

СТВОРЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА КРЕМНЕЗЕМНИХ СОРБЕНТАХ

Н. О. Шурко, Т. В. Даниш
natalia_shurko@ukr.net

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,
вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, 79044, Україна, ipktm@ukr.net

Технологічні процеси хроматографічного очищення широко використовуються в останні роки для фракціонування плазми крові. Впровадження іонообмінної, афінної та гель-проникної хроматографії сприяли виникненню нового покоління високоочищених та вірус-безпечних терапевтичних препаратів плазми, зокрема факторів зсідання крові.

Мета дослідження — дослідити можливість використання методу хроматографічного очищення фактора VIII на кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в якості лігандів.

У статті наведено результати досліджень очищення фактора VIII зсідання крові, яке є комбінацією попереднього фракціонування свіжозамороженої плазми з наступним етапом методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах. Охарактеризовано основні переваги і недоліки використання тріазинових барвників в ролі афінних лігандів.

Запропонований метод охоплює попереднє осадження білків плазми цитратом барію, адсорбцію на гідроксиді алюмінію, відділення осаджених білків центрифугуванням і використання методу негативно-афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах: Діасорб-Активний яскраво-голубий К, Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Gelb MXR.

Продemonстровано, що поєднання попереднього фракціонування плазми крові з методом негативно-афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах із синтетичними барвниками в якості лігандів дозволяє досягти високого ступеня очищення фактора VIII (приблизно в 100 разів). Наприклад, використання сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4 ЖТ збільшує питому активність фактора VIII з $0,017 \pm 0,004$ МО/мг до $1,940 \pm 0,023$ МО/мг білка. Наведена технологія може бути застосована одночасно з іншими видами хроматографії у схемі препаративного отримання фактора VIII зсідання крові.

Ключові слова: АФІННА ХРОМАТОГРАФІЯ, КРЕМНЕЗЕМНІ СОРБЕНТИ, ТРІАЗИНОВІ БАРВНИКИ, ФРАКЦІОНУВАННЯ, ПЛАЗМА КРОВІ, ФАКТОР VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ, ГЕМОФІЛІЯ А

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF BLOOD COAGULATION FACTOR VIII PURIFICATION BY THE METHOD OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON SILICA SORBENTS

N. O. Shurko, T. V. Danysh
natalia_shurko@ukr.net

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine»,
45 gen. Chuprynyky str., Lviv 79044, Ukraine, ipktm@ukr.net

The manufacturing processes of chromatographic purification are used increasingly for plasma fractionation in the last few years. Implementation and combination of ion-exchange, affinity and size-exclusion chromatography have allowed the development of a new generation of therapeutic plasma derivatives, especially coagulation factors with improved purity and virus safety.

The purpose of this work was to investigate the possibility of using the method of chromatographic purification of factor VIII on silica sorbents with triazine dyes as ligands.

The paper presents the results of studies of purification blood coagulation factor VIII which is a combination of the method of fresh frozen plasma fractionation with the next step of affinity chromatography on macroporous silica sorbents. The main advantages and disadvantages of using triazine dyes as ligands are described.

The suggested method contains a combination of previous precipitation of plasma proteins with barium citrate, adsorption with aluminium hydroxide, separation of precipitated proteins by centrifugation and

using the method of negative affinity chromatography on the silica sorbents: Diasorb Active Bright-blue K, Diasorb Active-scarlet damask 4GT, Diasorb-Procion Blue HB, Diasorb-Procion Gelb MXR.

We have shown that the combination of previous fractionation of plasma with method of negative affinity chromatography on macroporous silica sorbents with synthetic dyes as ligands can achieve high purity factor VIII (about 100 times). For example, using sorbent Diasorb Active-scarlet damask 4GT increases the specific activity of factor VIII from 0.017 ± 0.004 IU/mg to 1.940 ± 0.023 IU/mg protein. This technology can be used along with other types of chromatography in the scheme of preparative receiving of factor VIII.

