

СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ И МЕТОДЫ ИХ УДАЛЕНИЯ ИЗ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А.С. Журавко*, аспирант, В.И. Швеиц, заведующий кафедрой, академик РАН

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ М.В. Ломоносова,

Москва, 119571 Россия

*Автор для переписки, e-mail: nastasya_Zh@mail.ru

В мини-обзоре рассматриваются химические и биологические свойства бактериальных эндотоксинов и современные наиболее удобные и эффективные методы удаления их из биофармацевтических препаратов.

Ключевые слова: генно-инженерные белки, бактериальные эндотоксины, липополисахариды (ЛПС), способы очистки, токсичные примеси.

Введение

Использование методов генетической инженерии позволило экспрессировать гены множества белков (интерфероны, интерлейкины, инсулин, гормон роста человека и др.) в различных клетках, в том числе и бактериальных, что в свою очередь дало возможность создавать медицинские препараты и применять их для лечения различных заболеваний. Получение генно-инженерных белков с помощью бактериальных систем, таких как *Escherichia coli*, сопряжено с загрязнением конечного продукта токсичными для человека примесями: эндотоксинами – липополисахаридами клеточной стенки. Основная проблема заключается в том, что эндотоксины способны образовывать комплексы со многими белками, что значительно затрудняет процесс очистки.

В области контроля качества биофармацевтических препаратов практическое значение имеет определение и уровень содержания бактериальных эндотоксинов [1, 2], которые являются частью внешней клеточной мембраны всех грамотрицательных бактерий [3]. Бактериальные эндотоксины, или липополисахариды [4], являются одними из основных примесей готовых лекарственных инъекционных форм (ГЛФ) и активных фармацевтических субстанций (АФС). Присутствие их в ГЛФ и АФС оказывает существенное воздействие на организм человека, вызывая аллергические и воспалительные реакции, повреждение тканей и даже может приводить к серьезным нарушениям биохимических процессов, вплоть до летального исхода в случае высоких концентраций. Поэтому очень важно, чтобы фармацевтические продукты не содержали в своем составе эндотоксины.

Максимальный уровень эндотоксинов для инъекционных лекарственных форм и биологических продуктов установлен европейской фармакопеей в 5 единиц эндотоксина (EU, Endotoxin Unit) на 1 кг веса тела за 1 ч [5]. Одна единица приблизительно равна 100 пкг эндотоксина [5, 6].

В фармацевтической промышленности загрязнение препарата возможно во время процесса производства или при приготовлении ко-

нечного продукта. Хотя в бактерии эндотоксины связаны с бактериальной клеточной стенкой, они постоянно выделяются в окружающую среду. Высвобождение происходит не только в момент разрушения клетки, но также во время ее роста и деления. Так как бактерии могут расти даже в обедненных средах, таких как вода, щелочные и буферные растворы, эндотоксины присутствуют практически повсеместно. Одна молекула *E. coli* содержит приблизительно 2 млн. молекул ЛПС [7].

Очистка конечного продукта от примесей такой природы является одной из приоритетных задач при производстве генно-инженерных препаратов. Однако при выделении белков из клеточной биомассы образуются прочные эндотоксин-белковые комплексы, что значительно усложняет задачу получения фармацевтически чистого лекарственного препарата. Кроме этого, эндотоксины по сравнению с белками являются очень стабильными молекулами, устойчивыми к нагреванию и изменению pH [6, 8, 9].

Цель этой работы состоит в том, чтобы рассмотреть химические и биологические свойства эндотоксинов, способы их взаимодействия с белками, а также наиболее удобные и эффективные методы их удаления из биофармацевтических препаратов.

Химическое строение и биологические свойства бактериальных эндотоксинов

Как уже было сказано выше, бактериальные эндотоксины являются компонентами наружной мембраны грамотрицательных бактерий (рис. 1). Молекулы эндотоксина обеспечивают структурную целостность, отвечают за многие физиологические функции, в том числе определяют патогенные и антигенные свойства бактерий. ЛПС состоит из гидрофильного полисахаридного участка, который связан с гидрофобным липидным участком (липид А) [4, 10–12]. Структурно ЛПС включает в себя 3 ковалентно связанных компонента: О-антиген, центральный (кор) олигосахарид и липид А (рис. 2).

Липид А в значительной степени определяет биологическую активность эндотоксина, то есть его токсичность, и имеет относительно консервативное строение, схожее во многих бактериях [4, 7].

