

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА  
ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ»  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШУРКО НАТАЛІЯ ОЛЕГІВНА**

УДК 612.151-083:616.151-056.7

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОАКТИВНОГО ПРЕПАРАТУ ФАКТОРА VIII  
ЗСІДАННЯ КРОВІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ  
НА БАРВНИК-КРЕМНЕЗЕМНИХ НОСІЯХ**

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

03.00.04. – біохімія

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ Н. О. Шурко

Науковий керівник

**ДАНИШ Тарас Васильович**

кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник

**Львів – 2018**

## АНОТАЦІЯ

*Шурко Н. О.* Одержання високоактивного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням афінної хроматографії на барвник-кремнеземних носіях. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Державна Установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів, 2017. Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

Дисертація присвячена створенню нового методу отримання очищеного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням макропористих кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками; синтезу та дослідженню властивостей макропористих кремнеземних сорбентів із активними барвниками в ролі лігандів, придатних для очищення фактора VIII зсідання крові; використанню різних хімічних речовин в ролі вірус-інактивуєчих агентів у процесі очищення; розробці схеми отримання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора та вивченню його біохімічних властивостей.

У роботі застосовано кремнеземні макропористі матриці на основі Діасорбу амінопропілового 800/70, фракція 0,25–0,50 мкм різної пористості (250, 500, 750 та 1500 Å), ковалентно модифіковані наступними активними тріазиновими та вініл-сульфонофими барвниками: Cibacron Brilliant Yellow 3GP, Procion Blue HB, Procion Blue MXR, Procion Yellow HE3G, Procion Gelb M4R, Procion Red MX5B, Reactive Brown 10, Reactive Red 120, Reactive Green 5, Reactive Green 19, Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Активний бордо 4 СГ, Активний пурпуровий 4ЖТ.

В якості модельних для дослідження властивостей сорбентів застосовували комерційні препарати фактора VIII: Кріопреципітат та Immunate.

Встановлено, що процес очищення фактора VIII відбувається завдяки явищу негативної афінної сорбції. Фактор VIII не сорбується жодним зі

синтезованих сорбентів. Проте, його питома активність у супернатані зростає, що пов'язано з сорбцією із досліджуваного розчину нецільових білків. Дані підтверджуються статистично двовибірковим t-тестом з різними дисперсіями при визначенні значущості різниці між групами ( $P \leq 0,05$ ).

Серед досліджуваних сорбентів виділено групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К. Виявлено, що на сорбцію білків впливає рН розчину (вищий ступінь очищення досягається при рН 7,4).

У процесі інкубації досліджуваного розчину препарату фактора VIII з цими сорбентами питома активність зростала на порядок (від  $0,036 \pm 0,001$  до  $0,300 \pm 0,009$  МО/мг білка (Кріопреципітат) і від  $17,450 \pm 0,750$  до  $100,120 \pm 5,069$  МО/мг білка (Immunate) максимально).

Виявлено, що фактор фон Віллебранда також не сорбується із досліджуваними сорбентами, що забезпечує збереження вихідного співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> у препараті (вихідне співвідношення становило 0,63, а при нанесенні було в межах 0,53–0,73, залежно від сорбенту). Це має важливе значення як у процесі виробництва, оскільки фактор фон Віллебранда захищає фактор VIII від протеолітичної деградації, так і в клінічному використанні отриманих препаратів (можливість застосування для лікування гемофілії А та хвороби фон Віллебранда). Це є однією із важливих переваг пропонованого процесу очищення фактора VIII у порівнянні з методами іонообмінної хроматографії, у яких має місце значна втрата фактора фон Віллебранда.

В експерименті встановлено, що даною групою сорбентів зв'язуються не лише альбумін, але й фактори протромбінового комплексу та фібриноген.

Виявлено, що при виборі хроматографічного сорбенту важливим є не лише вибір ліганду, але й властивості самої матриці. Так, зокрема, продемонстровано, що найкраща сорбція нецільових білків досягалася на сорбенті з розміром пор  $750 \text{ \AA}$  (найвищий ступінь очищення фактора VIII).

Відмічено, що у випадку нанесення Кріопреципітату існує достовірна відмінність між вихідною питомою активністю та активністю, отриманою на сорбентах з розміром пор 500, 750 та 1500 Å, а для Immunate – 250, 500 та 750 Å ( $P \leq 0,01$ ).

Проведено дослідження впливу методів попереднього фракціонування у поєднанні з методом негативної афінної сорбції для створення схеми отримання високоочищеного препарату фактора VIII з плазми крові. Встановлено, що попереднє фракціонування барій цитратом, алюміній гідроксидом (III) та ПЕГ-4000 забезпечує видалення факторів протромбінового комплексу, фібриногену, фібрoneктину, ліпопротеїдів, денатурованих білків, альбуміну тощо. На цьому етапі досягли стократного очищення препарату фактора VIII (від  $0,017 \pm 0,001$  до  $1,88 \pm 0,11$  МО/мг білка для сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ).

Продемонстровано, що застосування іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та афінної хроматографії на відібраних кремнеземних макропористих сорбентах забезпечує одержання фактора VIII з Кріопреципітату зі ступенем очищення від 129 до 242 разів та збереженням до 73-76 % від вихідної прокоагулянтної активності. Основні втрати від вихідної активності фактора VIII і фон Вілебранда (до 27 %) відбувались на етапі іонообмінної хроматографії. Оскільки, очищення фактора на кремнеземних сорбентах відбувалось завдяки явищу негативної афінної хроматографії, це забезпечувало практично сто-відсотковий (96,34 %) вихід продукту та є ще однією суттєвою перевагою даного методу в технології отримання очищеного препарату.

Виявлено, що поєднання етапів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії забезпечує ступінь очищення в межах 239–700 разів, залежно від типу вибраного сорбента. Найкращий результат досягли у досліді використання Діасорб-Активний пурпуровий 4 ЖТ.

Для одержання вірус-безпечного препарату досліджено можливість застосування відомих ефективних методів антивірусної обробки: сольвент-

детергентного та тіоціанатного. Запропоновано етапи включення кожного з методів у схему отримання препарату та способи видалення вірус-інактивууючих агентів. Оптимальне місце застосування цих методів є перед етапом кріоосадження, оскільки основна їх частина залишається у супернатанті.

Включення різних методів інактивації вірусів у поєднанні з ефективними хроматографічними етапами біоспецифічного виділення та очищення фактора VIII зсідання крові дозволяє отримати препарати високого ступеня чистоти, безпечні у застосуванні стосовно можливої вірусної контамінації.

Для контролю за процесом очищення фактора VIII застосовували коагулологічний та хромогенний (з низькомолекулярним пептидним субстратом S-2765) методи визначення активності.

Результатами досліджень встановлено, що на визначення активності фактора з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату вплив антивірусних агентів (три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну 80 та тіоціанату амонію) в інкубаційній суміші є меншим у порівнянні з коагулологічним. Це є ваговим аргументом на користь використання методу гідролізу хромогенних субстратів у технології очищення фактора, оскільки дозволяє безпосередньо контролювати активність фактора на різних етапах технологічного процесу отримання.

В результаті проведених досліджень вперше запропоновано метод негативної афінної хроматографії (патент України на винахід № 94299), схеми очищення фактора VIII зсідання крові, що поєднують етапи попереднього фракціонування білків плазми крові, іонообмінної та афінної хроматографії, а також антивірусної обробки (патент на корисну модель № 107509). Запропонованим методом отримано препарат фактора VIII з питомою активністю  $50,58 \pm 1,68$  МО/мг білка, співвідношенням фактора VIII/фон Віллебранда 1,73, який за електрофоретичними характеристиками близький до відомих комерційних препаратів. Стабільний у розчині при кімнатній температурі до 8 год, у замороженому стані (-30) °C активність фактора повністю зберігається упродовж місяця, через три місяці зберігання

зменшується на 10 %, після року зберігання – на 20–25 %. В отриманому препараті не виявили активності тромбіну та фактора ІХ, залишків фібриногену.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що отримані результати можуть бути впроваджені в практику лабораторного та промислового виробництва. Одержаний препарат може використовуватись для лабораторної діагностики (наприклад, дослідження імуноглобулінів до фактора VIII, як стандартний зразок тощо), стати основою для розробки терапевтичного препарату, а також для наукових досліджень.

**Ключові слова:** кремнеземні макропористі сорбенти, активні барвники, плазма крові, фактор VIII, фактор фон Віллебранда, хроматографія, фракціонування.

## ANNOTATION

*Shurko N. O.* Preparation of highly active concentrate of blood coagulation factor VIII with the use of affinity chromatography on dye-silica carriers. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscripts.

Thesis for a scientific degree of candidate in biological sciences, specialty 03.00.04 – Biochemistry. State Institution «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine», Lviv, 2017. Institute the Animal Biology, NAAS, Lviv, 2018.

The dissertation is devoted to development of a new method to obtain purified preparation of the blood coagulation factor VIII using macropore silica matrix with active dyes as ligands, to synthesis and investigation of properties of a dye-ligand macropore silica suitable for purification of the coagulation factor VIII, to use of various chemicals as virus-inactivating agents in the process of purification, and to development of a scheme for obtaining a highly active virus-safe preparation of the factor VIII and studying its biochemical properties.

The following substances were used in the work: macropore silica matrix based on Diasorb-aminopropyl 800/70, fraction 0.25–0.50  $\mu\text{m}$  of different pore sizes (250, 500, 750, and 1500  $\text{\AA}$ ), covalently modified by the following triazine and vinyl-sulfon active dyes: Cibacron Brilliant Yellow 3GP, Procion Blue HB, Procion Blue MXR, Procion Yellow HE3G, Procion Gelb M4R, Procion Red MX5B, Reactive Brown 10, Reactive Red 120, Reactive Green 5, Reactive Green 19, Active bright orange KH, Active violet 4K, Active bright blue KX, Active bright red 5SX, Active burgundy 4SG and Active purple 4GT.

The commercial preparations Cryoprecipitate and Immunate were used as a model for studying the properties of sorbents.

Research results demonstrated that the process of purification of the factor VIII is due to the phenomenon of the negative affinity adsorption. Factor VIII is not absorbed by any of the synthesized sorbents. However, its specific activity increases in the supernatant. This is due to its sorption from the investigated solution of additional proteins. The data are confirmed statistically by a two-sample t-test with different dispersions in determining the significance of the difference between the groups ( $P \leq 0.05$ ).

A group of studied sorbents is isolated, which shows the best binding of additional proteins: Diasorb-Active purple 4GT, Diasorb-Procion Gelb M4R, Diasorb-Procion Blue HB, Diasorb-Procion Blue MXR and Diasorb-Active bright blue KX. It was determined that the pH of the solution affects the sorption of protein (the highest level of specific activity of factor VIII was at pH 7.4).

The specific activity increased by an order of magnitude during incubation of a test solution of the factor VIII preparation with these sorbents (from  $0.036 \pm 0.001$  to  $0.300 \pm 0.009$  IU/mg protein (Cryoprecipitate) and from  $17.450 \pm 0.750$  to  $100.120 \pm 5.069$  IU/mg protein (Immunate) maximum).

It was established that the von Willebrand's factor is also not absorbed with the investigation sorbents. This ensures the preservation of the original ratio  $FVIII/vWF:R_{\text{cof}}$  in the preparation (the initial ratio was 0.63 and at application, it was within 0.53–0.73, depending on the sorbent). This is important in the production

process, since the von Willebrand's factor protects the factor VIII from proteolytic degradation, as well as in the clinical use of the resulting preparations (the possibility of use for the treatment of hemophilia A and von Willebrand diseases). This is one of the important advantage of the proposed process of purification of factor VIII in comparison with methods of ion-exchange chromatography, which are accompanied by a significant loss of the von Willebrand's factor.

It has been found that this group of sorbents binds not only albumin, but also factors of the prothrombin complex and fibrinogen.

It has been established that in choosing a chromatographic sorbent, not only the choice of the ligands is important, but also the properties of the matrix. It was demonstrated that the best sorption of additional proteins was achieved on a sorbent with a pore size of 750 Å (the highest degree of the factor VIII purification). It is noted that there is a significant difference between the initial specific activity and the activity obtained on sorbents with a pore size of 500, 750, and 1500 Å for experiments with Cryoprecipitate, and 250, 500 and 750 Å for Immunate ( $P \leq 0.01$ ).

To create a scheme for obtaining a highly purified preparation of the blood coagulation factor VIII from blood plasma, the research was conducted on combinations of the pre-fractionation method with the method of negative affinity sorption. It was determined that the pre-fractionation with barium citrate, aluminum hydroxide (III), and PEG-4000, provides removal of factors of prothrombin complex, fibrinogen, fibronectin, lipoproteins, denatured proteins, albumin etc. At this stage, we have reached hundredfold purification of the factor VIII preparation (for example, from  $0.017 \pm 0.001$  to  $1.88 \pm 0.11$  IU/mg protein for sorbent Diasorb-Active purple 4GT).

It has also been demonstrated that the use of ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and affinity chromatography on selected sorbents allows obtaining factor VIII from Cryoprecipitate with a degree of purification of 129 to 242 times and preservation of up to 73–76 % of the initial procoagulant activity. The main losses from the initial activity of factor VIII and the von Willebrand's factor (up to 27 %) occurred at the stage of ion-exchange chromatography. The phenomenon of negative

affinity sorption provides almost 100.0 % (96.34 %) yield of the product. This is another significant advantage of this method in the technology of obtaining a purified preparation of the coagulation factor VIII.

It has been found that the combination of pre-fractionation, ion-exchange and affinity chromatography stages provides a purification rate of 239–700 times, depending on the type of selected sorbents. The best result was achieved when using Diasorb-Active purple 4GT.

To get the virus-safe preparation, the possibility of using known effective methods of antiviral treatment: solvent-detergent and ammonium thiocyanate, was investigated. Stages of inclusion of each of these methods in the scheme of purification of the coagulation factor VIII and methods of removal of virus-inactivating agents are proposed. The optimal application of these methods is prior to the cryopreservation stage, because most of the factors remain in the supernatant.

Inclusion of various methods of inactivation of viruses in combination with effective chromatographic stages of biospecific isolation and purification of the blood coagulation factor VIII allows getting high purity preparations that are safe to use with regard to possible viral contamination.

To control the process of purification of the coagulation factor VIII, one-stage clotting and chromogenic (with peptide substrate S-2765) methods were used.

The results of the research have shown that the influence of antiviral agents (three(n-butyl)phosphate, Triton X-100, Tween 80, and ammonium thiocyanate) on the determination of the activity by the chromogenic method in the incubation mixture was lower compared to the one-stage clotting method.

This is an important argument in favor of using the method of hydrolysis of chromogenic substrates in the technology of purification of the factor VIII, since it allows directly controlling the activity of the factor at various stages of the process of purification.

For the first time, the method of negative affinity chromatography (Patent of Ukraine № 94299), schemes of purification of the blood coagulation factor VIII, combining the stages of pre-fractionation, ion-exchange and affinity chromatography,

as well as antiviral treatment (Patent of Ukraine № 107509 ). A preparation of the factor VIII with a specific activity of  $50.58 \pm 1.68$  IU/mg protein was obtained using the suggested method. The ratio of the factor VIII/von Willebrand's factor was 1.73. The obtained factor is close to the known commercial drugs by electrophoretic characteristics. The resulting preparation is stable in solution at room temperature for up to 8 hours. The activity of the factor VIII is completely preserved during a month in the frozen state ( $-30$ ) °C, after three months storage is reduced by 10%, after a year of storage – by 20–25%. The activity of thrombin and factor IX, as fibrinogen residues in the resulting preparation was not detected.

The practical significance of the obtained results is that they can be implemented in the practice of laboratory and industrial production. The resulting preparation can be used for laboratory diagnosis (for example, the study of inhibitor antibodies, as a standard sample, etc.), to become the basis for the development of a therapeutic preparation, as well as for scientific research.

**Key words:** silica macropore sorbents, active dyes, plasma of blood, factor VIII, von Willebrand's factor, chromatography, fractionation.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України

1. Даниш Т. В., Шурко Н. О., Вороняк М. І., Вус М. М. Альтернативні шляхи одержання препаратів фактора VIII згортання крові. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2008. Т.ІІ, вип. 34. С. 87–92. (Здобувач брала участь у визначенні активності FVIII у субфракціях плазми крові та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).
2. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., Шурко Н. О. Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами – активними барвниками тріазинового ряду. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2008. Вип. 47. С. 63–69. (Здобувач провела літературний пошук, синтез сорбентів, підготувала статтю до друку).

3. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Одноетапний спосіб очищення фактора VIII методом негативної афінної хроматографії з препарату «Кріопреципітат». *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 207–209. *(Здобувач проаналізувала літературу, провела визначення активності FVIII, підготувала статтю до друку).*
4. Застосування сольвент-детергентного методу інактивації вірусів при одержанні препаратів з плазми крові / М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Л. В. Орлова, **Н. О. Шурко**. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н, 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 166–170. *(Здобувач провела фракціонування плазми крові, узагальнила отримані дані, підготувала статтю до друку).*
5. Дослідження впливу вірус-інактивуючих агентів на кількісний вміст та активність факторів згортання крові / **Н. О. Шурко**, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 365–369. *(Здобувач виконала експериментальні дослідження впливу вірус-інактивуючих речовин на активність FVIII, підготувала статтю до друку).*
6. Використання синергічного ефекту вірус-інактивуючих агентів у сучасних технологіях одержання факторів згортання крові та фібринолізу / В. Л. Новак, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 312–316. *(Здобувач провела літературний пошук, підготовлено статтю до друку).*
7. **Шурко Н. О.** Фракціонування плазми крові: класичні та хроматографічні методи отримання фактора VIII згортання крові. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2016. Вип.73. С. 347–351.
8. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Дослідження зв'язування фактора VIII зсідання крові з кремнеземними сорбентами різної пористості. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 23–28. *(Здобувач брала участь у*

проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала статтю до друку).

9. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Фактор VIII зсідання крові: будова молекули та застосування. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2017. Вип. 76. С. 184–192. (Здобувач брала участь у пошуку та аналізі літературних джерел, підготувала статтю до друку).
10. **Шурко Н. О.** Новий метод отримання комплексу факторів VIII-фон Віллебранда. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2017. Вип. 39. С. 229–236.

#### **Статті у фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних**

11. **Шурко Н. О.**, Вороняк М. І., Даниш Т. В. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання. *Біологічні студії*. 2014. Т. 8. № 1. С. 197–204. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).
12. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах. *Біологія тварин*. 2016. Т. 18, № 2. С. 152–159. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).
13. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Вороняк М. І. Застосування барвник-лігандної хроматографії для очищення фактора VIII зсідання крові. *Біологічні студії*. 2017. Т.11. № 1. С. 67–74. (Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з синтезованими сорбентами, брала участь в аналізі результатів, підготувала статтю до друку).

#### **Статті в інших журналах України**

14. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Негативна афінна хроматографія як спосіб отримання фактора VIII з плазми крові людини. *Медичний форум*. 2015. 4 (04). С. 95–97. (Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з відібраними сорбентами, провела аналіз результатів, підготувала статтю до друку).

15. Терапевтичні препарати факторів зсідання крові в Україні / О. Й. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, **Н. О. Шурко**, Т.В. Даниш. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 51–56. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).
16. Сучасні тенденції у фракціонуванні плазми крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак, Ю. В. Войціцький, Л. Є. Лаповець. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 140–144. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).

#### **Патенти України на винахід та корисну модель**

17. Патент України на винахід № 94299 Спосіб очищення фактора VIII / **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – від 26.04.2011 р., Бюлетень № 8. (Здобувач дослідила сорбцію FVIII із сорбентами, брала участь в оформленні патенту на винахід).
18. Патент України на корисну модель 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові/ **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – № u201512302; заявл. 11.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11. (Здобувач брала участь у розробці технологічної схеми одержання FVIII, в оформленні патенту на корисну модель).

#### **Інформаційний лист**

19. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак., М. І. Вороняк, М. М. Вус, С. Є. Мадич, Н. А. Дульцева, Л. В. Орлова. *Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я*. К.: «Укрмедпатентінформ». 2010. №2. (Здобувач дослідила можливість впровадження додаткового етапу очищення препарату «Кріопреципітат», підготувала матеріали до друку).

#### **Тези наукових доповідей**

20. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Одержання фактора VIII згортання крові – основні тенденції. *Укр. хім. журн*. 2008. № 1-2. (м. Черкаси, 2–3 жовт.,

- 2008). (Здобувач провела літературний пошук, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
21. **Shurko N., Danysh T.** Presence of factor VIII in blood Cohn fractions and his purification. *Vox Sanguinis*. 2008. Vol. 95. Suppl. 1. P. 237. (Масао, Китай. 7–8 черв., 2008). (Здобувач провела дослідження активності FVIII на різних етапах фракціонування плазми, підготувала тези до друку).
22. Застосування діасорбу амінопропілового для одержання високоочищених білкових препаратів з плазми крові / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова, С. Є. Мадич. *Тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я».* (м. Луганськ, 26–27 берез., 2009 р.). С. 24–25. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
23. **Shurko N., Danysh T.** A rapid purification of coagulation factor VIII from a cryoprecipitate. *Clin Chem Lab Med*. 2009. Vol. 47. P. 227–228. (Innsbruck, Австрія, 7–11 черв., 2009). (Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).
24. **Шурко Н. О., Даниш Т. В.** Створення технології виділення та очищення фактора VIII згортання крові з використанням біоімітуючих кремнеземних сорбентів. *Матеріали ювілейної наук.-практ. конф. «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини».* (м. Львів, 27–28 трав., 2010 р.). С. 187–188. (Здобувач узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
25. **Шурко Н. О., Даниш Т. В.** Вірусна безпека препаратів фактора згортання крові VIII. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченої 80-річчю служби крові Криму.* (АР Крим, м. Алушта, 23–24 трав., 2013 р.). С. 59–60. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези).
26. **Shurko N. O., Danysh T. V.** The purification of factor VIII by the method of negative affinity chromatography. *Book Abstract Bari International Conference.*

2014. P. 34. (*Bari, Італія, 3–5 жовт., 2014*). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стендову доповідь).
27. **Shurko N. O.**, Danysh T. V. Negative affinity chromatography as the method purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med.* 2014. Vol. 52. P. 914. (*Istanbul, Туреччина, 22–25 черв., 2014*). (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
28. **Шурко Н. О.**, Орлова Л. В., Даниш Т. В. Вірусна безпека антигемофільних препаратів. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Нове у медицині сучасного світу».* (м. Львів, 28–29 листоп., 2014 р.). С. 110–113. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
29. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Корецька Н. Р. Фракціонування плазми крові: основні тенденції. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення».* (м. Київ, 7–8 листоп., 2014 р.). С. 86–88. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
30. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Розробка методики визначення концентрації тіоціанату амонію у біологічних рідинах. *Тези доп. IV міжнар. мед. конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України».* (м. Київ, 15–17 квіт., 2015 р.). С. 75. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
31. **Шурко Н. О.** Методи отримання плазмових препаратів фактора VIII. *Тези доп. X Ювілейної південноукр. наук.-практ. конф. «Вища школа в рішенні проблем внутрішньої медицини», присвяченої 115-річчю Одеськ. нац. мед. ун-ту.* (м. Одеса, 9 квіт., 2015 р.). С. 140–141.
32. **Шурко Н. О.**, Дульцева Н. А., Даниш Т. В. Застосування вірусних інактиваторів в процесі технології одержання факторів згортання крові та фібринолізу. *Зб. тез наук. праць «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках».* (м. Київ, 4–5 груд., 2015 р.). С. 96–99. (Здобувач

- досліджувала вплив вірус-інактивуючих речовин на активність факторів зсідання крові, підготувала тези до друку).
33. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Афінна хроматографія фактора VIII зсідання крові з використанням тріазинових барвників в якості лігандів. *Матеріали наук-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, 21 квіт., 2016 р.). С. 179. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
34. Новак В. Л., **Шурко Н. О.**, Миськів І. М. Скринінг донорської крові та її компонентів як основа вірусної безпеки трансфузійної медицини. *Тези доп. III міжнар. конгресу з інфузійної терапії.* (м. Київ, 6–7 жовт., 2016 р.). С. 124–125. (Здобувач провела аналіз результатів поширення вірусних захворювань серед населення України, підготувала тези до друку).
35. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Технологія очищення фактора VIII згортання крові. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, 21 квіт., 2016 р.). С. 179. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
36. **Shurko N.**, Danysh T., Danysh O. Effect of thiocyanate on the activity of blood coagulation factor VIII. *Haematologica. Abstract book.* 2016. Vol. 101 (s1). P. 878. (Copenhagen, Данія, 9–12 черв., 2016). (Здобувач дослідила вплив тіоціанату-амонію на активність FVIII, підготувала тези до друку).
37. **Shurko N.**, Danysh T. The method of purification blood coagulation factor VIII. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2016. Vol. 38 (S2). P. 97–98. (Milano, Італія, 12–14 трав., 2016). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
38. **Shurko N.**, Novak V., Danysh T., Voytsitskyu J. La cromatografia di affinità con treazine-colorante come il metodo purificazione del fattore VIII. *Blood Transfusion.* 2017. 15. Suppl. № 1. P. 75–76. (Firenze, Італія, 25–27 трав.,

- 2017). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стендову доповідь).
39. **Shurko N.**, Danysh T., Novak V. Affinity chromatography with dye – new method for the purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med.* 55. Special Suppl. June. 2017. P. 731. (Athens, Греція, 11–15 черв. 2017). (Здобувач провела афінну хроматографію, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
40. **Shurko N.**, Danysh T., Novak V. The new method of purification factor coagulation VIII. *Haematologica. Abstract book.* 2017. Vol. 102 (s1). P. 881–882. (Madrid, Іспанія, 14–17 черв., 2017). (Здобувач розробила технологічну схему очищення FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
41. **Shurko N.**, Danysh T. Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation. *International Journal of laboratory Hematology.* 2017. Vol. 39 (Issue S2). P. 109. (Honolulu, Гаваї, 4–6 трав., 2017). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
42. **Shurko N.**, Novak V., Danysh T. The basis of viral safety of transfusion medicine: screening of donor blood and methods of virus inactivation. *20<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESCV.* (Lago Maggiore, Італія, 13–16 верес., 2017). *Abstract book.* 2017. P. 177. (Здобувач провела дослідження використання різних вірус-інактивуючих речовин, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
43. **Shurko N.**, Danysh T., Voroniak M., Novak V. The advantages of using PEG-precipitation in the isolation and purification of factor coagulation VIII. *Blood Transfusion.* 2017. Vol. 15. Suppl. № 3. P. 492. (Rome, Італія, 15–17 верес., 2017). (Здобувач провела дослідження впливу ПЕГ-4000 у схемі одержання FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....</b>	<b>21</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>23</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>31</b>
1.1 Структура та функції фактора VIII зсідання крові.....	31
1.1.1 Синтез та структура молекули фактора VIII.....	32
1.1.2 Взаємодія фактора VIII з фактором фон Віллебранда.....	35
1.2 Методи одержання фактора VIII.....	36
1.2.1 Методи отримання препаратів фактора VIII зсідання крові – основні тенденції .....	37
1.2.2 Очищення фактора VIII методом іонообмінної хроматографії.....	39
1.2.3 Отримання фактора VIII методом афінної хроматографії.....	43
1.3 Активні барвники в ролі афінних лігандів.....	47
1.4 Вірусна безпека антигемофільних препаратів.....	50
1.5 Застосування препаратів фактора VIII зсідання крові.....	56
1.6 Висновки до розділу 1.....	59
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>61</b>
2.1 Вибір напрямку дослідження.....	61
2.2 Матеріали, реагенти, обладнання.....	61
2.2.1 Матеріали та реагенти.....	61
2.2.2 Обладнання .....	63
2.3 Методи досліджень.....	63
2.3.1 Визначення концентрації білка .....	63
2.3.2 Визначення альбуміну в сироватці (плазмі) крові.....	63
2.3.3 Синтез біоспецифічних кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками («метод включення солі»).....	63
2.3.4 Методи дослідження системи гемостазу.....	65
2.3.4.1 Уніфікований одностадійний метод кількісного визначення фактора VIII (IX).....	65

2.3.4.2	Метод визначення активності фактора VIII за допомогою хромогенного пептидного субстрату.....	66
2.3.4.3	Визначення активності фактора фон Віллебранда .....	67
2.3.4.4	Методи визначення концентрації імуноглобулінів до фактора VIII .....	68
2.3.4.5	Визначення активності тромбіну.....	69
2.3.4.6	Визначення концентрації фібриногену.....	70
2.3.5	Електрофоретичні дослідження.....	70
2.3.6	Іонообмінна хроматографія фактора VIII на DEAE-Sepharose.....	71
2.3.7	Афінна хроматографія фактора VIII зсідання крові на кремнеземних сорбентах.....	72
2.3.8	Статистичні методи.....	72
2.4	Висновки до розділу 2.....	72

### **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....73**

3.1	Дослідження властивостей макропористих кремнеземних сорбентів з іммобілізованими активними барвниками, придатних для очищення фактора VIII зсідання крові.....	73
3.1.1	Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами-барвниками.....	73
3.1.2	Дослідження фізико-хімічних властивостей лігандів та сорбентів....	82
3.1.3	Очищення фактора VIII на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками .....	90
3.1.3.1	Дослідження сорбції/десорбції фактора VIII.....	90
3.1.3.2	Дослідження сорбційних властивостей хроматографічного сорбенту з матрицями різної пористості.....	100
3.1.3.3	Дослідження сорбційної ємності сорбентів .....	103
3.1.4	Висновки до розділу 3.1.....	104
3.2	Застосування хімічних речовин в ролі вірус-інактивууючих агентів у схемі отримання фактора VIII зсідання крові.....	106
3.2.1	Дослідження впливу вірус-інактивууючих агентів на активність фактора VIII зсідання крові.....	106

3.2.2	Визначення концентрації вірус-інактивуючих реагентів у досліджуваних білкових розчинах.....	111
3.2.3	Висновки до розділу 3.2.....	112
3.3	Обґрунтування послідовності застосування етапів у схемі одержання фактора VIII зсідання крові .....	114
3.3.1	Попереднє фракціонування плазми крові .....	114
3.3.2	Отримання фактора VIII методом афінної сорбції на кремнеземних сорбентах.....	118
3.3.3	Отримання фактора VIII комбінацією хроматографічних методів.....	121
3.3.3.1	Отримання фактора VIII хроматографічним методом без попередніх етапів фракціонування.....	121
3.3.3.2	Отримання фактора VIII хроматографічним методом з додатковим використанням попередніх етапів фракціонування.....	123
3.3.4	Визначення наявності нецільових білків на різних етапах одержання фактора VIII зсідання крові.....	125
3.3.5	Дослідження властивостей отриманих зразків очищеного препарату фактора VIII .....	128
3.3.5.1	Вплив зберігання очищеного препарату фактора VIII на його біоактивність.....	128
3.3.5.2	Визначення концентрації імуноглобулінів за допомогою отриманого препарату фактора VIII.....	129
3.3.6	Висновки до розділу 3.3.....	131
<b>РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>		<b>133</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>		<b>151</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>		<b>153</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>		<b>180</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

**а. к. з.** – амінокислотні залишки

**Å** – ангстрем,  $10^{-10}$  м

**АЧТЧ** – активований частковий тромбопластиновий час

**АТІІІ** – антитромбін ІІІ

**БО** – Бетесда одиниць

**БСА** – бичачий сироватковий альбумін

**ВРХ** – велика рогата худоба

**ДВЗ** – дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові

**кДа** – кілодальтон

**ЛСА** – сироватковий альбумін людини

**МО** – міжнародна одиниця активності фактора

**мРНК** – матрична рибонуклеїнова кислота

**ПААГ** – поліакриламідний гель

**ПЕГ** – поліетиленгліколь

**п.н.** – пар нуклеотидів

**ППСБ** – білки протромбінового комплексу (протромбін, проконвертин, Стюарт-фактор, антигемофільний фактор В)

**СЗП** – свіжозаморожена плазма

**СПК** – станції переливання крові

**ТЕАЕ** – триетиламіноетил

**т.п.н.** – тисяч пар нуклеотидів

**Тріс** – тріс(гідргідроксиметил)амінометан

**ФЕК** – фотоелектроколориметр

**ЦК** – центри крові

**АРС** – активований білок С

**ВНК** - baby hamster kidney

**CAS** – реєстр хімічних сполук (Chemical Abstracts Service)

**C.I.** – Color Index

**СНО** – Chinese hamster ovary

**DEAE** – диетиламіноетил

**FV** – фактор V

**FVIII** – фактор VIII

**FIX** – фактор IX

**FX** – фактор X

**FXIII** – фактор XIII

**HAV** – вірус гепатиту A

**HBV** – вірус гепатиту B

**HCV** – вірус гепатиту C

**HIV** – вірус імунодефіциту людини

**IgG** – імуноглобулін G

**MIO** – одна оиниця Malmö

**NIH** – Національний інститут здоров'я (National Institute of Health)

**vWF** – фактор фон Віллебранда

**SDS** – додецилсульфат натрію (sodium dodecyl sulfat)

$\lambda$  – довжина хвилі

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Проблема переробки донорської плазми крові з метою створення ефективних лікарських препаратів та діагностичних засобів є актуальною. На сьогоднішній день відомо і опубліковано велику кількість методів фракціонування плазми крові, виділення та очищення її компонентів, зокрема, факторів зсідання крові та фібринолізу. Особливо привабливими з точки зору ефективності є методи біоспецифічної хроматографії [72–74, 77, 81, 99, 100, 109, 119, 187, 188, 197].

Препарати плазми крові посідають значне місце серед лікарських засобів та відіграють важливу роль у лікуванні цілої низки захворювань [64, 65, 169]. Відомо, що загальна частка плазми, що піддається фракціонуванню у світі становить 48,4 млн л на рік [208]. Водночас, існує постійний дефіцит плазми для задоволення потреб в терапевтичних препаратах, особливо альбуміну (близько 500 т), імуноглобуліну G (40 т) та фактора VIII (1 кг, 200000 доз) [78, 91]. Оптимізація технологій фракціонування білків плазми крові є надзвичайно важливою не тільки для зменшення собівартості препаратів, але й для розширення їх асортименту та підвищення якісних характеристик отриманих продуктів [74].

З метою запобігання дефіциту фактора VIII і кровотеч у пацієнтів із гемофілією А проводять замісну терапію введенням його плазмових або рекомбінантних препаратів [111, 164, 205, 237, 238, ]. Препарати фактора VIII для клінічного використання представлені на ринку багатьма виробниками Європи, Азії та США (Baxter BioScience (Австрія), Kedrion (Італія), Octapharma (Австрія, Швеція, Франція), Grifols (Іспанія), Behring GmbH (Німеччина), Pfizer (Швеція), GreenCross (Південна Корея), Bayer (Німеччина, США)). Вітчизняний препарат фактора VIII виробляє фірма «Біофарма». Висока вартість препаратів фактора VIII зумовлює їх дефіцит в Україні, а відповідно й низьку ефективність лікування гемофілії А. З огляду на це, розробка й оптимізація методів одержання високоактивних препаратів фактора VIII зсідання крові для

збільшення обсягу його виробництва та зниження вартості є актуальною проблемою сьогодення [34, 36, 51].

Препарати фактора VIII зсідання крові різної чистоти одержують при застосуванні різноманітних методів: ізоелектричного осадження, висолювання, осадження органічними розчинниками та кріопреципітації [16, 75]. В даний час ці методи комбінують з іоно-обмінною, гель-проникною та афінною хроматографіями [72, 83, 119, 124, 139, 152, 155, 199, 202, 235], а також у поєднанні з методами антивірусної обробки (застосування детергентів, термоінактивації та фотоінактивації в процесі очищення) [60, 68, 73, 75, 102, 117, 127, 138, 160, 188].

Хроматографічні методи, зокрема, афінна хроматографія, є найбільш ефективними при одержанні високоочищених препаратів білків плазми крові [110]. При цьому суттєве значення має, як вибір специфічного ліганду, так і природа носія, який використовують для іммобілізації. Промислове використання хроматографічних сорбентів суттєво залежить від вибору матриці, яка повинна відповідати певним вимогам, а саме: придатна для багаторазового використання, зручна у роботі, доступна і відносно недорога [75, 96, 110].

Відомо, що неорганічні полімерні носії володіють рядом переваг в порівнянні з органічними. Основною перевагою кремнеземних сорбентів над органічними є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації [85, 95, 148].

В якості лігандів в афінних сорбентах використовують інгібітори досліджуваного білка, амінокислотні залишки, що відповідають специфічності ферменту тощо. Особливу групу лігандів для афінної хроматографії утворюють активні, зокрема тріазинові та вініл-сульфонові барвники. Завдяки тріазиновому кільцю вони утворюють міцні ковалентні зв'язки з матрицями [70, 71, 85, 95, 148]. Бокові замісні групи барвників визначають їх специфічність стосовно того чи іншого білка. Застосування активних тріазинових барвників привело до започаткування нового напрямку наукових

досліджень – біоімітуючої хроматографії. Структура цих барвників доволі складна, а механізм та причини взаємодії з білками, ферментами та іншими сполуками до кінця не в'яшені. Відомо, що біоспецифічні сорбенти на основі органічних матриць та тріазинових лігандів застосовують для очистки дегідрогеназ, кіназ і мутаз, СоА-залежних ферментів, нуклеаз, полімераз, рестриктаз, фосфорилаз, аміотрансфераз, факторів зсідання крові, сироваткового альбуміну, білків комплементу, інтерферону та ін. [63, 70, 92 251]. Проте, на фоні великої кількості робіт з вивчення властивостей активних барвників для очищення альбуміну, нуклеотидзалежних ферментів, їх застосування для очищення фактора VIII зсідання крові вивчені недостатньо.

Таким чином, створення нового способу одержання фактора VIII методом біоспецифічної хроматографії з використанням модифікованих кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками є актуальною задачею з практичним значенням для сучасного виробництва плазмових препаратів та трансфузійної медицини.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом наукових досліджень ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» і безпосередньо пов'язана з такими науково-дослідними роботами, виконавцем яких була здобувач: «Одержання біоспецифічних сорбентів на основі пористих силохромних матриць та лігандів тріазинової групи, придатних для виділення високоочищених препаратів серинових протеїназ з плазми крові» (№ Держреєстрації 0107U001131, 2007–2009); «Дослідити ефективність застосування методів антивірусної обробки у технології виділення та очищення білкових факторів плазми крові з використанням афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах» (№ Держреєстрації 0113U003164, 2013–2015); «Одержати нові біоспецифічні сорбенти на основі кремній-неорганічних матриць та дослідити їх властивості та ефективність застосування у технології фракціонування плазми крові» (№ Держреєстрації 0116U000177, 2016–2018).

Робота була підтримана індивідуальним грантом від Західно-Українського Біомедичного Центру (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC) за темою «Coagulopathy – perspectives of diagnostics and treatment» (2008–2009).

**Мета і завдання дослідження.** *Мета* роботи полягала у розробці методу одержання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням новосинтезованих біоспецифічних кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками та дослідження властивостей отриманих препаратів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі основні *завдання*:

- синтезувати нові біоспецифічні сорбенти іммобілізацією активних барвників на кремній-неорганічній матриці та дослідити їх фізико-хімічні властивості;
- вивчити умови сорбції/десорбції фактора VIII синтезованими афінними сорбентами;
- дослідити ефективність використання кремнеземних сорбентів для проведення афінної хроматографії фактора VIII зсідання крові;
- розробити технологічну схему одержання препарату фактора VIII із використанням афінної хроматографії на модифікованих кремнеземних сорбентах;
- визначити оптимальні умови антивірусної обробки препаратів фактора VIII в процесі їх одержання.

*Об'єкт дослідження* – процес одержання високоактивного вірус-безпечного препарату фактора VIII зсідання крові із застосуванням методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими барвниками.

*Предмет дослідження* – фактор VIII зсідання крові; властивості отриманого препарату фактора VIII; макропористі кремнеземні сорбенти з іммобілізованими активними барвниками та їх властивості.

**Методи дослідження.** У дисертаційній роботі використовували такі методи: хімічного синтезу макропористих кремнеземних сорбентів з активними тріазиновими та вініл-сульфоновими барвниками; фракціонування білків плазми крові; ультрадіафільтрації; афінної та іонообмінної хроматографії; спектрофотометричні; електрофоретичні; коагулологічні та методи з використанням специфічних хромогенних субстратів визначення активності факторів зсідання крові й кількості імуноглобулінів до фактора VIII; антивірусної обробки сольвент-детергентним та тіоціанатним методами; статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертаційній роботі вперше застосовано афінну хроматографію на макропористих кремнеземних сорбентах з активними барвниками в ролі лігандів для очищення фактора VIII зсідання крові. З'ясовано, що очищення фактора VIII відбувалося завдяки явищу негативної афінної сорбції за умов відповідного рН розчину та розміру пор матриці.

Із 16 синтезованих сорбентів відібрано 5, що є оптимальними для очищення фактора VIII зсідання крові (Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К) (патент на винахід № 94299 «Спосіб очищення фактора VIII», 2011).

Обґрунтовані переваги поєднання етапів попереднього фракціонування плазми крові та кріопреципітату з хроматографією, що дало змогу досягнути значно вищого ступеня очищення (242 та 702 рази, відповідно) за рахунок видалення нецільових білків (патент на корисну модель № 107509 «Спосіб виділення фактора VIII згортання крові», 2016).

Досліджено вплив вірус-інактивуєчих речовин на активність фактора VIII зсідання крові та продемонстровано зворотність такого впливу. З'ясовано, що методи визначення активності фактора VIII з використанням специфічних хромогенних субстратів, на відміну від коагулологічних, менш чутливі до

наявності домішок і рекомендовані для використання на всіх етапах одержання фактора VIII.

Доведено, що досліджувані сорбенти також не зв'язують фактор фон Віллебранда (vWF), внаслідок чого забезпечується вихідний рівень співвідношення  $FVIII/vWF:R_{cof}$ .

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено технологічні схеми отримання препаратів вірус-безпечного фактора VIII зсідання крові з використанням етапів попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах у поєднанні з етапами антивірусної обробки.

Обґрунтовано доцільність впровадження у практику промислового виробництва методу афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах із іммобілізованими активними барвниками для отримання очищених препаратів фактора VIII зсідання крові.

Видано інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Спосіб очищення фактора VIII згортання крові» (Київ, 2010).

Основні результати досліджень та положення роботи впроваджено у практику відділення заготівлі крові та її компонентів Львівського обласного центру служби крові; військово-медичного клінічного центру Західного регіону м. Львів та відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітин НАНУ, м. Львів.

**Особистий внесок здобувача.** Автор особисто зібрала й проаналізувала літературні джерела на тему дослідження та розробила алгоритм розв'язання поставлених завдань.

Під час виконання експериментальної частини роботи здобувач особисто проводила експериментальні дослідження і первинний аналіз отриманих даних. Разом із науковим керівником сформульовано мету і завдання дослідження, а також пошук шляхів їх вирішення. Автор статистично опрацювала матеріал, проаналізувала, узагальнила та інтерпретувала отримані результати, підготувала до публікації основні матеріали, написала всі розділи дисертації,

сформулювала висновки. При аналізі та узагальненні результатів досліджень користувалася порадами наукового керівника – завідувача лабораторії біохімії крові, кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Т. В. Даниша.

У процесі проведення окремих етапів досліджень брали участь співробітники лабораторії біохімії крові, деякі дослідження проведені в інших лабораторіях та відділеннях ДУ «Інституту патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» (директор Інституту, Заслужений діяч науки і техніки України, д.мед.н., професор В. Л. Новак; завідувачі: к.б.н., с.н.с. М. І. Вороняк, к.мед.н. Ю. В. Войціцький).

**Апробація результатів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи представлено на: XXXth International Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT, Макао, Китай, 7–8 черв. 2008); I та III міжнародних конгресах з інфузійної терапії (м. Черкаси, 2–3 жовт. 2008; Київ, 6–7 жовт. 2016); III міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я» (м. Луганськ, 26–27 берез. 2009); 18<sup>th</sup> і 22<sup>nd</sup> IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Innsbruck, Австрія, 7–11 черв. 2009; Athens, Греція, 11–15 черв. 2017); ювілейній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини» (м. Львів, 27–28 трав. 2010); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченій 80-річчю служби крові Криму (АР Крим, Алушта, 23–24 трав. 2013); міжнародній науково-практичній конференції «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення» (м. Київ, 7–8 лист. 2014); міжнародній науково-практичній конференції «Нове у медицині сучасного світу» (Львів, 28–29 лист. 2014); 22<sup>nd</sup> International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab, Istanbul, Туреччина, 22–25 черв. 2014); 8<sup>th</sup> і 9<sup>th</sup> Bari International Conference (Bari, Італія, 3–5 жовт. 2014; Rome, Італія, 15–17 верес. 2017); IV міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних

досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України» (м. Київ, 15–17 квіт. 2015); X ювілейній південно-українській науково-практичній конференції «Вища школа у вирішенні проблем внутрішньої медицини», присвяченій 115-річчю Одеського національного медичного університету (м. Одеса, 9 квіт. 2015); науково-практичній конференції «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках» (м. Київ, 4–5 груд. 2015); V науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку» (м. Київ, 21 квіт. 2016); 29<sup>th</sup> та 30<sup>th</sup> International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (Milano, Італія, 12–14 трав. 2016; Honolulu, Гаваї, 4–6 трав. 2017); 21<sup>th</sup> і 22<sup>nd</sup> Congress European Hematology Association (Copenhagen, Данія, 9–12 черв. 2016; Madrid, Іспанія, 14–17 черв. 2017); міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії», присвяченій 100-річчю від дня народження професора Б. Ф. Сухомлинова (м. Львів, 16–18 лист. 2016); 5 Conferenza Nazionale dei Servizi Transfusionali SIMTI (Firenze, Італія, 25–27 трав. 2017); 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESCV (Lago Maggiore, Італія, 13–16 верес. 2017).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано у 43 наукових працях, з яких 10 статей у наукових фахових виданнях України (2 одноосібні), 3 статті у наукових фахових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 3 статті в інших наукових журналах, 2 патенти України (1 – на винахід та 1 – на корисну модель), 1 інформаційний лист, 24 тези доповідей у матеріалах з'їздів та конференцій, у тому числі 12 закордонних.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація викладена на 194 сторінках комп'ютерного тексту (основна частина – 115 сторінок) і сформована з анотації, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та їх узагальнення, висновків, списку використаних джерел та 8 додатків. Дисертаційна робота ілюстрована 24 таблицями та 28 рисунками на 30 сторінках. Бібліографічний список налічує 254 найменувань (57 кирилицею та 197 латиницею).

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Структура та функції фактора VIII зсідання крові

В основі функціональної активності білкових молекул лежить їх здатність брати участь у визначених для кожного білка міжмолекулярних взаємодіях. Ця «спеціалізація» забезпечує формування для кожної молекули нативної, єдиної, відповідної лише для неї та певного визначеного етапу процесу конформації [23].

