

04571.

1563 / 93

KERESZTNEVEZÉS TARTALMAZÓ
 IMIDOÉSZTERREL TÉRHÁLÓSÍTOTT HEMOGLOBIN KÉSZÍTMÉNYEK BEJÁRATI-
 LÁRA

THE UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, Michigan, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 10. 03.

Elsőbbsége: 1990. 11. 29. (07,619,840)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/07155

A bejelentés benyújtásának dátuma: 1990. 10. 03.

KIVONAT

A találmány az élő sejtekhez történő oxigén-szállításra alkalmas térhálósított hemoglobin készítmény-re vonatkozik. A készítményben lévő hemoglobin lényegében szennyeződésmentes és egy imidoészterrel térhálósított. A hemoglobin túlnyomóan tetramer formában van jelen a készítményben és P50 értéke legalább 1,733 kPa (13 Hgmm). Előnyösen a térhálósított hemoglobin készítmény túlnyomóan legalább 64000 értékű molekulatömeggel rendelkezik.

A találmány ~~magában foglalja~~ a térhálósított hemoglobin ~~készítmény~~ előállítási eljárását ~~is~~. Ennek során egy tisztított hemoglobin lizátumot imidoészterrel legalább 8,0 értékű pH-n, egy Tris-HCl-ot tartalmazó polimerizációs oldatban térhálósítanak, miáltal a térhálósított hemoglobin túlnyomórészt 64000 értékű molekulatömeggel és legalább 1,733 kPa (13 Hgmm) P50 értékkel rendelkezik.

A tisztított és térhálósított hemoglobin az autooxidációval szemben megnövelt keresztkötés-stabilitással rendelkezik, s jól alkalmazható az emlősök számára vérhelyettesítőként, illetve oxigénszállító folyadékként.

Gnall

1563

A

64571

Képviselő:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda

~~Budapest~~

1563 / 93 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NS20x COT K 15 122
AGI K 37 114

IMIDOÉSZTER KERESZTKÖTÉST TARTALMAZÓ HEMOGLOBIN ~~KÉSZÍTMÉNYEK~~ ÉS ELJÁRÁS ELŐÁLLÍTÁSUKRA

THE UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, Michigan,

Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

GARLICK Robert Lee, Augusta, Michigan,

MARTIN Joseph Patrick, Richland, Michigan,

LYLE Stephen Baker, Kalamazoo, Michigan,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 10. 03.

Elsőbbsége: 1990. 11. 29. (07/619,840)

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/07155

A nemzetközi bejelentés dátuma: 1991. 02. 01.

9725

A találmány tárgya új eljárás olyan, tisztított hemoglobin készítmény előállítására, amely alkalmas a vér helyettesítésére a humán vagy állati szervezetekben transzfúzió során vagy felhasználható oxigénszállító folyadékként. A keresztkötéses hemoglobintermék lényegében szennyeződésmentes, amennyiben csak nagyon kis mennyiségben tartalmaz bakteriális endotoxint és foszfolipidet.

A hemoglobin szerkezetét és funkcióját a korábbiakban már részletesen áttekintették [Bunn. H. F., and B. G. Forget, *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 690 pp., (1986)]. Az emlős hemoglobin egy tetramer, amely két, egymástól eltérő, alfa és béta alegység két-két tagját tartalmazza. Mindegyik alegység hozzávetőleges molekulasúlya 16000 és egy centrális vasatommal rendelkező hemo csoportot tartalmaz. A proteinrégió vagy globin a hemo csoportban lévő vasnak a redukált vagy ferro-állapotban tartását biztosítja, lehetőséget nyújtva arra, hogy a hemoglobin-molekula az oxigént reverzibilisen megkösse.

Az emlős hemoglobint nem egy olyan, statikus tetramerként kell elképzelni, amely egy 64000-68000 molekulasúlyú egyetlen proteinfajta. Valójában kovalens kötésekkel egymáshoz kapcsolódó alegységekből épül fel, és monomer-dimer, valamint dimer-tetramer kölcsönhatásokat magában foglaló dinamikus egyensúlyban létezik.

A hemoglobin mindenkor hozzávetőleg 16000 molekulatömegű monomerek, 32000 molekulatömegű dimerek és tetramerek meghatározott összetételéből áll. A monomer-, dimer- és tetramerfajták oldatban lévő eloszlása függ a hemoglobin koncentrációjától, a hemoglobin ligandállapotától, a pH-tól, valamint a hemoglobint tartalmazó oldat sóösszetételétől.

Az emlős hemoglobint a vörösvértestek vagy eritrociták tartalmazzák. Az emlősökben ezek a különleges sejtek az érés során elvesztették sejtmagjaikat, és más proteineket csak igen alacsony koncentrációban tartalmazva, egyszerűen csak a hemoglobin zsákjaiként funkcionálnak. A hemoglobin számos okból kifolyólag kapcsolódik a keringő eritrocitákhoz. Elsőként, ha a hemoglobin nem a sejtekben volna, hanem helyette szabadon, oldatban áramlana, a kapillárisfalakon, a vesén vagy egyéb helyeken történő átjutással igen könnyen kikerülne a keringésből. Bizonyos gerinctelen organizmusok ezt a problémát úgy oldották meg, hogy milliós nagyságrendben lévő molekulatömegű polimer hemoglobinokat fejlesztenek, amelyek túlságosan nagyok ahhoz, hogy átjussanak a kapillárisokon és a vese nefronján. A vörösvértestek által nyújtott további funkciók közé tartoznak például a következők: a védett környezet, amely a hemoglobin-molekulát megvédi a proteolitikus szérumproteinektől; a hemoglobin funkciójának ellátását lehetővé tevő ionegyensúly fenntartása; a hemben lévő vas

redukált (funkciós) állapotban tartását biztosító enzimrendszer; valamint az allosztérikus effektor (végrehajtó) molekulák jelenlétének irányítása (kontrollja).

A humán szervezetben végzett transzfúzió során alkalmazott vér helyettesítésére alkalmas tisztított, sztrómamentes hemoglobinoldatok előállítására igen jelentős erőfeszítések történtek már a korábbiakban. [*Blood* 4: 380-385, (1949); Rabiner, S. F., Helbert, J. R., Lopas, H., and L. H. Friedman, Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J. Exp. Med.* 126: 1127-1142 (1967); Christensen, S. M., Medina, F., Winslow, R. W., Snell, S. M., Zegna, A., and M. A. Marini, Preparation of human hemoglobin Ao for possible use as a blood substitute. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 17: 143-154 (1988); és Feola, M., Gonzalez, H., Canizaro, P. C., Bingham, D. and P. Periman, Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg. Gyn. Obst.* 157: 399-408 (1983)]. Ezekben az oldatokban a hemoglobin egy módosítás nélküli állapotban van, s a hemoglobin szabadon az alegységeivé disszociálhat. A módosítatlan hemoglobin infúziója a hemoglobinnak a keringésből történő gyors kiválásához vezet. Ezen túlmenően a módosítás nélküli hemoglobin infúziója - a beszámolók szerint - számos káros hatással jár a szervezetben, többek között vesemérgezést okoz. A módosítatlan hemoglobinnal összefüggésben álló nefrotoxicitás annak kimondására kényszerítette az Amerikai Egyesült

Államok hivatalos hatóságát (Center for Biologics Evaluation and Research of the U.S. Food and Drug Administration), hogy a hemoglobin alapú oxigénszállítóknban megtiltsa a módosítatlan hemoglobin jelenlétét.

A hemoglobinoldatoknak a hemoglobin polipeptid-láncai közötti kovalens kémiai kötések kialakításával történő stabilizálását számos közlemény leírja [Rausch, C. W., and M. Feola, Extra pure semi-synthetic blood substitute, PCT/US87/02967. bejelentési és WO/88/03408. közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés (1988. 05. 19.); Bonhard, K., and N. Kothe, Cross-linked hemoglobin of extended shelf life and high oxygen transport capacity and process for preparing same, 4,777,244. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Bucci, E., Razynska, A., Urbaitis, B., and C. Fronticelli, Pseudo cross-link of human hemoglobin with mono-(3,5-dibromosalicyl)fumarate. *J. Biol. Chem.* 264: 6191-6195 (1989); valamint a 4,001,200. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás].

Keresztkötéses hemoglobin készítményeket ismertettek a korábbiakban a 4,001,200., a 4,011,401., a 4,053,590. és a 4,061,736. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A keresztkötéses borjú (bovine) hemoglobint és annak előállítását írják le a következő helyeken: Feola, M., Gonzalez, H., Canizaro, P. C., Bingham, D. and P.

