

## ФАКТОР ЗСІДАННЯ КРОВІ VII: ВЛАСТИВОСТІ Й МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ

С. Мадич, Т. Даниш

*ДУ Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України  
вул. ген. Чупринки, 45, Львів 79044, Україна  
e-mail: SofiaM@ukr.net, dtaras2006@ukr.net*

Фактор VII використовують при кровотечах і операціях у хворих на гемофілію А або В з інгібіторами до факторів VIII або IX, а також для лікування хворих із вродженим чи набутим його дефіцитом. За походженням розрізняють плазмові та рекомбінантні препарати фактора. Для виділення й очищення препарату використовують класичні (пересадження неорганічними солями, моно- та поліспиртами, іонообмінну і гель-проникну хроматографію) та сучасні хроматографічні методи (біоспецифічну, імуноафінну хроматографію). Ми показали, що низка синтезованих нами афінних сорбентів на основі кремнеземних макропористих матриць і тріазинових барвників-лігандів ефективно та зворотно зв'язує фактор VII. За допомогою вдало підібраних умов елюції вдалося одержати високоочищений препарат цього білка. Отриманий препарат фактора FVII за чистотою і специфічною активністю аналогічний до комерційних препаратів різних виробників. Технологія виділення фактора включає також стадії антивірусної обробки за допомогою сольвент-детергентного та тиоціанатного методів.

*Ключові слова:* плазма крові, фактор зсідання VII, хроматографічні методи, сорбенти, тріазинові барвники.

Гемостаз – це комплекс фізіологічних процесів, які ведуть до припинення кровотеч. Тромбоцити, білки плазми, кровonosні судини й ендотеліальні клітини – три компоненти цього процесу, кожен з яких відіграє важливу роль. При пошкодженні тканин за нормальних умов негайно запускається механізм, який забезпечує швидке утворення згустка. Центральне місце у процесі зсідання відіграє коагуляційний каскад, серія протеолітичних перетворень, у яких певні білки плазми (або коагуляційні фактори) послідовно активуються іншими попередньо активованими факторами коагуляції. Коагуляційні фактори циркулюють як неактивні одноланцюгові зимогени й активуються розщепленням в один чи більше етапів до дволанцюгової активної форми білка [1].

Фактор VII (проконвертин; FVII) – серинова протеїназа трипсинового типу, вітамін К-залежний глікопротеїн, що синтезується в печінці у формі протеолітично неактивного одноланцюгового зимогену з молекулярною масою 50 кДа. Активується протеолітичним розщепленням в один етап по зв'язку Arg<sup>152</sup>-Phe<sup>153</sup>. У результаті утворюється активна дволанцюгова протеаза, з'єднана одним дисульфідним зв'язком (FVIIa) [2].

FVII має важливе клінічне значення як маркер ризику виникнення тромбоемболій. Порушення синтезу вітаміну К, а також вроджений чи набутий дефіцит FVII – основні чинники, що впливають на нормальне функціонування зовнішньої системи зсідання крові. Остання ініціюється тканинним тромбопластином (TF), який вивільняється внаслідок ушкодження тканин. Під його впливом утворюється активний FVIIa. Комплекс TF/FVIIa каталізує перехід факторів IX (FIX) і X (FX) у їхні активні форми (FIXa та FXa), що ініціюють коагуляцію по зовнішньому шляху. Оскільки активація FVII має локальний характер (близько до місця пошкодження), застосування концентрату фактора, за винятком окремих випадків множинних пошкоджень, не викликає системної активації зсідання крові [5].

FVII використовують при кровотечах і операціях хворих на гемофілію А або В з інгібіторами до факторів FVIII або FIX, а також для лікування хворих із дефіцитом FVII. Джерелом FVII на сьогодні є свіжозаморожена плазма, а також очищені комерційні препарати. На даний час відомо багато методів виділення FVII, які ґрунтуються на властивостях молекули даного білка. Сировиною для його одержання слугують плазма крові людини або культуральне середовище біологічного (генетично модифікованого) надпродуцента.

Для одержання FVII з плазми крові людини застосовують попередні методи фракціонування (спиртове або сольове осадження, кріопреципітацію тощо), а також низку хроматографічних методів (іоно обмінну, гель проникну, метало-хелатну, біоспецифічну хроматографію). Важливим, з точки зору безпеки, є поєднання цих технологій з методами антивірусної обробки.

