

ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИИ КОМПЛЕКСА ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII И ФОН ВИЛЛЕБРАНДА НА ИОНООБМЕННЫХ СОРБЕНТАХ

М.А. Ажигирова, заведующий отделом экспериментальных технологий,

Т.Л. Дереза, старший научный сотрудник, О.Г. Кутюрова, аспирант,

Т.А. Ципилева, аспирант

Учреждение Российской академии медицинских наук

Гематологический научный центр РАМН

plasma@blood.ru

Проведено сравнительное изучение сорбционных свойств ионообменных сорбентов, а именно, DEAE-Toyopearl 650M, Toyopearl Super-Q 650M, Fractogel EMD TMAE (M), DEAE-Sepharose FF, Fractogel EMD TMAE Hicap (M), по отношению к факторам свертывания крови VIII (FVIII) и фон Виллебранда (vWF) и установлено, что наибольшей емкостью обладают сорбенты, функциональные группы которых размещаются на концах привитых к матрице полимерных «щупалец». Сорбция проводилась batch-методом при комнатной температуре и перемешивании и контролировалась по остаточному содержанию белков в растворе, измеренному в единицах специфической активности. Установлены значения емкостей сорбентов по отношению к факторам свертывания FVIII и vWF, составившие для Fractogel EMD TMAE (M) 188 и 2309 ME/г, соответственно, а для Fractogel EMD TMAE Hicap (M) – 130 и 1935 ME/г. Полученные результаты могут быть использованы для разработки метода хроматографической очистки комплекса белков FVIII/vWF.

Ключевые слова: факторы свертывания крови, хроматографические сорбенты, криопреципитат

Свежезамороженная плазма донорской крови (СЗП) является уникальным природным источником белков, пригодных для приготовления лекарственных препаратов, имеющих более 20 коммерческих наименований.

К числу наиболее востребованных в клинической практике препаратов плазмы относятся факторы свертывания крови VIII (FVIII), IX и фактор фон Виллебранда (vWF). Их клиническое применение направлено на профилактику и оказание медицинской помощи пациентам с врожденными нарушениями свертывающей системы. Особое значение имеют препараты, содержащие концентраты фактора VIII, так как они являются жизненно важными для пациентов, страдающих гемофилией А.

Результаты изучения составов антигемофильных препаратов в эксперименте *in vitro* [1, 2] и клинические данные [3, 4] свидетельствуют о защитной роли vWF по отношению к FVIII в тех препаратах, в которых выше содержание vWF, а также о снижении риска развития осложнений после их применения, в частности, возникновения ингибиторных форм гемофилии А.

На основе этих данных можно сделать заключение о предпочтительности выделения комплекса FVIII/vWF для получения более эффективного и безопасного антигемофильного препарата.

Технологический процесс выделения комплекса антигемофильных белков включает два основных этапа – осаждение криопреципитата (КП) и хроматографическую очистку.

Процесс получения КП состоит в размораживании СЗП при температуре $0 \div +3^{\circ}\text{C}$, в результате чего образуются две фракции: осадок, КП, и жидкая часть, криосупернатант. В состав КП, помимо факторов свертывания FVIII и vWF, входят фибриноген, фибронектин, незначительное количество альбумина и других белков [5].

Модификации способа криофракционирования, в том числе путем использования добавок различных карбоновых кислот и их солей, в частности, цитрата натрия, в пластиковые контейнеры [6], используемые для заготовки СЗП, а также непосредственно в процессе криофракционирования [7] позволили увеличить содержание комплекса белков FVIII/vWF в КП более чем в 2 раза.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение сорбционных свойств полимерных анионообменных носителей, пригодных для завершающей стадии выделения комплекса FVIII/vWF.