Periman, Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg. Gyn. Obst.* 157: 399-408 (1983); és a PCT/US87/02967. bejelentési és WO/88/03408. közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés (1988. 05. 19.).

A dimetil-adipinsav-imidát és normál humán hemoglobin (HbA), valamint sarlósejtes hemoglobin (HbS) reakcióit ismertetik a következő helyen: Plese, C. F., and E. L. Amma, Circular dichroism as a probe of the allosteric R-T transformation in hemoglobins and modified hemoglobins (1977). A 3,925,344. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás egy plazmaprotein anyag vagy plazmaexpander előállításához imidoészterekkel kialakított keresztkötéses hemoglobint ír le; ugyanakkor ez az anyag nem felel meg oxigénszállító folyadékként. Beszámoltak arról, hogy az imidoészterekkel (DMA) végzett térhálósítás megnöveli az oxigénnek az affinitását a hemoglobinhoz, amely alkalmatlanná teszi ezáltal a hemoglobint az oxigén szállítására és annak felszabadítására [Pennathur-Das, R., Heath, R. H., Mentzer, W. C., and B. H. Lubin, "Modification of hemoglobin S with dimethyl adipimide - Contribution of individual reacted subunits to changes in properties, *Biochim. Biophys. Acta* 704: 389-397 (1982); Pennathur-Das, R., Vickery, L. E., Mentzer, W. C., and B. H. Lubin, "Modification of hemoglobin A with dimethyl adipimide - Contribution of individual reacted subunits to changes in

oxygen affinity, *Biochim. Biophys. Acta* 580: 356-365 (1979)].

A korábbiakból következően szükség van a térhálósított hemoglobin előállításához egy olyan eljárásra, amely a hemoglobint stabilizálja, elsősorban tetramer formában, illetve többszörös tetramer formában, oly módon azonban, hogy az előállított keresztkötéses hemoglobin még olyan P50 értékkel (P50 a féltelítésnél mért parciális oxigénnyomás) és oxigénaffinitással rendelkezzen, amely kellőképpen alacsony az oxigénnek egy élő szervezetben történő szállításához, majd az oxigénnek a sejt számára történő felszabadításához. Lényeges tehát, hogy a molekulatömeg túlnyomóan legalább 64000 legyen (ami a hemoglobin tetramer formájának felel meg), kevés 64000-nél kisebb molekulatömeggel, azaz dimer vagy monomer formával, és kevés 64000-nél nagyobb molekulatömeggel együtt, amely molekulák kellőképpen nagyok ahhoz, hogy az emlős szervezetekben előnyös hatást váltsanak ki. Egy ilyen polimerizációs eljárásnak a kifejlesztése rendkívül kívánatos volna annak érdekében, hogy egy eredményes oxigénszállító helyettesítőt találjunk.

A találmány egyik tárgya egy olyan stabil, térhálósított hemoglobin készítmény, amely alkalmas az oxigén szállítására és felszabadítására az élő sejtekben. A hemoglobin lényegében szennyeződésektől mentes, s a

térhálósítást egy imidoészterrel végezzük, miáltal a hemoglobin túlnyomórészt tetramer vagy annál nagyobb formákban van jelen. A hemoglobin keresztkötéseinek kialakítására alkalmas előnyös imidoészterek közé tartozik a dimetil-adipinsav-imidát és a dimetil-parafasav-imidát. Tetramer vagy annál nagyobb formában lévő hemoglobinnak az tekinthető, amelyben a keresztkötéses hemoglobin legalább 80 %-a legalább 64000 dalton molekulatömeggel rendelkezik, még előnyösebben a keresztkötéses hemoglobin legalább 90-95 %-a legalább 64000 dalton molekulatömeggel rendelkezik. Ezen túlmenően az imidoészter keresztkötéses hemoglobin a met-hemoglobinhoz képest rendkívül stabil, valamint legalább 1,733 kPa (13 Hgmm) értékű oxigénaffinitással (P50) rendelkezik.

A kezelt emlős szervezetbe történő transzfúzió vagy injekció bejuttatásának elősegítésére vagy oxigén-szállító folyadékként az analitikai, transzplantációs vagy laboratóriumi felhasználásra a keresztkötéses hemoglobin készítmény magában foglalhat egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközeget is. A jellegzetes, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközegek közé tartozik a víz és a szalinoldat.

A találmány további tárgyát képezi egy eljárás keresztkötéses hemoglobin készítmény előállítására, amelynek során:

- a) emlős vért gyűjtünk be,
- b) a vörösvértesteket a begyűjtött vérből elkülönítjük és a vörösvértesteket mossuk,
- c) a mosott vörösvértesteket lizáljuk,
- d) a hemoglobin lizátum kinyeréséhez a lizált vörösvértesteket centrifugáljuk,
- e) a lizátumot anioncserélő vagy kationcserélő kromatográfiával tisztítjuk,
- f) a tisztított hemoglobin kinyerésére a kromatográfiából kapott eluált lizátumot ultrafiltrálásnak vagy mikrofiltrálásnak vetjük alá, és
- g) a túlnyomórészt tetramer formában lévő hemoglobin kinyerésére a tisztított hemoglobint egy imidoészterrel térhálósítjuk.

A vörösvértestek feloldását (lizálását) hipo-ozmotikus sokk segítségével végezhetjük. Az ultrafiltrálást jellegzetesen egy 300000 molekulatömegű membránnal, míg a mikrofiltrálást általában egy körülbelül 0,025 mikrométer és körülbelül 0,040 mikrométer közötti méretű szűrővel végezzük. Alternatív módon az imidoészterrel végzett térhálósítási (g) lépést elvégezhetjük a (d) lépésben nyert hemoglobin lizátummal,

miáltal az (e) lépés a keresztkötéses hemoglobin tisztításával kezdődik. Az eljárás magában foglalhat egy további, (h) lépést is, amelynek során a tisztított, térhálósított hemoglobint affinitáskromatografáljuk (méretkizárásnak vetjük alá), miáltal az alacsony (kisebb, mint 64000 dalton) molekulatömegű hemoglobint eltávolítjuk. Szokásosan a méretkizárást alacsony nyomású affinitáskromatográfiával végezzük.

A találmány egy olyan, imidoészter keresztkötéses hemoglobin készítményt ismertet, amely lényegében szennyeződésmentes, továbbá alapvetően tetramer vagy annél nagyobb formában van, s a hagyományos, például glutáraldehiddel térhálósított hemoglobinnál jobb stabilitással rendelkezik a hemoglobin oxidációjával szemben. A hemoglobin készítmény túlnyomórészben legalább 64000 dalton értékű molekulatömeggel és fokozott keresztkötés-stabilitással rendelkezik. A hemoglobin megfelel a véroxigén szállításának helyettesítőjeként az emlősökben vagy általánosan mint oxigénszállító folyadék.

A találmány eljárást ismertet hemoglobin tisztítására és térhálósítására olyan imidoészterekkel, amelyeket korábban még nem alkalmaztak a hemoglobin keresztkötéseinek kialakítására transzfúziós gyógyászati készítményként történő alkalmazás céljával. Ezek a bifunkciós imidoészter térhálósító anyagok egyebek között

magukban foglalják a dimetil-adipinsav-imidátot és a dimetil-parafasav-imidátot. A korábbiakban már alkalmazott hemoglobin térhálósító szerekhez viszonyítva az előbbi térhálósító anyagok jelentős előnyökkel rendelkeznek. Az általunk alkalmazott reakciókörülmények egy szűk molekulatömeg-eloszlást biztosítanak és lehetővé teszik az oxigén szállítását.

