

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ АФФИННЫХ НОСИТЕЛЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К БЕЛКУ АНТИТРОМБИНУ III

*М.А. Ажигирова, зав. отделом экспериментальных технологий, Т.Л. Дереза, старший научный сотрудник, *И.С. Кряжевских, аспирант, Н.В. Сергеева, научный сотрудник, *В.И. Швеи, заведующий кафедрой
*кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
Гематологический научный центр РАМН
e-mail: kr-ira@blood.ru*

С

Статья посвящена изучению сорбционных свойств аффинных носителей по отношению к белку антитромбину III. Установлено, что емкость сорбента Toyopearl AF-Heparin значительно выше, чем емкость Heparin-Sepharose FF. Сорбция проводилась batch-методом при комнатной температуре и постоянном перемешивании, а специфическая активность антитромбина III оценивалась амидолитическим методом с помощью хромогенного субстрата. Полученные данные могут быть использованы для разработки колонного хроматографического способа выделения антитромбина III из плазмы донорской крови.

This paper reports the chromatographic properties of affinity resins in respect of protein antithrombin III. The capacity of resin Toyopearl AF-Heparin was found to be higher than that of resin of Heparin-Sepharose FF. Sorption was carried out by the batch method at room temperature and constant stirring. The specific activity of antithrombin III was estimated by the amidolytic method with the use of a chromogenic substrate. The obtained results can be used for the development of column chromatographic method of isolation of antithrombin III from human plasma.

Ключевые слова: антитромбин III, хроматографические сорбенты, белки плазмы крови.

Key words: antithrombin III, chromatographic resins, proteins of human plasma.

Антитромбин III (АТ III), белок плазмы донорской крови, играет значимую роль в поддержании баланса между свертывающей и тромболитической составляющими системы гемостаза. Сдвиг баланса в сторону тромбообразования влечет за собой тромбозы, нарушение кровотока и, как следствие, развитие в организме патологических состояний.

Роль АТ III состоит в инактивации тромбина, инициирующего образование тромба, путем связывания двух белковых молекул через активные центры на их поверхностях с образованием эквимольных комплексов [1]. Необратимая инактивация тромбина происходит в несколько этапов с переходом в конечную неактивную латентную форму.

Недостаточность содержания АТ III в организме связана с врожденным снижением его концентрации в крови или с аномалией его структуры. Приобретенное снижение активности АТ III наблюдается при ДВС-синдроме, патологии печени, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся потерей белка, гемодиализе почек. В последнее время в литературе все чаще встречаются рекомендации по использованию АТ III при пересадке искусственных органов и после инфаркта миокарда. При лечении этих заболеваний применяют препараты АТ III, выделенные из плазмы донорской крови.

Особенностью АТ III является его высокое сродство к гепарину, что и используется при разработке хроматографических методов его выделения [2–4].

Целью данной работы было сравнительное изучение сорбционных свойств двух аффинных сорбентов Toyopearl AF-Heparin HC-650M и Heparin-Sepharose FF по отношению к анти-тромбину III, который выделяли из плазмы донорской крови, обедненной факторами свертывания VIII и IX. В настоящее время такая плазма (далее ППУ, плазма после удаления факторов свертывания) используется в качестве сырья при производстве препаратов альбумина и иммуноглобулина.

Полученные результаты будут использованы при оценке возможности разработки хроматографической стадии выделения анти-тромбина III в единой технологической схеме фракционирования плазмы донорской крови.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья нами использовалась плазма донорской крови, полученная после удаления факторов свертывания VIII и IX (ППУ), содержание АТ III в которой составляло $94.5 \pm 5.8\%$ ($n=6$), концентрация общего белка – $6.1 \pm 0.4\%$ ($n=6$). Удельная активность АТ III в исходном сырье колебалась в интервале 15.6 ± 1.2 МЕ/г белка ($n=6$).

Для проведения сорбции были исполь-

зованы следующие хроматографические носители: сорбент Heparin-Sepharose FF (фирма GE Healthcare, кат. № 17-0998-25, Швеция), сорбент Toyopearl AF-Heparin HC-650M (фирма Tosoh, кат. № 20031, Япония). Для приготовления растворов использовались следующие реактивы: натрий цитрат трехзамещенный 2-х водный (фирма Fluka, кат. № 71404, Швейцария), ТРИС (гидроксиметил)аминометан (фирма Fluka, кат. № 93352, Швейцария). Для измерения специфической активности АТ III использовали набор Berichrom Antithrombin III (А) (фирма DADE Behring, кат. № OWWR 17, Германия), а также реактивы фирмы DADE Behring (Германия), а именно, стандартную человеческую плазму (кат. № ORKL 21), контрольную плазму N (кат. № ORKE 41), контрольную плазму P (кат. № OUPZ 17).

