt krioprecipitátumot 100 µl/perc átfolyási sebességgel visszük fel az oszlopra.

A nem kötött anyag mintáit műanyag kémcsövekben gyűjtjük össze, és a gyantát 16 oszlop térfogatnyi BN1 pufferrel vagy foszfát pufferrel mossuk. A plazmin(ogén) elúcióját TLN 1 pufferrel végezzük, majd ezt követően mosást végzünk 4 térfogat 3M NaCl oldattal, 4 térfogat tisztított vízzel és 4 térfogat 1M NaCl-lel kiegészített 25% etanollal.

A 4. táblázat a plazmin(ogén) különböző típusú gyantákkal végzett eltávolításának és a fibrinogén kinyerésének hatékonyságát mutatja. A

fibrinogén tartalmat az alvadási idő teszttel (Clauss vizsgálat) mérjük, míg a plazmin(ogén) tartalmat egy kromogén vizsgálattal határozzuk meg.

A különböző gyanták közötti összehasonlítás azt jelzi, hogy a fibrinogén tartalom 95,4 – 96,4 %-a a nem kötött csúcsban marad meg, amikor BN1 puffert használunk. Ezzel szemben, a fibrinogén kinyerés alacsony, ha foszfát puffert használunk. Meglepő módon, csak az immobilizált TEA gyanta biztosít magas plazmin(ogén) eltávolítást és nagy fibrinogén kinyerést.

A lizin gyantával kapott eredmények is a BN1 pufferrel elért jobb hatékonyságot mutatják, a foszfát pufferhez képest.

4. táblázat

Az immobilizált gyantákkal, BN1 pufferrel vagy foszfát pufferrel végzett fibrinogén és plazmin(ogén) kinyerések tesztelése eredményeinek összefoglalása

Immobilizált ligandumok	Plazmin(ogén) eltávolítás (%)	Fibrinogén kinyerés (%)
TEA (nagy konc.) Epoxy + BN1 puffer	77,1	96,4
Lizin-Epoxy+BN1 puffer	68,87	95,4
Lizin-Epoxy+foszfát puffer	100	66,9
Lizin CNBr+BN1 puffer	62,5	121,8
Lizin CNBr+foszfát puffer	100	62,2

4. példa

Fagyasztott, vírus inaktivált krioprecipitátum aliquot részeit kiolvasztjuk 37°C hőmérsékleten és BN1 pufferrel (0,12M NaCl, 0,01M Tri

Na-citrát, 1 mM $CaCl_2$, pH 7,0), vagy másik lehetőségként 25 mM foszfát pufferrel szemben dializáljuk. Ez utóbbi oldatot átszűrjük egy 5 µm-es Depth szűrőn, hogy eltávolítsuk az oldhatatlan részeket.

Egy 26 mm átmérőjű oszlopra (Pharmacia, Sweden) felviszünk 50 ml (nedves térfogat) immobilizált TEA-t (TEA Sepharose 6B) és 4 térfogat tisztított vízzel és ugyanilyen térfogatú TLN 0,1 pufferre (0,1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9,0), TLN 1 pufferre (1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9) és tisztított vízzel mossuk. Az ekvilibrálást 4 térfogat BN1 pufferrel (NaCl, tri Na-citrát, $CaCl_2$, pH 7,0) végezzük és a szűrt BAC-ot 700 µl/ml átfolyási sebességgel engedjük át az oszlopon.

A nem kötött anyag mintáit műanyag edényben összegyűjtjük és a gyantát legalább 3 gél térfogatnyi BN1 pufferrel mossuk. A plazmin(ogén) elúcióját TLN 1 pufferrel végezzük, amit 3M NaCl-lel végzett mosás követ.

A két futtatásból származó nem kötött frakciókat összegyűjtjük és 4°C hőmérsékleten tartjuk a koncentrálásig. Végül, a BAC-ot körülbelül az eredeti térfogatra koncentráljuk diaszűréssel, egy 100-as lyukméretű membránt használva, B1 pufferrel szemben (Glicin, NaCl, Tri Na-citrát, $CaCl_2$, pH 7), amit egy 0,45 µm-es szűrőn való szűrés követ. Két % arginint adunk a szűrlethez.

A stabilitási tesztekhez, a kapott terméket sterilre szűrjük egy 0,2 µm-es szűrőn.

