



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90935

(13) U

(51) МПК

C12N 9/74 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 01076**

(22) Дата подання заявки: **05.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.06.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.06.2014, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Платонова Тетяна Миколаївна (UA),  
Корольова Дар'я Сергіївна (UA),  
Чернишенко Тамара Мартинівна (UA),  
Горницька Ольга Володимирівна (UA),  
Гришук Володимир Іванович (UA),  
Чернишенко Володимир Олександрович  
(UA),  
Луговської Едуард Віталійович (UA),  
Комісаренко Сергій Васильович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ,  
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТРОМБІНУ

(57) Реферат:

Спосіб отримання тромбіну включає одержання фракції вітамін К-залежних білків плазми крові з наступним хроматографічним виділенням з цієї фракції протромбіну та активацію протромбіну в тромбін. Спочатку модифікованим методом одержують концентрат вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом їх сорбції на BaSO<sub>4</sub> з наступною елюцією вітамін К-залежних білків 0,05 М трис-HCl буферним розчином, рН 7,4. Виділяють протромбін із концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом розділення на Q-Sepharose ("Sigma"), яку врівноважують буферним розчином та наступною елюцією протромбіну цим буферним розчином із додаванням 0,4 М NaCl. Проводять іммобілізацію екамуліну на сорбенті BrCN-Sepharose ("SIGMA-AIDRICH"), стандартизують отриманий сорбент екамулін-Sepharose за хромогенним субстратом калікреїну S2302.

UA 90935 U



Корисна модель належить до біотехнології, медицини, біохімії і є способом отримання тромбіну з плазми крові для використання в лабораторній та клінічній практиці при діагностиці порушень функціонування системи зсідання крові та фібринолізу за патології.

Процес зсідання крові - це каскад послідовних реакцій, що направлені на утворення фібринового згустку. Ключовим етапом коагуляційного каскаду є активація протромбіну в тромбін, який перетворює фібриноген на фібрин. Останній разом з активованими тромбоцитами складають основу тромбу, що здатний закривати пошкоджену поверхню судини та перешкоджати кровотечі.

Тромбін - серинова протеїназа з молекулярною масою 35-37 кДа. Активація протромбіну *in vivo* відбувається під дією протромбіназного комплексу, до складу якого входять фактори системи зсідання крові  $X_a$ ,  $V_a$ , фосфоліпіди та іони кальцію.

Відомо, що для отримання тромбіну як сировину використовують очищений протромбін або суміш вітамін К-залежних білків (фактори зсідання крові II, VII, X, IX та протеїн C). Активація протромбіну *in vitro* здійснюється декількома способами [1-6]. Так, тромбін отримують активацією протромбіну за присутності 25-40 % цитрату натрію [1, 2]. Недоліком цього способу є тривалість процесу: активація протромбіну проходить протягом 24-48 год., з подальшим довготривалим діалізом для видалення надлишку цитрату натрію. Крім того, довготривалі процедури призводять до часткової або значної втрати активності препарату в результаті автокаталізу.

Найближчим аналогом способу, що заявляється, є спосіб отримання тромбіну шляхом активації протромбіну тромбопластином за присутності іонів кальцію [3]. Проблема використання цього способу полягає в технології виробництва препарату тромбопластину: сировина може містити патогенні віруси та бактерії. Крім того, додаткові незручності створює процес стандартизації препаратів тромбопластину.

Задачею корисної моделі, що заявляється, є розробка способу отримання високоочищеного препарату тромбіну для використання в лабораторній і клінічній діагностиці стану системи зсідання крові.

Суть способу, що заявляється, полягає в безпосередній активації протромбіну плазми крові до тромбіну екамуліном - активатором протромбіну, іммобілізованим на BrCN-Sepharose, який отримано з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*) в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ [8].

