



УДК: 612.151-083:616.151-056.7

ЗАСТОСУВАННЯ БАРВНИК-ЛІГАНДНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ

Н. О. Шурко, Т. В. Даниш, М. І. Вороняк

*ДУ "Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України"
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

Проблема переробки плазми донорської крові з метою створення ефективних лікарських препаратів є актуальною. На сьогоднішній день створено велику кількість методів фракціонування плазми крові, виділення і очищення її компонентів, зокрема, факторів зсідання крові та фібринолізу. Особливо привабливими з точки зору ефективності є методи біоспецифічної хроматографії. Хроматографічне очищення фактора VIII вважається одним із технологічно найважчих процесів через потенційний ризик його активації та нестабільність за наявності протеаз плазми крові. Для отримання очищених препаратів фактора VIII широко використовують аніонообмінну, гель-проникну й афінну хроматографії. Синтетичні тріазинові барвники мають низку переваг як ліганди, тому ми дослідили можливість використання барвник-лігандної афінної хроматографії на макропористих кремнеземних носіях для виділення й очищення фактора VIII зсідання крові. У статті описано сорбцію цього фактора з різними хроматографічними сорбентами та запропоновано спосіб його очищення із кріопреципітату методом зв'язування нецільових білків на Діасорбі амінопропіловому з іммобілізованими тріазиновими барвниками. У результаті проведеної роботи було відібрано групу сорбентів, яка найкраще надається для процесу очищення фактора VIII зсідання крові: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion gelb M4R, Діасорб-Procion blue HB, Діасорб-Procion blue MXR та Діасорб-Активний яскраво-голубий К. Очищення фактора VIII відбувалося завдяки явищу негативної афінної хроматографії. Питома активність цього фактора зростала приблизно на порядок.

Ключові слова: фактор VIII зсідання крові, афінна хроматографія, тріазинові активні барвники.

ВСТУП

Застосування класичних хроматографічних методів, наприклад, іонообмінної хроматографії чи гель-фільтрації, для виділення й очищення певних груп білків, що відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями незначно, пов'язане з певними труднощами та потребує тривалих затрат часу [11]. Відповідно, це призводить до значної втрати їхньої біологічної активності через процеси денатурації, ензиматичного гідролізу та ін.

Однією з найбільш характерних властивостей білкових молекул є їхня здатність зворотно зв'язувати інші речовини (ферменти утворюють комплекси зі субстратом, інгібітором чи кофактором, антитіла з антигенами та ін.). Утворення специфічних дисоційованих комплексів біологічних макромолекул лежить в основі афінної хроматографії [18].

Афінна хроматографія – процес адсорбції, що здійснюється завдяки біоспецифічній взаємодії між лігандами, закріпленими на матриці (нерухома фаза), та елементарними до них молекулами, що підлягають очищенню чи фракціонуванню з подальшим процесом їхньої елюції з рухомою фазою [9].

Сучасні дослідження спрямовані на стандартизацію хроматографічного процесу з точки зору селективності, специфічності, можливості багаторазового використання, зменшення собівартості, простоти регенерації матриці. Це досягається створенням нових підходів у виборі лігандів (як природних, так і синтетичних) і матриць [3].

Тривале застосування афінних лігандів “еволюціонувало” від ензиматичних субстратів, коензимів, гормонів, лектинів, кофакторів, антитіл, нуклеїнових кислот, ефекторів та інгібіторів до різних пептидів, поліпептидів, а також інших синтетичних структур [1].

Барвник-лігандна біоспецифічна хроматографія розроблена як важливий спосіб очищення білка, оскільки має низку переваг над іншими формами афінної хроматографії (табл. 1) [8].

Таблиця 1. Властивості барвників як лігандів для афінної хроматографії

Table 1. The properties of dyes as ligands for affinity chromatography

Дешевизна
Доступність
Легкість іммобілізації
Відносна стабільність щодо дії хімічних і біологічних чинників
Тривале зберігання сорбенту без втрати зв'язувальних властивостей
Багаторазове використання (легкість регенерації)
Можливість стерилізації
Простота використання
Висока адсорбційна ємність
Середня специфічність

Основою для синтезу тріазинових барвників є трихлорціанурова кислота, заміщення активних груп якої хромофорами приводить до утворення дихлор- або монохлортріазинових барвників [4].

