

## ФРАКЦІОНУВАННЯ ПЛАЗМИ КРОВІ: КЛАСИЧНІ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ФАКТОРА VIII ЗГОРТАННЯ КРОВІ

Н. Шурко

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна  
e-mail: natalia\_shurko@ukr.net*

Процес згортання крові являє собою послідовність хімічних реакцій за участю білків плазми, фосфоліпідів та іонів кальцію. Відсутність будь-якого з цих факторів приводить до виникнення кровотеч. Фактор VIII (FVIII) є одним із факторів згортання крові, а його дефіцит викликає розвиток спадкового захворювання, відомого як гемофілія А. Сучасне лікування гемофілії А полягає у застосуванні препаратів фактора плазмового або рекомбінантного походження. Мета роботи – розробити технологічну схему отримання препарату FVIII згортання крові в поєднанні класичних методів фракціонування плазми та хроматографії. Фракціонування плазми крові на сьогоднішній день є найбільшим сегментом промислового виготовлення терапевтичних білків. Це зумовило появу нового покоління препаратів, особливо факторів згортання крові. У статті описано результати очищення FVIII в поєднанні методів преципітації білків (з барій цитратом, ПЕГ-4000 та гідроксидом алюмінію) і двох хроматографічних етапів: іонообмінної на DEAE-SEPHAROSE й афінної на Діасорб-амінопропілової матриці з тріазиним барвником Procion Blue HB у ролі ліганда. Ми показали, що поєднання попереднього фракціонування плазми крові з хроматографічними методами дає змогу досягнути високого рівня очищення (приблизно в 1000 разів, від  $0,017 \pm 0,004$  МО/мг білка до  $20,050 \pm 0,047$  МО/мг білка).

*Ключові слова:* плазма крові, фракціонування, хроматографія, тріазинові барвники, фактор VIII згортання крові.

Кров людини – рідка сполучна тканина, що містить клітинні елементи (еритроцити, лейкоцити і тромбоцити) та плазму. Плазма – вихідний біологічний матеріал, що складається з численних білків, які виконують різноманітні функції [4]. Загальний вміст білка плазми становить 60 г/л, із яких 95 % використовується для отримання терапевтичних препаратів для клінічного використання [6], що часто виступають єдиним доступним варіантом для профілактики та лікування небезпечних для життя травм, вроджених вад, імунологічних розладів або інфекцій [5]. Так, для лікування гемофілії А (рецесивного генетичного захворювання, пов'язаного з X-хромосомою та частотою виникнення приблизно 1 випадок на 5000 чоловіків) необхідна наявність препаратів FVIII.

Перші системи білкового поділу базувались на хімічних або фізичних засобах преципітації з використанням сульфату амонію, каприлової кислоти, етанолу, поліетиленгліколю (ПЕГ), варіації рН/температури та ін. [3]. Класичний метод фракціонування з використанням етанолу, розроблений Коном та співавторами, залишається основним серед тих, що використовуються у технологічній схемі виробництва препаратів із плазми крові. Цей метод здійснюється у відповідності з дотриманням концентрації етанолу, рН, температури, іонної сили, осмомолярності, що призводить до селективного осадження білків, наприклад, факторів згортання крові, імуноглобуліну G (Ig G) і альбуміну [7].

Для покращення аналітичних характеристик продукту в процес виробництва препаратів плазми крові, зокрема FVIII, 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 [3].

Метою нашої роботи було розробити технологічну схему отримання високоочищеного вірусбезпечного препарату FVIII згортання крові в поєднанні класичних методів фракціонування плазми та сучасних хроматографічних методів.

#### Матеріали та методи

Вихідним матеріалом була свіжозаморожена плазма з активністю FVIII 1 МО/мл. Визначення активності фактора VIII здійснювали уніфікованим одностадійним коагулологічним методом [8]. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250. Синтез сорбентів з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили методикою «з включенням солі» при лужних значеннях рН.

Фракціонування плазми крові проводили поетапно осадженням білків протромбінового комплексу (ППСБ) цитратом барію та їх сорбції на гідроксиді алюмінію (III), відділенням фібриногену, фібронектину та домішкових білків на ПЕГ-4000 та проведенням подвійної вірусної інактивації на етапах хроматографії.

#### Результати і їхнє обговорення

Запропонована нами блок-схема (див. рисунок) передбачає фракціонування плазми крові за допомогою проведення класичних методів осадження білків і двох хроматографічних етапів: іонообмінної на DEAE-SEPHAROSE й афінної на кремнеземних сорбентах з використанням тріазинових барвників у ролі лігандів.