Гемостаз – складна біологічна система поєднання прокоагулянтних, антикоагулянтних та фібринолітичних факторів, яка попереджує або зупиняє кровотечу та сприяє підтриманню крові в рідкому стані завдяки взаємодії судинно-тромбоцитарного та коагуляційного механізмів [4, 31, 131]. Як результат цього балансу, з одного боку, кров залишається в рідкому стані, а з іншого, попереджає виникненню надмірної кровотечі, сприяючи утворенню згустків після ушкодження ендотелію в місці ураження. Ця рівновага залежить від багатьох параметрів, в тому числі і від кількості та функціональної активності тромбоцитів, а також факторів зсідання крові та інгібіторів [246]. В судинно-тромбоцитарному гемостазі основна роль в зупинці кровотечі належить судинній стінці та тромбоцитам, а в коагуляційному – факторам зсідання крові [31, 84].

Фактор зсідання крові VIII (FVIII) – це неферментативний кофактор активованого фактора IX (FIXa), який при протеолітичній активації утворює з FIXa щільний нековалентний комплекс, що зв'язує та активує фактор X (FX) [163]. Дефекти гену FVIII можуть спричинити розвиток гемофілії А – X-зв'язаного спадкового рецесивного захворювання, що спостерігається з частотою 1 на 5000 чоловіків [38, 163, 154]. Приблизно половина усіх випадків гемофілії А спричинена інверсіями інтрона 22 гену FVIII, ще 5 % – інверсіями в інтроні 1 [237].

### 1.1.1 Синтез та структура молекули фактора VIII

На сьогодні відомо, що ген FVIII локалізований на великому плечі X-хромосоми (хромосомна локалізація Xq28) [31], займає ділянку приблизно 186 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) і складається з 26 екзонів (розміром від 69 до 3106 пар нуклеотидів (п.н.)), розділених 25 інтронами (розміром від 207 п.н. до 32,4 т.п.н.) [25]. Загальна довжина кодувальної послідовності цього гену рівна 9 т.п.н. Повний ген становить близько 0,1% від усієї X-хромосоми [47, 112].

Відмічено, що експресія гену FVIII є тканинспецифічна та, швидше за все, відбувається в гепатоцитах, хоча матрична рибонуклеїнова кислота (мРНК) FVIII була також виявлена в клітинах інших тканин [25, 38]. Найвищий рівень мРНК і білка FVIII виявлено в клітинах ендотеліальної вистілки синусоїдних капілярів печінки, значну кількість відмічено також в гепатоцитах і клітинах Купфера (резидентні макрофаги вистілки синусоїдів) [23].

Описано біля 160 місенс-мутацій гену FVIII [170]. З проаналізованих 80 точкових мутацій 27 викликають розвиток тяжкої форми гемофілії А, 29 – середньої форми тяжкості та 18 – легкої [31]. Приблизно у 5 % хворих на гемофілію А рівень фактора, визначений імунологічно, є вищим у порівнянні з біологічною активністю, що є результатом синтезу молекули із зниженою функціональною активністю [2, 25, 38]. Мутації можуть виникати як в екзонах, так і в інтронах, а також в 3'-нетранслюючій області, промоторі та в сигнальній ділянці. Наприклад, приблизно у половини хворих з тяжкою формою гемофілії А виявлено пошкодження в інтронах 22 і 23, які відповідальні за кодування C1 домену [179].

Відомо про більше ніж 60 різних делецій в гені FVIII, причому встановлено, що гемофілія А, яка виникає в результаті делецій, в 5 раз частіше супроводжується появою імунних антитіл, ніж у пацієнтів без делецій [16, 31].

У літературі зазначено, що зрілий білок FVIII синтезується у вигляді одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою приблизно 330 кДа та містить 2332 амінокислоти, яким передують 19 залишків гідрофобного

сигнального пептиду [163, 214]. У лідерний пептид входить ядро з 10-ти гідрофобних амінокислотних залишків, оточених радикалами, що несуть електростатичний заряд, утворюючи структуру як у більшості секреторних білків [16].

Білок FVIII має доменну структуру конформації [31, 151, 167, 243], у ньому виділяють: домен–А, який повторюється тричі, центральний В–домен і два С–домени. На границях А доменів розміщені три кислі субдомени, що позначають як a1–a3 (A1(a1) –A2(a2) –В– (a3)A3–C1–C2) і які відіграють важливу роль при взаємодії FVIII з іншими білками [114, 172, 176]. Існує думка, що зміни у цих субдоменах приводять до зниження рівня активації FVIII тромбіном [38].

А–домени FVIII на 30 % гомологічні один одному (приблизно 330 амінокислотних залишків (а.к.з.) кожен), А–доменам фактора V (FV) та мідь-зв'язуючому білку людини – церулоплазмину. На сьогодні відомо, що домен A1 FVIII координує іон міді [38]. У літературі зазначено, що взаємодія поліпептидного ланцюга FVIII з іонами металів відповідає за його структурну цілісність та кофакторну функцію [62, 250]. На думку дослідників [58, 89, 156, 213] ділянка 558–565 домену A2 відповідає за зв'язування з FIXа та його конформаційну перебудову в складі тенази.

Домени C1 та C2 (приблизно по 150 а.к.з. кожен), що входять в склад легкого ланцюга зрілої молекули FVIII, гомологічні доменам C1 та C2 FV [127], С-кінцевим доменам білка MFG8 (milk fat globule EGF factor 8, lactadherin) та фрагменту дискоїдину I [90].

Центральний В–домен FVIII частково відщеплюється від молекули зрілого білка. На нього припадає приблизно 40 % амінокислотної послідовності (983 а.к.з.) та містить 25 потенційних місць для N-глікозилювання, 16–19 з яких фактично містять N-зв'язуючі олігосахариди при значному рівні мікрогетерогенності. Виходячи зі значної гомології факторів VIII та V, висувається припущення про еволюційне походження гену FVIII в результаті процесу дуплікації. При цьому відмічено, що функціональні домени А і С цих

білків консервативні, а подібність доменів В обмежена високим ступенем глікозилювання, що свідчить на користь функціональної значимості високої щільності олігосахаридних груп в домені В FVIII [38, 120].

FVIII в плазмі крові людини знаходиться в концентрації 1–2 мг/мл [81], а за іншими даними ще в нижчій – порядку 0,1–0,2 мг/мл [31], стабільним при рН 6,5–8,5, ізоелектрична точка є в межах 6,95–7,02 [77].

Для відновлення прокоагулянтної активності FVIII при дисоціації-ресоціації ланцюгів необхідні як іони міді, так й іони кальцію та марганцю. При цьому відмічено, що іони кальцію і марганцю не впливають на димеризацію ланцюгів, але сприяють утворенню активної конформації у відновленої молекули FVIII [250], зв'язуючись з сайтами, розміщеними на обох ланцюгах білка [113]. В склад FVIII входить 19 цистеїнових залишків, 16 з яких утворюють дисульфідні зв'язки з двохвалентними іонами металів [31].

Активація FVIII при ініціації процесу зсідання крові здійснюється тромбіном (FII) чи FXa та полягає у протеолітичних розривах в певних визначених місцях білкової молекули [16, 31, 38]. Відмічено, що на першому етапі активації тромбіном розщеплюються пептидні зв'язки в положеннях Arg740 та Arg1689 [38]. В результаті цього відщеплюється домен В, важкий ланцюг розділяється на незв'язані ковалентні домени та відокремлюється коротка кисла область а3 перед доменом А3 [172]. Ця модифікація збільшує активність FVIII в 5 разів [31]. На другій стадії повна активація забезпечується розщепленням ще одного пептидного зв'язку в положенні Arg372. Активація FVIII FXa відбувається за аналогічною схемою розриву цих пептидних зв'язків та двох-трьох додаткових у положенні Arg1721, Arg336 та Arg36 [176]. Причому зауважено, що взаємодія FVIII з тромбіном опосередкована через сульфатування залишків тирозину в молекулі FVIII, тоді ж як активація FXa практично не чутлива до заміни у сайтах сульфатування [174].

Щодо інактивації FVIIIa, то вона може відбуватись спонтанно та полягає у відділенні домену А2 важкого ланцюга [131, 143]. Описано дві специфічні інактивації FVIIIa – APC та FXa [58]. APC інактивує FVIIIa через низку

протеолітичних розщеплювань в положеннях Arg336 домену–A1 і в Arg562 домену–A2 [93]. Інактивація FVIIIa за допомогою FXa відбувається значно швидше, ніж APC, та полягає у протеолітичному розщепленні зв'язків у позиціях Arg336 та K36, що спричиняє дестабілізацію домену A1 та відокремлення вільного A2 домену [38].

### 1.1.2 Взаємодія фактора VIII з фактором фон Віллебранда

Відомо, що практично весь FVIII в плазмі крові входить до складу нековалентного комплексу з шапероном – фактором фон Віллебранда (vWF) – та може дисоціювати при високій іонній силі. Період півжиття FVIII в цьому комплексі складає 10–12 год, а в дисоційованому вигляді – 2,5 год. Константа зв'язування складає  $5,9 \pm 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [16, 31].

На думку більшості дослідників vWF виступає основним регулятором FVIII, а саме: дозволяє тромбіну активувати зв'язаний FVIII [69, 130], запобігає розщепленню протеазами FXa [174, 240, 249] та активованим білком С (APC) [93, 121, 143, 175]. Зазначено, що vWF попереджує неспецифічне зв'язування FVIII з мембранами клітин ендотелію судин [253] і тромбоцитів [220], через що FVIII не може бути частиною Теназного комплексу з FIXa, фосфоліпідами та іонами кальцію.

Приєднується vWF до N-кінцевої ділянки легкого ланцюга, де розташовані два сульфатовані залишки тирозину (1664 та 1668) і кислий фрагмент 1649–1689 (ділянка a2). Ця ділянка не лише задіяна у зв'язуванні, але й впливає на C2–домен, надаючи йому спорідненість до vWF. Синтез дисфункціональної молекули FVIII, у якої тирозин 1680 замінено на фенілаланін, веде до розвитку клінічної картини «м'якої» (легкої) форми гемофілії, що пов'язано з порушенням стабільності комплексоутворення [16, 38].

## 1.2 Методи одержання фактора VIII

Перший з відомих препаратів FVIII – «Кріопреципітат» описаний в середині 60-их років ХХ-століття як концентрат антигемофільного FVIII, що використовувався для лікування гемофілії А, хвороби фон Віллебранда та гіпофібриногенемії [13, 194]. Кріопреципітат отримують в результаті повільного розмороження плазми при температурі  $+(2\div 4)$  °С. Це кріоглобулінова фракція високомолекулярних білків плазми крові (FVIII, vWF, FXIII, фібриноген та фібронектин). В слідових кількостях можуть бути присутні й інші білки, наприклад, імуноглобуліни [13, 80, 179, 194].

Кріопреципітат є стандартним компонентом крові, що виготовлявся в більшості центрів служб крові України [80]. Основними показаннями для клінічного застосування кріопреципітату були: дефіцит фібриногену (гіпофібриногенемія), викликаний значними кровотечами через травми, масивні трансфузії або дисеміноване внутрішньосудинне зсідання крові (ДВЗ) чи дисфібриногенемія, що пов'язана з функціональним порушенням фібриногену [13, 105]. Раніше кріопреципітат використовувався і для лікування гемофілії А та хвороби фон Віллебранда, але з появою концентратів факторів зсідання крові, його застосування відійшло на другий план [72, 115, 129, 144, 168, 170, 173, 177, 196].

Перші схеми фракціонування білків плазми крові базувалися на використанні хімічних або фізичних засобів преципітації сульфатом амонію, каприловою кислотою, етанолом, поліетиленгліколем (ПЕГ) або варіації рН/температури [110, 190, 231]. Наступним етапом було введення процесу хроматографії як селективної та специфічної процедури фракціонування/очищення [72, 73, 196, 229]. Такі методи були значно ефективніші, ніж стадії осадження, і викликали великий інтерес щодо очищення білків, що містяться в незначних кількостях [85, 100, 119, 141, 155, 202].

Традиційні методи виробництва FVIII включали стадії осадження, які були спрямовані на усунення білкових домішок, таких як фібриноген,

фібронектин та імуноглобуліни. Ці технології могли використовувати комбінування осадження при низьких температурах (-10) °С або додаванням білкових обволікаючих (осаджуючих) речовин – гідрофільних полімерів, таких як ПЕГ [231], полівінілпіролідон [81], декстран, фікол, перкол, гідроксиетильований крохмаль та інші [110]. Те ж саме відноситься і до застосування гліцину та хлориду натрію, рекомендованого Р. К. Ng, Н. С. Eguizabal та G. Mitra (1986) [173]. Аналогічним чином, деякі автори вдало об'єднували три обволікаючі агенти для отримання препаратів FVIII, а саме: ПЕГ, гліцин і хлорид натрію [185].

Використання хроматографічних методів у фракціонуванні плазми крові дозволило отримати препарати факторів зсідання (зокрема, FVIII) високого рівня чистоти та питомої активності [83, 162, 199].

### **1.2.1 Методи отримання препаратів фактора VIII зсідання крові – основні тенденції**

Кров людини – унікальний рідкий біологічний матеріал, що містить клітинні елементи (еритроцити, тромбоцити, лімфоцити) та плазму [72]. Фракціонування плазми крові є складною технологією, в якій тісно інтегровані різні виробничі процеси [21, 35, 44, 57, 91, 132, 193]. Традиційним методом переробки плазми є так зване етанольне фракціонування за Конном, хоча все частіше в технологічні процеси включають і хроматографічні стадії.

На сьогоднішній час фракціонування плазми є найбільшим сегментом промисловості виробництва білків для терапевтичного застосування [74, 75, 78, 96, 137]. Цим способом отримують препарати альбуміну та імуноглобуліну G (IgG) у відповідності з дотриманням наступних параметрів: концентрації етанолу, рН, температури, іонної сили, вмісту білка [78, 193]. Преципітат, отриманий на певному етапі фракціонування, відокремлюють центрифугуванням або фільтрацією. При етанольному фракціонуванні плазму розморозжують при температурі +(2÷4) °С, щоб відокремити кріопреципітат,

що містить FVIII, vWF, фібриноген та фібрoneктин [136]. Переваги етанольного фракціонування полягають у простоті, низькій токсичності, бактеріостатичних ефектах та інактивації вірусів. До недоліків відносять: низьку специфічність при очищенні слідових білків плазми і потенційний денатуруючий вплив етанолу або низьких значень рН на нестійкі білки (фактори коагуляції, інгібітори протеаз та антикоагулянти) [107, 136].

В промисловому виробництві терапевтичних препаратів використовують пул плазми сотень або навіть тисяч донорів. Заготівля плазми розглядається як невід'ємна частина виготовлення сучасних препаратів. Плазму для фракціонування повинні заготовляти ліцензовані державні установи та заклади (центри крові (ЦК) та станції переливання крові (СПК)), які контролюються відповідними національними регулятивними органами [24]. Заготовлені пули плазми проходять перевірку на якість і безпеку. Особливо важливими є процедура скринінгу донорів: тестування, маркування, документація, вимоги щодо походження, обробки крові та плазми [136]. Люди, які відповідають критеріям донорства (наприклад, вік і частота донацій) та не містять факторів ризику зараження інфекційними збудниками, отримують право бути донором [5]. Біля 35 % плазми в світі отримують шляхом центрифугування цільної крові, а 65 % – методом автоматизованого плазмаферезу. Плазму також можна отримати як побічний продукт при процедурі забору тромбоцитів [44, 75].

Середній вміст факторів зсідання крові в плазмі, зокрема FVIII, отриманій класичним методом нижчий, ніж у плазмі, одержаній методом плазмаферезу, тому що вимагає тривалішого часу обробки перед заморожуванням (цільна кров повинна бути додатково оброблена, щоб відокремити клітинні компоненти і плазму), вищий вміст антикоагулянту і, можливо, високий рівень клітинного забруднення, які можуть вивільнити протеолітичні ферменти, що впливають на стабільність факторів зсідання. Проте, слід зазначити, що плазма, отримана методом плазмаферезу, містить менше IgG [75].

### 1.2.2 Очищення фактора VIII методом іонообмінної хроматографії

Іонообмінне розділення суміші іонів визначається різницею їх зарядів, а також іонною силою розчину та широко використовується у промисловому фракціонуванні білків плазми крові [18].

У літературі зазначено, що аніонообмінна хроматографія є досить швидким і широко розповсюдженим методом фракціонування білків плазми крові [75, 199] і може бути використана також і для очищення FVIII з кріопреципітату [72, 139, 141, 196].

Зазвичай, для отримання високоочищених препаратів FVIII може бути використаний будь-який катіоніт, що має сульфопропіл- чи карбгидроксиметил-групи. Серед них широко використовуються: SP-Sepharose® Fast Flow і CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 і Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP і Poros® 10S (PerSeptive Biosystems), Toyopearl™ SP 550 C і Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas). Для очищення комплексу FVIII/vWF особливо добре підходить пористий гель, що має щупальцеву структуру типу Fractogel® EMD-SO3 і Fractogel® EMD COOH (Merck) [101].

A. J. Johnson та A. J. Fulton [181] отримували очищений FVIII з плазми крові великої рогатої худоби (BRX) за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці TEAE-целюлози (в 50 мМ Тріс-буфері, pH 8,6 та градієнті концентрацій солей NaCl).

Інша група дослідників (G. A. Vehar і E. W. Davie [247]) проводили очищення FVIII на DEAE-Sephadex в 20 мМ імідазольному буфері, pH 6,6, що містив: 0,15 М NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 20 мМ гліцин, етиловий ефір, 10% гліцерин і дитіотрейтол.

A. Faure та співавтори [119] очищали FVIII з плазми крові донорів на аніоніті, що має гідрофобні властивості завдяки гексильним залишкам (АН-Sepharose).

Описаний спосіб очищення FVIII, в якому екстракт кріопреципітату, обробленого гелем гідроксиду алюмінію, піддається хроматографії на аніоніті

полісахаридного типу при кислому значенні рН (від 5,0 до 6,5). В даній роботі використовували високі концентрації сахарози та гліцину [30].

Іншими дослідниками [186] рекомендовано, з одного боку, використання цукрів і багатоатомних спиртів для збільшення електростатичних сил на поверхні білка та зниження гідрофобності під час іонообмінної хроматографії, а з іншого – використання поверхнево активних речовин, таких як Твін-80 в хроматографічному буфері для елюції. В якості матриці дослідники використовували QAE-Sephadex A-25 і QAE-Sepharose SEPHAROSE 4B-Fast Flow (Pharmaci, Швеція).

Описаний також метод отримання препарату FVIII [188], який полягав у попередньому очищенні кріопреципітату гелем алюмінію гідроксиду при температурі між  $+(10\div 18)$  °C та аніонообмінної хроматографії на колонці DEAE-Fractogel (DEAE-Toyopearl®, Tosoh Bioscience) гідрофільного типу. Спосіб включав в себе стадії вірусної інактивації з використанням сольвент-детергентного методу. Аналогічні дані описані також і в патенті на винахід EP 0367840 [187].

T. Vurnouf та співавтори [72] описують розроблену процедуру очищення FVIII з кріопреципітату методом іонообмінної хроматографії на DEAE-Fractogel TSK 650 M. В іншій роботі ці ж автори [72] для отримання очищеного FVIII використовували свіжу або свіжозаморожену плазму. Перед очищенням на алюмінію гідроксиді проводили осадження хлоридом барію. Осад відокремлювали, а надосадову рідину з FVIII піддавали ультрафільтрації в присутності гепарину і вихідного буфера, що використовували для аніонообмінної хроматографії на DEAE-Fractogel або гель-фільтрації на сефадексі G25 з використанням цього ж буферу.

Описано також спосіб отримання FVIII, де зазначається, що матриці гелю вінілового полімеру, що містять DEAE групи з гідрофобними властивостями, мають особливу здатність адсорбувати великі білкові молекули та комплекси (FVIII, FVIII/vWF) [124]. Саме тому дослідники використовували у своїй роботі Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck).

У роботі М. Grandgeorge та співавторів рекомендовано застосування в буфері для елюції гліцин та лізин, що дозволяє уникнути використання кальцій хлориду для стабілізації фактора. Як іоніт використовували DEAE-Sepharose Fast Flow [185].

М. Poulle та Р. Bonneel описали метод очищення FVIII на іонообміннику Fractogel® TSK-DEAE 650 (DEAE-Toyopearl®, Tosoh Bioscience). Елюцію проводили селективно, за рахунок збільшення іонної сили буферу. Проте, такий метод, поряд з очищенням FVIII, не дає можливості отримати очищений vWF, який відіграє важливу роль в гемостазі, відповідаючи за дві важливі функції: як білок адгезії він сприяє агрегації тромбоцитів крові на субендотелію судини, а з іншого боку, забезпечує стабілізацію і транспортування FVIII [189].

Відомі також інші різноманітні хроматографічні методи отримання комплексу FVIII:C/vWF, наприклад, шляхом аніонообмінної, гідрофобної чи афінної хроматографії [196]. Так у роботі А. J. Johnson і А. J. Fulton описано отримання очищеного FVIII:C в результаті дисоціації комплексу VIII:C/vWF [181].

У. Linnau і W. Schoenhofer в ролі катіоніта застосовували смоли з карбоксильними чи сульфогідрильними-групами: S- чи DM-Sepharose (Amersham Pharmacia), Fractogel EMD-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> чи COO<sup>-</sup> (Merck, Darmstadt) або SP- чи CM-Toyopearl (Tosohaas). В якості вихідного матеріалу використовували плазму або її фракції (Кріопреципітат, фракцію I за Коном тощо). Для запобігання дисоціації комплексу FVIII:C/vWF, в робочому буфері концентрація іонів кальцію становила 0,5-10 мМ [184].

В патенті [30] наведений спосіб отримання комплексу FVIII:C/vWF з плазми крові людини за допомогою комбінації осадження цитратом барію або гідроксидом алюмінію та аніонообмінної хроматографії на DEAE-Fractogel.

Harrison та співавтори [124] описують очищення комплексу VIII:C/vWF методом хроматографії на декстран-сульфат-сефарозі.

У роботі [33] автори повідомляють про два методи отримання FVIII. У першому випадку в технологічному процесі очищення використали поєднання

гель-проникної (на сорбенті Sepharose 4FF) та іонообмінної (на DEAE-Toyopearl 650M), в іншому – тільки іонообмінної хроматографії.

Відомо, що на стадії кріоосадження втрачається приблизно 30–40 % активності FVIII [33], тому часто в процесі виробництва оминають цей етап. Методи хроматографічного отримання FVIII безпосередньо з плазми крові є альтернативними до традиційних з кріопреципітату, оскільки не вимагають додаткових етапів центрифугування і можуть бути проведені при кімнатній температурі. Наприклад, у роботі А. М. Tanaka та співавторів описано процес прямого очищення FVIII свині [200].

У літературі наведено метод гель-фільтрації з використанням смоли Sepharose 4 Fast Flow для відокремлення комплексу FVIII/vWF від суміші низькомолекулярних білків плазми [140]. Інші автори використали цю властивість у комбінуванні з аніонообмінною хроматографією для отримання очищених зразків FVIII [140].

Е. Cheng та співавтори описали метод отримання FVIII у поєднанні аніонообмінної хроматографії (на матриці Q-Sepharose) і гель-фільтрації (Sepharose 4 Fast Flow чи Sepharose 6 Fast Flow) [199]. В іншій роботі [83] ці ж автори застосовували метод отримання FVIII з плазми крові, використовуючи поєднання іонообмінної хроматографії, гель-фільтрації та метал-афінної хроматографії.

Окремі повідомлення стосуються очищення FVIII людини безпосередньо з плазми з використанням аніонообмінної хроматографії з наступною гель-фільтрацією [115]. У дослідженнях використовували три різні Q-сефарозні смоли: отримано 40 % вихід активності FVIII з застосуванням Q-Sepharose XL, приблизно 80 % на Q-Sepharose Fast Flow і 70 % Q-Sepharose Big Beads. Разом з FVIII елюювались вітамін К-залежні фактори зсідання крові. Наступним етапом очищення була іонообмінна хроматографія на Sepharose 6FF, вихід FVIII складав 70 % від вихідної активності. Описано також отримання препарату FVIII методом аніонообмінної хроматографії на Fractogel EMD TMAE з відновленням активності 86 % [196].

### 1.2.3 Отримання фактора VIII методом афінної хроматографії

Застосування класичних хроматографічних методів (іонообмінної чи гель-фільтрації) для виділення та очищення певних груп білків, що не дуже відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями, пов'язане з певними труднощами та вимагає тривалих затрат часу [26]. Відповідно, це призводить до значної втрати їх біологічної активності через процеси денатурації, ферментативного гідролізу тощо.

Однією з найбільш характерних властивостей білкових молекул є їх здатність зворотно зв'язувати інші речовини (ензими утворюють комплекси з субстратом, інгібітором чи кофактором, антитіла з антигенами тощо). Утворення специфічних дисоційованих комплексів біологічних макромолекул лежить в основі афінної хроматографії [37, 77, 85, 99, 100, 104, 147, 148, 152, 183, 202, 205, 235, 250].

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 вимоги наявності реактивних хімічних груп (аміно-, гідроксильних-, епоксидних-), що дозволяють при допомозі нескладної хімічної реакції ковалентно прив'язувати різноманітні біологічні молекули (ліганди та спейсери) [26, 37, 183].

Хроматографічні ліганди іммобілізують на інертному, переважно сферичному, матеріалі-носії. Прикладами відповідних матриць є неорганічні носії (силікагель, силікати чи пористі скла), або органічні (поперечно-зшиті полісахариди, наприклад, целюлоза, похідні целюлози, декстрини або модифіковані ага рози). Кращим носієм для іммобілізації ліганду є Sepharose® – матеріал на основі модифікованої агарози, полісахаридні ланцюжки якої сполучені з утворенням тривимірної сітки [26, 235].

Неорганічні носії мають ряд переваг над органічними: легко регенеруються, їм можна надати будь-якого вигляду (порошок, кулька, частка неправильної форми, пористий матеріал або моноліт, що утворює багатоканальну систему). Найчастіше у якості 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 [8].

На сьогоднішній день афінну хроматографію використовують у виробництві різних терапевтичних продуктів плазми, таких як препарати факторів VIII, IX, XI, vWF, білка C, антитромбіну III та інші [77, 99, 147, 152, 183, 202, 205].

Протягом кількох десятиліть застосування афінної хроматографії при очищенні білків плазми в промислових масштабах було дещо обмежене через використання лише наявних природних інгібіторів або субстратів, таких як гепарин, декстран-сульфат і желатин. Ці біо-ліганди приєднували до агарозних гелів, що відігравали роль матриць. Їх використання забезпечило значний прогрес в очищенні білків, зокрема, у сучасному промисловому одержанні клінічно-важливих факторів зсідання, антитромбіну III та інгібіторів протеаз. Проте, у деяких випадках, селективність цих лігандів (наприклад, гепарину або декстран-сульфату) є недостатньою через спорідненість зв'язування до низки різних білків [54, 73]. Використання таких неспецифічних лігандів може вимагати застосування додаткових стадій очищення або розробки оптимальних умов елюції, щоб ізолювати білки-мішені, усуваючи білки-домішки [92]. Так, у літературі зустрічаються повідомлення використання цих лігандів, зокрема гепарину та декстран-сульфату, які виявляють афінність до комплексу FVIII/vWF і, отже, можуть бути пов'язані з матрицею для отримання хроматографічних матриць [124,177].

В роботі [235] описано використання іншого афінного ліганду, диметиламінопропілкарбамоїл-пентилу. Проте, подальші дослідження показали неможливість відновлення з такої плазми інших терапевтичних білків, що безумовно, робить неприйнятним застосування такого методу хроматографії, оскільки, в першу чергу, з економічної точки зору, з одного пулу плазми повинні бути вилучені кілька терапевтичних продуктів. Це вимагає підбору та комбінування різних методів, не погіршуючи якісні та кількісні характеристики різного роду білків, які використовуються в промисловості для отримання терапевтичних препаратів [74].

Групою авторів запропоновано певного роду оптимізацію процесу отримання FVIII з плазми зі спеціалізованою афінною матрицею диметиламінопропілкарбамілпентил-сефарозою CL-4B (матриця C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>). Спочатку застосовується хроматографія плазми на аніоніті DEAE-сефадексі А-50, щоб відокремити ряд білків, в тому числі факторів протромбінового комплексу (II, IX і X) від FVIII. Згодом, незв'язана частина іонообмінника, що містить FVIII, піддається афінній хроматографії з цим же сорбентом [152].

Описано очищення FVIII і/або його фрагментів, отриманих з вихідних різних джерел, шляхом використання моноліту на основі методів псевдоафінності. Зокрема, L-гістидин іммобілізований на CIM-моноліті використовується для очищення FVIII з плазми, кріопреципітату чи рекомбінантного зразка. Для очищення плазмового чи рекомбінантного FVIII використовується іммобілізована метал-іонна афінна хроматографія [198].

Досягнення в галузі культур клітин гібридом та отримання моноклональних антитіл відкрило новий метод імуноафінності [149, 195]. Такі системи швидко набули популярності завдяки своїй селективності у захопленні білка-мішені. Е. J. Sohn і співавтори для отримання препарату застосовували смоли з іммобілізованими антитілами і буфер, що містить 50 % етиленгліколю та сіль у високій концентрації [218].

Відмічено, що хоча антитіла, які застосовуються як ліганди в афінній хроматографії, мають велику стійкість до низьких діапазонів рН, проте вони

здатні утворювати агрегати, що зумовлює використання додаткової стадії хроматографії для їх видалення, тим самим збільшуючи вартість їх виробництва [59]. Вони також схильні до деградації протеазами чи бактеріями, що присутні в клітинних культурах або в біологічних рідинах. З тієї ж причини, імуноафінна система не витримує суворі умови процедури очищення, необхідні для «санітарної» обробки і повного видалення міцно зв'язаних білків. Імуноафінні ліганди мають обмежену кількість хроматографічних циклів (в середньому від 10 до 20) та є найдорожчими у порівнянні з іншими. Тим не менше, ліганди-антитіла, які розпізнають конкретні FVIII або епітопи vWF широко використовуються для отримання високоочищених препаратів [201, 215]. Імуноафінні процедури очищення FVIII сприяють вірусній безпеці, але не вважаються настільки надійними, як процеси видалення та інактивації [120], оскільки видалення вірусів за допомогою хроматографії важко передбачити і контролювати [73]. Недоліком цього методу є також використання мишачих антитіл, які можуть вилугуватись і, отже, повинні бути усунені шляхом наступної стадії адсорбційної хроматографії.

Так, у роботі S. Winge та співавторів запропоновано метод очищення FVIII з використанням хроматографії, яка здійснюється за допомогою афінного ліганду – так зване Fab-антитіло розміром 13 кД, що зв'язується з легким ланцюгом досліджуваного білка [182].

Наступним кроком у галузі афінних лігандів було створення нових синтетичних і біосинтетичних лігандів і матриць [147]. Афінні ліганди змінювались від ферментативних субстратів, коферментів, гормонів, лектинів, кофакторів, антитіл, нуклеїнових кислот, ефекторів та інгібіторів різних пептидів [99] до поліпептидів, пептидних фрагментів, а також інших синтетичних структур [202].

Ще однією групою авторів запропоновано використовувати в ролі афінних лігандів синтетичні пептиди, а саме: Trp-His-Tyr-Tyr-His-Gly (WHYYHG), His-Ile-Gln-His-Tyr-His (HIQHYN) і His-Gln-Tyr-Gly-Tyr-His (HQYGYH) [100]. Інша група дослідників використовувала пептидний ліганд

TN8.2 (дисульфід-зв'язуючий пептид з 27 а.к.з. ~ 2800 Da), що іммобілізували до Sepharose. Така матриця проявляла стабільність при регенерації та забезпечувала високий вихід продукту [99].

Іммобілізований ліганд є ключовим фактором, що визначає успіх будь-якого афінного хроматографічного методу. Більшість з цих лігандів біологічного походження, проте, термін «афінна хроматографія» також використовується для процесу, що містить селективні ліганди небіологічного походження. Прикладами таких лігандів є іммобілізовані іони металу [198] та синтетичні барвники, наприклад, тріазинові [70, 71, 84, 85, 251].

### 1.3 Активні барвники в ролі афінних лігандів

Барвник-лігандна хроматографія сформувалася як важливий метод для великомасштабного очищення білків з 1968 р. [70, 85, 87, 94, 97, 98, 251]. Так, Gekkel та співавтори при очищенні піруваткінази методом гель-фільтрації виявили, що Blue Dextran (молекула барвника) спільно елюювалась з досліджуваним білком. Наступні дослідження показали, що існує спорідненість фермента до барвника, що і призвело до ко-елюції [84].

Значимість активних барвників в ролі афінних лігандів є результатом їх хімічної будови, що дозволяє їм взаємодіяти з великою кількістю білків, а також легкістю іммобілізації на стандартних хроматографічних матрицях. Активні барвники зв'язуються з білками завдяки специфічним взаємодіям в активному центрі або неспецифічним взаємодіям. Двовалентні метали, що входять в структуру барвника, беруть участь у ще одному типі взаємодії тріазинових барвників з білками (метал-хелатна). Всі ці типи взаємодій використовуються в технологічних схемах очищення білків [85, 86, 94–97, 148].

Cibacron Blue 3GA був першим і найбільш поширеним з модифікованих тріазинових барвників. 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 та Procion H є положення сульфогрупи в аніліновому кільці (*орто*- в Cibacron та *мета*- чи *пара*- в Procion H серії) [87, 142].

Більшість активних барвників, що використовуються в барвник-афінних системах, містять хромофори (інші азобарвники, антрахінон, фталоціанін), ковалентно зв'язані з реактивною групою (моно- чи дихлортріазинове кільце) [86, 94, 148]. Вони також містять негативно заряджені сульфогрупи для покращення розчинності барвників у водних розчинах. Деякі барвники мають додатково карбокси-, аміно-, хлоридно- чи метало- комплексні групи; більшість містять нітро-групи, зв'язані з ароматичним кільцем чи поза ним [95-98].

Синтетичні ліганди, що включають молекулу барвника, були відомі протягом тривалого часу і вважаються однією з важливих альтернатив до біологічних лігандів для афінної хроматографії. Барвник-лігандна біоспецифічна хроматографія (відома також як «псевдо-афінна») розроблена в якості важливого способу очищення білка, оскільки має ряд переваг над іншими формами афінної хроматографії: дешевизна; доступність; легкість іммобілізації; відносно стабільні щодо дії хімічних і біологічних чинників; тривале зберігання сорбенту без втрати сорбційних властивостей; багаторазове використання (легкість регенерації); можливість стерилізації; простота використання; висока адсорбційна ємність та середня специфічність [95].

Хлортріазинові полісульфатні ароматичні молекули (тріазинові барвники), використовували для очищення альбуміну, оксидоредуктаз, декарбоксилази, гліколітичних ферментів, нуклеаз, гідролаз, ліаз, синтеаза і трансфераз [147].

Основою для синтезу тріазинових барвників є трихлорціанурова кислота, заміщення активних груп якої хромофорами приводить до утворення дихлор- чи моно хлор- тріазинових барвників [9, 84]. Молекули барвника, що містять атоми хлору, взаємодіють з нуклеофільними (гідрокси- та аміно-) групами матриці і утворюють таким чином ліганди на поверхні носія (рис. 1.1). Коли атоми хлору тріазинового кільця повністю заміщені іншими групами, реактивність барвника втрачається.

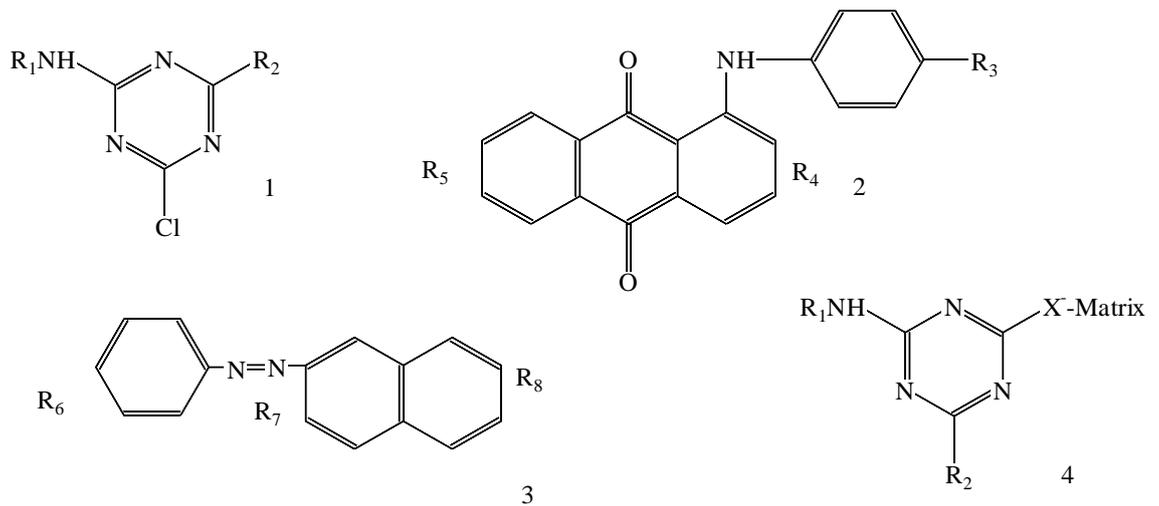


Рис. 1.1 Структурні формули активних тріазинових барвників [9]

Примітки: 1 – хлортріазинова група, де  $R^1$  – сульфопохідна антрахінону, заміщений антрахінон, ароматична азогрупа, фталоціанінова група;  $R^2$  – органічна група, хлорпохідна; 2 – антрахінонові похідні цібакронів та проціонів, де  $R^3$ ,  $R^4$  та  $R^5$  – сульфогрупи чи атом водню; 3 – ароматичні азопохідні цібакронів та проціонів, де  $R^6$ ,  $R^7$  та  $R^8$  – сульфогрупи чи атом водню; 4 – місце зв'язування тріазинових барвників з матрицею

Біоімітуючі моно- чи дихлортріазинові барвники здатні зв'язувати більшість типів білків, особливо ферментів, в деяких випадках дивним специфічним чином [9, 86]. Згідно з іншими дослідженнями [40, 95, 97] таке зв'язування має змішаний характер (біоспецифічна, гідрофобна та іонна взаємодія). Ця специфічність зумовлена присутністю різноманітних за властивостями замісників у барвників-лігандів і здійснюється, очевидно, за змішаним типом за участі каталітичного активного центру ферменту та центрів зв'язування субстратів (інгібіторів), гідрофобної та іонної взаємодії.

Більшість активних барвників відносяться до імфілітів, лігандів із змішаною іонно-гідрофобною функцією, для яких біоспецифічність здійснюється в результаті випадкової просторової орієнтації його структури з відповідною ділянкою білка, що відповідає за певні функції [9, 40, 85, 94, 95, 148], якщо ця ділянка включає в себе один з активних центрів фермента. Якщо ж в результаті взаємодії з коферментом, субстратом чи інгібітором просторова конфігурація його суттєво порушується, то стає можливою конкурентна афінна елюція білка з колонки. Вище сказане обумовлює широку специфічність зв'язування білків даною групою лігандів [9, 42]. Звуження специфічності

зв'язування досягається підбором умов проведення відповідного хроматографічного процесу.

Основним недоліком барвників є їх помірنا селективність при білок-зв'язуючому процесі. Крім того, дисоціація білкового комплексу від барвника часто досягається специфікою конкуруючих лігандів, припускаючи взаємодію з білком в дискретних ділянках. Це підтримується за допомогою хроматографічної кінетичної інактивації, афінної лабільності тощо [94].

Наступним кроком барвник-лігандної хроматографії було створення біоміметичних модифікованих барвників, що імітують природний рецептор білка-мішені [87, 92, 98].

Останнім часом у літературі з'явився новий підхід до вирішення проблеми селективності барвника, так звана «ера біоспецифічності». Цей підхід заснований на генерації біоімітуючих барвників. При використанні методів молекулярного моделювання, можна переробити батьківський прототип (наприклад, Cibacron Blue F3GA) або конструкцією De Novo створити новий барвник, що імітує природній біо-ліганд з підвищеною селективністю до цільового ферменту [84, 92].

#### **1.4 Вірусна безпека антигемофільних препаратів**

Сучасна історія трансфузійної медицини полягає у безперервному та невтомному пошуку нових методів, для того, щоб зробити процедуру трансфузії компонентів крові безпечною та ефективною для пацієнта [126]. При трансфузії плазмових препаратів білки з одного боку можуть спричинити виникнення алергічних реакцій, а з іншого, існує ризик передачі вірусної інфекції [24, 41].

Згідно рекомендацій Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я та директивних органів країн Європейської Економічної Спільноти використанню похідних плазми крові для лікування різноманітних патологій надається

перевага перед застосуванням цільної крові. Лікування похідними плазми є ефективніше, економічно обґрунтоване та безпечніше [56].

Дані літератури свідчать, що з кожним роком зростає кількість методів, які використовуються в технологічних процесах фракціонування донорської плазми крові для гарантування безпеки продуктів такої переробки [74-76, 78, 139, 196]. Завдяки цьому в промислових масштабах одержують ряд високоочищених вірус-безпечних препаратів плазми крові. Основна частина з цих методів базується на використанні відомих принципів спиртового осадження, фракціонування з використанням зміни рН, іонної сили, в'язкості розчину, фазового розподілу речовин, температурної та хімічної обробки розчинів білкових препаратів, хроматографічних методів [5, 10]. Але, якщо в минулому основна увага приділялась методам одержання та збереження активності препаратів крові, то останніми роками на перше місце вийшла проблема вірусної безпеки, оскільки спиртовий метод фракціонування за Конном практично не впливає на активність вірусів, особливо таких патогенних як віруси гепатитів, імунодефіциту людини (HIV), герпесу, цитомегаловірусів, токсоплазмозу та інших [63]. На даний час ідентифіковано понад 30000 вірусів, серед яких найбільш поширеними є: HIV, гепатитів А (HAV), В (HBV) та С (HCV), цитомегаловірус, Т-клітинний лімфотропний вірус типу I та II, вірус Епштейна-Барра, парвовірус B19 [74].

Проведені дослідження показують, що технологічні процеси, які поєднують етанольне фракціонування плазми з хроматографічними методами, мають здатність ефективно видаляти високі дози абнормальних пріонових білків під час процедури одержання препаратів плазми крові [168]. Вірусна безпека компонентів донорської крові та препаратів плазми передбачає три взаємодоповнюючі підходи: відбір донорів, тестування пулів донорської плазми на наявність гемотрансмісивних інфекцій, а також введення процесів вірусної інактивації в технологічну схему виробництва [5, 232].

У літературі відмічено, що за останні десятиліття досягнуто значний прогрес щодо вірусної безпеки плазмових препаратів, зокрема FVIII, завдяки

збільшенню чисельності методик для знешкодження інфекційних агентів [126, 194, 211, 248]. Вони включають:

- плазмове фракціонування, що забезпечує зниження концентрації вірусних контамінантів шляхом фізичного відокремлення та видалення вірусних частинок від цільових білків [75];
- методи фільтрації концентрованих плазмових продуктів (глибинна фільтрація, діафільтрація, ультрафільтрація та нанофільтрація);
- методи хроматографії для поділу молекул на основі відмінностей іонного заряду (іонний обмін), розміру (гель-фільтрація) або спорідненості до специфічних антитіл (імуноафінна) [202, 211, 210];
- пастеризація чи теплова обробка [102, 127];
- сольвент-детергентний метод проти оболонкових вірусів [63, 138, 209, 212];
- хімічна обробка (висока концентрація солі, використання різних хімічних реагентів, наприклад солей тіоціанату) [60,117].

Ці процедури теоретично скоротили ризик передачі вірусів через препарати плазми крові, зокрема HIV, HBV і HCV. Однак, не всі з цих методів можуть використовуватись для будь-якого з білків плазми. Більшість препаратів піддаються двом або трьом таким різним методам, які можуть вплинути на безпеку продукції. Крім того, незважаючи на ці заходи, продовжують відбуватися спорадичні випадки зараження невідомими видами інфекційних агентів [63].

Першим способом інактивації вірусів при виготовленні препаратів факторів зсідання корові (зокрема, FVIII) був метод пастеризації. Згодом, у процес виробництва препаратів FVIII включений ще й сольвент-детергентний метод. Ці два методи, поряд з ретельним відбором донорів та скринінгом донацій на наявність гемотрансмісивних інфекцій, привели до підвищення безпеки препаратів факторів зсідання крові. Проте, потенційний ризик передачі вірусів через компоненти крові та препарати плазми, як і раніше, залишається на високому рівні [122]. Будь-яке сучасне виробництво препаратів плазми крові

вимагає як мінімум двох етапів вірусної інактивації, що дозволяє отримати концентрати високого рівня чистоти та безпеки [24].

З літератури відомо, що до основних методів вірусної інактивації, які використовуються при виготовленні препаратів FVIII та забезпечують зберігання його біологічної активності, відносяться: сухе нагрівання, пастеризація, сольвент-детергентний та інші. Крім цього, останніми роками при виробництві препаратів факторів зсідання широко використовують методи ультра- та нанофільтрації, які дозволяють видалити малі та неболонкові віруси [167]. Тіоціанатний метод вірусної інактивації при виділенні факторів зсідання VIII та IX застосовує фармфірма Behringwerke. Автори даної технології пропонують її застосування також і для санобробки хроматографічних сорбентів. Даний метод покладений в основу одержання препарату фактора IX та VIII (Monopine, Armour) [117]. Вони запропонували в процес виробництва включити метод хімічної обробки (солями тіоціанату амонію) та ультрафільтрації.

Тіоціанат (ціансульфанід, сульфоціанат, тіоціанід, роданід) ( $\text{SCN}^-$ ) відноситься до хаотропних агентів та металохелаторів. Властивості цього іону зумовлені негативним зарядом присутніх атомів Сульфуру та Нітрогену.

Хаотропний агент являє собою речовину, яка руйнує структуру, викликаючи денатурацію макромолекул, таких як білки та нуклеїнові кислоти. Розчини хаотропних речовин збільшують ентропію системи, впливаючи на нековалентні внутрішньомолекулярні взаємодії (водневі, ван-дер-Ваальсівські, гідрофобні зв'язки) [86]. Макромолекулярна структура і функція залежить від загального ефекту цих сил, тому збільшення концентрації розчинених хаотропних речовин в біологічній системі денатурує макромолекули, знижує ферментативну активність. Третинна структура білка залежить від гідрофобних взаємодій амінокислот всієї послідовності білка. Розчинені хаотропні речовини зменшують загальний гідрофобний ефект гідрофобних ділянок. Це спричинює зміну його третинної структури, викликаючи денатурацію. Аналогічно, хаотропи діють на гідрофобні області подвійних ліпідних шарів; якщо

досягається критична концентрація розчиненої хаотропної речовини (в гідрофобній ділянці подвійного шару), то цілісність мембрани порушується, і клітина лізується [133].