Keywords: AFFINITY CHROMATOGRAPHY, SILICA SORBENTS, TRIAZINE DYES, FRACTIONATION, PLASMA OF BLOOD, BLOOD COAGULATION FACTOR VIII, HAEMOPHILIA A

СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ФАКТОРА VIII СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА КРЕМНЕЗЕМНЫХ СОРБЕНТАХ

Н. О. Шурко, Т. В. Даныш
natalia_shurko@ukr.net

ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины»,
ул. Генерала Чупринки, 45, г. Львов, 79044, Украина, ipktm@ukr.net

Производственный процесс хроматографической очистки широко используется в последние несколько лет для фракционирования плазмы крови. Внедрение и сочетание ионообменной, аффинной хроматографии и гель-фильтрации позволило создать новые поколения терапевтических производных плазмы с повышенной чистотой и вирусной безопасностью, в частности факторов свертывания крови.

Цель работы — исследовать возможность использования метода хроматографической очистки фактора VIII на кремнеземных сорбентах с триазиновыми красителями в качестве лигандов.

В статье приведены результаты исследований очистки фактора VIII свертывания крови, которая является комбинацией предварительного фракционирования свежесамороженной плазмы с последующим этапом метода аффинной хроматографии на макропористых кремнеземных сорбентах. Охарактеризованы основные преимущества и недостатки использования триазиновых красителей в качестве аффинных лигандов.

Предлагаемая схема включает предварительное осаждение белков плазмы цитратом бария, адсорбцию на гидроокиси алюминия, отделение осажденных белков центрифугированием и использование метода негативной аффинной хроматографии на кремнеземных сорбентах: Диасорб Активный Ярко-голубой К, Диасорб Алый 4ЖТ, Диасорб Procion Blue HB, Диасорб Procion Gelb MXR.

Продemonстрировано, что сочетание метода предварительного фракционирования плазмы крови с методом негативной аффинной хроматографии на макропористых сорбентах с синтетическими красителями в качестве лигандов позволяет достичь высокой степени очистки фактора VIII (около 100 раз). Например, использование сорбента Диасорб-Активный Алый 4ЖТ увеличивает удельную активность фактора VIII с $0,017 \pm 0,004$ МЕ/мг до $1,940 \pm 0,023$ МЕ/мг белка. Настоящая технология может применяться одновременно с другими видами хроматографии в схеме препаративного получения фактора VIII.

Ключевые слова: АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, КРЕМНЕЗЕМНЫЕ СОРБЕНТЫ, ТРИАЗИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ, ПЛАЗМА КРОВИ, ФАКТОР СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII, ГЕМОФИЛИЯ А

Фактор зсідання крові VIII (FVIII) є ферментативним кофактором, який задіяний в активації фактора зсідання IX (FIX).

Дефект гену FVIII може призвести до розвитку гемофілії А — рецесивного генетичного захворювання, пов'язаного з Х-хромосомою, частота виникнення якого — приблизно 1 випадок на 5000 чоловіків. Майже 50 % усіх випадків розвитку захворювання пов'язані з інверсією

інтрону 22 гену FVIII, 5 % — спричинені інверсією інтрону 1, решта випадків спричинені мутаціями іншого роду [1]. Крім генетичних порушень, причинами захворювання на гемофілію А можуть стати інші чинники (так звана набута форма).

Ця хвороба спричиняє порушення системи зсідання крові і, як наслідок, є причиною кровотеч, які виникають спонтанно або при

травмах. Серед тварин трапляється нечасто — переважно у собак, свиней, коней та овець; описані також випадки захворювання у великої рогатої худоби. У собак з гемофілією А чи В (дефіцит FІХ) виникають спонтанні кровотечі, які можна порівняти з кровотечами, що відповідають фенотипу людей з важкою формою захворювання. Ген FVІІІ собак має ідентичну послідовність кДНК на 77–92 % до генів людини, мишей, овець і свиней, а саме містить гомологічні доменні структури А1, А2, В, А3, С1 і С2 [2].

