

Optimizacija izolacije koagulacijskog faktora IX

Sobol, Silvia

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:299269>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Silvia Sobol
Optimizacija izolacije koagulacijskog faktora IX iz humane plazme
Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Silvia Sobol
Optimizacija izolacije koagulacijskog faktora IX iz humane plazme
Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Zahvala

Zahvaljujem se svome mentoru, prof.dr.sc. Đuri Josiću, što mi je izašao u susret i omogućio izradu ovog rada. Zahvalna sam na svim savjetima, potpori, strpljenju i pruženom znanju tijekom rada u njegovom laboratoriju.

Veliku zahvalnost dugujem i kolegama Tamari i Urošu, što su me tijekom rada usmjeravali i što sam uz njih uvijek znala da sam na pravom putu. Hvala na vremenu, podijeljenom iskustvu i znanju.

Hvala kolegicama Mariji, Anji i Iris, bez kojih bi kromatografija bila malo manje zabavna.

Mentor rada: prof.dr.sc. Đuro Josić

Diplomski rad obranjen je dana 18. rujna 2018.

pred povjerenstvom:

1. Prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić (predsjednik)
2. Doc.dr.sc. Karlo Wittine (član)
3. Prof.dr.sc. Đuro Josić (član)

Rad ima 45 stranica, 18 slika, 1 tablicu i 48 literaturnih navoda

SAŽETAK

Zgrušavanje krvi odvija se nizom reakcija, a ključni je događaj aktivacija faktora zgrušavanja. Ukoliko je neki od faktora deficijentan ili ne može izvršavati svoju funkciju, neće doći do te važne fiziološke reakcije. Najčešće genetske bolesti povezane sa defektom zgrušavanja krvi su hemofilija A i B. Hemofilija A je češća i uzrokovana je nedostatkom ili defektom faktora VIII. Deficijencija faktora IX (FIX) uzrok je hemofilije B. Ova bolest je znatno rjeđa od hemofilije A, ali su simptomi ovih genetskih poremećaja jako slični. Kod nedostatka jednog od ova dva faktora dolazi do krvarenja u mišiće, zglobove i u mekom tkivu, što predstavlja problem prilikom ozljeda ili tijekom operacija. Kao terapija koristi se intravenozna infuzija deficijentnog faktora, koji se dobiva iz humane plazme ili metodom rekombinantne DNA.

Proces kojim se FIX izolira iz humane plazme uključuje različite tipove kromatografije kojima se postepeno uklanjaju ostale komponente plazme, dok se kao krajnji produkt ne dobije pročišćeni koncentrat FIX. Prilikom purifikacije FIX iz humane plazme, prinos i koagulacijska aktivnost FIX opada sa svakim korakom. Stoga je potrebno optimizirati postupak tako da se koncentrat FIX dobije u što manje koraka i sa maksimalnim prinosom.

U ovom radu je u prvom koraku sistematski ispitano nekoliko omjera mase matriksa i volumena plazme, kako bi se odredila koncentracija plazme pri kojoj dolazi do potiskivanja komponenata uzorka (engl. *sample displacement*), odnosno vezanja proteina prisutnih u niskim koncentracijama u plazmi za nosač. Uvjet je da ti proteini imaju znatno viši afinitet prema kromatografskom nosaču od onih koji dolaze u višoj koncentraciji, ali se vežu sa znatno nižim afinitetom. U ovom koraku je korišten poprečno vezani dekstran (Sephadex), koji je dodan plazmi u različitim koncentracijama. Ispitane su dvije vrste poprečno vezanog dekstrana različitih ionskih jakosti – DEAE (dietilaminoetil) Sephadex, i QAE (kvartarni aminoetil) Sephadex. U svrhu određivanja optimalnog

omjera između količine plazme i dodanog poprečno vezanog dekstrana (Sephadex), ionski izmjenjivač je odvojen centrifugiranjem i vezani proteini su eluirani otopinom NaCl. U sljedećem koraku je eluirani materijal dijaliziran i ponovo nanesen na različite kolone punjene anionskim izmjenjivačima. Te su kolone ili punjene zrnastim materijalom ili su korištene monolitne kolone sa anionskim izmjenjivačima različite jakosti – QAE i DEAE koji vežu FIX i prateće proteine različitim intenzitetom. Nakon svakog kromatografskog postupka provedena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrij dodecil-sulfat (SDS-PAGE) kako bi se odredio proteinski sastav frakcija. Razvijene su Western blot metode za potvrdu prisutnosti FIX, te glavnog kontaminanta, faktora X (FX) u pojedinim frakcijama.

Naši rezultati sugeriraju da pri optimalnom omjeru između količine plazme i količine poprečno vezanog dekstrana (Sephadex) dolazi do potiskivanja komponenata uzorka, što znači da komponente koje se sa višim afinitetom vežu na anionski izmjenjivač (u ovom slučaju poprečno vezani dekstran - Sephadex) potiskuju one vezane nižim afinitetom. Ovaj postupak i kromatografske kolone korištene u ovom istraživanju mogu se koristiti u izolaciji FIX iz humane plazme, te pomoći u daljnjoj optimizaciji procesa purifikacije ovog važnog terapijskog proteina.

Ključne riječi: hemofilija B, faktor IX, FIX, kromatografija

SUMMARY

Blood clotting takes place through a series of reactions, and the key one is activation of coagulation factors. If any of the factors in the clotting cascade is deficient or if it cannot perform its function, this important physiological reaction will be disturbed. Two most common genetic disorders linked to the blood clotting defect are hemophilia A and B. Hemophilia A, caused by factor VIII deficiency or defect, is more prevalent. Deficiency of coagulation factor IX (FIX) is the cause of hemophilia B. Its prevalence is significantly lower than hemophilia A, but the symptoms are similar. In case of deficiency of one of these factors, bleeding in the muscles, joints and soft tissues occurs, presenting a problem in injuries and during operations. As a therapy, intravenous infusion of FIX is given to the patient. Therapeutic FIX can be derived from human plasma or by recombinant DNA method.

The process of FIX isolation from human plasma involves various types of chromatography, by which other plasma components are removed gradually until the final product is obtained in form of purified FIX concentrate. During the purification process, the yield and enzymatic activity of FIX tend to decrease after each step. It is therefore necessary to optimize the process, so that FIX concentrate is obtained in as few steps as possible, and the maximal yield is achieved.

In this study, several matrices added to human plasma in different ratios were tested, to determine the plasma concentration at which the sample displacement occurs. Under these conditions, low abundance plasma proteins bind to the matrix. This will happen only if these proteins bind to the matrix with significantly greater affinity than high abundance proteins. In this step, cross linked dextran (Sephadex) is added to plasma at different concentrations. Two types of Sephadex with different ionic strength were tested – diethylamino ethyl (DEAE) and quaternary (QAE) Sephadex. To determine the optimal Sephadex to plasma ratio, the anion exchanger was separated by centrifugation, and bound proteins were

eluted with a NaCl solution. In the next step, eluted material is dialyzed and reapplied to different columns packed with anion exchange materials. These columns are either packed with granular material or with a monolithic support with anion exchangers of different strength - QAE or DEAE, binding FIX and the accompanying proteins with different intensity. After each chromatographic step, electrophoresis on polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed to determine protein composition. Western blot methods were developed to confirm the presence of FIX and its main contaminant, factor X (FX), in certain fractions.

Our results document that an optimal plasma to Sephadex ratio leads to sample displacement, meaning that the compounds which bind to the anionic exchanger (in this case Sephadex) with higher affinity, replace the compounds that bind with lower affinity. This procedure, as well as the columns used in this study can be used in FIX isolation from human plasma, which can help in further optimization of the purification process of this therapeutically important protein.

Key words: hemophilia B, factor IX, FIX, chromatography

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Zgrušavanje krvi.....	1
1.1.1.	Koagulacijski faktor IX.....	3
1.1.2.	Struktura koagulacijskog faktora IX.....	3
1.2.	Hemofilija	5
1.2.1.	Terapija koagulacijskim faktorom IX	6
1.2.2.	Rekombinantni koagulacijski faktori VIII i IX	7
1.3.	Frakcionacija plazme	8
1.4.	Izolacija koagulacijskog faktora IX iz humane plazme.....	10
1.4.1.	Kromatografija kao metoda za izolaciju terapijskih proteina iz plazme	10
1.4.2.	Metoda potiskivanja komponenata uzorka u kromatografskom odjeljivanju proteina	11
1.4.3.	Monolitne kolone	12
2.	CILJ RADA.....	14
3.	MATERIJALI I METODE.....	16
3.1.	Adsorpcija na QAE i DEAE Sephadex (ekstrakcija na čvrstoj fazi)	16
3.2.	Kromatografija ionske izmjene.....	18
3.2.1.	Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama	18
3.2.2.	Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE CIM kolonama	19
3.2.3.	Kromatografija ionske izmjene na QAE TOYOPEARL koloni	19
3.3.	Kvantifikacija proteina - BCA test.....	20
3.4.	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil-sulfat (SDS-PAGE)	21
3.5.	Određivanje prisutnosti koagulacijskih faktora pomoću Western blot metode.....	22
3.5.1.	Koagulacijski faktor IX.....	22
3.5.2.	Koagulacijski faktor X.....	23
4.	REZULTATI.....	25
4.1.	Adsorpcija na QAE i DEAE Sephadex (ekstrakcija na čvrstoj fazi)	25
4.2.	Kromatografija ionske izmjene.....	27
4.2.1.	Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama	27
4.2.2.	Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE CIM kolonama	30
4.2.3.	Kromatografija ionske izmjene na QAE TOSOH koloni.....	32
5.	RASPRAVA.....	34
6.	ZAKLJUČAK.....	37
7.	LITERATURA.....	39

8. ŽIVOTOPIS.....	44
-------------------	----

1. UVOD

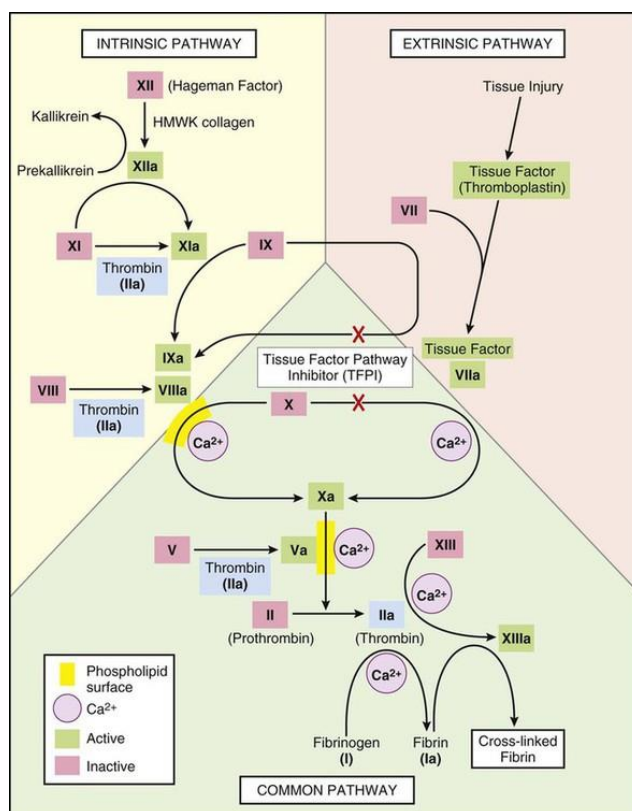
1.1. Zgrušavanje krvi

Prilikom ozljede tkiva, krv izlazi iz cirkulacije te gubi tekuća svojstva i postaje želatinasta. To se događa zbog nastanka krvnog ugruška, što je mreža tankih filamenata koji se isprepliću oko stanica krvi. Zgrušavanje krvi se odvija na površinama stanica poput aktiviranih trombocita i monocita te fibroblasta, nizom reakcija aktivacije koagulacijskih faktora, čime se postiže kontrolirano zgrušavanje samo u potrebnim situacijama (1). Regulatorni mehanizam ovog procesa je naizmjenično djelovanje koagulacijskih faktora i njihovih prirodnih inhibitora (2). Jedan dio ovih proteina su vitamin K ovisni te su produkti biosinteze u jetri (3). Vitamin K ovisni koagulacijski faktori su faktor II (FII) ili protrombin, faktor VII (FVII), faktor IX (FIX) i faktor X (FX). Vitamin K ovisni koagulacijski inhibitori su protein S, protein C i protein Z (4).

U normalnom stanju u cirkulaciji krv se ne zgrušava, jer koagulacijski faktori postoje u neaktivnom obliku, kao zimogeni. Kada se aktiviraju, djeluju kao proteolitički enzimi koji aktiviraju ostale zimogene, sve do pretvorbe fibrinogena u fibrin (5).

Proces koagulacije se odvija u tri faze, koje su pokazane u slici 1: najprije dolazi do aktivacije protrombina, koji se zatim pretvara u trombin, a ova proteaza konačno katalizira konverziju fibrinogena u fibrin (6). Aktiviranje protrombina može se odvijati egzogenim i endogenim putem. U egzogenom putu aktivacija je pokrenuta tkivnim tromboplastinom, a u endogenom putu trombocitima u samoj krvi (7). Aktivator protrombina (faktor Xa) pretvara protrombin u trombin u prisustvu Ca^{2+} iona. Sam trombin može ubrzati reakciju mehanizmom pozitivne povratne sprege, tako da aktivira faktor V (FV), što zauzvrat ubrzava formaciju protrombinskog aktivatora. U zadnjem koraku, topivi fibrinogen se pretvara u netopivi fibrin. Prvo se fibrinogen pretvara u aktivni fibrinogen

– fibrin monomer, a zatim se polimerizira sa ostalim monomerima te se stvara fibrin. Na početku, prvi formirani fibrin sadrži labavo raspoređene niti, a kasnije se modificira u gusti, čvrsti agregat, pomoću fibrin stabilizirajućeg faktora (FXII), u prisustvu Ca^{2+} iona (1).



Slika 1. Shematski prikaz kaskade zgrušavanja krvi. (8)

Vitamin K ovisni faktori, protein C, protein S i protein Z su prirodni inhibitori gore opisanog procesa koagulacije. Koagulacijski faktori i inhibitori su u prirodnoj ravnoteži, i tek njenim poremećajem dolazi do stvaranja ugruška i tromboze. Antikoagulansi su supstance koje se primjenjuju u sprečavanju ili odgađanju patološkog zgrušavanja krvi i uzimaju se za profilaksu ili liječenje tromboembolijskih poremećaja, za čuvanje cijele krvi ili dijela krvi te za sprečavanje zgrušavanja laboratorijskih uzoraka krvi. Antikoagulansi su supstance poput heparina, dikumarola, warfarina, etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), citrati i slično (9,10).