Так, наприклад, за даними дослідників застосування 1 М розчину KSCN зменшувало титр scarіе-агенту (асоційованого з пріонною інфекцією білка) в  $10^5$  [244]. На відміну від сольвент-детергентного методу, який придатний для інактивації оболонкових вірусів, тіоціанатний є менш специфічним, і може застосовуватися як для оболонкових, так і до безоболонкових вірусів.

Авторами винаходу [188] передбачено застосування комбінації хімічних сполук та фізичних чинників для забезпечення антивірусного захисту лабільних білкових продуктів плазми крові, не викликаючи їх денатурації. Для цього препарат піддавали обробці хімічною сполукою, зокрема, натрію тіоціанатом, з наступною ультрафільтрацією. Метод може бути застосований до плазми, сироватки, концентратів плазми, кріопреципітату, кріосупернатанту, продуктів субфракціонування плазми, що містять віруси гепатитів та імунодефіциту людини. Автори для інактивації вірусів застосовували натрію тіоціанат в концентрації 0,5-2,0 М, як окремо, так і в комбінації з сольвент-детергентною обробкою.

За даними S. V. Prusiner та співавторів, при перебуванні у розчині протягом однієї хвилини обробки, досліджувані інгредієнти самі по собі не є сильнодіючими противірусними чинниками. Однак, швидкий синергічний антивірусний ефект досягається, коли ці компоненти використовуються в комбінації. Крім того, найбільш потужна противірусна активність досягається, коли всі компоненти використовуються разом (більше 99,9 % інактивація). Найкращий ефект для інактивації оболонкових вірусів спостерігається при використанні комбінації неорганічних одновалентних аніонів (наприклад, бікарбонату натрію, тіоціанату амонію, фториду та хлориду натрію) в концентрації від 0,5 % до 5 % (маса/об'єм), етанолу до 15 % (об'єм/об'єм), неіонних детергентів, таких як Твін-20 в концентрації від 0,1 % до 3 % (об'єм/об'єм) [244].

Додавання поліетиленгліколю (ПЕГ 200, 300, 400, 600, 900 та 1000) в концентрації 5-30 % (по масі) значно посилює антивірусний ефект при застосуванні тіоціанатів [210].

Було встановлено, що синергічний ефект інактивації вірусів спостерігається при комбінації хаотропно ефективною солі з поліефіром (для прикладу, тіоціанат з поліетиленгліколем) зі збереженням біологічної активності препарату. Таким чином, стійкі віруси, такі як вірус коров'ячої віспи або парвовірусу, в даному випадку інактивуються значно швидше за менших концентрацій тіоціанату в порівнянні з обробкою тільки тіоціанатом. Зниження концентрації тіоціанату дозволяє отримувати препарати з вищою біологічною активністю [5].

Клінічні дослідження препаратів зсідання крові, при одержанні яких використовували сольвент-детергентний метод вірусної інактивації, продемонстрували, що при застосуванні понад 20 мільйонів одиниць фактора не було зареєстровано жодних ознак трансмісії вірусів HBV, HCV та HIV [129]. Свіжозаморожена плазма із застосуванням сольвент-детергентної обробки має перевагу у використанні перед плазмою без обробки, оскільки за останні 10 років не спостерігалось випадків захворювання посттрансфузійною гострою легеневою недостатністю. В модельних експериментах продемонстровано ефективність цього методу для інактивації високопатогенного оболонкового корона вірусу SARS-CoV, який викликав близько 8000 інфікувань людей з летальним завершенням у 800 осіб протягом 2002-2003 рр. [168]. На сьогодні найбільш ефективно застосовується в якості сольвента три-(n)-бутилфосфат, який має найслабший білок-денатуруючий ефект, а детергента – Тритон X-100, Твін-80 та інші, в основному поліоксиетиленові нейонні детергенти.

Пастеризація – це термічна обробка білкових розчинів протягом 10 годин при +60 °C, що приводить до денатурації білків віруса та пригнічує реплікацію його ДНК. Відмічено, що втрата від вихідної активності FVIII при сухій тепловій обробці становить близько 5 % і це ефективний метод для інактивації не оболонкових вірусів, стійких до сольвент-детергентного методу [102].

Включення методів вірусної інактивації в технологічний процес отримання в є обов'язковим при отриманні будь-яких препаратів з плазми крові. Сучасні препарати факторів зсідання крові є двічі вірус-інактивовані, а, відповідно, й безпечніші щодо гемотрансмісивних інфекцій [10, 12].

### **1.5 Застосування препаратів фактора VIII зсідання крові**

З метою корекції дефіциту FVIII та для запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів цього фактора [111, 164, 205, 238, 241].

Проте слід зауважити, що існує певна відмінність між лікуванням хворих із геморагічними ускладненнями (так звана «терапія на вимогу») та проведенням профілактичного введення FVIII [39].

«Терапія на вимогу» проводиться під час геморагічних ускладнень і потребує негайного реагування шляхом введення препарату FVIII. Такий спосіб лікування вимагає постійної наявності в лікувальній установі певного запасу препарату, що є економічно невигідно.

З іншого боку, профілактичне лікування полягає у періодичному введенні фактора пацієнтам з гемофілією А та може бути розділене на первинне і вторинне. Первинна профілактика досягається довготривалим введенням фактора (не менше 46 тижнів на рік) після першого епізоду кровотечі у віці до двох років. Вторинна профілактика – це довготривале введення фактора після двох чи більше випадків кровотечі у віці понад два роки [34, 39]. Профілактичне лікування проводять також перед операційним втручанням для запобігання геморагічних ускладнень. Нарешті, короткострокове профілактичне лікування проводять у разі частих повторних крововиливів у суглоби. Воно полягає у 4–8-тижневому введенні препарату недостатнього фактора. На даний момент при замісній терапії використовують комерційні препарати факторів зсідання, як плазмові, так і рекомбінантні, які мають високий ступінь безпеки щодо вірусних захворювань.

Препарати FVIII для клінічного використання в даний час на ринку представлені багатьма виробниками Європи, Азії та США. Сучасні препарати FVIII повинні бути вільні від надлишкових компонентів, таких як додаткові білки, активовані гемолізени, вірусні патогени та інші хімічні домішки, що використовуються в процесі отримання, та проявляти високу питому активність [168, 169].

Для лікування гемофілії А в Україні використовують низку препаратів FVIII, як плазмового так і рекомбінантного походження. При одержанні плазмових препаратів на початкових етапах FVIII відділяють від більшості білків плазми крові методом кріопреципітації з подальшим використанням додаткових методик очищення. Залежно від застосування методик очищення, виділяють три групи плазмових препаратів FVIII [36, 39, 134]: проміжного очищення, отримані методом преципітації/адсорбції (питома активність до 20 МО/мг білка); препарати, отримані при використанні хроматографічних методів (20–50 МО/мг білка); препарати, отримані за допомогою моноклональних антитіл (з питомою активністю понад 100 МО/мг білка).

З кінця 80<sup>-их</sup> років минулого століття в клінічній практиці почали використовувати рекомбінантні препарати FVIII [34, 36, 39, 197, 216, 252], які за етапами технологічного одержання також поділяють на три покоління (залежно від наявності білка людини чи тварини в культуральному середовищі та кінцевому продукті). Цей розподіл був запропонований медичною науково-консультативною радою [39, 101]. До першого покоління факторів належать препарати, що додатково містять білки людини чи тварин, як у культуральному середовищі, так і в кінцевому продукті; до другого – ті, що містять білок лише в культуральному середовищі, але не в кінцевому продукті; до третього – ті, що повністю позбавлені білка як у культурі, так і в кінцевому продукті.

Рекомбінантні препарати першого покоління (Recombinate<sup>®</sup>, Baxter BioScience, США), одержують шляхом введення генів FVIII людини в геном клітин яєчника китайського хом'яка (Chinese hamster ovary [CHO]) або в клітини нирки новонародженого хом'яка (baby hamster kidney [BHK]). Клітинна

лінія секретує рекомбінантний FVIII у культуральне середовище, з якого фактор піддається низці процесів очищення, зокрема процесам хроматографії, що являють собою комбінацію іонообмінної, гель-проникної та афінної (імуноафінної) хроматографії. Синтезовані рекомбінантні FVIII за структурою ідентичні до плазмового [39, 101, 129].

Рекомбінантні препарати другого покоління (Kogenate®, Bayer, США) містять як стабілізатора сахарозу гліцин, гістидин і кальцій (на противагу альбуміну) та в процесі їх одержання використовують сольвент-детергентний метод вірусної інактивації. Середовище росту містить клітини ВНК, альбумін і рекомбінантний інсулін [149, 161].

Рекомбінантні препарати третього покоління (наприклад, ReFacto AF®, Pfizer, Швеція) не містять альбуміну чи інших білків плазми крові на будь-якому етапі виробництва. Синтезуються клітинною лінією CHO, альбумін повністю виключений у процесі виробництва, моноклональні антитіла були замінені на синтетичні пептиди та введено додатковий етап вірусної інактивації нанофільтрацію (фільтри з розміром пор 15–25 нм), що дає змогу позбутися ретровірусів [39, 162, 201].

Серед останніх досягнень сучасної трансфузіології – проведення багато центрових клінічних досліджень із терапевтичного застосування модифікованих препаратів FVIII, наприклад, пегельованих похідних фактора [76, 250].

До гемостатичних препаратів, крім факторів зсідання крові (тромбіну, фібриногену, FVIII, FIX, FVIIa), належать також: їх замітники (желатинова губка («Spongostan», «Gelatamp» тощо); «Celox» – препарат на основі натурального високоочищеного полімеру хітозану, принцип дії якого полягає в зв'язування позитивно-заряджених гранул препарату з негативно-зарядженими еритроцитами та утворенні згустку [29]; хімічні речовини в'язучої дії (танін, перекис водню, галун, розчин трихлорного заліза); судинозвужуючі засоби (адреналін); засоби, що підсилюють агрегацію

тромбоцитів (етамзилат, добезилат-кальцію, андроксон, серотонін); препарати вітаміну К (фітоменадіон, вікасол) тощо [166].

Для обґрунтованої оцінки доз (фармакокінетики) та ефективності лікування (фармакодинаміки) обов'язковим етапом при створенні нових препаратів FVIII є дослідження з використання препаратів у тварини з певним розладом системи гемостазу. Тваринні моделі гемофілії та пов'язані з ними кровотечі дають уявлення про патофізіологію захворювання людини. Однак, існують потенційні недоліки та обмеження використання цих моделей для дослідження у людини, включаючи імунну реакцію на білки людини [157].

Тваринні моделі були використані для отримання нових поглядів на патофізіологію кожного розладу кровотечі, а також для проведення доклінічної оцінки стандартної терапії відповідними препаратами та створення моделей успадкування захворювання. Так, наприклад, собаки породи Чапел-Хілл з гемофілією А були використані для доклінічних випробувань препаратів FVIII людини [192], розроблення нової стратегії терапії даного захворювання та випробувань рекомбінантного FVIIa, що використовується, в основному, при лікуванні інгібіторної форми захворювання [218].

## 1.6 Висновки до розділу 1

Таким чином, провівши аналіз літературних джерел, можемо стверджувати, що FVIII відіграє важливу роль у процесі зсідання крові. Вроджений чи набутий дефіцит FVIII є причиною виникнення розвитку гемофілії А, лікування якої полягає у компенсаторному введенні препаратів фактора як плазмового, так і рекомбінантного походження.

1. Серед основних властивостей FVIII можна виділити наступні: хромосомна локалізація – Xq28; молекулярна маса – 170–280 кДа; кількість амінокислотних залишків – 2323; складається із субодиниць – A1(a1)–A2(a2)–B–(a3)A3–C1–C2; ізоелектрична точка – 6,95–7,02; стабільний при рН – 6,5–8,5; концентрація в плазмі крові – 1–2 мг/мл (за іншими даними – 0,1–0,2

мг/мл); час півжиття в комплексі з vFW – 10–12 год, а у вільному (дисоційованому) стані – 2,5 год; константа зв'язування vFW – з  $5,9 \pm 1,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ .

2. Перші традиційні методи одержання FVIII включали стадії осадження, хроматографічні етапи у процес очищення почали застосовуватись з 80-их років ХХ ст., основним з яких був метод іонообмінної хроматографії.
3. Процес вірусної інактивації є обов'язковим при отриманні будь-яких препаратів з плазми крові. Сучасні препарати факторів зсідання крові є двічі вірус-інактивовані.
4. Барвник-лігандна біоспецифічна хроматографія має ряд переваг над іншими видами афінної хроматографії (дешевизна; доступність; легкість іммобілізації; сорбенти відносна стабільні щодо дії хімічних і біологічних чинників; тривале зберігання сорбенту без втрати зв'язувальних властивостей; багаторазове використання; можливість стерилізації; простота використання; висока адсорбційна ємність тощо), що робить її особливо привабливою з точки зору використання для отримання цілої низки білків.
5. Підсумовуючи вищезгадане можна зробити висновок, що проблема пошуку та удосконалення методу одержання високоактивного препарату FVIII є предметом дослідження вчених усього світу. Проте, на фоні великої кількості робіт з вивчення властивостей активних барвників та використання методу барвник-лігандної хроматографії для очищення альбуміну та нуклеотидзалежних ферментів, дослідження, присвячені виділенню FVIII зсідання крові з їх використанням, нами не виявлені.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Вибір напрямку дослідження

Відповідно до мети і завдань роботи вибрано такі основні напрями досліджень:

- синтез макропористих кремнеземних сорбентів з активними барвниками в ролі лігандів та дослідження їх властивостей;
- дослідження умов сорбції/десорбції FVIII на різних афінних макропористих кремнеземних сорбентах, модифікованих активними барвниками та можливості їх використання для проведення процесу афінної хроматографії FVIII зсідання крові;
- одержання очищеного препарату FVIII з різної вихідної сировини за допомогою афінної хроматографії на біоспецифічних макропористих кремнеземних сорбентах (створення технологічної схеми отримання);
- дослідження властивостей одержаного препарату (активність, гомогенність, присутність інших білків, стабільність, придатність для діагностичних досліджень);
- дослідження впливу різних вірус-інактивуючих агентів на активність FVIII та вибір оптимальних умов антивірусної обробки в технології отримання препарату.

#### 2.2 Матеріали, реагенти, обладнання

##### 2.2.1 Матеріали та реагенти

У роботі використовували Тріс(гідроксиметил)амінометан, акриламід, N,N'-метилен-бісакриламід, додецилсульфат натрію (SDS), N,N,N',N'-

тетраметил-етилен діамін, ПЕГ-4000, Coomassie Brilliant Blue G-250 та R-250, амонію персульфат («Merck», Німеччина).

Застосовували наступні барвники: Cibacron Brilliant Yellow 3GP, Procion Blue HB («Acros Organics», Бельгія), Procion Blue MXR, Procion Yellow HE3G («Fluka», Швейцарія), Procion Gelb M4R («Serva», Німеччина), Procion Red MX5B, Reactive Brown 10, Reactive Red 120, Reactive Green 5, Reactive Green 19 («Sigma-Aldrich», США), Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий К, Активний яскраво-червоний 5СХ, Активний бордо 4 СГ, Активний пурпуровий 4ЖТ («Барва», Україна). Матрицею для синтезу хроматографічних сорбентів був Діасорб амінопропіловий 800/70, фракція 0,25-0,50 мкм різної пористості (250, 500, 750 та 1500 Å) (ЗАТ «БиоХимМак Ст», РФ).

Референтні нормальна та дефіцитна по факторах VIII та IX плазми (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Німеччина, Helena Biosciences Europe, Велика Британія), набори реагентів для визначення прокоагулянтної активності фактора (АЧТЧ-тест Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Німеччина та Helena Biosciences Europe, Велика Британія), набір для визначення активності FVIII з хромогенним субстратом Coamatic (Chromogenix, Італія), набір для визначення рістоміцин-кофакторної активності фактора фон Віллебранда («Ренам», РФ), комерційні препарати FVIII зсідання крові Immunate (Baxter, Австрія), Kogenate FS (Bayer, Німеччина), протромбінового комплексу Feiba (Engineering & Plants GmbH, Австрія). Набір білкових молекулярних маркерів ThermoFisher PageRuler™ Unstained Protein Ladder (суміш 14 рекомбінантних білків з молекулярною масою від 10 до 200 кДа, Fermentas, Литва).

Інші реактиви кваліфікації «чда» та «хч» вітчизняного виробництва.

Свіжозаморожену плазму крові (СЗП) та препарат Кріопреципіт отримували у Львівському обласному центрі служби крові та Тернопільському обласному центрі служби крові.

## 2.2.2 Обладнання

В роботі використовували хроматографічні колонки «Whatman» (Англія) та «Pharmacia» (Швеція), колектор фракцій «Діафрак 002» («БіоМарк», Україна), центрифуга РС6 (Киргизія), центрифуга Millipore Eppendorf 5702R (Німеччина), спектрофотометр Uvidес-510 («Jasco», Японія), спектрофотометр DS-11FX («DeNovix», Англія), планшетний аналізатор Multiscan EX (Фінляндія), прилад для електрофорезу АВГЕ («Хийу Калур», Естонія), водяний термостат TW2 («Elmi», Латвія), фотоелектроколориметр КФК-3 («ЛОМО», РФ), секундоміри, ваги, автоматичні дозатори, мірний посуд, пластикові і скляні пробірки.

## 2.3 Методи досліджень

Експериментальну частину роботи виконано впродовж 2008–2017 років у лабораторії біохімії крові ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», атестованій на проведення вимірювань у сфері метрологічного нагляду (завідувач – к.б.н., старший науковий співробітник Т. В. Даниш; свідоцтво про атестацію № РЛ 1043/07 від 03.09.2007 видане Держспоживстандарт України «Львівський регіональний державний центр стандартизації, метрології та сертифікації», свідоцтва № РЛ 1863/11 від 18.11.2011 р. та № РЛ 135/14 від 13.10.2014 р. видані ДП «Львівський науково-виробничий центр стандартизації, метрології та сертифікації» міністерства економічного розвитку і торгівлі України) на засобах вимірювальної техніки та обладнання, що пройшли метрологічну перевірку або атестацію.

### 2.3.1 Визначення концентрації білка [71]

Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за оптичною густиною розчину при довжині хвилі 590 нм з використанням Coomassie

Brilliant Blue G-250 в наступній модифікації: білковий розчин, що містив від 1 до 20 мкг білка в об'ємі 20 мкл, вносили в кювету з довжиною оптичного шляху 1 см, додавали 2 мл реагенту для визначення концентрації білка (0,005%-ний розчин Coomassie Brilliant Blue G-250 та R-250 в 0,8 М розчині ортофосфорної кислоти з 0,8 М етанолом), перемішували і через дві хвилини вимірювали світлопоглинання розчину при 590 нм [210]. Контроль: 2 мл реагенту з 20 мкл дистильованої води. Концентрацію білка визначали за калібрувальним графіком, а в якості стандарту використовували альбумін ВРХ.

### 2.3.2. Визначення альбуміну в сироватці (плазмі) крові [103]

**Принцип методу:** барвник бромкрезоловий зелений зв'язується з альбуміном, утворюючи стабільний кольоровий комплекс, максимум поглинання якого відповідає довжині хвилі 628 нм. Інтенсивність забарвлення комплексу пропорційна концентрації альбуміну в досліджуваному розчині.

Хід визначення. У вимірювальну кювету наливають 2 мл робочого розчину барвника і виставляють покази ФЕКа на відмітку «0» при довжині хвилі 628 нм. Потім додають 0,01 мл досліджуваного зразка плазми, енергійно струшують одержану суміш близько 10–15 с до утворення рівномірного синьо-зеленого забарвлення розчину і проводять замір. Концентрацію альбумінів визначають за калібрувальним графіком.

### 2.3.3 Синтез біоспецифічних кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками («метод включення солі») [153]

До 5 мл<sup>3</sup> сухого Діасорбу амінопропілового (модифікований  $\gamma$ -амінопропілтриетокси-силаном кремнеземний сорбент, раніше відомий під маркою Силохром) 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 карбонату калію (рН розчину біля 10,5). Витримували 48 год при

температурі +45 °С. Відмивали сорбенти дистильованою водою, 4М КСІ, ізопропанолом, 6М сечовиною, дистильованою водою. Одержані сорбенти зберігали в розчині 25% ізопропанолу.

### **2.3.4 Методи дослідження системи гемостазу**

#### **2.3.4.1 Уніфікований одностадійний метод кількісного визначення фактора VIII (IX) [1, 17]**

**Принцип методу:** метод ґрунтується на використанні у якості базового тесту активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) та полягає в інкубації безтромбоцитної плазми з фосфоліпідами та поверхневим активатором, що призводить до активації факторів внутрішнього механізму системи зсідання крові в контрольованих умовах. Додавання іонів кальцію ініціює цей процес. Використовують дефіцитну плазму до певного фактора (VIII чи IX). Визначається, чи змішування дефіцитної і досліджуваної плазм нормалізує подовжене АЧТЧ (оскільки при цьому відбувається корекція всіх факторів, крім того, до якого застосовується дефіцитна плазма).

Визначення виконується у досліджуваному зразку та розведеній стандартній плазмі при компенсації можливого зниження всіх факторів зсідання крові, крім FVIII (FIX), плазмою із заздалегідь відомим різко вираженим дефіцитом FVIII (FIX) (до 2 %). У такій системі час зсідання залежить виключно від активності FVIII (FIX). Рівень фактора виражали у відсотках (%) від його вмісту у нормальній плазмі за стандартною кривою розведень від часу утворення згустку в АЧТЧ-тесті. При визначенні рівня фактора у препаратах, де активність висока проводили розведення виходячи з того, що 1 Міжнародна одиниця (МО) дорівнює вмісту FVIII в 1 мл нормальній плазмі і становить 100 %.

Для визначення концентрації факторів використовували контрольні й субстратні плазми та набори АЧТЧ-реагентів виробництва фірм Helena (Німеччина) та Siemens (Велика Британія).

Хід визначення. У пробірку послідовно вносили 0,1 мл субстратної плазми, 0,1 мл розведеної буфером 1:10 досліджуваної плазми (чи досліджуваного зразка рідини в іншому розведенні) та 0,1 мл Actin-реагенту. Перемішували і поміщали на 3 хв на водяну баню. Через 3 хв в суміш додавали 0,1 мл 0,277 % розчину хлориду кальцію і одночасно вмикали секундомір. Суміш інкубували на водяній бані ще 30 с. В прохідному освітленні визначали час утворення згустку при періодичному (раз в 1–2 с) струшуванні пробірки. По калібрувальному графіку визначали вміст фактора в досліджуваному зразку плазми.

Побудова калібрувального графіка. Розводили референтну нормальну плазму буфером 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 та 1:160. Коагуляційну активність в розведенні 1:10 приймали за 100 %. Концентрація фактора в наступних розведеннях відповідала 50, 25, 12,5 і 6,25 % від норми. Проводили визначення часу зсідання в двох паралельних зразках в кожному із розведень. В логарифмічних координатах будували графік розведень, відкладаючи на осі ординат час згортання в секундах, а по осі абсцис – відповідні плазмові концентрації факторів згортання.

На папері з логарифмічною шкалою будують калібрувальну криву розведень у діапазоні від 100 до 1 %.

#### **2.3.4.2 Метод визначення активності FVIII за допомогою хромогенного пептидного субстрату [214]**

**Принцип методу:** метод базується на тому, що в присутності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та фосфоліпідів FX активується в FXa під дією FIXa. Ця активація стимулюється під впливом FVIII, що виступає кофактором цієї реакції. Швидкість активації FX прямопропорційна кількості FVIII. FXa гідролізує

хромогений пептидний субстрат S-2765 та вивільняє групу пара-нітроаніліну. Гідроліз S-2765 тромбіном інгібують його синтетичним інгібітором I-2558, який додають у суміш разом із субстратом. Інтенсивність забарвлення вимірюють на Multiscan EX при 405 нм, яка прямопропорційна кількості досліджуваного фактора та виражають у МО/мл за стандартною кривою розведень.

Хід визначення. Зразки перед початком роботи витримують при кімнатній температурі не менше ніж 30 хв та розводять робочим буфером у співвідношенні 1/80. У лунку планшета вносять 50 мкл досліджуваного зразка (контроль/стандарт). Інкують при +37 °С протягом 3–4 хв, додають 50 мкл прогрітого на водяній бані фактор-реагента (суміш FІХа, FХ, FІІ з CaCl<sub>2</sub> та фосфоліпідами), витримують при +37 °С протягом 2 хв. Додають 50 мкл прогрітого на водяній бані хромогенного субстрату разом з інгібітором. Знову інкують 2 хв та додають 20 % оцтової кислоти для зупинки реакції. Вимірюють поглинання при 405 нм.

По калібрувальному графіку визначають вміст фактора в досліджуваному зразку плазми.

### 2.3.4.3 Визначення активності фактора фон Віллебранда [239]

**Принцип методу:** ґрунтується на властивості фактора фон Віллебранда (vWF) викликати аглютинацію фіксованих формальдегідом тромбоцитів здорових осіб у присутності рістоміцину. Ця здатність до аглютинації зберігається у тромбоцитів після їх фіксації формальдегідом, тоді ж як втрачається до інших індикаторів аглютинації.

Хід визначення. Готують серію розведень плазми-калібратора для побудови калібрувальної кривої та визначають активність vWF у кожному окремому випадку: 1 пробірка: 100 мкл калібрувальної плазми та 900 мкл імідазольного буферу (активність 100 %); 2 пробірка: 500 мкл з першої пробірки та 500 мкл імідазольного буферу (активність 50 %); 3 пробірка: 500 мкл з другої пробірки та 500 мкл імідазольного буферу (активність 25 %); 4

*пробірка: 500 мкл з третьої пробірки та 500 мкл імідазольного буферу (активність 12,5 %).*

*Досліджувані зразки перед використанням розводять в 5 разів робочим буфером. На предметне скельце наносять 50 мкл проби та 50 мкл Віллебранд-реагента. Реакцію проводять при кімнатній температурі. Суміш рістоміцину та фіксованих тромбоцитів, безперервно перемішують і відмічають час появи аглютинації.*

*Використовуючи калібрувальний графік і значення часу утворення аглютинінів у досліджуваному зразку визначають активність фактора фон Віллебранда в %.*

#### **2.3.4.4 Методи визначення концентрації імуноглобулінів до фактора VIII [2]**

Визначення активності інгібітору до FVIII проводили за методикою Kasper (1975 р.) в модифікації Р. Н. Хаметової та співавторів в Бетесда од/мл (БО/мл) [61] та згідно методики описаної G. L. Salvagno [135]. За 1 одиницю інгібітора (БО) приймають таку його кількість, що інактивує половину з 100 % доданого фактора VIII.

**Принцип методу:** ґрунтується на властивості інгібітору в процесі інкубації з нормальною плазмою (чи концентратом) знижувати в ній активність FVIII.

Хід визначення. *Готують розведення контрольної номальної плазми 1:1 (200 мкл нормальної плазми та 200 мкл досліджуваної безтромбоцитної плазми) та серію розведень досліджуваної плазми (у 2, 4, 8, 16, 32 та 64 разів): 2 пробірка – 200 мкл досліджуваної плазми та 200 мкл імідазольного буферу (розведення у 2 рази); 3 – 200 мкл розведеної плазми з пробірки № 2 і 200 мкл імідазольного буферу (розведення у 4 рази); 4 – 200 мкл розведеної плазми з пробірки № 3 і 200 мкл імідазольного буферу (розведення у 8 разів). Аналогічно роблять і наступні розведення.*

*До кожної пробірки додають контрольної нормальної плазми. У еталоні, контролі та у кожному досліджуваному зразку нормальна плазма буде розведена у 2 рази і вміст FVIII у кожній пробі буде 50 % (у дефіцитній плазмі та досліджуваній плазмі хворого FVIII відсутній).*

*Після двогодинної інкубації на водяній бані при +37 °C усі пробірки обов'язково поміщають на льодяну баню для зупинки реакції. Після попереднього розведення у 10 разів (до 100 мкл суміші, що інкубувалась, додають 900 мкл імідазольного буферу) у еталонній пробірці та у пробірці № 1 визначають активність FVIII.*

*Розраховують титр інгібітора (за калібрувальним графіком), враховують розведення, в якому залишкова активність знаходилась в межах від 25 до 75 %.*

#### **2.3.4.5 Визначення активності тромбіну [20]**

Активність тромбіну визначали стандартною процедурою згідно вимог Національного інституту здоров'я (National Institute of Health; NIH) по часу зсідання 1 мл 0,1 %-ного розчину фібриногену в 0,15 М NaCl з 10 мМ Тріс-HCl буферним розчином, при рН 7,3, і додаванні 0,01–0,05 мл розчину тромбіну при температурі +37 °C. Активність тромбіну, яка необхідна для визначення, дає час зсідання нормальної контрольної плазми 12–15 с.

**Принцип методу:** визначають час зсідання безтромбоцитної плазми під дією тромбіну, активність якого стандартизована на контрольній нормальній плазмі.

Хід визначення. До 200 мкл прогрітої при +37 °C досліджуваної плазми додають 200 мкл прогрітого розчину тромбіну. Вмикають секундомір і фіксують час утворення згустку.

### 2.3.4.6 Визначення концентрації фібриногену [20]

**Принцип методу:** визначають час зсідання розведеної плазми з надлишком високоактивного тромбіну (не менше 100 NIH/мл). При надлишку тромбіну час утворення згустку залежить від концентрації фібриногену, яку визначають по калібрувальній кривій.

*Хід визначення.* 0,2 мл зразка прогрівають на водяній бані протягом 1 хв, додають 0,2 мл розчину тромбіну (з розрахунку ~ 33 NIH/мл) та вимірюють час утворення фібринового згустку при періодичному встряхуванні пробірки.

Згідно інструкцій виробника калібрувальну плазму розводять шляхом послідовних розведень імідазольним або Трис-HCl буфером у співвідношенні 1:5, 1:10, 1:20 та 1:40. Після чого проводять визначення у всіх зразках аналогічно з досліджуванним зразком.

Концентрацію фібриногену визначають по калібрувальній кривій на логарифмічному папері. Можливий час утворення згустку є в межах 5–30 с.

### 2.3.5 Електрофоретичні дослідження [146]

**Принцип методу:** розділення сумішей білків відповідно до їх електрофоретичної рухливості (функцією довжини поліпептидного ланцюжка або молекулярної маси, а також укладання білкової молекули, посттрансляційних модифікацій та інших факторів).

Вертикальний електрофорез в тонкому шарі поліакриламідного гелю (T=10 або 5-15 %, C=3,5 %) проводили в присутності 0,1 %-ного розчину SDS в системі Леммлі при напрузі 150–200 В протягом 3 годин. Білкові зони фарбували 0,2 %-им розчином Coomassie Brilliant Blue R-250 в 40 %-ому метанолі з 10 %-ою оцтовою кислотою, після попередньої фіксації трихлороцтовою кислотою. Незв'язаний барвник вимивали 10 %-им розчином етанолу в 10 %-ій оцтовій кислоті. В якості білкових маркерів використовували комерційний набір фірми ThermoFisher PageRuler™ Unstained Protein Ladder,

сироватковий альбумін ВРХ, комерційні препарати FVIII (Immunate, Kogenate FS) та протромбінового комплексу (Feiba).

Для визначення співвідношення між фракціями альбуміну та глобулінів проводили електрофорез в нативних умовах на ацетат-целюлозних мембранах [7].

### **2.3.6 Іонообмінна хроматографія фактора VIII на DEAE-Sepharose [30]**

Очистку FVIII проводили на іонообміннику DEAE-Sepharose FAST FLOW (Amersham – тепер GE Healthcare Life Sciences) у скляних колонках розміром (2x5) см<sup>2</sup>, швидкість елюції розчину становила (0,2–0,4) мл/(см<sup>2</sup> x хв). Перед дослідженням заповнену сорбентом колонку врівноважували буферним розчином такого складу: 50 мМ Тріс-НСl, рН 7,4; 10 мМ Na-цитрат (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>); 0,1 М NaCl; 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>; 2,0 г/л лізину та 8,0 г/л гліцину.

Наносили розчин кріопреципітату, забуференого вихідним розчином. Сорбент промивали 3-кратним об'ємом вихідного буферу. Для елюції FVIII використовували буфер із іонною силою 0,3 М NaCl.

Фракції збирали по 5 мл. на колекторі фракцій «Діафрак 002». У відібраних фракціях проводили вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 280 нм та активності FVIII. Фракції, що проявляли найвищу активність, об'єднували та використовували для подальших досліджень.

Регенерацією сорбенту проводили у такій послідовності:

5-ти об'ємами 1,0 М NaCl;

5-ти об'ємами 0,5 М NaCl;

5-ти об'ємами 0,1 М NaOH;

2-ома об'ємами дистильованої води;

4-ма об'ємами робочого буферу.

### **2.3.7 Афінна хроматографія фактора VIII зсідання крові на кремнеземних сорбентах**

Барвник-лігандну афінну хроматографію FVIII зсідання крові проводили в скляних колонках розміром (2x5) см<sup>2</sup>, швидкість елюції розчину становила 0,2–0,4 мл/(см<sup>2</sup> х хв). Перед дослідженням колонку врівноважували 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином, рН 7,4. Не зв'язаний із сорбентом проскок FVIII збирали фракційно на колекторі фракцій «Діафрак 002» («БіоМарк», Україна).

Регенерацію колонки проводили 50 мМ Тріс-НСІ буфером, рН 7,4, що містить 1,0 М NaCl та 25,0 % ізопропанол.

### **2.3.8 Статистичні методи**

Статистичну обробку матеріалу проводили за допомогою пакету прикладних програм Windows-Exel та Statistica 17 ESPP. У роботі використовували описову статистику, кореляційний аналіз та двовибірковий t-тест з різними дисперсіями. Перевірку на нормальність розподілу проводили за критеріями Колмогорова-Смірнова.

Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні достовірності не менше 95 % (P<0,05).

## **2.4 Висновки до розділу 2**

Таким чином, підібрані матеріали і методи відповідають меті та завданням дисертаційної роботи, що забезпечило отримання коректних, статистично достовірних результатів досліджень.

### **3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

#### **3.1 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ МАКРОПОРИСТИХ КРЕМНЕЗЕМНИХ СОРБЕНТІВ ІЗ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ АКТИВНИМИ БАРВНИКАМИ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ**

##### **3.1.1 Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами-барвниками**

Серед важливих властивостей досліджуваних барвників слід виділити наступні: всі вони водорозчинні, швидко та міцно (ковалентно) зв'язуються з хроматографічною матрицею, надлишок незв'язаного барвника легко відмивається кілька кратним промиванням сорбенту розчином з високою іонною силою та гідрофобністю [84, 85, 92, 95, 98]. Безумовно, основні властивості синтезованих сорбентів зумовлені ще й природою матриці [26, 37, 183].

Оскільки попередні роботи, проведені в лабораторії, показали можливість використання методу афінної хроматографії на кремнеземній матриці з активними барвниками в ролі лігандів для очищення низки білків плазми крові, зокрема, факторів протромбінового комплексу [9], та продемонстрували ряд переваг цього методу, нами проведені дослідження можливості їх застосування в процесі отримання FVIII зсідання крові.

Синтезовано ряд сорбентів методом «з включенням солі» (розділ 2.2.1.) шляхом додавання в інкубаційну суміш хлориду натрію, а сам синтез проводили протягом тривалого часу при рН 10,5 [153].

Ковалентне зв'язування з матрицею відбувається завдяки нуклеофільному заміщенню атома хлору тріазинового кільця чи водню вініл-сульфонового залишку з гідроксильними або аміно-групами на поверхні матриці [148, 219].

На рис. 3.1 зображено загальна схема синтезу макропористих кремнеземних сорбентів з реактивними барвниками тріазинового ряду в ролі лігандів.

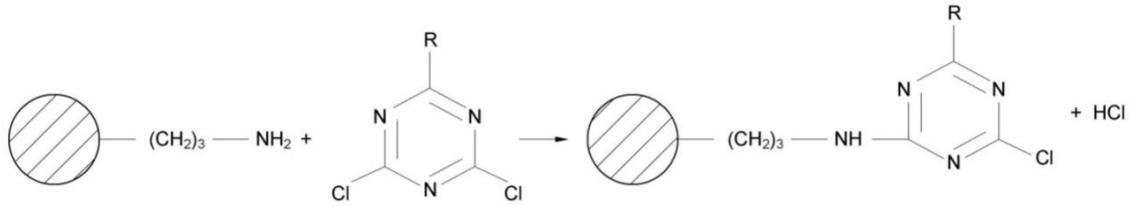


Рис. 3.1 Загальна схема іммобілізації тріазинового барвника на аміно-похідній матриці

Структурні формули барвників і місце зв'язування до кремнеземної матриці представлені на рис. 3.2 – 3.8.

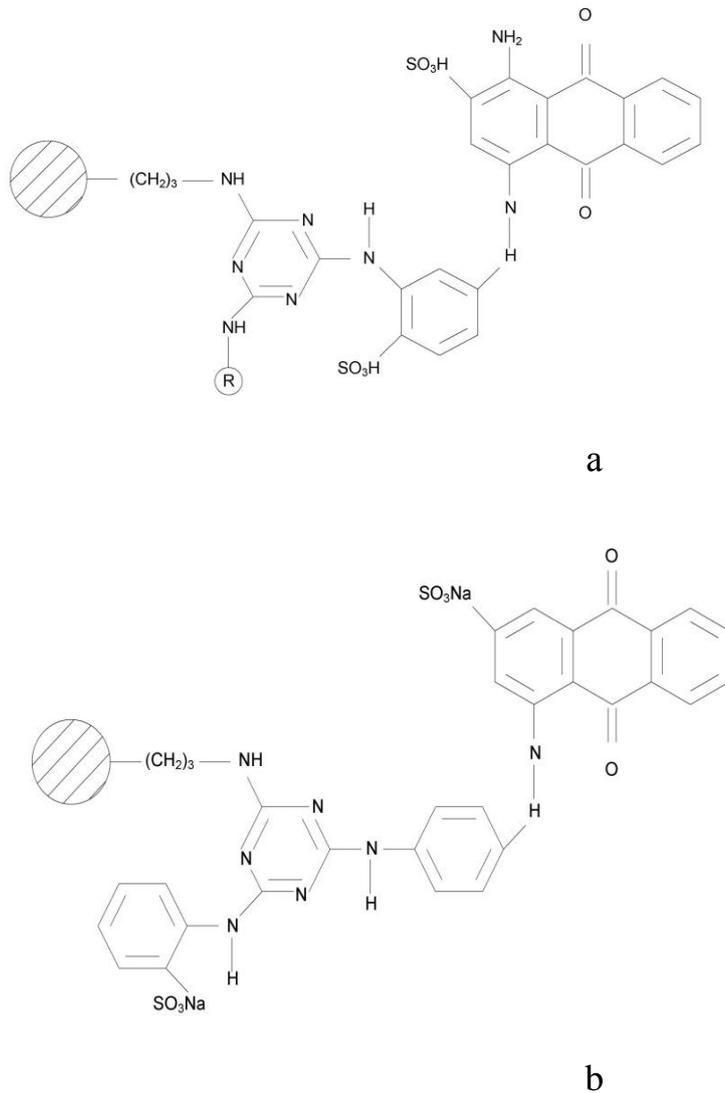
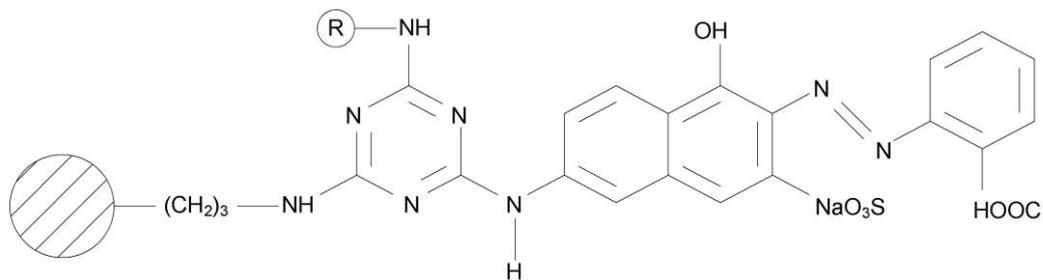
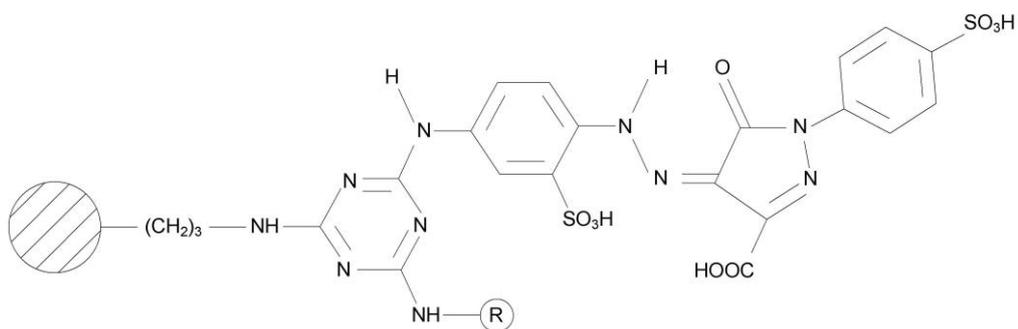


Рис. 3.2 Кремнеземні матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками:  
а – Діасорб-Procion Blue MXR (Активний яскраво-голубий К); б – Діасорб-Procion Blue НВ

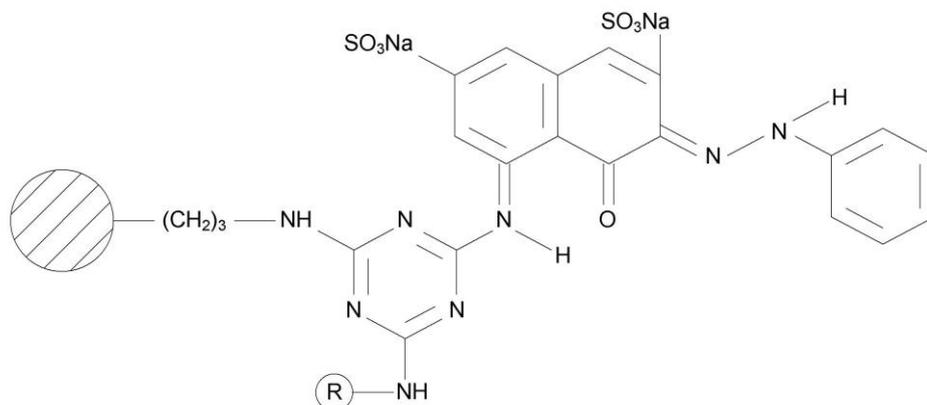
Примітка. Тут і на рис. 3.3–3.5, 3.7 : R – похідне Тріс(гідроксиметил)амінометану



a

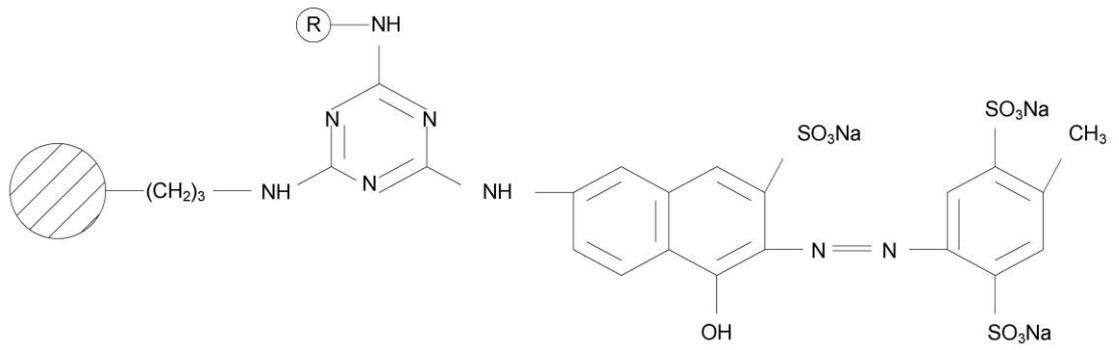


b

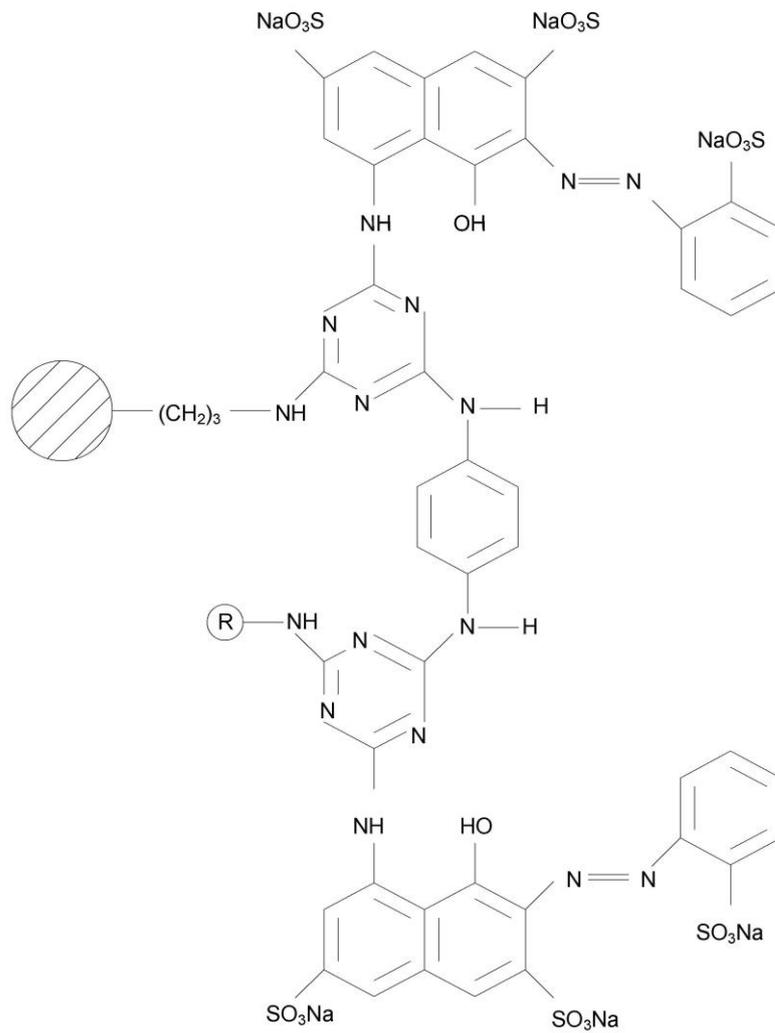


c

Рис. 3.3 Кремнеземні матриці з іммобілізованими дихлортріазиновими барвниками: а – Діасорб-Reactive Brown 10; б – Діасорб-Procion Gelb M4R; с – Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ

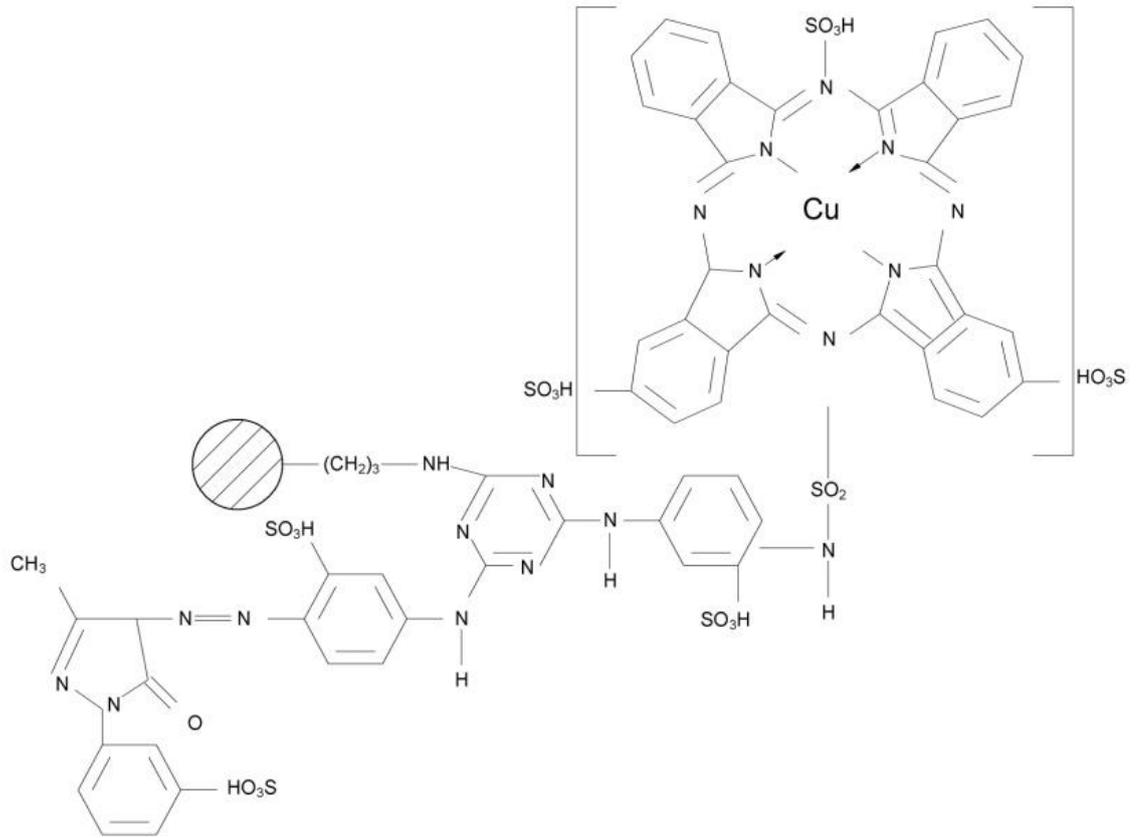


a

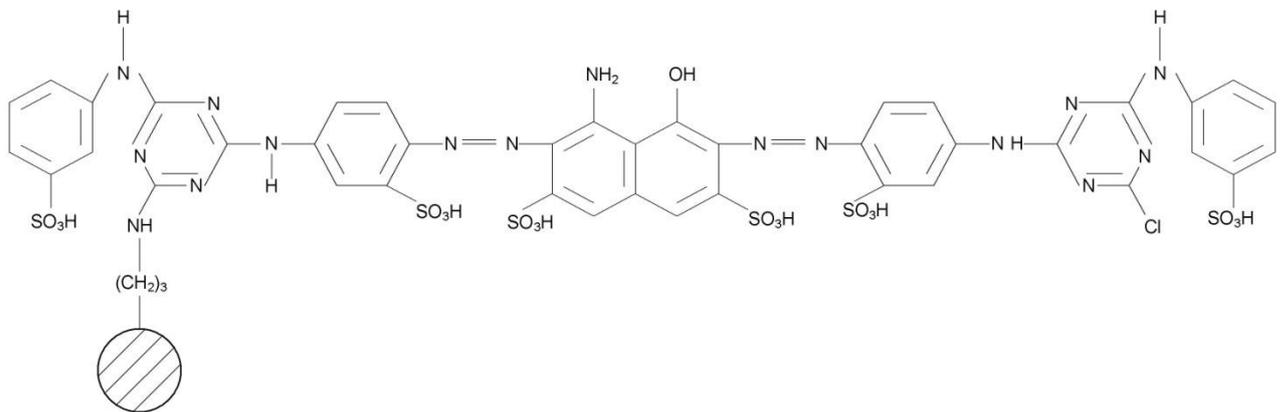


b

Рис. 3.4 Кремнеземні матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками:  
 а – Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ; б – Діасорб-Reactive Red 120

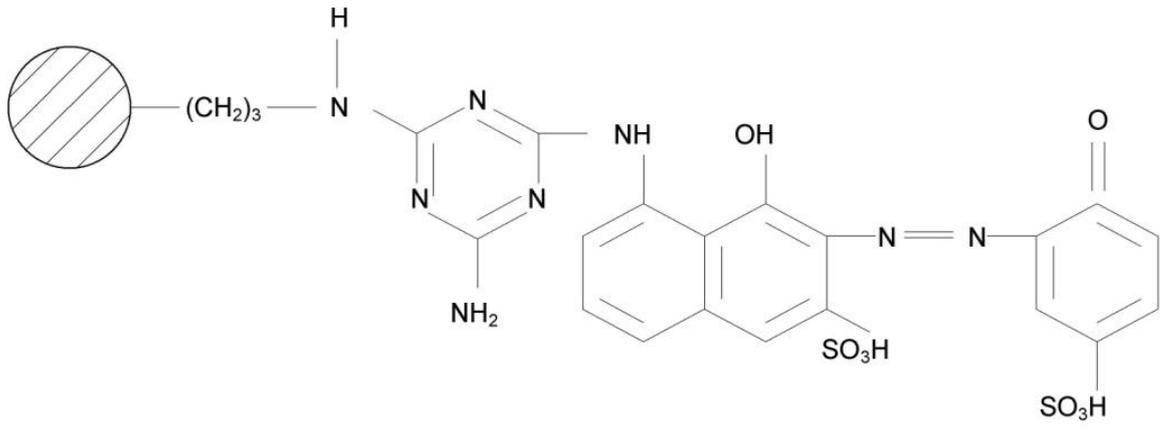


a

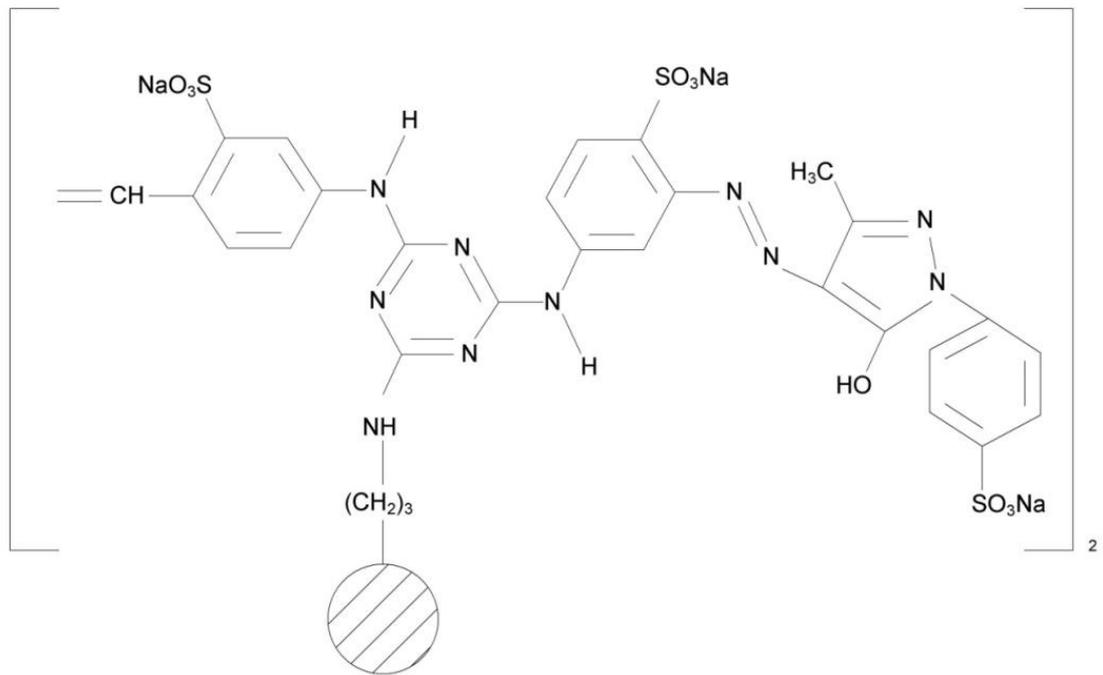


b

Рис. 3.5 Кремнеземні матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками:  
 а – Діасорб-Reactive Green 5; б – Діасорб-Reactive Green 19

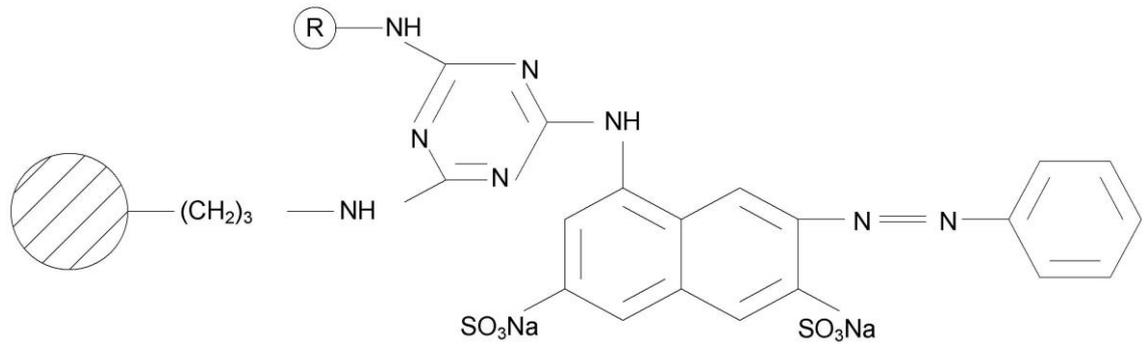


a

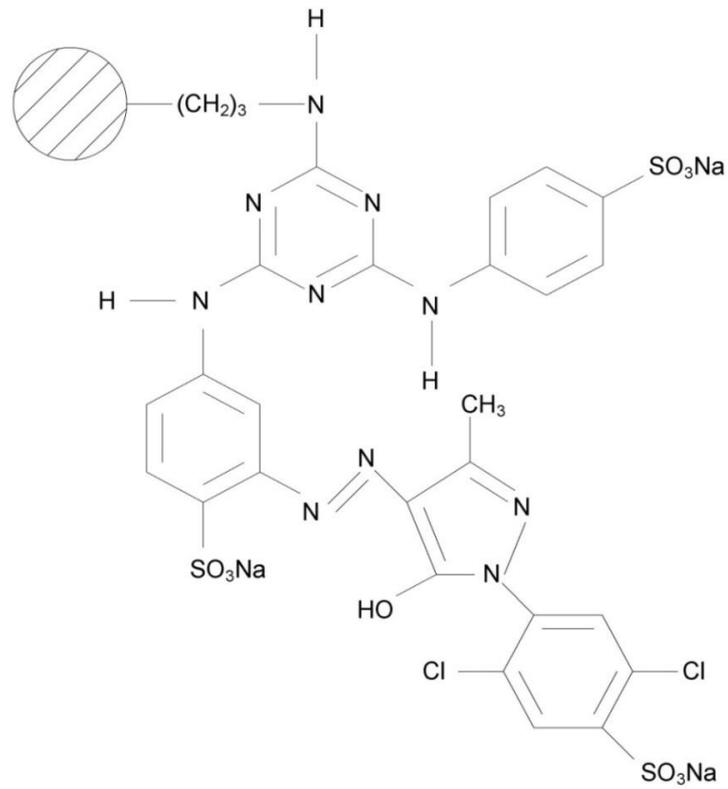


b

Рис. 3.6 Кремнеземні матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками:  
 а – Діасорб-Активний фіолетовий 4К; б – Діасорб-Procion Yellow HE3G

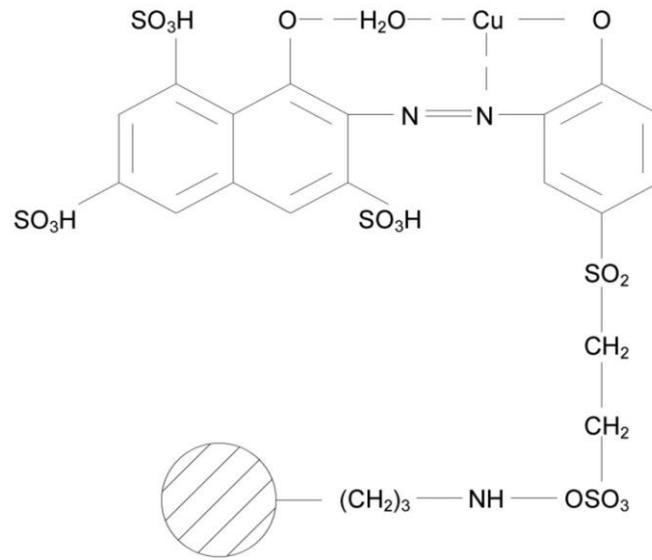


a

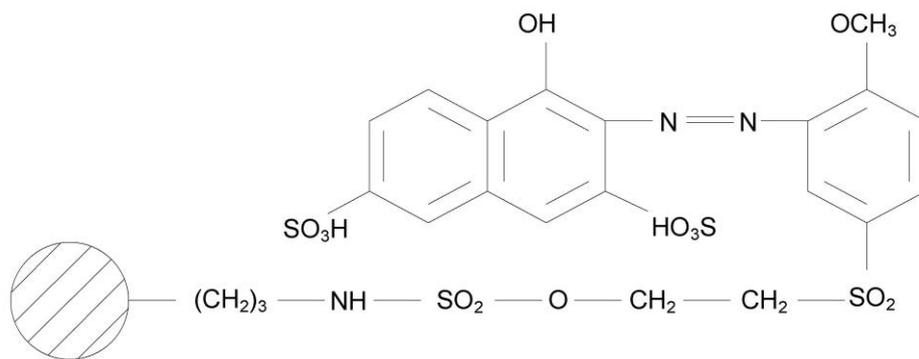


b

Рис. 3.7 Кремнеземні матриці з іммобілізованими тріазиновими барвниками:  
 а – Діасорб-Procion Red MX5B; б – Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP



a



b

Рис. 3.8 Кремнеземні матриці з іммобілізованими вініл-сульфоновими барвниками: а – Діасорб-Активний бордо 4СГ; б – Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ

Для барвників Procion Blue MXR, Procion Red MX5B, Procion Gelb M4R, Reactive Brown 10, Активний яскраво-голубий К, Активний яскраво-червоний 5СХ та Активний яскраво-оранжевий КХ, які є дихлортріазиновими похідними, після іммобілізації на Діасорбі амінопропіловому, вільна реактивна хлоридна група блокувалася в процесі відмивання. Для забезпечення їх повного

блокування сорбенти додатково промивали розчином Тріс(гідроксиметил) амінометану.

Як видно з представленого рисунку 3.2, барвники Procion Blue MXR та Procion Blue NB є спорідненими за структурою: наявність антрахінонового хромофору, приєднаного до тріазинового кільця через бензамідиновий залишок (в *мета*- та *орто*- положеннях, відповідно). Згідно з вітчизняною класифікацією, якої дотримується український завод-виробник «Барва», барвник Procion Blue MXR носить назву Активний яскраво-голубий К [9].

Барвник Reactive Red 120 має унікальну симетричну структуру: дві заміщені монохлортріазинові групи, дві діазогрупи, наявність бензамідинового залишку (рис. 3.4.). Reactive Green 19 є також бісиметричним барвником з двома тріазиновими групами та двома залишками, близькими до бензамідину (рис. 3.5). Барвник Reactive Green 5 містить бензамідиновий залишок і, на відміну від інших барвників, піразоловий та фталоціаніновий залишки [251]. Всі інші наведені барвники містять нафтилові групи та заміщені ароматичні групи, які можуть відігравати значну роль в гідрофобній взаємодії з досліджуваними білками. Крім того, слід враховувати присутність хлор-, сульфо-, аміно-, гідроксильних та інших груп, які впливають на іонообмінні властивості того чи іншого ліганду.

Проте, придатність того чи іншого сорбенту для очищення білка не завжди можна теоретично обґрунтувати. Необхідно дослідити його в умовах сорбції-десорбції.

Наявність ароматичних бензольних або конденсованих нафтилових чи антрахінонових похідних у різних послідовностях, присутність іонізованих груп, а також гідрофобних залишків визначають різноманітні властивості досліджуваних барвників [3, 9].

Після синтезу сорбентів незв'язані барвники видаляли шляхом послідовного промивання розчинами з високою іонною силою, різними значеннями рН та за участі полярних розчинників (див. розділ 2.3.3) до знебарвлення відмиваючого розчину [9].

### 3.1.2 Дослідження фізико-хімічних властивостей лігандів та сорбентів

Комерційні реактивні барвники містять різні домішки, які можуть вплинути на їх біохімічні властивості та, відповідно, можливість використання [70, 251]. Для визначення ступеня чистоти барвників, наявності чи відсутності домішок у модельному експерименті досліджували спектри світлопоглинання у діапазоні довжин хвиль 190–700 нм розведених розчинів вільних барвників при рН 8,0 на спектрофотометрі Uvidес-510. Одержані результати показали, що всі досліджувані барвники не містять домішок іншого типу барвників, а максимуми спектрів поглинання відповідали паспортним даним. На основі отриманих даних розраховані коефіцієнти молекулярної екстинкції водних розчинів барвників.

Основні характеристики досліджуваних барвників (комерційні назви та їх синоніми, молекулярна маса, емпірична формула, Colour-index (CI), CAS-номер тощо) наведені в табл. 3.1.

Для перевірки та оцінки міцності зв'язку матриця–барвник досліджено вплив різних чинників на синтезовані сорбенти. Хімічну стійкість сорбентів оцінювали під впливом високої іонної сили розчину, полярних розчинників, зміни рН середовища та високої температури. Міцність зв'язку оцінювали виявленням вільного барвника в розчині за світлопоглинанням при відповідній довжині хвилі для кожного барвника, яке вимірювали на спектрофотометрі DS-11FX («DeNovix», Англія). При порушенні зв'язку матриця–ліганд у розчин переходить вільний барвник, який і дає поглинання при відповідній довжині хвилі. Дані дослідження представлені в табл. 3.2 та 3.3. З отриманих результатів випливає, що досліджувані сорбенти є стабільні під дією всіх цих чинників, що свідчить про наявність міцного ковалентного зв'язку між матрицею та лігандом [9, 148, 219]. Поява у супернатанті вільних барвників при високих концентраціях NaCl (5,0 М) чи ізопропанолу (50 %) (табл. 3.2) свідчить про те, що незначна кількість барвників була зв'язана з матрицею за рахунок нековалентної взаємодії.

Таблиця 3.1

## Основні характеристики барвників

№	Назва барвника	Синоніми	Емпірична формула барвника	С.І.	Молекулярна маса	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	Коефіцієнт молярної екстинкції, $\text{M}^{-1}$	CAS
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Активний яскраво-оранжевий КХ	-	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_{10}\text{N}_6\text{S}_3\text{Cl}_2\text{Na}_2$		674,00	465	$1,27 \times 10^5$	
2	Активний фіолетовий 4 К	-	$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{O}_8\text{N}_7\text{S}_2\text{Cl}$		568,50	550	$1,55 \times 10^5$	
3	Активний бордо 4 СГ	-	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_{18}\text{N}_2\text{S}_5\text{CuNa}$		794,00	500	$2,32 \times 10^6$	
4	Активний пурпуровий 4 ЖТ	-	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_{14}\text{N}_2\text{S}_4\text{Na}$		648,00	500	$1,56 \times 10^6$	
5	Активний яскраво-червоний 5 СХ	Procion Brilliant Red 5 SKH, Reactive Red 2, Procion Brilliant Red 5BS; Procion Red MX 5B	$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Cl}_6\text{N}_6\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7$	18200	615,30	510-540	$1,77 \times 10^6$	1780449-8
6	Procion Yellow H-E3G	Reactive Yellow 81, Brilliant Yellow KE-3G, Cibacron yellow G-E, Reactive Yellow KD-3G, Reactive Brilliant Yellow KE-3G, Reactive Brilliant Yellow KM-3G, Reactive Yellow HE4G	$\text{C}_{52}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_{18}\text{Na}_6\text{O}_{20}\text{S}_6$		1632,20	356	$1,23 \times 10^6$	59112-78-6
7	Procion Gelb M4R	Reactive Orange 14; Acticrom Yellow F4R; Adiaactive Yellow M4R	$\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_2$	19138	631,40	430	$1,76 \times 10^6$	12225-86-4

Таблиця 3.1 (продовження)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
8	Procion Blue HB	Cibacron Blue F3G-A, Cibacron Blue 3G, Basilen blue E-3G	$C_{29}H_{20}ClN_7Na_3O_{11}S_3$	61211	774,10	607	$1,78 \times 10^5$	79241-87- 5
9	Procion Blue MXR	Reactive Blue 4, Procion Brilliant Blue MR, Активний яскраво- голубий К	$C_{23}H_{14}Cl_2N_6O_8S_2$	61205	637,40	595	$4,75 \times 10^5$	13324-20-4
10	Cibacron Brilliant Yellow 3GP	Reactive Yellow 2; Reactive Brilliant Yellow К 6G; Reactive Flavine К- 6G	$C_{25}H_{15}Cl_3N_9Na_2O_{10}S_3$	18972	873,00	402- 406	$(1,031,14) \times 10^4$	50662-99-2
11	Reactive Red 120	Procion Red HE3B, Reactive Brilliant Red KE- 3B	$C_{44}H_{24}Cl_2N_{14}O_{20}S_6Na_6$	292775	1470,00	510;53 5	$6,58 \times 10^4$	61951-82-4
12	Reactive Green 5	Basic Green 5	$C_{12}H_{16}O_{18}N_{10}S_6Cu$ Aryl <sub>2</sub> PtCy	52020	844,00	340; 675	$1,91 \times 10^4$	12225-74-0
13	Reactive Brown 10	Brown C-5BR, Red Brown 4R, Brown MX-5BR	$C_{20}H_{14}O_6N_6SCrCl$ $C_{20}H_{11}Cl_2N_6NaO_6S$	179060	557,30	525	$4,6 \times 10^4$	12225-67-1
14	Reactive Green 19	Reactive Black Green KE- 4BD; Reactive Dark Procion Green H-E4BD	$C_{40}H_{31}O_{20}N_{15}S_6$ $C_{40}H_{23}Cl_2N_{15}Na_6O_{19}S_6$ $C_{48}H_{31}O_{23}N_{15}S_6Cl_2Na_6$	205075	1233,00 1418,94	410; 620	$2,17 \times 10^4$	61931-49- 5
15	Procion Red MX5B	Procion Brilliant Red M5B; Procion Brilliant Red M5B; Procion Red M- 5B; Reactive Bright Red X-3B	$C_{19}H_{10}Cl_2N_6Na_2O_7S_2$	18200	615,33	538	$1,29 \times 10^4$	17804-49- 8

Таблиця 3.2

## Дослідження хімічної стійкості синтезованих сорбентів (вплив іонної сили розчину та полярних розчинників)

№	Хімічний чинник Назва сорбенту	Вплив іонної сили розчину				Вплив полярних розчинників			
		0,5 M NaCl	1,0 M NaCl	2,0 M NaCl	5,0 M NaCl	5,0 % isoPro	10,0 % isoPro	25,0 % isoPro	50,0 % isoPro
1	Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	-	-	-	+	-	-	-	-
2	Діасорб-Активний фіолетовий 4К	-	-	+	+	-	-	+	+
3	Діасорб-Активний бордо 4СГ	-	-	-	+	-	-	+	+
4	Діасорб-Активний пурпуровий 4 ЖТ	-	-	-	+	-	-	-	-
5	Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Діасорб-Активний яскраво-голубий К	-	-	-	+	-	-	-	+
7	Діасорб-Procion Yellow HE3G	-	-	+	+	-	-	-	+
8	Діасорб-Procion Gelb M4R	-	-	-	-	-	-	-	+
9	Діасорб-Procion Blue HB	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Діасорб-Procion Blue MXR	-	-	-	+	-	-	-	-
11	Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Діасорб-Reactive Red 120	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Діасорб-Reactive Green 5	-	-	+	+	-	-	-	+
14	Діасорб-Reactive Brown 10	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Діасорб-Reactive Green 19	-	-	-	+	-	-	-	+
16	Діасорб-Procion Red MX5B	-	-	-	-	-	-	-	-

**Примітка.** Тут і в табл.3.3: стійкість сорбентів визначали за світлопоглинанням супернатанту при довжині хвилі, що відповідала максимуму поглинання відповідного барвника: «-» – відсутність поглинання при даних умовах;  
«+» – наявність поглинання за даних умовах.

Таблиця 3.3

## Дослідження фізичної стійкості синтезованих сорбентів (вплив рН розчину та температури)

№	Фізичний чинник Назва сорбенту	рН розчину						Температура				
		1,5	2,0	4,0	7,0	8,0	9,0	10,0	80 °С, 2 год	100 °С, 2 год	120 °С, 2 год	Автоклаву- вання, 1,1 атм, 120 °С, 60 хв
1	Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2	Діасорб-Активний фіолетовий 4К	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3	Діасорб-Активний бордо 4СГ	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
5	Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6	Діасорб-Активний яскраво-голубий К	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	Діасорб-Procion Yellow HE3G	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
8	Діасорб-Procion Gelb M4R	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
9	Діасорб-Procion Blue HB	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
10	Діасорб-Procion Blue MXR	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
11	Діасорб -Cibacron Brilliant Yellow 3GP	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
12	Діасорб-Reactive Red 120	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13	Діасорб-Reactive Green 5	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
14	Діасорб-Reactive Brown 10	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
15	Діасорб-Reactive Green 19	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
16	Діасорб-Procion Red MX5B	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Вивільнення барвника в розчин при рН 10,0 (табл. 3.3) обумовлено частковим гідролізом кремнеземної матриці. Слід зазначити, що вище перелічені концентрації цих речовин чи значення рН 10,0 не використовуються в технології отримання FVIII. Хімічна стабільність отриманих сорбентів надає можливість застосовувати розчини з різноманітними властивостями (рН, іонна сила, полярність, тощо) для елюції препаратів та ефективного промивання колонок з сорбентами.

Висока термостійкість надає цим сорбентам суттєвих переваг у порівнянні з органічними, оскільки процес автоклавування забезпечує антивірусну обробку сорбентів без втрати їх властивостей (табл. 3.3); дозволяє проводити пастеризацію чи стерилізацію сорбентів; синтезовані сорбенти не піддаються руйнуванню під впливом мікроорганізмів [70, 84, 251].

Встановлені властивості дозволяють проводити регенерацію сорбентів при використанні розчинів з високими концентраціями солей чи полярності, а також, після завершення хроматографічного процесу, з метою вірусної та бактеріальної безпеки, проводити їх стерилізацію. Це є важливий аргумент переваги використання неорганічних сорбентів над органічними, оскільки гарантує вірусну безпеку у роботі та дозволяє проводити хроматографію із «безмежним» числом циклів (стійкість до дії мікроорганізмів).

Відомо, що деякі барвники при взаємодії з білками можуть утворювати комплекси, внаслідок чого відбувається зсув максимуму поглинання (рис. 3.9–3.13) [71, 204]. Для попереднього відбору барвників, як потенційних лігандів зв'язування того чи іншого білка, проводили дослідження з вивчення впливу незв'язаних барвників на окремі модельні білки, зокрема, досліджені спектри поглинання вільних барвників, а також їх можливі комплекси з сироватковим альбуміном людини (ЛСА) та тромбіном (у діапазоні довжин хвиль 190–700 нм; (спектрофотометр Uvidesc-510) концентрація білка 1 мг/мл, рН 7,4; при кімнатній температурі) [14].

Зсув пікового поглинання при певній довжині хвилі для того чи іншого барвника в присутності білка може свідчити про їхню біоспецифічність

(наявність взаємодії білок–барвник) [70, 71, 94 95]. Серед усіх досліджуваних барвників 5 дали зсуви в спектрах поглинання та могли б розглядатись як потенційні ліганди для досліджуваних білків (в даному випадку тромбіну й альбуміну). На рис. 3.9–3.13 продемонстровано спектри поглинання досліджуваних розчинів вільних барвників та зсуви поглинання, а саме: Активного яскраво-червоного 5СХ від 540 до 545 нм, Procion Blue HB від 620 до 630 нм, Procion Blue MXR від 600 до 625 нм, Procion Yellow HE3G від 350 до 355 нм та Procion Gelb M4R від 430 до 440 нм.

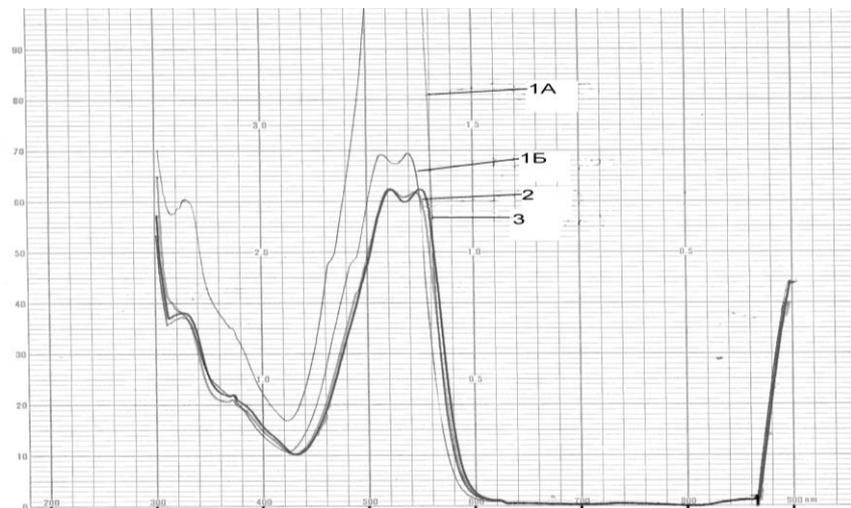


Рис. 3.9 Спектри поглинання барвника Активного яскраво-червоного 5СХ

Примтки: 1А, 1Б – вільний барвник, розведений в 5 та 10 разів; 2 – барвник в присутності тромбіну; 3 – барвник в присутності альбуміну

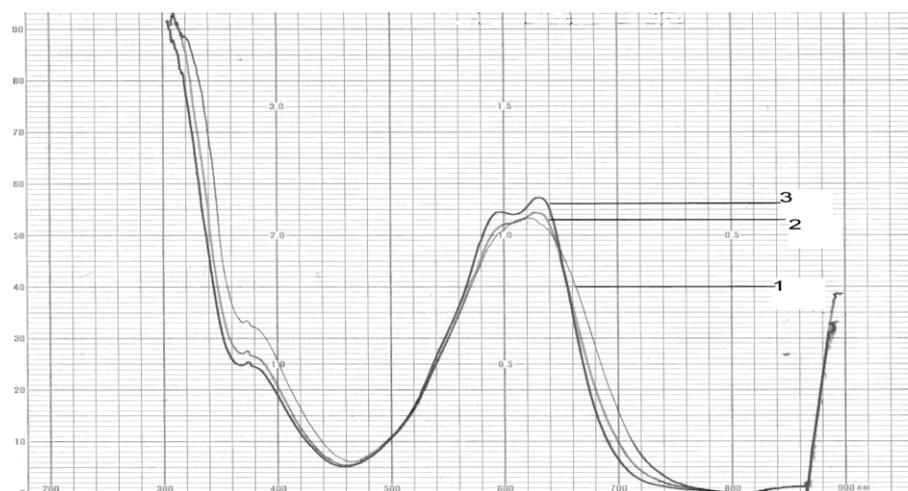


Рис. 3.10 Спектри поглинання барвника Procion Blue HB

Примітка. Тут і на рис.3.11–3.13 :1 – вільний барвник; 2 – барвник в присутності тромбіну; 3 – барвник в присутності альбуміну

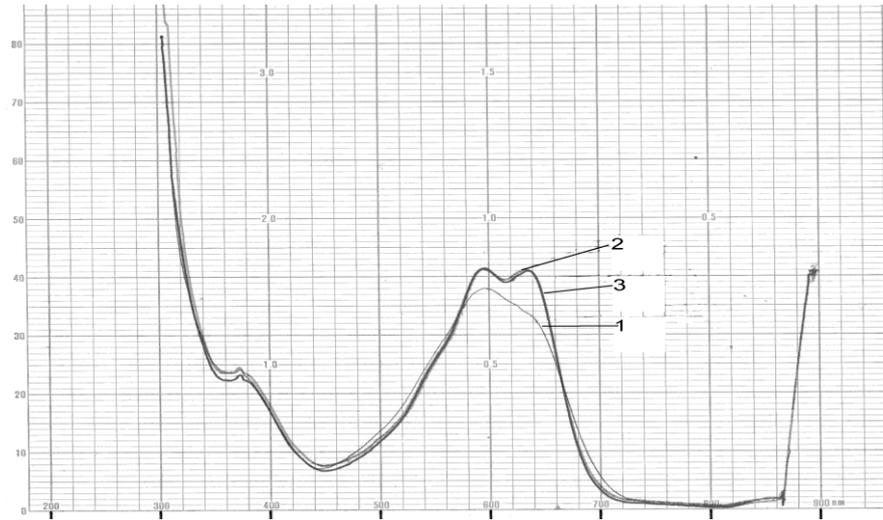


Рис. 3.11 Спектри поглинання барвника Procion Blue MXR

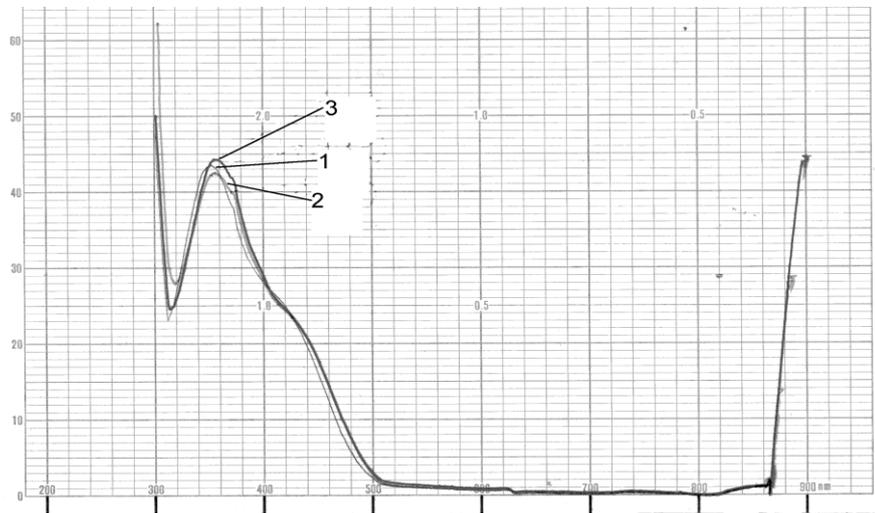


Рис. 3.12 Спектри поглинання барвника Procion Yellow HE3G

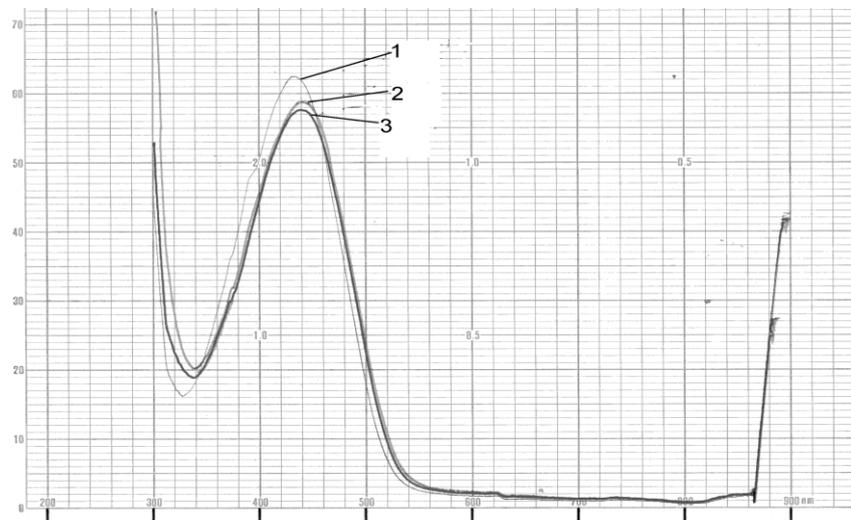


Рис. 3.13 Спектри поглинання барвника Procion Gelb M4R

### 3.1.3 Очищення фактора VIII на макропористих кремнеземних сорбентах із імобілізованими активними барвниками

#### 3.1.3.1 Дослідження сорбції/десорбції фактора VIII

З метою відбору кращого для наступних експериментів проводили дослідження сорбції/десорбції FVIII з синтезованими сорбентами. Для цього як модельні використали комерційні препарати FVIII зсідання крові: Кріопреципітат та Immunate [11, 28, 40, 45, 46, 55, 221, 223, 224].

Препарат Кріопреципітат – фракція кріоглобулінів, отримана з 1 дози свіжозамороженої плазми (СЗП) і розведена до об'єму близько 20–30 мл робочого буферного розчину, містить FVIII (>70 МО/дозу), vWF (>100 МО/дозу), фібриноген ( $\geq 140$  мг/дозу), FXIII, фібронектин та інші [13, 80].

Препарат Immunate – ліофілізований препарат FVIII (500 МО/дозу) і vWF ( $\geq 250$  МО/дозу). Містить як допоміжні речовини альбумін людини, гліцин, лізин гідрохлорид, натрію хлорид, натрію цитрат, кальцію хлорид [134].

Каталітична дія ферментів обмежена певним інтервалом рН оптимуму. Відхилення від цього оптимуму веде, як до зниження ферментативної активності, так і до зменшення афінності ферменту до ліганду [37]. Іонні та гідрофобні взаємодії, що мають місце при афінній сорбції, піддаються значному впливу рН розчину. З літературних джерел відомо, що FVIII є стабільним при рН 6,5–8,5, а ізоелектрична точка становить 6,95–7,02 [77]. Сорбцію/десорбцію білка вивчали при двох величинах рН – 7,4 (фізіологічне значення) та 8,0 (при якому, за попередніми дослідженнями, зв'язуються білки ППСБ).

Дослідження проводили batch-методом: до 2 мл кожного сорбенту, врівноваженого 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином з рН 7,4 або 8,0, додавали по 2 мл розчину досліджуваного зразка з відповідним значенням рН [11, 224]. Дані дослідження представлені у таблицях 3.4–3.7. Слід підкреслити, що дані усіх досліджень підлягають параметричному гаусівському розподілу (перевірку на нормальний розподіл здійснювали за критеріями Колмогорова-Смірнова).

Таблиця 3.4

**Сорбційні властивості сорбентів при нанесенні Кріопреципітату,  
рН 7,4 (M±m, n=3)**

Зразки	Активність FVIII, МО/мл	Концентрація білка, мг/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Ступінь очищення, раз
Вихідний розчин	0,92±0,02	25,99±0,05	0,40±0,01	1,00
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	0,96±0,01	9,45±0,12*	1,00±0,03	2,83
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	0,74±0,04	12,12±0,07*	0,60±0,03	1,69
Діасорб-Активний бордо 4СГ	0,92±0,02	10,07±0,04*	0,90±0,02	2,53
Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	0,98±0,02	4,72±0,13*	2,10±0,10	5,78
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	0,79±0,02	6,48±0,02*	1,20±0,03	3,39
Діасорб-Procion Yellow HE3G	0,87±0,01	14,79±0,52*	0,60±0,01	1,64
Діасорб-Procion Blue HB	0,92±0,02	6,48±0,02*	1,40±0,03	3,92
Діасорб-Procion Gelb M4R	1,03±0,06	4,83±0,31*	2,30±0,01	6,28
Діасорб-Procion Blue MXR	0,98±0,02	3,28±0,08*	3,00±0,09	8,33
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP	0,92±0,02	11,50±0,02*	0,80±0,02	2,22
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	1,02±0,07	4,77±0,13*	2,10±0,08	5,92

Примітка. Тут і в табл. 3.5, 3.9, 3.10: \* – різниця значень вірогідна відносно вихідного розчину ( $P \leq 0,01$ )

**Сорбційні властивості сорбентів при нанесенні Кріопреципітату,  
рН 8,0 (M±m, n=3)**

Зразки	Активність FVIII, МО/мл	Концентрація білка, мг/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Ступінь очищення, раз
Вихідний розчин	0,92±0,02	25,99±0,05	0,40±0,01	1,00
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	0,95±0,02	11,06±0,16*	0,90±0,03	2,36
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	0,95±0,03	17,62±0,28*	0,50±0,03	1,50
Діасорб-Активний бордо 4СГ	0,93±0,03	10,97±0,04*	0,90±0,03	2,36
Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	0,99±0,01	8,03±0,05*	1,20±0,03	3,42
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	0,94±0,02	11,49±0,02*	0,80±0,01	2,27
Діасорб-Procion Yellow HE3G	0,79±0,02	13,06±0,11*	0,60±0,02	1,69
Діасорб-Procion Blue HB	0,95±0,03	6,87±0,04*	1,40±0,04	3,83
Діасорб-Procion Gelb M4R	0,99±0,01	12,06±0,07*	0,80±0,01	2,27
Діасорб-Procion Blue MXR	1,05±0,05	8,52±0,03*	1,20±0,05	3,41
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP	0,99±0,01	11,50±0,02*	0,90±0,01	2,39
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	0,95±0,03	7,08±0,04*	1,30±0,04	3,72

Таблиця 3.6

**Сорбційні властивості сорбентів при нанесенні Immunate,  
рН 7,4 (M±m, n=3)**

Зразки	Активність FVIII, МО/мл	Концентрація білка, мг/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Ступінь очищення, раз
Вихідний розчин	4,20±0,12	2,40±0,04	17,45±0,75	1,00
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	3,66±0,18	2,40±0,10	15,31±0,19	0,88
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	3,40±0,10	1,60±0,10*	21,62±0,88	1,24
Діасорб-Активний бордо 4СГ	3,85±0,10	1,60±0,10*	21,35±0,91	1,22
Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	4,07±0,17	0,40±0,02#	100,12±5,07	5,74
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	3,37±0,09	2,10±0,10	16,50±0,96	0,95
Діасорб-Procion Yellow HE3G	3,67±0,18	1,40±0,10*	26,72±1,10	1,53
Діасорб-Procion Blue HB	4,20±0,12	0,50±0,01#	93,35±0,56	5,35
Діасорб-Procion GelbM4R	4,20±0,20	0,50±0,01#	87,25±3,00	5,00
Діасорб-Procion Blue MXR	4,43±0,09	0,70±0,01#	60,00±1,94	3,44
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP	3,70±0,15	1,70±0,07*	21,51±0,93	1,23
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	4,47±0,29	0,50±0,05#	95,54±4,39	5,48
Діасорб- Reactive Red 120	3,57±0,12	2,40±0,10	14,74±1,23	0,84
Діасорб- Reactive Green 5	3,83±0,17	2,10±0,10	18,42±0,48	1,06
Діасорб- Reactive Brown 10	3,93±0,07	1,90±0,02	20,17±0,28	1,16
Діасорб- Reactive Green 19	3,60±0,12	2,30±0,20	15,51±1,09	0,89
Діасорб- Reactive Red MX5B	3,83±0,17	1,80±0,10	21,29±0,66	1,22

Примітка. Тут і в табл.3.7:\* – різниця значень вірогідна відносно вихідного розчину ( $P \leq 0,05$ )  
# – різниця значень вірогідна відносно вихідного розчину ( $P \leq 0,01$ )

Таблиця 3.7

**Сорбційні властивості сорбентів при нанесенні Immunate,  
рН 8,0 (M±m, n=3)**

Зразки	Активність FVIII, МО/мл	Концентрація білка, мг/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Ступінь очищення, раз
Вихідний розчин	4,20±0,12	2,40±0,04	17,45±0,75	1,00
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	4,00±0,12	2,30±0,20	17,55±0,75	1,00
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	3,43±0,03	1,60±0,10	21,92±1,61	1,26
Діасорб-Активний бордо 4СГ	3,63±0,07	1,70±0,10	21,07±1,64	1,21
Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	3,70±0,17	1,00±0,03#	37,67±1,51	2,16
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ	3,93±0,18	2,00±0,20	19,39±0,97	1,11
Діасорб-Procion Yellow HE3G	3,75±0,14	1,50±0,20	24,77±2,45	1,42
Діасорб-Procion Blue HB	3,60±0,10	0,90±0,01#	40,01±1,21	2,29
Діасорб-Procion Gelb M4R	3,87±0,09	1,20±0,02#	32,78±0,51	1,88
Діасорб-Procion Blue MXR	4,13±0,13	1,70±0,10*	24,51±1,17	1,40
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP	3,62±0,07	2,00±0,20	18,66±2,01	1,07
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	3,85±0,08	1,80±0,10*	22,03±0,66	1,26
Діасорб- Reactive Red 120	3,80±0,20	2,40±0,30	15,96±1,21	0,91
Діасорб- Reactive Green 5	4,05±0,19	1,80±0,10	21,98±0,66	1,26
Діасорб- Reactive Brown 10	3,67±0,18	2,00±0,20	18,37±1,01	1,05
Діасорб- Reactive Green 19	3,58±0,01	2,40±0,10	15,00±0,25	0,86
Діасорб- Reactive Red MX5B	3,60±0,10	2,10±0,10	17,40±0,71	1,00

Дослідженнями з'ясовано, що FVIII не сорбується жодним зі синтезованих сорбентів, однак питома активність у розчині зростає, а, відповідно, відбувається процес очищення [28, 40, 45, 46, 221, 223, 224, 230]. Тобто, у даному випадку зростання питомої активності FVIII зсідання крові можна пояснити сорбцією супутніх білків (явище негативної афінної сорбції) (табл. 3.4–3.7).

Із досліджуваних сорбентів можна виділити групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К [27, 28, 42, 51]. Дані підтверджуються статистично двовибірковим t-тестом з різними дисперсіями при визначенні значущості різниці між групами. При статистичному аналізі встановлено, що існує достовірна відмінність між концентрацією нанесеного білка та сорбованого ( $P \leq 0,05$ ), але не проявляється достовірна відмінність між активністю фактора до нанесення та у супернатанті після сорбції ( $P \geq 0,05$ ).

У процесі інкубації досліджуваного розчину препарату FVIII з цими сорбентами протягом 60 хв питома активність зростала з  $0,036 \pm 0,001$  до  $0,300 \pm 0,009$  МО/мг білка (Кріопреципітат) і з  $17,450 \pm 0,750$  до  $100,120 \pm 5,069$  МО/мг білка (Immunate) [42, 51]. У результаті проведення простої процедури хроматографічного очищення досягли значного зростання питомої активності досліджуваного фактора і відібрали найкращі сорбенти для використання в процесі очищення FVIII. На рисунках продемонстровано порівняння відносного зв'язування білка при рН 7,4 та 8,0 (рис. 3.14) та зростання питомої активності (рис. 3.15) під час дослідження сорбції FVIII з синтезованими сорбентами.

