



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **24182** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 9/96
A61K 38/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ТРОМБІНУ

1

(21) u200700211

(22) 09.01.2007

(24) 25.06.2007

(46) 25.06.2007, Бюл. № 9, 2007 р.

(72) Магеровський Юрій Васильович, Брагінець Олена Григорівна, Шурко Наталія Олегівна, Даниш Ольга Йосифівна, Вороняк Мирослав Іванович, Вус Марія МIRONІВНА, Орлова Любов Володимирівна, Даниш Тарас Васильович

(73) ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ, Магеровський Юрій Васильович, Брагінець Олена Григорівна, Шурко Наталія Олегівна, Даниш Ольга Йосифівна,

2

Вороняк Мирослав Іванович, Вус Марія МIRONІВНА, Орлова Любов Володимирівна, Даниш Тарас Васильович

(57) Спосіб виділення та очищення тромбіну з активованого концентрату протромбінового комплексу, який включає використання методу афінної хроматографії на макропористому кремнеземному носії, який **відрізняється** тим, що для підвищення ступеня очищення препарату, ефективності способу, а також для покращення аналітичних характеристик кінцевого продукту як ліганд використовують тріазиновий барвник Активний яскраво-голубий К.

Корисна модель відноситься до галузі біотехнології - одержанні очищених білкових препаратів, - і може бути використана в медико-біологічній промисловості, на станціях переливання крові, а також в науково-дослідницьких лабораторіях.

Препарат очищеного тромбіну використовуються в медичній клінічній практиці як терапевтичний засіб (для місцевої зупинки кровотечі з дрібних капілярів та паренхіматозних органів, а також як основний компонент у виробництві так званого фібринового клею) та діагностичний препарат для коагулологічних досліджень. На даний момент вітчизняна промисловість не випускає препаратів очищеного тромбіну людини.

Для виділення та очищення тромбіну в якості лігандів біоспецифічних сорбентів використовували інгібітори тромбіну n-хлорбензиламін [1] чи n-амінобензамідин [2], специфічні амінокислотні залишки L-лізин чи L-аргінин, а також аліфатичні α , ω -діаміни, що містили не менше 4 метиленових ланок [3]. Ці ліганди іммобілізували на органічних матрицях - сефарозі [2, 3] чи гідрофільному синтетичному полімері [1].

Відомі способи одержання очищеного тромбіну людини шляхом афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах, що містять в якості ліганда L-лізин, L-аргінин, гексаметилендіамін, граміцидин С і бацитрацин [4], n-Cl-бензил [5, 6].

Серед відомих носіїв, що використовуються для хроматографічного виділення та очищення тромбіну, найбільш ефективними є макропористі кремнеземні матриці з регульованим розміром пор. Вони достатньо жорсткі, хімічно інертні, термостійкі, а хроматографічні сорбенти на їх основі легко регенеруються, витримують високу швидкість пропускання розчинів з достатньою специфічною ємністю по відношенню до тромбіну, не піддаються гідролізу мікроорганізмами.

Найближчим по сукупності ознак, подібних до сукупності суттєвих ознак даного винаходу є спосіб одержання тромбіну з використанням афінного сорбенту n-Cl-бензилсилохрому [6], який полягає в пропусканні через колонку з сорбентом активованого концентрату протромбінового комплексу.

Для здійснення цього способу осад фракції II+III плазми крові за Коном суспендують в 0,02M тріс-буферному розчині, рН 8,0, що містить 0,15M NaCl, 0,03M тринатрій-цитрату, 50г/л ПЕГ-115 і центрифугують протягом 10 хв при 2500g [7]. Осад відкидають. Далі повільно додають охолоджений до +4°C хлорид барію. При цьому утворюється нерозчинний цитрат барію на якому сорбуються фактори протромбінового комплексу. На наступному етапі осад цитрату барію суспендують в дисільованій воді і відділяють баластні білки висолюванням сульфатом амонію. Супернатант діалізують проти 0,15M хлориду натрію. Активацію

(13) **U**(11) **24182**(19) **UA**

протромбіну в тромбін проводять з використанням тромбопластин-кальцієвої суміші.

