

Винахід відноситься до біотехнології, біохімії, медицини та являє собою спосіб виділення високоочищеного α_2 -антиплазміну з донорської плазми. α_2 -Антиплазмін може бути використаний у біохімії для дослідження механізмів регуляції фібринолізу та позаклітинного протеолізу, в медичній біохімії для вивчення впливу на процеси інвазії та метастазування пухлинних клітин, а також у клінічній практиці для кількісного визначення окремих білкових компонентів фібринолітичної системи.

α_2 -Антиплазмін - основний плазменний швидкодіючий високоспецифічний інгібітор плазміну з молекулярною масою 70кДа. Фізіологічна роль α_2 -антиплазміну полягає в інактивації плазміну, що утворився в кровотоці, і запобіганні неспецифічного протеолізу білків плазми. В той час як активатори плазміногена є важливими фармакологічними засобами для лікування судинних захворювань, α_2 -антиплазмін як селективний інгібітор плазміну може бути ефективним засобом контролю за міграцією пухлинних клітин та деградацією міжклітинного матриксу. Плазміноген/плазмінова система бере участь у багатьох фізіологічних та патофізіологічних процесах в організмі людини: підтриманні рідкого стану крові, загоєнні ран, овуляції та заплідненні яйцеклітин, трансформації тканин, у запальних, алергічних, інфекційних процесах, метастазуванні пухлин (1-3).

Визначення ролі основного інгібітору плазміну в цих процесах та можливість застосування його в клінічній практиці є актуальною проблемою сучасної біохімії та медицини.

Різні способи виділення α_2 -антиплазміну базуються на його здатності з високою спорідненістю взаємодіяти з певними структурами в N-кінцевій частині молекули плазміногена, так званими лізин-зв'язуючими ділянками.

Подібна здатність властива плазменним білкам: фібриногену та гістидинбагатому білку. Одержання препаратів α_2 -антиплазміну без домішок цих білків потребує додаткових трудомістких етапів очистки. Особливо це стосується гістидинбагатого білка, який має дуже близьку до α_2 -антиплазміну молекулярну масу - 68кДа. Гістидинбагатий білок знижує швидкість інгібування плазміну α_2 -антиплазміном (4) і має однакову з α_2 -антиплазміном здатність пригнічувати зв'язування плазміногена з фібрином (5).

Для виділення α_2 -антиплазміну використовують комбінацію традиційних методів одержання білків, іонообмінну та афінну хроматографію (6). Процедура включає в себе афінну хроматографію на лізин-сефарозі, фракціонування плазми сульфатом амонію, хроматографію на ДЕАЕ-сефадексі, афінну хроматографію на плазміноген-сефарозі та хроматографію на гідроксипатиті. Описаний спосіб має низький вихід інгібітору з невисокою питомою активністю.

Запропонований іншими авторами метод дозволяє отримати білок з більш високим ступенем очистки та високою питомою активністю. На першому етапі з цитратної плазми видаляють плазміноген на лізин-сефарозі, потім проводять хроматографію на плазміноген-сефарозі, ДЕАЕ-сефадексі А-50, конканавалін А-сефарозі (7). Недоліком даної процедури є її бага тоетапність, що вимагає значних витрат часу та праці.

Встановлено, що взаємодія α_2 -антиплазміну з плазміногеном опосередкована лізин-зв'язуючими ділянками останнього, що розташовані в перших трьох N-кінцевих кринглових доменах (K1-3) (8). Плазма містить дві ізоформи плазміногена, що різняться за кількістю вуглеводних компонентів. Форма I гликозилізована в положеннях Asn288 та Thr345, форма II - тільки в положенні Thr345. α_2 -Антиплазмін виявляє високу спорідненість саме до II форми плазміногена (9). Отримані дані дозволили створити новий афінний сорбент, в якому високо специфічним лігандом для α_2 -антиплазміну був фрагмент II форми плазміногена K1-3 (Tyr79-Val337), іммобілізований на бромціанактивованій-сефарозі (10). K1-3 одержували з еластазного гідролізату II форми плазміногена (11). I і II форми плазміногена розділяли на лізин-сефарозі за різної концентрації 6-аміногексанової кислоти (9). Запропонований сорбент дозволяє підвищити вихід інгібітору (5). Цитратну плазму послідовно наносять на лізин-сефарозу, K1-3 (II форма)-сефарозу та отримують матеріал, що містить близько 80% α_2 -антиплазміну та домішки фібриногену й гістидинбагатого білка. Фібриноген видаляють гель-фільтрацією на Ultrogel ACA 44. Для отримання α_2 -антиплазміну без домішок гістидинбагатого білка використовують додатковий етап очистки - іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-сефадексі А-50 (12). Дана процедура також тривала й трудомістка. Крім того, етапи гель-фільтрації, іонообмінної хроматографії, що призводять до багаторазового розбавлення α_2 -антиплазміну, і його наступне концентрування негативно впливають на вихід та активність кінцевого препарату.