1.1.1.Koagulacijski faktor IX

Koagulacijski faktor IX (FIX) je vitamin K ovisni protein plazme relativne molekulske mase 55kDa, te ima ključnu ulogu u intrinzičnom putu zgrušavanja krvi (6). Njegova koncentracija u plazmi je oko 4 µg/ml (4). FIX se u cirkulaciji nalazi u obliku 415 aminokiselina dugačkog jednolančanog zimogena (11). Aktivna forma FIX (FIXa) djeluje kao serin proteaza slična tripsinu te prevodi koagulacijski faktor X (FX) u aktivnu enzimsku formu (FXa). Uz prisutnost Ca^{2+} iona i fosfolipida FIXa se veže na negativno nabijenu površinu membrane faktora VIIa, selektivno cijepa vezu između arginina i izoleucina u FX i tako ga aktivira u FXa (1). FXa jedna je od ključnih proteaza koagulacijske kaskade (Slika 1).

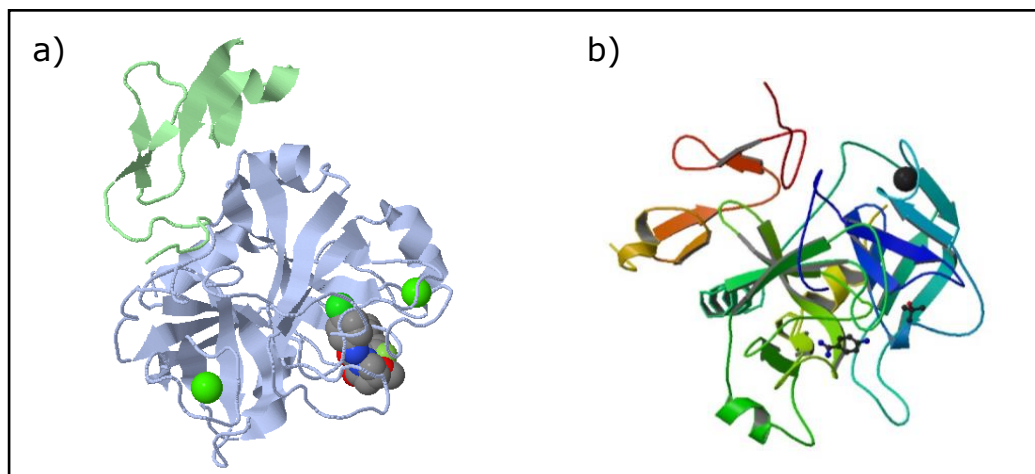
1.1.2.Struktura koagulacijskog faktora IX

Faktor IX se sastoji od 4 funkcionalno različite domene (Slika 2). Sekvenca FIX je kodirana genom f9 koji sadrži 33,5 kilobaza DNA, uključujući 8 egzona. Domena proteaze čini polovicu mase ukupnog proteina. Aktivacija FIX se događa pomoću jednog od dva fiziološka aktivatora: faktora VIIa u kompleksu sa tkivnim faktorom (TF), ili faktora XIa (12). Proteolitičkim cijepanjem nakon dva bazična aminokiselinska ostatka (Arg-145 i Arg-180) oslobađa se aktivacijski peptid (13). Tako nastaje enzim sa dvolančanom strukturom, FIXa, koji se sastoji od lakog lanca sa Gla i domenom sličnom epidermalnom faktoru rasta (EGF), i teškog lanca, koji sadrži katalitičku domenu. Ove dvije domene su međusobno povezane jednostrukom disulfidnom vezom.

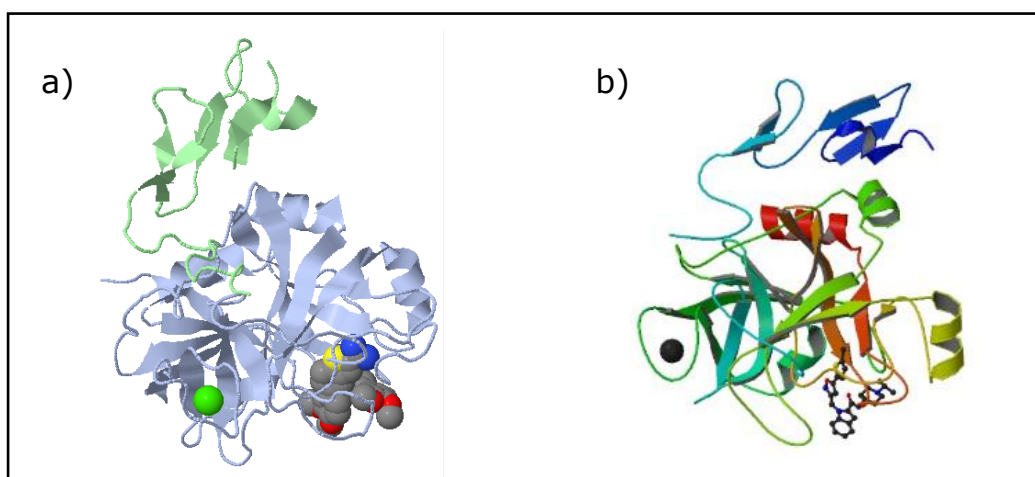
Signalni peptid	N-terminalni propeptid	Laki lanac – domena slična EGF	Aktivacijski peptid	Teški lanac – katalitička domena	
0	28	46	191	226	461

Slika 2. Dijelovi strukture koagulacijskog faktora IX.

Aktivacijski peptid FIX sadrži mnoga mjesta na kojima se odvijaju posttranslacijske modifikacije (PTM) koje utječu na svojstva FIX, uključujući N-vezane oligosaharide. FIX sadrži ukupno 9 potencijalnih mjesta za glikozilaciju (14). Od svih PTM, jedina modifikacija koja ima izravan i značajan učinak na prokoagulacijsku aktivnost FIX je γ -karboksilacija u Gla domeni (15). Ova regija karakteristična za vitamin K ovisne proteine je bogata γ -karboksiglutaminskom kiselinom, a nalazi se u N-terminalnom dijelu proteina (16). Adicija karboksilne grupe na γ -ugljik glutamata je reakcija katalizirana vitamin K ovisnim enzimom γ -glutamil-karboksilazom (17). γ -karboksilacija glutamatnih ostataka Gla domene uvjetuje vezanje domene za kalcij i fosfolipide, što je neophodno za ispravnu proteaznu aktivnost tijekom koagulacije krvi (18).



Slika 3. Struktura koagulacijskog faktora IX (a) i njegove aktivne forme IXa (b).



Slika 4. Struktura koagulacijskog faktora X (a) i njegove aktivne forme Xa (b).

1.2. Hemofilija

Ukoliko je neki od faktora zgrušavanja deficitantan ili ne može izvršavati svoju funkciju, neće doći do koagulacije krvi. Najčešće se radi o deficijenciji faktora VIII (FVIII), koja je uzrok hemofilije A, i deficijenciji faktora IX (FIX), koja je uzrok hemofilije B. Hemofilija je nasljedni poremećaj krvarenja koji nastaje zbog mutacija u f8 ili f9 genu, koji nose kod za sintezu koagulacijskih faktora VIII i IX. 30% slučajeva hemofilije je uzrokovano novim mutacijama, koje mogu biti točkaste (engl. *nonsense* i *missense*) mutacije, insercije, delecije i slično. Postoji više od tisuću mutacija f9 gena (vidi tablicu 1 i [20]). Većina ih se nalazi u dijelu gena koji kodira za katalitičku domenu. Mutacije u promotorskoj regiji uzrokuju lakši oblik hemofilije B Leiden (20). U takvim slučajevima postoji gotovo potpuna deficijencija tijekom djetinjstva, no s vremenom razina endogenog FIX naraste do gotovo normalnih vrijednosti.

Tablica 1. Neke od čestih mutacija koagulacijskog faktora IX. Mutacijom na poziciji 46 dolazi do sprečavanja cijepanja propeptida. Pretvorba aspartata u glicin na poziciji 93 vjerojatno uzrokuje nemogućnost vezanja na stanične membrane. Zamjena arginina sa glicinom, triptofanom ili glutaminom na poziciji 226 dovodi do sprečavanja cijepanja aktivacijskog peptida.

Pozicija	Tip mutacije
43	R → L, Q, W
46	R → S, T
93	D → G
191	R → C, H
226	R → G, W, Q

Hemofilija A i B su X kromosom-vezani poremećaji, što znači da se bolest tipično eksprimira u muškaraca, dok su žene uglavnom nositelji.

Klinička slika je konzistentna unutar obitelji. Hemofilija A ima veću prevalenciju u populaciji (80% slučajeva), a u 50-60% slučajeva se radi o teškom obliku. Od hemofilije B boluje 5 od 100 000 ljudi, a teški oblik ima 44% bolesnika. Simptomi hemofilije su masnice te krvarenje iz mišića, zglobova i u mekom tkivu, što predstavlja problem prilikom ozljeda i nesreća, ali i u operacijama i stomatološkim zahvatima.

Iako je hemofilija još uvijek neizlječiva, postoji učinkovita terapija nedostajućim koagulacijskim faktorom. Terapija se može koristiti kao profilaksa za održavanje sigurne razine koagulacijskog faktora, kao infuzija prije fizičkih aktivnosti da bi se spriječilo krvarenje tijekom istih, te neposredno nakon početka krvarenja (21).

Jedna od najtežih komplikacija u hemofiliji je razvoj inhibitora, što se događa uslijed dugotrajnog korištenja terapijskog koagulacijskog faktora. Inhibitori su neutralizirajuća protutijela protiv FVIII i FIX koje pacijenti dobivaju intravenozno. Do razvoja inhibitora dolazi uglavnom u pacijenata sa hemofilijom A, i to u težem obliku, no nije isključena pojava u lakšem i umjerenom obliku, pa tako i u hemofiliji B (22). Jedan način za nadvladavanje inhibitora je administracija veće od uobičajene doze terapijskog faktora, čime se postiže vezanje FIX za protutijela, te preostali FIX zatim može djelovati kao prokoagulans (23).

1.2.1. Terapija koagulacijskim faktorom IX

Kao terapija za hemofiliju B primjenjuje se intravenozna infuzija koncentrata faktora IX. Doza ovisi o tipu krvarenja, a iznosi između 20-100 jedinica po kilogramu tjelesne težine. Svaka jedinica povećava razinu FIX u serumu za 1%. Poluživot trenutno dostupnog terapijskog FIX je između 12 i 14 sati. Prema tome, administracija FIX je potrebna dva puta tjedno (21).

Prije 1950. godine kao terapija u hemofiliji koristila se cjelovita krv u obliku infuzije. Takav oblik liječenja uzrokovao je komplikacije jer se pacijentu tako daju i svi ostali koagulacijski faktori, a prekomjerna razina istih može dovesti do tromboembolijskih poremećaja. Nakon 1950. počinje se primjenjivati svježa smrznuta plazma (engl. *fresh frozen plasma*, FFP) te samo u slučaju hemofilije A, krioprecipitat (24). Za liječenje hemofilije B se do nedavno koristio i koncentrat protrombinskog kompleksa koji sadrži faktore II, VII, XI i X, no takva terapija još uvijek je predstavljala problem u smislu rizika od stanja hiperkoagulacije (24,25). Sredinom 1970-ih godina počinje primjena samostalnih infuzija koncentrata FVIII i FX izvan klinike. Sa pojavom HIV virusa dolazi do masovne infekcije i mnogih smrti u zajednici hemofilicara. Od tada je inaktivacija i uklanjanje krvlju nošenih virusa obavezna praksa tijekom procesa purifikacije koagulacijskih faktora iz humane plazme. Iako rizik još uvijek postoji, nakon toga nisu zabilježeni slučajevi smrti uzrokovanih virusima poput HIV i hepatitis A,B i C virusa u zajednici hemofilicara (26).

1.2.2. Rekombinantni koagulacijski faktori VIII i IX

Od 1992. godine počinje se proizvoditi rekombinantni FVIII, a oko dvije godine kasnije i rekombinantni FIX (rFIX). Danas su koncentрати rFIX esencijalni u liječenju i prevenciji krvarenja u bolesnika sa hemofilijom B. Prednost ovakvog terapeutika je što je za razliku od FIX dobivenog iz humane plazme, rizik od prijenosa krvlju nošenih virusa minimalan (27). Također, dostupnost plazme za purifikaciju terapijskih proteina je ograničena. Relativno kratak poluživot FIX dobivenog iz humane plazme predstavlja problem u liječenju djece zbog učestalosti infuzija (28). Još jedna od prednosti rFIX je mogućnost generacije dugotrajno djelujućeg terapeutika, čime bi se smanjila učestalost administracije (29). S druge strane, proizvodnja rFIX sa sobom nosi izazove kao što su kompleksne posttranslacijske modifikacije (PTM) prirodno dobivenog FIX, koje nije

jednostavno replicirati metodom rekombinantne DNA. Jedna od bitnih PTM je već spomenuta karboksilacija glutamata, pri čemu dolazi do formacije γ -glutamata (Gla) u Gla domeni. Ova modifikacija predstavlja glavni izazov u dobivanju ekspresije visokog titra potpuno funkcionalnog rekombinantnog FIX. Da bi FIX stekao svoju prokoagulacijsku aktivnost te da bi se smanjila vjerojatnost pojave inhibitora, potrebna je γ -karboksilacija prvih deset od ukupno dvanaest ostataka glukoze u Gla domeni. U prirodnom FIX γ -karboksilacija je prisutna na svih dvanaest ostataka, no u rekombinantnom FIX izostavljena su barem zadnja dva ostatka. Razvoj biosličnog rFIX uključuje generaciju klonalne stanične linije sa što većom specifičnosti produkcije te visokom razinom specifične prokoagulacijske aktivnosti (30). Najčešće se rFIX dobiva iz stanica jajnika kineskog hrčka (CHO, engl. *Chinese hamster ovary cells*) i stanica bubrega mladog hrčka (BHK, engl. *baby hamster kidney cells*) (31).

Zbog kompleksne prirode proizvodnje FIX metodom rekombinantne DNA, prinos je vrlo nizak, a troškovi liječenja visoki. Osim toga, dugogodišnja infuzija ovakvog proteina još uvijek nosi sa sobom i povišen rizik od pojave inhibitora. Zbog toga se i dalje radi na optimizaciji izolacije FIX iz humane plazme, što može smanjiti troškove liječenja, pogotovo u manje razvijenim i siromašnijim zemljama, gdje su bolesnicima sa hemofilijom B koncentratu rekombinantnog FIX uglavnom nedostupni (32).