Amint az 5. táblázatban bemutatjuk, egy nagyobb és hosszabb oszlop alkalmazása javítja a TEA ligandum hatékonyságát, a fibrinogén kinyerése 100% és a plazmin(ogén) eltávolítása a plazmin(ogén) kromogén vizsgálat detektálhatósági szintje alatt van.

A diaszűrés előtti és utáni termékek közötti összehasonlítás egy 33%-os fibrinogén tartalombeli veszteséget jelez. Ez a jelenség olyan technikai problémákkal magyarázható, melyeket csak kis léptéknél figyeltünk meg. Az immobilizált TEA gyanta, minden kétséget kizáróan,

egyrészt kiváló plazmin(ogén) eltávolítást, másrészt kiváló fibrinogén kinyerést biztosít.

5. táblázat

A nem kötött csúcsban a fibrinogén és plazmin(ogén) kinyerések tesztelésével nyert adatok összefoglalása. Az egyes adatok két futtatás átlagából adódnak.

Minta	Fibrinogén kinyerés (%)	Plazmin(ogén) kinyerés (%)
Felvitel után	100	0
Felvitel és diaszűrés után	66,2	0*

* Az kinyert plazmin(ogén)t a minta összegyűjtése után 3,7-szeresére koncentráljuk.

Nem találtunk maradék TEA-t sem az eluált protein oldatban, sem a koncentrált ultraszűrt termékben. A tranexamin sav maradék szintjének analízisét HPLC-vel végezzük el.

Négy további futtatást végzünk, a plazmin(ogén) eltávolításához, ugyanazt a gyantát és futtatási körülményeket használva, mint amit már fent leírtunk (4. példa). Általánosságban a megvizsgált minták mindegyikének eredményei hasonlóak a fent bemutatott első eredményekhez.

Nem találtunk maradék TEA-t sem az eluált protein oldatban, sem a koncentrált ultraszűrt termékben. A Tranexamin sav maradék szintjének analízisét HPLC-vel végezzük el.

Nem figyeltünk meg adhéziót egyik sávval sem a plazmin(ogén) eltávolítása előtt, vagy után, ahogy azt patkány modellben vizsgáltuk.

A plazmin(ogén) eltávolítása előtti és utáni krioprecipitátumot lebomlásra teszteljük, szobahőmérsékleten való inkubálás során. Az

alvadásra képes proteinek százalékára vonatkozó adatokat (UV abszorbanciával mérjük) a különböző mintákban, a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

A dupla virálisan inaktivált, koncentrált krioprecipitátum szobahőmérsékleten való inkubálás utáni alvadásra képes protein százaléka a plazmin(ogén) tranexamin savhoz ligált Epoxy Sepharose 6B-vel végzett eltávolítása előtt és után

	Inkubációs idő (hetek)						
	0	1	2	3	4	5	6
Kezelés előtt	62,91	0	0	0	0	0	0
Kezelés után	73,44	70,80	68,24	65,69	63,69	63,84	62,46

A stabilitási teszteket olyan csíkokkal végezzük, melyeket a plazmin(ogén) eltávolítás előtt és után a krioprecipitátumból készítettünk, amit 37°C hőmérsékleten való inkubálás követett puffer jelenlétében. Ezeket a csíkokat glicin és/vagy arginin hozzáadásával vagy kihagyásával kezeljük. Az eredményeket az alábbi 7. táblázatban összegezzük.

7. táblázat

A lebontási idő a csíkokban a plazmin(ogén) eltávolítás előtt és után

Készítmény	Csíkok lebontási ideje (napok)						
	0	1	2	3	4	5	6
Kezelés előtt	+++						
Kezelés előtt+2% arginin	+++	-	-	-	-	-	-
Kezelés előtt+2% arginin+1% glicin	+++	-	-	-	-	-	-
Kezelés után	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Kezelés után+2% arginin+1% glicin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