Досягнення в галузі лікування гемофільї значною мірою залежать від наявності добре охарактеризованих тваринних моделей, які точно відтворюють фенотип кровотеч у людей з цим захворюванням. Дослідження цих експериментальних моделей має важливе значення для оптимізації в галузі клінічної медицини, яка приносить користь людям і тваринам. Так, експерименти на собаках з гемофілією А значною мірою дозволили вирішити певні обмеження в лікуванні цього захворювання через можливий розвиток інгібіторних антитіл до FVІІІ та розробити нові методи оцінки гемостазу *in vivo* [3].

Відомо, що терапевтичні рекомбінантні препарати одержують шляхом введення генів FVІІІ людини в геном клітин яєчника китайського хом'яка (*Chinese Hamster Ovary*) або клітин нирки новонародженого хом'яка (*Baby Hamster Kidney*). Клітинна лінія секретує рекомбінантний FVІІІ (rFVІІІ) у культуральне середовище, з якого фактор виділяють за допомогою хроматографічних методів (іонообмінна, гель-проникна та афінна хроматографії). Синтезовані rFVІІІ за структурою ідентичні до плазматичного [4].

Білкові препарати, отримані з плазми крові людини, є часто єдиним доступним варіантом для профілактики та лікування небезпечних для життя травм, вроджених вад, імунологічних розладів або інфекцій [5]. Процес виробництва плазматичних похідних доволі складний, повинен забезпечувати продукту специфічність, стабільність, безпеку та супроводжуватися відповідними методами контролю.

Крім того, через дефіцит плазми надзвичайно важливим є безвідходність техноло-

гії. Кілька терапевтичних продуктів повинні бути виділені одночасно з одного пулу плазми. Це вимагає комбінування між процесами очищення для декількох білків без погіршення якості та кількості основних продуктів [6].

Перші спроби очищення FVІІІ з плазми крові людини для терапевтичного застосування були переважно безуспішними. Його отримували з фракції І за Коном чи кріопреципітату. Ці фракції містили в основному фібриноген і фібронектин та різні домішкові білки, в тому числі імуноглобуліни. Кріопреципітат, який було доволі легко отримати з окремих доз плазми у місцевих центрах служби крові, а також з великих пулів плазми на промислових підприємствах, був основним препаратом для лікування хворих на гемофілію до середини 90-х рр. (а в Україні — донедавна) [7].

Сучасна технологія виробництва препаратів з плазми крові базується значною мірою на використанні процесу фракціонування етанолом, який передбачає послідовні етапи обробки за певних концентрацій етилового спирту, пов'язані зі змінами рН, температури й осмолярності, що призводить до селективного осадження білків, наприклад, факторів зсідання крові, імуноглобуліну G (IgG) й альбуміну [5]. Переваги етанольного фракціонування полягають у простоті, низькій токсичності, бактеріостатичних ефектах та інактивації вірусів. До недоліків ж належать: низька специфічність при очищенні слідових білків плазми і потенційний денатуруючий вплив етанолу або низьких значень рН на нестійкі білки (фактори коагуляції, інгібітори протеаз та антикоагулянти) [6].

З метою вдосконалення білкового фракціонування та покращення аналітичних характеристик продукту до процесу виробництва препаратів факторів зсідання крові вводять етапи хроматографічного очищення. Зручність хроматографії полягає в тому, що її можна поєднувати з традиційними методами преципітації плазми, забезпечивши належне використання побічних фракцій, що містять концентровані напівочищені білки плазми крові людини [6].

Афінна хроматографія — це процедура очищення, яка використовує здатність молекул зв'язуватися з іншими; вона використовує специфічні біологічні взаємодії, які можуть

існувати між білком та антитілом, ферментом і субстратом (або кофактором), рецептором і лігандом. Афінна хроматографія стала ефективним інструментом для очищення біофармацевтичних препаратів плазми крові людини.