Афінну хроматографію тромбіну проводять на колонці з *n*-Cl-бензилхлорид-силохромом, врівноважену 0,05М тріс-НСІ-буфером, рН 8,0. Після пропускання екстракту тромбіну колонку послідовно промивають вихідним буфером, 25 %-ним розчином пропанолу-2, 0,25М розчином ϵ -АКК і десорбують тромбін 25%-ним розчином пропанолу-2 з 1М NaCl в 0,05М тріс-НСІ-буфері, рН 8,0.

Недоліками даного способу є наступні:

1. Для досягнення високої очистки тромбіну необхідна рехроматографія одержаного елюату.

2. Двоетапність афінної хроматографії зменшує кінцевий вихід продукту внаслідок втрат на кожному з етапів.

Задачею даної корисної моделі є підвищення ступеню очищення тромбіну, збільшення його кінцевого виходу, спрощення технології внаслідок одностадійності хроматографічного процесу.

Поставлена задача досягається запропонованим способом одержання тромбіну, яка включає пропускання активованого тромбопластин-кальцієвою сумішшю концентрату тромбіну через колонку з силохромом-Активним яскраво-голубим К, десорбцію баластних білків 25 %-ним розчином пропанолу-2, 0,25М розчином ϵ -АКК та елюцію тромбіну 25%-ним розчином пропанолу-2 в присутності 1 М розчину натрію хлориду, діаліз одержаного розчину та ліофілізацію.

Відмінність запропонованого способу полягає у застосуванні в якості ліганда для афінної хроматографії тромбіну на кремнеземній матриці тріазинного барвника - Активного яскраво-голубого К (С.І. 61211).

Застосування нового хроматографічного носія дозволяє підвищити ступінь очищення тромбіну на 33% (близько 2000 од. NIH/мг білка), спростити технологію одержання препарату за рахунок одностадійності хроматографічного процесу, зменшити тривалість процедури, збільшити кінцевий вихід препарату на 40%. Пропонований хроматографічний сорбент має суттєво вищу сорбційну ємність по відношенню до тромбіну у порівнянні з найближчим аналогом (ємність по тромбіну 10500од-NIH/г сорбенту проти 2000од. од.МН/г сорбенту - найближчого аналога).

В представлених прикладах кількість білка наведена в мг, активність тромбіну виражена в міжнародних одиницях NIH (National Institute of Health) по часу утворення фібринового згустка в стандартизованих умовах з використанням розчину фібриногену.

Активність тромбіну визначали по часу зсідання 1мл 0,1%-ного розчину фібриногену в 0,15М NaCl з 0,01М тріс-НСІ буфером, рН 7,3, при додаванні 0,01-0,05мл розчину тромбіну при температурі 37°C. Калібрувальну криву будували аналогічно, використовуючи в якості стандарту тромбін

ВРХ фірми "Calbiochem" (США), а також 1-й Міжнародний стандарт тромбіну (код 70/157) [8].

Приклад 1. 2кг фракції II+III за Коном суспендували протягом 1,5-2 год в 8л розчину такого складу: 0,02М тріс-НСІ-буфер, рН 8,0, 0,15М NaCl, 0,02М тринатрій-цитрат і 5%-ний ПЕГ-115. В присутності ПЕГ-115 осаджуються ліпопротеїни, фібриноген і денатуровані білки, від яких позбавлялись центрифугуванням протягом 30хв при 2500g.

До одержаного супернатанту додавали 1/10 об'єму охолодженого до +4°C 1М розчину хлориду барію. Перемішували протягом 1 год., центрифугували 20 хв. при 2000 g. Надосадкову рідину заморозували при -30°C і використовували в подальшому для виділення плазміногену і імуноглобуліну G. Осад промивали 2л дистильованої води, повторно центрифугували при аналогічних умовах, суспендували в 500мл дистильованої води, по краплях додавали 75мл 3,3 М забуференого до рН 8,0 розчину сульфату амонію. Нерозчинний матеріал видаляли центрифугуванням при 4000-5000g протягом 25хв, а надосадкову рідину (приблизно 600-700мл) діалізували протягом 10-15 год проти 8л 0,15М розчину NaCl. За цей час розчин 0,15М NaCl змінювали двічі.

Одержаний концентрат факторів протромбінового комплексу використовували для подальшої очистки з метою одержання препарату тромбіну.