З представлених рисунків видно, що в обох випадках краща сорбція білка відбувалась при рН 7,4. Проте досліджувані сорбенти проявляють більшу сорбційну здатність по відношенню до білків Кріопреципітату, ніж до альбуміну у препараті Immunate. Слід зауважити, що концентрація нанесеного білка суттєво відрізнялась у цих дослідженнях (вихідна концентрація білка Кріопреципітату  $25,99 \pm 0,05$  мг/мл, а Immunate –  $0,241 \pm 0,004$  мг/мл). Оскільки у

препараті Кріопреципітат міститься низка різних за властивостями білків, які і можуть зв'язуватись з даними сорбентами, очищення FVIII в даному випадку відбувається не лише через сорбцію альбуміну, як нецільового білка, але й інших (фібриноген, фібронектин тощо).

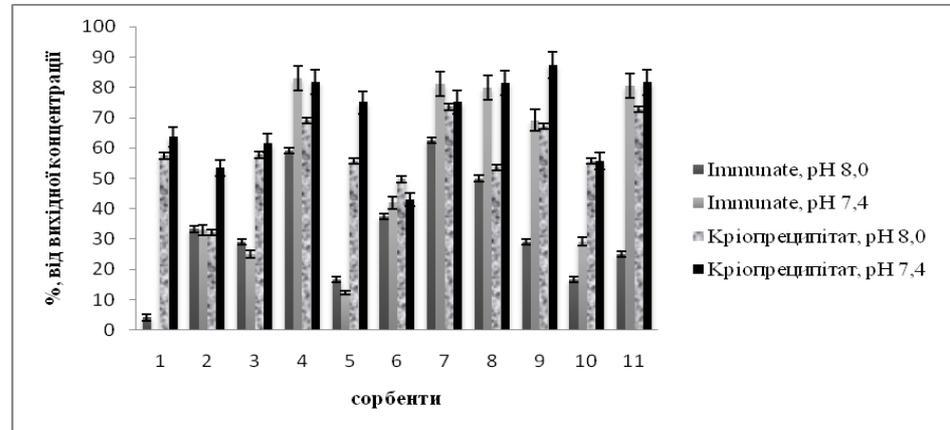


Рис. 3.14 Порівняльна характеристика зв'язування білка з сорбентами при різних значеннях рН ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Примітка. Тут і на рис. 3.15 та 3.19: 1 – Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ; 2 – Діасорб-Активний фіолетовий 4К; 3 – Діасорб-Активний бордо 4 СГ; 4 – Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ; 5 – Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ; 6 – Діасорб-Procion Yellow HE3G; 7 – Діасорб-Procion Blue HB; 8 – Діасорб-Procion Gelb M4R; 9 – Діасорб-Procion Blue MXR; 10 – Діасорб- Cibacron Brilliant Yellow 3GP; 11 – Діасорб-Активний яскраво-голубий К

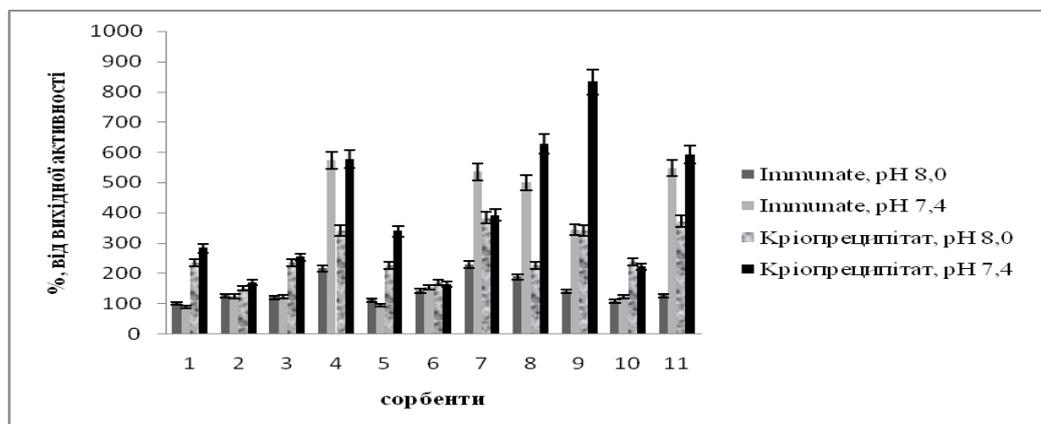


Рис. 3.15 Зміни активності FVIII при сорбції Кріопреципітату та Immunate на синтезованих сорбентах ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Рисунок 3.15 демонструє, що у випадку дослідження сорбції білків Кріопреципітату чи Immunate, найвищий рівень питомої активності отримано при застосуванні аналогічних сорбентів.

Визначення концентрації фібриногену та рівня рістоміцин-кофакторної активності vWF після сорбції на відібраних сорбентах продемонстрували наступне: концентрація фібриногену в супернатанті достовірно знижується ( $P \leq 0,05$ ) (у всіх випадках при порівнянні різниці між контролем (вихідна концентрація при нанесенні) та після сорбції) (рис. 3.16), а рівень vWF практично залишається без змін (не виявлено достовірної різниці) (рис. 3.17).

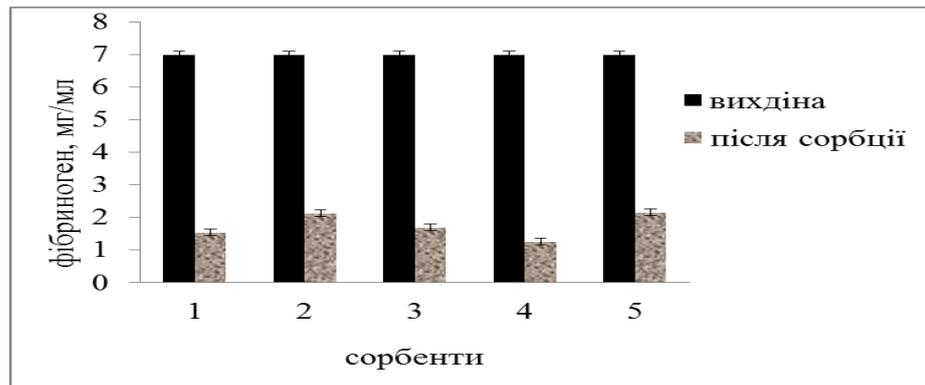


Рис. 3.16 Сорбція фібриногену кремнеземними сорбентами ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Примітка. Тут і на рис. 3.17: 1 – Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, 2 – Діасорб-Procion Gelb M4R, 3 – Діасорб-Procion Blue HB, 4 – Діасорб-Procion Blue MXR, 5 – Діасорб-Активний яскраво-голубий К

При розробці технологічної схеми та проведенні етапів одержання FVIII важливо враховувати співвідношення FVIII/vWF, оскільки воно має важливе значення як у процесі виробництва (захищає FVIII від протеолітичної деградації) [124, 130] так і в клінічному використанні отриманих препаратів фактора [115, 116, 134].

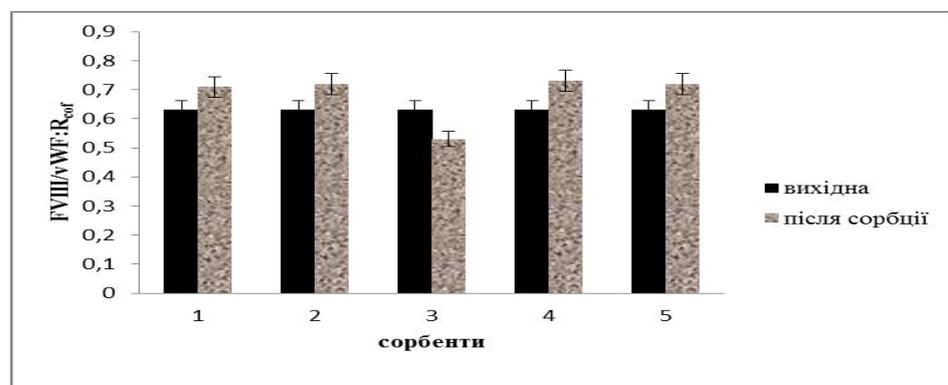


Рис. 3.17 Зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> у супернатанті під час афінної сорбції з сорбентами ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Проведені дослідження цього показника продемонстрували наступне: зміни у співвідношенні  $FVIII/vWF:R_{cof}$  були незначними, тобто синтезовані макропористі сорбенти проявляють негативну афінну сорбцію і по відношенню до  $vWF$  [55].

Електрофоретичне дослідження білкового спектру дозволяє провести якісну оцінку процесу очищення після інкубації з хроматографічними сорбентами препарату Кріопреципітату (рис. 3.18). На електрофореграмі чітко прослідковується зменшення зон домішкових (нецільових) білків та проявляються ті, які відповідають по своїй молекулярній масі субодиницям  $FVIII$  (90 та 200 кДа) [31, 88].

Для наглядності процесу очищення та порівняння як маркерні в даному дослідженні використали зразки високоочищених препаратів  $FVIII$  Immunate та Kogenate FS, а також неочищені зразки плазми та кріопреципітату.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

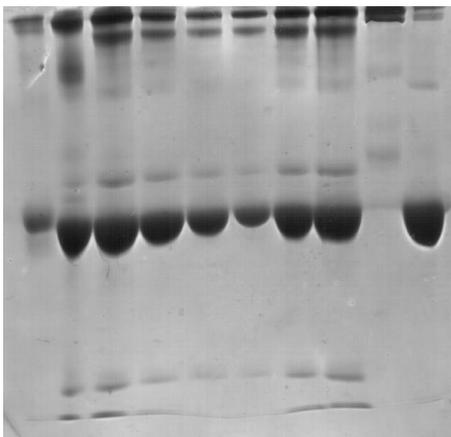


Рис. 3.18 Електрофоретичне дослідження білкового спектру супернатантів після інкубації з хроматографічними сорбентами при рН 7,4 (10%-ий ПААГ, рН 8,9, 0,1 % SDS)

Примітки: 1 – альбумін; 2 – свіжозаморожена плазма; 3 – кріопреципітат; 4 – Супернатант/сорбент Діасорб активний пурпуровий 4ЖТ; 5 – Супернатант/сорбент Діасорб Procion Gelb MXR; 6 – Супернатант/сорбент Діасорб Procion Blue HB; 7 – Супернатант/сорбент Діасорб blue MXR; 8 – Супернатант/сорбент Діасорб активний яскраво-голубий К; 9 – Kogenate FS (рекомбінантний препарат  $FVIII$ ); 10 – Immunate (плазмовий препарат  $FVIII$ ).

Для виявлення чи зростання питомої активності  $FVIII$  в процесі негативної афінної сорбції з досліджуваними сорбентами пов'язане лише з

можливим зменшенням вмісту альбуміну, проводили електрофоретичне дослідження зразків в нативних умовах на ацетат-целюлозних мембранах [7].

Таблиця 3.8

**Співвідношення між альбуміновою та глобуліновими фракціями  
у досліджуваних зразках**

Зразки	Альбумін, %	Глобулінова фракція, %
Кріопреципітат	39,9	59,1
Супернатант-сорбент Діасорб активний пурпуровий 4ЖТ	41,4	58,6
Супернатант-сорбент Діасорб Procion Gelb M4R	43,1	56,9
Супернатант-сорбент Діасорб Procion Blue HB	44,5	55,5
Супернатант-сорбент Діасорб Procion Blue MXR	45,5	54,5

Представлені дані наглядно демонструють, що не має суттєвих змін у співвідношенні між альбуміновою та глобуліновими фракціями. Тобто, очищення FVIII відбувалось не лише завдяки сорбції альбуміну як нецільового білка, але й інших, зокрема протромбіну, що належить до  $\alpha$ -глобулінів, фібриногену та інших факторів зсідання, що входять до складу  $\beta$ -глобулінів тощо [7].

При дослідженні десорбції зв'язаних білків з сорбентами використовували наступні розчини для елюції у такій послідовності (рН 7,4 або 8,0):

- 1,0 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl буферний розчин;
- 0,25 М ебсілон-амінокапронової кислоти, 25% iPro, 50 мМ Tris-HCl буферний розчин;
- 1,0 М NaCl, 25% iPro, 50 мМ tris-HCl буферний розчин.

Встановили, що 1,0 М розчин NaCl десорбує зв'язані білки у всіх випадках та при різних значеннях рН (найкраще з сорбентів Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ, Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Yellow HE3G та Діасорб-Procion Gelb M4R) (рис. 3.19). Розчин 0,25М ебсілон-амінокапронової кислоти, 25% iPro не давав суттєвої елюції. В останньому

випадку найкраща елюція відбувалась із сорбентів Діасорб-Активний яскраво-червоний 5СХ, Діасорб-Procion Blue НВ, Діасорб-Procion Blue МХR та Діасорб-Активний яскраво-голубий К (рис. 3.19). Попередні дослідження, показали, що фактори протромбінового комплексу (II, VII та IX) та альбумін [14] зв'язуються із сорбентом Діасорб-Активний яскраво-голубий К, елюція відбувається буферними розчинами з різною іонною силою, полярністю, рН [28]. Оскільки третій буферний розчин для елюції, що містив 1,0 М NaCl та 25% іPro забезпечував ще додаткову десорбцію зв'язаних білків, сам він може бути використаний для регенерації сорбентів.

Результати десорбції нецільових білків свідчать, що їх зв'язування з досліджуваними сорбентами відбувається за змішаним типом: іонним та гідрофобним [9, 28].

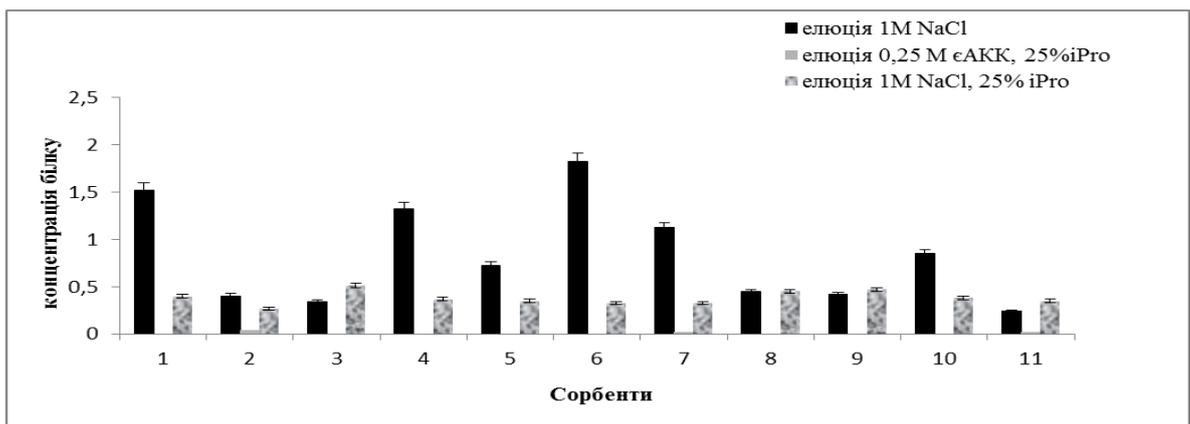


Рис. 3.19 Десорбція білка після нанесення препарату кріопреципітату на сорбенти ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

### 3.1.3.2 Дослідження сорбційних властивостей хроматографічного сорбенту з матрицями різної пористості

Можливість адсорбції макромолекули на хроматографічному сорбенті залежить не лише від вибору афінного ліганду, але й від природи носія. Інтенсивність процесу адсорбції визначається розміром, кількістю та конфігурацією пор [43, 85]. Для ефективної дифузії через сорбент розмір пор має бути більшим, ніж біологічна молекула. Це необхідно для досягнення

максимальної поверхні взаємодії сорбенту з макромолекулою. Найбільш придатними для виділення білкових факторів є носії з порами 300–1000 Å [8]. Оскільки об'єктом дослідження є FVIII – доволі велика білкова молекула (M<sub>r</sub>=330 кДа), – вибір був зроблений саме на користь макропористих кремнеземних сорбентів. Попередні дослідження стосовно сорбції тромбіну та альбуміну з використанням хроматографії на кремнеземних сорбентах показали, що оптимальною є матриця з розміром пор 500–750 Å [14, 43].

Сорбент з оптимальним розміром пор для очищення FVIII підбирали експериментально. Для моделювання процесу сорбції FVIII з сорбентами різного розміру пор як вихідну сировину застосовували препарати Immunate та Кріопреципітат. Для досліджень використали сорбент Діасорб-Procion Blue HB з розміром пор 250, 500, 750 та 1500 Å відповідно. Одержані результати представлені в табл. 3.9 та 3.10. Дослідження проводили batch-методом: до 2 мл кожного із сорбентів, врівноваженого 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином з рН 7,4, додавали 2 мл робочого розчину (Immunate та Кріопреципітат, відповідно). Активність FVIII визначали в супернатанті після 5 хв інкубації з сорбентом одностадійним коагулологічним методом [1], концентрацію білка визначали за допомогою методу зв'язування барвника Coomassie Brilliant Blue G-250 [71].

Таблиця 3.9

**Результати очищення FVIII з Кріопреципітату на сорбенті  
Діасорб-Procion Blue HB з різним розміром пор (M±m; n=10)**

Показники	Нанесення (вихідний зразок)	Діасорб-Procion Blue HB			
		250 Å	500 Å	750 Å	1500 Å
Активність FVIII, МО/мл	1,65±0,07	1,27±0,07	1,14±0,05	0,09±0,04	1,16±0,06
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, раз	1,00	1,03	1,38	2,17	1,34

Таблиця 3.10

**Результати очищення FVIII з препарату Immunate на сорбенті  
Діасорб-Procion Blue HB з різним розміром пор ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Показники	Нанесення (вихідний зразок)	Діасорб-ProcionBlue HB			
		250 Å	500 Å	750 Å	1500 Å
Активність FVIII, МО/мл	10,28±0,42	5,25±0,32	6,05±0,22	8,15±0,33	7,60±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, раз	1,00	1,23	1,39	3,25	0,95

Найкраща сорбція нецільових білків досягалася на кремнеземному сорбенті з Діасорб-Procion Blue HB з розміром пор 750 Å (найвищий ступінь очищення) [43]. Слід відмітити, що у випадку Кріопреципітату існує достовірна відмінність між вихідною питоною активністю та активністю, отриманою на сорбентах з розміром пор 500, 750 та 1500 Å, а для Immunate – 250, 500 та 750 Å ( $P \leq 0,01$ ).

Сорбенти з меншим розміром пор (250 та 500 Å) є малоефективними для очищення фактора, оскільки вони не дозволяють відділити нецільові білки від цільового. Це узгоджується з даними літератури [37], згідно яких для кремнеземних сорбентів з діаметром пор 440–650 Å межа ексклюзії по декстрану різної молекулярної маси складає 150–350 кДа. Оскільки, основні білки, що входять до складу Кріопреципітату – це високомолекулярні фібриноген ( $M_r=330$  кДа), фібрoneктин ( $M_r=450$  кДа) та vWF ( $M_r=310$  кДа) [13, 80, 234], не було досягнуто відповідного ступеня очищення FVIII на сорбентах з розміром пор 250 та 500 Å, хоча і відбувається часткове зв'язування білків на зовнішній поверхні хроматографічних сорбентів (незначне збільшення питокої активності FVIII).

Молекулярна маса ЛСА становить приблизно 70 кДа. Відомо [96, 142], що оптимальна його сорбція відбувається на поліамідному сорбенті з Cibacron Blue F3GA з розміром пор 400 Å при рН 5,0. Ізоелектрична точка ЛСА становить 4,64. Очевидно, що в даній технології сорбція альбуміну досягається за рахунок гідрофобних зв'язків. Результати, представлені в табл. 3.9 та 3.10, свідчать, що при більших значеннях рН (7,4) при використанні цього ліганду, мають місце інші типи взаємодії, скоріш за все, змішаного характеру (іонний, гідрофобний, біоспецифічний, тощо) [9].

У випадку сорбенту з розміром пор 1500 Å питома ефективна площа зв'язування (концентрація ліганду) є менша. Для порівняння питома кількість аміно-пропільних груп на кремнеземній матриці з розміром пор 750 Å становить 0,47 мМоль/г, а для 1500 Å – 0,37 мМоль/г [14, 43]. Зменшення концентрації ліганду приводить до зменшення сорбційної ємності сорбенту. Відповідно, ефективність такого сорбенту є менша у порівнянні з сорбентом з пористістю 750 Å.

З отриманих даних дослідження випливає, що для видалення нецільових білків та одержання препарату FVIII з найвищим ступенем очищення є сорбент Діасорб-Procion Blue HB з розміром пор 750 Å.

Відповідно, для синтезу інших сорбентів (з іншими барвниками-лігандами) застосовуючи матрицю з аналогічним розміром пор.

### 3.1.3.3 Дослідження сорбційної ємності сорбентів

На наступному етапі дослідження розраховано сорбційну ємність сорбентів (Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Gelb M4R та Діасорб-Procion Blue MXR). Після приготування ряду розведень вихідного розчину Кріопреципінату дослідили сорбцію нецільових білків та активність FVIII. У цьому дослідженні наносили різні концентрації білка з розрахунку на 1 см<sup>3</sup> сорбенту, щоб підібрати оптимальну концентрацію і не перенаситити колонку. Результати дослідження наведені в табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Розрахунок сорбційної ємності сорбентів ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Дослід	Діасорб-Procion Blue MXR		Діасорб-Procion Gelb M4R		Діасорб-Procion Blue HB	
	Кількість зв'язаного білка, мг	Ступінь очищення, раз	Кількість зв'язаного білка, мг	Ступінь очищення, раз	Кількість зв'язаного білка, мг	Ступінь очищення, раз
I	12,68±0,05	3,15	13,24±0,04	2,65	14,62±0,04	3,04
II	7,35±0,01	16,82	6,21±0,03	7,30	7,22±0,02	15,23
III	3,19±0,02	13,07	3,37±0,01	18,35	3,57±0,01	19,65
IV	1,57±0,01	7,08	1,66±0,01	13,73	1,57±0,01	8,09

Примітка: вихідна концентрація білка при нанесенні:

I – 19,74±0,20; II – 7,94±0,05; III – 3,97±0,05; IV – 1,96±0,04.

З наведених даних випливає, що максимальна ємність досліджуваних сорбентів становить приблизно 15 (14,62±0,04) мг білка/1см<sup>3</sup> сорбенту. Проте, для досягнення максимального очищення FVIII (максимальної питомої активності) оптимальна кількість білка, що наноситься на 1 мл сорбенту повинна бути в межах 4-8 мг білка/1см<sup>3</sup> сорбенту.

Слід зауважити, що при проведенні статистичної обробки даних двовибірковим t-тестом з різними дисперсіями виявлено достовірну різницю між контролем (вихідна концентрація білка при нанесенні) та дослідом (концентрація білка після сорбції) ( $P \leq 0,01$ ).

### 3.1.4 Висновки до розділу 3.1

- Синтезовано 16 біоспецифічних кремнеземних сорбентів з такими іммобілізованими активними барвниками: 7 монохлор-тріазинових (Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Reactive Red 120, Діасорб-Reactive Green 5, Діасорб-Reactive Green 19, Діасорб-Активний фіолетовий 4К, Діасорб-Procion Yellow HE3G, Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3GP), 7 дихлор-тріазинових (Діасорб-Procion Blue MXR, Діасорб-Procion Red MX5B, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Reactive Brown 10, Діасорб-Активний яскраво-голубий К, Діасорб-Активний яскраво-червоний 5CX, Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ) та

2 вініл-сульфонові (Діасорб-Активний бордо 4СГ; Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ).

- Визначено їх характеристики та переваги у практичному застосуванні: висока сорбційна ємність, стійкість до дії різних полярних чинників, стійкість у границях рН розчину від 3,0 до 9,0 та високої іонної сили, термостійкість.
- Оптимальною матрицею для отримання сорбентів є Діасорб з розміром пор 750Å.
- За ефективністю очищення FVIII зсідання крові оптимальними виявлено: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К.
- Дослідження сорбційних властивостей сорбентів продемонстрували, що всі вони здатні зв'язувати нецільові білки (явище негативної афінної сорбції), при цьому великий вплив на їх зв'язування має величина рН. Сорбція нецільових білків є найвищою при рН 7,4.
- Продемонстровано, що максимальна ємність досліджуваних сорбентів становить приблизно 15 (14,62±0,04) мг білка/1см<sup>3</sup> сорбенту.
- Виявлено, що відібрані сорбенти не зв'язують vWF, в наслідок чого (в процесі негативної сорбції) в препараті FVIII зберігається вихідний рівень співвідношення FVIII/vWF.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях [9, 11, 14, 28, 32, 40, 42, 43, 45-47, 221, 223, 226, 227, 230].

## **3.2 ЗАСТОСУВАННЯ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН В РОЛІ ВІРУС-ІНАКТИВУЮЧИХ АГЕНТІВ У СХЕМІ ОТРИМАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ**

### **3.2.1 Дослідження впливу вірус-інактивуючих агентів на активність фактора VIII зсідання крові**

Сучасний препарат фактора повинен володіти високою питомою активністю (максимальна ступінь очищення), не викликати алергічних реакцій та розвитку інгібіторів (не містити залишкових імуногенних білків) [118] і гарантувати пацієнту високу вірусну безпеку [24].

Включення різних методів інактивації вірусів у поєднанні з ефективними хроматографічними етапами біоспецифічного виділення та очищення FVIII зсідання крові дозволяє отримати препарати високого ступеня чистоти, безпечні у застосуванні стосовно можливої вірусної контамінації [15, 24, 41, 53, 56, 68, 73, 79, 102, 117, 127, 160, 188, 208-212, 232, 233].

Вірусна безпека є безумовно важливим пріоритетом при виготовленні препаратів із біологічної сировини, зокрема плазми крові. Удосконалення та постійний пошук нових методів вірусної інактивації є базисною основою будь-якої технології одержання препарату. При застосуванні хімічних методів інактивації вірусів в процесі розробки коагулологічних препаратів необхідні знання про їх можливий ефект на активність чи інші властивості ферментів. Оскільки, з літератури відомо, що сольвент-детергентний метод використовується проти оболонкових вірусів, а тіоціанатний є неспецифічний і може бути використаний, як для оболонкових, так і безоболонкових проведено дослідження з визначення впливу три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80 та тіоціанату амонію ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) на активність FVIII зсідання крові.

Крім того, описано синергізм їх дії в ролі вірус-інактивуючих речовин [244], що забезпечує підвищений ефект антивірусної дії при одночасному застосуванні, ніж при використанні кожного з методів окремо.

Для дослідження впливу хімічних інактиваторів вірусів на активність FVIII в досліджувану реакційну суміш додавали їх забуферені розчини різних концентрацій. Як контроль використали зразки без додавання хімічних реактивів [12, 222].

Всі досліджувані реактиви негативно впливали на активність FVIII. Визначення активності фактора проводили двома методами: одностадійним коагулологічним [17] та з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату [214]. При проведенні коагулологічного визначення активності FVIII розчини антивірусних агентів додавали безпосередньо в реакційну суміш перед етапом активації FVIII [12, 222, 232]. При визначенні активності з використанням хромогенного субстрату S-2765 їх додавали перед процесом активації (перед внесенням реактив-реагенту) або після (перед додаванням хромогенного субстрату), щоб дослідити вплив як на сам процес активації FX, так і на ферментативний гідроліз хромогенним субстратом FXa. (табл. 3.12–3.13).

Експериментально доведено, що на визначення активності FVIII методом з використанням хромогенного пептидного субстрату вплив домішкових речовин в інкубаційній суміші є меншим у порівнянні з коагулологічним. Це є вагомим аргументом на користь використання методу хромогенних субстратів для визначення активності FVIII у технології очищення фактора, оскільки дозволяє проводити контроль визначення на різних етапах технологічного процесу отримання без додаткових етапів діалізу, гель- чи ультрафільтрації.

Так, при концентраціях різних хімічних чинників (у даному випадку вірус-інактивуєчих речовин:  $> 0,06 \text{ M NH}_4\text{SCN}$ ;  $\geq 2,0 \%$  три(н-бутил)фосфату;  $\geq 1,5 \%$  Тритону X-100;  $\geq 2,0 \%$  Твіну-80) активність FVIII коагулологічним методом, на відміну від хромогенного, не визначалася (табл. 3.12–3.13).

Встановлено, що існує негативний кореляційний зв'язок середньої сили між концентрацією у розчині  $\text{NH}_4\text{SCN}$  та методами визначення активності FVIII. При цьому слід зауважити, що у випадку використання коагулологічного методу визначення сила зв'язку є дещо менша ( $r=-0,77$ ), ніж для методу з

використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату. ( $r=-0,73$ ). Між самими методами визначення (коагулологічним та хромогенним) встановлено достовірний тісний позитивний кореляційний зв'язок ( $r=+0,98$ ,  $P\leq 0,05$ ).

Таблиця 3.12

**Порівняльний аналіз методів визначення активності фактора VIII  
за присутності  $\text{NH}_4\text{SCN}$  ( $M\pm m$ ;  $n=5$ )**

№ п/п	Концентрація $\text{NH}_4\text{SCN}$ , М	Коагулологічний метод	Метод з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату	
		Активність FVIII, МО/мл <sup>1</sup>	Активність FVIII, МО/мл <sup>1</sup>	Активність FVIII, МО/мл <sup>2</sup>
1	0	1,04±0,02	1,11±0,03	1,11±0,03
2	0,002	0,77±0,01*	0,71±0,01*	0,86±0,02*
3	0,012	0,44±0,02	0,55±0,02	0,75±0,02*
4	0,024	0,16±0,01*	0,35±0,02*	0,67±0,02*
5	0,061	не визначається	0,22±0,02*	0,59±0,02
6	0,122	не визначається	0,22±0,01*	0,57±0,02

Примітки: <sup>1</sup> – розчин  $\text{NH}_4\text{SCN}$  додавали перед етапом ферментативної активації

<sup>2</sup> – розчин  $\text{NH}_4\text{SCN}$  додавали після етапу ферментативної активації

\* – рівень достовірності  $P\leq 0,05$

При дослідженні впливу інших вірус-інактивуючих речовин (три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100 та Твіну-80) на методи визначення активності FVIII встановили, що між величиною їх концентрації та методами визначення існує тісний негативний кореляційний зв'язок. Так, наприклад, між концентрацією три(н-бутил)фосфату у досліджуваному зразку та коагулологічним чи методом з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату визначення активності FVIII визначено коефіцієнт кореляції ( $r=-0,99$ ,  $P=0,05$ ). Між самими методами визначення (коагулологічним та хромогенним) встановлено тісний позитивний прямопропорційний зв'язок ( $r=+0,99$ ,  $P\leq 0,01$ ). У випадку дослідження впливу на активність FVIII Тритон X-100 та Твін-80 встановлено дещо слабший негативний кореляційний зв'язок ( $r=-0,85$  та  $r=-0,93$  для Тритон-X-100 і  $r=-0,94$  та  $r=-0,96$  для Твін-80, відповідно). Між самими методами, як і в попередніх дослідженнях встановлено тісний позитивний кореляційний зв'язок ( $r=+0,98$ ,  $P\leq 0,01$ ).

Таблиця 3.13

**Порівняльний аналіз методів визначення активності фактора VIII  
за наявності сольвенту та детергентів (M±m; n=5)**

№ п/п	Концентрація, %	Коагулологічний метод	Методом з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату	
		Активність FVIII, МО/мл <sup>1</sup>	Активність FVIII, МО/мл <sup>1</sup>	Активність FVIII, МО/мл <sup>2</sup>
<b>Контроль</b>				
	0	1,04±0,22	1,11±0,03	1,11±0,03
<b>три(н-бутил)фосфат</b>				
1	0,1	0,96±0,02	1,03±0,03	1,04±0,05
2	0,5	0,76±0,02*	0,79±0,02*	0,95±0,02
3	1,0	0,63±0,02*	0,66±0,02*	0,84±0,02*
4	1,5	0,35±0,02	0,56±0,02*	0,77±0,01*
5	2,0	не визначається	0,35±0,02	0,56±0,02*
<b>Тритон X-100</b>				
1	0,1	0,54±0,02	0,68±0,01	0,76±0,02
2	0,5	0,28±0,02	0,43±0,03*	0,60±0,03*
3	1,0	0,09±0,01*	0,36±0,02*	0,43±0,03
4	1,5	не визначається	0,12±0,01*	0,27±0,01*
5	2,0	не визначається	0,05±0,01*	0,18±0,01*
<b>Твін-80</b>				
1	0,1	0,86±0,02	0,97±0,01	1,02±0,04
2	0,5	0,84±0,02*	0,85±0,02*	1,02±0,04
3	1,0	0,80±0,02*	0,86±0,02*	0,96±0,02
4	1,5	0,44±0,03*	0,65±0,02*	0,76±0,02*
5	2,0	не визначається	0,38±0,02*	0,55±0,02

Примітки: <sup>1</sup> – розчини додавали перед етапом ферментативної активації

<sup>2</sup> – розчини додавали після етапу ферментативної активації

\* – рівень достовірності P≤0,05

Представлені в таблицях результати свідчать, що присутність тіоціанату амонію, сольвенту чи детергенту в значних концентраціях приводить до зниження чи повної втрати прокоагулянтної активності FVIII [12].

В той же час відомо, що сольвент-детергентна обробка з метою вірусної інактивації не веде до повної втрати активності FVIII та масштабно використовується в технології одержання фактора [63, 138, 209, 212, 233].

Для визначення зворотності чи незворотності інгібування активності фактора тїоціанатом амонїю проводили видалення останнього з досліджуваних розчинів поетапно методом ультрадіафільтрації. Ультрафільтрацію низькомолекулярних домішок здійснювали через мембранні фільтри Amicon Ultra-0,5 з межою ексклюзії 10кД фірми Millipore шляхом центрифугування на центрифугі Eppendorf 5702R при 2000 g 20 хв та температурі +4 °С (табл.3.14) [12, 222, 232].

Одержані результати свідчать про те, що застосування NH<sub>4</sub>SCN при виготовленні препарату FVIII з метою антивірусної обробки не має негативного впливу на його кінцеву активність, оскільки при видаленні його з розчину активність відновлюється. При цьому виявили помірний негативний кореляційний зв'язок між концентрацією тїоціанату амонїю та активністю фактора (r=-0,67).

*Таблиця 3.14*

**Порівняльна характеристика активності фактора VIII у препараті Immunate на різних етапах ультрацентрифугування (M±m; n=5)**

№ п/п	Концентрація NH <sub>4</sub> SCN, М	Активність фактора VIII, МО/мл
1	0,313	не визначається
2	0,123	не визначається
3	0,078	не визначається
4	0,020	0,17±0,01
5	0,002	0,80±0,02
6	0,001	0,95±0,02
7 (контроль)	0	1,04±0,22

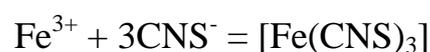
Отже, аніон тїоціанату, завдяки своїм хаотропним та металохелаторним властивостям, у високій концентрації суттєво знижує активність фактора зсідання крові VIII, але це зниження є зворотнім, що дозволяє застосовувати його як антивірусний агент технологіях отримання FVIII [60, 117].

### 3.2.2 Визначення концентрації вірус-інактивуючих реагентів у досліджуваних білкових розчинах

Застосування препаратів плазми крові, одержаних з використанням сольвент-детергентної технології видалення вірусів, в трансфузійній практиці викликає певні побоювання відносно цитолітичних впливів та потенційної токсичності залишків сольвент-детергентних реагентів, що можуть бути присутніми в препаратах [63]. Так, відомо [191], що триалкілфосфати володіють токсичною чи подразнюючою дією на мембрани клітин шкіри чи слизової. На початку 90-их років ХХ ст питання потенційного накопичення сольвент-детергентних реагентів в препаратах крові було досить серйозною проблемою. Обробка розчинів сольвент-детергентним методом приводить до утворення міцелярних структур, відділити які від розчину білка було непростим завданням [15, 63, 138]. Так для видалення сольвент-детергентних реагентів застосовують наступні методи: переосадження, методи фільтрації чи діалізу, різноманітні хроматографічні процедури (гідрофобна, афінна, гель-проникна) [195, 209, 212, 233].

В процесі виготовлення препарату необхідним є контроль вмісту хімічних вірусних інактиваторів – потенційно-небезпечних для здоров'я людини агентів. З цієї метою розроблені методи визначення концентрації вірус-інактивуючих агентів на різних етапах процесу очищення та у готовому препараті.

Відомо, що аніон роданіду утворює з катіонами трьохвалентного заліза  $\text{Fe}^{3+}$  комплекси, забарвлені в яскраво-червоний колір, що використовується в аналітичній хімії для якісного та кількісного визначення заліза (III) [244]. Реакція достатньо чутлива, у спрощеному вигляді її рівняння можна записати так:



Дану властивість роданіду використали для його визначення в досліджуваних розчинах. Для побудови калібрувальної кривої до 3 мл розчину  $\text{NH}_4\text{SCN}$  додавали 10 мкл реактиву, попередньо приготовленого наступним

чином: 45 г  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  розчиняли в 800 мл дистильованої води, що містила 54 мл концентрованої азотної кислоти. Кінцевий об'єм розчину доводили дистильованою водою до 1000 мл. Вимірювали оптичну густину отриманих сумішей при 490 нм (довжина оптичного шляху 1 см) проти контролю (3 мл дистильованої води + 10 мкл реактиву).

Запропонований метод дозволяє проводити вимірювання концентрації тіоціанату в діапазоні 0,0005–0,005 моль/л.

Для визначення Тритону X-100 використовують його здатність поглинати світло при 275 та 223 нм [49]. Було знято спектр світлопоглинання 0,01% водного розчину Тритон X-100 в інтервалі довжин хвиль від 200 до 310 нм. В ультрафіолетовій області розчин Тритону X-100 має два максимуми поглинання – 223 та 275 нм, причому при 223 нм пік значно вищий (абсолютний показник поглинання майже в 4 рази вищий). Оскільки визначення концентрації Тритону X-100 необхідно проводити в розчинах, що містять білки, для яких характерне поглинання в цьому діапазоні хвиль, постала необхідність попереднього їх видалення з розчину, що і досягалося осадженням 10 % трихлороцтовою кислотою (співвідношення проба:кислота як 1:1 по об'єму; центрифугування 30 хв. при 3000 g). Для недопущення помилки внаслідок можливої інтерференції інших речовин вимірювання проводили при двох довжинах хвиль (223, 275 нм) проти контролю, що містив 5% трихлороцтової кислоти.

Визначення концентрації Тритону X-100 в розчині проводили, використовуючи калібрувальні графіки залежності оптичної густини від його концентрації. Калібрувальні графіки для визначення концентрації Тритон X-100 лінійні, похибка визначення не перевищує 5%. Чутливість визначення при 275 нм – 0,0019 %, а при 223 нм – 0,00035 %.

Для визначення концентрації Тритону X-100 використовували також метод [145], принцип якого полягає в тому, що органічні сполуки, які містять ненасичені подвійні зв'язки, після гідролізу при температурі 100 °С в присутності сірчаної кислоти, реагують з ваніліном і фосфорною кислотою з

утворенням ефірних сполук малинового кольору. В певному інтервалі концентрація Тритону X-100 пропорційна поглинанню розчину при довжині хвилі (500–560) нм (максимум поглинання при 530 нм).

Одержані результати свідчать, що метод з використанням фосфорнованілінового реактиву дозволяє визначати не менше 125 мкг/пробу Тритон X-100, який використовували для сольвент-детергентної інактивації препаратів крові.

Наведені результати свідчать про те, що в концентрованих розчинах одержаних білкових препаратів Тритон X-100 не визначається, тобто його можлива концентрація не перевищує 0,0019 % (чутливість УФ методу).

Одержані результати переконують в тому, що метод хроматографії з використанням макропористих силохромних сорбентів дозволяє одержувати препарати білкових факторів без присутності в них Тритону X-100.

### 3.2.3 Висновки до розділу 3.2

- Встановлено, що для контролю активності FVIII на різних етапах його одержання, в тому числі і після вірус-інактивації хімічними методами, кращим є метод з використанням специфічного хромогенного пептидного субстрату. При його застосуванні, на відміну від коагулологічного, не потрібно провести додаткових етапів діалізу, гель- чи ультрафільтрації.
- Показано, що інгібуючий вплив вірус-інактивуєчих речовин, зокрема тіоціанату амонію, на коагулологічну активність фактора є зворотнім, оскільки при видаленні його з розчину активність відновлювалась.
- Запропоновано методи контроль вмісту хімічних вірусних інактиваторів, зокрема іонів тіоціаніту амонію та Тритон X-100, на різних етапах процесу очищення та у готовому препараті.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях [5, 12, 15, 24, 41, 49, 53, 56, 222, 232].

### 3.3 ОБГРУНТУВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ЕТАПІВ У СХЕМІ ОДЕРЖАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ

#### 3.3.1 Попереднє фракціонування плазми крові

Попередні дослідження були пов'язані з вивченням та виділенням факторів протромбінового комплексу (серинових протеїназ трипсинового типу), зокрема тромбіну [9]. У зв'язку з цим виникла необхідність визначення активності FVIII у цих фракціях та на різних етапах фракціонування (табл. 3.15). У цьому випадку вихідною сировиною були свіжоприготовлені або заморожені при (-30) °С з терміном зберігання не більше 1 року осаді фракції за Коном III та II+III, отримані у Львівському обласному центрі служби крові від донорів із негативним результатом на вірусні збудники. Додатково визначення активності фактора проводили у фракції I за Коном.

Таблиця 3.15

#### Активність фактора VIII зсідання крові у субфракціях плазми крові ( $M \pm m$ ; $n=7$ )

Аналізовані проби	Концентрація білка (мг/мл)	Активність фактора VIII	
		МО/мл	МО/мг білка, $\times 10^{-4}$
Свіжозаморожена плазма	64,14 $\pm$ 1,06	1,08 $\pm$ 0,03	168,57 $\pm$ 6,51
Кріопреципітат	42,71 $\pm$ 1,07	2,70 $\pm$ 0,36	630,48 $\pm$ 82,58
Розчин фракції I за Коном	302,85 $\pm$ 9,12	0,58 $\pm$ 0,06	19,27 $\pm$ 2,32
Розчин фракції II+III за Коном	281,42 $\pm$ 10,33	0,12 $\pm$ 0,02	4,40 $\pm$ 0,76

У фракції I за Коном питома активність FVIII приблизно в 5 разів вища, ніж у II+III фракції ((19,27 $\pm$ 2,32)  $\times 10^{-4}$  та (4,40 $\pm$ 0,76)  $\times 10^{-4}$  МО/мг білка, відповідно) [11, 227]. Очевидно, що при технологічному виготовленні осаду фракції I (8 % етанолу, рН 7,2, (-3) °С) основна частина фактора переходить у нерозчинну форму [78, 138, 193]. В даному випадку відбувається ізоелектричне

осадження цього білка при низькій температурі [75, 96, 132, 155]. Таким чином, відносно високий вміст FVIII у фракції I за Коном дає підставу вважати її важливим вихідним (альтернативним) матеріалом для виділення та очищення препаратів цього білка [11].

Встановлено, що питома активність FVIII у кріопреципітаті є приблизно в 4,2 разів більша, ніж у плазмі, в 31,25 разів, ніж у фракції I за Коном та 156,25 разів, ніж у фракції II+III за Коном. Всі ці фракції є потенційним джерелом отримання FVIII, проте основними в технології отримання FVIII є кріопреципітат та плазма.

Отримані дані узгоджуються з дослідженнями, проведеними Lundblad R. зі співавторами [158].

При цьому слід зауважити, що вміст нецільових білків у цих фракціях є досить високий та різноманітний. Так, зокрема, відомо, що фракція I за Коном містить: фібронектин, ADAMTS13 (vWF-протеаза розщеплення), глікозоаміноглікан (міститься також у фракції IV-1 та II+III за Коном), C1q, C1r та C1s– компоненти комплементу, FVIII, vWF та фібриноген. Фракція II містить імуноглобуліни, III фракція – лектин-протеїн, 8-ий компонент комплементу, основні білки,  $\alpha_2$ -макроглобулін, FIX, H-фіколін (антиген Хаката), P-фіколін (P35), аполіпопротеїн AI та AII [163], фактори зсідання II, VII, IX та X, глобуліни. Кріопреципітат містить: фібриноген, фібронектин, фактор фон Віллебранда тощо [13, 80].

Наявність великої кількості нецільових білків ускладнює процес очищення, тому при одержанні FVIII із загальної суміші на попередніх етапах проводять їх попереднє видалення. Серед відомих методів використовують висолювання, осадження, екстракції, преципітації, тощо [72-79, 202]. Основним недоліком застосування цих методів є те, що вони вимагають використання різних хімічних речовин, які можуть впливати на активність (властивість) цільового білка.

Проведено дослідження впливу різних осаджуючих речовин на вміст факторів зсідання крові (FVIII, vWF, FIX, тромбіну та фібриногену) та

концентрацію білка. Як вихідний матеріал використали свіжозаморожену СЗП. В якості осаджуючих речовин застосовували: барій хлорид (0,125 М), алюмінію гідроксид (III) (3,0 %) та ПЕГ-4000 (3,2 %) [27, 51,110, 225, 232].

Отримані дані представлені в табл. 3.16. СЗП розморожували при кімнатній температурі, поділили на рівні об'єми (по 50 мл) та за аналогічних умов на магнітній мішалці додавали осаджуючі речовини, перемішували протягом 15 хв, центрифугували при 2700 г протягом 20 хв при +8 °С. Активність факторів та концентрацію білка визначали у супернатанті.

Таблиця 3.16

**Дослідження впливу осаджуючих речовин на вміст факторів зсідання крові та концентрацію білка (M±m; n=7)**

Показники	Контроль	Показники після преципітації		
	СЗП	Al(OH) <sub>3</sub>	ПЕГ-4000	Ва-цитрат
Активність FVIII, МО/мл	1,12±0,03	1,08±0,02	1,06 ±0,02	1,05±0,13
Питома активність FVIII, МО/мг білка, x 10 <sup>-1</sup>	0,17±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,23±0,03
Активність vWF, %	104,71±2,31	108,57±3,40	99,71±1,57	98,57±1,38
Активність FIX, МО/мл	1,13±0,04	0,09±0,01	1,13 ±0,02	0,13±0,01
Питома активність FIX, МО/мг білка, x 10 <sup>-2</sup>	1,70±0, 10	0,17±0,01	2,60±0,30	2,00±0,02
Тромбін, НН/мл	1,05±0,03	не визначається	1,04±0,03	не визначається
Фібриноген, мг/мл	4,87±0,21	3,23±0,19	2,05±0,03	2,05±0,04
Концентрація білка, мг/мл	64,14±1,06	50,71±1,21	43,71±1,04	45,77±0,65

З даних таблиці випливає, що кріопреципітація та осадження барій-цитратом, алюміній гідроксидом (III) та ПЕГ-4000 можуть бути використані у технології отримання препарату FVIII. Кріопреципітація необхідна для концентрування FVIII (за різними даними 3,5–5,0 разів). Видалення білків протромбінового комплексу забезпечували осадженням за допомогою барій-

цитрату та алюміній гідроксиду (III), що приводило до зниження активності цих білків у супернатанті, а також частково відбувалось і видалення фібриногену (рис. 3.20). ПЕГ-4000 забезпечує осадження фібриногену, фібронектину [30, 110, 190], ліпопротеїдів, денатурованих білків тощо[33, 231].