+++ Ezek az adatok a csíkok meglétét jelölik

- Ezek az adatok a csík lebomlását jelölik

1. A következő példákban leírt vizsgálatokat normális, egészséges donorokból származó krio-szegény, összegyűjtött frissen fagyasztott plazmán végezzük el. Az egészséges donorokban az antiplazmin magas koncentrációja és a plazmin kis mennyiségei miatt 1) a plazmin nem detektálható funkcionális (kromogén) vizsgálattal (Schreiber AD, Kaplan AP, Austen KF, Plasma inhibitors of the components of the fibrinolytic pathway in man, J. Clin. Invest, 52:1394-1401, 1973). Következésképpen, lehetetlen

bemutatni egészséges donor plazma mintákból származó plazmin TEA gyantából való eltávolítását, tisztítását és kinyerését. Azonban egy kereskedelemben kapható, és a glu-plazmin(ogén) nagyon alacsony mennyiségeinek detektálására szolgáló ELISA kit, és ahogy korábbi vizsgálatokban tapasztaltuk, a TEA gyanta azonos affinitással rendelkezik a plazmin(ogén) mindkét formájával, valamint a plazminnal szemben (Fredenburgh JP., Nesheim ME, Lys plasmin(ogen) is a significant intermediate in the activation of Glu-plasmin(ogen) during fibrinolysis in vitro, J. Biol. Chem. 267.26150-6, 1992 és Miyashita C. Wenzel E., Heiden M. Plasmi(ogen): a brief introduction into its biochemistry and function. Haemostasis 1:7-13, 1988).

2. Így a glu-plazmin(ogén) mérései felhasználhatók a plazmában levő összes plazmin(ogén) indikátoraként.

5. példa

Az alábbiakban bemutatjuk a kromatográfiás lépést

Vizsgálatokat végzünk egy immobilizált TEA 1 IU/ml plazmin(ogén)t tartalmazó, krio-szegény, Frissen Fagyasztott Plazmából (FFP) való plazmin(ogén) eltávolításban mutatkozó hatékonyságának megállapításához Sepharose 4FF-en. A krio-szegény frissen fagyasztott plazma aliquot részeit kiolvasztjuk 37°C hőmérsékleten, és átszűrjük 3 µm-es Depth szűrőn az oldhatatlan proteinek eltávolítása céljából.

Egy 10 mm átmérőjű oszlopra (Pharmacia, Sweden) felviszünk 2 ml (nedves térfogat) immobilizált TEA-t és mossuk 4 térfogat tisztított vízzel, és ugyanilyen térfogat TLN-0,1 pufferrel (0,1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9,0), TLN-1 pufferrel (1M NaCl, Lizin 0,02M, Tris 0,05M, pH 9,0) és tisztított vízzel). Az ekvilibrálást 4 térfogat BN1 pufferrel (0,12M NaCl, 0,01M Tri Na-citrát, 1 mM $CaCl_2$, pH 7,0) végezzük, és a

szűrt plazmát (körülbelül 20IU plazmin(ogén)) 1 ml/perc átfolyási sebességgel engedjük át az oszlopon.

Az átfolyt anyagot összegyűjtjük és műanyag üvegekben lefagyasztjuk, a gyantát legalább 3 térfogat BN1 pufferrel mossuk. A plazmin(ogén) elúcióját TLN-1 pufferrel végezzük, melyet megközelítően 3 térfogat 3M NaCl-oldattal, két térfogat tisztított vízzel és két térfogat 20% etanol+1M NaCl-lel való mosás követ (1-es módszer). A második módszerben (2-es módszer) ugyanezt az eljárást hajtjuk végre, mint amit az 1-es módszerben használunk, de további mosást végzünk 3M NaCl-lel a plazmin(ogén) eluálása előtt.

Az alábbiakban bemutatjuk az analitikai módszereket:

A glu-plazmin(ogén) detektálási vizsgálat: az ezen kísérletekben használt Immunclone® Glu-plasmin(ogen) ELISA kit (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) egy olyan enzimhez kötött szendvics immunvizsgálat, mely a natív humán glu-plazmin(ogén) szintek meghatározásához specifikus. A vizsgálat mennyiségi határértéke (a legalacsonyabb kalibrációs görbe standardnek megfelelően) plazmában vagy plazma származékokban 0,063 µg/ml.

Plazmin aktivitás: egy fibrinolitikus vizsgálatot végzünk el az eluátumokban levő plazmin aktivitás fél-mennyiségi meghatározásához. Röviden, plazmin(ogén) mentes fibrinogént (Enzyme Research) inkubálunk normál összegyűjtött plazma (Unicalibrator, Stago), vagy az affinitási oszlopokról eluált tisztított plazmin(ogén) különböző koncentrációival, feleslegben levő sztreptokináz jelenlétében. Az alvadék teljes lebomlásának idejét feljegyezzük, és a minta teljes alvadék lebontásához hasonlítjuk.