Обсуждение результатов

Для выделения факторов FVIII и vWF в качестве сырья использовали осадок КП, полученный из СЗП в присутствии низкомолекулярных агентов. Использование низкомолеку-

лярных добавок на стадии криофракционирования позволило практически полностью осадить vWF, выход которого составил $100.0 \pm 3.6\%$, а также FVIII с выходом $70.7 \pm 10.8\%$. Наряду с указанными белками осадок КП содержал $55.5 \pm 12.6\%$ фибриногена (Fib) и не более 2% альбумина и иммуноглобулина от их исходного содержания в СЗП. Очевидно, что при проведении сорбции комплекса FVIII/vWF фибриноген, представляющий собой балластный белок, может препятствовать сорбции в силу близости своих физико-химических характеристик выделяемым белкам, конкурируя при взаимодействии с поверхностью сорбента.

В связи с этим проводилось предварительное удаление Fиб из растворов КП методом гель-фильтрации на Sepharose 4 FF.

Объем наносимого образца раствора КП составлял 20-25% от объема сорбента. Отбор высокомолекулярной фракции (ВМФ), содержащей комплекс FVIII/vWF, заканчивали с возрастанием показания проводимости элюата. Типичный профиль элюции при проведении гель-фильтрации представлен на рис. 1. Отбираемый объем ВМФ колебался в интервале 350-360 мл и содержал FVIII и vWF в количестве 2.60 ± 0.25 МЕ/мл ($n=5$) и 10.00 ± 3.96 МЕ/мл ($n=3$), соответственно.

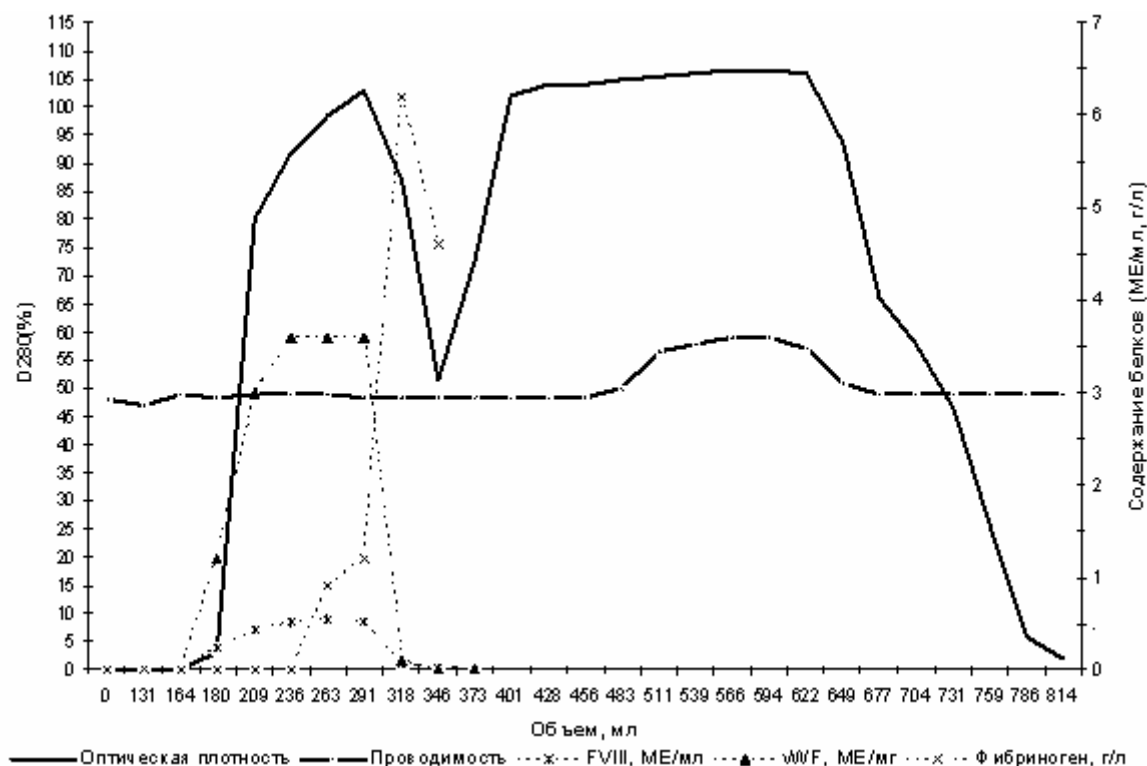


Рис. 1. Профиль элюции при проведении гель-фильтрации растворов КП на Sepharose 4 FF.