Молекули барвника, що містять атоми хлору, взаємодіють із нуклеофільними (гідрокси- і аміно-) групами матриці й утворюють таким чином ліганди на поверхні носія. Коли атоми хлору тріазинового кільця повністю заміщені іншими групами, реактивність барвника втрачається.

Комерційні реактивні барвники містять різні домішки, які можуть вплинути на їхні біохімічні властивості й, відповідно, можливість використання барвників [2]. Реактивні барвники очищають за допомогою низки хроматографічних процедур, таких як тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія та колонкова на силікагелі або сефадексі [8]. Проте відомо, що застосування очищених

реактивних барвників необхідне тільки в методах, які стосуються досліджень механізму взаємодії барвник-білок (у розчині). Якщо використовують іммобілізований барвник, необхідності в попередньому очищенні немає, оскільки забруднюючі речовини не будуть адсорбуватися на матриці, а власне промивання адсорбенту після іммобілізації забезпечує видалення забруднень [8].

З впровадженням хроматографічних методів очищення для промислового отримання плазмових похідних розвинулася нова генерація терапевтичних препаратів, а саме факторів зсідання крові (VII, VIII та IX), інгібіторів протеаз та ін. [5, 10, 12, 14].

Так, використання препарату “Кріопреципітат” для лікування хворих на гемофілію А на сьогодні обмежене через низку причин: незначну концентрацію FVIII у препараті, що не дає змоги досягнути необхідного рівня гемостазу; високий вміст домішкових білків, що призводить до навантаження реципієнта чужорідним білком; небезпеку зараження вірусними інфекціями; високу ймовірність виникнення посттрансфузійних реакцій та ін. Проте спосіб кріоосадження є достатньо ефективним для одержання високоочищеного концентрату FVIII і може бути використаний у технологічній схемі його отримання. Застосування нових плазмових препаратів для вибіркової гемотерапії робить можливим лікування пацієнтів очищеними, стандартизованими, біологічно активними, вірус безпечними продуктами, на противагу використанню цільної плазми [3].

Хроматографічне очищення фактора VIII (FVIII) вважається одним із технологічно найважчих процесів через потенційний ризик його активації та нестабільність за наявності протеаз плазми крові.

Мета роботи – дослідити можливість використання барвник-лігандної афінної хроматографії на кремнеземних носіях для виділення й очищення FVIII зсідання крові.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Як сировину використали препарати FVIII “Кріопреципітат” (одержаний згідно з [17]) та “Immunate” (Baxter, Австрія). “Кріопреципітат” – фракція кріоглобулінів, отримана з 1 дози СЗП і розведена до об'єму $\approx 20\text{--}30$ мл робочого буферного розчину, містить FVIII (>70 МО/дозу), фактор фон Віллебранда (>100 МО/дозу), фібриноген (≥ 140 мг/дозу), FXIII, фібронектин та ін.

Препарат “Immunate” – ліофілізований препарат FVIII (500 МО/дозу) та фактора фон Віллебранда (≥ 250 МО/дозу), що містить як допоміжні речовини альбумін людини, гліцин, лізин гідрохлорид, натрію хлорид, натрію цитрат, кальцію хлорид.

Визначення активності FVIII здійснювали уніфікованим одностадійним коагулологічним методом за часом зсідання фібриногену в суміші, що містила дефіцитну по фактору плазму (вміст фактора менше 1%), розведену досліджувану рідину й АСТІН-реагент, за наявності іонів кальцію. Кількісне визначення активності фактора виконували згідно з графіком залежності активності фактора (у відсотках) від часу зсідання в АПТЧ-тесті [15] (HELENA, Великобританія).

У роботі використали такі барвники: Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний бордо 4СГ, Активний пурпуровий 4ЖТ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Активний яскраво-голубий 4К (Барва, Україна), Procion yellow H-E3G, Procion blue MX-R (Fluka, Швейцарія), Procion gelb M4R (Serva, Німеччина), Procion blue HB, Cibacron brilliant yellow 3G-P (Acros Organics, Бельгія).