Технічним результатом способу, що заявляється, є одержання тромбіну за допомогою стабільного при багаторазовому використанні іммобілізованого активатора протромбіну на BrCN-Sepharose, що обумовлює стандартизацію процесу активації; одержаний тромбін не потребує діалізу та додаткової очистки від активатору протромбіну.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання тромбіну, що включає одержання фракції вітамін К-залежних білків плазми крові з наступним хроматографічним виділенням з цієї фракції протромбіну та активацію протромбіну в тромбін, згідно з корисною моделлю, спочатку модифікованим методом одержують концентрат вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом їх сорбції на  $BaSO_4$  з наступною елюцією вітамін К-залежних білків 0,05 М трис-HCl буферним розчином, pH 7,4, що містить 0,2 М NaCl і 0,02 М EDTA; після чого виділяють протромбін із концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом розділення на Q-Sepharose ("Sigma"), яку врівноважують 0,02 М трис-HCl буферним розчином, pH 7,4, та наступної елюції протромбіну цим буферним розчином із додаванням 0,4 М NaCl; далі проводять іммобілізацію екамуліну на сорбенті BrCN-Sepharose ("SIGMA-ALDRICH"), стандартизують отриманий сорбент екамулін-Sepharose за хромогенним субстратом калікреїну S2302 при температурі 37 °C впродовж 5 хв в 0,05 М трис-HCl буфері, pH 7,4, який містить 0,13 М NaCl, приймаючи за стандартну одиницю активності сорбенту екамулін-Sepharose такий його об'єм, який за даних умов розщеплює 0,2 мл 0,5 мМ хромогенного субстрату калікреїну S2302 з вивільненням п-нітроаніліну у кількості, що забезпечує екстинцію  $0,15 \pm 0,01$  при довжині хвилі 405 нм; далі, змішуючи протромбін з сорбентом екамулін-Sepharose (з розрахунку 1 мг протромбіну на 2 одиниці активності екамулін-Sepharose) та інкубуючи протягом 1,5 год. при температурі 37 °C, отримують тромбін з активністю  $695 \pm 70$  NIH/мг.

#### Приклад 1

Етап 1. Отримують протромбін з концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові по Фентону [7] з власною модифікацією, для чого спочатку одержують концентрат вітамін К-залежних білків плазми крові, змішуючи плазму крові з барієм сірчаноокислим (60 г  $BaSO_4$  на 1 л плазми крові), проводять сорбцію вітамін К-залежних білків на  $BaSO_4$  при температурі +6 °C з наступним центрифугуванням при 1200-1400 g. Потім елюють вітамін К-залежні білки з отриманого осаду 0,05 М трис-HCl буферним розчином, pH 7,4, що містить 0,2 М NaCl і 0,02 М

ЕДТА, після чого видаляють барій сірчаноокислий центрифугуванням при 1200-1400 g впродовж 15 хв. Протромбін виділяють із отриманого концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом розділення на Q-Sepharose (Sigma). Наносять концентрат вітамін К-залежних білків в 0,02 М трис-НСІ буферним розчином, рН 7,4 та проводять елюцією протромбіну 0,02 М трис-НСІ

буферним розчином, рН 7,4, що містить 0,4 М NaCl (фіг. 1).

Етап 2. Проводять іммобілізацію екамуліну на BrCN-Sepharose (SIGMA-ALDRICH) наступним чином: BrCN-Sepharose промивають  $1 \cdot 10^{-3}$  N HCl; врівноважують 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH буфером, рН 7,8, що містить 0,1 М NaCl; додають екамулін та інкубують при температурі 22 °С впродовж 3 год. на шейкері; матеріал, що не зв'язався з носієм, елюють спочатку 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH буфером, рН 6, а потім 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH буфером, рН 8, що містять 1 М NaCl; зберігають одержаний сорбент екамулін-Sepharose при температурі 6-8 °С в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містить 0,13 М NaCl і 0,02 %  $\text{NaN}_3$ .