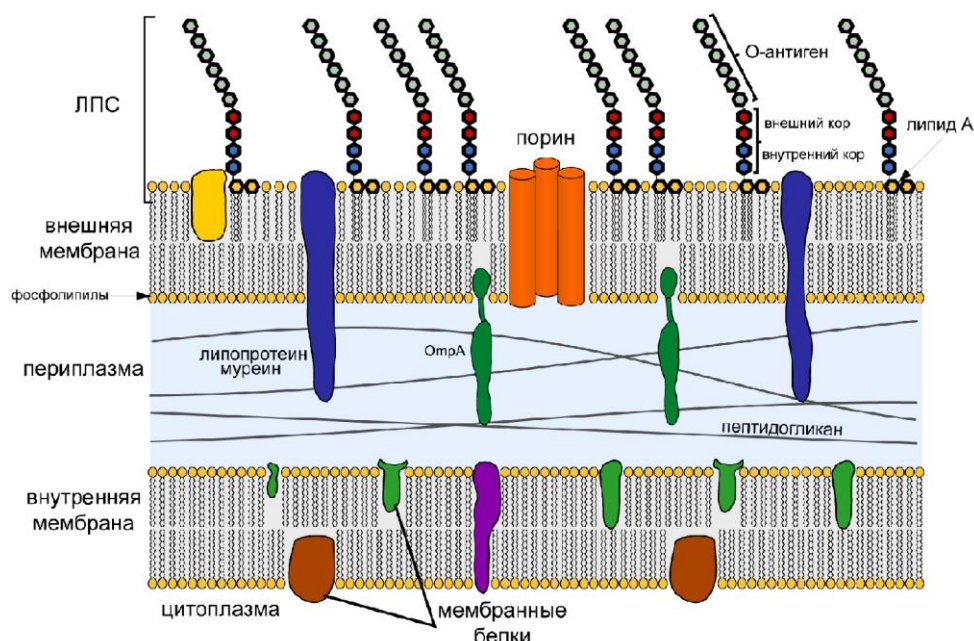
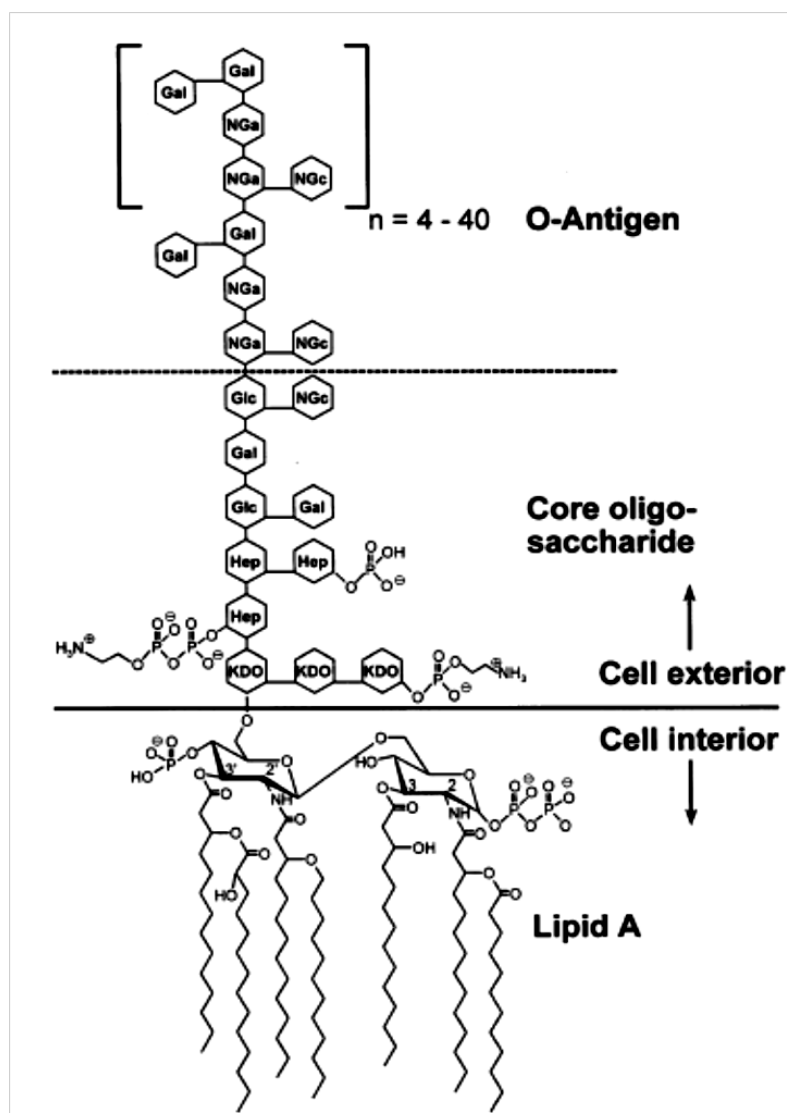