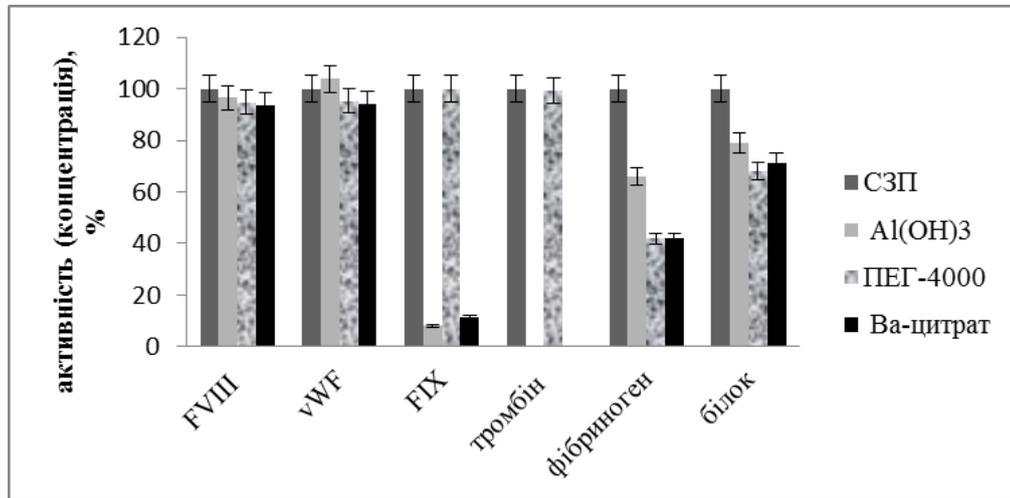


Рис. 3.20 Преципітація факторів зсідання крові при використанні різних осаджуючих речовин ( $M \pm m$ ;  $n=7$ )

Попередні дослідження стали основою для створення технологічної схеми отримання очищеного FVIII.

Плазма крові як джерело різноманітних лікарських препаратів містить цілу низку білків у різноманітних концентраціях. FVIII належить до класу високомолекулярних білків, які є в дуже низькій концентрації (див. розділ 1.1) та нестабільний через можливі процеси активації/інактивації. Безумовно, білки, що знаходяться у значно вищій коцентрації, чи ті, що проявляють подібні фізико-хімічні властивості, заважають його очищенню. Крім того, проведення попередніх етапів осадження/преципітації нецільових білків не тільки полегшує процес виділення бажаного білка (FVIII), але й покращує його аналітичні характеристики, оскільки усунення природніх інгібіторів чи активаторів даного білка впливає на характеристику кінцевого продукту.

### 3.3.2 Отримання фактора VIII методом афінної сорбції на кремнеземних сорбентах

При розробці технологічної схеми виділення FVIII використано як вихідну сировину СЗП з активністю FVIII близько 1 ( $1,08 \pm 0,03$  МО/мл) [51, 52]. Проведено поетапне відокремлення білків протромбінового комплексу осадженням з барію цитратом та сорбцією на гідроксиді алюмінію (III), відділенням фібриногену, фібрoneктину та інших домішкових білків з ПЕГ-4000. Етап фракціонування домішкових білків проводили наступним чином: до СЗП додавали 1,0 М розчин хлориду барію при рН 7,4 до кінцевої концентрації 0,125 М. Реактив вводили поступово при постійному перемішуванні розчину на магнітній мішалці. Одержану суміш центрифугували при 2700 g при температурі +6 °С протягом 20 хв на центрифугі Eppendorf 5702R.

Осади використовували для одержання очищених білкових препаратів в інших технологіях для забезпечення безвідходності процесів. Отримані результати представлені в табл. 3.17.

Далі до супернатанту порційно додавали гідроксид алюмінію (III) до кінцевої концентрації 3,0 %, перемішуючи розчин з допомогою магнітної мішалки протягом 15 хв. Зразу ж після цього, крапельно вносили до суміші 32,0 % розчин ПЕГ-4000 до кінцевої концентрації 3,5 %, перемішували ще 15 хв при кімнатній температурі та центрифугували при 2700 g при температурі +6 °С протягом 30 хв на центрифугі Eppendorf 5702R.

В результаті проведених етапів осадження домішкових білків вдалося досягнути збільшення питомої активності FVIII в 1,47 разу. Крім того, видалення з досліджуваної суміші факторів протромбінового комплексу – серинових протеїназ трипсинового типу, – значно збільшувало стабільність комплексу FVIII-vWF (через відсутність можливого процесу обмеженого протеолізу) [125, 144, 171]. В одержаному концентраті FVIII активність факторів протромбінового комплексу коагулологічними методами не визначалася.

Таблиця 3.17

**Активність FVIII на різних етапах фракціонування (M±m, n=8)**

Проба	Концентрація білка, мг/мл	Активність FVIII, МО/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$
Свіжозаморожена плазма	64,14±1,06	1,08±0,03	0,17±0,01
Супернатант після осадження цитратом барію	51,38±0,65	1,03±0,03	0,20±0,01
Супернатант після сорбції білків на гідроксиді алюмінію та осадження з ПЕГ-4000	39,88±0,52	1,02±0,02	0,26±0,01

На наступному етапі досліджень проводили додаткове очищення FVIII з використанням макропористих кремнеземних сорбентів з барвниками-лігандами (batch-метод) [28, 40, 45, 221, 224]. Для цього до 2 мл кожного сорбенту, врівноваженого 50 мМ Тріс-НСІ буферним розчином з рН 7,4, додавали по 2 мл досліджуваного зразка. Виміри здійснювали у супернатанті. Суміш витримували при кімнатній температурі протягом 2 год, після чого здійснювали визначення окремих показників, які наведені в табл.3.18.

Таблиця 3.18

**Активність FVIII після негативної афінної сорбції (M±m, n=8)**

Проба	Концентрація білка, мг/мл	Активність FVIII, МО/мл	Питома активність FVIII, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$
Вихідний розчин	64,14±1,06	1,08±0,03	0,17±0,01
Супернатант/сорбент Дісорб-Активний яскраво-голубий К	1,72±0,06	2,82±0,08	16,50±0,70
Супернатант/сорбент Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	1,79±0,03	3,36±0,15	18,80±1,10
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Blue HB	1,65±0,03	2,82±0,08	17,10±0,70
Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Gelb MXR	1,64±0,03	2,59±0,08	15,70±0,40

За рахунок проведення етапу сорбції нецільових білків ступінь очищення FVIII зростає приблизно в 100 разів (наприклад, від  $(0,17 \pm 0,01) \times 10^{-1}$  до  $(18,80 \pm 1,10) \times 10^{-1}$  МО/мг білка для сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ) [51]. Ефективність даного методу очищення FVIII (поєднання попереднього осадження нецільових білків та негативної афінної хроматографії) у порівнянні тільки з проведенням негативної сорбції зростає в межах від 14,86 до 25,66 разів (залежно від використаного сорбенту).

Проведене електрофоретичне дослідження (рис. 3.21) наглядно демонструє, що інкубація супернатанту СЗП (після попереднього осадження цитратом барію, гідроксидом алюмінію (III) та ПЕГ-4000) з досліджуваними сорбентами приводить до суттєвого зменшення кількості домішкових білків і, як наслідок, підвищення питомої активності FVIII (треки 7–10, рис. 3.21).

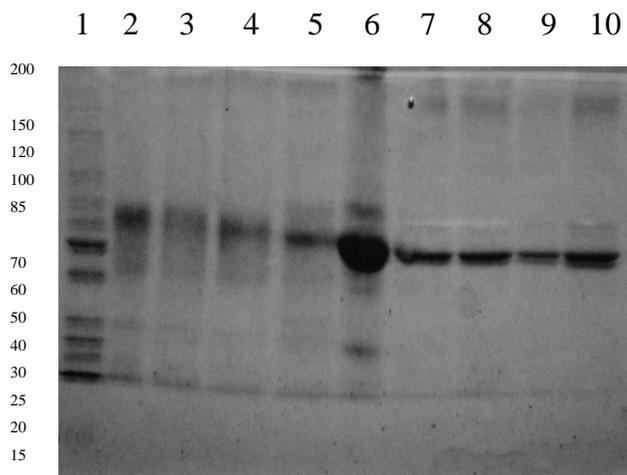


Рис. 3.21 Електрофореграма результатів очищення FVIII із плазми крові (10%-ий ПААГ, рН 8,9, 0,1 % SDS):

Примітка: 1 – маркерні білки; 2 – свіжозаморожена плазма; 3 – супернатант після осадження Ва-цитратом; 4 – супернатант після сорбції білків на  $Al(OH)_3$  та ПЕГ-4000; 5 – вихідна проба для нанесення, розведена в 5 разів; 6 – криопреципітат; 7 – Супернатант/сорбент Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ; 8 – Супернатант/сорбент Діасорб-Активний яскраво-голубий К; 9 – Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Gelb M4R; 10 – Супернатант/сорбент Діасорб-Procion Blue HB.

### 3.3.3 Отримання фактора VIII комбінацією хроматографічних методів

#### 3.3 3.1 Отримання фактора VIII хроматографічними методами без попередніх етапів фракціонування

Оскільки, основним хроматографічним методом при одержанні комерційних препаратів FVIII є метод іонообмінної хроматографії [72, 124, 173, 180-190, 196, 201], проведено додаткове використання цього методу в одній схемі отримання концентрату фактора.

Іонообмінну хроматографію антигемофільного фактора проводили при кімнатній температурі на DEAE-Sepharose FAST FLOW, рН 7,4. Використали колонку розміром (2x5) см<sup>2</sup>. В даному дослідженні як вихідну сировину використали кріопреципітат свіжозаморожений [27].

Розчин кріопреципітату готували на буферному розчині з рН 7,4, кінцева концентрація солей перед нанесенням становила: 10,0 мМ Na-цитрат, 0,1 М NaCl, 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2,0 г/л L-лізину, 8,0 г/л L-гліцину.

Після нанесення вихідного розчину кріопреципітату сорбент промивали вихідним буфером згідно методики (див. розділ 2.3.6). Елюцію проводили 0,3 М розчином NaCl, щоб забезпечити коелюцію фактора разом з фактором фон Віллебранда [19]. Результати досліджень представлені в табл. 3.19.

Відбирали фракції елюату з найвищою активністю FVIII та проводили хроматографію при рН 7,4 на кремнеземних сорбентах, де в ролі лігандів були: Procion Blue MXR, Procion Blue HB, Procion Gelb M4R, Активний яскраво-голубий К та Активний пурпуровий 4ЖТ. Розмір колонок з афінними сорбентами становив (2x5) см<sup>2</sup>. Хроматографію проводили при кімнатній температурі.

Оскільки з'ясовано, що FVIII не зв'язується із досліджуваними сорбентами, основний пік його активності збирали на виході із фракціями проскоку.

Після збору основної фракції FVIII, колонку з сорбентом, що містила зв'язані нецільові білки, промивали вихідним 50 мМ Тріс-НСl буферним розчином, рН 7,4. Для елюції цих білків (для регенерації колонки) використовували аналогічний буфер, що містив додатково 1,0 М NaCl та 25 % іPro, рН 7,4.

Після закінчення досліджень, проводили стерилізацію сорбентів автоклавуванням (1,1 атм, 120 °С, 30 хв). Регенеровані та вірус-безпечні сорбенти зберігали в 50 мМ Тріс-НСl буферному розчині, що містив 25% іPro, рН 7,4 при температурі +8 °С.

Таблиця 3.19

### Хроматографічне очищення фактора VIII зсідання крові ( $M \pm m$ , $n=5$ )

Зразок	Питома активність, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Сумарна активність МО	Ступінь очищення, раз	Вихід, %
Кріопреципітат	0,87±0,02	125,00	1,00	100,00
DEAE-Sepharose, 0,3 М NaCl	81,70±0,60	95,00	93,91	76,00
Проскок з Діасорб-Procion Blue MXR	134,40±4,50	92,16	154,60	73,73
Проскок з Діасорб-Procion Blue HB	112,60±5,70	92,75	129,44	74,20
Проскок з Діасорб-Активний яскраво-голубий К	156,20±3,80	93,60	179,54	74,88
Проскок з Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	210,60±9,60	91,80	242,10	73,44
Проскок з Діасорб-Procion Gelb M4R	144,87±6,29	95,04	166,52	76,03

З досліджуваних афінних сорбентів найкращий результат отримали на Діасорбі-Активному пурпуровому 4ЖТ (питома активність FVIII становила  $21,06 \pm 0,96$  МО/мг білка).

З отриманих даних випливає, що застосування іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та афінної хроматографії на кремнеземних макропористих сорбентах забезпечує одержання FVIII з кріопреципітату зі

ступенем очищення від 129 до 242 разів (залежно від типу афінного сорбенту) та збереженням до 73-76 % від вихідної прокоагулянтної активності. При цьому слід зауважити, що основні втрати від вихідної активності FVIII (до 27 %) відбувались на етапі іонообмінної хроматографії. Очищення фактора на кремнеземних сорбентах здійснювалось завдяки явищу негативної афінної хроматографії, що забезпечувало практично стовідстковий вихід продукту. Це є суттєвою перевагою методу негативної афінної сорбції в технології отримання очищеного препарату.

### **3.3.3.2 Отримання фактора VIII хроматографічним методом з додатковим використанням попередніх етапів фракціонування**

Сучасна технологічна схема очищення факторів зсідання крові об'єднує не лише комбінування різних хроматографічних методів, але й включає в себе етапи попереднього фракціонування [30, 72, 75, 78, 81]. Наступним етапом роботи було поєднання іонообмінної та афінної хроматографії з методами сорбції/осадження домішкових білків [221, 225, 226, 228, 229]. Проведено аналогічні дослідження до розділу 3.3.3.1 лише за однієї відмінності: на хроматографічну колонку з DEAE-Sepharose наносили забуферений розчин кріопреципітату, з якого попередньо видаляли нецільові білки з використанням  $Al(OH)_3$  та ПЕГ-4000. Результати досліджень представлені в табл.3.20.

З даного дослідження видно, що завдяки проведенню попередніх етапів фракціонування, досягнуто вищого ступеня очищення FVIII (в 2–3 рази вищі у порівнянні з схемою без попереднього фракціонування). Отримані результати можуть свідчити про те, що видалення нецільових білків (білки ППСБ, фібриноген тощо), не заважають зв'язуванню FVIII з іонообмінником, що, в свою чергу, веде до кращого очищення досліджуваного білка. Слід зауважити, що втрати від вихідної активності практично не відрізнялись від попереднього дослідження (див. розділ 3.3.3.1), а рівень питомої активності зріс практично вдвічі ( $500,80 \times 10^{-1}$  у порівнянні з  $210,60 \times 10^{-1}$  МО/мг білка) (табл. 3.19, 3.20).

Таблиця 3.20

**Активність фактор VIII на різних етапах одержання ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Зразок	Питома активність, МО/мг білка, $\times 10^{-1}$	Сумарна активність МО	Ступінь очищення, раз	Вихід, %
Кріопреципітат	0,72 $\pm$ 0,02	147,00	1,00	100,00
Розчин після сорбції на Al(OH) <sub>3</sub>	0,81 $\pm$ 0,01	134,40	1,12	91,43
Розчин Кіропреципітату після сорбції на ПЕГ-4000	0,91 $\pm$ 0,01	113,40	1,26	77,14
DEAE-Sepharose, 0,3 M NaCl	172,40 $\pm$ 2,70	111,80	239,44	76,05
Проскок з Діасорб-Procion Blue MXR	441,30 $\pm$ 26,70	105,60	612,92	71,84
Проскок з Діасорб-Procion Blue HB	247,00 $\pm$ 12,20	110,00	343,06	74,83
Проскок з Діасорб-Активний яскраво-голубий К	438,50 $\pm$ 13,50	105,00	609,02	71,43
Проскок з Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	505,80 $\pm$ 16,80	107,20	702,05	73,87
Проскок з Діасорб-Procion Gelb M4R	359,60 $\pm$ 9,90	109,20	499,44	74,29

Отримані дані підтверджуються й результатами електрофоретичного дослідження (рис. 3.22). Проби відбирали після кожного етапу очищення.

На представленій електрофореграмі помітно, що на етапах попереднього фракціонування (треки 2–5) відбувається часткове очищення FVIII. Проведення іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose (трек 6) забезпечує суттєве очищення фактора від нецільових білків. Найвищий ступінь очищення досягається на етапах негативної афінної сорбції (треки 7–9). У порівнянні з комерційним препаратом Feiba (трек 10) відсутні зони, характерні для факторів ППСБ.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

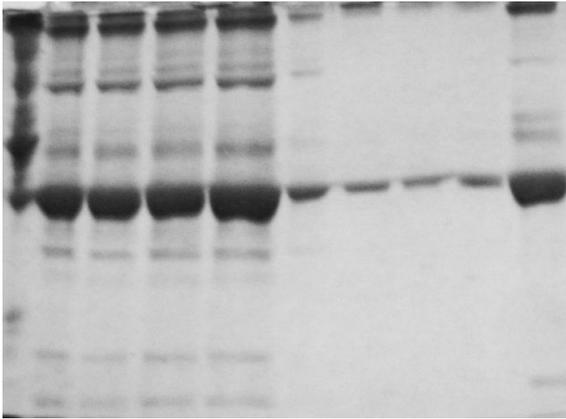


Рис. 3.22 Електрофоретичне дослідження білкового спектру на різних етапах отримання FVIII в 10 %-ному ПААГ, в присутності 0,1 % SDS

Примітка: 1 – свіжозаморожена плазма; 2 – Кріопреципітат; 3 – супернатант після осадження  $\text{BaCl}_2$ ; 4 – супернатант після осадження  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ; 5 – супернатант після осадження ПЕГ-4000; 6 – елюат/DEAE-Sephrose; 7 – просок/сорбент Діасорб-Procion Blue MXR; 8 – просок/сорбент Діасорб-Procion Blue HB; 9 – просок/сорбент Діасорб-Procion Gelb M4R; 10 – Feiba (активованій FVII, не активовані II, IX та X)

### 3.3.4 Визначення наявності нецільових білків на різних етапах одержання фактора VIII зсідання крові

На різних етапах фракціонування та хроматографії в отриманих зразках проводили визначення наявності інших факторів зсідання, зокрема: тромбіну, FIX, фібриногену,  $\text{vWF/R}_{\text{cof}}$ . Визначення проводили згідно з методиками, наведеними у розділі «Матеріали і методи» [1, 20, 238].

Контроль наявності цих факторів необхідно проводити, оскільки білки ППСБ та фібриноген є тромбогенними і не повинні бути присутні в очищеному зразку FVIII. Відомі випадки клінічного застосування препаратів факторів зсідання крові VIII, що містили білки протромбінового комплексу, які приводили до випадків венозного тромбоутворення і ДВС-синдрому [171]. Така непередбачувана реакція-відповідь може виникати внаслідок гіперкоагуляції, що підсилюється високим рівнем нецільових білків та присутності тромбогенних компонентів у їх складі, чи внаслідок спонтанної активації факторів протромбінового комплексу [72, 81, 171].

Крім того, серинові протеїнази, якими і є фактори ППСБ, можуть викликати обмежений протеоліз FVIII, що в свою чергу, може призвести до його активації чи зниження кофакторної активності. Результати узгоджуються із даними літератури [33, 72, 75, 81], оскільки в технологічні схеми отримання очищеного FVIII завжди включене попереднє очищення.

З іншого боку, метод іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose використовується також для отримання інших факторів зсідання крові, зокрема, тромбіну, FVII та FIX [125, 144, 171]. Попереднє видалення цих білків нівелює теоретичну можливість їх конкурентного зв'язування з іонообмінником, оскільки, без проведення попереднього фракціонування при елюції FVIII частина їх може коелювати разом з досліджуваним білком.

Як відповідь на лікування такими «недоочищеними» препаратами концентратів FVIII часто виникає імуносупресія, що свідчить про небажане забруднення концентратів білковими домішками – так звана інгібіторна форма гемофілії [93, 150, 242]. У зв'язку з цим, виникає постійна необхідність вдосконалення методів отримання високоочищених концентратів FVIII [66].

В отриманих зразках очищеного FVIII на останньому етапі хроматографічного очищення на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками не виявили наявності тромбіну, FIX та фібриногену – потенційно тромбогенних білків.

Слід зауважити, що крім активності FVIII, на всіх етапах технологічного процесу в зразках проявлялась ристоміцин-кофакторна активність vWF. При цьому до етапу проведення негативної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> зростало відносно вихідного приблизно вдвічі (від 0,78 до 1,75) (табл. 3.21). На останньому етапі очищення FVIII (негативної афінної сорбції) це співвідношення суттєво не змінювалось (ці дані узгоджуються з даними сорбції/десорбції FVIII), що надає підставу вважати, що синтезовані сорбенти не сорбують фактор фон Віллебранда.

Для елюції фактора з DEAE-Sephарose використали буфер з 0,3 М NaCl, щоб забезпечити коелюцію комплексу FVIII-vWF. Однак, частина vWF елюювалася з першими фракціями (до виходу FVIII). Відповідно, в основній фракції, що містила FVIII, зменшилась кількість фактора vWF, і, як наслідок, зросло співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>. Ці дані узгоджуються з літературними відомостями [30], що vWF елюється 0,15 М NaCl.

Таблиця 3.21

**Співвідношення FVIII/vWF на різних етапах очищення FVIII  
(M±m, n=5)**

Зразки	FVIII/vWF:R <sub>cof</sub>
Кріопреципітат	0,78±0,04
Елюат з DEAE-Sephарose (0,3 М NaCl)	1,85±0,09
Проскок з Діасорб-Procion Blue MXR	1,96±0,12
Проскок з Діасорб-Procion Blue HB	1,75±0,06
Проскок з Діасорб-Активний яскраво-голубий К	1,78±0,14
Проскок з Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	1,73±0,21
Проскок з Діасорб-Procion Gelb M4R	1,89±0,09

Отже, етапи попереднього фракціонування забезпечують видалення з кінцевого продукту факторів ППСБ, фібриногену, фібронектину тощо. Використання макропористих кремнеземних сорбентів з активними барвниками забезпечує не лише зростання питомої активності FVIII, але й не змінює співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>, на відміну від етапу іонообмінної хроматографії.

Цю властивість можна використати з метою створення препарату для лікування хвороби фон Віллебранда. Використання у технології виділення лише методу афінної хроматографії з кремнеземними сорбентами не лише забезпечує вихідний рівень даного співвідношення, але й дозволяє отримати vWF високої активності.

### 3.3.5 Дослідження властивостей отриманих зразків очищеного препарату фактора VIII

#### 3.3.5.1 Вплив зберігання очищеного препарату фактора VIII на його біоактивність

Для дослідження стабільності отриманого FVIII вимірювали його активність за різних умов зберігання в розчині: при кімнатній температурі, при +8 °С, при (-18) °С та (-30) °С.

З'ясовано, що при кімнатній температурі активність FVIII у розчині знижується на 20 % через 6–8 год зберігання, на 40 % – через 24 год та на 90 % через 48 год. При +8 °С фактор залишається більш стабільним (рис. 3.23).

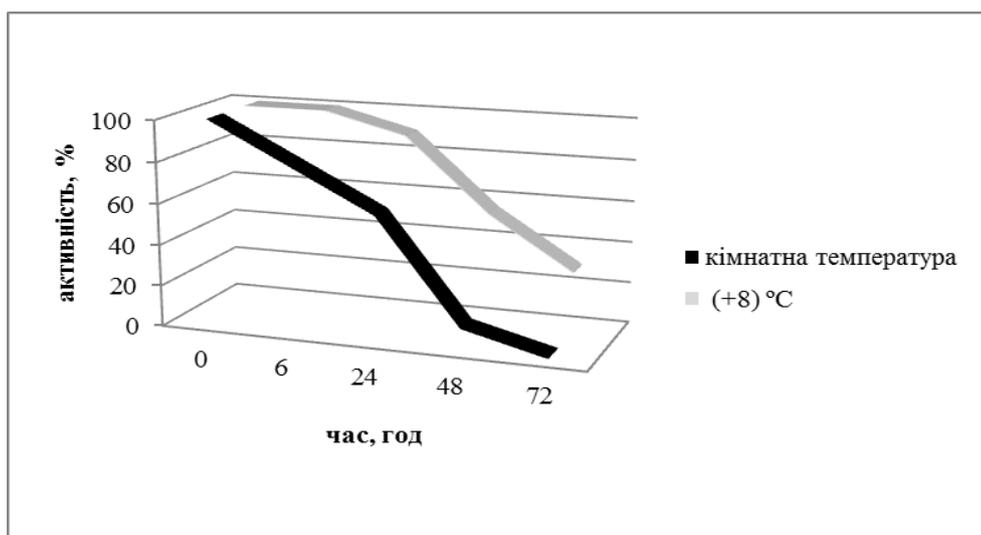


Рис. 3.23 Стабільність FVIII при зберіганні в розчині за кімнатної температури та при +(4÷8) °С

У замороженому стані активність фактора повністю зберігається упродовж місяця, через три місяці зберігання зменшується на 10 %, після року зберігання – на 20–25 %. Повторне заморожування–відтаювання призводило до втрати активності на 5–10 % після кожного наступного циклу. Ліофілізація препарату забезпечує збереження його активності протягом не менше двох років при + (4÷8) °С.

### 3.3.5.2 Визначення концентрації імуноглобулінів із використанням отриманого препарату фактора VIII

Поява інгібіторних антитіл, як відповідь на лікування чужерідним білком, є основним ускладненням замісної терапії при лікуванні хворих на гемофілію А. Так, поширеність анти-FVIII антитіл змінюється і залежно від тяжкості захворювання: при легких формах гемофілії від 5 % до 7 %, а у випадках тяжкої та середньої форми захворювання ці величини можуть досягати значень в діапазоні від 7 % до 18 % (в окремих випадках до 30 %) [203, 238].

Серед основних факторів ризику, які можуть сприяти виникненню специфічних анти-FVIII антитіл, виділяють генетичні (пов'язані з пацієнтом): тяжкість хвороби, сімейний анамнез, расова приналежність, тип генної мутації FVIII, гаплотип генів головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex/МНС) класу I та II, поліморфізм генів цитокінів та Т-лімфоцитів) та фактори, зовнішні (пов'язані з лікуванням): вік початку лікування, дози препаратів, вид кровотечі, тривалість та інтенсивність лікування, тип препарату, його імуногенність, зміна типу препарату, наявність інфекції, хірургічні втручання, травматичні крововиливи, післяопераційний стан [34].

Для проведення терапії важливим є метод визначення титру анти-VIII антитіл у крові пацієнтів. Основним методом кількісного визначення інгібіторів є метод Bethesda, який був розроблений Kasper C. K. та стандартизований групою гематологів у місті Bethesda, Maryland (1970 р.) [242].

Принцип даного тесту ґрунтується на властивості інгібітору в процесі інкубації з нормальною плазмою знижувати в ній активність FVIII. Величина зменшення вихідної активності FVIII виражається в одиницях Bethesda. Наведений метод простий у виконанні, діагностично важливий, проте, має низку недоліків, наприклад, недостатню чутливість та специфічність (оскільки в плазмі хворого можуть бути наявні антитіла не лише до FVIII, але й до інших факторів системи зсідання).

Для підвищення чутливості та специфічності визначення застосовують очищені препарати FVIII [135].

Провели дослідження застосування отриманого очищеного зразка фактора для виявлення імуноглобулінів до FVIII. Для цього в якості модельного експерименту використали дефіцитні плазми фірм Helena та Siemens (модель важкої форми гемофілії А без інгібіторів, FVIII $\leq$ 1,0 МО/мл). Як контроль використали стандартні плазми з нормальним рівнем FVIII. Паралельно провели визначення анти- FVIII антитіл у плазмі хворих на гемофілію А з відомим рівнем інгібіторних антитіл. Для порівняння роботи використали комерційний плазмований препарат FVIII Immunate (Baxter).

Визначення інгібіторних антитіл проводили згідно методики описаної G. L. Salvagno: змішували досліджуваний зразок з концентратом фактора (активність FVIII 1 МО/мл) у співвідношенні 3:1; інкубували на водяній бані протягом 2 год при +37 °C [135]. Після інкубації активність FVIII визначали одностадійним коагулологічним методом. Титр інгібіторів розраховували в одиницях Мальмо (1 одиниця Malmo (МІО) відповідає інактивації 1 одиниці FVIII у 1 мл плазми і еквівалентна, приблизно, 3,0 Бетесда Одиниць/мл (БО/мл) [154]. Результати досліджень представлені у табл.3.22

Таблиця 3.22

**Визначення концентрації інгібіторних антитіл  
(МІО/мл), (M $\pm$ m, n=3)**

Досліджувані зразки	Immunate	Очищений препарат
Дефіцитна плазма, Helena	не визначається	не визначається
Дефіцитна плазма, Siemens	не визначається	не визначається
Нормальна плазма, Helena	не визначається	не визначається
Нормальна плазма, Siemens	не визначається	не визначається
Плазма 1 (0 БО/мл)	не визначається	не визначається
Плазма 2 (5,0 БО/мл)	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
Плазма 3 (10,0 БО/мл)	3,0 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,1
Плазма 4 (20,0 БО/мл)	6,5 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,3

Одержані дані демонструють придатність використання отриманого препарату як діагностичного для виявлення анти- FVIII антитіл у пацієнтів.

Застосування неочищених препаратів (наприклад, Кріопреципітату) для кількісного визначення імуноглобулінів за даною методикою мало придатне, оскільки значна частина домішок в препараті заважає проведенню даного тесту (не лінійність графіку визначення).

Крім того, ця методика дозволяє підібрати оптимальний препарат (з найменшою імуногенністю) для проведення замісної терапії хворих на гемофілію А інгібіторної форми. Зокрема відомо, що саме використання недоочищених препаратів FVIII є основною причиною виникнення інгібіторних антитіл у пацієнтів *in vivo* [135, 154].

### 3.3.6 Висновки до розділу 3.3

- Доведено, що видалення білків протромбінового комплексу та частково фібриногену здійснювалося після осадження барій-цитратом та алюміній гідроксидом (III); осадження фібриногену відбувалось завдяки преципітації на ПЕГ-4000.
- Отримано очищений FVIII (ступінь очищення приблизно 100 раз) із СЗП з використанням етапів попереднього фракціонування та методів негативної афінної сорбції.
- Розроблено метод очищення FVIII з кріопреципітату, що включав два види хроматографії – іонообмінну та афінну (максимальна ступінь очищення від 129 до 242 разів, залежно від типу сорбенту).
- Створено схему одержання FVIII методом іонообмінної та афінної хроматографії у поєднанні з етапами попередньої сорбції нецільових білків (максимальна ступінь очищення від 239 до 702 разів, залежно від типу сорбенту).
- Встановлено, що на етапі негативної афінної сорбції забезпечується вихід FVIII майже 100 % (по активності).

- Продемонстровано, що на етапі афінної хроматографії не відбуваються зміни у співвідношенні FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>. Це є важливою перевагою даного методу у технології отримання очищеного препарату FVIII над методом іонообмінної хроматографії, оскільки на цьому етапі відбуваються основні втрати фактора Віллебранда.
- Встановлено, що попередні етапи видалення нецільових білків приводять до значно вищого ступеня очищення кінцевого препарату (для порівняння: 242 і 702 рази, відповідно).
- Встановили, що одержаний препарат не містить залишків ППСБ, фібриногену; стабільний в розчині при кімнатній температурі до 6 год; в замороженому стані – до місяця часу; ліофільно висушений зразок стабільний до двох років зберігання.
- Доведено, що отриманий препарат є придатний для діагностичних досліджень імуноглобулінів до FVIII.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [27, 35, 36, 39, 44, 48, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 224, 225, 228, 229].

#### 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проведений аналіз публікацій про структуру та фізіологічні функції FVIII (біологічну роль, патогенез і прояви вродженого та набутого дефіциту (гемофілія А), будову молекули, методи лікування та отримання) свідчить про його важливу біологічну роль в процесі зсідання крові [2, 4, 16, 25, 31, 38, 47, 79, 111–113, 118, 163, 164, 168–170, 244].

З літературних джерел відомо, що молекула FVIIIa це неферментативний білковий кофактор, який функціонує в присутності FIXa і тромбогенної фосфоліпідної поверхні та іонів кальцію, активуючи FX в FXa [4, 16].

Лікування гемофілії А за допомогою препаратів FVIII на сьогоднішній час є розповсюдженою практикою і вимагає препаратів високої чистоти, щоб, з однієї сторони, зменшити ризик зараження пацієнта вірусними захворюваннями, а з іншої, оскільки ін'єкції необхідно часто повторювати, запобігти виникненню небажаних імунних реакцій, які виникають при накопиченні залишкових забруднюючих речовин [36, 39, 63, 115, 127, 129, 134, 160, 161, 167–170, 173, 209]. З метою корекції дефіциту FVIII та для запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів цього фактора [111, 164, 177, 205, 241].

Препарат Кріопреципітат для лікування хворих на гемофілію А на сьогодні застосовується лише в окремих областях України та винятково при відсутності препаратів промислового виробництва. Його використання обмежене через ряд причин: незначну концентрацію FVIII в препараті, що не дає можливості досягнути необхідного рівня гемостазу; високий вміст нецільових білків, що призводить до навантаження реципієнта чужорідним білком; небезпеку зараження вірусними інфекціями; високу ймовірність виникнення посттрансфузійних реакцій тощо [13, 21].

Застосування нових плазмових препаратів для вибіркової гемотерапії робить можливим лікування пацієнтів очищеними, стандартизованими,

біологічно активними, вірус-безпечними продуктами на противагу використанню свіжозамороженої плазми та кріопреципітату [74].

Важливим є створення нових та удосконалення існуючих методик виділення та очищення FVIII зсідання крові.

Відомо, що перші препарати FVIII були виготовлені за допомогою методів осадження, хроматографія була введена в процесі виробництва в кінці 80<sup>-их</sup> років XX століття [72, 73, 75, 155]. В наш час, для очищення FVIII широко використовуються аніонообмінна, гель-проникна, афінна та імунно-афінна хроматографії [251]. Часто в процес виробництва фактора включають кілька видів цих хроматографій [185–189, 184, 190].

Сучасні дослідження спрямовані на стандартизацію хроматографічного процесу з точки зору селективності, специфічності, можливості багаторазового використання, зменшення собівартості, простоти регенерації сорбенту. Це досягається шляхом створення нових підходів у виборі лігандів (як природних так і синтетичних) та матриць [70, 74, 92, 96, 97, 99, 100, 104, 147, 201, 205].

Основними перевагами використання барвників-лігандів і біоімітуючих барвників є їх низька вартість і стійкість до хімічного і біологічного розкладу. Основний недолік використання цих синтетичних лігандів полягає в тому, що процес вибору конкретної біомолекули є емпіричним і вимагає прецизійного скринінгу при розробці методу [84, 70, 85, 95, 148]. Ми не зустрічали у літературі даних щодо очищення FVIII зсідання крові за допомогою даного типу барвників-лігандів, що підтверджено результатами експертизи по суті винаходу (патент України на винахід № 94299 «Спосіб очищення фактора VIII згортання крові» [28]) проведеного Держпатентом України.

Протягом тривалого часу проведені дослідження щодо можливості використання барвник-лігандної хроматографії в технології отримання факторів ППСБ, зокрема тромбіну [15]. Отримали вірусбезпечні препарати з високою питомою активністю та виходом [9, 225, 226, 228], що послужило передумовою для виявлення можливості їх застосування для виділення та очищення FVIII.

У дисертаційній роботі представлено результати досліджень, спрямовані на створення методу отримання препарату FVIII зсідання крові з використанням сучасних методів, які об'єднують основні біохімічні (синтезу, сорбції, преципітації, хроматографії) та коагулологічні (визначення активності факторів зсідання крові, імуноглобулінів до FVIII тощо).

Вміст різноманітних білків у біологічних рідинах, зокрема в плазмі, знаходиться у дуже широких межах. Так, одні білки присутні в високих концентраціях і складають до 90 % від загального вмісту (альбумін, IgG, IgA, фібриноген, антитрипсин, трансферин, транстиретин, гемопексин або гаптоглобулін) [165]. Ці білки заважають виділенню інших, що є в значно нижчих концентраціях. Тому процес отримання факторів зсідання крові, зокрема FVIII, які є в значно нижчих концентраціях, вимагає попередніх етапів видалення цих білків: кріопреципітації, переосадження неорганічними солями та розчинниками, різні види хроматографічних процесів тощо [30, 33, 72, 78, 139–141, 180–191].

На першому етапі виконання роботи провели синтез біоспецифічних сорбентів на основі макропористого кремнеземного носія та монохлор-тріазинових (7), дихлор-тріазинових (7) та вінілсульфонових барвників (2) [9]. Дослідження щодо можливості їх використання в ролі лігандів узгоджуються з даними робіт інших дослідників [84, 85, 95–98]. Зокрема, завдяки стабільності синтезованих сорбентів у «жорстких» умовах випробовувань (кисле і лужне значення рН середовища, висока іонна сила, наявність полярних розчинників, стійкість до високої температури) свідчить на користь утворення міцного ковалентного зв'язку між матрицею та лігандом. Ці властивості дозволяють проводити хроматографічні процедури з використанням таких сорбентів з високими швидкостями, що є надзвичайно важливим при великомасштабних (препаративних) та серійних експериментах виробництвах.

Наступним етапом дослідження було вивчення сорбційно-десорбційних властивостей синтезованих сорбентів стосовно FVIII. Показано, що всі сорбенти в тій чи іншій мірі здатні зворотньо зв'язувати білки, але FVIII за

різних умов дослідження (рН 7,4 та 8,0) не зв'язувався з жодним із сорбентів. Проте, дослідження продемонстрували, що очищення FVIII відбувалось завдяки явищу негативної афінної сорбції – виділення нецільових білків [56, 55, 223].

Відомо, що є три типи афінної хроматографії – негативна, позитивна і тандем-хроматографія [217]. При позитивній хроматографії, іммобілізовані барвники використовують для утримання цільового білка, а також деяких домішкових білків. Досліджуваний білок потім селективно елюють з використанням неспецифічного реагенту (нейтральної солі) або конкретного реагенту (субстрату, кофактора або конкуруючого інгібітора).

При тандем-хроматографії (найбільш технологічно складна з трьох процедур) використовують послідовне поєднання негативної і позитивної хроматографії. Суміш білків спочатку пропускають через колонку, що містить іммобілізований барвник, підібраний для негативної хроматографії. Наступним кроком є використання позитивної хроматографії. Цільовий білок, який зв'язується із специфічним лігандом, елюють. Тандем-хроматографія особливо корисна у тих ситуаціях, коли іммобілізований барвник використовується для позитивної хроматографії, зв'язує занадто багато небажаних білків, що утруднює селективне елювання цільового білка [217].

Негативна хроматографія – найпростіша із трьох методів за виконанням. Суть її полягає в тому, що ряд певних нецільових білків утримується іммобілізованим барвником, а інші, в тому числі й цільовий білок, проходять крізь колонку зі сорбентом. Вона особливо зручна для швидкого видалення фрагментів деградації, протеаз і нуклеаз, а також для видалення білків, які наявні у великих кількостях (наприклад, альбумін сироватки крові, фібриноген у кріопреципітаті). Крім того, на відміну від позитивної чи тандем-хроматографії, при проведенні негативної сорбції вихід продукту становить майже 100 % від нанесеного.

Відібрано 5 сорбентів, які забезпечили найкращий ступінь очищення FVIII: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-

Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К [27, 28, 40, 42, 46, 47, 51, 221, 223–226, 228, 229]. З наведеного ряду тільки Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ є сорбентом з вініл-сульфоновим барвником в якості лігаду. Всі інші в ролі ліганду містять тріазиновий барвник, в складі якого присутній бензамідиновий залишок – сполуки, похідні якої є ефективними інгібіторами протеїназ трипсинового типу (факторів II, VII, IX, X та є складовими комплексу ППСБ), що може свідчити про їх можливу афінність в якості лігандів для виділення цього класу ферментів.

Отже, в результаті негативної афінної сорбції на макропористих кремнеземних сорбентах, очищення FVIII відбулось завдяки зв'язуванню білків ППСБ (їх активність у супернатанті не визначалась) та, частково, альбуміну, які є нецільовими при виділенні FVIII. Отримані результати підтверджується і даними досліджень спектрів поглинання вільних розчинів барвників та в присутності альбуміну чи тромбіну. Зокрема, для Procion Blue HB, Procion Blue MXR та Procion Gelb M4R було виявлено зсуви у спектрах поглинання (рис. 3.10, 3.11, 3.13) у присутності досліджуваних білків.

Зв'язування альбуміну цими сорбентами підтверджують дослідження щодо препарату Immunate, в якому стабілізатором є альбумін людини [139]. В процесі негативної афінної сорбції синтезованими сорбентами відбувалося зростання питомої активності FVIII, що можна пояснити хроматографічним видаленням з розчину альбуміну.

Альбумін – це основний білок плазми крові [7, 94, 96]. Відомо, що для його очищення використовується барвник-лігандна афінна хроматографія з лігандом Cibacron Blue F3GA [87, 142], аналогом якого є Procion Blue HB. Серед обраних сорбентів найближчим за структурою до Procion Blue HB є Procion Blue MXR, а, відповідно, і Активний яскраво-голубий К (рис. 3.1). Отже, цілком ймовірно, що очищення FVIII на цих трьох макропористих сорбентах відбувалось завдяки сорбції альбуміну [94, 96].

Щодо сорбенту Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ не зустрічали у літературі даних щодо його використання у технологіях очищення білків.

Проте, описано використання вініл-сульфонових барвників у технології одержання альбуміну [219]. Провести аналогію у структурній будові його молекули та інших чотирьох обраних сорбентів не вдалося. Барвник Активний пурпуровий 4ЖТ не містить бензамідинового залишку і, відповідно, не можемо стверджувати, що він проявляє спорідненість до протеїназ серинового типу. Проте, аналогічно попереднім сорбентам, активність факторів ППСБ, а саме тромбіну та FIX, не виявлялась. Отже, тут також мало явище сорбції цих білків, яке може відбуватись і завдяки іншим, не афінним, взаємодіям (іонним, гідрофобним тощо).

Стосовно фібриногену, що міститься в розчині Кріопреципітату, вважаємо, що його зв'язування на досліджуваних сорбентах відбувалось завдяки іонним і гідрофобним взаємодіям. Фібриноген належить до класу глобулінів – слабокислих чи нейтральних білків, ізоелектрична точка яких лежить в межах 6,0–7,3 [6]. При чому кращої сорбції фібриногену досягали при рН 7,4, близько до його рІ. Тобто, цілком ймовірно, що фібриноген зв'язувався завдяки гідрофобним зв'язкам, які виникли між сорбентом та білком.

Відомо, що FVIII циркулює в плазмі крові разом з іншим глікопротеїном vWF, утворюючи нековалентний комплекс [16, 38]. Роль vWF у системі гемостазу полягає з одного боку у захисті FVIII від протеолітичної деградації, а з іншого – участі в процесах адгезії та агрегації тромбоцитів [4, 16, 31, 240]. Хвороба Віллебранда разом із гемофілією є найпоширенішими захворюваннями системи гемостазу [115], а причиною виникнення є дефіцит або аномальна мультимерна будова молекули vWF. Доволі часто у таких хворих спостерігається й зниження активності FVIII, як непрямий наслідок кількісних і якісних змін vWF. Для лікування обох цих захворювань використовують препарати FVIII. Крім цього, слід зазначити, що у лікуванні хвороби Віллебранда використовують і препарат десмопресин, що сприяє вивільненню ендогенного vWF з ендотеліальних клітин. У роботах [66, 82, 159] відмічено, що для лікування хвороби фон Віллебранда 3<sup>го</sup> типу та хворих, що не дають відповіді на застосування десмопресину, використовують комплексні

препарати FVIII–vWF. Вміст vWF у цих препаратах, а, відповідно, і співвідношення FVIII/vWF змінюється в дуже широких межах залежно від методів отримання. Проте, слід підкреслити, що найрозповсюдженіший спосіб отримання очищеного препарату FVIII методом іонообмінної хроматографії не дозволяє стандартизувати вміст в ньому vWF [115, 139, 140, 189, 184, 196].

Більшість зареєстрованих препаратів FVIII розроблені для лікування гемофілії А, і, відповідно, мають низький вміст vWF. Використання таких препаратів у лікуванні хвороби Віллебранда, перш за все, пов'язане з підвищеним ризиком виникнення тромбозів [196]. З іншого боку, використання препаратів FVIII може стати причиною основного ускладнення такої терапії – появою анти-FVIII антитіл [108, 123, 178]. Поява імуноглобулінів до FVIII залежить від попереднього лікування, тяжкості захворювання та типу вибраного препарату. Так, за даними M. Morfini та співавторів, ризик розвитку інгібіторних антитіл проти FVIII рекомбінантного типу був майже у два рази вищий (27,4%), ніж для плазмового препарату високої чистоти (14,3%) [168].

Дослідження *in vitro* продемонстрували, що використання препаратів FVIII з високим вмістом vWF, знижує ризик виникнення інгібіторів [117, 137]. Клінічні дослідження підтвердили, що використання рекомбінантних препаратів без vWF в 2,5–3 рази збільшує ризик виникнення інгібіторних форм гемофілії [123, 207, 254]. У роботах [67, 116] рекомендовано використовувати концентрати FVIII–vWF з високим вмістом vWF для лікування інгібіторних форм гемофілії А.

Відносно лікування хвороби Віллебранда немає чіткої відповіді у співвідношенні цих двох факторів, проте, у роботі A. B. Federici відмічено, що це співвідношення має бути не менше 0,77 [115]. Деякі із дослідників пропонують використовувати фактор фон Віллебранда як стабілізатор FVIII у готових препаратах на противагу альбуміну чи амінокислотам гліцину та лізину, оскільки він є природнім стабілізатором його активності, що не вимагає додавання стабілізаторів [67].

Отже, з вище наведеного впливає важливість присутності vWF в очищеному препараті FVIII та забезпечення збереження вихідного рівня співвідношення FVIII/vWF.

При застосуванні іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose не вдається зберегти вихідне співвідношення (табл. 3.21) через те, що елюція цих двох факторів з іонобмінника відбувається при різних величинах іонної сили. Тобто, метод іонообмінної хроматографії не дозволяє забезпечити абсолютний вихід vWF разом із FVIII (рис. 4.1).