Проведение сорбции batch-методом

Перед проведением сорбции сорбенты уравнивали буфером, содержащим 0.01 М ТРИС, 0.06 М тринатрий цитрат, рН 7.8. В центрифужные стаканы вносили сорбент, разводили эквивалентным объемом буфера и центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре при 1000 об./мин. Надосадочный раствор сливали и добавляли новый буфер, перемешивали и снова центрифугировали. Эта операция была повторена пятикратно. Сорбцию проводили путем постоянного перемешивания сорбента с различными объемами ППУ, при комнатной температуре в течение 1 ч. Сорбент удаляли центрифугированием при комнатной температуре при 1000 об./мин в течение 20 мин. Количество сорбированного белка определяли по разности значений содержания АТ III в растворах до и после сорбции.

Измерение специфической активности АТ III

Измерение специфической активности АТ III проводили амидолитическим методом с помощью хромогенного субстрата на спектрофотометре Cary 100 Bio (фирма-производитель Varianic, Австралия) [4]. Измерения проводили при 405 нм, в пластиковых кюветах шириной 10 мм. За величину международной единицы активности АТ III (МЕ АТ III) принимали активность, соответствующую активности 1 мл нормальной плазмы донорской крови.

Представление результатов

Полученные результаты обрабатывались с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. Нами использовались следующие формулы для определения правильности и точности, представленные с помощью доверительных интервалов [5]:

- правильность:

$$E_r = (A_{\text{АТ III ср}} - A_{\text{АТ III ист}}) / A_{\text{АТ III ист}} \cdot 100,$$

где $A_{\text{АТ III ср}}$ – среднее значение специфической активности АТ III, %;

$A_{\text{АТ III ист}}$ – значение специфической активности АТ III, приведенное в инструкции к реактиву и рассчитанное с учетом кратности разведения, %;

E_t – правильность, %;

- точность:

$$A_{\text{АТ III ср}} \pm C (\%), \text{ где } C = (t_{p,f} \cdot S) / n^{1/2},$$

где S – стандартное отклонение;

n – число измерений;

C – граница доверительного интервала;

$t_{p,f}$ – табличное значение t -критерия Стьюдента.

Для перевода значений специфической активности из % в МЕ используется следующее выражение:

$$A_{\text{АТ III}} (\text{МЕ}) = [A_{\text{АТ III}} (\%) / 100\%] \cdot V_{\text{ППУ}},$$

где $A_{\text{АТ III}} (\%)$ – специфическая активность АТ III, выражаемая в %;

$A_{\text{АТ III}} (\text{МЕ})$ – специфическая активность АТ III, выражаемая в МЕ;

$V_{\text{ППУ}}$ – объем ППУ, мл.

Обсуждение результатов

Оценка пригодности ППУ в качестве исходного сырья для выделения АТ III определялась по специфической активности АТ III в сравнении со свежемороженой плазмой донорской крови (СЗП).

Проведение сравнительных количественных определений специфической активности АТ III потребовало подтверждения допустимости применения амидолитического метода с помощью хромогенного субстрата, используемого для тестирования СЗП [6], в случае измерения активности АТ III в таком ее полупродукте как ППУ.

Аналитическая составляющая исследования включала два этапа – валидация метода хромогенного субстрата [7] для образцов СЗП и экспериментальное подтверждение пригодности метода его использования для образцов ППУ.

Нами проводилась валидация метода хромогенного субстрата [7] для образцов СЗП по следующим характеристикам – линейность калибровочной кривой, правильность, точность. Стабильность АТ III в образцах СЗП освещена в литературе [8]. Авторы показали, что содержание АТ III в СЗП после отбора крови у доноров и 24 ч хранения при 4°C не изменяется.

Линейность калибровочной кривой, построенная по реактиву стандартной человеческой плазмы с известным содержанием АТ III, характеризуется коэффициентом корреляции, пересечением с осью Y , наклоном линии регрессии и остаточной суммой отклонений. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты валидации метода измерения специфической активности АТ III с помощью хромогенного субстрата.