Для активації протромбіну в тромбін 10г ліофільно висушеного тромбопластину гомогенізували з 100мл 0,2 5М розчину хлориду кальцію в 0,2М тріс-НСІ-буфері, рН 7,4 і до одного об'єму гомогенату додавали 7 об'ємів відділізованого протромбінового комплексу. Суміш інкубували протягом 60-120хв при температурі 37°C, доки активність тромбіну не виходила на плато (приблизно 700-1000 од. NIH/мл розчину). Через кожні 10хв відбирали проби для визначення згортуючої активності тромбіну.

Одержаний екстракт тромбіну центрифугували 30хв при 4000g при + 4°C і супернатант пропускали через колонку з сорбентом активним-яскраво-голубим К розміром 2,5х32см, врівноважену 0,05М тріс-НСІ-буфером, рН 8,0. Далі колонку із зв'язаним на сорбенті тромбіном послідовно промивали вихідним буфером, 25%-ним розчином пропанолу-2, 0,25М розчином ϵ -АКК і десорбували тромбін 25%-ним розчином пропанолу-2 з 1М NaCl в 0,05М тріс-НСІ-буфері, рН 8,0. Швидкість елюції становила 0,2-0,4мл/(хв x см²). Тромбінвмісні фракції об'єднували, діалізували проти 0,15МNaCl при +4°C протягом ночі і після заморозки при - 25°C ліофільне висушували.

Вихід тромбіну з 2 кг фракції II+III за Коном - 1000000-1500000 од. NIH, питома активність - 2000 од. NIH/мг білка.

В таблиці представлені характеристики препарату тромбіну, одержаного запропонованим способом і способом-найближчим аналогом.

Таблиця

властивості спосіб	Сорбційна властивість сорбенту, од. NIH/г сорбенту	Активність тромбіну в елюаті, од. NIH/мл	Питома активність тромбіну, од. NIH/мг білка	Вихід тромбіну (по активності), %
приклад 1	10500	1200±200	2000	90±5
найближчий аналог	2000	800±100	1500	79±5

З наведених даних видно, що ступінь очищення тромбіну, який характеризується підвищенням його питомої фібриноутворюючої здатності, вищий в 1,3 рази в пропонованому способі.

Вихід сумарної згортуючої активності (ефективність способу) у порівнянні з аналогічним показником для найближчого аналога для пропонованого способу у 1,14 рази вищий.

Питома ємність пропонованого сорбенту в 5,25 рази вища у порівнянні з найближчим аналогом, що дозволяє за один технологічний цикл використати значно більшу кількість вихідної сировини для одержання препарату тромбіну.

Скорочення часу виділення тромбіну за рахунок одностадійного хроматографічного процесу здешевлюють пропонований спосіб, елюція тромбіну більш концентрованим піком спрощує наступні роботи технологічного процесу (діаліз, ліофілізацію), внаслідок чого покращуються аналітичні показники кінцевого продукту - діагностичного чи лікувального препарату.

Джерела інформації:

1. Грачева Н.А., Ужинова Л.Д., Курд А.Л. и др. // Биоорган. химия.-1981.- Т. 7.- № 10.- С. 1560-1565.

2. Schmer G. The purification of bovine thrombin by affinity chromatography on benzamidine-

agarose. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.-1972.- V.353.-P.810-814.

3. Hatton M.W., Regoez E. The affinity of human, rabbit and bovine thrombins for sepharose-lysine and other conjugates // Biochem. Biophys. Acta.-1976.-V.427.-P. 575-585.

4. Affinity chromatography of human thrombin on modified silica /Gaida A.V., Monastyrskii V.A., Magerovskii Yu.V. et al. // J. Chromatogr. - 1987. - V. 424, No. 2.-P. 385-391.

5. Хроматография тромбина на модифицированных кремнеземах: роль матрицы, спейсера и величины рН./ Гайда А.В., Монастырский В.А., Магеровский Ю.В. и др. // Биотехнология.- 1989.- Т. 5.- № 4.- С. 449-454.

6. Магеровский Ю. В. Очистка тромбина и тромбопластина методом аффинной и гелепроникающей хроматографии на модифицированных кремнеземных сорбентах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Львов, 1989. -21с.

7. 65. Монастырский В.А., Магеровский Ю.В., Гайда А.В. Применение полиэтиленгликоля для выделения протромбинового комплекса // Гематол. и трансфузиол.-1986.- №2.-С.51-53.

8. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis./Ed. by R. Biggs//Blackwell Scientific Publications, Philadelphia.-1976.- 722 P.