

© Коллектив авторов, 2014

А. В. Исеркапов^{1, 2}, А. Л. Берковский¹, А. В. Слободян^{1, 2}, Т. Л. Дереза¹,
О. Г. Кутюрова¹, Н. С. Шастина², В. И. Швеиц²

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОГО ПРОТРОМБИНОВОГО КОМПЛЕКСА МЕТОДОМ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹ ФГБУ "Гематологический научный центр" Минздрава России, Москва, 125167, Новый Зыковский проезд, д. 4, Россия

² Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, 119571, Москва, проспект Вернадского, 86, Россия
E-mail artemis-kornilov@rambler.ru

Рассмотрены способы получения полного протромбинового комплекса методом анионообменной хроматографии с использованием различных сорбентов. Изучен способ получения PPSB анионообменной хроматографией на DEAE- и QAE-Sephadex A50batch методом. Показано влияние массы геля, взятого для хроматографии, на выход и удельную активность ф. II, ф. VII, ф. IX, ф. X. Предлагаются новые способы получения протромбинового комплекса с высоким содержанием ф. VII методом колоночной хроматографии. Изучена статическая емкость по ф. VII системы гемокоагуляции ряда сорбентов, а также динамическая емкость TOYOPEARL GigaCap Q-650M и Capto Q.

Ключевые слова: полный протромбиновый комплекс; колоночная хроматография.

Протромбиновый комплекс — это группа гликопротеинов плазмы крови, включающая факторы ее свертывания — II, VII, IX и X (ф. II, ф. VII, ф. IX и ф. X), а также регуляторные белки C и S [1].

По количеству содержащегося фактора VII протромбиновые комплексы разделяют на полные (PPSB) и частичные (PCC). Протромбиновые комплексы с различным количеством фактора VII широко использовались для лечения гемофилии B, но их постепенно заменили концентраты высокоочищенного фактора ф. IX [1]. В настоящее время PPSB с примерно равным соотношением всех 4 факторов применяется при дефиците витамин К-зависимых факторов свертывания, диспротромбинемии, передозировке антикоагулянтами, такими как варфарин, синкумар [2, 3]. Также PPSB используется при редком аутосомно-рецессивном заболевании — врожденном дефиците протромбина [1]. Поскольку концентраты очищенного протромбина не производятся, коррекция дефицита достигается применением протромбинового комплекса. Независимо от причины дефицита витамин К-зависимых факторов для восстановления гемостаза возможно, а в некоторых случаях и необходимо, применение PPSB. Кроме этого PPSB с высоким содержанием фактора VII служит полупродуктом для получения препарата, обладающего FVIII-байпасной активностью [4].

В настоящее время протромбиновый комплекс выделяют из свежемороженой донорской плазмы сорбцией в объеме на анионообменном геле DEAE-Sephadex A50, предложенным в [4]. Таким способом, например, компания "Baxter" (Австрия) полу-

чает "Prothromplex-T", который в настоящее время является наиболее распространенным коммерческим препаратом PPSB. Существующие на сегодняшний день препараты протромбинового комплекса высокоэффективны, но, к сожалению, весьма дорогостоящи. В настоящее время отечественных аналогов подобных препаратов не существует, поэтому важной задачей является создание в России технологии выделения протромбинового комплекса.

Целью настоящей работы являлось изучение технологических подходов и разработка способа получения полного протромбинового комплекса с высоким содержанием FVII методом колоночной хроматографии.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовалась свежемороженая плазма (СЗП) человека, полученная в Отделении заготовки крови и ее компонентов Гематологического научного центра МЗ РФ. СЗП заготавливали согласно "Инструкции по проведению донорского прерывистого плазмафереза", утвержденной МЗ РФ 23.09.2002. Аттестацию проводили в соответствии с "Инструкцией по заготовке и консервированию донорской крови", утвержденной МЗ РФ 29.05.1995 и дополнениями к ней от 02.08.99 г. Сорбцию PPSB проводили из криосупернатанта (КСН), полученного в процессе первичного криофракционирования СЗП. Была изучена сорбционная способность следующих сорбентов: TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M, TOYOPEARL GigaCap Q-650M, TOYOPEARL DEAE-650M (TOSOH BIOSCIENCE, Япония),