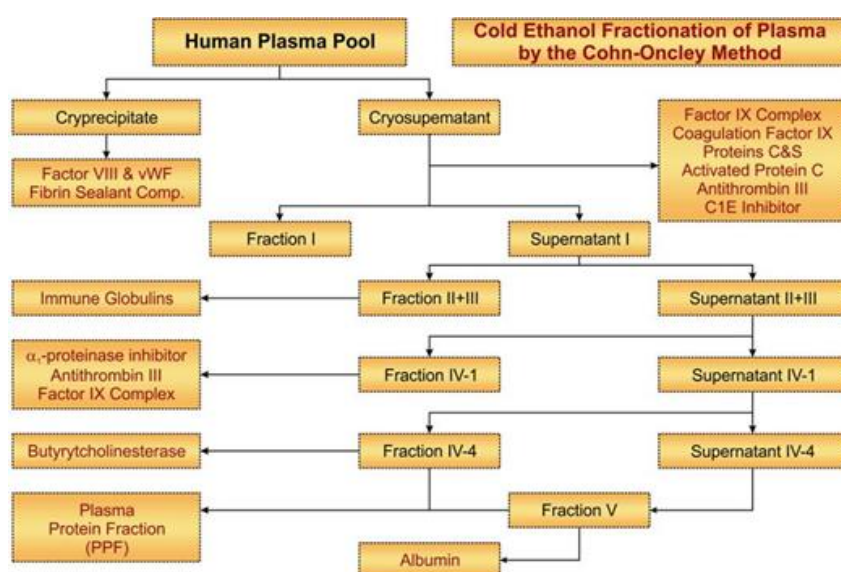
1.3. Frakcionacija plazme

Proteinski produkti frakcionirani iz humane plazme predstavljaju esencijalnu klasu terapeutika te su korišteni u prevenciji i terapiji stanja uzrokovanih traumom, kongenitalnim deficiencijama, imunološkim poremećajima ili infekcijama. Trenutno se od svih proteina plazme u terapijske svrhe koristi oko 20. Moderna tehnologija proizvodnje produkata plazme se i dalje uglavnom bazira na frakcionaciji etanolom. Postignut je napredak u smislu poboljšanja čistoće produkata, boljeg

oporavka imunoglobulina G (IgG), te izolacije novih proteina plazme, kao što su inhibitor alfa1-proteaze, von Willebrand faktor te protein C (33).

Početni materijal je pool donacije ljudske plazme (engl. *fresh frozen plasma* – FFP). Glavni rizik povezan sa produktima plazme je već spomenuta transmisija krvlju nošenih infektivnih agensa. Tijekom posljednjih 20 godina u lanac proizvodnje frakcioniranih produkata plazme implementirane su mjere virusne inaktivacije i uklanjanja koje osiguravaju optimalnu sigurnost, pogotovo od virusa HIV, te hepatitis B i C virusa.

Frakcioniranje plazme metodom po Cohn-u se sastoji od kombinacije koraka za izolaciju sirovih frakcija, koje se dalje pročišćavaju do pojedinih terapijskih proizvoda (Slika 5). Plazma se prikuplja iz krvi donora koji zadovoljavaju propisane kriterije, kao što su dob, učestalost donacija i mogućnost prijenosa krvlju nošenih virusa. Kvaliteta plazme i oporavak labilnih proteina, poput FVIII, ovisi o prikupljanju krvi i plazme te njihovoj obradi i pohrani. Nastoji se izbjeći aktivaciju koagulacijske kaskade, komplementa i fibrinolitičkih sustava. Kako bi se sačuvao integritet plazme, dodaje se otopina antikoagulansa (primjerice natrijev citrat) od početka do kraja procesa prikupljanja. Trajanje prikupljanja ne bi smjelo biti dulje od 15 minuta, te se nastoji izbjeći varijacije u temperaturi krvi (33).



Slika 5. Frakcionacija plazme metodom po Cohn-u (34).

1.4. Izolacija koagulacijskog faktora IX iz humane plazme

Kompleksnost procesa frakcionacije je povećana uvođenjem kromatografije za izolaciju novih proteina iz postojećih frakcija, odnosno iz krioprecipitata ili plazme iz koje je uklonjena ova komponenta (engl. *cryopoor plasma*), te implementacijom procesa uklanjanja i inaktivacije virusa. Za izolaciju proteina plazme najčešće se koristi kromatografija ionske izmjene i afinitetna kromatografija (4). Prednost ovih metoda je vezivanje proteina u fiziološkom pH i ionskoj jakosti, čime je očuvana njihova funkcionalna aktivnost. Kromatografija se koristi u izolaciji terapijskih proteina plazme zbog poboljšanja čistoće produkta, ekstrakcije labilnih komponenti u tragovima, optimizacije njihova renaturiranja te uklanjanja agensa korištenih za virusnu inaktivaciju. Često korišteni ligandi za afinitetnu kromatografiju u koracima izolacije koagulacijskih faktora su imobilizirani heparin (afinitetna) i monoklonalna protutijela (imunoafinitetna kromatografija). Imunoafinitetnom purifikacijom FIX iz humane plazme može se poboljšati sigurnost koncentrata FIX, u smislu da takvi koncentрати sadrže značajno manje količine FIXa, što umanjuje rizik od tromboze (35). Problem kod purifikacije korištenjem imobiliziranih monoklonalnih mišjih protutijela je što takvi produkti mogu uzrokovati alergijski odgovor na mišji imunoglobulin, čime mogu doprinijeti razvoju FIX-neutralizirajućih protutijela, odnosno oblika hemofilije B sa inhibitorom (36).

1.4.1. Kromatografija kao metoda za izolaciju terapijskih proteina iz plazme

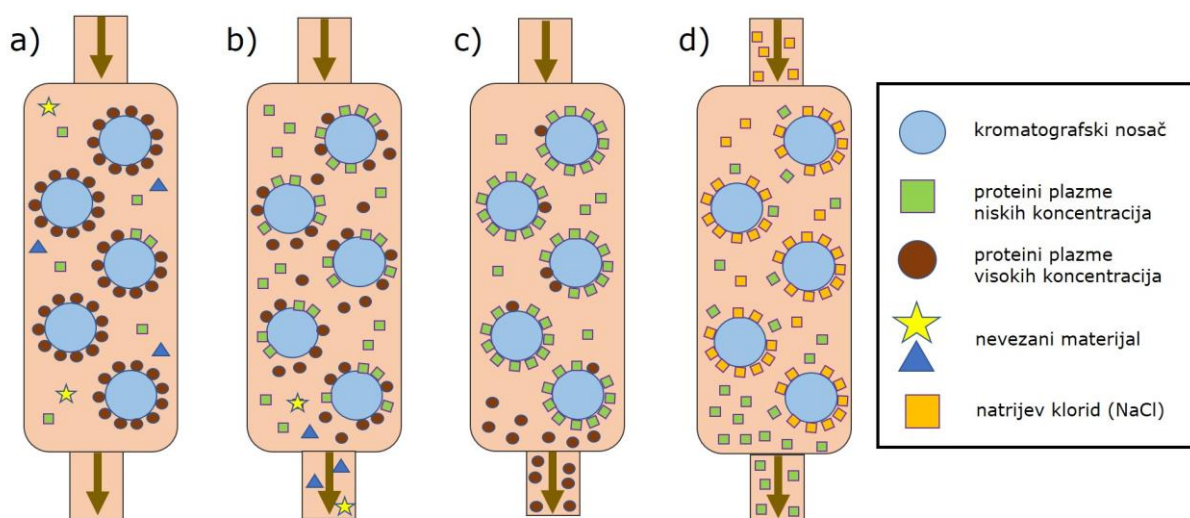
Za dobivanje koncentrata FIX primjenjuje se nekoliko kromatografskih metoda. Jedna od metoda je ekstrakcija krioprecipitata plazme sa jakim ili slabim ionskim izmjenjivačima kao ligandima, kao što su dietilaminoetil (DEAE) ili kvartarni aminoetil (QAE), vezanim na

matrikse na bazi agaroze, poput poprečno vezanog dekstrana (Sephadex). Druge metode uključuju heparin afinitetnu kromatografiju, kromatografiju s metalnim kelatima ili s monoklonalnim protutijelima. Regulatorne norme u svim navedenim metodama uključuju virusnu sigurnost terapijskih proteina plazme, kvalitetu i reproducibilnost kromatografskih medija, te korištenje jakih agensa za inaktivaciju i uklanjanje virusa (4,33,37). Ovaj korak se provodi radi uklanjanja patoloških agensa poput HIV ili hepatitis A, B i C virusa, a gotovo uvijek se koristi koncentrirana otopina natrijevog hidroksida – 0,5M i više, tijekom više od 1h. U slučaju izolacije različitih fiziološki aktivnih proteina koji se vežu na heparin, poput FIX, postoje određeni izazovi: heparin je biološki polimer te ima varijabilnu strukturu i kvalitetu, stoga heparinske afinitetne smole ne mogu preživjeti tretmane sa natrijevim hidroksidom u većim koncentracijama. U zadnjih 10-15 godina radi se na korištenju različitih smola sa imobiliziranim ligandima negativnog naboja, primjerice fosfatnim i sulfatnim grupama umjesto heparina (37,38).

1.4.2. Metoda potiskivanja komponenata uzorka u kromatografskom odjeljivanju proteina

Budući da plazma sadrži brojne komponente, od kojih neki imaju i slične strukture, izolacija pojedinih proteina često nije jednostavna. Sastojci prisutni u visokim koncentracijama, poput humanog serum albumina i imunoglobulina G (IgG), čine oko 75% mase proteina u plazmi i ometaju izolaciju proteina u tragovima (39). Separacija proteina plazme može se poboljšati primjenom kromatografije potiskivanja komponenata uzorka. Ova metoda se bazira na činjenici da se neke komponente u tragovima vežu na određeni nosač na koloni višim afinitetom nego visoko zastupljeni proteini. Prilikom nanošenja smjese proteina na kolonu, najprije se vezuju visoko zastupljeni proteini (Slika 6.a). Tijekom procesa, proteini u tragovima se zbog većeg afiniteta vežu za nosač, potiskujući

pritom ranije vezane proteine (6.b), sve dok ih gotovo potpuno ne zamjene (6.c). U sljedećem koraku (6.d) se vezani proteini eluiraju s kolone puferom koji sadrži komponente sa još višim afinitetom za nosač, u ovom slučaju natrijev klorid (40). Ovaj postupak može uvelike doprinijeti čistoći krajnjeg produkta te se često koristi u kromatografiji ionske izmjene (41).



Slika 6. Kromatografija potiskivanja komponenata uzorka.

1.4.3. Monolitne kolone

Iako se koriste već više od dvadeset godina, u posljednje vrijeme ponovo raste interes za monolitne kolone. Radi se o kolonama koje se sastoje od poroznog materijala u jednom komadu, priljubljenog uz unutarnje stijenke kolone, zbog čega cijeli volumen mobilne faze mora proći kroz monolit. Pore materijala su međusobno povezane kanalima kroz koje prolazi mobilna faza (42). Prednost ovakve strukture je jednaka distribucija protoka, smanjen radni tlak te dostupnost kompletne površine za vezanje. Otpornost na pH olakšava proces inaktivacije i uklanjanja virusa natrijevim hidroksidom (43). Dobiveni pikovi su uski i oštri, što ukazuje na visoku rezoluciju separacije, neovisno o veličini molekula u

otopini. Zbog smanjenog radnog tlaka kromatografija na monolitnim kolonama je mnogo brža nego na zrnastim kolonama. Primijećen je i veći prinos krajnjeg produkta korištenjem ovih kolona, što čini monolite prikladnima za brzo procesuiranje velikih volumena kompleksnih bioloških smjesa. Monolitne kolone od polimera poliglicidil metakrilata su se pokazale uspješnima u separaciji proteina humane plazme.

S obzirom na nastojanje da se izolacijom iz humane plazme dobije koagulacijski faktor IX što veće čistoće za terapiju pacijenata sa hemofilijom B, uz što veći prinos, potrebna je daljnja optimizacija procesa. U ovom radu je s tim ciljem primijenjen fenomen potiskivanja komponenata uzorka za kromatografiju na matriksu od poprečno vezanog dekstrana (Sephadex), u koraku ekstrakcije na čvrstoj fazi. Nakon toga je ispitana učinkovitost monolitnih kolona u separaciji koagulacijskog faktora IX od ostalih proteina plazme, u usporedbi sa zrnastim kolonama na bazi poprečno vezane agaroze (Sepharose). Nakon ova dva koraka doći će do separacije te će FIX biti detektiran u nekoj od frakcija.

2. CILJ RADA

Svrha istraživačkog rada je optimirati proces purifikacije FIX iz humane plazme, kako bi se postigao što veći prinos i koagulacijska aktivnost krajnjeg produkta.

Ciljevi istraživačkog rada:

1. Ispitati pri kojem omjeru matriksa od poprečno vezanog dekstrana (Sephadex) i plazme će doći do potiskivanja komponenata uzorka.

Potiskivanje komponenata uzorka se odnosi na pojavu kada proteini plazme prisutni u manjim koncentracijama vežu većim afinitetom za nosač nego oni prisutni u većim koncentracijama. Prema podacima iz literature, pri izolaciji terapijskih proteina iz plazme koristi se korak u kojem se pri dovoljnoj koncentraciji proteina postiže potiskivanje komponenata uzorka (39,44,45). Među proteine prisutne u manjim koncentracijama u plazmi pripada i FIX, stoga je naša pretpostavka bila da se ovim korakom osigurava vezanje FIX za poprečno vezani dekstran, te da će se u sljedećem koraku elucijom sa NaCl FIX eluirati sa kolone.

2. Down-scaling procesa purifikacije FIX, u svrhu optimizacije procesa korištenjem manjih količina plazme i kolona manjeg volumena.

S obzirom da se na industrijskoj skali primjenjuju kromatografske kolone velikih volumena, za izolaciju plazme i optimizaciju procesa koriste se uglavnom veliki spremnici i velika količina plazme. Za potrebe ovog rada potrebno je smanjiti radni volumen plazme i kromatografskih kolona. Pretpostavljamo da će down-scaling procesa biti postignut ako se odredi optimalan omjer matriksa i plazme, te će se određeni omjer koristiti u procesu optimizacije.

3. Testirati kromatografske kolone sa različitim tipovima nosača (zrnasti nosači na bazi poprečno vezane agaroze, sintetski nosači i monoliti) i skupinama različitih ionskih jakosti (QAE, DEAE) u svrhu dobivanja što većeg prinosa FIX.

Navedeni nosači i ionski izmjenjivači su već primijenjeni u postupku izolacije FIX, ali na industrijskoj razini (4). U ovom radu će biti ispitana separacija na navedenim kromatografskim kolonama malog volumena, kako bi se odredila kvaliteta separacije proteina humane plazme.

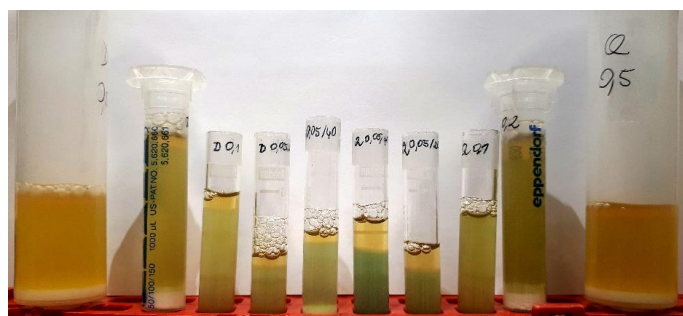
4. Razvoj Western blot metode za detekciju prisutnosti koagulacijskih faktora IX i X u frakcijama dobivenim nakon kromatografije.