A protein meghatározása: A teljes proteint a Bradford módszert (Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

binding. Anal. Biochem. 72:248-54, 1976) használva végezzük el. A 8a. és 8b. táblázatok a humán plazma Glu-plazmin(ogén) TEA ligandummal való kromatográfiás eltávolításának és tisztításának eredményeit mutatja be. A 8a. táblázat a plazmin(ogén) tisztítás eredményeit mutatja be. A táblázat azt mutatja, hogy a 2-es módszer valamivel jobb plazmin(ogén) tisztítást eredményez, mint az 1-es módszer, a tisztítás 567-szeres, és a hozam 91,6%. A 8b. táblázat azt mutatja, hogy átlagosan a plazmin(ogén) 99,5%-át távolítottuk el a nem kötött frakcióból, amit leginkább az eluátumban kinyert mennyiség magyaráz (8a. táblázat).

8a. táblázat

A TEA gyanta további, 3M nátrium-kloriddal végzett mosásának (1-es módszer vs 2-es módszer) hatása a specifikus aktivitásra és tisztításra valamint a plazmin(ogén) plazmából való kinyerésére

	1. Módszer	1. Módszer	2. Módszer	2. Módszer
Frakció	Kiindulási anyag	Eluátum	Kiindulási anyag	Eluátum
Térfogat (ml)	40	13,2	40	20
Protein (mg/ml)	46,96	0,291	55,41	0,180
Glu-plazmin(ogén) (µg/ml)	65,4	18,2	78,0	142,9
Plazmin(ogén) (IU/ml)	Nincs elvégezve		kb. 0,5	kb. 1
Specifikus aktivitás (mg plazmin(ogén) /mg protein)	0,0014	0,625	0,0014	0,794
Tisztítási faktor	446		567	
A plazmin(ogén) kinyerés %-a	91,8		91,6	

8b. táblázat

Plazmin(ogén) eltávolítás a plazmából (két módszer eredményeinek átlaga)

Módszer	Kromatográfiás frakció	Glu-plazmin(ogén) (átlag µg/ml)	Térfogat (átlag, ml)	Plazmin(ogén) eltávolítás (%)
1 & 2*	Plazma	71,7	40,0	99,5
	Nem kötött frakció	0,18	83,5	

* Az 1-es és a 2-es módszer azonos egészen a nem kötött (átfolyó) frakció összegyűjtéséig, illetve ebben.

6. példa

A kromatográfiás körülmények hatása egy immobilizált-lizin ligandum hatékonyságára a plazmin(ogén) affinitás tisztításában

Kromatográfiás lépés:

Egy immobilizált-lizin ligandummal ellátott gyantát használó affinitás tisztítást végzünk el két, a kereskedelemben beszerezhető lizin gyantával. Az irodalomban dokumentált kromatográfiás módszert (lásd Robbins, K.C., Summaria, L., Plasmin(ogen) and Plasmin, Methods Enzymol. 45:257-73, 1976; az alábbiakban leírt 2-es kódszerhez), valamint egy a bejelentők laboratóriumában kifejlesztett módszert (1-es módszer, lent) használunk.

Két immobilizált Lizin gyantát (a kerámia HyperDF-et, amit a Biosepra gyárt, és a Speharose 4B-t, amit a Pharmacia gyárt) teszünk 10 mm átmérőjű oszlopokba (Pharmacia, Sweden). Az egyes oszlopok 2 ml (nedves térfogatú) gyantát tartalmaznak.

Krio-szegény, frissen fagyasztott plazma aliquot részeit kiolvasztjuk 37°C hőmérsékleten és 3 µm-es Depth szűrőn átszűrjük, hogy tiszta oldatot kapjunk.

A kromatográfiás lépést az alábbi módszerek szerint végezzük el:

1-es módszer:

Az oszlopot az alábbi oldatok 4-4 térfogatnyi mennyiségeivel mossuk: 1) tisztított víz; 2) TLN-0.1; 3) TLN-1 és 4) tisztított víz. Az ekvilibrálást 4 térfogat BN1-gyel végezzük. A 40 ml szűrt plazmát 1 ml/perc átfolyási sebességgel helyezzük az oszlopra. Az átfolyt anyag mintáit összegyűjtjük műanyag üvegekben, és a gyantát BN1 pufferrel mossuk. A plazmin(ogén) elúcióját TLN-1 pufferrel végezzük, amit 3M NaCl oldattal, 2 térfogat tisztított vízzel és 2 térfogat 20% etanol+1M NaCl-lel végzett mosás követ.