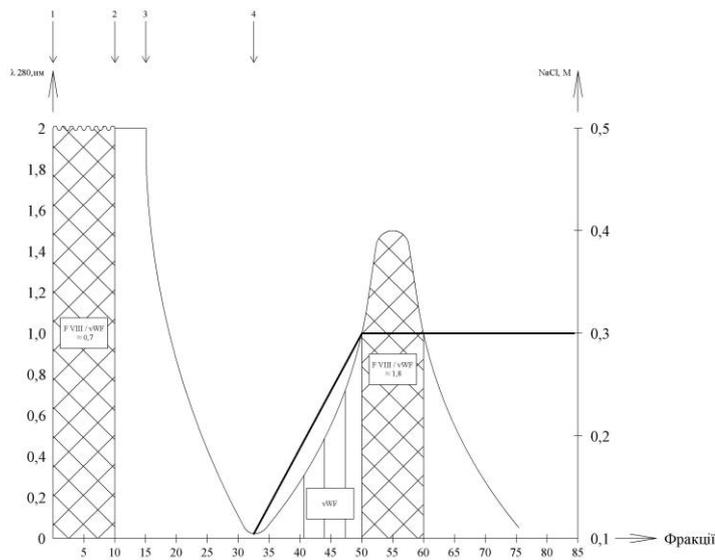


Рис. 4.1 Іонообмінна хроматографія FVIII

Примітка: 1 – нанесення; 2 – проскок; 3 – промив; 4 – елюція FVIII

У дослідженнях продемонстровано, що при застосуванні кремнеземних макропористих сорбентів з барвниками-лігандами для очищення FVIII, співвідношення FVIII/vWF:R<sub>cof</sub> практично не змінилось. Це є вагомою перевагою використання даного типу сорбентів у технології отримання очищеного FVIII, оскільки вони, на відміну від методу іонообмінної хроматографії, дозволяють забезпечити вихідний рівень у співвідношенні цих двох факторів і, відповідно, зменшити ризик виникнення анти-FVIII антитіл при терапевтичному застосуванні препарату.

Іншим вагомим аргументом на користь використання макропористих кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками для очищення FVIII є

те, що процес очищення відбувався завдяки явищу негативної сорбції, що в свою чергу, забезпечує практично 100 % вихід фактора. В умовах недостатності плазми зменшення втрат від вихідного рівня на різних етапах виробництва є важливим завданням при створенні нових технологій очищення.

Поєднання етапів очищення FVIII з різними методами інактивації вірусів дозволяє отримати високоактивні вірус-безпечні препарати [24, 53, 56, 68, 79, 102, 127, 160, 188, 232].

Методи подвійної вірусної інактивації в процесі отримання препаратів FVIII почали застосовуватись вже наприкінці ХХ-століття [15, 41, 73, 117, 209–213, 233].

Сольвент-детергентний метод інактивації вірусів, який базується на використанні в якості сольвенту три(п-бутил)фосфату, а в якості детергенту – Тритону Х-100, Твіну-80 чи іншого, в основному поліоксиетиленового неіонного детергенту, на сьогоднішній час залишається найефективнішим методом солюбілізації мембран вірусів [10, 22].

Ефект детергенту визначається двома видами взаємодії – взаємодією молекул детергенту з мембранними компонентами і молекул детергенту між собою. З однієї сторони, чим краще детергент руйнує вірусну оболонку, тим він кращий для процесу інактивації. Проте, з іншої сторони, вищеописане явище має велике значення саме для використання процесів вірусної інактивації з застосуванням детергентів в розчинах білків плазми крові, для яких такий вплив може мати значні негативні наслідки (якщо не на порушення нативної структури, то, як мінімум, зменшення чи повне зникнення ферментативної активності, причому незворотнє) [15, 233].

В той же час, вірус-інактивуючі речовини є потенційно-токсичними і можуть мати негативний вплив на організм пацієнта [73, 117, 191] або безпосередньо впливати на активність (властивості) FVIII [68, 79, 127, 160, 188, 208, 210-212, 233].

Проведені дослідження впливу вірус-інактивуючих речовин на активність FVIII двома різними методами: одностадійним коагулологічним та з

використанням специфічного хромогенного субстрату. Константовано, що всі ці речовини в тій чи іншій мірі мали негативний вплив на активність FVIII. В експерименті було показано, що інгібуючий вплив цих речовин на активність фактора є зворотнім – після видалення методом ультрадіафільтрації активність FVIII відновлювалась [12, 222]. Слід зазначити, що застосування методу хромогенних субстратів дозволяє проводити експрес-визначення активності фактора на всіх етапах очищення. Проте, коагулологічний метод є більш інформативним для визначення придатності застосування FVIII у терапевтичних цілях. Хоча, для рекомбінантних препаратів третього покоління із зміненою нативною структурою (відсутність субодиниць, складні біологічні комплекси тощо) деякі виробники наголошують на застосуванні методу гідролізу хромогенних субстратів [162, 201, 250, 252].

В процесі отримання FVIII важливим є вибір етапу вірусної інактивації з наступним видаленням вірус-інактивуючих речовин.

Сольвент-детергентний метод вірусної інактивації може застосовуватись як перед етапом кріопреципітації, оскільки при цьому відбувається осадження FVIII, а вірус-інактивуючі речовини залишаються у супернатанті, так і безпосередньо перед етапом іонообмінної хроматографії, оскільки сольвент і детергент не зв'язуються з сорбентом і проходять разом з проскоком [63, 138, 171, 209, 212, 233].

Оскільки сольвент-детергентний метод антивірусної обробки придатний для інактивації оболонкових вірусів, а тіоціанатний – неспецифічний (для оболонкових та без-оболонкових вірусів), їх поєднання в одній технологічній схемі виділення та очищення білків плазми з використанням попереднього фракціонування та біоспецифічної хроматографії на кремнеземних макропористих сорбентах дозволить суттєво покращити безпеку отриманих препаратів [53, 208, 211, 222, 244]. Поєднання застосування кількох методів хімічної вірусної інактивації завдяки синергізму дії покращує якісні характеристики отриманого препарату [5].

Оскільки для вірусної інактивації використовували тіоціанат амонію у концентрації 1,0 М, цей етап необхідно здійснювати лише перед кріопреципітацією. При такій концентрації тіоціанату не відбувається зв'язування FVIII з іонообмінником. На етапі кріопреципітації значна частина інактивуючих речовин (сольвент-детергенту та тіоціанату амонію) залишаються у супернатанті, тому не заважають наступним етапам отримання FVIII [138, 233]. Залишкова концентрація вірусінактивуючих речовин у кріопреципітаті відносно вихідної зменшується приблизно в 10 разів.

При проведенні іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose використовували вихідний буферний розчин, що містив 0,1 М NaCl, а для елюції – аналогічний буфер з 0,3 М.

Залишкова концентрація тіоціанату (0,1 М) після кріопреципітації заважає зв'язуванню FVIII на іонообміннику (сумарна іонна сила близько 0,2 М). Для усунення цього наслідку в якості робочого вихідного буферу використали 50 мМ Тріс-HCl, що не містить 0,1 М NaCl (сумарна іонна сила розчину 0,1 М). Для остаточного видалення тіоціанату після зв'язування FVIII на іонообміннику сорбент промивали вихідним буферним розчином з 0,1 М NaCl.

Для контролю наявності вірус-інактивуючих речовин необхідно проводити їх кількісне визначення на різних етапах, а також в готовому препараті. Для визначення Тритону X-100, Твіну-80 та тіоціанату амонію запропоновані фотометричні методи визначення їх концентрацій [49]. Контроль доцільно проводити на етапі, який був наступним після процесу інактивації вірусів. Якщо в зразку виявляються залишки вірус-інактивуючих речовин це, безумовно, вимагає включення в технологію отримання очищеного препарату FVIII методів остаточного їх видалення (гель- та ультрафільтрації, висолювання тощо), які доцільно проводити на останніх етапах виготовлення. Крім того, обов'язково потрібно провести додаткове визначення можливих залишків в очищеному зразку після останнього етапу виділення (для валідації процесу).

У літературі зазначено, що аніонообмінна хроматографія є досить швидким і широко розповсюдженим методом фракціонування білків плазми крові і може бути використана також і для очищення FVIII з кріопреципітату [30, 33, 139, 141, 215]. Використання методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками для очищення FVIII запропоновано вперше [40, 42]. Одночасне застосування цих методів в одній схемі одержання FVIII дозволило отримати стабільний високоактивний препарат [51].

На підставі вище представлених результатів розроблено технологічні схеми очищення FVIII (рис. 4.2-4.4). Схеми 4.2 відрізняється від схеми 4.3 послідовністю етапів проведення антивірусної обробки. Як згадувалось раніше, оптимальним для проведення етапу хімічної вірусної інактивації є місце перед кріопреципітацією, оскільки в цьому випадку значна кількість антивірусних агентів залишається в супернатанті. Це не вимагає додаткових методів видалення їх (діалізу чи гель-фільтрації) з розчину перед етапом іонообмінної хроматографії.

При проведенні різних етапів одержання очищеного препарату FVIII необхідно контролювати ефективність процесу. обов'язковим є визначення активності FVIII на всіх етапах одержання, оскільки її втрата на будь-якому етапі вимагає припинення усього технологічного процесу. Після процесу вірусної інактивації активність необхідно контролювати методом гідролізу хромогенних субстратів, оскільки встановлено, що на цей метод визначення вплив домішкових речовин є меншим.

Необхідно проводити і визначення активності інших факторів зсідання крові та концентрації білка на усіх етапах одержання. Так, на етапах осадження білків ППСБ отриманий осад з успіхом може бути використаний для одержання інших факторів зсідання крові, зокрема FIX та FVII.

Важливим є і контроль наявності вірус-інактивуючих речовин, оскільки їх залишкова концентрація є шкідлива для здоров'я пацієнтів [73, 117, 191].

У схемах одержання очищеного препарату основним методом очищення залишається метод іонообмінної хроматографії. При цьому більшість виробників пропонують застосування сольвент-детергентного методу вірусної інактивації безпосередньо перед хроматографічним етапом. Оскільки розроблений метод передбачав використання комбінації двох методів (сольвент-детергентного та тіоціанатного), необхідно проводити його або перед кріопреципітацією, або, як описано раніше, включити ще етап видалення вірус-інактивуючих речовин з розчину.

Всі етапи контролю необхідно проводити з метою валідації процесу виробництва. Так звані «точки контролю» дозволяють розробити технологічний процес з високим рівнем відтворюваності.

Крім того, на кожному етапі технології можна вирахувати «коефіцієнт похибки», який слід враховувати при визначенні активності FVIII. Оскільки кожен етап передбачає використання різних хімічних речовин, які заважають визначенню активності фактора, можна розрахувати «відсоток впливу» кожного окремого чинника. Це дозволить проводити контроль без додаткових етапів видалення цих речовин з розчину.

Відомо, що на етапі кріоосадження втрачається близько 30–40 % вихідної активності FVIII [33], у схемі 4.4 запропоновано одержання фактора безпосередньо з плазми крові. При цьому методи хімічної вірусної інактивації та способи видалення вірус-інактивуючих речовин з розчину слід проводити перед етапом іонообмінної хроматографії.

Отже, основними етапами одержання препарату є антивірусна обробка, кріопреципітація, осадження факторів ППСБ гідроксидом алюмінію (III), з ПЕГ-4000, іонообмінна хроматографія на DEAE-Sepharose FAST FLOW, негативна афінна хроматографія на барвник-кремнеземних сорбентах.

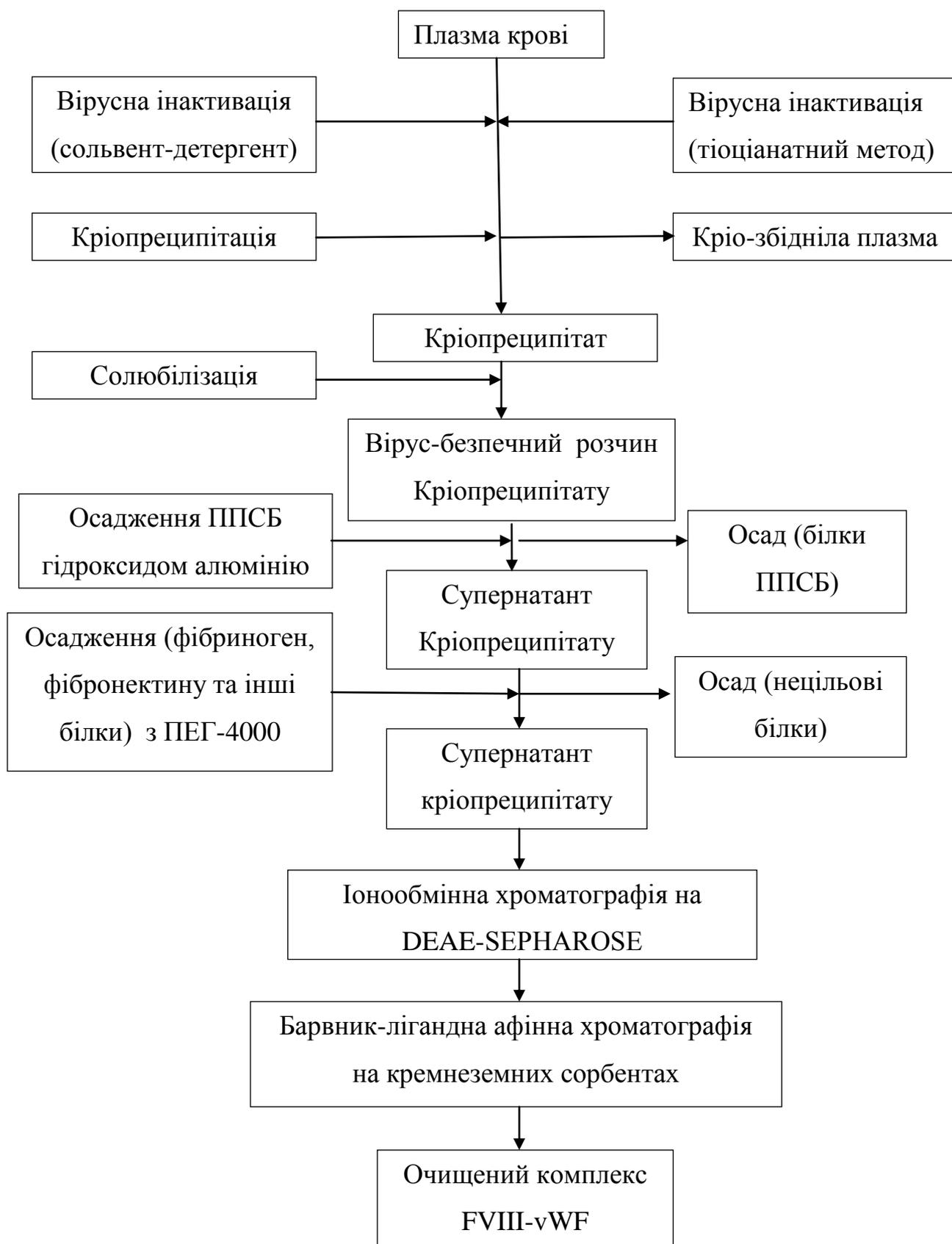


Рис. 4.2 Технологічна схема отримання фактора FVIII з плазми крові



Рис. 4.3 Технологічна схема отримання фактора FVIII з кріопреципітату замороженого

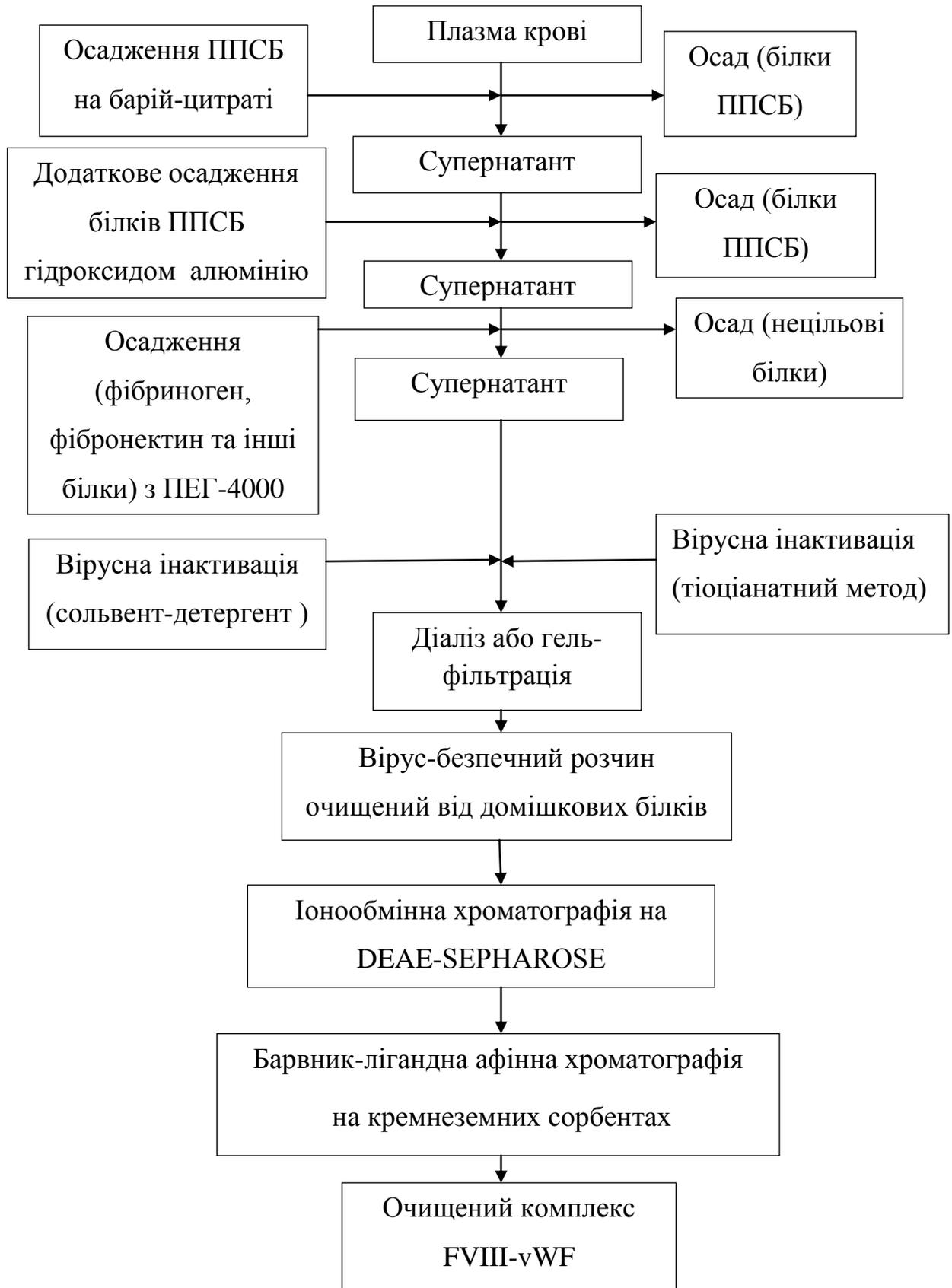


Рис. 4.4 Технологічна схема отримання фактора FVIII безпосередньо з плазми крові

У таблиці 4.1 представлені порівняльні результати досліджень при поєднанні різних етапів очищення FVIII. Зокрема, застосування безпосередньо етапу афінної хроматографії (Дослід I) дозволило досягнути максимального ступеня очищення 8,33 рази; при проведенні етапів попереднього фракціонування з негативною афінною сорбцією ступінь очищення FVIII становив приблизно 100 раз (Дослід II). Поєднання іонообмінної хроматографії з афінною забезпечило зростання ступеня очищення в 242 рази максимально. Включення у технологічну схему всіх цих етапів, а саме попереднього фракціонування, іонообмінної та афінної хроматографії, дозволяє отримати препарат FVIII із ступенем очищення до 700 разів.

Таблиця 4.1

**Порівняння ступеня очищення фактора VIII  
залежно від методів отримання**

Сорбенти	Дослід I	Дослід II	Дослід III	Дослід IV
	Ступінь очищення, раз			
Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ	5,78	110,59	242,10	702,05
Діасорб-Procion Blue HB	3,92	100,59	129,44	343,06
Діасорб-Procion Gelb M4R	6,28	93,35	166,52	499,44
Діасорб-Procion Blue MXR	8,33	не проводили	154,60	612,92
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	5,92	97,05	179,54	609,02

Примітки: Дослід I – афінна сорбція білків (Кріопреципітат);  
 Дослід II – попереднє фракціонування + афінна хроматографія (СЗП);  
 Дослід III – іонообмінна + афінна хроматографії (Кріопреципітат);  
 Дослід IV – попереднє фракціонування + іонообмінна хроматографія + афінна хроматографії (Кріопреципітат)

Характеристика одержаного препарату FVIII з найвищим ступенем очищення (див. розділ 3.3.3.2) наведена в таблиці 4.2. Отриманий препарат не містить залишків фібриногену, тромбіну, FIX. Не визначались залишки вірус-інактивууючих речовин (три(н-бутил)фосфату, Тротону X-100, Твіну-80 та тіоціанату амонію).

Таблиця 4.2

**Характеристика отриманого концентрату фактора VIII зсідання крові ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )**

Показники	Очищений FVIII
FVIII МО/мг білка	50,58±1,68
FVIII МО/мл	5,31±0,34
vWF:R <sub>cof</sub> , МО/мл	3,07±0,18
FVIII/vWF:R <sub>cof</sub>	1,73±0,21
Концентрація білка, мг/мл, $\times 10^{-1}$	1,06±0,04
Концентрація альбуміну, мг/мл, $\times 10^{-1}$	0,67±0,02
Фібриноген, мг/мл	не виявлено
Тромбін, НН/мл	не виявлено
FIX, МО/мг білка	не виявлено
Три(н-бутил)фосфат	не виявлено
Тритон X-100	не виявлено
Тіоціанат амонію	не виявлено
Твін-80	не виявлено
Вихід продукту, %	73,87
Ступінь очищення, рази	702,05
Стабільність при зберіганні у розчині (100 %): кімнатна температура +(4÷8) °C - (30) °C	до 6 год до 24 год до 3 місяців
Стабільність зберігання після ліофілізації (+(4÷8) °C)	до 2 років

Розроблений метод очищення FVIII зсідання крові на макропористих кремнеземних сорбентах з іммобілізованими активними барвниками володіє низкою переваг над розповсюдженими методами іонообмінної хроматографії у технології отримання фактора і може бути впроваджений в практику лабораторного та промислового виробництва, стати основою для розробки терапевтичного препарату, а також для наукових досліджень. Отриманий препарат може використовуватись і з діагностичною метою для виявлення імуноглобулінів до FVIII.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення й експериментальне обґрунтування доцільності використання макропористих кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками у технології отримання FVIII зсідання крові. Досліджено основні властивості цих сорбентів, а також можливість їх використання для фракціонування плазми крові.

1. Синтезовано 16 біоспецифічних кремнеземних сорбентів із іммобілізованими активними барвниками (7 монохлор-, 7 дихлор-тріазинові та 2 вініл-сульфонові барвники) й досліджено їх основні характеристики та переваги: жорсткість, висока сорбційна ємність, стійкість до дії різних полярних чинників, рН та високої іонної сили розчину, що зумовлено наявністю міцного ковалентного зв'язку між матрицею та лігандом.
2. Доведено, що всі досліджувані сорбенти зв'язують нецільові щодо фактора VIII білки (явище негативної сорбції); при цьому значний вплив на зв'язування мають величина рН та розмір пор матриці. Сорбція нецільових білків є найвищою при рН 7,4 та розмірі пор матриці 750 Å.
3. За результатами досліджень відібрано п'ять сорбентів, для яких характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion Gelb M4R, Діасорб-Procion Blue HB, Діасорб-Procion Blue MXR і Діасорб-Активний яскраво-голубий К.
4. Виявлено, що відібрані сорбенти не зв'язують фактор фон Віллебранда, внаслідок чого зберігається вихідний рівень співвідношення FVIII/vWF, що є вагомою перевагою запропонованого методу над методом іонообмінної хроматографії. Вихід продукту на етапі афінної хроматографії становить 96,34 %.
5. Уперше розроблено схеми отримання очищеного вірус-безпечного препарату фактора VIII у поєднанні методів попереднього фракціонування білків, іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose та афінної сорбції на

пропонованих макропористих кремнеземних сорбентах із методами антивірусної обробки, при яких досягається максимальний ступінь очищення 700 разів.

6. Показано, що вплив тіоціанату амонію, три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80 на активність фактора VIII зсідання крові є зворотним і при видаленні їх із реакційної суміші активність фактора VIII відновлюється.
7. Продемонстровано, що існує тенденція до негативного кореляційного зв'язку середньої сили між концентрацією у розчині тіоціанату амонію та методами визначення активності фактора VIII – коагулологічним ( $r=-0,77$ ) і з використанням хромогенного субстрату ( $r=-0,73$ ). Між методами визначення зафіксовано тісний позитивний кореляційний зв'язок ( $r=+0,98$ ,  $P\leq 0,05$ ). При дослідженні впливу інших вірус-інактивууючих речовин на методи визначення активності фактора VIII констатовано, що між величиною їх концентрації та методами визначення існує тісний негативний кореляційний зв'язок ( $r=-0,99$ ,  $P\leq 0,05$ ). Між методами визначення виявлено тісний прямопропорційний зв'язок ( $r=+0,99$ ,  $P\leq 0,01$ ).
8. Розроблено методи контролю вмісту хімічних вірусних інактиваторів, зокрема іонів тіоціанату амонію і тритону X-100, на різних етапах очищення та в кінцевому препараті.
9. Отримано препарат фактора VIII з питомою активністю  $50,58\pm 1,68$  МО/мг білка, співвідношенням FVIII/vWF:R<sub>cof</sub>  $1,73\pm 0,21$ , з концентрацією альбуміну  $0,07\pm 0,01$  мг/мл. Не виявлено залишків фібриногену, тромбіну, фактора IX; залишків вірус-інактивууючих речовин (три(н-бутил)фосфату, Тритону X-100, Твіну-80, тіоціанату амонію); стабільний (без втрати активності) при кімнатній температурі до 6 год, при  $+(4\div 8)$  °C – 24 год, у замороженому стані (-30) °C до 3 місяців, після ліофілізації – не менше 2 років. Одержаний препарат фактора VIII придатний для виявлення анти-FVIII антитіл у плазмі крові пацієнтів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Баркаган З. С., Момот А. П. Основы диагностики нарушений системы гемостаза. М.: *Ньамед-АО*. 1991. 213 с.
2. Бобоев К. Т. Популяционные и молекулярно-генетические аспекты гемофилии А и В в Узбекистане. *Цитология и генетика*. 2008. 2. С. 51–54.
3. Бородкин В. Ф. Химия красителей. М.: *Химия*. 1981. 248 с.
4. Виговська Я. І. Гемораргічні захворювання. Львів: *ВАТ «Бібльос»*. 1991. 240 с.
5. Використання синергічного ефекту вірус-інактивуючих агентів у сучасних технологіях одержання факторів згортання крові та фібринолізу / В. Л. Новак, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Н. О. Шурко, Л. В. Орлова *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 312–316.
6. Гончаренко Д. О., Жежер А. О., Колівошко А. М. Ключове питання замісної терапії акушерських кровотеч – фібриноген. *Медицина неотложных состояний*. 2015. 1 (64). С. 67–70.
7. Горячковский А. М. Клиническая биохимия. *Одесса: Астропринт*. 1998. 608 с.
8. Грегірчак Н. М., Антонюк М. М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології. *Конспект лекцій для студентів спеціальність 8.05140101 «Промислова біотехнологія» денної та заочної форм навчання*. К.: НУХТ. 2011. 59 с.
9. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., Шурко Н. О. Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами – активними барвниками тріазинового ряду. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2008. Вип. 47. С. 63–69.
10. Даниш Т. В. Розробка методів солюбілізації мембран вірусів та їх застосування при виготовленні препаратів крові. *Біологія тварин*. 2010. 12. № 1. С. 367–375.

11. Даниш Т. В., Шурко Н. О., Вороняк М. І., Вус М. М. Альтернативні шляхи одержання препаратів фактора VIII згортання крові. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2008. Т.ІІ, вип. 34. С. 87–92.
12. Дослідження впливу вірус-інактивуючих агентів на кількісний вміст та активність факторів згортання крові / Н. О. Шурко, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 365–369.
13. Заготівля та використання кріопреципітату замороженого. Методичні рекомендації / П. М. Перехрестенко, А. М. Чугрієв, І. В. Жиглинський, В. В. Петров, О. О. Якубович. Київ. 2006. 26 с.
14. Застосування діасорбу амінопропілового для одержання високоочищених білкових препаратів з плазми крові / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, Н. О. Шурко, Л. В. Орлова, С. Є. Мадич. *Тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я».* (м. Луганськ, 26–27 берез. 2009 р.). С. 24–25.
15. Застосування сольвент-детергентного методу інактивації вірусів при одержанні препаратів з плазми крові / М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Л. В. Орлова, Н. О. Шурко. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н, 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 166–170.
16. Зубаїров М. Д. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. *Казань: ФЕН.* 2000. 364 с.
17. Козлов А. А. Метод определения активности фактоа VIII в плазме крови человека и в антигемофильных препаратах. *Вестник службы крови.* 2006. № 3. С.35–40.
18. Курашвілі Л. В., Волков А. С. Прогностична значущість визначення холестерину у фракції ліпопротеїдів високої щільності у донорів крові. *Гематологія і трансфузіологія.* 1993. № 5. С. 39–41.

19. Кутюрова О. Г., Дереза Т. Л., Скрылева И. А., Берковский А. Л. Выделение комплекса FVIII/фактора Виллебранда из плазмы донорської крови. *Гематология и трансфузиология*. 2014. № 4 (59). С. 19–24.
20. Красівська В. В., Стасишин О. В., Новак В. Л. Лабораторна діагностика вроджених геморарагічних захворювань. *Львів: РВА «Тріумф»*. 2014. 72 с.
21. Любчак В. В. Проект щодо реорганізації переробки плазми крові. *Здоров'я нації*. 2012. 2 (22). С. 48–50.
22. Меддию Э. Биохимическое исследование мембран. М.: Мир. 1979. 460 с.
23. Молекулярная патология белка / под ред. член-кор АМН Украины, проф. Д. И. Заболотного. К.: Логос. 2008. 236 с.
24. Новак В. Л., Шурко Н. О., Миськів І. М. Скринінг донорської крові та її компонентів як основа вірусної безпеки трансфузійної медицини. *Збірник тез III Міжнародного конгресу з інфузійної терапії*. 2016. С. 124–125.
25. Орлова Н. А. Дизайн генетических элементов и оптимизация системы гетерологичной экспрессии фактора свертывания крови VIII человека в клетках млекопитающих. *Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.01.03*. НАН России. Москва. 2013. 26 с.
26. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1985. 536 с.
27. Пат. України на корисну модель 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові/ Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ «Інститут патології крові та трансфузійно медицини НАМН України» – № u201512302; заявл. 11.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11.
28. Пат. 94299 України, C2, МПК, C07K 1/22, C07K 14/755 Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л.; заявник ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України». – № а 2009 06990; заявл. 03.07.2009; опубл. 10.01.2011, Бюл. № 8, 26.04.2011.

29. Пат. 112716 України, С2, МПК, А61К 31/722, С08В 37/08 Спосіб отримання хітозану гемостатичного / Луцик М. Д., Білий Р. О., Луцик М. М., Стойка Р. С.; заявник Інститут біології клітин НАН України. № заявки 2015 06305; заявл. 25.06.2015; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 19, 25.09.2015.
30. Пат. 2148411 RU. Способ получения с помощью хроматографических методов вирусно-инактивированной фракции, содержащей фактор VIII / Странчар А., (SI); Штадлер М. А. (AT); Йозич Д. (DE). А61К38/37, С07К14/7556, № 96110890/14, заявл. – 30.09.1994; опубл. 10.05.2000.
31. Современные представления о системе гемостаза / Г. Л. Волков, Т. Н. Платонова, А. Н. Савчук, О. В. Горницкая, Т. М. Чернышенко, Е. Н. Краснобрижая. К.: Наукова думка. 2005. 292 с.
32. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / Н. О. Шурко, Т. В. Даниш, В. Л. Новак., М. І. Вороняк, М. М. Вус та ін, *Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я*. К.: «Укрмедпатентінформ». 2010. №2.
33. Сравнение двух альтернативных методов хроматографической очистки при получении препаарта VIII фактора свертывания плазмы крови человека в дозировке 500 едениц/флакон / А. В. Ямкин, О. В. Стронин, Л. Н. Никитина, Н. А. Сименова, А. А. Епанченцева. *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2011. № 2-2, (26). С. 49–55.
34. Стасишин О. В. Пофілактичне лікування гемофілії – стратегія вибору. *Здоров'я України*. 2011. №4 (257). С. 48–49.
35. Сучасні тенденції у фракціонуванні плазми крові / Н. О. Шурко, Т. В. Даниш, В. Л. Новак, Ю. В. Войціцький, Л. Є. Лаповець. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 140–144.
36. Терапевтичні препарати факторів зсідання крові в Україні / О. Й. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Н. О. Шурко, Т.В. Даниш. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 51–56.
37. Туркова Я. Афинная хроматография. М.: Мир. 1980. 472 с.

38. Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии / Н. А. Орлова, С. В. Ковнир, И. И. Воробьев, А. Г. Габибов, А. И. Воробьев. *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*. 2013. № 2 (17), том 5. С.19–39.
39. Шурко Н. О., Вороняк М. І., Даниш Т. В. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання. *Біологічні студії*. 2014. Т. 8, № 1. С. 197–204.
40. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Афінна хроматографія фактора VIII з'єднання крові з використанням тріазинових барвників в якості лігандів. *Матеріали наук-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфізіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 21 квіт. 2016 р.). С. 179.
41. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Вірусна безпека препаратів фактора згортання крові VIII. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченої 80-річчю служби крові Криму*. (АР Крим, м. Алушта, 23–24 трав. 2013 р.). С. 59–60.
42. Шурко Н. О., Даниш Т. В., Вороняк М. І. Застосування барвник-лігандної хроматографії для очищення фактора VIII з'єднання крові. *Біологічні студії*. 2017. Т.11, № 1. С. 67–74.
43. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Дослідження зв'язування фактора VIII з'єднання крові з кремнеземними сорбентами різної пористості. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2017. Вип. 76. С. 23–28.
44. Шурко Н. О., Даниш Т. В., Корецька Н. Р. Фракціонування плазми крові: основні тенденції. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення»*. (м. Київ, 7–8 листоп. 2014 р.). С. 86–88.
45. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Негативна афінна хроматографія як спосіб отримання фактора VIII з плазми крові людини. *Медичний форум*. 2015. 4 (04). С. 95–97.

46. Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л. Одноетапний спосіб очищення фактора VIII методом негативної афінної хроматографії з препарату «Кріопреципітат». *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2009. Т. II, випуск 34. С. 207–209.
47. Шурко Н. О., Даниш Т. В., Новак В. Л. Фактор VIII зсідання крові: будова молекули та застосування. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 184–192.
48. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Одержання фактора VIII згортання крові – основні тенденції. *Український хіміотерапевтичний журнал.* 2008. № 1–2. С. 399.
49. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Розробка методики визначення концентрації тіоціанату амонію у біологічних рідинах. *Тези доп. IV міжнар. мед. конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України».* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 15–17 квіт. 2015 р.). С. 75.
50. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Створення технології виділення та очищення фактора VIII згортання крові з використанням біоімітуючих кремнеземних сорбентів. *Матеріали ювілейної наук.-практ. конф. «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини».* (м. Львів, 27–28 трав. 2010 р.). С. 187–188.
51. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах. *Біологія тварин.* 2016. Т. 18, № 2. С. 152–159.
52. Шурко Н. О., Даниш Т. В. Технологія очищення фактора VIII згортання крові. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, ВЦ «КиївЕкспо Плаза», 21 квіт. 2016 р.). С. 179.
53. Шурко Н. О., Дульцева Н. А., Даниш Т. В. Застосування вірусних інактиваторів в процесі технології одержання факторів згортання крові та

- фібринолізу. *Зб. тез наук. праць «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках»*. (м. Київ, 2015 р.). С. 96–99.
54. Шурко Н. О. Методи отримання плазмових препаратів фактора VIII. *Тези доп. X Ювілейної південноукр. наук.-практ. конф. «Вища школа в рішенні проблем внутрішньої медицини»*, присвяченої 115-річчю Одеськ. нац. мед. ун-ту. (м. Одеса, 9 квіт. 2015 р.). С. 140–141.
55. Шурко Н. О. Новий метод отримання комплексу факторів VIII-фон Віллебранда. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2017. Вип. 39. С. 229–236.
56. Шурко Н. О., Орлова Л. В., Даниш Т. В. Вірусна безпека антигемофільних препаратів. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Нове у медицині сучасного світу»*. (м. Львів, 28–29 листоп. 2014 р.). С. 110–113.
57. Шурко Н. О. Фракціонування плазми крові: класичні та хроматографічні методи отримання фактора VIII згортання крові. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна*. 2016. Вип. 73. С. 347–351.
58. Activated protein C-catalyzed proteolysis of factor VIIIa alters its interactions within factor Xase / L. M. Regan, L. M. O'Brien, T. L. Beattie, K. Sudhakar, F. J. Walker, F. J. Fay *J. Biol Chem.* 1996. 23; 27 (8). P. 3982–3987.
59. Aldington S., Bonnerjea J Scale-Up of monoclonal antibody purification processes. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007. 848 (1). P. 64–78.
60. Almeida J. D., Bradburne A. F., Wreghitt T. G. The effect of sodium thiocyanate on virus structure. *Journal of Medical Virology.* 1979. 4 (4). P. 269–277.
61. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors / C. K. Kasper, L. Aledort, D. Aronson, R. Counts, J. R. Adson et al. *Thrombosis et Diathesis Hemorrhagica.* – 1975. – № 34. – P. 869–872.
62. An oriP expression vector containing the HIV-1 Tat/TAR transactivation axis produces high levels of protein expression in mammalian cells / M. S. Cho, H. Yee, C. Brown, K.-T. Jeang, S. Chan. *Cytotechnology.* 2001. 37 (1). P. 23–30.

63. A solvent/detergent-treated and 15-nm filtered factor VIII: a new safety standard for plasma-derived coagulation factor concentrates / S.Chtourou, P. Porte , M. Nogr , N. Bihoreau, E. Cheesman, B. Samor, A. Sauger, S. Raut, C. Mazurier. *Vox Sang.* 2007. 92 (4). P. 327–337.
64. A study of reported factor VIII around the world / J. S. Stonebraker, M. Brooker, R. E. Amand, A. Farrugia, A. Srivastava. *Haemophilia.* 2010. 16 (1). P. 33–46.
65. A study of reported factor IX use around the world / J. S. Stonebraker, P. H. Bolton-Maggs, M. Brooker, A. Farrugia, A. Srivastava. *Haemophilia.* 2011. 17 (3). P. 446–455.
66. Berntrop E., Ekman M., Gunnarson M., Nillson I. M. Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations. *Haemophilia.* 1996. 2. P. 90–99.
67. Berntorp E. VWF/FVIII complex and the management of patient with inhibitors: from laboratory to clinical practice. *Haemophilia.* 2007. 13 (S5). P. 69–72.
68. Biesert L., Lemon S., Goudeau A., Hans-Dieter Brede H.-D. Viral safety of a new highly purified factor VIII (Octate). *Journal of Medical Virology.* 1996. 48 (4). P. 360–366.
69. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII / D. D. Pittman, E. M. Alderman, K. N. Tomkinson, J. H. Wang , A. R. Giles , R. J. Kaufman. *Blood.* 1993. 1. 81(11). P. 2925–2935.
70. Boyer P. M., Hsu J. T. Protein purification by dye-ligand chromatography. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology.* 1993. 49. P. 1– 44.
71. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72. P. 248–254.
72. Burnouf T., Burnouf-Radosevich M., Huart J. J., Goudemand M. A highly purified factor VIII:C concentrate pre-pared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatog-raphy. *Vox Sang.* 1991. Vol. 60. (S1). P. 8–15.
73. Burnouf T. Chromatographic removal of viruses from plasma derivatives. *Dev Biol Stand.* 1993. 81. P. 199–209.

74. Burnouf T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography B*. 1995. 664. P. 3–15.
75. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev*. 2007. 21. P. 101–117.
76. Burnouf T. New developments in the production of plasma derivatives. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1751-2824](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1751-2824). 2016.
77. Burnouf T., Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2001. Vol. 49. P. 575–586.
78. Burnouf T., Seghatchian J. «Go no Go» in plasma fractionation in the world's emerging economies: Still a question asked 70 years after the COHN process was developed. *Transfus Apher Sci*. 2014. 51 (2). P.113–119.
79. Burnouf T. Viral safety of plasma products – Do we have zero risk? *Transfusion and Apheresis*. 2001. 24. P. 139.
80. Callum J. L., Karkouti K., Lin Y. Cryoprecipitate: the current state of knowledge. *Transfus Med*. 2009. 23 (3). P. 177–188.
81. Casillas G., Simonetti C., Pavlovsky A. Chromatographic behaviour of clotting factors. *Br. J. Haematol*. 1982. 50. P. 655–672.
82. Castaman G., Federici A.B., Rodeghiero F., Mannucci P. M Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment *Haematologica*. 2003. 88 (1). P. 94–108.
83. Cheng E. Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography. *J. Blood Disord Transfus*. 2016. 7:4 (Suppl). P. 82.
84. Clonis Y. D. Affinity separation: dye–ligands. Encyclopedia of separation science. *Academic Press Ltd, London*. 2000. P. 259–265.
85. Clonis Y. D. Dye Ligands. Affinity separation. 2000. P. 259–265.
86. Collins Y. D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal*. 1997. 72 (1). P. 65–76.

87. Chamani M., Rasi H. M., Panah H. A., Sadeghi A. A. Pseudo-affinity chromatography of rumen microbial cellulase on Sepharose-Cibacron Blue F3GA. *African Journal of Biotechnology*. 2011. 10 (24). P. 4926–4931.
88. Comparison among plasma-derived clotting Factor VIII by using monodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry / A. M. Timperio, F. Gevi, G. Grazzini, S. Vaglio, L. Zolla. *Blood Transfus.* 2010. 8 (3). P. 98–104.
89. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex / J. C. Ngo, M. Huang, D. A. Roth, B. C. Furie, B. Furie. *Structure*. 2008. 16 (4). P. 597–606.
90. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII / L. Lin, Q. Huai, M. Huang, B. Furie, B. C. Furie. *J Mol Biol.* 2007. 17. 371 (3). P. 717–724.
91. Curling J., Bryant C. The plasma fractionation industry: new opportunities to move forward. *Bioprocess Int.* 2005. P. 18–27.
92. Curling J. Mimetic ligand technology improves the performance of your protein purification process. *Biopharm. International*. 2004. 17. №8. P. 1–12.
93. Danese S., Vetrano S., Zhang L. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood*. 2010. 11. 115 (6). P. 1121–1130.
94. Denizli A., Kokturk G., Yavuz H., Pişkin E. Dye-ligand column chromatography: albumin adsorption from aqueous media and human plasma with dye-affinity microbeads *Journal of Applied Polymer Science*. 1999. 74. P. 2803–2810.
95. Denizli A., Pişkin E. Dye-ligand affinity systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001. 30. 49 (1-3). P. 39–416.
96. Denizli A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 2011. 39 (4). P. 315–341.
97. Denizli A. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 2011. 39 (1). P. 1–18.

98. Designer dyes: «biomimetic» ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography / C. R. Lowe, S. J. Burton, N. P. Burton, W. K. Alderton, J. M. Pitts, J. A. Thomas *Trends in Biotechnology* 1992. 10. P. 442–448.
99. Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of factor VIII / B. D. Kelley, M. Tannatt, R. Magnusson, S. Hagelberg, J. Booth. *Biotechnol Bioeng.* 2004. 5. 87(3). P. 400–412.
100. Development of a peptidomimetic ligand for efficient isolation and purification of factor VIII via affinity chromatography / S. Knor, A. V. Khrenov, B. Laufer, E. L. Saenko, C. A. Hauser, H. Kessler *J. Med. Chem.* 2007. 50. (18). P. 4329–4339.
101. Development of a plasma- and albumin-free recombinant von Willebrand factor / P. L. Turecek; A. Mitterer; H. P. Matthiessen, H. Gritsch, K. Varadi et al. *Hemostaseologie.* 2009. 4a. P. 32–38.
102. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma / K. In Seop, Y. W. Choi, Y. Kang, H. M. Sung, J. S. Shin *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. 18 (5). P. 997–1003.
103. Dumas B. T., Watson W. A., Biggs H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 1997. 3. 258 (1). P. 21–30.
104. Efficient factor VIII affinity purification using a small synthetic ligand / S. Knor, A. Khrenov, B. Laufer, A. Benhida, S. C. Grailly et al. *Journal of Thrombos. and Haemost.* 2008. 6 (3). P. 470–477.
105. Erber W. N., Perry D. J. Plasma and plasma products in the treatment of massive haemorrhage. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006. № 19. P. 97–112.
106. Ettingshausen C. E., Kreuz W. Role of von Willebrand factor in immune tolerance induction. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2005. 16. P. 27–31.

107. Factor VIII and fibrinogen recovery in plasma after Theraflex methylene blue-treatment: effect of plasma source and treatment time / A. Rapaille, S. Reichenderg, T. Najdovski, N. Cellier, N. de Valensart, V. Deneys *Blood Transfus.* 2014. 12 (Suppl 1). P. 1–6.
108. Factor VIII products and inhibitor development in severe Hemophilia A / S. C. Gouw, J. G. van der Bom, R. Ljung, C. Escuriola, A. R. Cid et al. *The New England Journal of Medicine.* 2013. 368 (3). P. 231–239.
109. Farrugia A., Cassar J. Plasma-derived medicines: access and usage issues. *Blood Transfus.* 2012. 10 (3). P. 273–278.
110. Farrugia A., Griffin B., Pepper D., Prowse C. Studies on the procurement of coagulation factor VIII: selective precipitation of factor VIII with hydrofobic polymers. *Thromb. Haemostas.* 1984. № 51. P. 338–342.
111. Farrugia A. New therapeutic perspectives in haemophilia. *Blood Transfusion.* 2015. 13 (4). P. 531.
112. Fay P. J. Activation of factor VIII and mechanism of cofactor action. *Blood Reviews.* 2004. 18. P. 1–15.
113. Fay P. J. Factor VIII structure and function. *Int J. Hematol.* 2006. P. 83–103.
114. Fay P.J., Mastri M., Koszelak M. E., Wakabayashi H. Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of  $\alpha 2$  subunit with factor IXa. *J Biol Chem.* 2001. 13. 276 (15). P. 12434–12439.
115. Federici A. B. Highly purified VWF/FVIII concentrates in the treatment and prophylaxis of the von Willebrand disease: the PRO.WILL Study. *Haemophilia.* 2007. 13 (5). P.15–24.
116. Federici A. B. Management of von Willebrand disease with factor VIII/von Willebrand concentrates: results from current studies and surveys. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2005. 16 (S1). P. 17–21.
117. Feldman F., Chandra S., Huang C. Improved safety from plasma derivatives: purification and viral elimination characteristics of Mononine. *Acta Haematol.* 1995. 94. P. 25–34.