Валидационный параметр	Значение
Коэффициент корреляции	0.9917
Пересечение с осью Y	2.0156
Наклон линии регрессии	- 0.0112
Остаточная сумма отклонений	0.3331
Правильность (E _r), %	2.55%
Точность (A _{АТ III} ср ± C), %	93.3 ± 11.3%

Подтвердив линейность калибровочной кривой, необходимо установить правильность и точность измерений для СЗП. Для этого мы использовали специальный реактив фирмы DADE Behring контрольная плазма N, имеющий сертификат с указанным значением АТ III. В соответствии с рекомендациями [7, п. IV, В] правильность аналитического метода описывает близость измеренных величин, полученных этим методом, с истинным значением. Точность аналитического метода отражает степень разброса результатов для серии измерений одного и того же образца при определенных условиях и характеризуется доверительным интервалом. Правильность и точность устанавливали по трем измерениям трех концентраций АТ III. Данные представлены в табл. 1.

Полученные значения точности измерений позволили сделать заключение, что методика количественного определения АТ III с использованием набора Berichrom Antithrombin III на спектрофотометре Cary 100 Bio позволяет проводить количественные измерения специфической активности АТ III в СЗП с ошибкой измерения 11.3%, что является допустимым в соответствии с рекомендациями GMP о пригодности биоаналитической методики с точностью <15% [7].

В соответствии с рекомендациями [7, п. II, В] изменение определяемой матрицы со свежемороженой плазмы (СЗП) на плазму после удаления факторов свертывания (ППУ) без изменения остальных параметров методики требует частичной валидации метода измерения специфической активности антитромбина III с помощью хромогенного субстрата. Таким образом, необходимо подвергнуть валидации только некоторые характеристики, способные повлиять на метод измерения специфической активности антитромбина III при изменении биологической матрицы.

Первостепенную роль при смене матрицы играет специфичность методики по отношению к АТ III. Допустимость применения методики

хромогенных субстратов для количественного определения АТ III в образцах ППУ устанавливалась с помощью построения прямых, отражающих зависимость оптической плотности экспериментальных образцов при 405 нм от содержания в них АТ III (рис. 1). Параллельность прямых, построенных последовательным разведением исходных образцов ППУ, относительно калибровочной кривой свидетельствует о высокой специфичности методики измерения специфической активности антитромбина III с помощью хромогенного субстрата [7, п. V, А]. Уравнения прямых, представленных в виде зависимости $D_{405} = f(A_{\text{АТ III}})$, для калибровочной кривой (1) и ППУ (2 и 3) имеет вид:

$$y = -0.0112x + 2.0183 \quad (1)$$

$$y = -0.0112x + 2.0183 \quad (2)$$

$$y = -0.0112x + 2.0183 \quad (3)$$

В полученных уравнениях коэффициенты при «х», характеризующие тангенс угла наклона прямой, имеют одинаковую величину, равную -0.0112. Это позволяет утверждать, что прямые зависимости оптической плотности экспериментальных образцов при 405 нм от содержания в них АТ III параллельны. Свободные члены уравнения равны между собой и характеризуют расстояние, на которое смещены прямые относительно «0» при пересечении с осью ординат. Равные величины свободных членов говорят о наложении прямых относительно друг друга, что хорошо видно на рис. 1. Эти факторы свидетельствуют о допустимости применения данного метода количественного измерения специфической активности АТ III в СЗП к ее полупродукту ППУ.

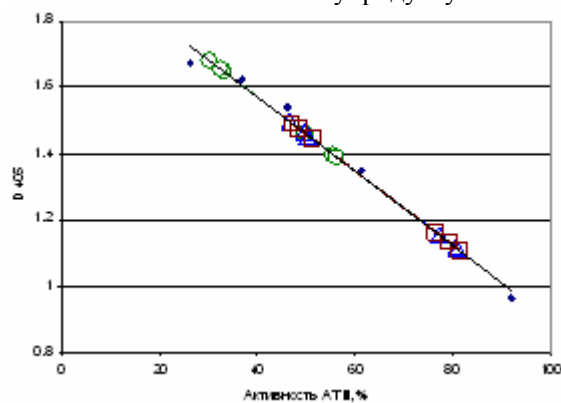


Рис. 1. Зависимость оптической плотности образцов ППУ от содержания антитромбина III.
■ Калибровка ● ППУ-1 ▲ ППУ-2 □ ППУ-3

Следующий шаг состоял в определении точности методики количественного измерения специфической активности АТ III в ППУ. Доверительные интервалы определялись для трех экспериментальных серий ППУ. Для каждой серии проводили шесть измерений специфической активности АТ III.

Таблица 2. Доверительные интервалы для опытных образцов ППУ.