S obzirom na literaturne podatke, faktor IX se nalazi u određenim frakcijama nakon kromatografije ionske izmjene (41). Pretpostavlja se da će u našim frakcijama doći do separacije proteina plazme te da će faktor IX biti prisutan u istima. Još jedna pretpostavka je da će faktor X biti eluiran u frakciji različitoj od one u kojoj je faktor IX, čime bi se postigla separacija ovih dvaju faktora, a time i bolja čistoća krajnjeg produkta – pročišćenog koncentrata faktora IX. Kako bi se potvrdila prisutnost faktora u frakcijama, potrebno je razviti adekvatnu analitičku metodu. Pod pretpostavkom da se optimizira protokol za Western blot metodu, ovim postupkom će se moći detektirati faktori ukoliko su prisutni u frakcijama nakon kromatografije.

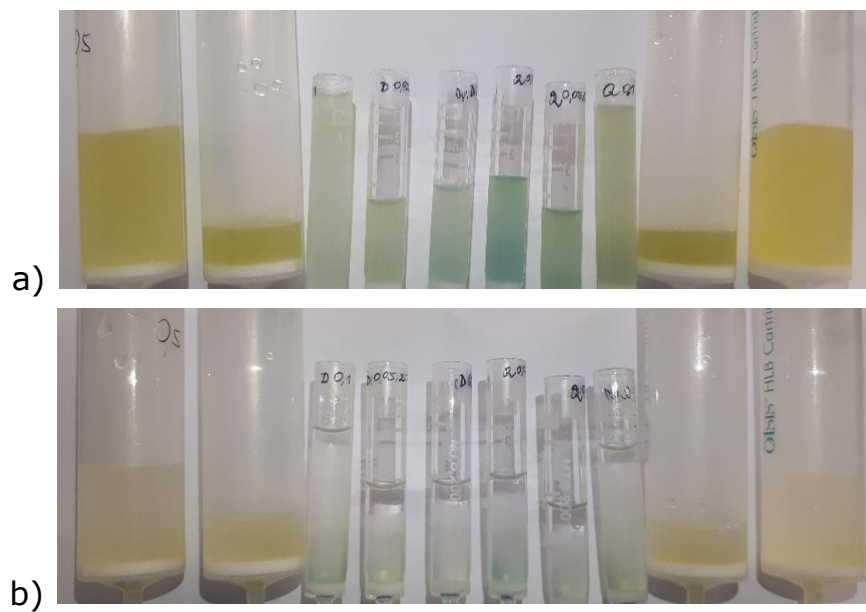
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Adsorpcija na QAE i DEAE Sephadex (ekstrakcija na čvrstoj fazi)

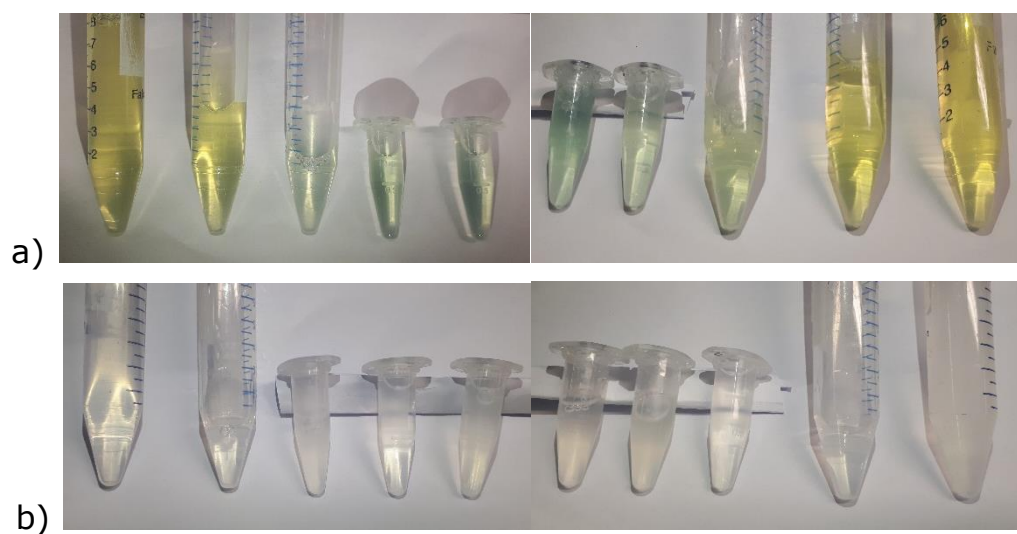
Svježa smrznuta ljudska plazma pakirana u vrećicama od 250ml (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska) je odmrznuta tijekom 1 i pol dana u hladnjaku, na 4°C. Za korištenje plazme je dobivena dozvola Etičke komisije Zavoda. Za izolaciju krioprecipitata, odmrznuta plazma je centrifugirana (Centrifuga 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 10000rpm pri 4°C tijekom 20 minuta te profiltrirana kroz nabrani filter papir. U Falcon tube od 50ml su odvagane različite mase matriksa DEAE Sephadex A-50 i QAE Sephadex A-50 (0.5g, 0.2g, 0.1g, 0.05g) (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD) te je u tube dodana plazma u volumenu od 20 ili 40 ml. Falcon tube su ostavljene na orbitalnoj tresilici tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Nabubreni matriks sa plazmom je automatskom pipetom prenesen u kolone (Slika 7). Plazma je pomoću vakuuma ispuštena kroz površinu matriksa. Provedeno je ispiranje matriksa sa 3CV (eng. *column volume*) 0.01M Tris-HCl pufera, pH 7,0. Zatim su provedene dvije elucije istim puferom uz dodatak 0.5M NaCl (Slika 8). Eluati su sakupljeni u odgovarajuće spremnike (Slika 9) te je izmjeren volumen svakog eluata. Eluati dobiveni nakon adsorpcije na DEAE i QAE Sephadex-u su korišteni za naredne postupke kromatografije, točnije eluat nakon druge elucije.



Slika 7: Kolone sa matriksom DEAE ili QAE Sephadex A-50 i plazmom u različitim omjerima.



Slika 8. Kolone sa Sephadex matriksom nakon prve (a) i druge elucije (b) 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa dodatkom 0.5M NaCl



Slika 9. Eluati nakon prve (a) i druge elucije (b) 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa dodatkom 0.5M NaCl.

3.2. Kromatografija ionske izmjene

3.2.1. Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama

Kromatografija je provedena na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC) (Knauer, Berlin, Njemačka). Ekvilibracija kolone provedena je 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,0. 1,3ml eluata nakon druge elucije sa DEAE ili QAE Sephadex-a razrijeđeno je u 6,5ml 50mM Tris-HCl pufera, pH 7,0. Korištene su HiTrap® Q Fast Flow i HiTrap® DEAE Fast Flow kolone (GE Healthcare) volumena 1ml, sa matriksom Q Sepharose® Fast Flow i DEAE Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare). Na svaku kolonu nanoseno je po 3,5ml razrijeđenog uzorka pri protoku kroz kolonu od 1ml/min. Uzorak je sa kolone eluiran gradijentnom elucijom u tri koraka. Elucijski puferi za gradijentno ispiranje su redom: 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 150mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 250mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 500mM NaCl. Sakupljene su frakcije nakon elucije svakim od pufera različite ionske jakosti, kao i flow-through frakcija, koja sadrži materijal koji se nije vezao za kolonu. Frakcije su sakupljane od pojave do pada pika na kromatogramu. Kada se vrijednosti konduktiviteta i apsorbancije ustale, počinje elucija sljedećim puferom više ionske jakosti.

Ukoncentriravanje i odsoljavanje uzoraka nakon kromatografije je provedeno na centrikonima u Falcon tubama od 15ml (Merck Millipore, Burlington, MA, SAD). Cijeli volumen eluata je nanosen na centrikon sa porama koje propuštaju proteine i peptide do molekularne mase od 10kDa te centrifugiran na 4000rpm pri 4°C tijekom 45 minuta do 1 sat (Centrifuga 5804 R, Eppendorf). Ukoncentrirani i odsoljeni eluati su prebačeni u vijalice i korišteni za SDS-PAGE i Western blot analize.

3.2.2. Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE CIM kolonama

Kromatografija je provedena na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC) (Knauer). Ekvilibracija kolone provedena je 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,0. 1,3ml eluata nakon druge elucije sa DEAE ili QAE Sephadex-a razrijeđeno je u 6,5ml 50mM Tris-HCl pufera, pH 7,0. Korišteni su DEAE i QAE Convective Interaction Media (CIM) monolitni diskovi (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija) volumena 0,34ml. Na svaku kolonu nanoseno je po 3,5ml razrijeđenog uzorka pri protoku kroz kolonu od 1ml/min. Uzorak je sa kolone eluiran gradijentnom elucijom u tri koraka. Elucijski puferi za gradijentno ispiranje su redom: 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 150mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 250mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 500 mM NaCl. Sakupljene su frakcije nakon elucije svakim od pufera, kao i flow-through frakcija, koja sadrži materijal koji se nije vezao za kolonu. Frakcije su sakupljane od pojave do pada pika na kromatogramu. Kada se vrijednosti konduktiviteta i apsorbancije ustale, počinje elucija sljedećim puferom više ionske jakosti.

Ukoncentriravanje i odsoljavanje uzoraka nakon kromatografije je provedeno na centrikonima u Falcon tubama od 15ml (Merck Millipore). Cijeli volumen eluata je nanosen na centrikon sa porama koje propuštaju proteine i peptide do molekularne mase od 10kDa te centrifugiran na 4000rpm pri 4°C tijekom 45 minuta do 1 sat (Centrifuga 5804 R, Eppendorf). Ukoncentrirani i odsoljeni eluati su prebačeni u vijalice i korišteni za SDS-PAGE i Western blot analize.

3.2.3. Kromatografija ionske izmjene na QAE TOYOPEARL koloni

Kromatografija je provedena na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC) (Knauer). Ekvilibracija kolone provedena je 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,0. 1,3ml eluata nakon druge elucije sa DEAE ili

QAE Sephadex-a razrijeđeno je u 6,5ml 50mM Tris-HCl pufera, pH 7,0. Korištena je kolona sa nosačem TOYOPEARL QAE-550C (Tosoh Bioscience, Tokio, Japan). Na svaku kolonu nanoseno je po 3,5ml razrijeđenog uzorka pri protoku kroz kolonu od 1ml/min. Uzorak je sa kolone eluiran gradijentnom elucijom u tri koraka. Elucijski puferi za gradijentno ispiranje su redom: 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 150mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 250mM NaCl; 50mM Tris-HCl pufer, pH 7,0 sa 500 mM NaCl. Sakupljene su frakcije nakon elucije svakim od pufera, kao i flow-through frakcija, koja sadrži materijal koji se nije vezao za kolonu. Frakcije su sakupljane od pojave do pada pika na kromatogramu. Kada se vrijednosti konduktiviteta i apsorbancije ustale, počinje elucija sljedećim puferom više ionske jakosti.

Ukoncentriravanje i odsoljavanje uzoraka nakon kromatografije je provedeno na centrikonima u Falcon tubama od 15ml (Merck Millipore). Cijeli volumen eluata je nanosen na centrikon sa porama koje propuštaju proteine i peptide do molekularne mase od 10kDa te centrifugiran na 4000rpm pri 4°C tijekom 45 minuta do 1 sat (Centrifuga 5804 R, Eppendorf). Ukoncentrirani i odsoljeni eluati su prebačeni u vijalice i korišteni za SDS-PAGE i Western blot analize.

3.3. Kvantifikacija proteina - BCA test

Za mjerenje koncentracije proteina u eluatima nakon kromatografije ionske izmjene korišten je kit sa bicinkoniničnom kiselinom (BCA), Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA). Test mjeri stvaranje Cu^+ iz Cu^{2+} iona, formiranjem biuret kompleksa u lužnatim otopinama proteina. Komponente proteina - cistein, triptofan i tirozin reduciraju bivalentni bakar (Cu^{2+}), a zatim dvije molekule BCA keliraju Cu^+ ion, formirajući ljubičasti kompleks koji apsorbira svjetlost na 562nm. Kao standard korišten je albumin goveđeg seruma (BSA) koncentracije 2mg/ml. Za izradu kalibracijske krivulje pripremljena su razrjeđenja

standarda u poznatim koncentracijama (0.025 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,75mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml; 2 mg/ml). Na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica, otpipetirano je u duplikatu po 10 μ l svakog razrjeđenja standarda te svakog eluata nepoznate koncentracije proteina. U sve jažice je dodano po 200 μ l BCA reagensa. Reakcija je inkubirana na 37°C tijekom 20 minuta. Apsorbancija je izmjerena spektrofotometrom na čitaču ploča Hidex Sense (Hidex Oy, Turku, Finska) pri valnoj duljini 562nm. Koncentracija proteina proporcionalna je apsorbanciji te je određena pomoću jednadžbe kalibracijske krivulje. Podaci su analizirani u programu Microsoft Office Excel.

3.4. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil-sulfat (SDS-PAGE)

Proteinski sastav eluata, odnosno učinkovitost pročišćavanja frakcija ispitana je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Pripremljeno je 10ml 8% gela – (engl. running gel) (3,3ml 30% akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid (AA/BAA), 4ml vode, 2,5ml 1.5M Tris baza pH 8,8, 100 μ L 10%(w/v) natrijev dodecil-sulfat (SDS), 5 μ L tetrametiletilendiamin (TEMED), 50 μ L 10%(w/v) amonijev persulfat) i 5ml 4% gela za sabijanje – (engl. stacking gel) (0,66ml 30% AA/BAA, 3ml vode, 1,26ml 0,5M Tris baza pH 6,8, 50 μ L 10%(w/v) SDS, 5 μ L TEMED, 25 μ L 10%(w/v) amonijev persulfat). Elektroforeza je provedena korištenjem BIO-RAD uređaja u separacijskom puferu – (engl. running buffer) (pH 8,3-8,5, 10x koncentriran: 30g 250mM Tris-HCl, 144g 1,92M glicin, 10g 1%(w/v) SDS, 1L voda).

Pripremljena su razrjeđenja eluata u vijalicama od 1.5ml, u koja je dodan pufer za nanošenje uzorka na gel (pH 6,8, 6 puta koncentriran: 0,454g 375mM Tris-HCl, 6ml 60%(v/v) glicerol, 0,6g 6%(w/v) SDS, 0,003g 0,03%(w/v) bromfenol blue, do 10ml voda i 0,184g 1,2M ditionitrol (DTT) do 1ml), 3 μ l po uzorku. Uzorci su zatim inkubirani na

95°C tijekom 5 minuta (ThermoBlock C, Eppendorf) te je u svaku jažicu gela nanoseno oko 30µg proteina.

