

УДК 612.151-083:616.151-056.7

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ З КРЕМНЕЗЕМНИМИ СОРБЕНТАМИ РІЗНОЇ ПОРИСТОСТІ

Н. Шурко*, Т. Даниш

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

Препарати фактора VIII зсідання крові використовуються у лікуванні пацієнтів з гемофілією А та хворобою Віллебранда. Фактор VIII отримують безпосередньо з плазми крові людини з використанням хроматографічних методів. Очищення білка методом афінної хроматографії засноване на оберненій взаємодії між білком і афінним лігандом, з'єднаним з хроматографічною матрицею. Традиційно, роль матриці в афінній хроматографії відіграють пористі матеріали, такі як агароза, поліметакрилат, поліакриламід, целюлоза та кремнезем. Під час вибору матеріалу матриці хроматографічного сорбенту необхідно враховувати кілька факторів: однорідність, гідрофільність, хімічну та механічну стабільність, селективність, високу адсорбційну ємність, розмір частинок і пор. Продемонстровано ефективність застосування барвник-лігандної афінної сорбції з використанням кремнеземного носія для виділення й очищення фактора VIII зсідання крові. У статті представлено результати досліджень сорбції фактора VIII з хроматографічним сорбентом Діасорб-амінопропіл-Procion blue NB з різним розміром пор (250, 500, 750 та 1500 Å). Сорбент із розміром пор 750 Å виявився найкращим для очищення фактора VIII зсідання крові. Очищення фактора відбувалося завдяки явищу негативної афінної сорбції. Питома активність очищеного фактора зростала приблизно втричі.

Ключові слова: фактор VIII зсідання крові, афінна хроматографія, тріазинові активні барвники, макропориста кремнеземна матриця

У процесі вдосконалення виготовлення плазмових похідних із використанням хроматографічних методів очищення розвинулася нова генерація терапевтичних препаратів, а саме факторів зсідання крові (VII, VIII та IX), інгібіторів протеаз тощо [9, 13, 15]. Хроматографічне очищення фактора VIII (FVIII) – один із технологічно найважчих процесів через потенційний ризик його активації та нестабільності за наявності протеаз плазми крові [8].

Для отримання сучасних препаратів FVIII широко використовують аніонообмінну, гель-проникну й афінну хроматографії. З точки зору ефективності афінна хроматографія найбільш придатна для цієї мети.

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 в хроматографічному процесі, відсутність неспецифічної адсорбції тощо), пред'являються додаткові вимоги: макропористість і наявність реактивних хімічних груп (аміно-, гідроксильних, епоксидних), що дають змогу за допомогою нескладної хімічної реакції ковалентно прив'язувати різноманітні біологічні молекули (ліганди та спейсери) [5].

Біоспецифічні ліганди іммобілізують на інертному, переважно сферичному матеріалі-носії. Прикладами відповідних матриць є неорганічні носії, такі як силікагель, силікати чи пористе скло, або органічні, такі як поперечно-зшиті полісахариди, наприклад, целюлоза, похідні целюлози, декстрини або модифікована агароза. Кращим носієм є Sepharose® – матеріал на основі модифікованої агарози, полісахаридні ланцюжки якої утворюють тривимірну структуру [5]. Неорганічні носії мають низку переваг над органічними: легко регенеруються, їм можна надати будь-якого вигляду (порошок, кульки, частки неправильної форми, моноліт або пористий матеріал, що утворює багатоканальну систему). Найчастіше з неорганічних носіїв використовують макропористі кремнеземи (силікагелі, силохроми та макропористе скло).

Кремнеземні носії зручні у роботі, однак мають суттєві недоліки: підвищену розчинність у лужному середовищі та неспецифічну адсорбцію ферментів. З метою зниження розчинності цих носіїв використовують різні модифікуючі агенти, що дає змогу цілеспрямовано змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв [10]. Для зменшення неспецифічної сорбції кремнеземних носіїв, що містять вільні силанольні групи, проводять їхню обробку (силанізацію), найчастіше γ -амінопропілтриетоксисиланом, γ -гідроксипропілтриетоксисиланом чи триетоксипропілгліцидоксисиланом (рис. 1) [4].