Рис. 1. Поверхностные структуры грамотрицательных бактерий [10].

Рис. 2. Химическая структура эндотоксина *E. coli* O111:B4. [Hep] – L-глицеро-D-манногептоза, [Gal] – галактоза, [Glc] – глюкоза, [KDO] – 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота, [NGa] – N-ацетил-галактозамин, [NGc] – N-ацетил-глюкозамин [13].

Липид А содержит остов из двух молекул глюкозамина, соединенных β -1,6-гликозидной связью. Гидроксильные группы при восстанавливающем 1'-атоме углерода одной молекулы глюкозамина и при 4'-атоме углерода другой молекулы глюкозамина фосфорилированы, а другие гидроксильные группы и аминогруппы этерифицированы обычно гидроксимиристиновой жирной кислотой [10]. Она и «заякоривает» молекулу ЛПС в бактериальной мембране. Эта гидрофобная часть эндотоксина является более жесткой, чем остальная часть молекулы [13, 14].

Центральный олигосахарид (кор, полисахаридное ядро) формально подразделяется на внешнюю и внутреннюю части. В состав внутренней части кора обычно входят остатки L-глицеро-O-манногептозы и 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО). КДО содержит 8 атомов углерода и в природе практически нигде больше не встречается. Она служит молекулярным мостиком и соединяет липид А с О-антигеном. Следует отметить, что участок центрального олигосахарида, расположенный около липида А, и сам по себе липид А частично фосфорилированы ($pK_1 = 1.3$, $pK_2 = 8.2$ фосфатных групп липида А), поэтому в растворе с нейтральным или основным pH молекулы эндотоксина имеют отрицательный заряд [13, 15].

О-Антиген представляет собой полисахаридные цепи, которые соединены с центральным олигосахаридом. В молекуле эта часть ЛПС направлена в окружающую среду, она является наиболее иммуногенной, поэтому легко распознается иммунной системой хозяина, с чем и связано ее название [4, 13]. Состав О-антигена варьирует в зависимости от штамма бактерии. Наиболее распространенными моносахаридами, входящими в состав О-антигена, являются глюкоза, галактоза, гептоза. Этот участок молекулы придает ей гидрофильные свойства, благодаря чему ЛПС хорошо растворимы в воде.

О-Антиген определяет молекулярную массу эндотоксина. Молекулярная масса мономера эндотоксина обычно составляет от 10 до 20 кДа. Но встречаются и отдельные исключения: 2.5 кДа для ЛПС с коротким О-антигеном и до 70 кДа для ЛПС с очень длинным О-антигеном [10].

Важно отметить, что в присутствии двухвалентных катионов металлов молекулы эндотоксинов образуют довольно крупные структуры [13]. Эти структуры были изучены разными методами, такими как электронная микроскопия, дифракция рентгеновских лучей, ИК-Фурье-спектроскопия и ЯМР [10]. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что эндотоксины в водных растворах самостоятельно могут образовывать агрегаты пластинчатой, кубической и гексагональной

формы, которая зависит от значения pH, концентрации соли и детергентов [7, 15].