Як прототип обрано метод одержання α_2 -антиплазміну, що складається з чотирьох етапів: видалення плазміногена з цитратної донорської плазми на лізин-сефарозі, осадження спиртом фібриногена, одержання α_2 -антиплазміну афінною хроматографією на K1-3-сефарозі та очистка препарату на ДЕАЕ-сефадексі А-50 від домішок гістидинбагатого білка (13). Описаний спосіб дозволяє видалити етап гель-фільтрації і таким чином підвищити вихід та отримати α_2 -антиплазмін з високою інгібіторною активністю. Однак, цей метод також вимагає значних витрат часу, праці і для видалення гістидинбагатого білка потребує додаткового етапу очистки з наступним концентруванням після іонообмінної хроматографії.

Таким чином, виділення α_2 -антиплазміну з донорської плазми - багатоетапний процес, пов'язаний зі значними витратами часу, праці, а отриманий білок містить домішки фібриногену та гістидинбагатого білка, що потребує додаткових етапів очистки та концентрування, внаслідок чого значно зменшується вихід та активність інгібітору.

Задачею даного винаходу є розробка простого та швидкого способу виділення α_2 -антиплазміду з використанням послідовної афінної хроматографії на лізин-, K1-3 (I форма) та K1-3 (II форма)-сефарозі без застосування додаткових методів очистки - гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії. Це дозволяє в один етап одержати α_2 -антиплазмін з високою інгібіторною активністю без домішок фібриногену та гістидинбагатого білка. Паралельним завданням є більш повна утилізація донорської плазми.

Для вирішення задачі донорську плазму наносять на три послідовно з'єднані афінно-хроматографічні колонки: перша з лізин-сефарозою; друга з K1-3-сефарозою (Tyr79-Val353, I форма), третя з K1-3-сефарозою (Tyr79-Val337, II форма). I та II форми кринглів розділяли на конканавалін А-сефарозі (14).

На лізин-сефарозі плазму виснажують на плазміноген, тим самим вивільняючи частку α_2 -антиплазміну, що в плазмі крові циркулює в комплексі з плазміногеном. На K1-3 (I форма)-сефарозі плазму виснажують на фібриноген та гістидинбагатий білок. На K1-3 (II форма)-сефарозі специфічно сорбується α_2 -антиплазмін.

Після нанесення плазми колонки промивають робочим буфером з високою іонною силою для видалення неспецифічно сорбованих білків. Елюцію α_2 -антиплазміну з третьої колонки проводять робочим буфером, що містить 6-аміногексанову кислоту.

Одержаний α_2 -антиплазмін за даними електрофорезу має молекулярну масу 70кДа і є гомогенним (без домішок фібриногену і гістидинбагатого білка). Виділений α_2 -антиплазмін проявляє високу інгібіторну активність, яку визначають за здатністю інгібувати гідроліз плазміном специфічного хромогенного субстрату D-Val-L-Leu-L-Lys-п-нітроаніліду (15). Отримані препарати α_2 -антиплазміну зберігають при -40°C або ліофілізують.

Можливість здійснення способу підтверджується прикладами.

Приклад 1.

200мл цитратної донорської плазми, до якої додавали детергент тритон X-100 до 0,01% кінцевої концентрації, наносили зі швидкістю 15-20мл/год при $+4^{\circ}\text{C}$ на три послідовно з'єднані афінно-хроматографічні колонки :

- лізін-сефарозу 4В, 50мл гелю сефарози, попередньо зрівноваженою 0.05М натрій-фосфатним буфером, рН 7,4;

- K1-3 (I форма)-сефарозу 4В, 20мл гелю сефарози, що містить 2мг K1-3 на 1мл гелю, попередньо зрівноваженою 0,04М натрій-фосфатним буфером, рН7,0;

- K1-3 (II форма)-сефарозу 4В, 20мл гелю сефарози, що містить 2мг K1-3 на 1мл гелю, попередньо зрівноваженою 0,04М натрій-фосфатним буфером, рН7,0.