Проводять стандартизацію сорбенту екамулін-Sepharose, інкубуючи хромогенний субстрат калікреїну S2302 при температурі 37 °С впродовж 5 хв в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, який містить 0,13 М NaCl, використовуючи на 0,5 мл екамулін-Sepharose-0,2 мл 0,5 мМ хромогенного субстрату калікреїну S2302; реєструють розщеплення хромогенного субстрату калікреїну S2302 по екстинції при 405 нм та 492 нм на рідері ("Titertek Multiskan MC"), приймаючи за стандартну одиницю активності одержаного сорбенту екамулін-Sepharose такий його об'єм, який за даних умов розщеплює хромогенний субстрат калікреїну S2302 з вивільненням п-нітроаніліну у кількості, що забезпечує екстинцію  $0,15 \pm 0,01$ .

Етап 3. Отримують тромбін, змішуючи протромбін з сорбентом екамулін-Sepharose з розрахунку: 1 мг протромбіну на 1, 2 та 3 одиниці активності сорбенту екамулін-Sepharose та інкубують протягом 1, 1,5 та 2,5 год. при температурі 37 °С.

Активність одержаного тромбіну визначають за часом згортання 0,2 % фібриногену під дією тромбіну в 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl, використовуючи калібрувальну криву, побудовану з використанням стандартизованого тромбіну (фіг. 2); за одиницю активності приймають 1 NIH - міжнародну одиницю активності тромбіну, що відповідає такій кількості тромбіну, під дією якої відбувається згортання 1 мл 0,1 %-го фібриногену при температурі 29 °С за 15 сек (таб. 1).

Таблица 1

Активність тромбіну, отриманого на екамулін-Sepharose за різних умов

Час інкубації, год.	Активність тромбіну, NIH/мг		
	1 одиниця активності екамулін-сефарози	2 одиниці активності екамулін-сефарози	3 одиниці активності екамулін-сефарози
1	195±30	420±48	463±57
1,5	305±25	632±45	695±70
2,5	370±48	687±65	743±80

Оптимальний час активації протромбіну на екамулін-Sepharose становить 1,5 год. Подовження часу інкубації до 2,5 год. не дає збільшення активності тромбіну (таб. 1) й може супроводжуватися автокаталізом.

#### Приклад 2

Одержують тромбін за способом найближчого аналога [3] для порівняння його зі способом, що заявляється.

Етап 1. Отримують протромбін з концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові за Фентоном [7] з власною модифікацією (аналогічно прикладу 1).

Етап 2. Активують протромбін тромбопластином ("Ренам", Москва), який готують до роботи відповідно інструкції "Ренампластин". Активацію протромбіну проводять в суміші, що складається з 5 мг протромбіну в 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl та 0,05, 0,08, 0,1 та 0,150 мл тромбопластину). Інкубують при температурі 37 °С протягом 1, 1,5 та 2 години.

Етап 3. Отриманий за способом найближчого аналогу [3] тромбін додатково очищають від тромбопластину з використанням афінної хроматографії на гепарин-Sepharose (фіг. 3). Висока ступінь чистоти отриманого тромбіну підтверджується даними хроматографії.

Етап 4. Визначають ступінь активації протромбіну під дією активатора (як описано в етапі 3, приклад 1) при оптимальних умовах активації: 5 мг протромбіну на 0,08 мл тромбопластину при інкубації суміші протягом 1,5-2 год. при температурі 37 °С (таб. 2).

Таблиця 2

Активність тромбіну, одержаного за методом найближчого аналога, при активації протромбіну тромбопластином після додаткової хроматографічної очистки

Час інкубації, год.	Активність тромбіну, NIH/мг		
	Кількість тромбопластину 0,05 мл	Кількість тромбопластину 0,08 мл	Кількість тромбопластину 0,1 мл
1	78±15	330±60	417±30
1,5	238±30	503±68	500±70
2	312±30	510±20	504±40

Таким чином, тромбін, отриманий способом, що заявляється, після активації протромбіну протягом 1,5 год. має активність 695±70 NIH/мг (таб. 1) без додаткової очистки. А тромбін, отриманий способом найближчого аналога [3], після активації протягом 1,5 год. та додаткової хроматографічної очистки має активність 500±70 NIH/мг (таб. 2).