Az imidoészterek, amilyen például a dimetil-adipinsav-imidát és a dimetil-parafasav-imidát, két-funkciós térhálósító reagensek, amelyek specifikusan és gyorsan reagálnak, enyhe körülmények között. Stabil amidin adduktokat képeznek a lizincsoport epszilon-amino-csoportjaival és a polipeptidláncok aminoterminális aminjával [Wold, F. (1972) Bifunctional reagents. *Methods in Enz.* 25: 623-651; Peters, K., and F. M. Richards (1977) Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 523-551]. A térhálósító reagens jellegzetesen egy-két aminocsoporttal reagál hemoglobin alegységeként. Néhány keresztkötés a két béta lánc lizincsoport (béta-82) között fordul elő, s ez stabilizálja a humán hemoglobin tetramer formáját. A hemoglobin S számára sarlósejt-ellenes (antisickling) ágensként történő alkalmazásban már vizsgálták a dimetil-adipinsav-imidátot [Lubin, B. H., Pena, V., Mentzer, W. C., Bymun, E., Bradley, T. B., and L. Packer (1975) Dimethyl adipimide: a new anti-sickling agent. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 72: 43-46]. A

béta-82 lizin módosítása megváltoztatja a HbS dezoxigenált formájának konformációját, s ily módon megakadályozza annak kristályosodását vagy gélesedését. A kristályosodás jelenti a beteg vörösvértestek formájában megjelenő 'sarlósejtes jelenség molekuláris alapját. Jóllehet a sarlósejtes megbetegedés meggátlásához a béta-82 lizin térhálósító szerrel történő módosítása szükséges, egy hemoglobin tetrameren belül a két béta-82 lizin adott keresztkötésére nincs szükség. A jelen találmányban a dimetil-adipinsav-imidátot alkalmazzuk borjú hemoglobin esetén, azzal a szándékkal, hogy egyrészt a béta-82 lizinek közé alegységek közötti keresztkötések bevezetésével stabilizált tetramereket alakítsunk ki, másrészt a szeparált, stabilizált hemoglobin tetramerek epszilon-amino-csoportjai közötti intermolekuláris keresztkötések bevezetésével stabilizált tetramerek nagy molekulatömegű aggregátumait képezzük.

Az imidoészterek, és különösen a dimetil-adipinsav-imidát alkalmazásával végzett hemoglobin térhálósítás kettős előnnyel jár.

Először, a keresztkötés meggátolja a 64000 molekulatömegű tetramer hemoglobin 32000 molekulatömegű dimerekre történő disszociációját. A módosítatlan hemoglobinban a tetramer és dimer fajták dinamikus egyensúlyban vannak. Az imidoészterekkel végzett térhálósítás útján a tetramer hemoglobin stabilizációja alapvetően

lecsökkenti a hemoglobin átjutását a vesetubulusokba, azáltal, hogy megakadályozza az átszűrődést a glomeruláris kapszulák membránján keresztül.

Másodszor, a térhálósítás a hemoglobin tetramerek olyan, nagy molekulatömegű oligomerjeit eredményezi, amelyek különösen ellenállóak a veseszűréssel szemben, s fiziológiás hőmérsékleten az oxidációval szemben lényegesen stabilabbak, mint akár a módosítatlan hemoglobin, akár a glutáraldehid térhálósító szerrel módosított hemoglobin.

A dimetil-adipinsav-imidát viszonylag olcsó, s nagy mennyiségekben is hozzáférhető reagens. A dimetil-adipinsav-imidát alkalmazásával végzett eljárás alkalmas nagyobb méretekben történő végrehajtásra is, azaz az ipari felhasználásra.

Megvizsgáltuk és mértük a borjú hemoglobin különböző formáinak az oxigénkötő tulajdonságait. Az eredményeket az I. Táblázatban tüntettük fel. A P50 az a parciális oxigénnyomás, amelynél a lehetséges helyek 50 %-a köt meg oxigént. A Hill-koefficiens vagy n érték az oxigénkötő helyek közötti együttműködési készség kifejezése; a magas n érték nagyfokú együttműködésre utal. A P50 értékeket egyaránt mértük a hemoglobinoldat oxigenálásának és dezoxigenálásának ideje alatt. A fő P50 értékek a következők voltak: 1,80 kPa (13,5 Hgmm) a

dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított hemoglobin esetén; 1,90 kPa (14,25 Hgmm) a glutáraldehiddel térhálósított hemoglobin esetén; és 3,166 kPa (23,75 Hgmm) a módosítatlan borjú hemoglobin esetén. Amennyiben imidoészterekkel vagy glutáraldehiddel extrém térhálósítást végeztünk, ezeknél a hemoglobinoknál a P50 érték nagymértékben lecsökkent. Megállapítható tehát, hogy mind az imidoészterekkel, mind a glutáraldehiddel térhálósított hemoglobin esetén lecsökkent az együttműködési készség, azonban a glutáraldehiddel kezelt minták esetén a csökkenés nagyobbak látszott.

I. TÁBLÁZAT			
Hb minta	P50 oxi kPa	P50 dezoxi kPa	n
Borjú Hb	3,201	3,166	2,1 - 2,4
Glutáraldehiddel térhálósított	2,000	1,900	1,2
DMA-tal térhálósított	1,867	1,800	1,6
Glutáraldehyd feleslegével	0,933	0,867	1,1
DMA feleslegével	1,333	1,200	1,5

A különböző keresztkötésű hemoglobinok stabilitását összehasonlítottuk, és azt találtuk, hogy az imidoészteres változat rendelkezett a legkiválóbb stabilitással. Az imidoészter az alábbiakban ismertetendő specifikus térhálósítási eljárás körülményei között a stabilitást és az oxigénaffinitást figyelembe véve egy jobb oxigénszállító hemoglobint eredményezett.

A 36-37 °C hőmérsékletű inkubációs kísérletben a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses, a glutáraldehid keresztkötéses és a módosítatlan hemoglobin minták a megfelelő sorrendben 2,5 %, 8,0 % és 3,5 % methemoglobint tartalmaztak az inkubáció kezdetén. Öt órán keresztül végzett 36-37 °C hőmérsékletű inkubációt követően a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses, a glutáraldehid keresztkötéses és a módosítatlan borjú hemoglobin mintákban a methemoglobin százalékos értéke a megfelelő sorrendben 8,9 %, 44,4 % és 8 % volt. Huszon-négy óra elteltével a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses, a glutáraldehid keresztkötéses és a módosítatlan borjú hemoglobin mintákban a methemoglobin százalékos értéke a megfelelő sorrendben 24,1 %, 87,9 % és 42 % volt. Negyvennyolc óra után a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses és a nem térhálósított borjú hemoglobin mintákban a methemoglobin százalékos értéke a megfelelő sorrendben 46,5 % és 68 % volt. A methemoglobin-képződéssel szemben a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses hemoglobin stabilabb volt, mint a módosítatlan hemoglobin. A szakirodalom beszámol arról, hogy a glutáraldehid keresztkötéses humán hemoglobin autooxidációja négyszer gyorsabb, mint a módosítatlan humán hemoglobiné. Ennek alapján nemvárt eredmény volt, hogy a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses hemoglobin stabilabb, mint a módosítatlan hemoglobin.

A dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses, a glutáraldehid keresztkötéses és a módosítatlan borjú hemoglobin autooxidációval szembeni stabilitását vizsgáltuk úgy is, hogy a mintákat ugyanabban, a fentiekben ismertetett foszfátpufferben 4 °C hőmérsékleten 52 napon keresztül inkubáltuk. Huszonnyolc nap elteltével a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses borjú hemoglobinban 2,5 %-ról 9,6 %-ra nőtt a methemoglobin mennyisége. Azonos idő elteltével a glutáraldehid keresztkötéses hemoglobinban a methemoglobin mennyisége 8,0 %-ról 23,5 %-ra emelkedett. A mérést 52 nap után végezve a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses hemoglobin 14,3 % methemoglobint tartalmazott, míg a módosítatlan borjú hemoglobin 16,3 % methemoglobint tartalmazott már 37 nap elteltével. Akárcsak a 37 °C hőmérsékleten végzett inkubáció során, a dimetil-adipinsav-imidát keresztkötéses hemoglobin itt is szignifikánsan stabilabb volt, mint a glutáraldehid keresztkötéses vagy a módosítatlan borjú hemoglobin.

A találmány részét képezi az emlős hemoglobinok, közöttük a borjú hemoglobin stabilitásának fokozása imidoészterekkel, köztük dimetil-adipinsav-imidáttal végzett térhálósítást követően. Ismertetjük, hogy az emlős hemoglobinok stabilitása fokozható imidoészterekkel, különösen dimetil-adipinsav-imidáttal specifikus reakciókörülmények között végzett reakcióval. A fentiekben túlmenően eljárást írunk le tisztított, emlős

hemoglobin, különösen borjú hemoglobin előállítására. A hemoglobinnak lényegében szennyeződésmentesnek kell lennie, ami azt jelenti, hogy nem tartalmaz semmilyen anyagot olyan mennyiségben, ami a kezelt emlős számára bármilyen káros hatást okozhatna. A hemoglobinnak a térhálósítást megelőzően kellőképpen mentesnek kell lennie endotoxintól (például egy legalább 40 mg/ml hemoglobin-koncentrációnál az endotoxin kevesebb, mint 0,5 EU/ml), foszfolipidtől, vírusoktól és egyéb, nem-hemoglobin proteinektől. Ugyanakkor lehetőség van arra is, hogy először a lizált hemoglobin összegyűjtését követően a hemoglobint térhálósítsuk, majd a keresztkötéses hemoglobint tisztítsuk, s így az eljárás még hatékonyabb lehet az ipari előállítás során. A tisztított és térhálósított hemoglobin alkalmas humán és állati szervezetekben végrehajtott transzfúzió során oxigénszállító vérpótlékként.

