© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, 2010
УДК 615.382 + 616 — 022; 576.8.095.87.894

Застосування противовірусної обробки при одержанні препаратів плазми крові

М.І.Вороняк

Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України
Львів, Україна

Створена технологічна схема одержання препарату тромбіну з фракцій II+III та III плазми крові за Коном, яка включає попереднє фракціонування, осадження протромбінового комплексу, активацію тромбіну, сольвентно-детергентну обробку та афінну хроматографію на кремнеземному сорбенті, яка дозволила одержати високоактивний з високим рівнем антивірусної безпеки препарат, придатний для діагностики чи лікування.

Ключові слова: фракції II+III та III плазми крові за Коном, тромбін, афінна хроматографія, сольвентно-детергентна обробка.

Вступ

Якщо в минулому основна увага приділялась методам одержання та збереження активності препаратів крові, то сьогодні на перше місце вийшла проблема противірусної безпеки. Зараз ідентифіковано понад 30000 вірусів. Багато з них є патогенними для людського організму й можуть існувати в крові та передаватись при трансфузії препаратів крові. Віруси є причиною більш 80% інфекційних захворювань людини, і такий перелік, на жаль, із кожним днем поповнюється. Тому розробка надійних методів інактивації, неспецифічних для окремих вірусів, є дуже актуальною. Такі методи потенційно здатні також знизити ризик передачі вірусів, про наявність яких не було відомо.

Методів інвактивації вірусів відомо досить багато, але лише деякі дозволені для використання при виготовленні лікувальних засобів із плазми крові.

Останніми роками все більшого поширення набуває метод сольвентно-детергентної (СД) інактивації вірусів, розроблений Нью-Йоркським центром крові та вперше впроваджений у промислове виробництво компанією «Октафарма». Суть методу полягає в додаванні до робочих розчинів на певних етапах фракціонування неіонного детергенту та розчинника, які незворотньо руйнують перш за все ліпідні оболонки вірусу, інактивують його. Введений у виробничі процеси метод продемонстрував високий рівень інактивації оболонкових вірусів (HIV, HBV, HCV, HGV, CMV, поліомієліту, везикулярного стоматиту та ін.) і в той же час характеризувався високим виходом препаратів крові [1, 2]. Зараз СД метод застосовують у світі близько сотні потужних фірм-виробників, які виготовляють десятки різних препаратів з плазми крові.

Встановлено, що при застосуванні препаратів факторів зсідання, одержаних із використанням СД методу, не було зареєстровано жодних ознак трансмісії вірусів гепатиту В, гепатиту С, ВІЛ, TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury — посттрансфузійної гострої легенової недостатності), SARS-CoV вірусу та ін. [3-5]. Даний метод також застосовується при воготовленні рекомбінантних препаратів.

Проте слід відзначити, що при СД обробці зменшується активність деяких компонентів плазми (зокрема факторів зсідання V, VIII, α_2-антиплазміну, антитрипсину) [6, 7].

Метою дослідження було включити етап сольвентно-детергентної антивірусної обробки в процес виділення та очищення препаратів крові, зокрема тромбіну, не знижуючи при цьому якість кінцевого продукту.

Матеріали та методи дослідження

Вихідною сировиною для одержання препаратів були фракції II+III або III плазми крові за Коном. Як реагенти сольвентно-детергентної обробки нами використовувались детергент тритон Х-100 та розчинник три-(н-бутил)фосфат. В якості матриці хроматографічного сорбенту ми використовували діасорб амінопропіловий (ЗАТ «БиоХимМак Ст», Росія), афінним

лігандом служив Procion Blue H-B. У роботі також використовували тріс-оксиметиламінометан, поліетиленгліколь ПЕГ-6000 («Acros Organics», Бельгія), мертіолат (препарат «Тімеросал»), кумассі діамантовий голубий G-250 та R-250 («Ferak Berlin», Німеччина), інші реактиви кваліфікації «чда» та «хч».

У типовій процедурі фракціонування до одержаного супернатанту фракції III за Коном після етапу осадження додавали тритон Х-100 і трибутилфосфат до кінцевої концентрації 1% і 0,5-1,0% відповідно. Далі фракціонування продовжували до одержання концентрату факторів протромбінового комплексу, який використовували для подальшого очищення з метою одержання гемостатичного препарату або тромбіну.

Після діалізу проводили активацію протромбіну в тромбін. Одержаний екстракт тромбіну центрифугували, після чого повторно додавали тритон Х-100 і трибутилфосфат до концентрації 1,0 і 0,5% відповідно і пропускали через хроматографічні колонки. Тромбінвмісні фракції об'єднували, діалізували або обезсолювали гельфільтрацією, після чого ліофільно висушували.

Результати дослідження та їх обговорення

Вагомою проблемою застосування СД методу є питання, в якому місці процедури одержання того чи іншого препарату включити даний етап, не допустивши зниження рівня антивірусної безпеки процесу фракціонування. Важливим також залишається пошук ефективного способу відділення сольвенту і детергенту від продуктів переробки плазми крові.

Найбільш ефективними методами виділення СД компонентів з білкових розчинів, на нашу думку, є хроматографічні методи, зокрема методи афінної хроматографії як найбільш специфічні до кожного необхідного білка (ферменту). Крім виділення небажаних в кінцевому продукті СД реактивів вони дають змогу одержати препарати високого ступеня очищення.