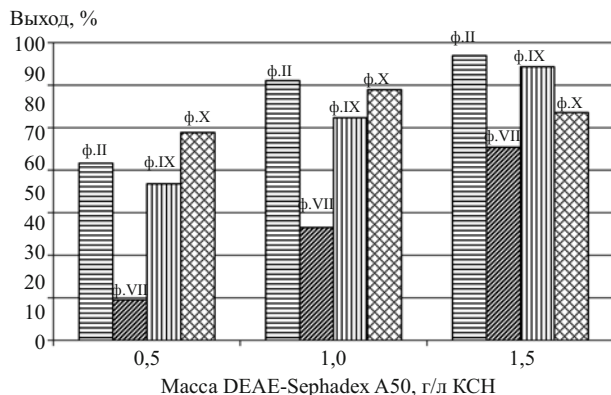


Рис. 1. Зависимость выхода ф. II, ф. VII, ф. IX, ф. X от массы DEAE-SephadexA50.

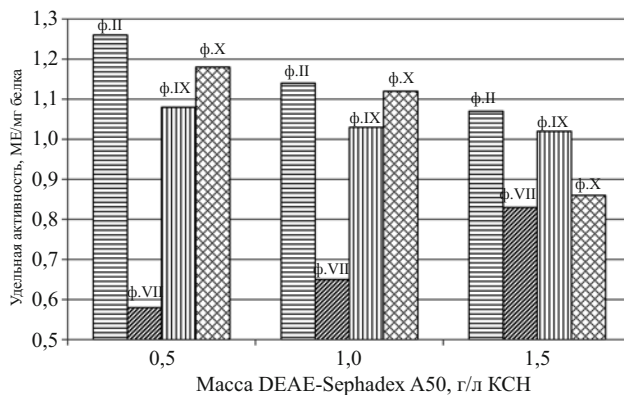


Рис. 2. Зависимость удельной активности ф. II, ф. VII, ф. IX, ф. X от массы DEAE-Sephadex A50.

Fractogel EMD TMAE (M) (Merck, Германия), DEAE-Sephadex FF, Capto Q, DEAE-Sephadex A50, QAE-Sephadex A50 (GE HealthCare, США).

Коагулометрические измерения. Специфическую активность факторов II, VII, IX, X в международных единицах (МЕ) измеряли одностадийными коагулологическими методами на анализаторе MC4 PLUS (Merlinmedical, Германия) [5, 6]. Для проведения измерений использовали плазму-калибратор, аттестованную по активности факторов II, VII, IX и X против международного стандарта, плазмы субстратные дефицитные по факторам II, VII, IX и X, тромбопластин (очищенный экстракт мозга кроликов), АЧТВ-реагент, содержащий эририд (фосфолипиды мембран эритроцитов) и 0,5 % суспензию каолина в физиологическом растворе. Для разведения исследуемых образцов использовали имидазоловый буфер. Проверку правильности построения калибровочных прямых осуществляли с помощью контрольной плазмы (плазма крови человека с нормальным уровнем параметров системы гемостаза). Все реагенты производства НПО РЕНАМ (Россия).

Концентрация общего белка. Концентрацию общего белка определяли методом Бредфорда на спек-

трофотометре Ultrospec 2100 pro (GEHealthCare, США) [7]. В качестве калибратора использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 60 г/л (ООО Агат-Мед, Россия).

Изучение способа получения PPSB методом сорбции в объеме

СЗП (1000 мл) размораживали в термостатируемом стакане при перемешивании верхнеприводной мешалкой (RZR 2102 Heidolph, Германия), при этом температуру поддерживали ниже + 4 °С с помощью термостата (LTD6GGrant, Англия). Для отделения образовавшегося криопреципитата размороженную плазму центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин (центрифуга RC-3B Sorvall, США). pH полученного криосупернатанта (КСН) при необходимости корректировали до 7,4 – 7,6 либо 0,5 М уксусной кислотой, либо 0,5 М раствором NaOH, процесс контролировали с помощью pH-метра (HI 223 HANNA Instruments, Германия). Для сорбции факторов протромбинового комплекса к КСН медленно при перемешивании добавляли различное количество (0,5, 1,0 и 1,5 г/л КСН) сухого DEAE- или QAE-Sephadex A50 (GEHealthCare, США). Суспензию перемешивали в течение 1 ч, сорбент отделяли на воронке Бюхнера и промывали буфе-