Після нанесення плазми третю колонку промивають 0,04М натрій-фосфатним буфером, рН7,0, що містить 0,5М хлорид натрію до 0-0,02 значень екстинкції розчину при 280нм. Специфічну елюцію α_2 -антиплазміну проводять 0,04М натрій-фосфатним буфером, рН7,0, що містить 0,05М 6-аміногексанову кислоту. Збирають фракції об'ємом 1,25мл. Фракції, екстинкція яких становить 0,5-2,0 при 280нм, об'єднують. α_2 -Антиплазмін діалізують проти охолодженої дистильованої води, в яку додають бікарбонат амонію до слабо лужної реакції. Концентрацію інгібітору визначають, вимірюючи оптичне поглинання за 280нм і віднімаючи значення поглинання за 320нм. Концентрацію розраховують за значенням коефіцієнта екстинкції (1%, 1см) α_2 -антиплазміну, що дорівнює 6,7. Активність α_2 -антиплазміну визначають за інгібуванням амідолітичної активності плазміну з відомим відсотком активних центрів. Молярне співвідношення α_2 -антиплазміну до плазміну дорівнює 1:1. Активність одержаних препаратів перевищує 90%.

Приклад 2.

Виділення α_2 -антиплазміну проводять, як показано в прикладі 1, але донорську плазму розбавляють вдвічі для зменшення в'язкості. Розбавлення плазми збільшує тривалість виділення α_2 -антиплазміну, внаслідок чого його інгібіторна активність дещо знижується.

Приклад 3.

α_2 -антиплазмін виділяють, як описано у прикладі 1, але в плазму не додають тритон X-100. Відсутність детергенту не впливає на концентрацію та активність отриманого інгібітору, але не дозволяє використовувати плазму з високим вмістом ліпідів.

Таким чином, запропоновано простий та швидкий спосіб виділення високоочищеного інгібітору плазміну з плазми крові людини. Спосіб дозволяє в один етап без застосування додаткових методів очистки - гел'єфільтрації та іонообмінної хроматографії одержати α_2 -антиплазмін без домішок фібриногену та гістидинбагатого білка з високою інгібіторною активністю.

Список посилань.

1. Dano K., Andersen P.A., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Neilsen L.S., Skriver L. Plasminogen activator, tissue degradation and cancer. *Adv.Cancer.Res.*-1985.-44, №1 .-p.139-226.

2. Chapman H.A. Plasminogen activator, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr.Opm.Cell Biol.*-1997.-9.-p.714-724.

3. Lottenberg R.A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.*-1997.-5.-p.466-468.

4. Lijnen H.R., Rylatt D.B., Collen D. Physicochemical, immunochemical and functional comparison of human histidine-rich glycoprotein and autorosette inhibitor factor. *Biochim.Biophys.Acta.*-1983.-742, №1. -p.109-115.

5. Lijnen H.R., Hoylaerts M., Collen D. Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. *J.B.C.*-1980.-255, №21.-p.10214-10222.

6. Moroi M., Aoki N. Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J.Biol.Chem.*-1976.-251, №19.-p.5956-5965.

7. Wiman B., Collen D. Purification and characterization of human antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor in plasma. *Eur.J.Biochem.*-1977.-78, №1.-p.19-26.

8. Wiman B., Lijnen H.R., Collen D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α_2 -antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim.Biophys.Acta.*-1979.-579, №1.-p.142-154.

9. Hayes M.L., Castellino F.J. Carbohydrate of the human plasminogen variants. *J.Biol.Chem.*-1979.-254, №.-p.8768-8771.

10. March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogens bromide activation of agarose for affinity chromatography. *AnaL Biochem.*-1974.-60, №1.-p.149-152.

11. Sottrup-Jensen L., Zaidel M., Claeys H et al. The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one "mini-plasminogen" (M.W.38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis.* N.Y. Raven Press.-1978.-3.-p.191-209.

12. Wiman B. Affinity-chromatographic purification of human α_2 -antiplasmin. *Biochem.J.*-1980.-191, №1.-p.229-232.

13. Lijnen H.R., Collen D. Alpha-2-antiplasmin. *J.Med.*-1985.-16, №1-3.-p.225-283.

14. Arias M., Solis D., Diaz-Maurino T. Involvement of the lysine-binding site of plasminogen on its interaction with concanavalin A. *Thromb. Res.*-1989.-56, №6.-p.709-718.

15. Wiman B. Human α_2 -antiplasmin. Methods in Enzymol.-1981.-80.-p.395-408.