Jellegzetesen a találmány szerinti hemoglobint úgy állítjuk elő, hogy aszeptikus körülmények között begyűjtjük az emlős vért, a vörösvértesteket mossuk, lizáljuk a vörösvértesteket, a lizátumot centrifugáljuk, legalább 300000 molekulatömegű membránnal ultrafiltráljuk vagy 0,025 mikrométertől körülbelül 0,040 mikrométerig terjedő szűrővel mikrofiltráljuk, a tisztított hemoglobin kinyerésére anion- vagy kationcserélő kromatográfiával tisztítjuk, majd az imidoészterrel térhálósítjuk és adott esetben affinitás- (méretkizárásos) kromatográfiát vagy

ultrafiltrációt végzünk az alacsony molekulatömegű hemoglobin eltávolítása érdekében. Alternatív módon a hemoglobin térhálósítható a lizátum centrifugálását és összegyűjtését követően. A tisztítási lépések elvégezhetőek ezt követően, beleértve az adott esetben végrehajtandó méretkizárási lépést is.

Az így előállított hemoglobin lényegében szennyeződésmentes és túlnyomórészt egy stabilizált tetramerből áll. Más megfogalmazással, a keresztkötéses hemoglobin túlnyomórészt legalább 64000-es molekulatömeg-eloszlással rendelkezik. Az itteni alkalmazásban a "túlnyomórészt" vagy "túlnyomóan" a térhálós hemoglobin legalább 80 %-át, előnyösen a keresztkötéses hemoglobin 90-95 %-át jelenti.

A speciális oxigénszállító, keresztkötéses hemoglobin előállításának érdekében a térhálósítási reakció különféle paramétereit specifikáljuk.

Először, a kloridion és/vagy a nátrium-klorid koncentrációja jelentős hatással van a (borjú) hemoglobin dimetil-adipinsav-imidáttal végzett térhálósításának mértékére az 1 mM Tris-HCl és az 50 mM Tris-HCl plusz 2,0 M NaCl tartomány felett. 1 és 10 mM Tris-HCl-ben dimetil-adipinsav-imidát 10 hozzáadása után a hemoglobinnak (az előbbi sorrendnek megfelelően) 90,3 %-a és 72,2 %-a marad polimerizálatlan. Ezzel szemben 50 mM Tris-HCl plusz 0,5,

1,0 és 2,0 M NaCl jelenlétében (az előbbi sorrendnek megfelelően) csak 25,8 %, 24,4 % és 20,7 % marad keresztkötés nélkül. A sókoncentráció növelésekor a polimerizálatlan hemoglobin folyamatos csökkenése és a nagy molekulatömeg (> 400000 dalton) állandó növekedése volt megfigyelhető. Amennyiben a térhálósítást 50 mM Tris-HCl-ben vagy 50 mM Tris-HCl plusz 100 mM NaCl-ban végeztük, a hemoglobin legnagyobb százaléka a 64000 - 400000 tartományban volt megfigyelhető.

Másodszor, megállapítottuk, hogy a puffer típusa jelentős befolyással bír a térhálósításra. Például a dimetil-adipinsav-imidáttal végzett térhálósítási reakció gyenge eredményt ad glicin-HCl-ban, etanol-amin-HCl-ban és nátrium-foszfátot és lizint tartalmazó oldatban. Feltételezhető, hogy ezekben a puffertípusokban a primer aminocsoport gátolja a térhálósítási reakciót, ami valószínűleg hamarabb reagál, mint a protein N-terminálisának és lizincsoportjainak aminocsoportjai. A legnagyobb mennyiségű keresztkötés 2-amino-2-metil-1-propanol puffer jelenlétében volt megfigyelhető, amikor is a hemoglobinnak csak 23,4 %-a maradt térhálósítatlan. Ez a puffer ugyancsak rendelkezik primer aminocsoporttal. A dimetil-adipinsav-imidát keresztkötés szempontjából a következő négy puffer a Tris [Trisz(hidroxi-metil)-amino-metán], a nátrium-karbonát, a CHES [2-(N-ciklohexil-amino)-etánszulfonsav] és a CAPSO [2-(ciklohexil-amino)-2-hidroxi-1-propánszulfonsav] volt. Ezek közül három

primer aminocsoporttal rendelkezik. Ezzel ellentétben a CAPS [3-(ciklohexil-amino)-1-propánszulfonsav] nem volt megfelelő puffer a térhálósítási reakció számára, a kapott termék csak 27,2-ban volt térhálósított. A nátrium-foszfát ugyancsak nem bizonyult jó választásnak a térhálósítási reakció számára.

Harmadszor, a pH jelentős szerepet játszott a hemoglobin imidoészterrel végzett polimerizációjának hatékonyságában. Például a dimetil-adipinsav-imidáttal végzett hemoglobin térhálósítási kísérletek teljesen sikertelenek voltak 8,0 pH érték alatt. Abban a kísérletben, ahol a dimetil-adipinsav-imidátot tíz részletben hozzáadva, amikor is a dimetil-adipinsav-imidát tízszeres végső sztöchiometriai arányban volt a hemoglobinhoz viszonyítva, pH 8,0 értéken a hemoglobinnak csak 12,2 %-a volt térhálósított. A térhálósítási hatékonyságban növekedés volt tapasztalható pH 9,0, 10,0 és 10,5 értéknél, amikor is (az előbbi sorrendnek megfelelően) csak 58 %, 48 % és 50 % visszamaradt, térhálósítatlan hemoglobin volt jelen a dimetil-adipinsav-imidát beadagolásának végén. Az adatokból ugyanakkor kitűnt, hogy 9-es vagy ennél nagyobb pH érték szükséges ahhoz, hogy a dimetil-adipinsav-imidátnak és a hemoglobinnak a reakciója eredményes legyen.

Végül, megfigyeltük, hogy a dezoxigenált hemoglobin készségesebben térhálósódott, mint az oxigenált hemoglobin.

Miután biztosítottuk a fentiekben leírt polymerizációs körülményeket az optimális térhálósításhoz, a 64000 vagy nagyobb molekulatömeg eléréséhez a térhálósítatlan hemoglobint kiszűrhetjük vagy kromatográfiás úton eltávolíthatjuk, majd további szűrés vagy kromatografálás eredményezi a túlnyomórészt 64000 molekulatömeget. A fentiekből következően a hemoglobin térhálósításának optimalizálása nagyban elősegíti a túlnyomórészt 64000 és 300000 molekulatömegű oxigénszállító anyag gazdaságos és gyakorlatilag megvalósítható előállítását.

A keresztkötéses hemoglobint az előállítását követően általában egy olyan, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközegbe helyezzük, amely lehetővé teszi az anyagnak egy kezelt emlős szervezetébe injekció vagy infúzió útján történő bejuttatását. A jellegzetes, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközegek magukban foglalják az injekciók és infúziók számára megfelelő fiziológiai szempontból elfogadható sóoldatokat, amilyenek például a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető szalinoldatok. Gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozó lehet bármely olyan folyadék, amely inert a térhálósított hemoglobinnal szemben és nem okoz semmilyen káros hatást az injekcióval vagy infúzióval

kezelt emlős szerveztében. A megfelelő folyadékok ugyan-
csak magukban foglalnak más, természetes vagy szintetikus
vértermékeket, továbbá fluorozott szénhidrogéneket.
Általában a találmány szerinti térhálósított hemoglobint
összekeverjük egy megfelelő gyógyszerészeti hordozóval,
ahol a hemoglobin koncentrációját egyenlő mennyiségekben
körülbelül 40 mg/ml-től körülbelül 140 mg/ml értékre
állíthatjuk be.

A találmányt a továbbiakban részletesebben
ismertetjük, bemutatva valamennyi, a fentiekben említett
eljárási lépést és molekuláris készítményt. Az
ismertetett eljárások bármilyen emlős hemoglobin esetén
alkalmazhatók, jóllehet a bemutatás céljaira az alábbiak-
ban ismertetendő példák (tisztítás, térhálósítás és
módosítás) borjú hemoglobint alkalmazunk. A borjú
hemoglobin ugyanakkor valóban rendelkezik egy előnnyel,
mégpedig egy nagyon magas, az oxigénszállításra alkalmas
P50 értékkel.