Зависимость состава протромбинового комплекса от массы DEAE- и QAE-SephadexA50

Таблица 1

	DEAE-SephadexA50				QAE-SephadexA50				
	0,5 г/л КСН				0,5 г/л КСН				
Факторы свертывания	ф. II	ф. VII	ф. IX	ф. X	Факторы свертывания	ф. II	ф. VII	ф. IX	ф. X
Активность, МЕ/мл	13,40	6,13	11,50	12,57	Активность, МЕ/мл	14,91	8,08	15,18	16,85
Удельная активность, МЕ/мг белка	1,26	0,58	1,08	1,18	Удельная активность, МЕ/мг белка	1,17	0,63	1,19	1,32
Выход, %	71,7	39,5	66,8	78,9	Выход, %	70,5	47,9	82,3	87,1
1,0 г/л КСН					1,0 г/л КСН				
Активность, МЕ/мл	7,74	4,41	7,00	7,65	Активность, МЕ/мл	8,47	6,31	8,77	7,54
Удельная активность, МЕ/мг белка	1,14	0,65	1,03	1,12	Удельная активность, МЕ/мг белка	1,07	0,80	1,11	0,95
Выход, %	91,1	56,5	82,4	89,0	Выход, %	92,9	68,4	87,6	85,9
1,5 г/л КСН					1,5 г/л КСН				
Активность, МЕ/мл	6,90	5,37	6,56	5,54	Активность, МЕ/мл	6,81	5,63	6,26	6,54
Удельная активность, МЕ/мг белка	1,07	0,83	1,02	0,86	Удельная активность, МЕ/мг белка	0,93	0,77	0,86	0,89
Выход, %	96,9	75,4	94,3	83,6	Выход, %	95,7	76,5	92,2	94,0

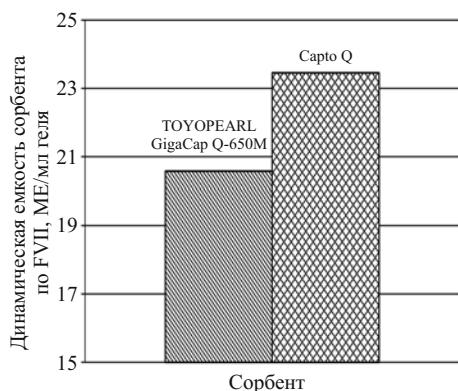


Рис. 3. Динамическая емкость сорбентов TOYOPEARL GigaCap Q-650M и Capto Q.

ром состава 0,014 М цитрата натрия (Na_3Cit), 0,12 М NaCl , pH 7,6. Протромбиновый комплекс элюировали буфером состава 0,014 М Na_3Cit , 0,51 М NaCl , pH 7,6.

В исходном КСН и полученных образцах PPSB определяли активность факторов свертывания II, VII, IX и X, а также концентрацию общего белка.

Изучение способа получения PPSB методом колоночной хроматографии

Определение статической емкости сорбентов. В пробирки объемом 50 мл помещали 0,5 мл геля, сорбенты промывали водой и затем уравнивали буфером состава 0,02 М Na_3Cit , 0,08 М NaCl . После чего к каждому образцу геля добавляли 20 мл криосупернатанта, pH которого предварительно корректировали до 7,0, 7,4, 7,6 и 8,0. Суспензию перемешивали в течение 40 мин, затем гель осаждали центрифугированием при 500 об/мин в течение 5 мин на центрифуге (EBA 21 Andreas Hettich GmbH&Co., Германия). Статическую емкость сорбента в МЕ/мл определяли как разность между активностью фактора свертывания в исходном криосупернатанте и в КСН после контакта с гелем, приведенную к единице объема геля.