Механизм активации бактериальных эндотоксинов

При попадании в организм бактериальные эндотоксины вызывают различные патофизиологические эффекты (эндотоксинальный шок, разрушение тканей и т.д.) [7, 10]. При этом эндотоксины не действуют непосредственно на клетки или органы, а активизируют иммунную систему, через моноциты и макрофаги, тем самым вызывая иммунный ответ. Эти клетки высвобождают медиаторы, такие как фактор некроза опухоли, фактор активации тромбоцитов, колониестимулирующий фактор, простагландин и свободные радикалы [16, 17]. Медиаторы обладают сильной биологической активностью и ответственны за побочное действие эндотоксина. Они изменяют метаболизм, структуру и функции органов и клеток, увеличивают температуру тела, активируют коагуляционный каскад, изменяют гемодинамику и вызывают шок. Было предпринято много попыток, чтобы предотвратить или уменьшить эффекты воздействия эндотоксинов на клетки иммунной системы, а именно использовать антитела против эндотоксинов для того, чтобы заблокировать антагонистов эндотоксиновых рецепторов. Однако взаимодействие эндотоксинов с клетками иммунной системы происходит не только посредством связывания с определенными рецепторами, а также с помощью неспецифического встраивания молекул эндотоксина в мембраны клеток-мишеней [18].

Следует отметить, что эндотоксины не разрушаются в условиях стерилизации. Разрушение эндотоксина происходит только при выдерживании его при температуре 250°C более 30 мин или при 180°C более 3 ч [19, 20]. Использование в лабораторных условиях кислотных и щелочных растворов в концентрации не менее 0.1 М также может привести к разрушению молекулы эндотоксина [7, 20].

Таким образом, рассмотренные выше свойства приводят к острой необходимости очистки белков, составляющих АФС, от токсичных примесей бактериальных эндотоксинов. Логично предположить, что имея представление о химическом строении и свойствах ЛПС, можно предложить ряд способов их удаления.

Методы удаления бактериальных эндотоксинов

Наиболее общими методами очистки от бактериальных эндотоксинов является ультрафильтрация и гель-фильтрация. Важно помнить, что молекулы ЛПС могут образовывать различные агрегаты и структуры, природа которых зависит от свойств раствора, в котором они находятся. Например, в присутствии ионов би-

валентных металлов, а именно Ca^{2+} или Mg^{2+} , ЛПС образуют довольно крупные агрегаты диаметром более 0.1 мкм и молекулярной массой выше 1000 кДа [4]. Такие крупные агрегаты, хотя и проходят через фильтр с размером пор 0.22 мкм, но эффективно задерживаются на фильтре с размером пор 0.025 мкм [7, 21].

Для очистки от эндотоксиновых агрегатов небольших белков, таких как миоглобин (18000 Да), успешно применяют ультрафильтрацию [10]. Можно отметить, что такой способ очистки не применим, если происходит взаимодействие между мономером эндотоксина и мономером белка, так как при таком взаимодействии эндотоксины проходят через мембрану вместе с белком. Очевидно, что при удалении двухвалентных ионов из раствора каким-либо комплексообразующим агентом, например, ЭДТА, агрегаты разрушаются, и в таком растворе ЛПС присутствуют в виде мономерных форм. Хотя ультрафильтрация является эффективным методом депирогенизации воды, она не всегда эффективна для белковых растворов, так как может приводить к разрушению белковой молекулы [21, 22].

Альтернативным методом удаления ЛПС является гель-фильтрация. Такой способ очистки исключает денатурацию биологически активных белков. Метод основан на различии молекулярных масс разделяемых компонентов, таким образом, более крупные агрегаты эндотоксинов будут элюироваться с колонки быстрее, чем молекулы белка. Однако белки, у которых $pI > 7$, могут вступать в электростатические взаимодействия с ЛПС [23], что значительно снижает эффективность процесса очистки.

Способность эндотоксинов нести на себе отрицательный заряд играет важную роль при использовании ионообменной хроматографии [24]. При таком способе очистки особое внимание уделяется выбору подвижной фазы. Изoeлектрическая точка очищаемого белка должна быть выше pH элюирующего раствора, а pK_a эндотоксинов ниже [23]. Кроме этого, большое значение имеет и заряд белковой молекулы. Например, анионообменная хроматография эффективно очищает от эндотоксинов положительно заряженные белки, такие как урокиназа [10, 25]. Однако очистка отрицательно заряженных белков на анионообменной смоле может сопровождаться серьезными потерями целевого компонента в результате его необратимой адсорбции на сорбенте.

Как уже было сказано выше, эндотоксины способны образовывать прочные эндотоксин-белковые комплексы, разрушение которых является достаточно сложной задачей, поэтому использование ионообменной хроматографии не всегда позволяет добиться необходимой степени чистоты препарата [26, 27]. Основной движущей силой в образовании комплексов

выступают, вероятно, электростатические взаимодействия. Эндотоксины, связанные с белками в комплекс, могут проходить через колонку, не задерживаясь на ней, тем самым ухудшая эффективность разделения.