U sustav za elektroforezu je dodan separacijski pufer, te je provedena elektroforeza na 120V tijekom 1 i pol sata. Marker molekularne mase sadržavao je proteinske standarde poznatih molekularnih veličina (245 kDa; 180kDa, 135 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 63kDa; 48 kDa; 35kDa; 25kDa; 20kDa; 17kDa, 10kDa).

Nakon završetka elektroforeze, kada obojana linija proteina na gelu dođe do kraja stakla, gelovi se vade iz sustava te ispiru destiliranom vodom. Za vizualizaciju bendova korištena je boja Coomassie brilliant blue (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

3.5. Određivanje prisutnosti koagulacijskih faktora pomoću Western blot metode

3.5.1. Koagulacijski faktor IX

SDS-PAGE procedura kojom je provedeno razdvajanje proteina na gelu korištenom za Western blot, slična je gore opisanoj proceduri. Razlika je u sastavu pufera za nanošenje uzorka koji u ovom slučaju ne sadrži DTT, te se uzorci ne kuhaju prije nanošenja na gel. Ove uvjete je bitno izostaviti kako bi se očuvala nativna struktura FIX, iz razloga što protutijelo korišteno u eksperimentu prepoznaje samo takvu formu proteina. Nakon SDS-PAGE u nereducirajućim uvjetima, gelovi su bez bojanja složeni u Western blot sendvič. Membrana je prije slaganja aktivirana hladnim metanolom tijekom 5 minuta, a sve komponente sendviča su uronjene u pufer za transfer sa 20%(v/v)-nim metanolom (pH 8,3, 200ml metanol, 700ml voda, 100ml 10x stock pufera: 30g 25mM Tris baza, 144g 190mM glicin; do 1L voda). Transfer proteina na polivinilidenfluorid (PVDF) membranu je proveden na 250mA tijekom 4 sata. Nakon transfera, membrane su prebačene u plastične kadice i

isprane u TBST puferu (pH 7,5, 100ml 10x stock pufera: 24g Tris baza, 88g NaCl; 1ml Tween, do 1L voda). Membrane su zatim blokirane u istom puferu koji sadrži 4% mlijeka u prahu, tijekom 1 sata. Inkubacija primarnim antitijelom provedena je preko noći na 4°C na klackalici. Korišteno je mišje monoklonalno anti-FIX IgG protutijelo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u razrjeđenju 1:1000. Sljedećeg dana je provedeno ispiranje 4 puta po 5 minuta TBST puferom, pH 7,5. Slijedi inkubacija sekundarnim protutijelom u razrjeđenju 1:2000, tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Korišteno je kozje anti-mišje IgG protutijelo konjugirano sa peroksidazom iz hrena (HRP) (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Membrane su isprane 4 puta po 5 minuta sa TBST puferom, pH 7,5. Za vizualizaciju je korišten Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD) koji sadrži otopinu A i otopinu B. Otopine A i B su pomiješane u jednakim omjerima, te je po membrani korišteno 500µl smjese. Membrana je sa reagensom inkubirana u mraku tijekom 1 minute, nakon čega je provedena vizualizacija.

3.5.2. Koagulacijski faktor X

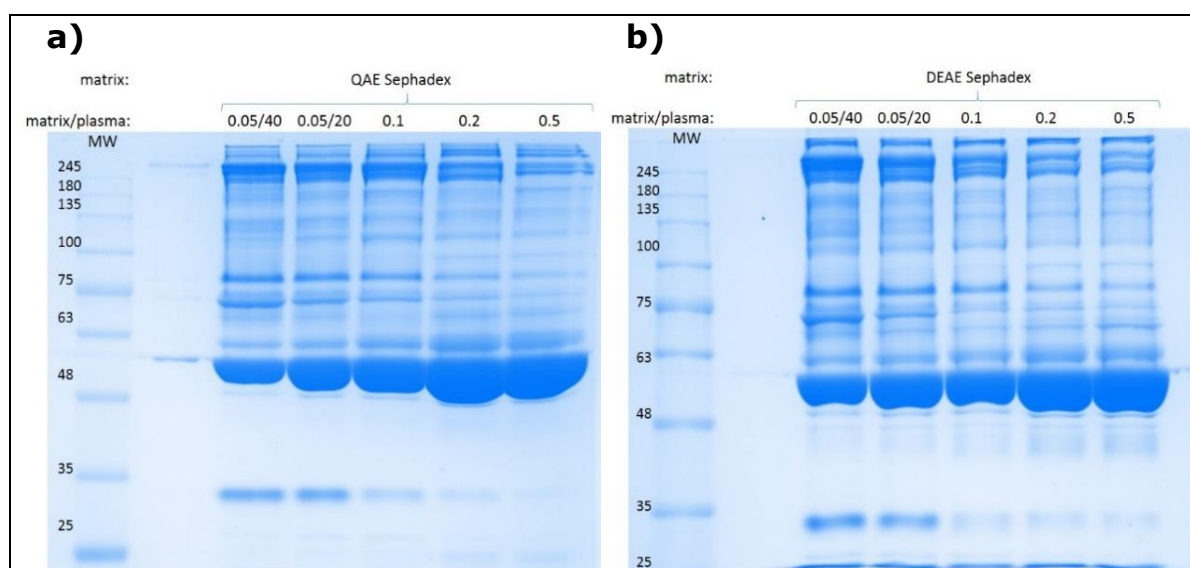
Nakon SDS-PAGE u reducirajućim uvjetima, gelovi su bez bojanja složeni u Western blot sendvič. Membrana je prije slaganja aktivirana hladnim metanolom tijekom 5 minuta, a sve komponente sendviča su uronjene u pufer za transfer sa 20%(v/v)-nim metanolom. Transfer proteina na PVDF membranu je proveden na 350mA tijekom 1 sata. Nakon transfera, membrane su prebačene u plastične kadice i isprane u TBST puferu, pH 7,5. Membrane su zatim blokirane u istom puferu koji sadrži 4% mlijeka u prahu, tijekom 30 minuta. Inkubacija primarnim antitijelom provedena je preko noći na 4°C na klackalici. Korišteno je zečje poliklonalno anti-FX IgG protutijelo (Thermo Fisher Scientific) u razrjeđenju 1:1400. Sljedećeg dana je provedeno ispiranje 4 puta po 5 minuta TBST puferom, pH 7,5. Slijedi inkubacija sekundarnim

protutijelom, tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Korišteno je kozje anti-zečje IgG protutijelo konjugirano sa HRP (Merck Millipore) u razrjeđenju 1:2800. Membrane su isprane 4 puta po 5 minuta sa TBST puferom pH 7,5. Za vizualizaciju je korišten Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz Biotechnology) koji sadrži otopinu A i B. Otopine su pomiješane u jednakim omjerima, te je korišteno 500 μ l te smjese po membrani. Membrana je sa reagensom inkubirana u mraku tijekom 1 minute, nakon čega je provedena vizualizacija.

4. REZULTATI

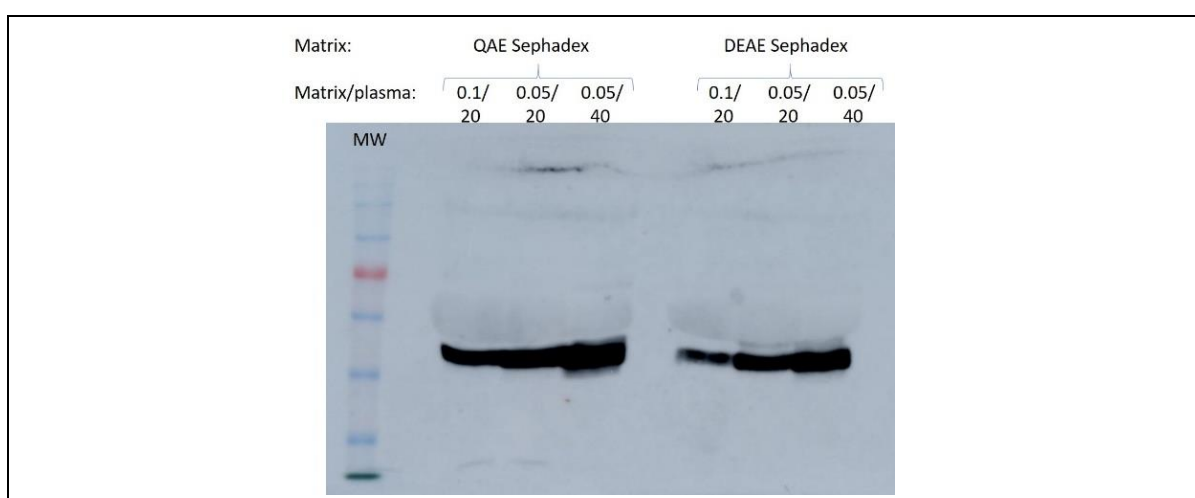
4.1. Adsorpcija na QAE i DEAE Sephadex (ekstrakcija na čvrstoj fazi)

Ispitano je koji od dva matriksa od poprečno vezanog dekstrana, QAE ili DEAE Sephadex, je uspješniji u odvajanju proteina plazme većih koncentracija od proteina prisutnih u manjoj koncentraciji, a među kojima se nalazi i koagulacijski faktor IX, čija je izolacija u aktivnom obliku zimogena krajnji cilj ovog projekta. Korišteni su različiti omjeri matriksa i plazme da bi se odredilo u kojem omjeru je postignuta najbolja separacija. Korištenjem oba matriksa dobiveni su slični rezultati. Najbolja separacija je postignuta korištenjem 0.05g matriksa i 40ml plazme, odnosno u omjeru 1g/800ml plazme (Slika 10.a i b).



Slika 10. Količina proteina u frakcijama je u korelaciji sa promjenama omjera mase matriksa i volumena plazme nakon adsorpcije na QAE (a) i DEAE (b) Sephadex matriksu. Odvagane su različite mase matriksa QAE (a) i DEAE (b) Sephadex A-50 (0.05g, 0.1g, 0.2g te 0.5g) i dodana je plazma volumena 20 ili 40ml. Nakon transfera u kolone, matriks sa plazmom je ispran 0,01M Tris-HCl puferom, pH 7,0. Zatim su provedene dvije elucije 0,01M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz dodatak 0,5M NaCl. Proteinski sastav eluata nakon druge elucije je analiziran elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz natrij-dodecil sulfat (SDS-PAGE). **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker relativne molekulske mase (kDa)

Na SDS-PAGE gelu, na poziciji koja odgovara relativnoj molekulskoj masi između 60 i 70 kDa, odnosno humanom serum albuminu, intenzitet benda je najmanji u frakciji sa najvećom korištenom koncentracijom plazme. Na poziciji koja odgovara relativnoj molekulskoj masi oko 75kDa, odnosno ceruloplazminu, intenzitet benda je najveći u frakciji sa najvećom korištenom koncentracijom plazme. To znači da je u toj frakciji sadržana najveća količina proteina u tragovima i da je došlo do najbolje separacije tih proteina od visoko zastupljenih, poput albumina.

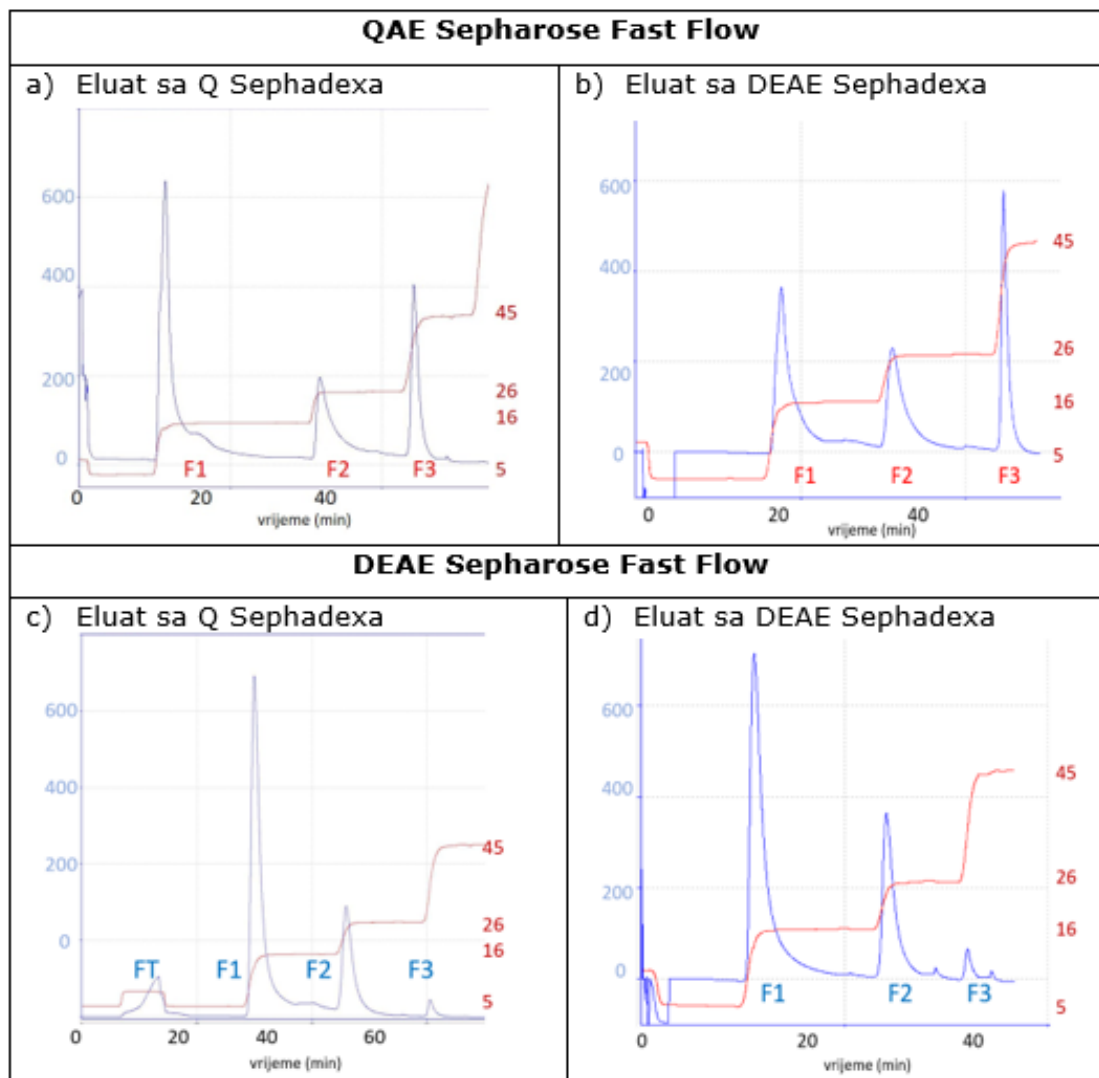


Slika 11. Koagulacijski faktor X je prisutan u svim ispitanim frakcijama nakon adsorpcije na QAE i DEAE Sephadex matriksu. Odvagane su različite mase matriksa QAE (a) i DEAE (b) Sephadex A-50 (0.05g, 0.1g, 0.2g te 0.5g) i dodana je plazma volumena 20 ili 40ml. Nakon transfera u kolone, matriks sa plazmom je ispran 0,01M Tris-HCl puferom, pH 7,0. Zatim su provedene dvije elucije 0,01M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz dodatak 0,5 M NaCl. Prisutnost faktora X u eluatu nakon druge elucije je ispitana metodom Western blot uz IgG protutijelo na faktor X. **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker relativne molekulske mase (kDa)

Da bi se odredila uspješnost separacije FIX i njegovog glavnog kontaminanta FX, izrađen je Western blot uz anti-FX protutijelo (Slika 11). Prisutnost koagulacijskog faktora X potvrđena je u svim ispitanim frakcijama dobivenim nakon druge elucije sa QAE ili DEAE Sephadex matriksa. Dvije frakcije sa najmanjom koncentracijom plazme nisu ispitane jer se na temelju SDS-PAGE analize istih utvrdilo da separacija proteina nije zadovoljavajuća u usporedbi s ostalim frakcijama.