1. példaA vér begyűjtése és a vörösvértest hemolizátum
előállítása

A vért aszeptikus körülmények között vettük le fiatal Holstein marhákból a The Upjohn Company Agricultural Division farmján. Először minden fiatal marha nyakáról elektromos nyírógéppel eltávolítottuk a szőrt. A leborotvált területet jóddal átítatott törlőruhával letöröltük, majd spriccflaskából 95 %-os etanollal lemostuk. A vér levétele előtt az etanolt hagytuk a levegőn felszáradni. A vért 0,5-1,0 literes, vákuum alá helyezett üvegekbe vettük le, amely üvegek sterilek és pirogénmentesek voltak. A vér begyűjtése előtt valamennyi üvegbe megfelelő mennyiségű nátrium-heparin-oldatot mértünk be. Feltöltés után az üvegeket azonnal jégre helyeztük és jégen tartva a laboratóriumba szállítottuk. A kezdeti vizsgálatokhoz 2,5-5,0 liter vért vettünk le.

A laboratóriumban minden eljárást vagy jégen vagy 4 °C hőmérsékleten végeztünk, hogy minimalizáljuk a mikroorganizmusok növekedését és az ezzel együttjáró pirogénképződést. Ezen túlmenően a tisztítási lépéseket szűrő, kis szilárdanyag-tartalmú levegővel ellátott, tiszta környezetben végeztük. A hemoglobin tisztításának első lépései magukban foglalják a vörösvértestek elkülönítését a vérplazmából, majd a vörösvértestek

ismételt mosását sóoldattal és a vörösvértestek pelletekké történő centrifugálását. A teljes vért először pirogénmentes, 0,5 literes centrifugacsövekbe helyeztük és 4 °C hőmérsékleten 4000 fordulat/perc értéken centrifugáltuk 30-40 percen keresztül. A vörösvértestek a centrifugálás ideje alatt pelletekké álltak össze. A felülúszóban lévő vérplazmát leszívással eltávolítottuk. A vörösvértesteket vagy eritrocitákat visszaszuszpendáltuk egy olyan, jéghideg oldatba, amely tisztított vízben 16 gramm nátrium-kloridot (NaCl) tartalmazott literenként. Ezt az oldatot 1,6 %-os szalinként említjük a továbbiakban. A vörösvértesteket egy steril és pirogénmentes üvegbottal végzett keveréssel vagy a centrifugacsövek óvatos, ismételt átfordításával szuszpendáltuk fel. Miután a vörösvértesteket visszaszuszpendáltuk, 10000 fordulat/percen ismételten centrifugáltuk 30-40 percen keresztül 4 °C hőmérsékleten. A vörösvértesteket újra visszaszuszpendáltuk 1,6 %-os szalinba, majd 10000 fordulat/percen ismételten centrifugáltuk 30-40 percen keresztül 4 °C hőmérsékleten. A vörösvértestek feltárása vagy lizálása előtt a vörösvértesteket összesen háromszor 1,6 %-os szalinnal mostuk.

A sejtek mosása után a vörösvértesteket hipo-ozmotikus sokkal lizáltuk, a következő módon. Egy térfogatrész mosott, pelletált vörösvértesthez hozzáadtunk négy térfogatrész jéghideg 0,0025 M nátrium-foszfát puffert (pH 7,4). A vörösvértesteket a centrifugacső

óvatos felfordításával felszuszpendáltuk a pufferben. Mután a vörösvértestek tökéletesen szuszpendálódtak, a vörösvértest-szuszpenziót egy órán keresztül $0-4^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten inkubáltuk, majd ezt követően 30-90 percen át 4°C hőmérsékleten 10000 fordulat/perc értékkel centrifugáltuk. A centrifugálás után a felülúszóban lévő hemoglobint leszívattással eltávolítottuk. Bizonyos kísérletekben az előírásokat a következők szerint módosítottuk. Az egy órás, 0,0025 M nátrium-foszfát pufferrel $0-4^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten végzett inkubáció után, de a centrifugálást megelőzően 2,0 M nátrium-klorid-oldatot adtunk hozzá olyan mennyiségben, hogy a végső koncentrációja 0,2 M legyen. A nátrium-kloridnak a vörösvértestek lizátumához való hozzáadása tisztább felülúszót eredményezett a centrifugálást követően.

A hemolizátum előállítása során a centrifugálás után beépíthetünk egy kitisztító lépést is. Ebben a lépésben egy szűrést elősegítő anyagot, például egy cellulóz-, diatómaföld-, polimer- vagy szilícium-dioxid-származékot adunk mozgítás közben a centrifugált hemolizátumhoz. A szűrést elősegítő anyaggal eltávolítjuk a további sztrómafragmentumokat, így a foszfolipidet, amely a centrifugálással előzetesen nem távolítható el teljesen.

A hipoozmotikus sokkal szemben alternatívát jelent a vörösvértestek lizálásához a mechanikai

roncsolás, például francia préssel vagy nagyobb méretű sejthomogenizátorral.

A LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) pirogénteszt alapján az előállított négy hemolizátum pirogéntartalma 0,05 és 0,2 endotoxin egység (EU) között változott. Anioncserélő vagy kationcserélő kromatográfiával az endotoxin és foszfolipid utolsó nyomait is eltávolítottuk.

2. példa

A vírustartalom csökkentése

Amennyiben a borjúvér vírusokkal szennyezett, a virális terhelés egy részét a vörösvértestek lassú centrifugálással végzett mosása során eltávolítjuk. Egy további részt a hemolizátum nagysebességű centrifugálásával távolítunk el, amely a pelletbe kerül. Még egy további rész a kitisztítási lépés során kerül ki.

A virális terhelés további csökkentését mikrofiltrációval és/vagy ultrafiltrációval végezzük. Egy 0,025-0,040 mikrométeres szűrővel végzett mikrofiltrálás igen nagy mértékben csökkenti a legtöbb vírus titerét. A további eljárás előtt a hemolizátum szűrésére egy 0,04 mikrométeres Ultipor N66 nylon 66 szűrőbetétet (Pall Corporation) alkalmaztunk. Ezen túlmenően szükség esetén egy 300000 molekulatömegű ultrafiltrációs membrán

(Filtron Corporation) alkalmazható, amelyet egy ultrafiltráló egységbe (Amicon Corporation) merítünk. A hemoglobin szabadon átáramlott valamennyi említett ultra- és mikrofiltráló membránon, míg a vírusok részei visszamaradtak azokon. A két szűrőmembrán együttes alkalmazása igen jól csökkenti a vírusterhelést. Ezeknek a szűrőtípusoknak mindkét tagja csak alacsony protein-visszatartást mutat.

A szűrésen kívül a hemolizátum vagy a szűrt hemolizátum vírustartalma megfelelő detergenssek, etilén-dinitril-tetraecetsav, a U.S. Food and Drug Administration (FDA) által jóváhagyott trinitro-butyl-foszfát reagens vagy ezeknek az adalékoknak kombinációban történő hozzáadásával is csökkenthető.

3. példa

A hemoglobin ioncserélő kromatográfiája

Az anioncserélő kromatográfiát kiterjedten alkalmazzák az emlős hemoglobinok tisztításában [Williams, R. C., K. Tsay (1973) *Anal. Biochem.* **54**: 137-45]. Az ajánlott pH és ionerősség körülményei között a hemoglobin úgy vihető fel egy anioncserélőre, hogy az hozzákötődik az ioncserélőhöz. A protein és nemprotein jellegű szennyeződések az oszlop kifejlesztése során leválnak a hemoglobinnal. A körülmények úgy is

megválaszthatók, hogy a hemoglobinnak csak csekély affinitása legyen vagy semmilyen affinitása ne legyen az anioncserélő gyantához. Ilyen körülmények között a szennyezések maradnak vissza az oszlopon. A frissen preparált hémolizátumban jelen lévő lényeges szennyezések a következők: foszfolipidek, az előzetes eljárási lépések során el nem távolított, visszamaradt potenciális vírusok, bakteriális endotoxin kis mennyisége, valamint a hemoglobintól eltérő proteinek. Az endotoxin, foszfolipid és a plazmaproteinek negatívabb töltéssel rendelkeznek, mint a hemoglobin, s a megfelelően megválasztott körülmények között nagyobb affinitást mutatnak az anioncserélőhöz. Az alkalmas terhelési és elúciós körülmények között az anioncserélő kromatográfia alkalmasnak bizonyult a hemoglobin kioldására az említett szennyezések mellől. Ezen túlmenően az anioncserélő kromatográfia tovább csökkentette a virális terhelést is.