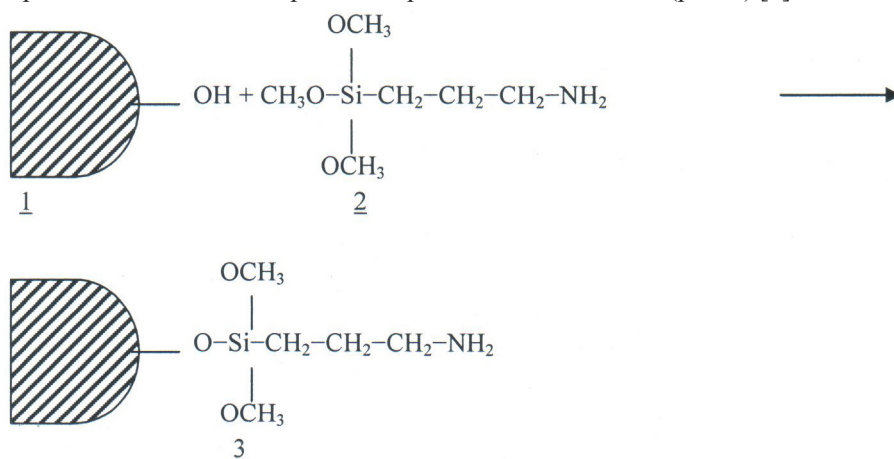


Рис. 1. Загальна схема одержання Діасорбу-амінопропілового: 1 – Діасорб; 2 – γ -амінопропілтриетоксисилан; 3 – Діасорб-амінопропіловий

Нами протягом тривалого часу на практиці застосовуються макропористі сорбенти на основі кремнезему як матриця для виділення й очищення білкових факторів плазми крові, зокрема, факторів протромбінового комплексу [1, 2].

За цей час нами продемонстровано основні переваги даного типу сорбентів: висока стабільність, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації, легкість регенерації, можливість застосування високих швидкостей проведення хроматографічного процесу [3].

Серед афінних лігандів є поділ на органічні (субстрати, коферменти, гормони, лектини, кофактори, антитіла, нуклеїнові кислоти, ефектори, інгібітори тощо) та неорганічні. Особливу групу серед таких лігандів займають тріазинові барвники, що являють собою синтетичні гідрофільні молекули з реактивним (хлортріазиновим) фрагментом, за допомогою якого вони можуть приєднуватися до різних полімерних носіїв [10].

Барвник-лігандна біоспецифічна хроматографія розроблена як важливий спосіб очищення білка, оскільки має низку переваг над іншими формами афінної хроматографії, а саме: дешевизна, доступність, легкість іммобілізації, відносна стабільність до дії біологічних і хімічних чинників, легкість регенерації, висока адсорбційна ємність тощо [11]. У літературі достатньо широко опубліковані дані про застосування активних тріазинових барвників як лігандів для хроматографічного виділення й очищення білків [14]. Світовими лідерами з випуску тріазинових барвників є компанії: Ciba Ltd. (Cibacron) та ICI (Imperial Chemical Industries або Procion). Cibacron та Procion H – монохлортріазинові барвники. Основною відмінністю між Cibacron і Procion H є положення сульфогрупи в аніліновому кільці (*орто*- в Cibacron і *мета*- чи *пара*- в Procion H серії).