4.2. Kromatografija ionske izmjene

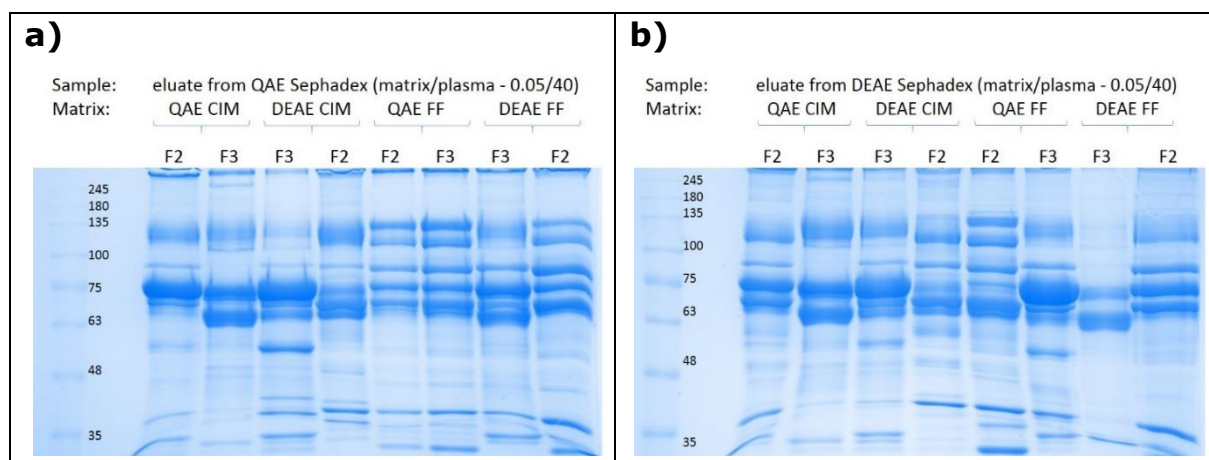
4.2.1. Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama



Slika 12. Kromatogrami nakon nanošenja i druge elucije uzoraka sa Q i DEAE Sephadex matriksa na Q i DEAE Sepharose Fast Flow kolone. Eluati sa Q (a) i DEAE (b) Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanosene na kolone sa QAE ili DEAE nosačem. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti pufera (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Svaki pik predstavlja apsorbanciju frakcije nakon elucije. **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **FT**-flow through frakcija, **F1**- frakcija nakon prve elucije (0,5M Tris puferom pH 7,0 sa 150mM NaCl), **F2**-druga elucija (0,5M Tris puferom pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-treća elucija (0,5M Tris puferom pH 7,0 uz 500mM NaCl), **plava linija** i vrijednosti s lijeve strane apscise-apsorbancija (mAU), **crvena linija** i vrijednosti sa desne strane apscise-konduktiviteti elucijskih pufera (mS/cm)

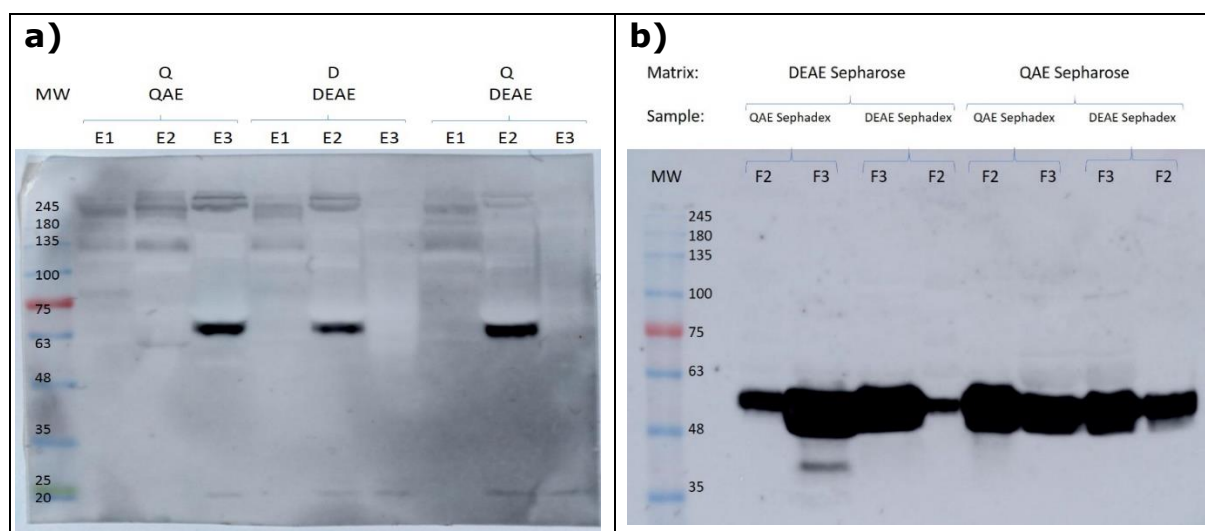
Kako bismo ispitali učinkovitost separacije FIX od ostalih proteina plazme na različitim kromatografskim kolonama, eluat nakon koraka solid phase extraction smo nanijeli na kolone u jednakim razrjeđenjima sa 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,3 (6x), pri konstantnom protoku kroz kolonu 1 ml/min. Provedeno je gradijentno ispiranje u tri koraka, 50mM Tris-HCl puferom, pH 7,3 sa dodatkom 150mM, 250mM i 500mM NaCl, postupnim povećavanjem ionske jakosti pufera. Frakcije su sakupljene pomoću praćenja pikova na kromatogramu.

Usporedbom kromatograma nakon postupka na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama, vidi se da se dobiveni profili razlikuju (Slika 12). S obzirom na startni uzorak, pikovi koji označavaju apsorbanciju pojedinih frakcija su otprilike sličnog intenziteta nakon kromatografskog postupka na DEAE Sepharose koloni. Nakon QAE Sepharose kolone prvi i treći pik se razlikuju u intenzitetu ovisno o tome da li je uzorak sa Q ili DEAE Sephadexa.



Slika 13. Sastav proteina u frakcijama sakupljenima nakon kromatografije na QAE i DEAE Sepharose kolonama. Eluati sa Q (a) i DEAE (b) Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanese na kolone Sepharose Fast Flow ili CIM sa anionskim izmjenjivačima QAE ili DEAE. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti pufera (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Proteinski sastav eluata je analiziran elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz natrij-dodecil sulfat (SDS-PAGE). **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker molekulske mase (kDa), **CIM**-Convective Interaction Media, **FF**-Fast Flow, **F2**-frakcija nakon druge elucije (0,5M Tris-HCl puferom pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-treća elucija (0,5M Tris-HCl puferom pH 7,0 uz 500mM NaCl)

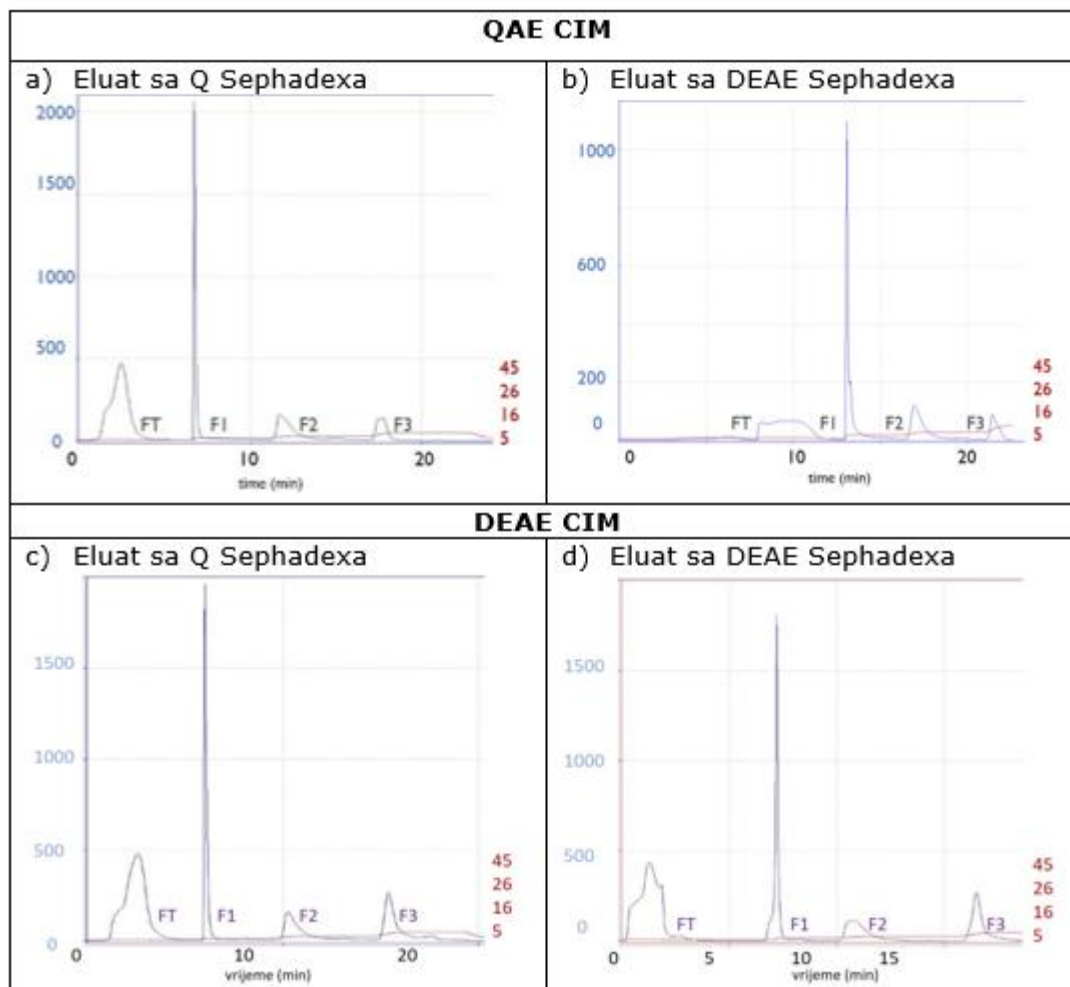
Prema rezultatima SDS-PAGE analize proteinskog sastava frakcija nakon kromatografije na Sepharose Fast Flow i CIM kolonama, vidljivo je da se sastav frakcija i količina proteina razlikuju (Slika 13). Veće razlike su uočene s obzirom na vrstu punila kolone nego na vrstu ionskog izmjenjivača. Primijećeno je da nakon ovog koraka frakcije sadrže znatno manje albumina u usporedbi s onima nakon koraka solid phase extraction.



Slika 14. Faktor IX se nalazi u trećoj frakciji nakon kromatografije na QAE Sepharose nosaču, te u drugoj frakciji nakon kromatografije na DEAE Sepharose nosaču (a). Faktor X je prisutan u drugoj i trećoj frakciji nakon kromatografije na QAE i DEAE Sepharose koloni (b). Eluati sa Q i DEAE Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanese na kolone Sepharose Fast Flow sa anionskim izmjenjivačima QAE ili DEAE. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti pufera (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Prisutnost faktora IX i X je ispitana metodom Western blot uz IgG protutijelo na faktor IX (a) i IgG protutijelo na faktor X (b). **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker molekulske mase (kDa), **F1(E1)**-frakcija nakon prve elucije (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 150mM NaCl), **F2(E2)**-druga elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3(E3)**-treća elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz 500mM NaCl)

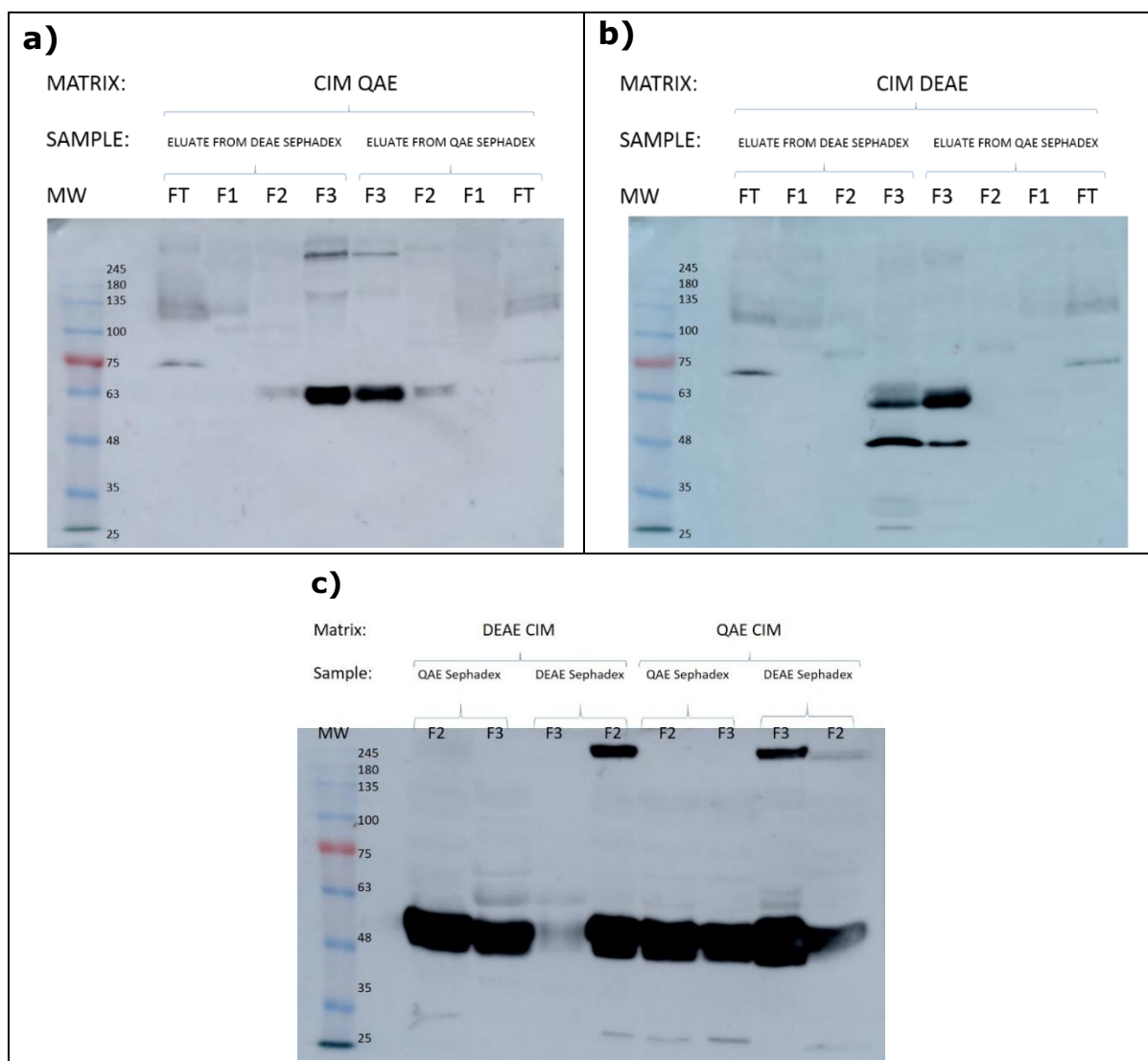
Western blot analizom utvrđeno je da se FIX nakon kromatografije na QAE Sepharose Fast Flow koloni nalazi u trećoj frakciji, a nakon kromatografije na DEAE Sepharose Fast Flow koloni nalazi se u drugoj frakciji (Slika 14.a). FX je prisutan u svim ispitanim frakcijama (Slika 14.b).