Синтез кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками здійснювали за методикою “з включенням солі” [7]. Для цього до 5 см³ сухого Діасорбу амінопропілового (БиоХимМак-Ст, Росія) 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 K₂CO₃ (рН ~10,5). Витримували 48 год при температурі 45 °С. Відмивали сорбенти дистильованою водою, 4 М KCl, ізопропанолом, 6 М сечовиною, дистильованою водою. Одержані сорбенти зберігали в розчині 25 % ізопропанолу.

У барвників Procion blue MX-R і Активний яскраво-оранжевий KX, які є дихлортріазиновими похідними, після іммобілізації на Діасорбі амінопропіловому вільна реактивна хлоридна група блокувалася у процесі відмивання. Для забезпечення їх повного блокування сорбенти додатково промивали розчином *трис*-оксиметил-амінометану.

Дослідження сорбції-десорбції FVIII проводили batch-методом: до 2 мл кожного зі синтезованих сорбентів, врівноваженого 50 мМ Трис-HCl буферним розчином (рН 7,4), додавали по 2 мл розчину досліджуваного препарату (в одному випадку – “Кріопреципітат”, а в іншому – “Immunate”). Для вимірювань відбирали проби до сорбції та через 60 хв після нанесення зразка.

Концентрацію білка визначали методом Бредфорда за допомогою Кумасі діамантового голубого G-250 [13]. Як стандарт використовували альбумін великої рогатої худоби (ВРХ).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Барвник-лігандна хроматографія сформувалась як важливий метод для великомасштабного очищення білків. Значимість активних барвників як афінних лігандів є результатом їхньої хімічної будови, що дає їм змогу взаємодіяти з великою кількістю білків, а також легкості іммобілізації на типових хроматографічних матрицях. Реактивні барвники зв'язують білки завдяки специфічним взаємодіям в активному центрі білка або неспецифічним взаємодіям. Двовалентні метали, що входять у структуру барвника, беруть участь у ще одному типі взаємодії тріазинових барвників із білками (метал-хелатна). Усі ці типи взаємодій використовують у технологічних схемах очищення білків.

Біоімітуючі моно- чи дихлортріазинові барвники у деяких випадках здатні зв'язувати більшість типів білків, особливо ензимів, специфічним чином [6]. Згідно з нашими попередніми дослідженнями [6, 7], таке зв'язування має змішаний характер (біоспецифічна, гідрофобна та іонна взаємодія). Ця специфічність зумовлена наявністю різноманітних за властивостями замісників у барвників-лігандів і здійснюється, очевидно, за змішаним типом за участі каталітичного активного центру ензиму і центрів зв'язування субстратів (інгібіторів), гідрофобної та іонної взаємодії.

Більшість активних барвників належать до імфілітів, лігандів зі змішаною іонно-гідрофобною функцією, для яких біоспецифічність здійснюється в результаті випадкової просторової орієнтації його структури з відповідною ділянкою білка, що відповідає за певні функції. Якщо ця ділянка включає в себе один із активних центрів ферменту, або якщо в результаті взаємодії з коензимом, субстратом чи інгібітором просторова конфігурація його суттєво порушується, то стає можливою конкурентна афінна елюція білка з колонки. Вищесказане обумовлює широку специфічність зв'язування білків даною групою лігандів [7]. Звуження специфічності зв'язування досягається підбором умов проведення відповідного хроматографічного процесу.

У роботі досліджували зв'язування FVIII зі синтезованими нами сорбентами (табл. 2). У дослідженні використовували два препарати, які, крім основного (цільового) FVIII, містили також інші білки (див. Матеріали).