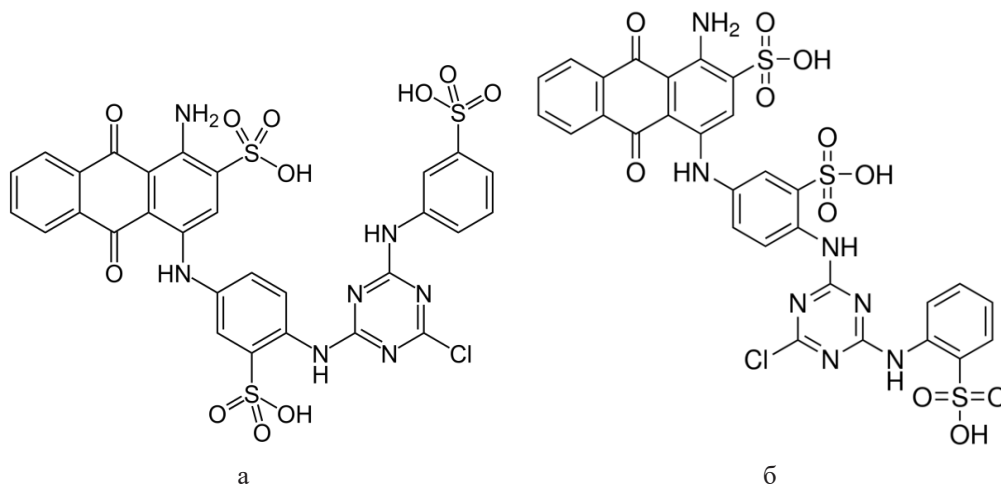


Рис. 2. Структурні формули Procion blue HB (а) та Cibacron Blue 3G-A (б)

Аналогом барвника Procion blue HB є вітчизняний барвник Активний яскраво-голубий К («Барва», Івано-Франківськ). У нашій лабораторії проведено низку порівняльних досліджень стосовно використання саме цих двох барвників у ролі афінних лігандів факторів протромбінового комплексу [3].

Метою нашої роботи було дослідити кремнеземні сорбенти різної пористості з лігандом Procion blue HB та визначити оптимальний для виділення FVIII зсідання крові.

Матеріали та методи

Як вихідний матеріал використали препарати FVIII «Кріопреципітат» (одержаний згідно з [18]) та «Immunate» (Baxter, Австрія). Визначення активності FVIII проводили уніфікованим одностадійним коагулогічним методом за часом зсідання фібриногену в суміші, що містила дефіцитну по фактору плазму (вміст фактора менше 1 %), розведену досліджувану рідину й АСТІN-реагент (Helena, Великобританія), за наявності іонів кальцію [16].

Для синтезу сорбентів застосовували кремнезем Діасорб-амінопропіловий (БиоХимМак-Ст, Росія) з розміром пор 250, 500, 750 та 1500 Å і тріазиновий барвник Procion Blue HB («Acros Organics», Бельгія). Синтез матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками проводили методикою «з включенням солі» за лужних значень рН [2].

Для цього до 5 см³ сухого Діасорбу-амінопропілового додавали 6,5 мл водного розчину (10 мг/мл) барвника. Через 20 хв додавали 2,5 мл 5 М NaCl, а ще через 90 хв 1,25 мл 5 М розчину K₂CO₃ (рН~10,5). Витримували 48 год за температури 45 °С. Відмивали сорбенти дистильованою водою, 4 М KCl, ізопропанолом, 6 М сечовиною, дистильованою водою.

Дослідження сорбції-десорбції FVIII проводили batch-методом: до 2 мл сорбенту, врівноваженого 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином (рН 7,4), додавали по 2 мл розчину досліджуваного препарату (в одному випадку – «Кріопреципітат», а в іншому – «Immunate»). Для вимірювань відбирали проби до сорбції та через 60 хв після нанесення зразка. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250 [14]. Як стандарт використовували альбумін великої рогатої худоби (ВРХ).

Результати і їхнє обговорення

Можливість адсорбції макромолекули на хроматографічному сорбенті залежить не лише від вибору афінного ліганду, але й від природи носія. Інтенсивність процесу адсорбції визначається розміром, кількістю й конфігурацією пор [10, 11].

Оскільки об'єктом нашого дослідження FVIII є доволі велика білкова молекула ($M_r=330$ кДа), наш вибір був зроблений саме на користь макропористих кремнеземних сорбентів. Сорбент з оптимальним розміром пор для очищення FVIII підбирали експериментально. Досліджували сорбційні властивості синтезованих нами сорбентів стосовно FVIII. Для моделювання процесу сорбції FVIII як вихідну сировину використали комерційний препарат фактора «Immunate», що, крім досліджуваного білка, містить як стабілізатор лише альбумін людини. Крім того, для дослідження можливості використання даного типу сорбенту в процесі очищення FVIII ми провели аналогічне дослідження із Кріопреципітатом, де вплив інших білків на сорбцію досліджуваного фактора є значним.