Результаты сравнительного изучения белкового состава исходных КП и ВМФ, полученных из них, представлены в табл. 1.

Как следует из данных табл. 1, проведение гель-фильтрации раствора КП позволяет более чем в 2 раза увеличить его удельную активность по FVIII. Эффективность удаления Fиб в процессе гель-фильтрации оценивали по соотношению $ME_{FVIII}/ME_{Fиб}$, величины которого составили для растворов КП и ВМФ 0.35 ± 0.13

($n=5$) и 0.65 ± 0.22 ($n=5$), соответственно. Таким образом, проведение гель-фильтрации позволило снизить в 1.8 раз нагрузку Fиб в расчете на 1 МЕ FVIII. При этом выходы FVIII и vWF на стадии гель-фильтрации составили $83.6 \pm 5.9\%$ ($n=4$) и $99.7 \pm 0.5\%$ ($n=2$), соответственно. Незначительные потери факторов свертывания позволяют использовать эту стадию в качестве подготовительной для проведения сорбции комплекса FVIII/vWF на ионообменниках.

Таблица 1. Белковый состав КП и ВМФ.

№ п/п	Удельное содержание белков (МЕ/мг общего белка)	КП ($n=10$)	ВМФ ($n=4$)
1	FVIII	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.5
2	vWF	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2

В сравнительное изучение сорбционных свойств по отношению к комплексу FVIII/vWF

были включены следующие анионообменники: DEAE-Toyopearl 650M, Toyopearl Super-Q 650M, Fractogel EMD TMAE (M), DEAE-Sepharose FF, Fractogel EMD TMAE Hicap (M).

Сорбционные свойства хроматографических носителей по отношению к комплексу FVIII/vWF оценивали по количеству сорби-

рованных белков в расчете на 1 г сорбента, устанавливаемому по разности их содержания (в МЕ) в растворах до и после проведения сорбции batch-методом.

Результаты сравнительного исследования сорбционных характеристик указанных ионообменников представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сорбционные характеристики сорбентов по отношению к комплексу белков FVIII/vWF.

№	Сорбент	FVIII (МЕ/г сорбента)			vWF (МЕ/г сорбента)		
		Кол-во нанесен- ного	Кол-во несорби- рованного	Кол-во сорбиро- ванного	Кол-во нанесен- ного	Кол-во несорби- рованного	Кол-во сорбиро- ванного
1	DEAE-Toyopearl 650M	70.3	24.7	45.6	180.0	131.0	49.0
2	Toyopearl Super-Q 650M	71.0	26.6	44.4	180.0	116.0	64.0
3	Fractogel EMD TMAE (M)	70.3	1.0	69.3	187.2	28.0	159.2
4	DEAE-Sepharose FF	73.2	52.8	20.4	180.0	158.5	21.5
5	Fractogel EMD TMAE Hicap (M)	70.3	0.8	69.5	187.2	9.6	177.6

Как следует из данных, представленных в табл. 2, лучшими сорбционными характеристиками по отношению к FVIII и vWF из изученных сорбентов в избранных условиях обладают Fractogel EMD TMAE (M) и Fractogel EMD TMAE Hicap (M). Полученные результаты объяснимы с точки зрения структурных особенностей исследованных сорбентов. Выбранные в качестве предпочтительных сорбенты относятся к группе хроматографических смол, имеющих на поверхности привитые полимерные «щупальца» и отличающихся тем, что ионообменные группы находятся на концах этих полимерных цепей. Стерическая доступность функциональных групп обеспечивает более высокую связывающую способность таких сорбентов [8], что особенно значимо в случае необходимости сорбции белков с высокой молекулярной массой от 285 кДа (FVIII) [9], до мультимеров с массой, превышающей 20 000 кДа (как в случае vWF) [10]. Аналогичные выводы о влиянии структуры хроматографических носителей на сорбцию столь значительных по молекулярной массе белков, как FVIII и vWF, были сделаны итальянскими исследователями [11] при проведении хроматографии колоночным способом.