4.2.2. Kromatografija ionske izmjene na QAE i DEAE CIM kolonama



Slika 15. Kromatogrami nakon nanošenja i elucije uzoraka sa Q i DEAE Sephadex matriksa na QAE i DEAE CIM kolone se ne razlikuju značajno. Eluati sa Q (a,c) i DEAE (b,d) Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanosene na CIM kolone sa QAE ili DEAE nosačima. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti pufera (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Svaki pik predstavlja apsorbanciju frakcije nakon elucije. **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **CIM**-Convective Interaction Media, **FT**-flow through frakcija, **F1**-frakcija nakon prve elucije (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 150mM NaCl), **F2**-druga elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-treća elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz 500mM NaCl), **plava linija** i vrijednosti s lijeve strane apscise-apsorbancija (mAU), **crvena linija** i vrijednosti sa desne strane apscise-konduktivitet elucijskog pufera (mS/cm)

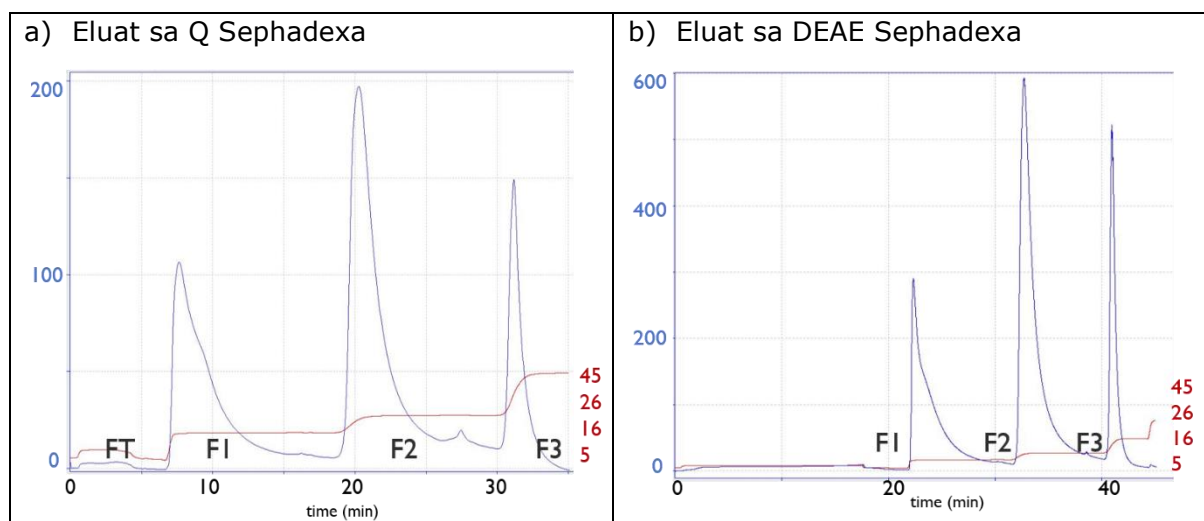
Testirane su monolitne (CIM) kolone sa nosačima QAE i DEAE. Usporedbom kromatograma za uzorke sa Q i DEAE Sephadex matriksa na QAE i DEAE CIM kolonama, profili se međusobno ne razlikuju značajno (Slika 15), ali se razlikuju s obzirom na kromatograme nakon separacije na sefarnim kolonama (Slika 12). Pik prve frakcije dobiven na monolitnim diskovima je oštar i visok, što označava mnogo bolju rezoluciju separacije u usporedbi sa sefarnim kolonama. Primjećuje se znatno kraće trajanje kromatografije na CIM kolonama, od otprilike 20 minuta po kromatografiji, dok na Sepharose Fast Flow kolonama postupak traje i do 60 minuta.



Slika 16. Faktor IX se nalazi u trećoj frakciji nakon kromatografije na QAE (a) i DEAE (b) CIM nosaču. Faktor X (c) je prisutan u svim frakcijama nakon

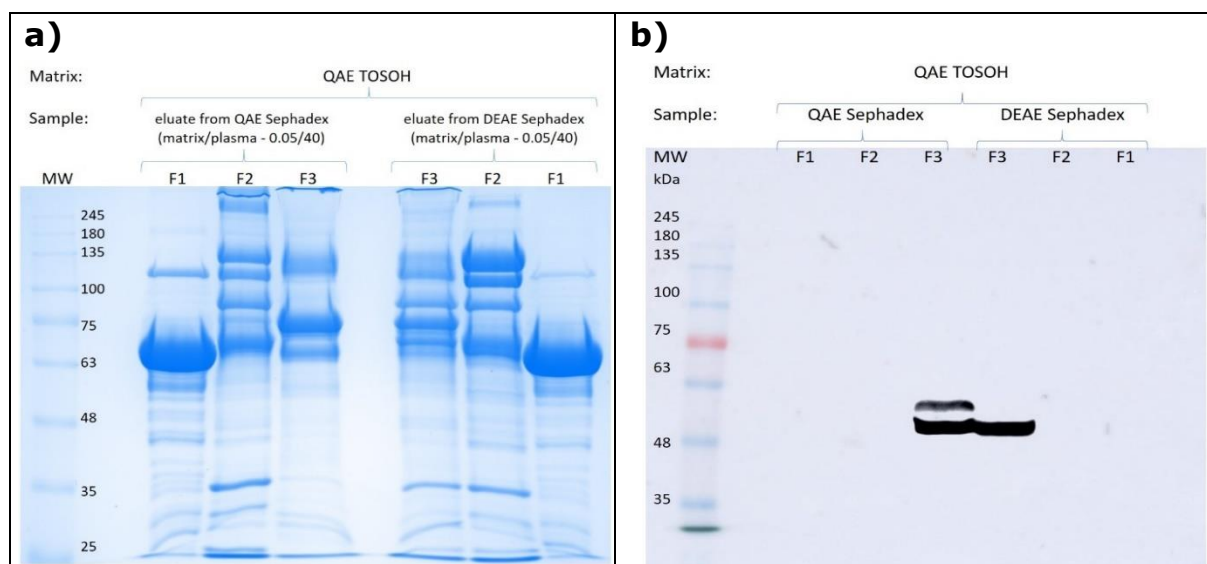
kromatografije na QAE i DEAE CIM nosaču. Eluati sa QAE i DEAE Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanese na kolone sa QAE (a) ili DEAE (b) CIM nosačima. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Proteinski sastav eluata je analiziran elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz natrij-dodecil sulfat (SDS-PAGE). Prisutnost FIX je određena Western blotom uz IgG protutijelo na FIX (a i b). Prisutnost FX je određena Western blotom uz IgG protutijelo na FX (c). **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker molekulske mase (kDa), **F2**-frakcija nakon druge elucije (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-frakcija nakon treće elucije sa (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz 500mM NaCl)

4.2.3. Kromatografija ionske izmjene na QAE TOSOH koloni



Slika 17. Kromatogrami nakon nanošenja i elucije uzoraka sa QAE i DEAE Sephadex matriksa na QAE TOSOH kolonu se ne razlikuju značajno. Eluati sa Q (a) i DEAE (b) Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su nanese na kolonu QAE TOYOPEARL-550c. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem koncentracije soli (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Svaki pik predstavlja apsorbanciju frakcije nakon elucije. **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **FT**-flow through frakcija, **F1**-frakcija nakon prve elucije (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 150mM NaCl), **F2**-druga elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-treća elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz 500mM NaCl), **plava linija** i vrijednosti s lijeve strane apscise-apsorbancija (mAU), **crvena linija** i vrijednosti sa desne strane apscise-konduktivitet elucijskog pufera (mS/cm)

Kromatogrami dobiveni nakon kromatografije na QAE Toyopearl koloni imaju sličan profil za oba startna uzorka. Intenzitet pikova između dva kromatograma je različit (Slika 17).



Slika 18. Sastav i koncentracija proteina su različiti u frakcijama sakupljenima nakon kromatografije na QAE TOSOH koloni. Faktor IX je prisutan u svim frakcijama nakon kromatografije na QAE TOSOH koloni (b). Eluati sa Q i DEAE Sephadexa u omjeru matriksa i plazme 0.05g/40ml su naneseni na kolone sa QAE TOSOH nosačem. Provedena je gradijentna elucija u tri stupnja sa 0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0, postepenim povećanjem ionske jakosti pufera (150mM, 250mM, 500mM NaCl). Proteinski sastav eluata je analiziran elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz natrij dodecil-sulfat (SDS-PAGE). Prisutnost FIX je određena Western blotom uz IgG protutijelo na FIX. **QAE**-kvartarni aminoetil, **DEAE**-dietilaminoetil, **MW**-marker molekulske mase (kDa), **F1**-frakcija nakon prve elucije (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 150mM NaCl), **F2**-druga elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 sa 250mM NaCl), **F3**-treća elucija (0,5M Tris-HCl puferom, pH 7,0 uz 500mM NaCl).

SDS-PAGE analiza frakcija dobivenih kromatografijom na QAE TOSOH koloni pokazuje različit proteinski sastav u pojedinim frakcijama (Slika 18.a). Mnogi proteini su u trećoj frakciji eliminirani, no to nije slučaj i sa FIX, što je potvrđeno Western blot analizom (Slika 18.b).

5. RASPRAVA

Najvažniji rezultat ovog rada je dokaz da se u koraku takozvane ekstrakcije na čvrstoj fazi optimalno vezivanje vitamin K ovisnih koagulacijskih faktora i inhibitora postiže nakon dodavanja optimalne količine matriksa od poprečno vezanog dekstrana (DEAE ili Q Sephadex-a). Pri toj koncentraciji nosača došlo je do potiskivanja komponenata uzorka i ovi proteini su potisnuli veliki dio albumina i ostalih proteina koji dolaze u visokoj koncentraciji u humanoj plazmi. Time su znatno olakšani daljnji koraci u procesu proizvodnje ovih važnih terapijskih proteina.

Ovaj korak provodi se već više od dvadeset godina u purifikaciji proteina, ali njegova sistematska primjena u industriji je rijetka (39,46). Implementacijom u proces primijećen je neznatno niži prinos čistog FIX, no razina čistoće krajnjeg produkta je dramatično poboljšana (41) te se stoga počinje koristiti u optimizaciji procesa. Unatoč tome, dosadašnja literatura ne bilježi sistematsko objašnjenje fenomena potiskivanja komponenata uzorka u koraku ekstrakcije na čvrstoj fazi korištenjem Sephadex A-50 matriksa od poprečno vezanog dekstrana. U ovom radu postupak je optimiran i teoretski objašnjen na navedenom kromatografskom nosaču.

Q i DEAE Sephadex su matriksi sa ligandima različite ionske jakosti, no rezultati analize frakcija nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi pokazuju kako ne postoji uočljiva razlika u uspješnosti separacije te je važniji faktor količina samog matriksa.

Intenzitet bendova na gelu može pomoći u interpretaciji uspješnosti separacije. Na SDS-PAGE gelu, na poziciji koja odgovara relativnoj molekulskoj masi između 60 i 70 kDa, odnosno humanom serum albuminu, intenzitet benda je najmanji u frakciji sa najvećim korištenim omjerom Sephadex-a i plazme (1g/800ml). Humani serum albumin je u ovom slučaju predstavnik visoko zastupljenih proteina plazme, koji

otežavaju izolaciju ostalih proteina. To znači da je u takvim uvjetima postignuta najbolja separacija albumina i ostalih visoko zastupljenih proteina od koagulacijskih faktora, uključujući faktor IX. Na poziciji koja odgovara relativnoj molekulskoj masi oko 75kDa, odnosno ceruloplazminu, intenzitet benda je najveći u frakciji sa najvećom korištenom količinom plazme i matriksa. Ceruloplazmin je predstavnik nisko zastupljenih proteina plazme, te se prema tome može zaključiti da je najbolje potiskivanje komponenata uzorka postignuto upravo u toj frakciji. Pretpostavlja se da je među tim proteinima i FIX, stoga je navedena frakcija korištena u daljnjim koracima separacije. Još jedan dokaz da se u ovoj frakciji nalazi najveća koncentracija ceruloplazmina je plava boja karakteristična za ovaj protein. Ova pojava je ranije opisana u smislu općenite separacije proteina plazme u drugim vrstama kromatografije (40).

Jedan od krajnjih ciljeva ovog projekta je separacija FIX od njegovog glavnog kontaminanta FX. U koraku ekstrakcije na čvrstoj fazi nije došlo do separacije ovih faktora. Razlog tome je što su ta dva proteina strukturno vrlo slična te se zbog toga vežu sličnim afinitetom za nosače.

Kromatogrami nakon separacije na QAE i DEAE Sepharose Fast Flow kolonama imaju različite profile, što znači da se proteinski sastavi dobivenih frakcija međusobno razlikuju za obje kolone. QAE je jaka baza, odnosno jaki anionski izmjenjivač, dok je DEAE slaba baza i slabi ionski izmjenjivač. Zbog toga ova dva liganda vežu proteine različitim afinitetom. Shodno tome će se sa svake kolone proteini eluirati različitim redoslijedom, ovisno o ionskoj jakosti pufera. U slučaju slabijeg vezanja, korištenje pufera slabije ionske jakosti biti će dovoljno za eluciju određenog proteina sa kolone.

Purifikacija faktora IX je već postignuta korištenjem kromatografije anionske izmjene na DEAE-Sepharose koloni (41). Profili dobiveni kromatografijom na istoj koloni u ovom istraživanju su u skladu sa prijašnjim rezultatima.