Застосування афінних лігандів розвивалося від ферментативних субстратів, кофакторів, гормонів, лектинів, кофакторів, антитіл, нуклеїнових кислот, ефекторів та інгібіторів до різних пептидів, поліпептидів, пептидних фрагментів, а також інших синтетичних структур. У наш час застосовують дві найбільші селективні групи лігандів — використання моноклональних антитіл і пептид-споріднених сполук [8].

Синтетичні ліганди, що включають молекулу барвника, відомі протягом тривалого часу і вважаються альтернативою біологічним лігандам. Барвники, які використовуються для очищення білків та ферментів — це синтетичні молекули, що несуть реактивні (наприклад, хлортріазинові) фрагменти, за допомогою яких вони легко можуть бути прикріплені до різних полімерних носіїв. Серед відомих лігандів реактивних барвників найбільшу увагу дослідників для очищення білка привернув *Cibacron Blue 3GA* [9].

Барвники мають чіткі переваги порівняно з біологічними лігандами з точки зору собівартості, легкості іммобілізації, безпеки, стабільності та адсорбційної здатності. Основним недоліком текстильних барвників є їхня помірна селективність стосовно білків. Незважаючи на це, загальний розмір, форма і розподіл іонних та гідрофобних груп барвників, що взаємодіють із сайтами зв'язування білків, іноді досить специфічні, як, наприклад, з нуклеотид-зв'язувальним сайтом деяких дегідрогеназ, кіназ чи нуклеотид-розпізнавальних ферментів. Взаємодія барвник-білок не повинна бути подібна до простого іонообмінного типу зв'язування, часто можливо при рН більшому, ніж рІ білка-мішені. Крім того, дисоціація білкового комплексу від барвника часто досягається вищою специфічністю конкуруючих лігандів, що входять до складу елюювальних розчинів [9].

До матриці афінного сорбенту, крім загальних вимог до хроматографічних матриць

(нерозчинність, гідрофільність, щільність, відповідна форма та розмір гранул, хімічна стабільність в умовах модифікації та безпосередньо у хроматографічному процесі, відсутність неспецифічної адсорбції тощо), пред'являються вимоги наявності реактивних хімічних груп (аміно-, гідроксильних-, епоксидних тощо), які дозволяють за допомогою нескладної хімічної реакції ковалентно прив'язувати різноманітні біологічні молекули (ліганди та спейсери).

Хроматографічні ліганди іммобілізують на інертному, переважно сферичному матеріалі-носії. Прикладами відповідних матриць є неорганічні носії — наприклад, силікагель, силікати чи пористі скла, або органічні — поперечно-зшиті полісахариди, наприклад, целюлоза, похідні целюлози, декстрини або модифіковані агарози. Кращим носієм є *Sepharose*[®], матеріал на основі модифікованої агарози, полісахаридні ланцюжки якої сполучені з утворенням тривимірної сітки [10, 11].

У літературі описано спроби використання в ролі матриці для афінних сорбентів пористе скло, проте вони не мали широкого успіху через неспецифічну адсорбцію. Було запропоновано використання з такою метою макропористого силікагелю, силанольні групи якого модифікували γ -аміно- чи γ -гідроксипропілтриметоксисиланом. До утвореного активованого носія (з вільними аміно- чи гідроксильними групами) за допомогою глутарового альдегіду приєднували хімотрипсин чи сироватковий альбумін. Низький рівень неспецифічної сорбції на силікагелі поряд з його ідеальною жорсткістю, добре розробленою технологією виготовлення дрібно- та макрозернистих гранул (з відкаліброваною пористістю) відкриває цікаві перспективи цієї групи носіїв для афінної хроматографії [10].

Мета роботи — дослідити можливість використання методу хроматографічного очищення FVIII на кремнеземних сорбентах з тріазиновими барвниками в якості лігандів.