Для выбранных сорбентов были установлены значения емкостей по факторам свертывания при проведении сорбции в условиях batch-метода.

С этой целью проводилась сорбция batch-методом, при которой образцы сорбентов перемешивались с растворами ВМФ, содержащими возрастающее количество МЕ FVIII и vWF. По разности между исходным и остаточным содержанием этих белков после про-

ведения сорбции и удаления сорбентов центрифугированием рассчитывали сорбированные количества белков в МЕ на 1 г сорбента. Было проведено 5 экспериментов с 4 различными сериями ВМФ. На рис. 2 представлены кривые насыщения FVIII и диаграммы емкостей по vWF, установленные при использовании Fractogel EMD TMAE (M) (рис. 2а) и Fractogel EMD TMAE Hicap (M) (рис. 2б).

Как следует из рис. 2, кривые насыщения FVIII достигали максимума при значениях емкости 188 МЕ/г в случае Fractogel EMD TMAE (M) и 130 МЕ/г для Fractogel EMD TMAE Hicap (M). Указанные величины свидетельствуют о большей, практически на 50%, емкости Fractogel EMD TMAE по сравнению с сорбентом Fractogel EMD TMAE Hicap (M).

В изученном интервале величин нагрузок белков на сорбенты максимальные значения емкостей для vWF, в отличие от FVIII, не были достигнуты. Как видно на рис. 2а, плато на кривой сорбции FVIII при исследовании Fractogel EMD TMAE сопровождается возрастающими значениями сорбции vWF, составляя при этом 1827 и 2309 МЕ/г.

Аналогичное наблюдение было сделано при использовании Fractogel EMD TMAE Hicap (M) (рис. 2б), но с получением меньших значений измеряемых величин, составивших 1935 МЕ/г для vWF при 130 МЕ/г для FVIII.

Проведение дальнейших экспериментов с целью насыщения сорбентов белком vWF мы считали нецелесообразным, как приводящее к неизбежным потерям FVIII.