A hemoglobin tisztításánál három szempontot vettünk figyelembe az anioncserélő kromatográfiával kapcsolatban: kötés emelt pH értéken; elúció csökkenő pH gradiens mellett; és feltöltés olyan pH körülmények között, amelyeknél a hemoglobin nem kötődik meg az anioncserélőn, hanem maradéktalanul áthalad az oszlopon. Bár valamennyi kísérletünket oszlopokon végeztük, a tisztítás elvégezhető szakaszos üzemmódban is, közel azonos eredményekkel. Kísérleteinkben Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) anioncserélőt alkalmaztunk, de meg kell

jegyezni, hogy ezek az eljárások számos olyan, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, alacsony vagy közepes nyomású anioncserélővel elvégezhető, amelyeket proteinek tisztítására fejlesztettek ki, magukban foglalva azokat is, amelyek kvaterner aminocsoportokkal vagy dietil-amino-etil-csoportokkal rendelkeznek.

A kationcserélő kromatográfiát ugyancsak elterjedten alkalmazzák az emlős hemoglobinok tisztítására [Bucci, E. (1981) Preparation of isolated chains of human hemoglobin, *Methods in Enzymol.* 76: 97-106]. A javasolt pH és ionerősség körülményei között a hemoglobin a kationcserélőre történő felvitelt követően az ioncserélőhöz kötődik. A foszfolipid és az endotoxin, valamint a plazmaproteinek csak kis affinitással rendelkeznek a kationcserélőhöz olyan körülmények között, amelyek mellett a hemoglobin kötődik. Az alkalmas terhelési és elúciós körülmények között a kationcserélő kromatográfia alkalmasnak bizonyult a hemoglobin elválasztására az említett szennyezések mellől. Ezen túlmenően a kationcserélő kromatográfia tovább csökkentette a virális terhelést is.

A hemoglobin tisztításánál két szempontot vettünk figyelembe a kationcserélő kromatográfiával kapcsolatban: először, a hemoglobint olyan körülmények között vittük fel, amelyek mellett kötődik a kationcserélőhöz, majd ezt követően lineáris pH gradienssel

eluáltuk; másodszor hemoglobint olyan körülmények között vittük fel, amelyek mellett kötődik a gyantához, majd egyetlen pH gradienssel eluáltuk. Mindkét módszerben a foszfolipid és az endotoxin maradéktalanul áthalad a gyantán, s így a hemoglobintól elválaszthatók az említett szennyezőanyagok. Számos, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető kationcserélő megfelel a kitűzött céloknak. Előnyösen egy S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) kationcserélőt alkalmaztunk, mivel ez kiváló proteinkötési és átfolyási jellemzőkkel rendelkezik. Megjegyzendő, hogy nagyon sok olyan, alacsony vagy közepes nyomású kromatográfiás közeg eleget tesz a kívánt követelményeknek, amely szulfopropil- vagy karboxi-metil-csoporttal rendelkezik. Ezeknek a gyantáknak az alkalmazása igen gazdaságos.

3A. példa

Anioncserélő kromatográfia lineáris pH gradienssel

Ez a kísérlet azoknak az anioncserélő kromatográfiás körülményeknek a bemutatására szolgál, amelyek között a borjú hemoglobint felvittük az ioncserélőre, majd lineáris pH gradienssel eluáltuk. Egy $2,5 \times 5,5$ cm-es Q-Sepharose Fast Flow oszlopot készítettünk, majd egy éjszakán át 0,5 M NaOH oldattal végzett mosással tisztítottuk. Az oszlopot 100 mM Tris oldattal (pH 8,5) mindaddig mostuk, amíg az oszlopeffluens pH-ja be nem állt

8,5 értékre. Ezt követően az oszlopot 50 mM Tris oldattal (pH 8,5) ekvilibráltuk. A hozzávetőleg 350 mg hemoglobint tartalmazó, frissen preparált borjú vörösvértest hemolizátum 5 ml-es mintáját meghígítottuk 10 ml 100 mM Tris oldattal (pH 8,5), majd 2,5 ml/perc sebességgel a Q-Sepharose oszlopra vittük. A felvitelt követően az oszlopot 50 mM Tris oldattal (pH 8,5) mostuk addig, amíg az oszlopeffluens abszorbanciája visszatért az alaponálra. Az oszlopot ezután lineáris gradiens elúciónak vetettük alá: a kiindulási puffertől 50 mM Tris oldatig (pH 6,5), tízszeres oszloptérfogat alatt végezve a változtatást. A hemoglobin lényegében egyetlen fő csúcs formájában eluálódott, előtte és utána számos kisebb csúccsal. A fő csúcs az oszlopra felvitt hemoglobin 95 %-ának felet meg. Valamennyi kromatográfiás eljárást 5 °C hőmérsékleten végeztünk.

3B. példa

Anioncserélő kromatográfia egy fokozatú pH gradienssel

Ez a kísérlet azoknak az anioncserélő kromatográfiás körülményeknek a bemutatására szolgál, amelyek között a borjú hemoglobint felvittük az ioncserélőre, majd egyetlen lépéses pH gradienssel eluáltuk. Egy 2,5 × 5,5 cm-es Q-Sepharose Fast Flow oszlopot készítettünk, majd egy éjszakán át 0,5 M NaOH oldattal végzett mosással tisztítottuk. Az oszlopot 100 mM Tris oldattal (pH 8,5)

mindaddig mostuk, amíg az oszlopeffluens pH-ja be nem állt 8,5 értékre. Ezt követően az oszlopot 50 mM Tris oldattal (pH 8,5) ekvilibráltuk. A hozzávetőleg 400 mg hemoglobint tartalmazó borjú vörösvértest hemolizátum mintájának 8 ml-ét meghígítottuk 16 ml 50 mM Tris oldattal (pH 8,5), majd 2,7 ml/perc sebességgel felvittük az oszlopra. A felvitelt követően az oszlopot 50 mM Tris oldattal (pH 8,5) mostuk addig, amíg az oszlopeffluens abszorbanciája visszatért az alapvonalra. Az oszlopot ezután 50 mM Tris oldattal (pH 7,4) fejlesztettük ki, és a hemoglobint lényegében egyetlen csúcs formájában eluáltuk az oszlopról. A hemoglobint tartalmazó frakciókban jelen lévő anyag mennyisége közel azonos volt az oszlopra felvitt anyag mennyiségével, jelezve, hogy ebben a lépésben a visszanyerés közel kvantitatív.

3C. példa

A hemoglobint vissza nem tartó anioncserélő

kromatográfia

Ez a kísérlet azoknak az anioncserélő kromatográfias körülményeknek a bemutatására szolgál, amelyek között a borjú hemoglobin nem kötődött az anioncserélőhoz, hanem maradéktalanul áthaladt az oszlopon. Egy 2,5 × 5,5 cm-es Q-Sepharose Fast Flow oszlopot készítettünk, majd egy éjszakán át 0,5 M NaOH oldattal végzett mosással tisztítottuk. Az oszlopot 100 mM Tris

oldattal (pH 7,4) mindaddig mostuk, amíg az oszlopeffluens pH-ja be nem állt 7,4 értékre. A 880 mg hemoglobint tartalmazó, frissen preparált borjú vörösvértest hemolizátum 10 ml-es mintáját meghígítottuk 40 ml 50 mM Tris oldattal (pH 7,4), majd 2,5 ml/perc sebességgel ennek az oldatnak 35 ml-ét a Q-Sepharose oszlopra vittük. A felvitelt követően az oszlopot 50 mM Tris oldattal (pH 7,4) mostuk addig, amíg a hemoglobin teljes egészében eluálódott az oszlopról. A hemoglobin kötődés nélkül átjutott az oszlopon, és a visszanyerés értéke 88 % volt.