Таблиця 2. Перелік сорбентів, що використовувались у роботі

Table 2. The list of sorbents used in the work

№ з/п	Назва барвника-ліганда	Емпірична формула
1	Активний яскраво-оранжевий КХ	$C_{17}H_{13}O_{10}N_6S_3Cl_2Na_2$
2	Активний фіолетовий 4К	$C_{19}H_{15}O_8N_7S_2Cl$
3	Активний бордо 4 СГ	$C_{18}H_{15}O_{18}N_2S_5CuNa$
4	Активний пурпуровий 4ЖТ	$C_{19}H_{17}O_{14}N_2S_4Na$
5	Активний яскраво-червоний 5 СХ	$C_{16}H_7O_7N_9S_2C_{14}$
6	Procion yellow H-E3G	$C_{52}H_{34}Cl_2N_{18}Na_6O_{20}S_6$
7	Procion gelb M4R	$C_{19}H_{12}Cl_2N_8O_9S_2$
8	Procion blue HB	$C_{29}H_{20}ClN_7O_{11}S_3$
9	Procion blue MX-R	$C_{23}H_{14}Cl_2N_6O_8S_2$
10	Cibacron Brilliant Yellow 3G-P	$C_{25}H_{15}Cl_3N_9Na_2O_{10}S_3$
11	Активний яскраво-голубий К	$C_{29}H_{20}ClN_7O_{11}S_3$

Примітка: * барвники-ліганди ковалентно зв'язували з кремнеземним носієм (див. Методи)

Comment: * dye-ligands covalently bound with silica carriers (see. Methods)

У роботі досліджували можливість зв'язування FVIII зі сорбентами, оскільки у літературі немає даних щодо зв'язування FVIII із тріазиновими барвниками. Нашими дослідженнями з'ясовано, що FVIII не сорбувався жодним зі синтезованих нами сорбентів, однак питома активність у розчині зростає, а, відповідно, відбувається процес очищення.

Відомо, що є три типи афінної хроматографії з барвником – негативна, позитивна і тандем-хроматографія. Негативна хроматографія – найпростіша із трьох процедур. Суть її полягає в тому, що деякі нецільові білки утримуються 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). У нашому випадку зростання питомої активності FVIII зсідання крові можна пояснити саме явищем негативної афінної хроматографії. На табл. 3 і 4 показано зміни концентрації та питомої активності до і після нанесення досліджуваного білка.

Із досліджуваних сорбентів можна виділити групу, для якої характерне найкраще зв'язування нецільових білків: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ (№ 4), Діасорб-Procion gelb M4R (№ 7), Діасорб-Procion blue HB (№ 8), Діасорб-Procion blue MXR (№ 9) і Діасорб-Активний яскраво-голубий К (№ 11). У процесі інкубації досліджуваного розчину препарату FVIII з цими сорбентами протягом 60 хв питома активність зростала з $0,035 \pm 0,003$ до $0,318 \pm 0,023$ ("Кріопреципітат") і з $17,5 \pm 0,2$ до $108,0 \pm 1,2$ ("Immunate"). У результаті проведення простої процедури хроматографічного очищення ми досягли значного зростання питомої активності досліджуваного фактора.

Таблиця 3. Сорбція сумарних білків після нанесення препарату “Immunate” і “Кріопреципітат” на досліджувані сорбенти ($M \pm m$, $n = 5$)

Table 3. Sorption of proteins after applying the products “Immunate” and “Cryoprecipitate” on sorbents ($M \pm m$, $n = 5$)

Сорбент	Immunate	Кріопреципітат
	Концентрація білка через 60 хв інкубації, мг/мл	Концентрація білка через 60 хв інкубації, мг/мл
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	0,08±0,01	6,5±0,1
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	0,09±0,01	12,0±0,3
Діасорб-Активний бордо 4СГ	0,07±0,01	10,0±0,3
Діасорб -Активний пурпуровий 4ЖТ	0,07±0,01	8,0±0,1
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5 СХ	0,08±0,01	11,5±0,2
Діасорб-Procion yellow HE3G	0,07±0,01	12,0±0,3
Діасорб-Procion gelb M4R	0,08±0,01	6,5±0,1
Діасорб-Procion blue HB	0,09±0,01	6,5±0,1
Діасорб-Procion blue MX-R	0,11±0,02	8,5±0,1
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3G-P	0,08±0,01	11,0±0,2
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	0,06±0,01	7,0±0,1

Примітки: Immunate – вихідна концентрація білка 0,24±0,02 мг/мл; Кріопреципітат – вихідна концентрація білка 26,0±0,4 мг/мл

Comments: Immunate – initial protein concentration 0.24±0.02 mg/ml; Cryoprecipitate – initial protein concentration 26.0±0.4 mg/ml

Таблиця 4. Питома активність FVIII у зразках після нанесення препарату “Immunate” та “Кріопреципітат” на сорбенти ($M \pm m$, $n = 5$)