2-es módszer (5. referencia):

Krio-szegény, frissen fagyasztott plazma (40 ml) aliquot részeit átszűrjük egy 3 µm-es Depth szűrőn. Négy ml 0,5M Trist, 0,2M lizint, 1M NaCl puffert (pH 9) adunk a 40 ml mennyiségű szűrt plazmához.

Az oszlopot 4 oszlop térfogat tisztított vízzel mossuk, és 0,1M foszfát pufferrel (pH 7,4) ekvilibráljuk. A hígított plazmát 1 ml/perc átfolyási sebességgel engedjük át a gyantán. A nem kötött anyag mintáit összegyűjtjük műanyag palackokban, és a gyantát 0,1M foszfát pufferrel (pH 7,4) mossuk, míg a kifolyó anyag 280 nm hullámhosszon mért abszorbanciája eléri az alapvonalat. Ezután a plazmin(ogén)t 0,1M foszfát pufferben (pH 7,4) feloldott, 0,2M ε-amino-kapronsavval eluáljuk, és műanyag edényben összegyűjtjük. Az eluálást úgy folytatjuk, hogy megközelítően 2 térfogat 3M NaCl oldattal és tisztított vízzel mosást végzünk.

A 9a, és 9b táblázatok összevetik a plazmin(ogén) két a kereskedelemben kapható immobilizált lizin gyantával végzett eltávolítását és tisztítását, két különböző tisztítási módszert használva. Bár viszonylag kis különbség van az eluátumokban (9a) a plazmin(ogén) kinyerések között, látható, hogy a 2-es módszert és a Ceramic HyperDF gyantát használva sokkal nagyobb plazmin(ogén) tisztítást lehet elérni.

Az eredmények azt mutatják, hogy Lys-Ceramic Hyper DF gyantát és a 2-es kromatográfiás módszert használva 444-szeres tisztaságot értünk el. Ezen kívül, a kiindulási anyagban levő plazmin(ogén) legnagyobb részét a csúcs frakciókban nyerjük ki (76,5% a nem kötött frakcióban + 10,9% az eluátumban, és a felvitt plazmin(ogén) csupán körülbelül 10%-a veszett el). Azonban a nem kötött frakcióból való plazmin(ogén) eltávolítás csupán 23,5%-os.

9a. táblázat

Specifikus aktivitás, tisztítási faktor és plazmából való plazmin(ogén) kinyerés két különböző, a kereskedelemben beszerezhető immobilizált lizin gyanta, és két különböző kromatográfiás módszer használatával

Frakció	1. módszer			2. módszer		
	Terhelés	Eluátum		Terhelés	Eluátum	
		Ceramic Hyper DF	Sepha-rose 4B		Ceramic Hyper DF	Sepha-rose 4B
Térfogat (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-plazmi-no-gén (µg/ml)	65,4	40,3	41,9	60,8	32,2	19,9
Specifikus aktivitás (mg plazmino-gén /mg protein)	0,0012	0,116	0,121	0,001	0,444	0,030
Tisztítási faktor		97	101		444	30
Kinyerés (%)		12,5	11,6		10,9	8,2

9b. táblázat

Plazmin(ogén) eltávolítás a nem kötött csúcsokban, mindkét módszer esetében

Módszer	Alkal-mazott gyanta	Kromato-gráfiás frakció	Térfogat (ml)	Glu-plazmin-(ogén) µg/ml	Teljes Glu-plazmin-(ogén) (µg)	Plazmin(ogen) eltávolítás (%)*
1	Ceramic Hyper DF	Plazma	40	65,4	2616	54,6 (45,4)
		Nem kötött	72	16,5	1188	
	Sepharose 4B	Plazma	40	65,4	2616	58,0 (42,0)
		Nem kötött	82	13,4	1099	
2	Ceramic Hyper DF	Plazma	40	60,8	2432	23,5 (76,5)
		Nem kötött	89	20,9	1860	
	Sepharose 4B	Plazma	40	60,8	2432	33,0 (67,0)
		Nem kötött	91	17,9	1629	

* A zárójelben levő értékek a nem kötött csúcsokban kinyert plazminogént képviselik

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Plazminogént vagy plazmint tartalmazó keverékből plazminogén vagy plazmin fibrinogén jelenlétében való specifikus eltávolítására szolgáló in vitro módszer azzal jellemezve, hogy a keveréket egy szilárd aminosavval hozzuk kapcsolatba, ahol az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja 6 – 8 Angstrom, előnyösen 7 Angstrom távolságra vannak, és a szilárd aminosav egy hordozóhoz az aminosav aminocsoportján keresztül kovalensen linkerdik.

2. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a keverék testnedvet, például vért, vér frakciókat, krioprecipitátumot, sejt tenyészetet, állati szövet kivonatokat, például szarvasmarha tüdő, szarvasmarha bél vagy állati csont kivonat zselatint, szarvasmarha szérum albumint, valamint állati eredetű, vízzel nem vegyíthető zsírokat, például lanolint (PC-foszfatidil-kolint) jelent.

3. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a hordozó kromatográfiás anyag.

4. A 3. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag hidrofil anyagot, például agarózt, cellulózt, szabályozott pórusú üveget, szilikagéleket, dextránokat vagy egy szerves mesterséges polimert, például poliakrilamidokra polisztirénekre alapozott polimert jelent.

5. A 3. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag agaróz vagy sepharose.

6. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag szemcsés anyag vagy monolitikus tömb-anyag.

7. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a szilárd aminosav a hordozóhoz egy, a hordozó és a tranexaminsav közötti linkeren keresztül kötődik.

8. A 7. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a linker egy bifunkcionális linker.

9. A 8. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a bifunkcionális linker N-hidroxi-szukcinimidet, DAPA-t, CNBr-t, epoxit, diamino-dipropil-amint (DADPA), 1,6-diamino-hexánt, borostyánkősavat, 1,3 diamino-2-propanolt, etilén-diamint (EDA), TNB-t, piridil-diszulfidot, jód-acetamidot, maleimid aktivált hordozót vagy ezek kombinációját jelenti.

10. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a hordozót egy olyan egységgel módosítjuk, mely primer vagy szekunder aminocsoportokkal reagál.

11. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a keverék tranexaminsavval kötött hordozóval való kapcsolatba hozása után a keveréket a hordozóval inkubáljuk elegendő ideig ahhoz, hogy megkösse a plazminogént vagy a plazmint, majd nátrium sókat, kalcium sókat, puffer sókat tartalmazó semleges vizes oldattal eluáljuk.

12. Az 1. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a keverék kapcsolatba hozása után a plazmint vagy a plazminogént egy olyan vizes oldattal eluáljuk, mely elegendő mennyiségű olyan ligandumot

tartalmaz, ami a hordozóhoz kötött szilárd aminosav plazminogén linker helyeivel verseng.

13. A 12. igénypont szerinti módszer, azzal jellemezve, hogy a ligandum lizin.

14. Egy szilárd aminosavhoz kovalensen kötődő hordozó, azzal jellemezve, hogy az aminosav aminocsoportja és az aminosav karboxilcsoportja körülbelül 6 – 8 Angstrom, előnyösen körülbelül 7 Angstrom távolságra található.

15. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy az aminosav tranexaminsav vagy 4-amino-metil-biciklo-[2.2.2.]-oktán-1-karbonsav.

16. A 14. vagy 15. igénypontok szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a hordozó egy kromatográfiás anyag.

17. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag hidrofil anyagot, például agarózt, cellulózt, szabályozott pórusú üveget, szilikagéleket, dextránokat vagy egy szerves, mesterséges polimert, például poliakrilamidokra polisztirénekre alapozott polimer.

18. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag agaróz vagy sepharose.

19. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a kromatográfiás anyag szemcsés anyagot vagy egy monolitikus blokk-anyagot jelent.

20. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a tranexaminsav a hordozóhoz egy, a hordozó és a tranexaminsav közötti linkeren keresztül kötődik.