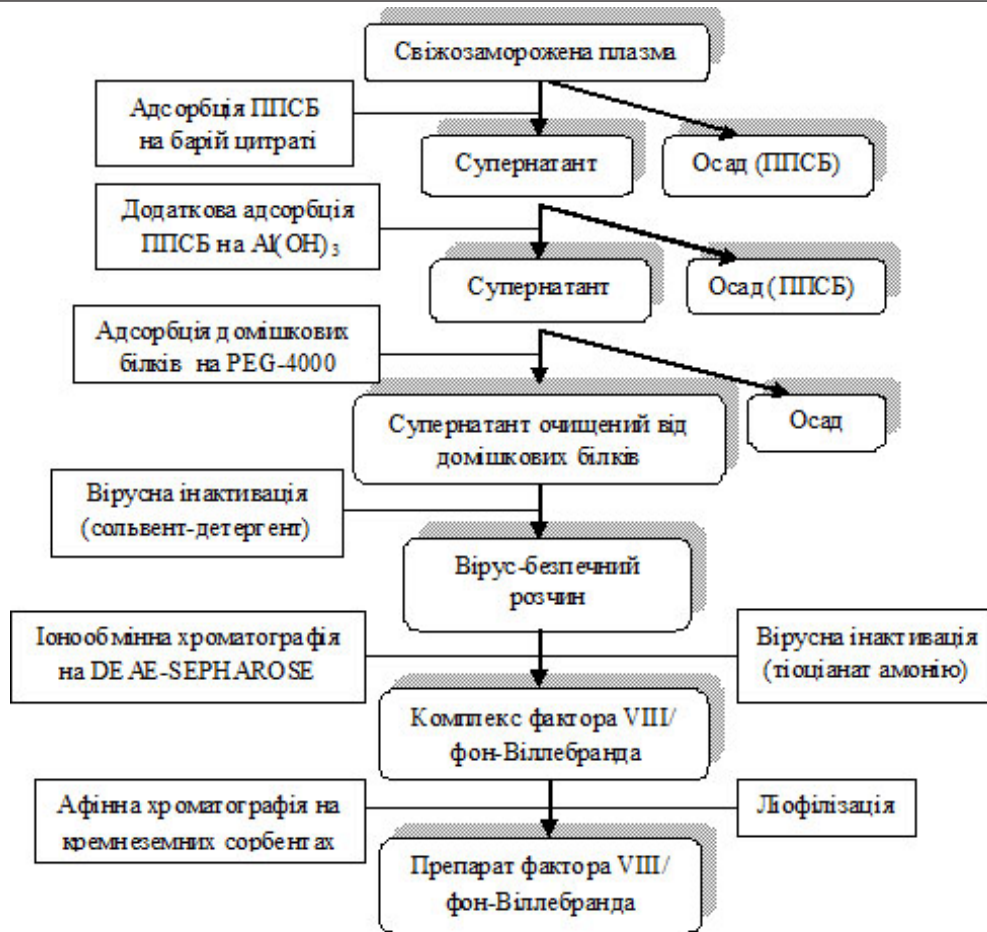
Згідно з нашими дослідженнями, серед носіїв, що використовуються для хроматографічного виділення й очищення білкових препаратів, достатньо ефективними є макропористі кремнеземні матриці з регульованим розміром пор. Вони досить жорсткі, хімічно інертні, термостійкі, а хроматографічні сорбенти на їхній основі легко регенеруються, витримують високу швидкість пропускання розчинів із достатньою специфічною ємністю щодо досліджуваних білків, не піддаються гідролізові мікроорганізмами [1].

Барвники-ліганди розглядаються як альтернатива природних аналогів для специфічної афінної хроматографії. Ці ліганди здатні зв'язувати більшість типів білків, вони комерційно доступні, недорогі та можуть бути легко іммобілізовані на матрицях. Вони взаємодіють з активними центрами багатьох білків, імітуючи структуру субстратів, кофакторів або рецепторів. Більшість із цих активних барвників складається з хромофора (або азобарвників, антрахінону, фталоціаніну), пов'язаного з реактивною групою (часто моно- або дихлортріазиновим кільцем). Взаємодія ліганд-барвника з білком може бути складним поєднанням електростатичних, гідрофобних і водневих зв'язків [7].

Попередні наші дослідження [2] продемонстрували, що FVIII не сорбувався з жодним із цих сорбентів, причому його питома активність зростала (явище негативної афінної сорбції). Для даного дослідження ми використали сорбент Procion Blue HB.

За рахунок проведення фракціонування плазми крові нами досягнуто зростання питомої активності FVIII з  $0,017 \pm 0,004$  МО/мг білка до  $20,050 \pm 0,047$  МО/мг білка.

**Висновок.** Розроблена нами схема очищення FVIII передбачає поєднання класичних методів попереднього фракціонування плазми крові з хроматографічними, що суттєво підвищує ступінь очищення отриманого препарату. Переваги, які мають кремнеземні сорбенти з тріазиновими барвниками в ролі лігандів, дають змогу швидко, економічно ефективно та в м'яких умовах досягти значного очищення FVIII (ступінь очищення порівняно з вихідним зразком на три порядки вищий).