3D. példa

A hemoglobin kationcserélő kromatográfiája

Ez a kísérlet azoknak a kationcserélő kromatográfiás körülményeknek a bemutatására szolgál, amelyek között a borjú hemoglobint felvittük az ioncserélőre, majd lineáris pH gradienssel eluáltuk. Egy 2,5 × 5,5 cm-es Q-Sepharose Fast Flow oszlopot készítettünk, majd egy éjszakán át 0,5 M NaOH oldattal végzett mosással tisztítottuk. Az oszlopot 100 mM Bis-Tris oldattal (pH 6,0) mindaddig mostuk, amíg az oszlopeffluens pH-ja be nem állt 6,0 értékre. Ezt követően az oszlopot 50 mM Bis-Tris oldattal (pH 6,0) ekvilibráltuk. A frissen preparált borjú vörösvértest hemolizátum 5 ml-es mintáját meghígítottuk 10 ml 50 mM Bis-Tris oldattal (pH 6,0), majd 2,5

ml/perc sebességgel a Q-Sepharose oszlopra vittük. A felvitelt követően az oszlopot 50 mM Bis-Tris oldattal (pH 6,0) mostuk addig, amíg az oszlopeffluens abszorban-
ciája visszatért az alapvonalra. Az oszlopot ezután lineáris gradiens elúciónak vetettük alá: az oszlop puffertől 50 mM Bis-Tris oldatig (pH 8,0), tízszeres oszloptérfogat alatt végezve a változtatást. Valamennyi kromatográfiás eljárást 5 °C hőmérsékleten végeztünk.

4. példa

Borjú hemoglobin térhálósítása dimetil-adipinsav- -imidáttal

Egy 170 mg/ml tisztított borjú hemoglobint tartalmazó mintát a következőképpen kezeltünk. A térhálósítási reakciót 1,75 mM vagy 112 mg/ml hemoglobin tetramer koncentráció mellett végeztük. A magas tetramer-koncentrációk elősegítik a hemoglobin tetramerek intermolekuláris térhálósodását. A hemoglobin módosítását 50 mM Tris puffer (pH 8,8) jelenlétében, 4 °C hőmérsékleten végeztük. A hemoglobin módosítása ekvimoláris mennyiségű dimetil-adipinsav-imidát hozzáadásával történt (azaz 1,75 mM dimetil-adipinsav-imidátot adtunk 1,75 mM hemoglobin tetramerhez). A dimetil-adipinsav-imidátos kezelést nyolc alkalommal ismételtük meg 30 perces időközönként, 4 °C hőmérsékleten. Minden egyes alkalmazásnál egy 0,025 mM nátrium-karbonát-oldatban (pH 9,25) lévő 50 mg/ml

koncentrációjú dimetil-adipinsav-imidát-oldatot adtunk a hemoglobinoldathoz, 1,75 mM végső dimetil-adipinsav-imidát mennyiségig. A térhálósító reagens beadagolásának ideje alatt a hemoglobinoldatot kevertettük, majd jégen 30 percen keresztül inkubáltuk. A harminc perc elteltével egy 0,4 ml-es mintát vettünk ki, majd ezt hozzáadtuk 4 ml 0,25 mM nátrium-foszfát (pH 7,0) pufferhez. Az imidoészter hidrolízisével a foszfát puffer leállította a térhálósítási reakciót. A kvencselést két órán keresztül szobahőmérsékleten végeztük. A visszamaradó hemoglobinoldatot ismét reagáltattuk a térhálósító ágens friss oldatával. A nyolc reakcióciklust 3,5 óra alatt hajtottuk végre. Az ebben a kísérletben alkalmazott egyedi imidoészter a dimetil-adipinsav-imidát volt. Egyéb imidoészterek ugyancsak felhasználhatók.

5. példa

A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított hemoglobin méretkizárásos nagynyomású folyadékkromatográfiája (SEC-HPLC)

A hemoglobin koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg, ismert extinkciós koeficiensek alkalmazásával [Benesch, R. E., Benesch, R., S. Yung, (1973) Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analyt. Biochem.* **55**: 245-48]. A reakciótermékeket a térhálósítószer minden egyes

hozzáadása után méretkizárásos HPLC (SEC-HPLC) segítségével megvizsgáltuk. A kvencselt reakcióterméket 0,2 M nátrium-foszfát (pH 7,0) pufferben milliliterenként 1 mg hemoglobin tetramer koncentrációra hígítottuk. A hígított terméket két különálló módon analizáltuk SEC-HPLC útján. Az első módszer szerint 0,2 M nátrium-foszfát (pH 7,0) pufferrel ekvilibrált Zorbax GF-250 SEC oszlopot (Dupont) és 1 ml/perc sebességet alkalmaztunk. A második módszer szerint 0,1 M nátrium-foszfát (pH 7,0) pufferrel ekvilibrált Superose 12 FPLC oszlopot (Pharmacia) használtunk. Előzetesen mibkét oszlopot ismert molekulatömegű proteinekkal kalibráltuk.

A dimetil-adipinsav-imidáttal végzett, folyamatosan ismételt térhálósítás fokozatos növekedést eredményezett a polimerizált, tetramer stabilizált hemoglobin mennyiségében. A Superose 12 oszloppal végzett SEC-HPLC segítségével meghatározott molekulatömeg-tartományok a következők voltak: 1.) % > 400000 dalton, 2.) % > 64000 dalton és < 400000 dalton és 3.) % < 64000 dalton. A térhálósítás négyszeri ismétlést követően a százalékos értékek a következők voltak: 1.) 0 %, 2.) 40,64 %, 3.) 59,36 %. Hétszeri ismétlés után a százalékos értékek a következőképpen alakultak: 1.) 4,1 %, 2.) 50,4 % és 3.) 45,5 %. Nyolcszori ismétlés után a következő százalékos értékeket nyertük: 1.) 7,5 %, 2.) 50,6 % és 3.) 41,9 %. A 64000 daltonnál kisebb molekulatömeget jelző, három csúcsból álló csoport szimmetrikus volt a középső, 30000

dalton molekulatömeget jelző csúcshoz képest. Ez a frakció együtt eluálódott a módosítatlan borjú hemoglobinnal, s feltehetőleg főleg hemoglobin dimerekből áll. A térhálósítás hétszeri ismétlése után a hemoglobin met-hemoglobin-tartalma $< 2,5 \%$ volt. A keresztkötéses hemoglobin látható spektruma hasonló a módosítatlan borjú hemoglobinéhoz.

6. példa

A térhálósított hemoglobin nátrium-dodecil-szulfát poli(akril-amid) gélelektroforézise

A nátrium-dodecil-szulfát poli(akril-amid) gélelektroforézist (SDS-PAGE) keresztkötéses és térhálósítatlan hemoglobin mintákkal végeztük, a következőkben leírtaknak megfelelően. A hemoglobin mintákat 2 mg/ml koncentrációra hígítottuk $0,005 \text{ M}$ nátrium-foszfát ($\text{pH } 7,4$) és $0,15 \text{ M}$ nátrium-klorid oldatával, majd a meghígított mintákat összekevertük három rész standard SDS-gél pufferrel, s ezt követően a mintákat 37°C hőmérsékleten 3 órán keresztül inkubáltuk. A mintákat $10-20 \%$ ISS minigéleken futattuk, a nemredukált formában. A térhálósítás hétszeres ismétlését követően nyert keresztkötéses hemoglobin SDS-PAGE vizsgálata azt mutatta, hogy a minta 80% -a térhálósítva volt az alegységek között. Az alegység molekulatömegének legalább

nyolc többszöröse volt jelen, valamennyi közel azonos mennyiségben.

7. példa

A térhálósított és a nemtérhálósított borjú hemoglobin oxigénegyensúlya

A térhálósított és a nemtérhálósított borjú hemoglobin oxigénegyensúlyának mérését egy Hemoxanalyzer készülék (TCS Medical Industries) segítségével végeztük. A dimetil-adipinsav-imidát reakciójának hétszeri ismétlésével nyert térhálósított hemoglobin mintáját foszfát pufferelt szalinban (pH 7,4) 1,5 mg/ml koncentrációra hígítottuk, majd analizáltuk. Azonos körülmények között elemeztük a módosítatlan hemoglobin mintáját is, valamint azt a glutáraldehiddel a saját laboratóriumunkban előállított térhálósított borjú hemoglobint, amelynek előállítását a korábban már ismertetett módszerrel végeztük [Guillochon, D. et al., (1986) Effect of glutaraldehyde on hemoglobin, *Biochem. Pharm.* 35: 317-23]. Az egyes hemoglobinfajtákra a P50 értékek (P50 a féltelítésnél mért parciális oxigénnyomás) a következők voltak: a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított hemoglobin esetén 1,800 kPa (13,5 Hgmm); a glutáraldehiddel térhálósított hemoglobin esetén 1,900 kPa (14,25 Hgmm); és a módosítatlan borjú hemoglobinra 3,166 kPa (23,75 Hgmm) volt.