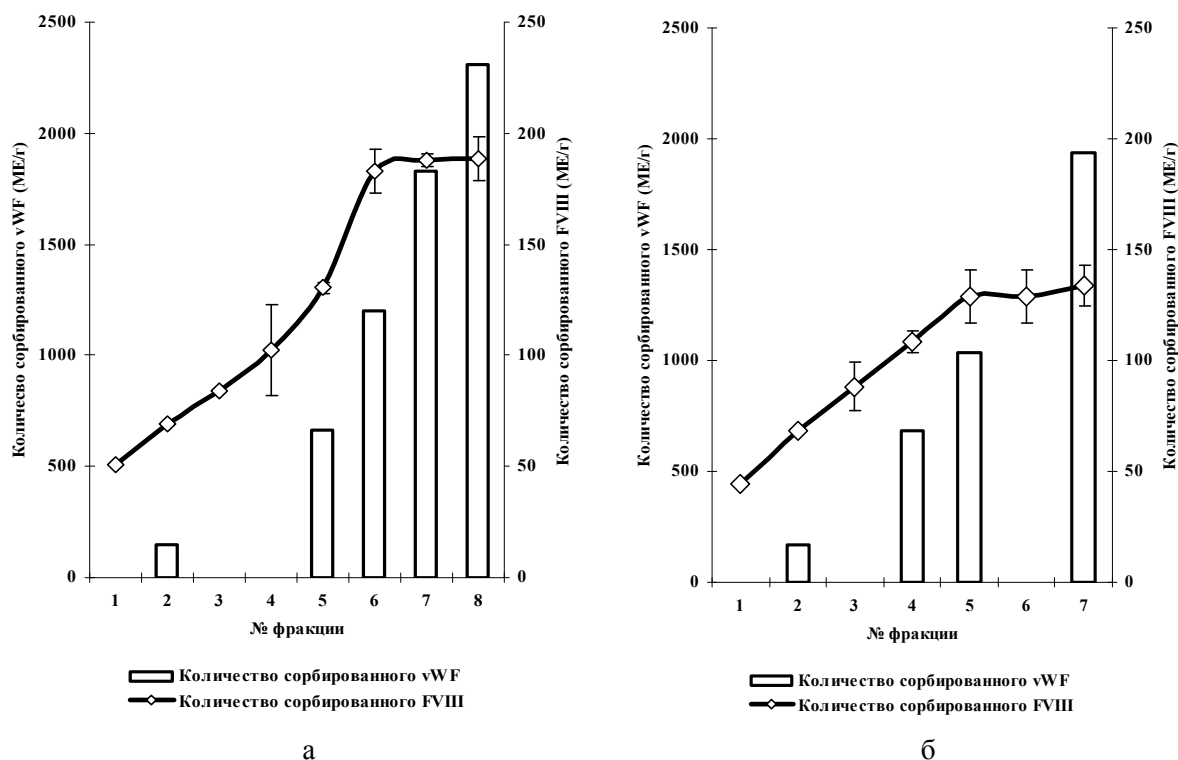


Рис. 2. Кривые насыщения по FVIII и гистограммы емкостей по vWF на сорбентах Fractogel EMD TMAE (M) (а) и Fractogel EMD TMAE Hicap (M) (б).

Полученные данные позволяют предположить, что сорбция происходит за счет взаимодействия функциональных групп сорбентов с поверхностью молекулы FVIII, которая, вероятно, удерживает vWF в виде комплекса белков. На основе сравнения числовых величин емкостей по факторам свертывания на прямых отрезках кривых насыщения можно прогнозировать сорбцию комплексов исследуемых белков в соотношениях ME_{FVIII}/ME_{vWF} как 1:9.7-12.3 для Fractogel EMD TMAE (M) и 1:14.5 в случае Fractogel EMD TMAE Hicap (M).

Полученные в ходе экспериментальной работы данные о предпочтительности использования таких анионообменников, как Fractogel EMD TMAE (M) и Fractogel EMD TMAE Hicap (M) для выделения комплекса FVIII/vWF и установленные значения емкостей могут быть применены для дальнейших работ по созданию технологии получения антигемофильного лекарственного препарата плазмы на основе белкового комплекса факторов свертывания крови.

Экспериментальная часть

Исходным сырьем при проведении работы являлась СЗП, полученная в соответствии с «Инструкцией по заготовке и консервированию донорской крови» от 29.05.95 г. и дополнениями к ней от 02.08.99 г. В работе использовались следующие реактивы: хлорид натрия, хлорид кальция 2-х водный, глицин (Merck, Германия), тринатрий цитрат трех-

замещенный 2-х водный, Трис-HCl (Fluka, Швейцария). Для проведения коагулометрических измерений применяли реактивы фирмы Behring (Германия): контрольная плазма N (кат. № ORKE 41), контрольная плазма P (кат. № OUPZ 17), Pathromtin*SL (кат. № OQGS29), дефицитная плазма по фактору VIII (кат. № OTXW17), стандартная человеческая плазма (кат. № ORKL21), von Willebrand reagent (кат. № OUBD23), а также следующие хроматографические носители: DEAE-Toyopearl 650M, Toyopearl Super-Q 650M (Tosoh, Япония), Fractogel EMD TMAE (M), Fractogel EMD TMAE Hicap (Merck), DEAE-Sepharose FF, Sepharose 4 FF (GE Healthcare).

Проведение криофракционирования СЗП

В качестве низкомолекулярных добавок использовали хлорид кальция и тринатрий-цитрат. Получение КП проводили в условиях, описанных нами ранее [7].

Гель-фильтрация растворов КП

Гель-фильтрацию раствора КП проводили на сорбенте Sepharose 4 FF (GE Healthcare) в 0.02 М Трис-HCl буфере, pH 7.0, содержащем 0.02 М цитрат натрия, 2.5 мМ хлорид кальция и 0.045 М хлорид натрия. Линейная скорость элюции составляла 17 см/ч. Концентрация общего белка в образцах, наносимых на колонку, не превышала значений $0.3 \pm 0.06\%$.