Известно, что гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, являются эффективными агентами в процессе отделения эндотоксинов от эндотоксин-белкового комплекса во время ионообменной хроматографии. На эффективность разрушения таких комплексов оказывают влияние такие факторы, как длина углеродной цепи, изомерная форма молекулы, длительность промывки гликолями и их концентрация, а также вид используемой ионообменной хроматографии (анионообменная или катионообменная). Более эффективно удаление эндотоксинов происходит на катионообменных, чем на анионообменных сорбентах [28, 29].

Самым эффективным методом удаления эндотоксинов из раствора является аффинная хроматография [30]. Очевидно, что эффективность процесса очистки зависит от наличия избирательного взаимодействия между иммобилизованным на матрице сорбента лигандом (например, гистамин, гистидин, полилизин и др.) и молекулой эндотоксина [31]. На сегодняшний день самым популярным сорбентом является Сефароза 4В с привитым полимиксином В — пептидом-антибиотиком, обладающим высоким сродством к липиду А [32, 33]. Благодаря специфическому взаимодействию полимиксин В способен нейтрализовать биологическую активность липидной части молекулы ЛПС [34]. Следует отметить, что данный аффинный сорбент имеет высокую стоимость, и его нельзя подвергать жесткой депирогенизации с использованием щелочи и этанола, а конечный продукт необходимо контролировать на содержание в нем полимиксина В [10].

Ряд проведенных исследований показал, что аффинные сорбенты с иммобилизованными аминокислотными (АК) лигандами могут успешно применяться для удаления ЛПС. Было установлено, что заряд и полярность АК играет важную роль в процессе адсорбции эндотоксина. Водородные связи, образующиеся между полярной группой АК лиганда и молекулой эндотоксина, значительно увеличивают адсорбцию ЛПС. Такие лиганды как аргинин и серин являются наиболее эффективными агентами, благодаря сорбенту с этими лигандами удалось очистить белки сыворотки крови кроликов от ЛПС на 78% [35].

Анализ литературных данных показал, что обращено-фазовая ВЭЖХ является отличным методом для удаления эндотоксинов. Гидрофобные липидные группы обеспечивают эффективное связывание с неподвижной фазой ВЭЖХ сорбентов, поэтому время удерживания эндо-

токсинам значительно выше времени удерживания большинства белков. Более того, десорбция эндотоксинов наступает только при существенных концентрациях органического модификатора в подвижной фазе (до 70-90% ацетонитрила) [23].

Недостатком данного метода является способность ЛПС со временем накапливаться на сорбенте и элюироваться с колонки вместе с целевым компонентом, что приведет к загрязнению последнего. Такое возможно из-за вытеснения целевым компонентом ЛПС с занятых ими активных центров сорбента, таким образом, возникает необходимость периодической депириогенизации сорбента. Для этих целей обычно используют концентрированные щелочные или кислотные растворы (например, 1 М гидроксид натрия или 1-2 М уксусную кислоту соответственно) [23].

Удаление ЛПС с помощью ОФ ВЭЖХ не одинаково подходит для всех белков, в частности, возникают проблемы в случае гидрофобных белков. Кроме того, такой способ очистки требует очень больших затрат времени.

На сегодняшний день экстракция выступает одним из наиболее часто используемых и эффективных методов разделения и концентрирования субстратов различной природы [36, 37]. Среди разнообразных жидкостных экстракционных методов интенсивное развитие получила мицеллярная экстракция фазами неионных ПАВ (НПАВ).

Преимуществами метода выступают высокие коэффициенты концентрирования микрокомпонентов при использовании малых объемов проб; возможность выделения и разделения веществ различной природы, в том числе заряженных форм; удобство сочетания с разными физико-химическими методами анализа. Мицеллярно-экстракционное концентрирование основывается на фазовом расслоении водных растворов НПАВ при температуре помутнения

(Тп) [38, 39]. В результате образуется мицеллярная фаза-коллектор и водная фаза с концентрацией неионного ПАВ, близкой к критической концентрации мицеллообразования.