№ серии ППУ	Доверительный интервал ($A_{AT\ III\ ср} \pm C$), %
1 серия	64.7 ± 8.2
2 серия	100.4 ± 4.9
3 серия	100.1 ± 4.9

Полученные значения точности измерений, представленные в табл. 2, позволили сделать заключение, что методика количественного определения АТ III с использованием набора Berichrom Antithrombin III на спектрофотометре Cary 100 Bio позволяет проводить количественные измерения специфической активности АТ III в ППУ с ошибкой измерения 4-8%, что является допустимым в соответствии с рекомендациями GMP о пригодности биоаналитической методики с точностью <15% [2].

В настоящее время в литературе описаны различные методы выделения АТ III, например, ионообменная хроматография [9], иммуно-аффинная хроматография [10] с использованием моноклональных антител и аффинная хроматография. При хроматографическом выделении АТ III из плазмы донорской крови, используют в основном аффинные носители, в частности, Heparin-Sepharose FF и Toyopearl AF-Heparin HC-650M, содержащие в качестве лиганда гепарин [2, 3]. Указанные сорбенты отличаются строением матриц. Однако, именно строение матрицы определяет устойчивость сорбента к скоростям элюции и допустимый интервал значений pH используемых растворов. Мы решили провести сравнительное изучение сорбционных характеристик Toyopearl AF-Heparin (фирма-производитель Tosoh) [11, 12], построенного на основе полимерной матрицы, состоящей из гидроксированного метакрилата, позволяющей вести хроматографический процесс на больших скоростях и в большом интервале значений pH 2 ÷ 13, а также весьма распространенного сорбента Heparin-Sepharose FF, мягкая матрица которого состоит из полисахаридов.

Полученные результаты валидационных исследований количественного определения АТ III в ППУ позволили приступить к экспериментам по сравнительному изучению процесса сорбции на выбранных аффинных носителях по отношению к этому белку.

В качестве стартовых условий проведения сорбции белка были избраны физико-химические характеристики исходной ППУ с целью возможности соблюдения в разрабатываемой технологической схеме принципа непрерывности потока, рекомендуемого для стерильных производств, и исключить необходимость проведения каких-либо подготовительных стадий перед проведением хроматографического выделения АТ III.

Для проведения сравнительного изучения

процесса сорбции вышеуказанных носителей был выбран batch-метод [13]. Использование этого метода позволяет сократить время проведения эксперимента, а также необходимые объемы исходного сырья по сравнению с колоночной хроматографией. Объем сырья сокращается за счет использования минимального количества сорбента.

При проведении сорбции (n=3) с использованием равных нагрузок на сорбент в размере 50 МЕ АТ III/ г сорб. было установлено, что на Toyopearl AF-Heparin сорбировалось 42.78 ± 2.83 МЕ АТ III/ г сорб., а на Heparin-Sepharose 37.43 ± 6.09 МЕ АТ III/ г сорб. Уже при минимальных нагрузках емкость Heparin-Sepharose была меньше, чем емкость Toyopearl AF-Heparin. В связи с полученными результатами представлялось целесообразным построение кривых насыщения обо аффинных сорбентов при последовательном увеличении нагрузки белка на носитель – от до 300 МЕ АТ III на 1 г сорбента (рис. 2).

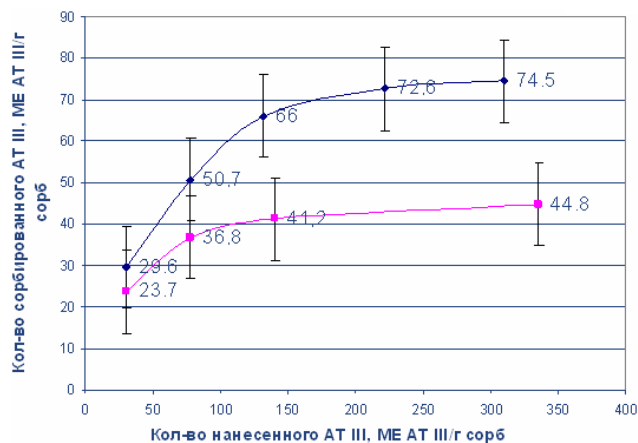


Рис. 2. Кривые насыщения аффинных сорбентов антитромбином III.

♦ Toyopearl AF-Heparin ■ Heparin-Sepharose FF.

Как следует из формы кривой, представленной на рис. 2, плато для Toyopearl AF-Heparin достигается при нагрузке 200 МЕ АТ III на 1 г сорбента, а это означает, что при этой нагрузке на сорбенте заняты все гепариновые группы, доступные для АТ III в данных условиях сорбции. При этом максимальная емкость сорбента достигает значений 74 МЕ АТ III/г сорбента. Для Heparin-Sepharose FF максимальная емкость достигается при нагрузке 100 МЕ АТ III на 1 г сорбента и равна 42 МЕ АТ III/г сорбента.