Отримані дані свідчать про те, що спосіб, що заявляється, є високоефективним, оскільки дозволяє без додаткової очистки отримати препарати тромбіну високої активності - 695±70 NIH/мг порівняно з найближчим аналогом - 500±70 NIH/мг (таб. 1 і 2).

Перевагами способу для отримання тромбіну, є:

- можливість стандартизації для багаторазового використання екамулін-Sepharose - стабільного іммобілізованого активатора протромбіну екамуліну на сорбенті BrCN-Sepharose;
- отриманий тромбін не потребує додаткової очистки від активатора протромбіну.
- оптимальний час отримання тромбіну складає 1-1,5 год.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє отримувати тромбін високої активності без додаткової очистки, використовуючи при цьому стандартизований активатор протромбіну багаторазового використання (екамулін-Sepharose).

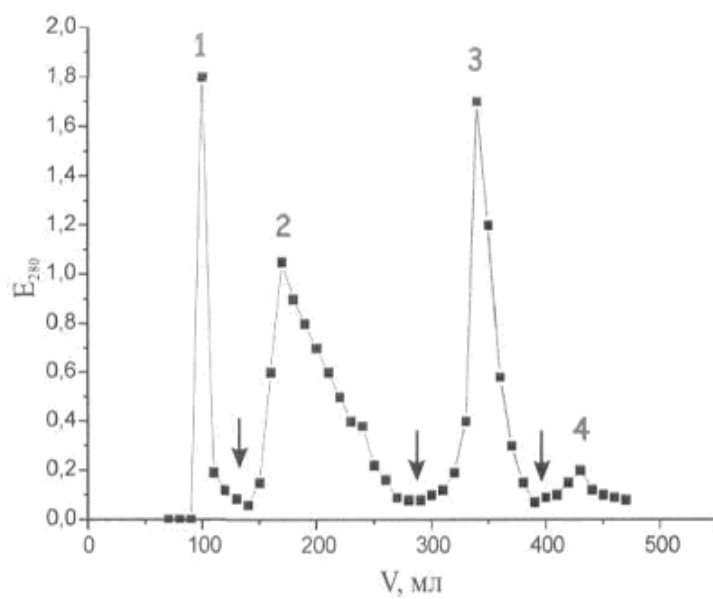
Перелік використаних джерел

1. Пат. 6,245,548 US. Опубл. 12.06.2001.
2. Lanchantin G., Friedmann J.A., Hart D.W. The conversion of prothrombin to thrombin by sodium citrate // J.Biol.Chem. - 1985. - Vol. 240, N8. - P. 3276-3282.
3. Пат. 5,151,355 US. Опубл. 29.09.1992.
4. Пат. 6,168,938 US. Опубл. 02.01.2001.
5. Пат. 5,723,123 US. Опубл. 3.03.1998.
6. Пат. 8,012,728 US. Опубл. 06.09.2011.
7. Fenton J.N., Fasco M.J., Stackrow A.B. et al. Human thrombin. Production, evolution and properties of  $\alpha$ -thrombin // J.Biol.Chem. - 1977. - Vol. 252, N9. - P. 3587-3598.
8. Соловьев Д.А., Платонова Т.Н., Угарова Т.П. Выделение и характеристика экамулина - активатора протромбина из яда эфы многочешуйчатой (*Echis multisquamatus*) // Биохимия, 1996, т. 61, вып. 6, С. 1094-1105.