Широкое распространение в практическом применении мицеллярной экстракции для разных объектов по очистке их от эндотоксинов получил тритон X-114 (ТХ-114). Это связано с тем, что точка помутнения данного НПАВ равна 22°C [23], а это очень удобно при работе с белками [13, 39]. Кроме этого, детергенты тритонового ряда обладают средней смешиваемостью с водными растворами, а при достижении значения температуры, выше критической, и концентрации детергента, больше ККМ, мицеллы агрегируют в капли с очень низким содержанием воды, тем самым формируя новую фазу [40, 41]. Разделение фаз осуществляли с помощью центрифугирования и нагревания. В результате неполярных взаимодействий алкильных цепей липида А и детергента эндотоксины остаются в обогащенной мицеллярной фазе и, следовательно, отделены от водной.

Подводя итоги, следует подчеркнуть, что методы очистки являются эффективными только тогда, когда возможно удалить эндотоксины из раствора белка и при этом сохранить нативную структуру последнего.

В заключение также следует отметить, что способ очистки определяется масштабами производства и экономической целесообразностью. Даже несмотря на существование множества методов очистки биофармацевтических препаратов от бактериальных эндотоксинов, универсального метода очистки от указанных примесей до сих пор не существует. Поэтому процедура их удаления для каждого определенного препарата разрабатывается отдельно. Во многих случаях возникновение такой проблемы может послужить поводом для перестройки всего процесса производства.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Chen L., Mozier N. Comparison of Limulus amoebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions // J. Pharm. & Biomed. Analysis. 2013. V. 80. P. 180–185.
2. Daneshian M., Guenther A., Wendel A., Hartung T., Von Aulock S. *In vitro* pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs // J. Immunol. Meth. 2006. V. 313. P. 169–175.
3. Levin J., Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood // Bull. Johns Hosp. 2004. V. 115. P. 265–274.
4. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides // Microbes & Infection. 2005. V. 4. P. 837–851.
5. Ogikubo Y., Ogikubo Y., Norimatsu M., Noda K., Takahashi J., Inotsume M., Tsuchiya M. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines // Biologics. 2004. V. 32. P. 88–93.
6. Fiske J.M., Ross A., Meid R.K., McMichael J.C., Arumugham M. Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations // J. Chrom. B. 2007. V. 753. P. 269–278.
7. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М., 1997. 96 с.

8. Lin M.F., Williams C., Murray M.V., Ropp P.A. Removal of lipopolysaccharides from protein lipopolysaccharide complex by nonflammable solvents // J. Chrom. B. 2005. V. 816. P. 167–174.
9. Co T.U.I., Hope D., Scrift M.H., Powers J. Purified pyrogen from *Eberthella typhosa*. A preliminary report on its preparation and its chemical and biologic characterization // J. Lab. Clin. Med. 1944. V. 29. P. 58–62.
10. Magalhaes P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C.V. Pessoa A.Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparation: A review // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 2007. V. 10. P. 388–404.
11. Hirayama C., Sakata M. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles // J. Chrom. B. 2002. V. 781. P. 419–432.
12. Raetz C.R., Ulevitch R.J., Wright S.D., Sibley C.H., Ding A., Nathan C.F. Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction // FASEB J. 1991. V. 5. № 12. P. 2652–2660.
13. Petsch D., Anspach F.B. Endotoxin removal from protein solutions // J. Biotechnol. 2005. V. 76. P. 97–119.
14. Ohno N., Morrison D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4434–4441.
15. Hou K.C., Zaniewski R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge // J. Parenteral Sci. Technol. 1990. V. 44. P. 204–209.
16. Forehand J.R., Pabst M.J., Phillips W.A., Johnston J.B. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium // J. Clin. Investig. 1989. V. 83. P. 74–83.
17. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function // FASEB J. 1994. V. 8. P. 217–225.
18. Schromm A.B., Brandenburg K., Loppnow H., Moran A.P., Koch M.H.J., Rietschel E.T., Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 2008–2013.
19. Sharma S.K. Endotoxin detection and elimination in biotechnology // Biotechnol. Appl. Biochem. 1986. V. 1. P. 5–22.
20. Reichelt P., Schwarz C., Donzeau M. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents // Protein Expr. Purif. 2006. V. 46. P. 483–488.
21. Sweadner K.J., Forte M., Nelsen L.L. Filtration removal of endotoxin [pyrogens] in solution in different states of aggregation // Appl. Environ. Microbiol. 1977. V. 34. № 4. P. 382–385.
22. Berthold W., Walter J. Protein purification: Aspects of processes for pharmaceutical products // Biologicals. 1994. V. 22. P. 135–150.
23. Гусаров Д.А. Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки // Биофарм. журн. 2009. Т. 1. № 3. С. 10–17.
24. Shukla A.K., Schauer R. Determination of 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO), N-acetylneuraminic acid, and their derivatives by ion-exchange liquid chromatography // Carbohydrate Res. 1985. V. 140. P. 1–8.
25. Chen R.H., Huang C.-Jr., Newton B.S., Ritter G., Old L.J., Batt C.A. Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography // Protein Expr. & Purif. 2009. V. 64. № 1. P. 76–81.
26. Brass D.M., Savov J.D., Whitehead G.S., Maxwell A.B., Schwartz D.A. LPS binding protein is important in the airway response to inhaled endotoxin // J. Allergy & Clin. Immunol. 2004. V. 114. № 3. P. 586–592.
27. Wilson M.J., Haggart C.L., Gallagher S.P., Walsh D. Removal of tightly bound endotoxin from biological products // J. Biotechnol. 2001. V. 88. № 1. P. 67–75.
28. Dismer F., Hubbuch J. 3D structure-based protein retention prediction for ion-exchange chromatography // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 8. P. 1343–1353.
29. Oelmeier S.A., Dismer F., Hubbuch J. Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems – Single PEG-molecules in solution // BMC Biophys. 2012. V. 5. P. 1–14.
30. Anspach F.B. Endotoxin removal by affinity sorbents // J. Biochem. & Biophys. Meth. 2001. V. 49. P. 665–681.
31. Hjelmeland L.M., Klee W.A., Osborne J.C. A new class of nonionic detergents with a gluconamide polar group // Anal. Biochem. 1983. V. 15. № 130. P. 485–490.