Блок-схема отримання препарату фактора VIII згортання крові

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пат. 24182 UA, C12N 9/96, A61K 38/02. Спосіб виділення та очищення тромбіну / Магеровський Ю.В., Брагінець О.Г., Шурко Н.О. та ін. // Заявл. 09.01.2007; Опубл. 25.06.2007 Бюл. № 9, 2007.
2. Пат. 94299 UA, C07K 1/22, 14/75. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л. // Заявл. 03.07.2009; Опубл. 26.04.2011; Бюл. № 8, 2011.
3. Шурко Н.О., Даниш Т.В. Створення технології отримання фактора VIII згортання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних носіях // Біологія тварин. 2016. Т.18. № 2. С. 152-159.
4. Burnouf T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends // Journal of Chromatography. 1995. Vol. 664. P. 3-15.
5. Burnouf T. Modern plasma fractionation // Transfusion Medicine Reviews. 2007. Vol 21. № 2. P. 101-117.

6. Denizli A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification // Hacettepe J. Biol. & Chem. 2011. Vol. 39. № 4. P. 315–341.
7. Denizli A., Pişkin E. Dye-ligand affinity systems // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. Vol. 49 (1-3). P. 391-416.
8. Ro Sen S., Casoni Chiarion M. Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: comparison between methods // American Clinical Laboratory. 2002. P. 32-37.

*Стаття: надійшла до редакції 30.06.16  
доопрацьована 1.09.16  
прийнята до друку 62.09.16*

## FRACTIONATION OF BLOOD PLASMA: CLASSIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR COAGULATION FACTOR VIII RECEIVING

**N. Shurko**

*State Institution «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine  
of National Academy Science of Ukraine»  
45, General Chuprynka St., 79044 Lviv, Ukraine  
e-mail: natalia\_shurko@ukr.net*

Blood coagulation is a sequential process of chemical reactions involving plasma proteins, phospholipids and calcium ions. Absence of any of these factor leads to bleeding disorders. Factor VIII (FVIII) is one of the blood clotting factor and it deficient causing development of bleeding disorders known as haemophilia A. The modern treatment of haemophilia A is the use of plasma or recombinant concentrates. The aim: to develop the technological scheme of obtaining of human coagulation FVIII from plasma in a combination by the method of plasma fractionation and chromatography. Nowadays, plasma protein fractionation is by far the largest industry segment in global therapeutic protein manufacture. This has led to the emergence of a new generation of products derived blood, especially of factor coagulation. The article presents the results of purification blood coagulation FVIII that is a combination of the method of protein precipitation (with barium citrate, PEG-4000 and aluminium hydroxide) and two chromatography steps: ion exchange on DE-AE-SEPPAROSA and affinity on the Diasorb-aminopropyl matrix with triazine active dye Procion Blue HB as ligand. We have shown that the combination of previous fractionation of plasma with method of chromatography can achieve high purity factor VIII (about 1000 times, from  $0,017 \pm 0,004$  IU/mg protein to  $20,050 \pm 0,047$  IU/mg protein).

*Keywords:* plasma of blood, fractionation, chromatography, triazine dyes, blood coagulation factor VIII.

**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ: КЛАССИЧЕСКИЕ  
И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ  
ФАКТОРА VIII СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

**Н. Шурко**

*ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной  
медицины АМН Украины»*

*ул. Генерала Чупрынки, 45, Львов 79044, Украина*

*e-mail: natalia\_shurko@ukr.net*

Процесс свертывания крови представляет собой последовательность химических реакций с участием белков плазмы, фосфолипидов и ионов кальция. Отсутствие любого из этих факторов приводит к возникновению кровотечений. Фактор VIII (FVIII) является одним из факторов свертывания крови, и его дефицит вызывает развитие наследственного заболевания, известного как гемофилия А. Современное лечение гемофилии А состоит в применении препаратов фактора плазменного или рекомбинантного происхождения. Цель работы – разработать технологическую схему получения препарата FVIII свертывания крови в сочетании классических методов фракционирования плазмы и хроматографии. Фракционирование плазмы крови на сегодняшний день является крупнейшим сегментом промышленного изготовления терапевтических белков. Это привело к появлению нового поколения препаратов, особенно факторов свертывания крови. В статье описаны результаты очистки FVIII объединением методов преципитации белков (с барий цитратом, ПЭГ-4000 и гидроксидом алюминия) и двух хроматографических этапов: ионообменной на DEAE-SEPHA-ROSE и аффинной на Диасорб-аминопропиловой матрице с триазиновым красителем Procion Blue HB в роли лиганда. Мы показали, что сочетание предварительного фракционирования плазмы крови с хроматографическими методами позволяет достичь высокого уровня очистки (приблизительно в 1000 раз; с  $0,017 \pm 0,004$  ME / мг белка до  $20,050 \pm 0,047$  ME / мг белка).

*Ключевые слова:* плазма крови, фракционирование, хроматография, триазиновые красители, фактор VIII свертывания крови.