Определение динамической емкости сорбентов. Колонку (ХК 16/20 GE HealthCare, США) заполняли 18 мл одного из сорбентов, либо TOYOPEARL GigaCap Q-650 M, либо Capto Q. Сорбент уравнивали стартовым буфером состава 0,02 М Na_3Cit , 0,08 М NaCl . Затем на колонку со скоростью 60 см/ч наносили около 500 мл КСН (pH 7,6), после чего гель

промывали 50 – 80 мл стартового буфера. Десорбцию факторов протромбинового комплекса осуществляли 50 – 80 мл буфера состава 0,02 М Na_3Cit , 0,50 М NaCl , pH 7,6. Процесс контролировали с помощью спектрофотометрического детектора (112 UV/VIS Gilson, Франция) при длине волны 280 нм. В КСН и полученных образцах PPSB определяли активность факторов свертывания крови II, VII, IX и X, а также концентрацию общего белка.

Результаты и их обсуждение

В ходе работы были рассмотрены различные способы получения протромбинового комплекса. Из литературы известно [4], что частичный протромбиновый комплекс (PPC), содержащий в основном факторы свертывания II, IX и X, выделяют из КСН свежезамороженной плазмы сорбцией на слабом анионообменном геле DEAE-Sephadex A50 при соотношении гель/плазма — 0,5 г/л. Поскольку факторы протромбинового комплекса имеют различное сродство к этому гелю (ф. VII сорбируется слабо), получаемый препарат содержит примерно равные количества факторов II, IX, X и лишь следовые количества ф. VII. Это обусловлено тем обстоятельством, что при выбранном соотношении гель/плазма практически все сайты связывания сорбента “окупированы” имеющими большее сродство факторами и на сорбцию ф. VII просто не хватает заряженных групп сорбента. Учитывая это обстоятельство, мы исследовали возможность получения препарата протромбинового комплекса с высоким содержанием ф. VII сорбцией на увеличенных количествах как слабого, так и сильного анионообменного геля.

Масса геля составляла 0,5, 1,0 и 1,5 г/л КСН, сорбцию проводили в течение 1 ч. В ходе экспериментов оценивалось изменение выхода и удельной активности ф. II, ф. VII, ф. IX, ф. X в зависимости от количества геля, взятого для хроматографии. Полученные результаты свидетельствуют о возрастании выхода всех 4 факторов, и в особенности ф. VII в целевой фракции при увеличении массы сорбента от 0,5 до 1,5 г/л КСН (табл. 1, рис. 1, 2). При этом происходит незначительное уменьшение удельной активности факторов II, IX и X за счет увеличения сорбции балластных белков плазмы. В наших экспериментах мы не отметили разницы в сорбционной способности слабого и сильного

Статическая емкость сорбентов по ф. VII при различных pH

Таблица 2

Сорбент	Емкость сорбента по ф. VII, МЕ/мл геля			
	pH			
	7,0	7,4	7,6	8,0
TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	9,56	12,16	14,04	10,38
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	15,83	17,56	19,84	14,22
TOYOPEARL DEAE-650M	3,01	3,84	3,52	1,49
Fractogel EMD TMAE (M)	9,86	12,08	13,20	10,14
DEAE-Sephadex FF	4,87	7,08	6,36	4,27
Capto Q	20,42	22,84	23,12	16,97
DEAE-Sephadex A50	14,25	19,56	20,68	11,41
QAE-Sephadex A50	15,07	22,28	22,60	12,59

Состав протромбинового комплекса, получаемого с помощью TOYOPEARL GigaCap Q-650M и Capto Q

Факторы свертывания	TOYOPEARL GigaCap Q-650M				Факторы свертывания	Capto Q			
	ф. II	ф. VII	ф. IX	ф. X		ф. II	ф. VII	ф. IX	ф. X
Активность, МЕ/мл	7,46	7,41	7,39	7,50	Активность, МЕ/мл	5,35	4,41	3,28	3,16
Удельная активность, МЕ/(мг белка)	0,85	0,84	0,84	0,85	Удельная активность, МЕ/(мг белка)	0,96	0,79	0,59	0,57
Выход, %	86,9	91,4	82,2	87,6	Выход, %	84,6	90,7	82,4	82,9
Емкость сорбента по FVII, МЕ/мл геля		20,6			Емкость сорбента по FVII, МЕ/мл геля		23,5		

анионообменников при соотношении 1,5 г сорбента/л КСН. Протромбиновые комплексы, выделяемые из плазмы, в этом случае имеют соотношение активностей факторов II, VII, IX и X, близкое к 1:1:1:1, что соответствует международным требованиям, предъявляемым к такого рода препаратам [8].