Матеріали і методи

Вихідною сировиною для досліджень була свіжозаморожена плазма (СЗП) з активністю FVIII 1 МО/мл. Визначення активності

FVIII здійснювали уніфікованим одностадійним коагулологічним методом за часом зсідання фібриногену в суміші, що містила дефіцитну за фактором плазму (менше 1 % фактора), розведену досліджувану рідину (плазму або одержаний в ході фракціонування чи хроматографії розчин) та АСТІН-реагент за присутності іонів кальцію. Кількісне визначення активності фактора виконували згідно з графіком залежності активності фактора (у відсотках) від часу зсідання в АПТЧ-тесті [12].

Для визначення питомої активності фактора використовували контрольні та субстратні плазми наборів реагентів для визначення АПТЧ виробництва фірми «Helen» (Великобританія).

Синтез сорбентів з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили за методикою «з включенням солі» протягом тривалого часу при лужних значеннях рН [13]. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250 [14]. Чистоту отриманого зразка оцінювали в поліакриламідному гелі у системі Лемлі [15]. В ролі білкових маркерів використовували комерційний набір фірми *ThermoFisher PageRuler Unstained Protein Ladder* (суміш 14 рекомбінантних білків з молекулярною масою від 10 до 200 кДа).

Осадження білків проводили таким чином: до СЗП додавали 1 М розчин хлориду барію при рН 6,5–7,4 до кінцевої концентрації 0,08 М. Реактив вводили поступово за постійного перемішування розчину на магнітній мішалці. Одержану суміш центрифугували при 2700 g за температури 6 °C протягом 20 хв

на центрифугу *Eppendorf 5702R*. Осад використовували для виділення білків протромбінового комплексу.

Далі до супернатанту порційно додавали гідроксид алюмінію(III) до кінцевої концентрації 3 %, перемішуючи розчин за допомогою магнітної мішалки протягом 15 хв. Зразу ж після цього до суміші крапельно вносили 32 % розчин ПЕГ 4000 до кінцевої концентрації 3,5%, перемішували ще 15 хв за кімнатної температури та центрифугували при 2700 g за температури 6 °C протягом 30 хв на центрифугу *Eppendorf 5702R*.

Отриману надосадову рідину використовували для подальшого експерименту із сорбентами, а осад заморозили для виділення інших білків плазми крові.

Результати та обговорення

До складу плазми крові людини входять численні білки широкого діапазону концентрацій, які виконують різноманітні функції. Загальний вміст білка у плазмі складає 60 г/л. Основними білками є альбумін з концентрацією 45 г/л, IgG — 8–11 г/л і фібриноген — 2–3 г/л. Плазма також містить інгібітори протеїназ, зокрема, альфа-1-антитрипсин (1,5 г/л), антитромбін III (0,3 г/л) та C1-інгібітор (0,2 г/л). Концентрація таких факторів зсідання крові, як FIX, FVII, FX, фактор фон Віллебранда (VWF), становить близько 5–10 мг/л, тоді як FVIII присутній в нижчій концентрації (<1 мг/л) [6].

З усіх зареєстрованих терапевтичних плазмових білкових препаратів FVIII — єдиний

Таблиця 1

Активність FVIII на різних етапах очищення ($M \pm m$, $n=3$)
The activity of FVIII at different stages of purification ($M \pm m$, $n=3$)

Проба Sample	Концентрація білка, мг/мл Concentration of protein, mg/ml	Активність FVIII, МО Activity of FVIII, IU	Питома активність FVIII, МО/мг білка Specific activity of FVIII, IU/mg protein
Свіжозаморожена плазма Fresh frozen plasma	60,00±0,85	1,00±0,09	0,017±0,004
Супернатант після осадження хлоридом барію Supernatant after precipitation by barium chloride	51,00±0,54	1,00±0,09	0,019±0,002
Супернатант після сорбції білків на гідроксиді алюмінію та осадження з ПЕГ 4000 The supernatant after sorption of proteins on aluminum hydroxide and precipitation by PEG 4000	40,00±0,67	1,00±0,12	0,025±0,001

продукт кріопреципітату — осаду, отриманого в результаті розморожування плазми за температури від 1 до 4 °С. Проте на стадії кріоосадження втрачається приблизно 30–40 % FVIII. Тому в цьому дослідженні перед нами стояло завдання розробити схему очищення препарату FVIII, оминаючи цю стадію.