Нашими дослідженнями показано, що на активність тромбіну додавання тритону Х-100 і трибутилфосфату практично не впливає, і в той же час основна їх кількість не зв'язуються із сорбентами, а виходить у фракціях проскоку. Тромбін у цих умовах сорбується на модифікованих силохромах і не вимивається жодним із десорбуючих розчинів, за винятком 1М NaCl в присутності 25% пропанолу-2. Залишкові кількості тритону Х-100 і трибутилфосфату повністю вимиваються 25% розчином пропанолу-2. Так, при проведенні спектрофотометричних вимірювань залишкова концентрація тритону Х-100 була менша чутливості методу (при 275 нм <0,0019%). Активність тромбіну в елюючих розчинах становила 1000-2000 од. NIH/мг білка.

Висновки

Отже, включення сольвентно-детергентного методу в схеми фракціонування плазми крові та хроматографічних методів виділення та очищення дозволяє отримувати препарати плазми високого ступеня чистоти, безпечних у застосуванні стосовно можливої вірусної контамінації.

Література

1. Вдовин В.В. Вирусная безопасность концентратов факторов свертывания крови для лечения гемофилии на современном этапе // Ремедиум. — 2009. — №3. — С. 34-37.
2. Гирін В.М., Тимченко А.С., Лисняк І.О., Бойко І.І. Ефективність вірусної деконтамінації білкових препаратів плазми крові // Український медичний часопис. — 2001. — №6. — XI-XII. — С. 14-16.
3. Проблемы и методы обеспечения вирусной безопасности плазматических препаратов // RUSD Medical LLC. — 1998.
4. McCullough J. Progress toward a pathogen-free blood supply // Clinical Infectious Diseases. — 2003. — №5. — P. 88-95.
5. SARS-coronavirus (SARS-CoV) and the safety of a solvent/detergent (S/D) treated immunoglobulin preparation / H.F.Rabenau, L.Biesert, T. Schmidt et al. // Biologicals. — 2005. — Vol. 33. — P. 95-99.
6. Coagulation factor content of solvent/detergent plasma compared with fresh frozen plasma / S.Doyle, P.O'Brein, K.Murphy et al. // Blood coagulation and fibrinolysis. — 2003. – Vol. 14. — №3. — P. 283-287.
7. Русанов В.М. Вирусная безопасность донорской плазмы // Вестник службы крови России. — 2008. — №2. — С. 34-37.

М.И.Вороняк. Применение противовирусной обработки при получении препаратов плазмы крови. Львов, Украина.

Ключевые слова: *фракции II+III и III плазмы крови по Кону, тромбин, аффинная хроматография, сольвентно-детергентная обработка.*

Создана технологическая схема получения препарата тромбина из фракций II+III и III плазмы крови по Кону, включающая предварительное фракционирование, осаждение протромбинового комплекса, актива-

цию тромбина, сольвентно-детергентную обработку и аффинную хроматографию на кремнеземном сорбенте, которая позволила получить высокоактивный с высоким уровнем антивирусной безопасности препарат, пригодный для диагностики или лечения.

M.I.Voronyak. Using of antiviral processing for blood plasma preparations. Lviv, Ukraine.

Key words: *II+III, III blood fractions by Cohn, thrombin, affinity chromatography, solvent-detergent processing.*

The purpose of the work was to create technology of production of the high-purified preparation of thrombin using solvent-detergent method of antiviral processing; to pick up the optimal conditions of activating of prothrombin into thrombin; to purify thrombin using the method of affinity chromatografy, as a result the high-activity; to eliminate the agents, that provide inactivation of the viruses. The introduction of the offered technology can give a chance to improve the level of antivirus safety of preparation of thrombin, suitable for diagnostic or treatment.

Надійшла до редакції 01.03.2010 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, 2010

УДК 577.156.6; 615.382

Створення технології виділення та очищення фактора VII згортання крові

С.Є.Мадич

Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України
Львів, Україна

Фактор VII використовують при кровотечах і операціях у хворих на гемофілію А або В з інгібіторами до факторів VIII або IX, а також для лікування хворих з вродженим дефіцитом VII. Ми показали, що ряд синтезованих нами сорбентів ефективно зв'язують фактор VII. За допомогою вдало підібраних умов елюції вдалося одержати високоочищений препарат цього білка. Отриманий препарат фактора VII за чистотою та специфічною активністю аналогічний до комерційних препаратів різних виробників. Технологія виділення фактора включає також стадії антивірусної обробки.

Ключові слова: афінна хроматографія, кремнеземні носії, тріазинові барвники, плазма, фактор VII згортання крові.

Вступ

Фактор VII (проконвертин, FVII) — серинова протеїназа трипсинового типу, вітамін К-залежний глікопротеїн, що синтезується в печінці. Це одноланцюговий неактивний зимоген, молекулярна маса якого 50 кД [1]. Серед коагуляційних білків FVII має найкоротший період півжиття (приблизно 2-3 год.) і циркулює в крові в дуже малих концентраціях — 0,5 мкг/мл [2]. При нестачі вітаміну К в організмі утворюються дефектні молекули FVII, які не містять залишків γ-карбоксиглутамінової кислоти і перетворюються в активні форми дуже повільно. Тому при порушенні синтезу вітаміну К спостерігається підвищена кровоточивість. FVII має важливе клінічне значення як маркер ризику виникнення тромбоемболій. Його гіперпродукція спостерігається при гіперліпідеміях. Порушення синтезу факторів згортання крові, зокрема FVII, викликає появу геморагічного діатезу [3]. Оскільки активація FVII носить локальний характер (близько до місця пошкодження) застосування концентрату фактора, за винятком окремих випадків множинних пошкоджень, не викликає системної активації згортання крові. FVII використовують при кровотечах і операціях у хворих з інгібіторними формами гемофілії А або В, а також для лікування хворих з вродженим чи набутим його дефіцитом [4].

Джерелом лікувального препарату FVII на сьогодні є свіжозаморожена плазма, концент-