118. Franchini M., Mannuccio Mannuci P. The safety of pharmacologic options for the treatment of persons with hemophilia. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2016. 15 (Issue 10). P. 1390–1400.
119. Fuare A., Caron M., Tepenier D. Improved buffer for the chromatographic separation of Factor VIII coagulant. *Journal of Chromatography*. 1983. 257. P. 387–391.
120. Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D., Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio. *J. Bacteriology*. 1997. 179 (17). P. 5282–5287.
121. Gharagozlou S., Sharifian R. A., Khoshnoodi J. Epitope specificity of anti-factor VIII antibodies from inhibitor positive acquired and congenital haemophilia A patients using synthetic peptides spanning A and C domains. *Thromb Haemost*. 2009. 101(5). P. 834–839.
122. Gringeri A. Factor VIII safety: plasma-derived versus recombinant products. *Blood Transfus*. 2011. 9 (4). P. 366–370.
123. Gringeri A. vWF/FVIII concentrates in high-risk immunotolerance: the RESIST study. *Haemophilia*. 2007. 13 (5). P. 73–77.
124. Harrison P., Saundry R. H., Savidge G. F. Chromatography of the VIII/vWF complex on dextran sulphate sepharose. *Thromb Res*. 1988. 50. P. 295–304.
125. Hashimoto N., Morita T., Iwanaga S. A method for systematic purification from bovine plasma of six vitamin K-dependent coagulation factors: Prothrombin, Factor X, Factor IX, Protein S, Protein C, and Protein Z. *J. Biochem*. 1985. 97. P. 1347–1355.
126. Health technology assessment of pathogen reduction technologies applied to plasma for clinical use / A. Cicchetti, A. Berrino, M. Casini, P. Codella, G. Facco, et al. *Blood Transfus*. 2016. 14. P. 287–386.
127. Heimburger N., Karges H. E., Weidmann E. Virus safety of pasteurized factor VIII and factor IX concentrates: study in virgin patients. *Dev Biol Stand*. 1987. 67. P. 303–310.

128. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure / M. L. Liu, B. W. Shen, S. Nakaya, K. P. Pratt, K. Fujikawa, E. W. Davie, B. L. Stoddard, A. R. Thompson. *Blood*. 2000. 1. 96 (3). P. 979–987.
129. Hermans C., Brackmann H., Schinco P., Auerswald G. The case for wider use of recombinant factor VIII concentrates. *Oncology and Hematology* 2012. 83 (Issue 1). P. 11–20.
130. Hill-Eubanks D. C., Lollar P. von Willebrand factor is a cofactor for thrombin-catalyzed cleavage of the factor VIII light chain. *J Biol Chem*. 1990. 15. 265 (29). P. 17854–17858.
131. Hockin M. F., Jones K. C., Everse S. J., Mann K. G. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J. Biol Chem*. 2002. 24. 277 (21). P. 18322–18333.
132. Hosseini K. M., Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. *Iran J Biotech*. 2016. 14 (4). P. 213–220.
133. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells / P. Bhaganna, R. J. Volkers, A. N. Bell, K. Kluge, D. J. Timson, J. W. McGrath, H. J. Ruijssenaars, J. E. Hallsworth. *Microbial Biotechnology*. 2010. 3 (6). P. 701–716.
134. Immunate S/D – A new factor VIII – von-Willebrand factor complex concentrate / P. L. Turecek, W. Schönhofer, T. R. Kreil, A. Weber, K. Váradi, J. Siekmann, L. Pichler et al. 33<sup>rd</sup> *Hemophilia Symposium. Hamburg* 2004. P. 117–134.
135. Impact of different inhibitor reactivities with commercial factor VIII concentrates on thrombin generation / G. L. Salvagno, J. Astermarak, M. Ekman, M. Franchini, G. C. Guidi, G. Lippi, G. Poli, E. Berntorp. *Haemophilia*. 2007. 13. P. 51–56.
136. Improved method for analysis of glycosaminoglycans in glycosaminoglycan/protein mixtures: application in Cohn-Oncley fractions of human plasma /

- F. Cecchi, M. Ruggiero, R. Cappelletti, F. Lanini, S. Vannucchi. *Clin Chim Acta*. 2007. 376 (1-2). P. 142–149.
137. In vitro reactivity of factor VIII inhibitors with von Willebrand factor in different commercial factor VIII concentrates / G. Tagariello, D. Zanotto, P. Radossi, R. Sartori, D. Belvini, R. Salviato. *Am. J. Haematol.* 2007. 82 (6). P. 460–462.
138. Is solvent/detergent plasma better than standard fresh-frozen plasma? A systematic review and an expert consensus document / M. Marietta, M. Franchini, M. L. Bindi, F. Picardi, M. Ruggeri, G. De Silvestro *Blood Transfus.* 2016. 14. P. 277–286.
139. Josic D., Schwinn H., Stadler M., Strancar A. Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 1994. 662. P. 181–190.
140. Kaersgaard P., Barington K. A. Isolation of the factor VIII-von Willebrand factor complex directly from plasma by gel filtration. *J. Chromatogr.* 1998. 715. P. 357–367.
141. Kang L., Zhang Y., Luo J., Su Z. Separation of coagulation factor VIII with high activity using gigaporous anion exchange chromatography. *Chinese journal of chromatography.* 2012. 30 (6). P. 618–623.
142. Kassab A., Yavuz H., Odabasi M., Denizli A. Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide hollow-fiber affinity membranes *J Chromatogr.* 2000. 746 (2). P. 123–132.
143. Koedam J. A., Meijers J. C., Sixma J. J., Bouma B. N. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J. Clin Invest.* 1988. 82 (4). P. 1236–1243.
144. Kusch M., Seitz R., König H. High sensitivity detection of activated factor IX: application to the analysis of different therapeutical factor IX concentrates and prothrombin complexes. *Thromb. Haemost.* 1998. 76. P. 778–783.

145. Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin. Chem.* 1972. Vol.18. № 3. P. 199–202.
146. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227. № 5259. P. 680–685.
147. Labrou N. E. Design and selection of ligands for affinity chromatography. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003. 25. 790 (1–2). P. 67–78.
148. Labrou N. E., Clonis Y. D. Immobilized synthetic dyes in affinity chromatography. *In Theory and Practice of Biochromatography, Vijayalakshimi MA: Taylor & Francis, London.* 2002. P. 335–351.
149. Lack of recombinant factor VIII B-domain induces phospholipid vesicle aggregation: implications for the immunogenicity of factor VIII / K. Grushin, J. Miller, D. Dalm, E. T. Parker, J. E. Healey, P. Lollar, S. Stoilova-McPhie *Haemophilia.* 2014. 20 (5). P. 723–731.
150. Lai J., Hough C., Tarrant J., Lillicrap D. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. *Blood.* 2017. 129. P. 3147–3154.
151. Lange A. M., Altynova A. S., Nguyen N. G., Sabatino D. E. Overexpression of factor VIII after AAV delivery is transiently associated with cellular stress in hemophilia A mice. *Citation: Molecular Therapy –Methods & Clinical Development.* 2016. 3. P. 1–8.
152. Large-scale purification of factor VIII by affinity chromatography: optimization of process parameters / P. W. M. te Booy, A. Faber, E. De Jonge, E. P. Wolterink, W. Riethorst, T. Beugeling, A. B. J. Over, B. W. König. *J Chromatogr.* 1990. 9; 503 (1). P. 103–114.
153. Larsson P.-O. High-performance liquid affinity chromatography. *Meth. Enzym.* 1984. 104. P. 213–223.
154. Lee C. A., Berntorp E. E., Hoots W. K. Textbook of hemophilia. Second edition. *A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.* 2010. 464 p.

155. Lihme A., Hansen M. B., Andersen I. V., Burnouf T. A novel core fractionation process of human plasma by expanded bed adsorption chromatography. *Anal Biochem.* 2010. 1. 399 (1). P. 102–109.
156. Lollar P., Knutson G. J., Fass D. N. Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry.* 1985. 31. 24 (27). P. 8056–8064.
157. Lozier J. N., Nicholas T. C. Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin Hematol.* 2013. 50 (2). P. 175–184.
158. Lundblad R. L. Biotechnology of Plasma Proteins. *Biotechnology of plasma proteins.* Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group. 2013. P. 441–446.
159. Mannucci P. M. Drug therapy: treatment of von Willebrand disease. *N. Engl. J. Med.* 2004. 351 (7). P. 683–694.
160. Mannucci P. M. Clinical evaluation of viral safety of coagulation factor VIII and IX concentrates. *Vox Sang.* 1993. 64 (4). P. 197–203.
161. Mannucci P. M., Franchini M. Porcine recombinant factor VIII: an additional weapon to handle anti-factor VIII antibodies. *Blood Transfusion.* 2017. 15. P. 365–368.
162. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein / J. McCue, R. Kshirsagar, K. Selvitelli, Q. Lu, M. Zhang, B. Mei, R. Peters, G. F. Pierce. *Biologicals.* 2015. 43. P. 213–219.
163. Mazurkiewicz-Pisarek A., Płucienniczak G., Ciach T., Płucienniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biologica polonoca.* 2016. 63 (1). P. 11–16.
164. McEneny-King A., Iorio A., Foster G., Edginton A. E. The use of pharmacokinetics in dose individualization of factor VIII in the treatment of hemophilia A. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2016. 12 (11). P. 1313–1321.
165. Methods for samples preparation in proteomic research / A. Bodzon-Kulakowska, A. Bierczynska-Krzysika, T. Dylag, A. Drabik, P. Suder, M. Noga, J. Jarzebinska, J. Silberring. *Journal of Chromatography.* 2007. 849. P. 1–31.

166. Millner R. W., Lockhart A. S., Bird H., Alexiou C. A new hemostatic agent: initial life-saving experience with Celox(chitosan) in cardiothoracic surgery *Ann Thorac Surg.* 2009 87 (2). P. 13–14.
167. Molecular design and downstream processing of turoctocog alfa (NovoEight), a B-domain truncated factor VIII molecule / H. Ahmadian, E. B. Hansen, J. H. Faber, L. Sejergaard, J. Karlsson, G. Bolt, J. J. Hansen, L. Thim. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 2016. 27 (5). P. 568–575.
168. Morfini M., Coppola A., Franchini M., Di Minno G. Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates. *Blood Transfus.* 2013. 11 (S.4). P. 55–63.
169. Morfini M. The history of clotting factor concentrates pharmacokinetics. *J. Clin. Med.* 2017. 6 (35). P. 1–14.
170. Mutation screening of the factor VIII gene in hemophilia A in Saudi Arabia: two novel mutations and genotype-phenotype correlation / F. A. Al-Allaf, M. M. Taher, Z. Abduljaleel, M. Athar, F. A. Ba-hammam, M. Abdulla, A. Bouazzaou, H. Abalkhail, T. Owaidah. *J. Mol Genet Med.* 2016. 10 (2). P. 1–11.
171. Nasiri S., Rezvan H., Mousavi K., Roostaei M. H. Preparation of highly purified solvent-detergent coagulation factor VII and factor IX concentrates from prothrombin complex (PPSB). *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran.* 2001. 15 (2). P. 103–108.
172. Newell J. L., Fay P. J. Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *Biochemistry.* 2008. 47 (33). P. 8786–8795.
173. Ng P. K., Eguizabal H. C., Mitra G. Preparation of high purity factor VIII concentrates. *Thrombosis Res.* 1986. 42. P. 825–834.
174. Nogami K., Lapan K. A., Zhou Q. Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337–372 of the factor VIII heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004. 279. P. 15763–15771.

175. Nogami K., Shima M., Nishiya K. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood*. 2002. 1; 99 (11). P. 3993–3998.
176. Nogami K., Wakabayashi H., Schmidt K., Fay P. Altered interactions between the A1 and A2 subunits of factor VIIIa following cleavage of A1 subunit by factor Xa. *J. Biol Chem.* 2003. 17. 278 (3). P. 1634–1641.
177. Ofori F. A., Freedman J., Semple J. W. Plasma-derived biological medicines used to promote haemostasis. *Thromb Haemost.* 2008. 99 (5). P. 851–862.
178. Oldenburg J., Lacroix-Desmazes S., Lillicrap D. Alloantibodies to therapeutic factor VIII in hemophilia A: the role of von Willebrand factor in regulating factor VIII immunogenicity. *Hematologica*. 2015. 100 (2). P. 149–156.
179. Orlova N. A., Kovnir S. V., Gabibov A. G., Vorobiev I. I. Stable high-level expression of factor VIII in Chinese hamster ovary cells in improved elongation factor-1 alpha-based system. *BMC Biotechnology*. 2017. 17 (33). P. 1–15.
180. Pat. 5484890 US Antihemophilic factor stabilization / Johnson A. J., Fulton A. J. – Appl. 08/138,481; Filed 15.10.1993; Publ 16.01.1996.
181. Pat. US 5278289 A Antihemophilic factor stabilization / Johnson A. J., Fulton A. J. / BiBTeX, EndNote, RefMan. – Appl. 07/790,390; Filed 12.11.1991; Publ 11.01.1994.
182. Pat. WO 2015107222 A1 A process for manufacturing factor VIII having an improved ratio of FVIII:C/FVIII:Ag / Winge S., Dadaian M., Johanson E., Fuchs B. – Appl. PCT/EP2015/051028; Filed 20.01.2014; Publ. 23.07.2015.
183. Pat. US 4546161 A Media for affinity chromatography / Harvey M. J., Atkinson A. / The Secretary Of State For Defence In Her Britannic Majesty's Government Of The United Kingdom Of Great Britain And Northern Ireland – Appl. 06/545,546; Filed 26.10.1983; Publ. 208.10.1985.
184. Pat. US 6605222 B1 Method for producing a factor VIII/von Willebrand factor complex / Linnau Y., Schoenhofer W. Baxter Aktiengesellschaft. – Appl. 09/623,245; Filed 25.02.1999; Publ 12.08.2003.

185. Pat. US 5371195 A Method for purifying factor VIII and preparations obtained // Grandgeorge M., Lutsch C. Pasteur Merieux. – Appl. 07/948,395; Fild 23.09.1992; Publ 06.12.1994.
186. Pat. 4743680 US Method for purifying antihemophilic factor / Mathews R. W., Johnson A. J. / New York University. – Appl. 06/697,267; Fild 01.02.1985; Publ 10.05.1988.
187. Pat. EP 0367840 A1 Process for producing by chromatography a non-infectious antihemophilic factor with high purity / Smith A. Octapharma AG. – Appl. EP 19880118478; Fild 05.11.1988; Publ 16.05.1990.
188. Pat. EP 0343275 A1 Process for the production of a high purity, virus-free antihaemophilic factor by means of chromatography / Smith A., De Burnouf M. C. Centre Regional De Transfusion Sanguine De Life. – Appl. EP 19880108458; Fild 27.05.1988; Publ 29.11.1989.
189. Pat. WO2009030866, C07K 1/ 18(2006.01), C07K 14/55(2006.01) Method for purifying the factor VIII and yhe von Willebrand factor / Poulle M., Bonneel P. LFB-Biotechnologies [FR/FR] – Appl. WO/2009/030866; Fild 28.08.2008; Publ 12.03.2009.
190. Pat. WO 1986005190 A1 Purification of blood coagulation factor VIII by precipitation / W. Lowell. Central Blood Laboratories Authority – Appl. PCT/GB1986/000121; Fild 07.09.1985; Publ 12.09.1986.
191. Pat. 0131740 A2 US, A61K 39/00, 35/14, 37/00, C07G 7/00, C07C 103/52. Undenaturated virus-free biologically active protein derivatives / Neurath A.R., Horowitz B. – Appl. 9840106557; Fild. 08.06.1984; Publ. 23.01.1985.
192. Pharmacokinetics and ex vivo whole blood clot formation of a new recombinant FVIII (N8) in haemophilia A dogs / D. M. Karpf, M. Kjalke, L. Thim, H. Agero, E. P.Merricks, N. Defriess, T. C. Nichols, M. Ezban. *Haemophilia*. 2011. 17. P. 963–968.
193. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of recombinant canine FVIIa in a study dosing one haemophilia A and one haemostatically normal dog /

- T. Knudsen, A. T. Kristensen, T. C. Nichols, H. Agerso, A. L. Jensen, M. Kjalke, M. Ezban, M. Tranholm. *Haemophilia*. 2011. 17. P. 962–970.
194. Preparation of cryoprecipitate from riboflavin and UV light-treated plasma / A. Ettinger, M. M. Miklauz, D. J. Bihm, G. Maldonado-Codina, R. P. Goodrich. *Transfus Apher Sci*. 2012. 46 (2). P. 153–158.
195. Production and purification of rabbit's polyclonal antibody against factor VIII S. Sohrabi, A. Akbarzadeh, D. Norouzian, A. Farhangi, M. Mortazavi, M. R. Mehrabi, M. Chiani, Z. Saffari, S. Ghassemi. *Indian J Clin Biochem*. 2011. 26 (4). P. 354–359.
196. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using ion-exchange chromatography / F. Mori, I. Nardini, P. Rossi, C. Nardini, C. Farina. *Vox Sang*. 2008. 95. P. 298–307.
197. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8) / L. Thim, B. Vandahl, J. Karlsson, N. K. Klausen, J. Pedersen, T. N. Krogh, M. Kjalke, J. M. Petersen et al. *Haemophilia*. 2010. 16. P. 349–359.
198. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography / E. S. Rodrigues, C. L. Verinaud, D. S. Oliveira, I. Raw, A. P. Lopes, E. A. Martins, E. Cheng *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2014. 62 (3). P. 343–348.
199. Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins / E. Cheng, D. Jinzenji, A. P. Lorthiois, R. R. Carvalho, A. M. Tanaka-Azevedo, E. A. Martins. *Biotechnol Lett*. 2010. 32. P. 1207–1214.
200. Purification of porcine plasma factor VIII using chromatographic methods / A. M. Tanaka, A. S. Tanaka, A. P. Lopes, R. R. de Carvalho, A. M. Tanaka-Azevedo, I. Raw, E. A. Martins. *Biotechnol Lett*. 2000. 22. P. 257–260.
201. Purification of recombinant human B-domain-deleted factor VIII using anti-factor VIII monoclonal antibody selected by the surface plasmon resonance biosensor // H. K. Oh, J. M. Lee, T. H. Byun, S. Y. Park, Y. H. Kim. *Biotechnol Prog*. 2001. 17 (6). P. 1119–1127.

202. Radosevich M., Burnouf T. Affinity chromatography – fractionated and DNA-engineered plasma proteins. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. 2009. P. 1–12.
203. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review / A. Iorio, S. Halimeh, S. Holzhauser, N. Goldenberg, E. Marchesini, M. Marcucci et al. *J Thromb Haemost*. 2010. 8 (6). P. 1256–1265.
204. Read S. M., Northcote D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G Dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem*. 1981. 116. № 1. P. 53–64.
205. Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A / K. Nord, O. Nord, M. Uhle, B. Kelley, C. Ljungqvist, P. A. Nygren *Eur. J. Biochem*. 2001. 268. P. 4269–4277.
206. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study / S. C. Gouw, J. G. Van der Bom, A. G. Ettinghausen, C. E. Ettinghausen, U. Tedgård, H. M. van den Berg. *Blood*. 2007. 109 (11). P. 4693–4697.
207. Robert P. Worldwide supply and demand of plasma and plasma derived medicines. *J. Blood and Cancer*. 2011. 3. P. 111–120.
208. Robertson B. H., Erdman D. D. Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products. *Dev. Biol. Stand.* 2000. 102. P. 29–35.
209. Roberts P. L., Lloyd D., Marshall P. J. Virus inactivation in a factor VIII/VWF concentrate treated using a solvent/detergent procedure based on polysorbate 20. *Biologicals*. 2009. 37 (1). P. 26–31.
210. Roberts P. L., Lloyd D. Virus inactivation by protein denaturants used in affinity chromatography. *Biologicals*. 2007. 35 (4). P. 343–347.

211. Roberts P. L. Virus elimination during the recycling of chromatographic columns used during the manufacture of coagulation. *Biologicals*. 2014. 42 (4). P. 184–190.
212. Roberts P. L. Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII. *Biologicals*. 2008. 36 (5). P. 330–335.
213. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle / M. Molinari, V. Calanca, C. Galli, P. Lucca, P. Paganetti. *Science*. 2003. 299. № 5611. P. 1397–1400.
214. Ro Sen S., Chiarion M. C. Chromogenic determination of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates. *Chromogenix – monograph series*. 2000. 34 p.
215. Rotblat F., O'Brien D. P., O'Brien F. J. Purification of human factor VIII:C and its characterization by Western blotting using monoclonal antibodies. *Biochemistry*. 1985. 24. P. 4294–4300.
216. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. *J. Drug Design, Development and Therapy*. 2014. 8. P. 2507–2515.
217. Scups K. P. Current protocol in protein *Science*. 1995. 3800 p.
218. Separation of the antibodies of serum and plasma proteins. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids / E. J. Cohn, E. L. Strong, W. L. Hughes et al.] *J. Am Chem Soc*. 1946. 72. P. 459–475.
219. Sereikaite J., Bumelis V.-A. Interaction of serum albumin with vinyl sulfonate azo dye. *Cent. Eur. J. Chem*. 2008. 6 (4). P. 509–512.
220. Shavit J. A., Manichaikul A., Lemmerhirt H. L. Modifiers of von Willebrand factor identified by natural variation in inbred strains of mice. *Blood*. 2009. 114 (26). P. 5368–5374.
221. Shurko N., Danysh T. A rapid purification of coagulation factor VIII from a cryoprecipitate. *Clin Chem Lab Med*. 2009. Vol. 47. P. 227–228.

222. Shurko N., Danysh T., Danysh O. Effect of thiocyanate on the activity of blood coagulation factor VIII. *Haematologica. Abstract book*. 2016. Vol. 101 (s1). P. 878.
223. Shurko N. O., Danysh T. V. Negative affinity chromatography as the method purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med*. 2014. Vol. 52. P. 914.
224. Shurko N., Danysh T., Novak V. Affinity chromatography with dye – new method for the purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med*. 55. Special Suppl. 2017. P. 731.
225. Shurko N., Danysh T., Novak V. The new method of purification factor coagulation VIII. *Haematologica. Abstract book*. 2017. Vol. 102 (s1). P. 881–882.
226. Shurko N., Novak V., Danysh T., Voytsitskyy J. La cromatografia di affinità con treazine-colorante come il metodo purificazione del fattore VIII. *Blood Transfusion*. 2017. 15, Suppl. № 1. P. 75–76.
227. Shurko N., Danysh T. Presence of factor VIII in blood Cohn fractions and his purification. *Vox Sanguinis*. 2008. Vol. 95, Suppl. 1. P. 237.
228. Shurko N., Danysh T. Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation. *International Journal of laboratory Hematology*. 2017. Vol. 39 (Issue S2). P. 109.
229. Shurko N., Danysh T. The method of purification blood coagulation factor VIII. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016. Vol. 38 (S2). P. 97–98.
230. Shurko N. O., Danysh T. V. The purification of factor VIII by the method of negative affinity chromatography. *Book Abstract Bari International Conference*. 2014. P. 34.
231. Shurko N., Danysh T., Vroniak M., Novak V. The advantages of using PEG-precipitation in the isolation and purification of factor coagulation VIII. *Blood Transfusion*. 2017. Vol. 15. Suppl. № 3. P. 492.
232. Shurko N., Novak V., Danysh T. The basis of viral safety of transfusion medicine: screening of donor blood and methods of virus inactivation. *20<sup>th</sup> Annual*

- Meeting of the ESCV. (Lago Maggiore, Italy, 13–16 September, 2017). Abstract book.* 2017. P. 177.
233. Single-use technology for solvent/detergent virus inactivation of industrial plasma products / Y. T. Hsieh, L. Mullin, P. Greenhalgh, M. Cunningham, E. Goodrich, J. Shea, E. Youssef, T. Burnouf. *Transfusion.* 2016. 56. P. 1384–1393.
234. Sparrow R. L., Greening D. W., Simpson R. J. A Protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted Plasma. *Methods Mol Biol.* 2011. № 728. P. 259–265.
235. Te Booy M. P., Riethorst W., Faber A. Affinity purification of plasma proteins: characterization of six affinity matrices and their application for the isolation of human factor VIII. *Thromb Haemost.* 1989. 61. P. 234–237.
236. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells / B. Gangadharan, M. Ing, S. Dellignat, I. Peyron, M. Teyssandier, S. V. Kaveri, S. Lacroix-Desmazes. *Haematologica.* 2017. 102 (2). P. 271–281.
237. The CDC hemophilia A mutation project (CHAMP) mutation list: a new online resource / A. B. Payne, C. H. Miller, F. M. Kelly, S. J. Michael, H. W. Craig. *Hum. Mutat.* 2013. 34. № 2. P. 2382–2391.
238. The demand for factor VIII and for factor IX and the toll fractionation product surplus management / G. Calizzani, S. Profili, F. Candura, M. Lanzoni, S. Vaglio, L. Cannata, G. M. Liunbruno, M. Franchini. *Blood Transfus.* 2013. 11 (S4). P. 64–76.
239. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors Organization / M. Laffan, S. A. Brown, P. W. Collins, A. M. Cumming, F. G. Hill, D. Keeling, I. R. Peake, K. J. Pasi. *Haemophilia.* 2004. 10. P. 199–217.
240. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa / J. A. Koedam, R. J. Hamer, N. H. Beeser-Visser, B. N. Bouma, J. J. Sixma. *Eur. J Biochem.* 1990. 30. 189 (2). P. 229–234.

241. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics / E. Casademunt, K. Martinelle, M. Jernberg, S. Winge, M. Tiemeyer, L. Biesert, S. Knaub, O. Walter, C. Schröder. *Eur J Haematol*. 2012. 89 (2). P. 165–176.
242. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability / B. Verbruggen, I. Novakova, H. Wessels, J. Boezeman, M. van den Berg, E. Mauser-Bunschoten *Thrombosis and Haemostasis*. 1995. 73. P. 247–251.
243. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII / B. W. Shen, P. C. Spiegel, C-H. Chang, J. W. Huh, J. S. Lee, J. Kim, Y. H. Kim, B. L. Stoddard. *Blood*. 2008. 111 (3). P. 1240–1247.
244. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent / S. B. Prusiner, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. P. Cochran, K. A. Bowman, K. C. Kasper. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981. 78 (7). P. 4606–4610.
245. Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *International Society for Laboratory Hematology*. 2016. 38 (S1). P. 66–77.
246. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand factor / J. E. Sadler, U. Budde, J. C. Eijkenboom, E. J.Favaloro, F. G. Hill, L. Holmberg, J. Ingerslev, C. A. Lee et al. *J. Thromb. Haemost*. 2006. 4 (10). P. 2103–2114.
247. Vehar G. A., Davie E. W. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry*. 1980. 19 (3). P. 401–410.
248. Vermynen J., Peerlinck K. Review of the hepatitis A epidemics in hemophiliacs in Europe. *Vox Sang*. 1994. Vol. 67 (4). P. 8–11.
249. Von Willebrand diseases: Basic and clinical aspect / A. D. Federici, C. A. Lee Ma, E. E. Berntop, D. Lillicrap, R. R. Montgomery. by *Blacwell Publishing Ltd*. 2011. 128 p.
250. Wakabayashi H., Koszelak M. E., Mastri M., Fay P. J. Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry*. 2001. 28, 40 (34). P. 10293–10300.

251. Wongchuphana R., Ti Teyb B., Siang W. Tanc Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. *Biochemical Engineering Journal*. 2009. 45. P. 232–238.
252. Wynn T. T., Gumuscu B. Potential role of a new PEGylated recombinant factor VIII for hemophilia A. *Journal of Blood Medicine*. 2016. 7. P. 121–128.
253. Zhang B., Ginsburg D. Familial multiple coagulation factor deficiencies. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2013. Sixth Edition, (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins). P. 709–714.
254. Zwick Y. The Octanate ITI experience in patients with poor ITI prognosis. *Thromb. Haemost.* 2007. Spec. Issue. P. 13–15.



49

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 107509

СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФАКТОРА VІІІ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зарєєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.06.2016.

В.о. Голови Державної служби  
інтелектуальної власності України

А.А.Малиш



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
Український центр наукової медичної інформації  
та патентно-ліцензійної роботи  
(Укрмедпатентінформ)

## ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СИСТЕМІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№ 2 – 2010

Випуск 1 з проблеми  
«Гематологія та трансфузіологія»  
Підстава: Рішення ПК  
«Гематологія та трансфузіологія»  
Протокол №4 від 18.11.2009 р.

ГОЛОВНОМУ ГЕМАТОЛОГУ  
МОЗ АР КРИМ, УПРАВЛІННЯ ОХОРОНИ  
ЗДОРОВ'Я ОБЛАСНИХ, СЕВАСТОПОЛЬСЬКОЇ  
ТА КИЇВСЬКОЇ МІСЬКИХ ДЕРЖАВНИХ  
АДМІНІСТРАЦІЙ

### СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ ФАКТОРА VIII ЗГОРТАННЯ КРОВІ

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

ДУ «ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА  
ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ»

УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ  
МОЗ УКРАЇНИ

А В Т О Р И:

ШУРКО Н.О.,  
ДАНИШ Т.В.,  
НОВАК В.Л.,  
ВОРОНЯК М.І.,  
ВУС М.М.,  
МАДИЧ С.С.,  
ДУЛЬЦЕВА Н.А.,  
ОРЛОВА Л.В.

м. Київ



«Затверджую»

Директор Інституту біології клітини  
НАН України  
д.б.н. Зден-кор. А.А.Сибірний

«10» 12 2010 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Набір макропористих кремнеземних сорбентів з лігандами – тріазиновими барвниками для афінної хроматографії білків.
2. ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України», 79044, м.Львів, вул. Генерала Чупринки,45. Даниш Т.В., Вороняк М. І., Шурко Н.О., Вус М.М., Орлова Л.В., Мадич С.С., Дульцева Н.А.
3. Джерело інформації публікація – *Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами – активними барвниками тріазинового ряду / Т. Даниш, М. Вороняк, Н. Дульцева,* інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п. *Н. Шурко / Вісник Львівськ. Ун-ту, Серія біологічна. – 2008. – Вип.47. – С. 63-69.*
4. Впроваджено в відділі аналітичної біотехнології ІБК НАНУ, м.Львів  
найменування лікувально-профілактичної о закладу
5. Термін впровадження III квартал 2010 р.
6. Загальна кількість спостережень 45
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації

Основні показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
	Механічна стійкість	відповідає
	Стійкість до дії хімічних речовин та стерилізації	відповідає
	Стійкість до дії мікро-організмів	відповідає
Ємність по сироватковому альбуміну людини	15 мг/мл	• 15,2 мг/мл

8. Зауваження, пропозиції

Відповідальний за впровадження

«10» 12 2010 р.

К.х.н., ст.н.с. Гайда Г.З.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Застосування тіоціанатів для антивірусної обробки в технологіях одержання білкових факторів плазми крові

найменування пропозиції для впровадження

2. ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
79044, м. Львів, вул. Генерала Чупринки, 45

Даниш Т.В., Дульцева Н.А., Мадич С.Є., Шурко Н.О.

установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я по батькові авторів

3. Джерело інформації: Даниш Т.В. ЗАСТОСУВАННЯ ПОДВІЙНОЇ ХІМІЧНОЇ ІНАКТИВАЦІЇ ВІРУСІВ У ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ БІЛКОВИХ ПРЕПАРАТІВ КРОВІ. // III Міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України», м. Київ, ВЦ «КиївЕкспоПлаза», 14-16 жовтня 2014.- С.. 60.

4. Впроваджено в Військово-медичний клінічний центр Західного регіону

найменування лікувально-профілактичної о закладу

5. Термін впровадження III кв. 2014 р.

6. Загальна кількість спостережень 15

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Час інактивації	60± 5 хв	60 хв.
Активність фактора згортання VIII після вірусної інактивації	80-100%	92 %
Активність фактора згортання IX після вірусної інактивації	80-100%	94 %

Відповідальний за впровадження

Зав. біохімічної лабораторії

(підпис)

Пакиш Б.В.

(прізвище, І.П.)

«\_03\_» листопада 2014 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб фракціонування плазми крові

найменування пропозиції для впровадження

2. ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
79044, м.Львів, вул. Генерала Чупринки,45Львівський обласний центр служби крові  
79044, м.Львів, вул. Пекарська,65Шурко Н.О., Даниш Т.В., Дульцева Н.А., Корецька Н.Р.

установа, що розробила. її поштова адреса, прізвище, ім'я. по батькові авторів

3. Джерело інформації: Фракціонування плазми крові: основні тенденції –  
Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення»  
Київ, 7-8 листопада 2014-С.86-88.4. Впроваджено у відділенні заготівлі крові та її компонентів Львівського обласного  
центру служби крові

найменування лікувально-профілактичної о закладу

5. Термін впровадження II-IV кв. 2014 р.6. Загальна кількість спостережень 17

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації за активністю факторів згортання крові

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Сумарна активність по фактору VIII в кінцевому продукті	80±10 %	82 %
Сумарна активність по фактору IX в кінцевому продукті	85±10 %	84 %

Відповідальний за впровадження

Зав.відділенням заготівлі крові та її компонентів

Корецька Н.Р.

(прізвище, І.П.)

« 12 » грудня 2014 р.



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

#### 1. Технологія отримання вірусбезпечного препарату фактора VIII зсідання крові

найменування пропозиції для впровадження

2. ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
79044, м.Львів, вул. Генерала Чупринки, 45

Львівський обласний центр служби крові  
79044, м.Львів, вул. Пекарська, 65

Шурко Н.О., Даниш Т.В., Дульцева Н.А., Мадич С.Є., Дяків Я.М., Корецька Н.Р.  
 установа, що розробила її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів

3. Джерела інформації: Метод отримання фактора VIII з плазми крові — IV міжнародний медичний конгрес «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України», Київ, ВІ «КиївЕкспоПлаза», 15-17 квітня, 2015. С.75.

Технологія отримання вірусбезпечного препарату фактора VIII згортання крові — III Міжнародний конгрес з інфузійної терапії, Київ, 6-7 жовтня, 2016. С. 143-144.

4. Впроваджено у відділенні заготівлі крові та її компонентів Львівського обласного центру служби крові

найменування лікувально-профілактичної о закладу

5. Термін впровадження II-IV кв. 2016 р.

6. Загальна кількість спостережень 32

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації за активністю факторів згортання крові

Показники	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила
Питома активність по фактору VIII в кінцевому продукті, МО/мг білка	10,0±0,5 %	10,2±0,6 %

Відповідальний за впровадження

Зав.відділенням заготівлі крові та її компонентів

«3» грудня 2016 р.

Корецька Н.Р.  
(прізвище, і.П.)

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

## Статті у наукових фахових виданнях України

1. Даниш Т. В., **Шурко Н. О.**, Вороняк М. І., Вус М. М. Альтернативні шляхи одержання препаратів фактора VIII згортання крові. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2008. Т.ІІ, вип. 34. С. 87–92. *(Здобувач брала участь у визначенні активності FVIII у субфракціях плазми крові та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).*
2. Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., **Шурко Н. О.** Синтез кремнеземних сорбентів з лігандами – активними барвниками тріазинового ряду. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2008. Вип. 47. С. 63–69. *(Здобувач провела літературний пошук, синтез сорбентів, підготувала статтю до друку).*
3. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Одноетапний спосіб очищення фактора VIII методом негативної афінної хроматографії з препарату «Кріопреципітат». *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н. 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 207–209. *(Здобувач проаналізувала літературу, провела визначення активності FVIII, підготувала статтю до друку).*
4. Застосування сольвент-детергентного методу інактивації вірусів при одержанні препаратів з плазми крові / М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, Л. В. Орлова, **Н. О. Шурко.** *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: Атіка-Н, 2009. Т.ІІ, випуск 34. С. 166–170. *(Здобувач провела фракціонування плазми крові, узагальнила отримані дані, підготувала статтю до друку).*
5. Дослідження впливу вірус-інактивууючих агентів на кількісний вміст та активність факторів згортання крові / **Н. О. Шурко**, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 365–369. *(Здобувач*

виконала експериментальні дослідження впливу вірус-інактивуючих речовин на активність FVIII, підготувала статтю до друку).

6. Використання синергічного ефекту вірус-інактивуючих агентів у сучасних технологіях одержання факторів згортання крові та фібринолізу / В. Л. Новак, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2014. Вип. 37. С. 312–316. (Здобувач провела літературний пошук, підготовлено статтю до друку).
7. **Шурко Н. О.** Фракціонування плазми крові: класичні та хроматографічні методи отримання фактора VIII згортання крові. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2016. Вип. 73. С. 347–351.
8. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Дослідження зв'язування фактора VIII зсідання крові з кремнеземними сорбентами різної пористості. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 23–28. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізі результатів, підготувала статтю до друку).
9. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л. Фактор VIII зсідання крові: будова молекули та застосування. *Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. С. 184–192. (Здобувач брала участь у пошуку та аналізі літературних джерел, підготувала статтю до друку).
10. **Шурко Н. О.** Новий метод отримання комплексу факторів VIII-фон Віллебранда. *Гематологія і переливання крові: міжвід. зб.* К.: МПБП «Гордон». 2017. Вип. 39. С. 229–236.

**Статті у фахових виданнях України, включених до  
міжнародних наукометричних баз даних**

11. **Шурко Н. О.**, Вороняк М. І., Даниш Т. В. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання. *Біологічні студії.* 2014. Т. 8, № 1.

- С. 197–204. *(Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).*
12. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Створення технології отримання фактора VIII зсідання крові з використанням методу афінної хроматографії на кремнеземних сорбентах. *Біологія тварин*. 2016. Т. 18, № 2. С. 152–159. *(Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала статтю до друку).*
13. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Вороняк М. І. Застосування барвник-лігандної хроматографії для очищення фактора VIII зсідання крові. *Біологічні студії*. 2017. Т.11, № 1. С. 67–74. *(Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з синтезованими сорбентами, брала участь в аналізі результатів, підготувала статтю до друку).*

#### Статті в інших журналах України

14. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Негативна афінна хроматографія як спосіб отримання фактора VIII з плазми крові людини. *Медичний форум*. 2015. 4 (04). С. 95–97. *(Здобувач дослідила сорбцію/десорбцію FVIII з відібраними сорбентами, провела аналіз результатів, підготувала статтю до друку).*
15. Терапевтичні препарати факторів зсідання крові в Україні / О. Й. Даниш, Н. А. Дульцева, С. Є. Мадич, **Н. О. Шурко**, Т.В. Даниш. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 51–56. *(Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).*
16. Сучасні тенденції у фракціонуванні плазми крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак, Ю. В. Войціцький, Л. Є. Лаповець. *Медичний форум*. 2017. 10 (10). С. 140–144. *(Здобувач провела літературний пошук, підготувала статтю до друку).*

## Патенти на винахід та корисні моделі

17. Патент України на винахід № 94299 Спосіб очищення фактора VIII / **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – від 26.04.2011 р., Бюлетень № 8. (*Здобувач дослідила сорбцію FVIII зі сорбентами, брала участь в оформленні патенту на винахід*).
18. Патент України на корисну модель 107509 UA, C07K 1/22, C07K 14/755, B01D 15/18. Спосіб виділення фактора VIII згортання крові/ **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Новак В. Л.; власник ДУ ІПКТМ НАМН України – № u201512302; заявл. 11.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. № 11. (*Здобувач брала участь у розробці технологічної схеми одержання FVIII, в оформленні патенту на корисну модель*).

## Інформаційний лист

19. Спосіб очищення фактора VIII згортання крові / **Н. О. Шурко**, Т. В. Даниш, В. Л. Новак., М. І. Вороняк, М. М. Вус, С. Є. Мадич, Н. А. Дульцева, Л. В. Орлова. *Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я*. К.: «Укрмедпатентінформ». 2010. №2. (*Здобувач дослідила можливість впровадження додаткового етапу очищення препарату «Кріопреципітат», підготувала матеріали до друку*).

## Тези наукових доповідей

20. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Одержання фактора VIII згортання крові – основні тенденції. *Укр. хім. журн.* 2008. № 1-2. (м. Черкаси, 2–3 жовт., 2008). (*Здобувач провела літературний пошук, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку*).
21. **Shurko N.**, Danysh T. Presence of factor VIII in blood Cohn fractions and his purification. *Vox Sanguinis*. 2008. Vol. 95. Suppl. 1. P. 237. (*Macao, Kuntay. 7–*

- 8 черв., 2008). (Здобувач провела дослідження активності FVIII на різних етапах фракціонування плазми, підготувала тези до друку).
22. Застосування діасорбу амінопропілового для одержання високоочищених білкових препаратів з плазми крові / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, М. М. Вус, Н. А. Дульцева, **Н. О. Шурко**, Л. В. Орлова, С. Є. Мадич. *Тези доп. міжнар. наук.-практ. конф. «Проблеми та перспективи методичних підходів до аналізу стану здоров'я».* (м. Луганськ, 26–27 берез., 2009 р.). С. 24–25. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
23. **Shurko N.**, Danysh T. A rapid purification of coagulation factor VIII from a cryoprecipitate. *Clin Chem Lab Med.* 2009. Vol. 47. P. 227–228. (Innsbruck, Австрія, 7–11 черв., 2009). (Здобувач провела дослідження, підготувала тези до друку).
24. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Створення технології виділення та очищення фактора VIII згортання крові з використанням біоімітуючих кремнеземних сорбентів. *Матеріали ювілейної наук.-практ. конф. «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини».* (м. Львів, 27–28 трав., 2010 р.). С. 187–188. (Здобувач узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
25. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Вірусна безпека препаратів фактора згортання крові VIII. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Сучасні аспекти донорства, забезпечення вірусної безпеки компонентів і препаратів донорської крові в Україні», присвяченої 80-річчю служби крові Криму.* (АР Крим, м. Алушта, 23–24 трав., 2013 р.). С. 59–60. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези).
26. **Shurko N. O.**, Danysh T. V. Negative affinity chromatography as the method purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med.* 2014. Vol. 52. P. 914. (Istanbul, Туреччина, 22–25 черв., 2014). (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
27. **Shurko N. O.**, Danysh T. V. The purification of factor VIII by the method of negative affinity chromatography. *Book Abstract Bari International Conference.*

2014. Р. 34. (*Bari, Італія, 3–5 жовт., 2014*). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стендову доповідь).
28. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В., Корецька Н. Р. Фракціонування плазми крові: основні тенденції. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф «Охорона здоров'я людини в умовах сьогодення»*. (м. Київ, 7–8 листоп., 2014 р.). С. 86–88. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
29. **Шурко Н. О.**, Орлова Л. В., Даниш Т. В. Вірусна безпека антигемофільних препаратів. *Зб. матеріалів міжнар. наук.-практ. конф. «Нове у медицині сучасного світу»*. (м. Львів, 28–29 листоп., 2014 р.). С. 110–113. (Здобувач провела літературний пошук, підготувала тези до друку).
30. **Шурко Н. О.** Методи отримання плазмових препаратів фактора VIII. *Тези доп. X Ювілейної південноукр. наук.-практ. конф. «Вища школа в рішенні проблем внутрішньої медицини»*, присвяченої 115–річчю Одеськ. нац. мед. ун-ту. (м. Одеса, 9 квіт., 2015 р.). С. 140–141.
31. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Розробка методики визначення концентрації тіоціанату амонію у біологічних рідинах. *Тези доп. IV міжнар. мед. конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України»*. (м. Київ, 15–17 квіт., 2015 р.). С. 75. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
32. **Шурко Н. О.**, Дульцева Н. А., Даниш Т. В. Застосування вірусних інактиваторів в процесі технології одержання факторів згортання крові та фібринолізу. *Зб. тез наук. праць «Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках»*. (м. Київ, 4–5 груд., 2015 р.). С. 96–99. (Здобувач досліджувала вплив вірус-інактивуючих речовин на активність факторів зсідання крові, підготувала тези до друку).
33. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Афінна хроматографія фактора VIII зсідання крові з використанням тріазинових барвників в якості лігандів. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія:*

- новітні тенденції розвитку» (м. Київ, 21 квіт., 2016 р.). С. 179. (Здобувач брала участь у проведенні дослідження та аналізу результатів, підготувала тези до друку).
34. **Шурко Н. О.**, Даниш Т. В. Технологія очищення фактора VIII згортання крові. *Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Трансфузіологія та гематологія: новітні тенденції розвитку»* (м. Київ, 21 квіт., 2016 р.). С. 179. (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
35. **Shurko N.**, Danysh T. Technological scheme for the preparation of purification factor VIII coagulation. *International Journal of laboratory Hematology*. 2017. Vol. 39 (Issue S2). P. 109. (Honolulu, Гаваї, 4–6 трав., 2017). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
36. **Shurko N.**, Danysh T. The method of purification blood coagulation factor VIII. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2016. Vol. 38 (S2). P. 97–98. (Milano, Італія, 12–14 трав., 2016). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
37. **Shurko N.**, Danysh T., Novak V. Affinity chromatography with dye – new method for the purification of factor VIII. *Clin Chem Lab Med*. 55. Special Suppl. 2017. P. 731. (Athens, Греція, 11–15 черв. 2017). (Здобувач провела афінну хроматографію, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
38. Новак В. Л., **Шурко Н. О.**, Миськів І. М. Скринінг донорської крові та її компонентів як основа вірусної безпеки трансфузійної медицини. *Тези доп. III міжнар. конгресу з інфузійної терапії*. (м. Київ, 6–7 жовт., 2016 р.). С. 124–125. (Здобувач провела аналіз результатів поширення вірусних захворювань серед населення України, підготувала тези до друку).
39. **Shurko N.**, Novak V., Danysh T., Voytsitskyu J. La cromatografia di affinità con treazine-colorante come il metodo purificazione del fattore VIII. *Blood Transfusion*. 2017. 15. Suppl. № 1. P. 75–76. (Firenze, Італія, 25–27 трав.,

- 2017). (Здобувач провела дослідження, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку та оформила стендову доповідь).
40. **Shurko N.**, Danysh T., Danysh O. Effect of thiocyanate on the activity of blood coagulation factor VIII. *Haematologica. Abstract book*. 2016. Vol. 101 (s1). P. 878. (Copenhagen, Данія, 9–12 черв., 2016). (Здобувач дослідила вплив тіоціанату-амонію на активність FVIII, підготувала тези до друку).
41. **Shurko N.**, Danysh T., Novak V. The new method of purification factor coagulation VIII. *Haematologica. Abstract book*. 2017. Vol. 102 (s1). P. 881–882. (Madrid, Іспанія, 14–17 черв., 2017). (Здобувач розробила технологічну схему очищення FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
42. **Shurko N.**, Novak V., Danysh T. The basis of viral safety of transfusion medicine: screening of donor blood and methods of virus inactivation. *20<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESCV*. (Lago Maggiore, Італія, 13–16 верес., 2017). *Abstract book*. 2017. P. 177. (Здобувач провела дослідження використання різних вірус-інактивуючих речовин, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).
43. **Shurko N.**, Danysh T., Voroniak M., Novak V. The advantages of using PEG-precipitation in the isolation and purification of factor coagulation VIII. *Blood Transfusion*. 2017. Vol. 15. Suppl. № 3. P. 492. (Rome, Італія, 15–17 верес., 2017). (Здобувач провела дослідження впливу ПЕГ-4000 у схемі одержання FVIII, узагальнила отримані дані, підготувала тези до друку).