Серед хроматографічних методів одержання FVII можна виділити наступні: гель-фільтрація за наявності катіонів  $\text{Cu}^{2+}$  на сорбенті Toyopearl HW-55F; гель фільтруюча хроматографія при рН 6 через Superdex 200; аніоно обмінна хроматографія при рН 6 та 9 на сорбенті Q-Sepharose Fast Flow, імуноафінне очищення при рН 6 на Sepharose 4B з моноклональними антитілами. Також часто застосовують ультрафільтрацію та діалізацію за наявності 20 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  [3,6].

У нашій лабораторії розробляються методи виділення очищених вірусінактивованих факторів зсідання крові та фібринолізу з продуктів субфракціонування плазми крові за Коном з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних носіях з біоспецифічними лігандами. Нами продемонстровані основні переваги даного типу сорбентів: висока стабільність, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації, легкість регенерації, можливість застосування високих швидкостей проведення хроматографічного процесу [4]. Використання такої технології дає можливість в один етап отримувати високоочищені терапевтичні кількості вірусінактивованих препаратів практично з утильної сировини станцій переливання крові.

#### Матеріали і методи

Фракції II + III та III плазми крові за Коном, макропористий кремнеземний носій Діасорб амінопропіловий, активні тріазинові барвники, поліетиленгліколь (ПЕГ). Визначення активності FVII проводили фотометричним методом за допомогою хромогенного субстрату S-2765 фірми Chromogenix.

Визначення активності факторів у досліджуваних зразках проводили з використанням хромогенного пептидного субстрату фірми Chromogenix S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA · 2HCl) – для прямого визначення активності фактора Ха та для двостадійного (після активації тромбопластином) визначення активності FVII. Паралельно для дослідження гомогенності отриманих препаратів проводили вертикальний електрофорез у тонкому шарі поліакриламідного гелю (Т=10 або 5-15 %, С=3,5 %) за наявності 0,1%-ного розчину додецилсульфату натрію.

У дослідженнях використовували референтні нормальні плазми, а також плазми, дефіцитні за факторами II, VII, VIII, IX та X (фірма «Corma»), набори реагентів для визначення АПТЧ («Ренам», «Технология-Стандарт», Росія), препарати «IMUNINE» (BAXTER), «NovoSeven» (Novo Nordisk A/S), набір білкових молекулярних маркерів PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, Литва).

Інші реактиви кваліфікації «чда» та «хч» вітчизняного виробництва.

#### Результати і їхнє обговорення

Наші попередні дослідження показали можливість і достатню ефективність застосування кремнеземних носіїв із лігандом Активним яскраво-голубим для виділення й

очищення тромбіну та фактора зсідання IX. Оскільки фактор зсідання VII, як і попередні виділені ферменти, є сериною протеїназою трипсинового типу, логічною є необхідність провести дослідження по можливості застосування кремнеземних носіїв із тріазиновими барвниками-лігандами для його виділення та очищення.

Фракції плазми II + III чи III за Коном містять II, VII, VIII, IX, X та XI фактори зсідання крові, протеїн С, протеїн S, фактор фон-Віллебранда та ін. В Україні вони є, фактично, утильним матеріалом Центрив з переробки донорської крові. У нашій лабораторії створені технології виділення деяких факторів зсідання крові з цієї сировини. Ці технології включають попереднє фракціонування з використанням іонного переосадження, ПЕГ-розділення, а також подальший етап афінної хроматографії з використанням кремнеземних макропористих сорбентів.

Створена лабораторна схема одержання очищеного фактора зсідання VII, яка включає етапи сольового та ПЕГ-переосадження, одержання концентрату протромбінового комплексу, його активацію тромбопластин-кальцієвою сумішшю, та безпосереднє очищення фактора методом афінної хроматографії на макропористому кремнеземному сорбенті з лігандом – активним тріазиновим барвником.

Серед важливих властивостей тріазинових барвників-лігандів для афінної хроматографії слід виділити такі: всі вони водорозчинні, швидко та міцно (ковалентно) зв'язуються з хроматографічною матрицею, надлишок незв'язаного барвника легко відмивається кількакратним промиванням сорбенту розчином з високою іонною силою та гідрофобністю.