32. Kang Y., Luo R. G. Effects of ionic strength and pH on endotoxin removal efficiency and protein recovery in an affinity chromatography // *Process Biochem.* 2000. V. 36. № 1-2. P. 85–92.
33. Molvig J., Baek L. Removal of endotoxin from culture media by a polymyxin B sepharose column // *J. Immunol.* 1987. V. 26. P. 611–619.
34. Issekutz A. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 61. P. 275–281.
35. Wei Z., Huang W., Li J., Hou G., Fang J., Yuan Z. Studies on endotoxin removal mechanism of adsorbents with amino acid ligands // *J. Chrom. B.* 2007. V. 852. P. 288–292.
36. Мартынов В.Б. Экстракция органическими кислотами и их щелочами. М.: Энергоатомиздат, 1989. 272 с.
37. Зотов Ю.А. Экстракция внутрикомплексных соединений. М.: Наука. 1968. 313 с.
38. Liu C.L., Kamei D.T., King J.A., Wang D.I.C., Blankschtein D. Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems // *J. Chrom. B.* 1998. V. 711. P. 127–138.
39. Lopes A.M., Magalhaes P.O., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C.V. Pessoa A. LPS removal from an *E. coli* fermentation broth using aqueous two-phase micellar system // *Biotechnol. Prog.* 2010. V. 26. № 6. P. 1644–1653.
40. Liu C.L., Nikas Y.J., Blankschtein D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems // *Biotechnol. Bioeng.* 1996. V. 52. P. 185–192.
41. Aida Y., Pabst M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114 // *J. Immunol. Meth.* 1990. V. 14. № 6. P. 191–195.

BACTERIAL ENDOTOXINS PROPERTIES AND METHODS OF REMOVING THEM FROM BIOPHARMACEUTICAL DRUGS

A.S. Zhuravko[@], V.I. Shvets

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

[@]Corresponding author e-mail: nastasya_Zh@mail.ru

The production of biopharmaceutical proteins by means of Escherichia coli cultivation leads to contamination with bacterial endotoxins which are very toxic and pyrogenic impurities. The final product purification from these impurities is one of the most important tasks in the production of biopharmaceutical drugs. However, isolation of proteins from cellular biomass results in the formation of strong endotoxin-protein complexes that considerably complicate the task of obtaining pharmaceutical safely drugs. The goal of the present mini-review consisted in considering and discussing effective methods of removing bacterial endotoxins from protein solutions on the basis of their chemical and biological properties.

Keywords: recombinant proteins, protein solutions, bacterial endotoxins, lipopolysaccharides, toxic impurity.