Prema rezultatima SDS-PAGE analize frakcija nakon kromatografije na Sepharose Fast Flow i CIM kolonama, postoje izvjesne razlike u proteinskom sastavu pojedinih frakcija. Na gelovima se može primijetiti da nakon ovog koraka frakcije sadrže manje albumina u usporedbi s frakcijama nakon koraka ekstrakcije na čvrstoj fazi. To znači da se korištenjem dva kromatografska koraka povećava efikasnost separacije. Ovo potvrđuju i oštiri pikovi dobiveni separacijom na monolitnim kolonama. Prednost korištenja monolita, pa tako i CIM diskova u smislu brzine i čistoće produkta je dokazana u prijašnjim radovima (47). Naši rezultati slažu se sa literaturnima.

Kromatografski postupak izolacije FIX pomoću monolitnog diska sa DEAE anionskim izmjenjivačem je primijenjen u "up-scalingu" procesa (47). U našem radu se ova kolona prvi puta primjenjuje za down-scaling. QAE monolitni disk je u prijašnjim radovima korišten za izolaciju proteina A (48), no literatura ne bilježi korištenje istog u procesu purifikacije FIX. U ovom radu je postignut down-scaling procesa purifikacije FIX na navedenim diskovima, što je korisno u procesu optimizacije jer je u tom slučaju potrebna manja količina plazme.

Q Toyopearl kolona je korištena po prvi puta u procesu purifikacije FIX. Rezultati našeg istraživanja pokazuju uspješnost separacije, no postupak je brži na monolitnim kolonama.

Western blot analizom frakcija dobivenih kromatografijom na QAE Sepharose Fast Flow koloni detektiran je FIX u drugoj frakciji, dok se u frakcijama sa DEAE Sepharose Fast Flow kolone nalazi u drugoj frakciji. Moguće objašnjenje je da se FIX slabije vezao za DEAE te je elucijski pufer manje ionske jakosti bio dovoljan za njegovu eluciju s kolone. FX je prisutan u svim ispitanim frakcijama, što znači da je potrebno provesti dodatni separacijski korak za uklanjanje ovog kontaminanta. Analitička metoda za potvrdu prisutnosti ova dva faktora u dobivenim frakcijama, koja je optimizirana tijekom ovog rada, može se koristiti u daljnjim koracima optimizacije.

6. ZAKLJUČAK

Naši rezultati pokazuju da se korištenjem matriksa od poprečno vezanog dekstrana (Sephadex A-50) i određene koncentracije plazme postiže potiskivanje komponenata uzorka, pri čemu proteini prisutni u plazmi u manjim koncentracijama istiskuju one prisutne u većim koncentracijama. Time se postiže vezanje proteina niskih koncentracija za matriks, a među tim proteinima se nalazi i faktor IX. Stoga se kromatografija potiskivanja komponenata uzorka na poprečno vezanom dekstranu (Sephadex) može koristiti kao prvi korak u odvajanju FIX i ostalih vitamin K ovisnih proteina od ostalih komponenti plazme.

Testirane su sefarozne i monolitne kromatografske kolone sa anionskim izmjenjivačima QAE i DEAE. Rezultati pokazuju da oba anionska izmjenjivača dobro vežu FIX te se mogu koristiti u procesu purifikacije. Prema rezultatima Western blota za dokazivanje prisutnosti faktora X, u svim ispitanim frakcijama nije došlo do odvajanja FX i FIX. Odvajanje bi se moglo postići daljnjom optimizacijom ovog, te uvođenjem dodatnog kromatografskog koraka.

Optimirana je Western blot metoda za detekciju FIX i FX u frakcijama dobivenim nakon koraka ekstrakcije na čvrstoj fazi na poprečno vezanom dekstranu (Sephadex) te nakon kromatografije anionske izmjene. Ova optimirana metoda koristiti će se za dokazivanje prisutnosti faktora u frakcijama nakon sljedećih kromatografskih koraka.

Na temelju dobivenih rezultata jasno je da je u ovom radu postignut down-scaling procesa, što je bilo potrebno da bi se proveli navedeni postupci.

Za daljnju potvrdu prisutnosti FIX u dobivenim frakcijama, kao i za određivanje varijante proteina, može se koristiti test na koagulacijsku aktivnost (engl. *clotting test*) i masena spektrometrija.

Sljedeći korak u istraživanju je heparin afinitetna kromatografija, kojom bi se moglo postići razdvajanje FIX od ostalih faktora slične strukture. Nakon optimiziranja tog koraka, nadamo se dobiti purificirani FIX te da će prinos i enzimska aktivnost biti što veći.

Budući da se dobiveni rezultati slažu sa literaturnima, zaključak je da se kromatografske kolone korištene u istraživanju mogu koristiti u postupku purifikacije FIX te da su monolitne kolone povoljnije, budući da je postupak elucije proteina sa takvih kolona mnogo kraći jer podnose veći protok po jedinici vremena. Nova saznanja će biti korisna u ubrzanju procesa purifikacije FIX. To bi dugoročno doprinijelo optimizaciji izolacije i u industrijskoj proizvodnji koagulacijskog faktora IX u terapijske svrhe.

7. LITERATURA

1. Bajaj SP, Joist JH. New insights into how blood clots: implications for the use of APTT and PT as coagulation screening tests and in monitoring of anticoagulant therapy. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25(4):407–18.
2. Sallah S. Inhibitors to clotting factors. *Ann Hematol.* 1997;75(1–2):1–7.
3. Chen H, Wu T, Jin L, Tang J, Zhu J, Ge Y, et al. Treatment of vitamin K-dependent coagulation factor deficiency and subarachnoid hemorrhage. *World J Emerg Med.* 2011;2(1):73–6.
4. Josic D, Hoffer L, Buchacher A. Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor protein C. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;790(1–2):183–97.
5. Nemerson Y, Furie B. Zymogens and cofactors of blood coagulation. *CRC Crit Rev Biochem.* 1980;9(1):45–85.
6. Milstone JH. Three-stage analysis of blood coagulation. *J Gen Physiol.* 1948;31(4):301–24.
7. Physiology, Coagulation Pathways. 2018. Chaudhry R, Babiker HM. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
8. Robbins Basic Pathology - 9th Edition. 2012. Kumar V, Abbas A, Aster J. Elsevier. p214
9. Brekelmans MPA, Abdoellakhan RA, Scheres LJJ, Biedermann JS, Hutten BA, Meijer K, et al. Clinical outcome of patients with a vitamin K antagonist-associated bleeding treated with prothrombin complex concentrate. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(1):77–84.
10. Hess JR. Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. *Blood Transfus.* 2010;8(3):s9–15.
11. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry.* 1985;24(14):3736–50.
12. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5260–4.

13. Venkateswarlu D, Perera L, Darden T, Pedersen LG. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys J*. 2002;82(3):1190–206.
14. Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S, et al. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. *J Biochem (Tokyo)*. 2000;128(2):175–80.
15. Larson PJ, Stanfield-Oakley SA, VanDusen WJ, Kasper CK, Smith KJ, Monroe DM, et al. Structural integrity of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human blood coagulation factor IXa Is required for its binding to cofactor VIIa. *J Biol Chem*. 1996;271(7):3869–76.
16. Aktimur A, Gabriel MA, Gailani D, Toomey JR. The Factor IX γ -Carboxyglutamic Acid (Gla) Domain Is Involved in Interactions between Factor IX and Factor XIa. *J Biol Chem*. 2003;278(10):7981–7.
17. Suttie JW. Vitamin K-Dependent Carboxylase. *Annu Rev Biochem*. 1985;54(1):459–77.
18. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. 1990;76(1):1–16.
19. Li T, Miller CH, Payne AB, Craig Hooper W. The CDC Hemophilia B mutation project mutation list: a new online resource. *Mol Genet Genomic Med*. 2013;1(4):238–45.
20. Reitsma PH, Bertina RM, Ploos van Amstel JK, Riemens A, Briët E. The putative factor IX gene promoter in hemophilia B Leyden. *Blood*. 1988;72(3):1074–6.
21. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. 2013;19(1):e1-47.
22. Boylan B, Rice AS, Neff AT, Manco-Johnson MJ, Kempton CL, Miller CH. Survey of the Anti-Factor IX Immunoglobulin Profiles in Patients With Hemophilia B Using a Fluorescence-Based Immunoassay. *J Thromb Haemost JTH*. 2016;14(10):1931–40.
23. Kulkarni R, Aledort LM, Berntorp E, Brackman HH, Brown D, Cohen AR, et al. Therapeutic choices for patients with hemophilia and high-titer inhibitors. *Am J Hematol*. 2001;67(4):240–6.
24. Chandra S, Brummelhuis HGJ. Prothrombin Complex Concentrates for Clinical Use. *Vox Sang*. 1981;41(5–6):257–73.

25. Chavin SI. Factor VIII: structure and function in blood clotting. *Am J Hematol.* 1984;16(3):297–306.
26. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion (Paris).* 1999;39(11–12):1160–8.
27. Windyga J, Solano Trujillo MH, Hafeman AE. BAX326 (RIXUBIS): a novel recombinant factor IX for the control and prevention of bleeding episodes in adults and children with hemophilia B. *Ther Adv Hematol.* 2014;5(5):168–80.
28. Santagostino E, Mancuso ME. Venous access in haemophilic children: choice and management. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2010;16 Suppl 1:20–4.
29. Santagostino E, Martinowitz U, Lissitchkov T, Pan-Petes B, Hanabusa H, Oldenburg J, et al. Long-acting recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in hemophilia B: results of a phase 3 trial. *Blood.* 2016;127(14):1761–9.
30. Kovnir SV, Orlova NA, Shakhparonov MI, Skryabin KG, Gabibov AG, Vorobiev II. A Highly Productive CHO Cell Line Secreting Human Blood Clotting Factor IX. *Acta Naturae.* 2018;10(1):51–65.
31. Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker CB. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1986;261(21):9622–8.
32. Evatt BL, Black C, Batorova A, Street A, Srivastava A. Comprehensive care for haemophilia around the world. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2004;10 Suppl 4:9–13.
33. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev.* 2007;21(2):101–17.
34. Molecular therapies|Digital Textbook Library [Internet]. 2011. Aradi J, Balajthy Z, Csősz E, Scholtz B, Szatmári I, Tőzsér J, Varga T. University of Debrecen. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapiak_en_book/ch04.html
35. Kim HC, McMillan CW, White GC, Bergman GE, Horton MW, Saidi P. Purified factor IX using monoclonal immunoaffinity technique: clinical trials in hemophilia B and comparison to prothrombin complex concentrates. *Blood.* 1992;79(3):568–75.

36. Puetz J, Soucie JM, Kempton CL, Monahan PE. Prevalent Inhibitors in Hemophilia B Subjects Enrolled in the Universal Data Collection Database. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2014;20(1):25–31.
37. Belattar N. Affinity adsorption of human vitamin K-dependent coagulation factor IX onto heparin-like poly (styrene sodium sulfonate) adsorbent. *Mater Sci Eng C.* 2007;27(4):849–54.
38. Ribeiro DA, Passos DF, Ferraz HC, Castilho LR. Intermediate purification of CHO-derived recombinant human Factor IX using hydrophobic interaction membrane-based chromatography and its comparison to a sulfated resin. *Electrophoresis.* 2017;38(22–23):2900–8.
39. Gajdosik MS, Clifton J, Josic D. Sample displacement chromatography as a method for purification of proteins and peptides from complex mixtures. *J Chromatogr A.* 2012;1239:1–9.
40. Gajdosik MS, Kovac S, Malatesti N, Müller E, Josic D. Ion-Exchange Sample Displacement Chromatography as a Method for Fast and Simple Isolation of Low- and High-Abundance Proteins from Complex Biological Mixtures. *Food Technology and Biotechnology.* 2014;52(1):58–63.
41. Burnouf T, Michalski C, Goudemand M, Huart JJ. Properties of a highly purified human plasma factor IX:c therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography. *Vox Sang.* 1989;57(4):225–32.
42. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2007;1168(1–2):101–68.
43. Brgles M, Clifton J, Walsh R, Huang F, Rucevic M, Cao L, et al. Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins. *J Chromatogr A.* 2011;1218(17):2389–95.
44. Brown A, Bill J, Tully T, Radhamohan A, Dowd C. Overloading ion-exchange membranes as a purification step for monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010;56(2):59–70.
45. Josic D, Breen L, Clifton J, Gajdosik MS, Gaso-Sokac D, Rucevic M, et al. Separation of proteins from human plasma by sample displacement chromatography in hydrophobic interaction mode. *Electrophoresis.* 2012;33(12).
46. Josić D, Hoffer L, Buchacher A, Schwinn H, Frenzel W, Biesert L, et al. Manufacturing of a prothrombin complex concentrate aiming at low thrombogenicity. *Thromb Res.* 2000;100(5):433–41.

47. Branović K, Buchacher A, Barut M, Strancar A, Josic D. Application of semi-industrial monolithic columns for downstream processing of clotting factor IX. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;790(1-2):175-82.
48. Breen L, Cao L, Eom K, Srajer Gajdosik M, Camara L, Giacometti J, et al. High-throughput fractionation of human plasma for fast enrichment of low- and high-abundance proteins. *Blood Transfus Trasfus Sanguie.* 2012;10 Suppl 2:s89-100.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Silvia Sobol

📍 Kralja Tomislava 43, 51260 Crikvenica (Hrvatska)

☎ (+385) 98521423

✉ silvia.sobol@student.uniri.hr

OBRAZOVANJE

2016 – danas

Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini"

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju

Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

www.biotech.uniri.hr

2013-2016

Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju

Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

www.biotech.uniri.hr

2009-2013

Srednjoškolsko obrazovanje

Opća gimnazija dr. Antuna Barca Crikvenica (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

03/2018 – 07/2018

Izrada diplomskog rada

Laboratorij za analitičku biotehnologiju i proteomiku, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

▪ Tema: Optimizacija izolacije koagulacijskog faktora IX iz humane plazme

Mentor: prof.dr.sc. Đuro Josić

07/2016 – 07/2016

Stručna praksa

Jadran galenski laboratorij JGL d.d.

Pulac 4A, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Odjel razvojne analitike

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik

hrvatski

Ostali jezici

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	C1	C1
njemački	C1	C1	C1	C1
Deutsche Sprachdiploma (DSD)				

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik

Stupnjevi: Temeljni korisnik - Samostalni korisnik - Iskusni korisnik
[Digitalne vještine - tablica za samoprocjenu](#)

- Osnovno znanje u korištenju bioinformatičkim programima – PyMol, Chimera, Avogadro, Marvin, Tenua, VMD - stečeno tijekom sveučilišnog studija

Vozačka dozvola

B

DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade

Višegodišnja korisnica stipendije grada Crikvenice za nadarene studente
 Erasmus stipendija za stručnu praksu 2018./2019.