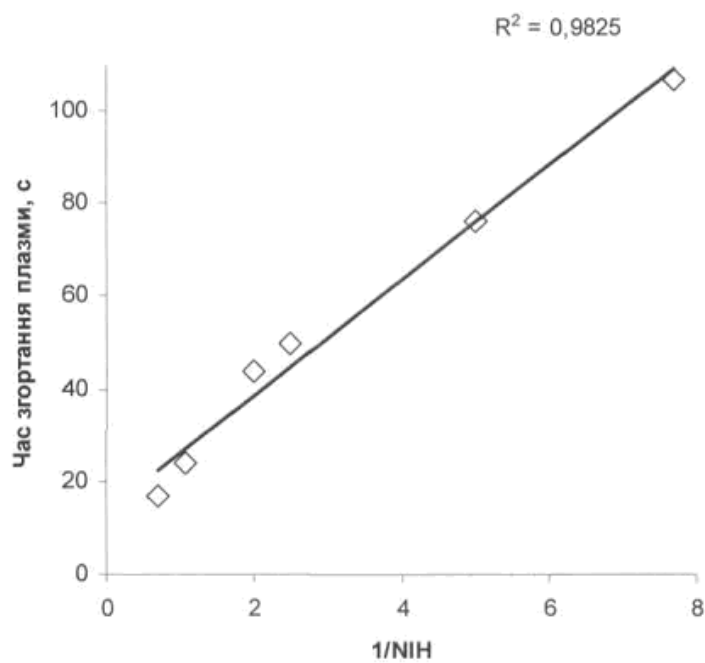
#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання тромбіну, що включає одержання фракції вітамін К-залежних білків плазми крові з наступним хроматографічним виділенням з цієї фракції протромбіну та активацію протромбіну в тромбін, який **відрізняється** тим, що спочатку модифікованим методом одержують концентрат вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом їх сорбції на BaSO<sub>4</sub> з наступною елюцією вітамін К-залежних білків 0,05 М трис-НCl буферним розчином, рН 7,4, що містить 0,2 М NaCl і 0,02 М EDTA; після чого виділяють протромбін із концентрату вітамін К-залежних білків плазми крові шляхом розділення на Q-Sepharose ("Sigma"), яку врівноважують 0,02 М трис-НCl буферним розчином, рН 7,4, та наступної елюції протромбіну цим буферним розчином із додаванням 0,4 М NaCl; далі проводять іммобілізацію екамуліну на сорбенті BrCN-Sepharose ("SIGMA-ALDRICH"), стандартизують отриманий сорбент екамулін-Sepharose за хромогенним субстратом калікреїну S2302 при температурі 37 °C впродовж 5 хв в 0,05 М трис-НCl буфері, рН 7,4, який містить 0,13 М NaCl, приймаючи за стандартну одиницю активності сорбенту екамулін-Sepharose такий його об'єм, який за даних умов розщеплює 0,2 мл 0,5 мМ хромогенного субстрату калікреїну S2302 з вивільненням п-нітроаніліну у кількості, що забезпечує екстинцію 0,15±0,01 при довжині хвилі 405 нм; далі, змішуючи протромбін з сорбентом екамулін-Sepharose (з розрахунку 1 мг протромбіну на 2 одиниці активності екамулін-

Sepharose) та інкубуючи протягом 1,5 год. при температурі 37 °С, отримують тромбін з активністю  $695 \pm 70$  NIH/мг.

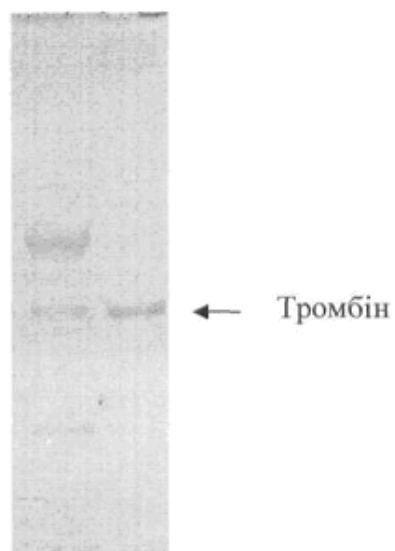


Фіг. 1



Фіг. 2

Б



**Fig. 3**

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601