Традиційно препарати FVIII на ранніх етапах виготовлялися за допомогою методів осадження. Хроматографія була впроваджена у процеси виробництва FVIII в кінці 80-х рр. Сьогодні для очищення FVIII широко використовують аніонообмінну, афінну та гель-проникну хроматографії [16]. Часто до процесу виробництва фактора включають кілька видів цих хроматографій.

Хроматографічне очищення FVIII вважається одним із найскладніших процесів через потенційний ризик його активації чи обмеженого протеолізу. Оскільки FVIII зв'язується у плазмі з VWF, який виступає природнім стабілізатором його активності, в процесі хроматографічного виділення важливо дотримуватися умов, що забезпечують збереження цього комплексу. При виборі афінних лігандів передбачають їх можливу специфічність до будь-якого з білків цього комплексу [7].

Під час розробки технологічної схеми виділення FVIII ми передбачали поетапне відокремлення білків протромбінового комплексу

їх осадженням з цитратом барію та сорбцією на гідроксиді алюмінію(III), відділенням фібриногену, фібрoneктину та інших домішкових білків з ПЕГ 4000. Одержані осадки використовували для одержання очищених білкових препаратів в інших технологіях для забезпечення безвідходності процесів. Отримані результати подані у *Таблиці 1*.

У результаті проведених етапів осадження домішкових білків вдалося досягнути збільшення питомої активності FVIII в 1,47 разу. Крім того, видалення з досліджуваної суміші факторів протромбінового комплексу значно збільшувало стабільність комплексу FVIII-VWF. В одержаному концентраті FVIII-активність факторів протромбінового комплексу доступними коагулологічними методами не визначалася.

На наступному етапі досліджень проводили додаткове очищення FVIII з використанням макропористих кремнеземних сорбентів з барвниками-лігандами (batch-метод).

Раніше ми синтезували 16 різних хроматографічних сорбентів на основі кремнеземного макропористого носія та тріазинових барвників. Попередні наші дослідження [17] продемонстрували, що FVIII не сорбувався із жодним з цих сорбентів, причому його питома активність зростала (явище негативної афінної сорбції) [18]. Для цього дослідження було відібрано 4 сорбенти.

Таблиця 2

Хроматографічне очищення FVIII ($M \pm m$, $n=3$)
The chromatographic purification of FVIII ($M \pm m$, $n=3$)

Проба Sample	Концентрація білка, мг/мл Concentration of protein, mg/ml	Активність FVIII, МО Activity of FVIII, IU	Питома активність FVIII, МО/мг білка Specific activity of FVIII, IU/mg protein
Свіжозаморожена плазма Fresh frozen plasma	60,00±0,85	1,00±0,09	0,017±0,004
Супернатант після сорбції білків на гідроксиді алюмінію та осадження з ПЕГ 4000 The supernatant after sorption of proteins on aluminum hydroxide and precipitation by PEG 4000	40,00±0,67	1,00±0,12	0,025±0,001
Супернатант/сорбент Діасорб-Активний яскраво-голубий К Supernatant/ sorbent Active Bright Blue K	1,70±0,12	3,00±0,12	1,760±0,018
Супернатант/сорбент Діасорб-Активний пурпуровий 4 ЖТ Supernatant/sorbent Active Scarlet Damask 4GT	1,80±0,06	3,50±0,09	1,940±0,023
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Blue HB Supernatant/ sorbent Procion Blue HB	1,60±0,04	3,00±0,32	1,875±0,034
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Gelb MXR Supernatant/ sorbent Procion Gelb MXR	1,60±0,08	2,50±0,16	1,560±0,009