Table 4. The specific FVIII activity in the samples after applying the product “Immunate” and “Cryoprecipitate” on sorbents ($M \pm m$, $n = 5$)

Сорбент	Immunate		Кріопреципітат	
	Питома активність через 60 хв інкубації, МО/мг білка	Ступінь очищення разів	Питома активність через 60 хв інкубації, МО/мг білка	Ступінь очищення, разів
Діасорб-Активний яскраво-оранжевий КХ	15,50±0,09	0,88	0,085±0,004	2,50
Діасорб-Активний фіолетовий 4К	20,67±0,24	1,18	0,057±0,003	1,68
Діасорб-Активний бордо 4СГ	22,86±0,18	1,30	0,090±0,002	2,65
Діасорб -Активний пурпуровий 4ЖТ	108,00±1,2	6,17	0,225±0,011	6,62
Діасорб-Активний яскраво-червоний 5 СХ	18,25±0,11	1,04	0,083±0,006	2,44
Діасорб-Procion yellow HE3G	27,14±0,26	1,55	0,057±0,004	1,68
Діасорб-Procion gelb M4R	90,00±0,86	5,14	0,225±0,011	6,62
Діасорб-Procion blue HB	95,00±0,92	5,43	0,138±0,009	4,06
Діасорб-Procion blue MX-R	73,00±0,67	4,17	0,318±0,023	9,35
Діасорб-Cibacron Brilliant Yellow 3G-P	21,88±0,08	1,25	0,078±0,002	2,29
Діасорб-Активний яскраво-голубий К	96,90±0,73	5,54	0,237±0,016	6,97

Примітка: Immunate – вихідна питома активність FVIII 17,5±0,2 МО/мг білка; Кріопреципітат – вихідна питома активність FVIII 0,035±0,003 МО/мг білка

Comments: Immunate – initial specific activity of FVIII 17.5±0.2 IU/mg protein; Cryoprecipitate – initial specific activity of FVIII 0.035±0.003 IU/mg protein

Очевидно, що зростання питомої активності FVIII у процесі інкубації з досліджуваними сорбентами пов'язане зі сорбцією нецільових білків – фібриногену, фібронектину, FXIII (для “Кріопреципиту”) [17] і альбуміну (для “Immunate”).

Ніші дослідження демонструють, що завдяки явищу негативної афінної хроматографії питома активність FVIII зростала. Відповідно, ми можемо стверджувати про можливість використання цього виду хроматографії в технологічній схемі отримання препарату. Оскільки триазинові барвники мають низку переваг (див. табл. 1) порівняно з іншими лігандами афінної хроматографії, вони виступають чудовою перспективою для хроматографічного очищення. Завдяки проведеній роботі ми відібрали деякі з них, що успішно можуть бути включені у процес очищення фактора.

Отже, кремнеземні хроматографічні матриці з триазиновими барвниками в ролі лігандів можуть бути використані для очищення FVIII. Низка переваг (легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації та ін.) цих хроматографічних матриць [6, 8] відкриває перспективу можливого їх використання у технологічній схемі отримання високоочищеного препарату FVIII.

ВИСНОВКИ

Використання кремнеземних матриць із триазиновими барвниками в ролі лігандів дає змогу завдяки явищу негативної сорбції досягти зростання питомої активності FVIII. У результаті проведеної роботи відібрано групу сорбентів, яка найкраще підходить для процесу очищення FVIII, а саме: Діасорб-Активний пурпуровий 4ЖТ, Діасорб-Procion gelb M4R, Діасорб-Procion blue HB, Діасорб-Procion blue MXR та Діасорб-Активний яскраво-голубий К. Це робить можливим використання цих сорбентів у технологічній схемі отримання препарату FVIII. Низка переваг триазинових барвників, наведених у табл. 1, дасть змогу спростити технологічний процес виробництва високоочищеного препарату FVIII.