Проведение сорбции batch-методом

Сорбцию комплекса FVIII/vWF из высокомолекулярной фракции раствора КП, полученной гель-фильтрацией, проводили batch-методом

перемешиванием раствора с сорбентами в различных весовых соотношениях при комнатной температуре в течение 1 ч. По завершении сорбции сорбент удаляли центрифугированием при $+3^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин при 1000 об./мин. Количественные определения активности FVIII и vWF проводили до и после проведения сорбции. По разнице активностей оценивали емкость анионо-обменников по FVIII и vWF.

Измерение специфической активности FVIII

Специфическую активность FVIII в международных единицах активности определяли на коагулометре KC-4A фирмы Amelung (США) одностадийным коагулометрическим методом [12] с использованием графопостроения. За величину международной единицы активности FVIII (МЕ FVIII) принимали активность, соответствующую активности 1 мл нормальной плазмы донорской крови.

Измерение специфической активности vWF

Ристоцетин-кофакторную активность vWF (в МЕ) определяли методом агглютинации на стекле фиксированных отмытых тромбоцитов в присутствии ристоцетина [13].

Определение концентрации общего белка

Концентрацию белка в исследуемых образцах измеряли методом Бредфорда [14] с использованием спектрофотометра Ultrospec-450 (LKB, Швеция). В качестве реагента использовали раствор красителя Кумасси бриллиантового синего G-250 фирмы Sigma-Aldrich, США. Концентрацию белка определяли по калибровочному графику, построенному с помощью стандартного образца раствора человеческого альбумина ОСО 42-28-340-07П.

Представление результатов экспериментов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью метода наименьших квадратов с использованием компьютерной программы «Анализ данных» по разделу «Описательная статистика» [15].

ЛИТЕРАТУРА:

1. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation/ K. Nogami [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 11. – P. 3993–3998.
2. Factor VIII inhibitors: role of von Willebrand factor on the uptake of factor VIII by dendritic cells / S.V Kaveri [et al.] // *Haemophilia*. – 2007. – Vol. 13. – P. 61–64.
3. Goudemand, J. Inhibitor development in haemophilia A: the role of von Willebrand factor/factor VIII concentrates / J. Goudemand // *Haemophilia*. – 2007. – Vol. 13. – P. 47–51.
4. Gringeri, A. vWF/FVII concentrates in high-risk immunotolerance: the RESIST study / A. Gringeri // *Haemophilia*. – 2007. – Vol. 13. – P. 73–77.
5. Fibronectin in frozen products of human plasma / S. Mitrovic [et al]. // *Abstr. of VI Regional European congress of the ISBT*. – 1999. – P. 67.
6. Pat. 6,541,518 US, МПК А 61 К 031/19. Enhanced production of safe plasma preparations / E. Shanbrom. – № 778681 ; заявлено 02.07.01 ; опубл. 01.04.03.
7. Ажигирова, М. А. Влияние условий получения криопреципитата на его состав / М. А. Ажигирова, Т. Л. Дереза, О. Г. Кутюрова, Т. А. Ципилева // *Гематол. и трансфузиол.* – 2008. – Т. 53, № 1. – С. 12–14.
8. Janson, J. C. Protein purification / J. C Janson, L. Ryden. – N.Y. : Wiley-Liss, 1998. – 166 p.
9. Бутинас, С. Свертывание крови / С. Бутинас, К.Г. Манн // *Биохимия*. – 2002. – Т. 67, № 1. – С. 5–15.
10. Furlan, M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity / M. Furlan // *Ann. Hematol.* – 1996. – Vol. 72. – P. 341–348.
11. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using ion-exchange chromatography/ F. Mori, I. Nardini, P. Rossi, C. Farina // *Vox Sang.* – 2008. – Vol. 95. – P. 298–307.
12. *European Pharmacopeia*, 4th ed. – 2002. – P. 166–168.
13. Sarji, K. E. Nature of von Willebrand factor: a new assay and a specific inhibitor / K. E. Sarji // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1974. – Vol. 71. – P. 2937–2941.
14. Государственная фармакопея РФ / изд. XII, ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – С. 109–110.
15. Банержи, А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / Пер. с англ. под ред. В. П. Леонова. – М.: Практическая медицина, 2007. – 287с.