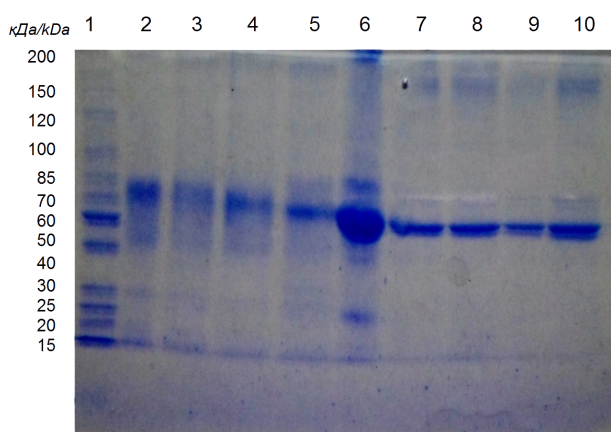


Рис. 1. Електрофоретичне розділення СЗП на різних етапах очищення FVIII (денатуруючі умови) в 10 %-ному ПААГ
Fig 1. Electrophoretic separation of FFP at different stages of purification of FVIII (non-reducing condition) in 10 % PAGE

- 1 — маркерні білки (protein markers);
- 2 — свіжозаморожена плазма (fresh frozen plasma);
- 3 — супернатант після осадження BaCl_2 (supernatant after precipitation by BaCl_2);
- 4 — супернатант після сорбції білків на $\text{Al}(\text{OH})_3$ та ПЕГ 4000 (supernatant after sorption on $\text{Al}(\text{OH})_3$ and PEG 4000);
- 5 — вихідна проба для нанесення, розведена в 5 разів (the initial sample for applying, diluted 5 times);
- 6 — кріопреципітат (cryoprecipitate);
- 7 — Супернатант/сорбент Діасорб активний пурпуровий 4ЖТ (Supernatant/sorbent Active Scarlet Damask 4GT);
- 8 — Супернатант/сорбент Діасорб активний яскраво-голубий К (Supernatant/sorbent Active Bright Blue K);
- 9 — Супернатант/сорбент Діасорб Procion Gelb MXR (Supernatant/sorbent Procion Gelb MXR);
- 10 — Супернатант/сорбент Діасорб Procion Blue HB (Supernatant/sorbent Procion Blue HB)

До 2 мл кожного сорбенту, врівноваженого 50 мМ тріс-НCl буферним розчином з рН 7,4, додавали по 2 мл досліджуваного зразка. Суміш витримували за кімнатної температури протягом 2 год. Одержані результати наведені у Таблиці 2.

За рахунок проведення простого хроматографічного етапу ступінь очищення FVIII зріс приблизно в 100 разів.

Проведене електрофоретичне дослідження (Рис. 1) наочно демонструє, що інкубація супернатанту СЗП (після попереднього осадження хлоридом барію, гідроксидом алюмінію(III) та ПЕГ 4000) з досліджуваними сорбентами приводить до суттєвого зменшення домішкових білків і, як наслідок, підвищення питомої активності FVIII.

Відомо, що сучасні технології очищення препаратів плазми крові поєднують кілька етапів хроматографічного очищення. Тому ми

плануємо до процесу очищення FVIII включити ще один з етапів, а саме іонообмінну хроматографію, що дозволить нам досягнути значно вищого ступеня очищення досліджуваного білка. Поєднання ефективних хроматографічних методів виділення та очищення білків плазми крові з методами антивірусної обробки в одній технологічній схемі є надзвичайно перспективним завданням, особливо з точки зору безвідходності процесу.