8. példaA térhálósított és a nemterhálósított borjú hemoglobin
stabilitási vizsgálatai

Dimetil-adipinsav-imidáttal hétszeri ismétléssel térhálósított borjú hemoglobint, módosítatlan borjú hemoglobint, valamint glutáraldehiddel térhálósított hemoglobint 0,125 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,1) 36-37 °C hőmérsékleten inkubáltunk. A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobin és a módosítatlan borjú hemoglobin koncentrációja 40 mg/ml, míg a glutáraldehiddel térhálósított hemoglobin koncentrációja 28 mg/ml volt. Meghatározott időközökben valamennyi hemoglobinfajtából mintát vettünk, 0,25 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,3) 1/100 arányban meghígítottuk, majd 680 nm és 420 nm között egy Shimadzu Model 160 UV-látható pásztázó spektrofotométer segítségével szkenneltük. A methemoglobin-tartalmat valamennyi spektrum elemzése alapján határoztuk meg, ismert egyenletek felhasználásával [Benesch, R. E., Benesch, R., S. Yung, (1973) Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analyt. Biochem.* 55: 245-48]. A spektrumokat 22 °C hőmérsékleten vettük fel.

A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobint, valamint a glutáraldehiddel térhálósított hemoglobint 4 °C hőmérsékleten további idő-

tartamig inkubáltuk. Időközönként mintákat vettünk, és a fentiekben ismertetett módon meghatároztuk a methemoglobin-tartalmukat.

A 36-37 °C hőmérsékleten végzett inkubációban a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított, a glutáraldehiddel térhálósított és a módosítatlan borjú hemoglobin minták az előbbi sorrendnek megfelelően 2,5 %, 8,0 % és 3,5 % methemoglobint tartalmaztak az inkubáció kezdetén. A 36-37 °C hőmérsékleten végzett inkubációban 5 óra elteltével a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított, a glutáraldehiddel térhálósított és a módosítatlan borjú hemoglobin minták az előbbi sorrendnek megfelelően 8,9 %, 44,4 % és 8 % methemoglobint tartalmaztak. Huszonnégy óra után a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított, a glutáraldehiddel térhálósított és a módosítatlan borjú hemoglobin minták az előbbi sorrendnek megfelelően 24,1 %, 87,9 % és 42 % methemoglobint tartalmaztak. Negyvennyolc óra elteltével a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított és a módosítatlan borjú hemoglobin minták az előbbi sorrendnek megfelelően 46,5 % és 68 % methemoglobint tartalmaztak. A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított hemoglobin 36-37 °C hőmérsékleten stabilabb a methemoglobin-képződéssel szemben, mint a módosítatlan borjú hemoglobin. A szakirodalmi adatok alapján a glutáraldehiddel térhálósított humán hemoglobin négyszer gyorsabban autooxidálódik, mint a módosítatlan humán hemoglobin [Guillochon, D. et al., (1986) Effect of

glutaraldehyde on hemoglobin, *Biochem. Pharm.* 35: 317-23]. Nemvárt eredmény volt, hogy a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított hemoglobin az autooxidációval szemben stabilabbnak bizonyult, mint a módosítatlan borjú hemoglobin. A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított és a glutáraldehiddel térhálósított borjú hemoglobin autooxidációval szembeni stabilitását ugyanabban a pufferben 28 napos, 4 °C hőmérsékleten végzett inkubáció után is mértük. A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobin esetén 28 nap elteltével a met-hemoglobin koncentrációja 2,5 %-ról 9,6 %-ra nőtt. A glutáraldehiddel térhálósított borjú hemoglobinnál azonos idő elteltével 8,0 %-ról 23,5 %-ra emelkedett a met-hemoglobin-koncentráció.

9. példa

A dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobin preparatív méretkizárásos kromatográfiája

A preparatív méretkizárásos kromatográfiát a kis, azaz < 64000 dalton molekulatömegű fajtáknak a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobinnál történő eltávolítására alkalmaztuk. Egy 2,5 × 90 cm-es, 0,025 M nátrium-foszfát, 0,15 M NaCl (pH 7,4) oldattal 4 °C hőmérsékleten ekvilibrált Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) oszlopra vittük fel a 40 mg/ml

koncentrációjú, dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobint. A felvitt anyag térfogata az oszlopágy térfogatának 1 %-át tette ki; az átfolyási sebesség 0,45 ml/perc volt. A kromatográfiából származó egyes csúcsoknak megfelelő frakciókat egyesítettük, majd az így kapott, egyesített mintákat a bennük lévő hemoglobinfajták molekulatömeg-eloszlásának meghatározása céljából a fentieknek megfelelő körülmények között Superose 12 oszlopon SEC-HPLC-vel analizáltuk. Az előoszlop vagy felvitt mintát a Superose 12 oszlopon ugyancsak vizsgáltuk.

A preparatív méretkizárásos kromatográfia a dimetil-adipinsav-imidáttal térhálósított borjú hemoglobint két fő frakcióra választotta szét. Az 1. frakció, amely a kinyert hemoglobin teljes mennyiségének 51,3 %-át tartalmazta, a nagyobb molekulatömegű térhálósított hemoglobinfajtákat tartalmazta. A 2. frakció a 64000 daltonnál kisebb molekulatömegű keresztkötéses hemoglobint tartalmazta. Az előoszlop keresztkötéses hemoglobin frakció SEC-HPLC vizsgálata azt jelezte, hogy annak 2,6 %-a > 400000 dalton, 47,2 %-a > 64000 dalton és 50,2 %-a < 64000 dalton. Az analitikai SEC-HPLC alapján a preparatív méretkizárásos kromatográfiával nyert, tisztított 1. frakció 4,7 %-a > 400000 dalton, 92,7 %-a > 64000 dalton és 2,6 %-a < 64000 dalton. Ez a módszer kiválóan megfelelt a kisebb molekulatömegű hemoglobinfajták eltávolítására.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Élő sejtekhez történő oxigénszállításra alkalmas térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a készítményben lévő hemoglobin lényegében szennyeződésmentes és egy imidoészterrel térhálósított, miáltal a hemoglobin túlnyomóan tetramer formában van jelen és amelynek P50 értéke legalább 1,733 kPa (13 Hgmm).

2. Az 1. igénypont szerinti térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az imidoészter dimetil-adipinsav-imidát vagy dimetil--parafasav-imidát.

3. Az 1. igénypont szerinti térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a térhálósított hemoglobin legalább 80 %-a legalább 64000 értékű molekulatömeggel rendelkezik.

4. Az 1. igénypont szerinti térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a térhálósított hemoglobin legalább 95 %-a legalább 64000 értékű molekulatömeggel rendelkezik.

5. Az 1. igénypont szerinti térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e,

! 1

hogy a készítmény magában foglal egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközeget.

6. Az 5. igénypont szerinti térhálósított hemoglobin készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóközeg tisztított víz vagy szalinoldat.

7. Eljárás élő sejtekhez történő oxigén-szállításra alkalmas térhálósított hemoglobin készítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy egy tisztított hemoglobin lizátumot egy imidoészterrel legalább 8,0 értékű pH-n egy Tris-HCl-ot tartalmazó polimerizációs oldatban térhálósítunk, miáltal a térhálósított hemoglobin túlnyomórészt 64000 értékű molekulatömeggel és legalább 1,733 kPa (13 Hgmm) P50 értékkel rendelkezik.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a polimerizációs oldat nátrium-kloridot tartalmaz.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a pH értéke 8,0-tól körülbelül 12,0-ig terjed.

10. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a polimerizációs oldat 50 mM

Tris--HCl-t és körülbelül 0,1 - 2,0 M nátrium-kloridot tartalmaz.

11. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a tisztított hemoglobin lizátum dezoxigenált.

12. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az eljárás magában foglalja a kis molekulatömegű hemoglobin méretkizárással történő eltávolítását.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a méretkizárást kromatográfiás úton végezzük.

14. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy az imidoészter dimetil-adipinsav-imidát vagy dimetil-parafasav-imidát.

15. A 7. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a polimerizáció során a tisztított hemoglobint az imidoészter ekvimoláris mennyiségével, ismételt reakciókban kezeljük.

A képviselő:

ADVOPATENT SZABADALMI IRODA
KARÁCSONYI BÉLA
szabadalmi ügyvivő
Postacím: 1251 Bp. Pf. 11.

vezető
Gyulai