21. A 20. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a linker egy bifunkcionális linkert jelent.

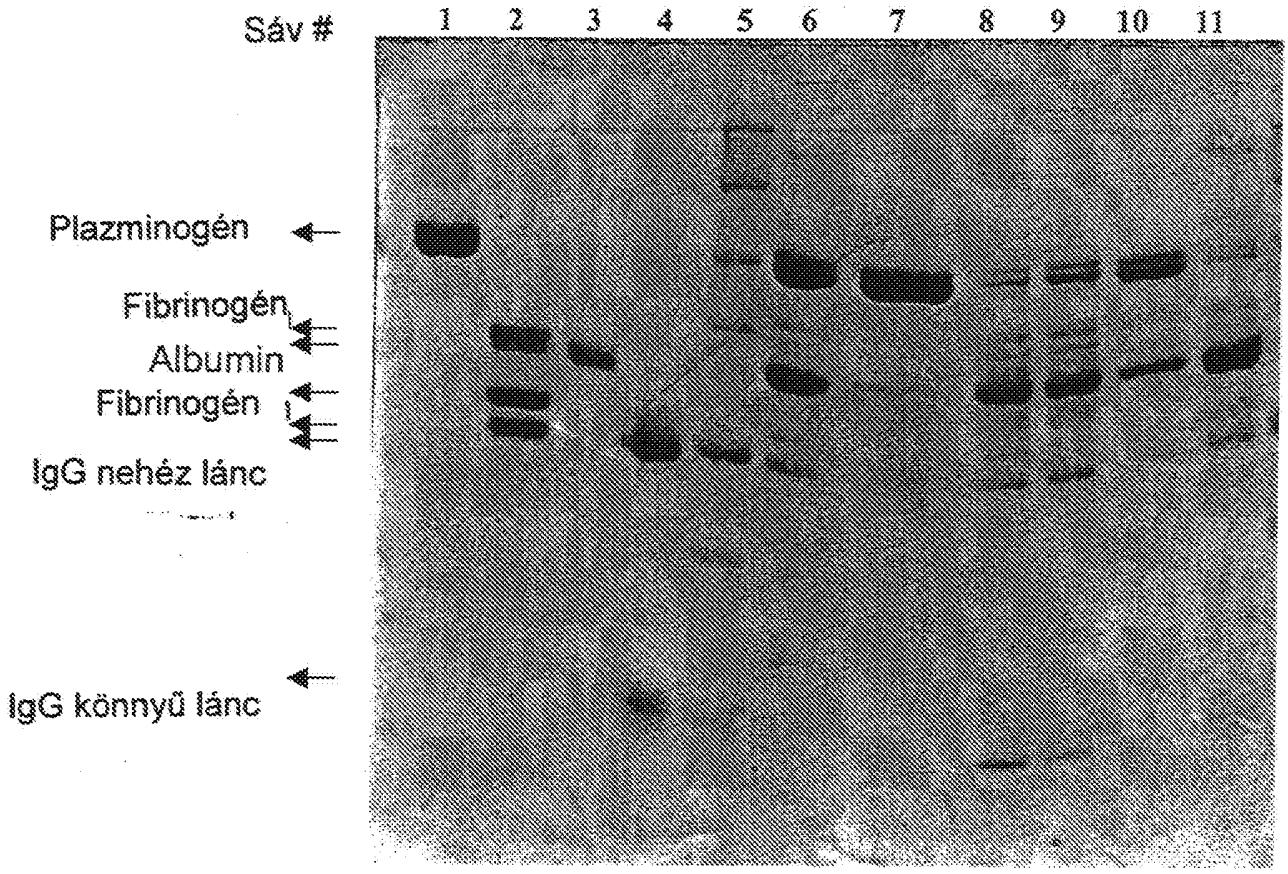
22. A 21. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a bifunkcionális linker N-hidroxi-szukcinimidet, DAPA-t, CNBr-t, epoxit, diamino-dipropil-amint (DADPA), 1,6-diamino-hexánt, borostyánkősavat, 1,3 diamino-2-propanolt, etilén-diamint (EDA), TNB-t, piridil-diszulfidot, jód-acetamidot, maleimid aktivált hordozót vagy ezek kombinációját jelenti.

23. A 14. igénypont szerinti hordozó, azzal jellemezve, hogy a hordozót egy olyan egységgel módosítjuk, mely primer vagy szekunder aminocsoportokkal reagál.

A meghatalmazott

Dr. Szentpéteri Ádám
Szabadalmi ügyvivő
SBGK Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1099 Fax: 461-1099
Email: szentpeteri@sbgk.hu

P0600110



1. ábra