Висновки

Поєднання методу попереднього фракціонування плазми крові з розробленим методом негативної афінної хроматографії на макропористих сорбентах суттєво підвищує ступінь очищення отриманого препарату FVIII. А ціла низка переваг, якими володіють кремнеземні сорбенти з синтетичними барвниками в якості лігандів, дозволяють швидко, економічно ефективно та у м'яких умовах досягти значного очищення FVIII (ступінь очищення порівняно з вихідним зразком на два порядки вищий). Наприклад, використання сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ збільшує питому активність FVIII з $0,017 \pm 0,004$ МО/мг до $1,940 \pm 0,023$ МО/мг білка.

Ця технологія може бути застосована і для виділення білків з плазми тварин.

Перспективи подальших досліджень.

З метою одержання високоочищених препаратів плазми крові сучасні технології поєднують кілька хроматографічних етапів. Ми плануємо до процесу очищення FVIII включити етапи вірусінактивації та іонообмінної хроматографії, що дозволить досягнути значно вищого ступеня очищення фактора зі значним рівнем антивірусної безпеки.

1. Orlova N. A., Kovnir S. V., Vorobiev I., Gabibov A. G., Vorobiev A. I. Blood clotting factor VIII: from evolution to therapy. *Acta Naturae*, 2013, vol. 5, no. 2, pp. 19–39.

2. Nichols T. C., Raymer R. A., Franck H. W., Merriks E. P., Bellinger D. A., De Friess N., Margaritis P., Arruda V. R., Kay M. A., High K. A. Prevention of spontaneous bleeding in dogs with haemophilia A and haemophilia B. *Haemophilia*, 2010, vol. 16, no. 3, pp. 19–23.

3. Timothy C., Nichols M. D. Lessons learned from animal models of inherited bleeding disorder.

ders. *Hematology Education*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 39–46.

4. De Waure C., Cadeddu C., Gualano M.-R., Nicolotti N., Di Nardo F., Walter R. Gestione terapeutica dell'emofilia A. *Italian Journal of Public Health*, 2011, vol. 8, no. 2, pp. 17–30. (in Italian)

5. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfusion Medicine Reviews*, 2007, vol. 21, no. 2, pp. 101–117.

6. Burnouf T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography*, 1995, vol. 664, pp. 3–15.

7. Burnouf T., Burnouf-Radosevich M., Huart J. J., Goudemand M. A highly purified factor VIII: concentrate prepared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography. *Vox Sanguinis*, 1991, vol. 60, pp. 8–15.

8. Radosevich M., Burnouf T. Affinity chromatography — fractionated and DNA-engineered plasma proteins. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 2009, pp. 1–12.

9. Clonis Y. D. Affinity separation: dye-ligands. *Encyclopedia of Separation Science. Academic Press Ltd*, London, 2000, pp. 259–265.

10. Osterman L. A. *The chromatography of proteins and nucleic acids*, Moscow, Science, 1985, 536 p. (in Russian)

11. Muller-Berghaus G., Potzsch B., Schwinn H. Method for the affinity-chromatographic purification of factor VIII. Patent US, no. 09/202,800, 2000.

12. Ro Sen S., Casoni Chiaroi M. Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: comparison between methods. *American Clinical Laboratory*, 2002, pp. 32–37.

13. Larsson P.-O. High-performance liquid affinity chromatography. *Methods in Enzymology*, 1984, vol. 104, pp. 213–223.

14. Read S. M., Northcote D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Commssie Blue G Dye-binding assay for proteins. *Analytical Biochemistry*, 1981, vol. 116, no. 1, pp. 53–64.

15. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.

16. Burnouf T., Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journual of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, vol. 49, pp. 575–586.

17. Shurko N. O., Danysh T. V., Novak V. L. The method of purification of coagulation factor VIII. Patent UA, no. 2906990, 2011. (in Ukrainian)

18. Scoups K. P. *Current protocols in protein Science*. John Wiley and Sons Inc., 1995, 3800 p.