Развитие технологии выделения и очистки белков в последнее десятилетие и особенно появление новых сорбентов, позволяющих проводить промышленную хроматографию на очень больших скоростях (до 200 см/ч и выше), дает возможность перейти при получении препаратов протромбинового комплекса с сорбции факторов в объеме к колоночной хроматографии. С целью разработки такой технологии мы изучили статическую емкость ряда современных и традиционных анионообменных сорбентов при различных значениях pH (7, 7,4, 7,6 и 8). Поскольку критичным при получении полного протромбинового комплекса является содержание ф. VII, мы изучали емкость сорбентов именно по этому фактору. Полученные данные свидетельствуют, что наилучшие результаты достигаются при применении сильных анионитов при pH в области 7,4 – 7,6 (табл. 2). Наибольшую статическую емкость по ф. VII в выбранных условиях показали TOYOPEARL GigaCap Q-650M и Capto Q, их емкость составила примерно 20 и 23 МЕ/мл геля соответственно. Поэтому именно эти сорбенты были выбраны для отработки условий проведения колоночной хроматографии.

Проведенные эксперименты показали, что с использованием данных сорбентов возможно получение

PPSB с соотношением факторов II, VII, IX, X, близким к 1:1:1:1 (табл. 3, рис. 3), динамическая емкость по ф. VII этих сорбентов примерно одинаковая и находится на уровне 20 – 24 МЕ/мл геля.

Данная работа может быть положена в основу дальнейшей разработки технологии производства полного протромбинового комплекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. М. Русанов, И. Левин, *Лечебные препараты крови*, ИД Медпрактика, Москва (2004), сс. 55 – 56.
2. M. M. Song, C. P. Warne, M. A. Crowther, *Thromb. Res.*, **129**(4), 526 – 529 (2012).
3. R. Demeyere, S. Gillardin, J. Arnout, et.al., *Vox Sang*, **99**(3), 251 – 260 (2010).
4. J. Bertolini, N. Goss, J. Curling, *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2012), pp. 65 – 79.
5. А. А. Козлов, А. Л. Берковский, Н. Д. Качалова, и др., *Диагностические наборы и реагенты для гемоглобинометрии и исследования системы гемостаза*, Сборник инструкций, НПО РЕНАМ, Москва (2010), сс. 11 – 21.
6. А. А. Козлов, Л. В. Натрус, П. А. Черновол и др., *Лабораторная диагностика системы гемостаза*, Литтерра, Москва (2011), сс. 91 – 98.
7. N. J. Kruger, *The Bradford method for protein quantitation, Methods of Enzymology. Basic protein and peptide protocols*, J. M. Walker (ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey (1994), vol. 32, pp. 9 – 15.
8. *European Pharmacopoeia*, 4th edition (2002), pp. 1325 – 1326.

Поступила 13.01.14

STUDY OF THE POSSIBILITY OF OBTAINING PROTHROMBIN COMPLEX CONCENTRATE BY ANION EXCHANGE COLUMN CHROMATOGRAPHY

A. V. Iserkapov^{1,2}, A. L. Berkovskii¹, A. V. Slobodyan^{1,2}, T. L. Dereza¹, O. G. Kutuyurova¹, N. S. Shastina², and V. I. Shvets²

¹ Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125167 Russia

² Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

* e-mail: artemis-kornilov@rambler.ru

Methods of obtaining total prothrombin complex (PPSB) by anion exchange chromatography using various sorbents have been considered. In particular, the obtaining of PPSB on DEAE- and QAE-Sephadex A50 by the batch method has been studied. It is established that the yield and specific activity of FII, FVII, FIX, and FX depends on the mass of the resin used for chromatography. New methods for obtaining PPSB with a high content of FVII by column chromatography are proposed. The static capacity for FVII of hemocoagulation system and the dynamic capacity of TOYOPEARL GigaCap Q-650M, and Capto Q were studied.

Keywords: total prothrombin complex; PPSB; anion exchange column chromatography