1. *Baikar V.M., Karnath M.V., Vishwanathan C. et al.* Separation of antihemophilic factor VIII from human plasma by column chromatography. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 2003; 18 (1): 80–86.
2. *Boyer P.M., Hsu J.T.* Protein purification by dye-ligand chromatography. **Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology**, 1993; 49: 1–44.
3. *Burnouf T.* Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. **Journal of Chromatography**, 1995; 664: 3–15.
4. *Clonis Y.D.* **Affinity separation: dye-ligands**. Encyclopedia of Separation Science: Academic Press Ltd, London, 2000; P. 259–265.
5. *Cheng E.* Purification of coagulation factor VIII by liquid chromatography. **Journal Blood Disord Transfusion**, 2016; 7(4): 82.
6. *Danysh T., Voronyak M., Dultseva N., Shurko N.* Synthesis of silica-based sorbents with active triazine dyes as ligands. **Visnyk of Lviv University. Biology Series**, 2008; 47: 63–69. (In Ukrainian).
7. *Danysh T.V.* Synthesis of dye-ligand affinity sorbents suitable for obtain and purification of blood coagulation factor. **Journal the Animal Biology**, 2009; 11(1–2): 355–359. (In Ukrainian).
8. *Denizli A., Pişkin E.* Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2001, 30;49(1–3): 391–416.
9. *Denizli A.* Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, 2011; 39 (4): 315–341.
10. *Larsson P.-O.* High-performance liquid affinity chromatography. **Journal Methods in Enzymology**, 1984, 104: 213–223.

11. *Osterman L.A. Chromatography of proteins and nucleic acids.* Moscow: Nauka, 1985. 536 p. (In Russian).
12. Pat. EP 1885486 B1. **Affinity adsorbents for factor VIII and von Willebrand's factor.** *Jason R. B., Badley S.* – CA2607858A1, CA2607858C, Filed: April 09.05.2006; Publ. 23.03.2016.
13. *Read S.M., Northcote D.H.* Minimization of variation in the response to different proteins of the Commssie Blue G Dye-binding assay for proteins. **Analytical Biochemistry**, 1981; 116(1): 53–64.
14. *Rodrigues S., Verinaud C.I., Oliveira D.S.* et al. Purification of coagulation factor VIII by immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2015, 62(3): 343–348.
15. *Ro Sen S., Casoni Chiaroi M.* Determination of factor VIII activity in plasma and concentrates: comparison between methods. **American Clinical Laboratory**, 2002: 32–37.
16. *Shurko N.O., Danysh T.V.* Negative affinity chromatography as the method purification of factor VIII. **Clin. Chem. Lab. Med**, 2014; 52: 914.
17. *Sparrow R.L., Greening D.W., Simpson R.J.* A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma. **Methods in Molecular Biology**, 2011; 728: 259–265.
18. *Turkova J.* **Affinity chromatography.** Moscow: Mir, 1980. 472 p. (In Russian).

APPLICATION OF DYE-LIGAND CHROMATOGRAPHY FOR PURIFICATION OF COAGULATION FACTOR VIII

N. O. Shurko, T. V. Danysh, M. I. Voronyak

*SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine"
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

The problem of processing of donor plasma for creating an effective medications is important. Nowadays a big number of methods for fractionation of plasma separation and purification components, especially coagulation factors and fibrinolysis were described. The methods of biospecific chromatography are especially attractive. The chromatographic purification of factor VIII is a trouble due to potential risks of activation and instability in the presence of plasma proteases. The anion exchange, gel-filtration and affinity chromatography are widely used for purification of coagulation factor VIII. The synthetic active triazine dyes have a number of advantages as ligands. We explored the possibility of using dye-ligand affinity chromatography on silica carriers for the isolation and purification of clotting factor VIII. The results of studies of sorption this factor with different chromatographic sorbents and the method of its purification from cryoprecipitate by binding of additional proteins on Diasorb aminopropyl with immobilized triazine active dyes are described. As a result of this work, we have selected a group of sorbents are the best for purification of factor VIII of blood coagulation: Diasorb-Active scarlet damask 4GT, Diasorb-Procion gelb M4R, Diasorb-Procion blue HB, Diasorb-Procion blue MXR and Diasorb-Active bright blue K. The purification of factor VIII occurred due to the phenomenon of negative affinity chromatography. The specific activity of factor increased approximately tenfold.

Keywords: blood coagulation factor VIII, affinity chromatography, triazine active dyes.

Одержано: 06.12.2016