Наші дослідження показали, що FVIII не зв'язувався зі синтезованими сорбентами (явище негативної афінної сорбції) [6, 17]. При цьому питома активність фактора зростала. Найкращий вихід по питомій активності для FVIII в обох випадках ми досягли на сорбенті з розміром пор 750 Å (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Результати очищення FVIII з Кріопреципітату на кремнеземних сорбентах із різним розміром пор ($M \pm m$; $n=5$)

Параметр	Нанесення	Діасорб 250	Діасорб 500	Діасорб 750	Діасорб 1500
Активність FVIII, МО/мл	1,65±0,07	1,27±0,07	1,14±0,05	0,09±0,04	1,16±0,057
Концентрація білка, мг/мл	26,02±0,13	20,02±0,06	12,58±0,10	6,55±0,06	13,60±0,02
Питома активність FVIII, МО/мг білка	0,06±0,03	0,06±0,03	0,09±0,04	0,14±0,05	0,09±0,04
Ступінь очищення, разів		1,03	1,38	2,17	1,34

Таблиця 2

Результати очищення FVIII з препарату «Immunate» на кремнеземних сорбентах із різним розміром пор ($M \pm m$; $n=5$)

Параметр	Нанесення	Діасорб 250	Діасорб 500	Діасорб 750	Діасорб 1500
Активність FVIII, МО/мл	10,28±0,42	5,25±0,32	6,05±0,22	8,15±0,33	7,6±0,31
Концентрація білка, мг/мл	0,50±0,02	0,20±0,01	0,21±0,01	0,12±0,04	0,39±0,01
Питома активність FVIII, МО/мг білка	20,66±0,64	26,60±0,99	28,70±0,81	67,20±0,90	19,54±0,94
Ступінь очищення, разів		1,23	1,39	3,25	0,95

Сорбенти з меншим розміром пор (250 та 500 Å) є малоефективними для очищення фактора, оскільки вони не дають відділити нецільові білки від бажаного. Це узгоджується з літературними даними [7], згідно з якими для кремнеземних сорбентів з діаметром пор 440-650 Å межа ексклюзії по декстрану різної молекулярної маси становить 150–350 кДа. Оскільки основні білки, що входять до складу Кріопреципітату, – це високомолекулярні фібриноген ($M_r=330$ кДа), фібронектин ($M_r=450$ кДа) і фактор фон Віллебранда

(M_r=310 кДа) [18], ми не досягли відповідного ступеня очищення FVIII на сорбентах з розміром пор 250 та 500 Å, хоча і відбувається часткове зв'язування цих білків на зовнішній поверхні хроматографічних сорбентів (незначне збільшення питомої активності FVIII).

Молекулярна маса сироваткового альбуміну людини (ЛСА) становить приблизно 70 кДа. Так, у роботі А. Denizli відмічено, що оптимальна його сорбція відбувається на поліамідному сорбенті з Cibacron Blue F3GA з розміром пор 400 Å при рН 5,0 [12]. Ізоелектрична точка ЛСА становить 4,64. Очевидно, що в даній технології сорбція альбуміну досягається за рахунок гідрофобних взаємозв'язків. У той же час, за більших значень рН (7,4 у нашому дослідженні) використання цього ліганду дає інші типи взаємодії, скоріш за все, змішаного характеру (іонний, гідрофобний, біоспецифічний тощо) [2].

У випадку сорбенту з розміром пор 1500 Å питома ефективна площа зв'язування (концентрація ліганду) є менша. Для порівняння питома активність кремнеземної матриці з розміром пор 750 Å становить 0,47 мМоль/г, а для 1500 Å – 0,37 мМоль/г. Зменшення концентрації ліганду приводить до зменшення сорбційної ємності сорбенту. Відповідно, ефективність такого сорбенту менша, порівняно зі сорбентом з пористістю 750 Å.