Данные, полученные при сравнении количеств сорбированного белка на Toyopearl AF-Heparin и на Heparin-Sepharose FF при равной нагрузке в 300 МЕ АТ III /г сорбента, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Сорбционные характеристики аффинных сорбентов при нагрузке

300 МЕ АТ III/г сорбента.

Сорбент	Емкость, МЕ АТ III/г сорб.
Toyopearl AF-Heparin (n=3)	74.00 ± 9.41
Heparin-Sepharose FF (n=3)	48.02 ± 14.47

Как видно из табл. 3, емкость Toyopearl AF-Heparin в 1.5 раза превышает таковую для Heparin-Sepharose FF. Это может быть связано со структурными особенностями матриц сорбентов.

Полученные результаты по изучению сорбции batch-методом свидетельствуют о преимуществах дальнейшего использования Toyopearl AF-Heparin по сравнению с Heparin-Sepharose FF в качестве сорбента для разработки способа хроматографического выделения АТ III. Кроме того, учитывая синтетическую природу матрицы, можно рассчитывать на возможность проведения хроматографического процесса на высоких скоростях

элюции и при давлении до 3 бар, а также осуществлять регенерацию с использованием 6 М раствора мочевины, сильных растворов щелочи и других сильных детергентов. Это допущение очень важно, так как плазма донорской крови и ее фракции представляют собой биологические матрицы, состав которых не бывает постоянным, и, следовательно, регенерация сорбента является важным этапом хроматографического процесса.

Таким образом, установленные в результате проведенного сравнительного изучения значения сорбционных характеристик аффинных носителей по отношению к белку антитромбину III, входящему в состав ППУ, говорят о предпочтительности использования для дальнейших исследований сорбента Toyopearl AF-Heparin, максимальные значения емкости которого в 1.5 раза превышают таковую характеристику для Heparin-Sepharose FF.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Струкова, С. М. Свертывание крови: триггерные механизмы и регуляция / С. М. Струкова // Новое в трансфузиологии. – 2004. – № 38. – С. 51–70.
2. A single-step method for the isolation of antithrombin III / M. Wickerhauser [et al.] // Vox Sang. – 1984. – Vol. 47. – P. 397–405.
3. Three novel high performance affinity chromatographic media for the separation of antithrombin III from human plasma/ Yingxin Zhao [et al.] // Biomed. Chromatography. – 2001. – Vol. 15. – P. 487–492.
4. Purification and large-scale preparation of antithrombin III/ D. L. Hoffman [et al.] // Amer. J. Medicine. – 1989. – Vol. 87, № 3B. – P. 23S–26S.
5. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Ч. 1. – С-Пб. : НПО «Мир и Семья», 2002. – 964 с.
6. US Patent Trademark Organization [Электронный ресурс] : [Электронная база патентов]. – Method for measuring antithrombin activity / Hugh W. Hoogendoorn. – № 6423658 ; заявлено 13.09.2000 ; опубл. 13.08.2002.
7. Guidance for industry bioanalytical method validation/ U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2001.
8. The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4°C overnight / R. Cardigan [et al.] // Transfusion. – 2005. – Vol. 45. – P. 1342–1348.
9. US Patent Trademark Organization [Электронный ресурс] : [Электронная база патентов]. – Method of purification of antithrombin III using an anion exchanger / Y. Linnau. – № 6395880 ; заявлено 26.05.2000 ; опубл. 28.05.2002.
10. Quantification of antithrombin isoform proportions in plasma samples of healthy subjects, sepsis patients, and in antithrombin concentrates / J. Römisch // Pathophysiol. Haemostasis & Thrombosis. – 2002. – Vol. 32. – P. 143–150.
11. Esp@cenet [Электронный ресурс] : [Электронная база патентов]. – Production of proteinic pharmaceutical free of virus / H. Motonori. – № JP 2209814 (A) ; опубл. 21.08.1990.
12. Esp@cenet [Электронный ресурс] : [Электронная база патентов]. – Концентрат FIX системы свертывания крови и метод его выделения / Т. Л. Дереза. – № RU 2163140(C1) ; опубл. 20.02.2001.
13. Optimization of affinity and ion-exchange chromatographic processes for the purification of proteins / Q. M. Mao [et al.] // Biotechnol. & Bioengineer. – 1996. – Vol. 52. – P. 204–222.