Нами показано, що іммобілізований на кремнеземній матриці Активний яскраво-голубий достатньо міцно зв'язує вищенаведені ферменти. Елюція цих протеїназ здійснюється специфічно, внаслідок чого ми одержуємо високоочищені препарати. Нами зроблено висновок, що даного типу сорбент може бути придатним для виділення й очищення інших факторів – протеїназ трипсинового типу з різної сировини, до яких належить також фактор VII.

Визначення вмісту фактора VII у різних субфракціях плазми крові, а також у концентраті ППСБ з метою виявлення найкращої сировини для його біоспецифічного виділення – одне з основних завдань наших досліджень. Іншим важливим фрагментом даної роботи є створення технології його виділення та очищення з цієї сировини.

Застосування хроматографії на кремнеземних сорбентах із лігандами – активними барвниками – можна рекомендувати як універсальний метод (основний чи додатковий) для виділення й очищення білкових факторів, котрий легко може поєднуватися з методами фракціонування і антивірусної обробки. Так, ми продемонстрували, що при використанні ефективного для видалення оболонкових вірусів (гепатиту В та С, вірусу імунодефіциту людини) сольвент-детергентного методу, наступний етап біоспецифічної хроматографії на барвник-кремнеземних сорбентах, крім специфічного виділення необхідного фактора, дає змогу легко видалити домішки розчинника три(н-бутил)фосфату і детергенту Тритону X-100 чи Твін-80.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гжегоцький М.Р., Заячківська О.С.* Система крові. Фізіологічні та клінічні основи. Львів, 2001. С. 92 – 101.
2. *Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І.* Біохімія людини. Тернопіль, 2002. С. 574 – 580.
3. *Broze G.J., Majerus P.W.* Purification and properties of human coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.* 1980, Vol. 255. P. 1242 – 1247.
4. *Madych S., Danysh T.* Selection and purification of blood clotting factor VII suitable for therapeutic and treatment purposes // *Thrombosis Research.* 2010. Vol. 125. Suppl. 2. P. S187.

5. *Patthy L.* Evolutionary assembly of blood – coagulation proteins // *Semin. Thromb. Hemost.* 1990. Vol. 16, P. 245 – 259.
6. *Sproule K. et al.* New strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography. *J. Chromatogr.* 2000. Vol. 740. P. 17-33.

*Стаття: надійшла до редакції 31.07.16*

*доопрацьована 31.08.16*

*прийнята до друку 1.09.16*

## **BLOOD CLOTTING FACTOR VII: PROPERTIES AND METHODS OF OBTAINING**

**S. Madych, T. Danysz**

*State Institution «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of National Academy Science of Ukraine»*

*45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine*

*e-mail: SofiaM@ukr.net, dtaras2006@ukr.net*

Factor VII is used in cases of bleeding and operations of patients with haemophilia A or B with inhibitors to VIII or IX and for treatment of patients with the acquire and inherit deficit of VII. We have shown that the row of newly synthesized sorbents effectively links factor VII. With the help of accurate conditions of elution highly-purified preparation of this protein was successfully selected. The received preparation of VII according to its cleanliness and specific activeness is analogical to commercial preparations of different producers. Technology of selection of preparation includes the stages of anti-virus treatment.

*Keywords:* blood plasma, blood clotting FVII, chromatographic methods, sorbents, triazine dyes.

## **ФАКТОР СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII: СВОЙСТВА И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ**

**С. Мадич, Т. Даныш**

*ДУ Государственное учреждение «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины»*

*ул. ген. Чупринки, 45, Львов 79044, Украина*

*e-mail: SofiaM@ukr.net, dtaras2006@ukr.net*

Фактор VII используют при кровотечениях и операциях у больных гемофилией А или В с ингибиторами к факторам VIII или IX, а также для лечения больных с врожденным и приобретенным дефицитом фактора VII. Мы показали, что ряд синтезированных нами сорбентов эффективно связывает фактор VII. С помощью удачно подобранных условий элюции удалось получить высокоочищенный препарат этого белка. Полученный препарат фактора FVII по чистоте и специфической активности аналогичен коммерческим препаратам различных производителей. Технология выделения фактора включает также стадии антивирусной обработки.

*Ключевые слова:* плазма крови, фактор свертывания VII, хроматографические методы, сорбенты, триазиновые красители.