Досліджено сорбційні властивості кремнеземних сорбентів стосовно FVIII з'єднання крові. Найвищий ступінь очищення досліджуваного фактора досягається на кремнеземному сорбенті з розміром пор 750 Å. При цьому встановлено, що очищення фактора досягається завдяки явищу негативної афінної сорбції.

Отже, кремнеземні сорбенти з розміром пор 750 Å із лігандом Procion Blue успішно можуть використовуватись у технології отримання високоочищеного препарату FVIII.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Вус М. М. Синтез та вивчення властивостей афінних сорбентів, придатних для виділення та очищення протеїназ із плазми крові // Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. 2008. Вип. 34. Т. 2. С. 83–87.
2. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., Шурко Н. О. Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами – активними барвниками тріазинового ряду // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Т. 47. С. 63–69.
3. Даниш Т. В. Застосування хроматографічних сорбентів з біоімітуючими лігандами для одержання діагностичних та терапевтичних білкових препаратів // Гематологія і переливання крові: міжвід. зб. 2008. Вип. 34. Т. 2. С. 79–83.
4. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Афинная хроматография: методы. М.: Мир, 1988. 278 с.
5. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
6. 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.
7. Туркова Я. Афинная хроматография. М.: Мир, 1980. 472 с.
8. 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.
9. Cheng E. Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography // J. Blood Disord Transfusion. 2016. Vol. 7. (4). P. 82.
10. Clonis Y. D. Dye Ligands. Affinity separation. 2000. P. 259–265.
11. Denizli A., Pişkin E. Dye-ligand affinity systems // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. Vol. 30. 49(1–3). P. 391–416.
12. Denizli A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification // Hacettepe J. Biology and Chemistry. 2011. Vol. 39 (4). P. 315–341.

13. Pat. EP 1885486 B1. Affinity adsorbents for factor VIII and von Willebrand's factor / Jason R. B., Badley S.; CA2607858A1, CA2607858C; Filed: April 09.05.2006; Publ. 23.03.2016.
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 // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 116 (1). P. 53–64.
15. Rodrigues S., Verinaud C. I., Oliveira D. S. et al. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015. Vol. 62. N 3. P. 343–348.
16. Ro Sen S., Casoni Chiaroi M. Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: comparison between methods // *Am. Clin. Lab.* 2002. P. 32–37.
17. Scoups K. P. Current protocols in protein science. 1995. 3800 p.
18. Sparrow R. L., Greening D. W., Simpson R. J. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 728. P. 259–265.

Стаття: надійшла до редакції 22.03.17

доопрацьована 06.09.17

прийнята до друку 15.09.17

STUDY OF COAGULATION FACTOR VIII SORPTION WITH SILICA SORBENTS OF DIFFERENT PORE SIZE

N. Shurko, T. Danysh

*SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine, NAMS»
45, Gen. Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

The coagulation factor VIII concentrates are used in the treatment of patients with Hemophilia A and Von Willebrand disease. Human FVIII was purified directly from plasma using different methods of chromatography. The separation of a proteins using affinity chromatography relies on the reversible interactions between the protein to be purified and the affinity ligand coupled to chromatographic matrix. Traditionally, affinity chromatography support sorbents have consisted of porous support materials such as agarose, polymethacrylate, polyacrylamide, cellulose, and silica. Regardless of the type of sorbents used in the affinity purification, several factors must be considered when choosing a matrix material should be uniform, hydrophilic, chemically and mechanically stable, hydrophilic, and selective and should also exhibit high adsorption capacity, pore size, and particle size. The paper describes studies of sorption factor VIII on chromatographic sorbents Diasorb aminopropyl-Procion Blue HB with different size of pore. As a result of this work we have selected of sorbent with size of pore 750 Å for the best for purification of factor coagulation VIII. The purification of factor took place due to the phenomenon of negative affinity chromatography. The specific activity increased approximately threefold.

Keywords: blood coagulation factor VIII, affinity chromatography, triazine active dyes, macroporous silica matrix