

ВИКОРИСТАННЯ СОЛЬВЕНТ-ДЕТЕРГЕНТНОГО МЕТОДУ ПРОТИВІРУСНОЇ ОБРОБКИ ПРИ ОДЕРЖАННІ ПРЕПАРАТІВ ПЛАЗМИ КРОВІ

М.І. Вороняк, Т.В. Даниш

Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України», Львів

Резюме. Створена технологічна схема одержання препаратів згортання крові та фібринолізу з фракцій I, II+III та III плазми крові за Коном, яка включає попереднє фракціонування, сольвент-детергентну обробку та афінну хроматографію на кремнеземному сорбенті. Дана схема дозволила одержати високоактивні з високим рівнем антивірусної безпеки препарати, придатні в діагностичних чи лікувальних цілях.

Ключові слова: плазма крові, фракціонування за Коном, афінна хроматографія, сольвентно-детергентна обробка, лікувальні та діагностичні препарати.

ПРИМЕНЕНИЕ СОЛЬВЕНТ-ДЕТЕРГЕНТНОГО МЕТОДА АНТИВИРУСНОЙ ОБРАБОТКИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПРЕПАРАТОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

М.И. Вороняк, Т.В. Даныш

Резюме. Создана технологическая схема получения препаратов свертывания крови и фибринолиза из фракций I, II+III и III плазмы крови по Кону, которая включает предварительное фракционирование, сольвент-детергентную обработку и аффинную хроматографию на кремнеземном сорбенте. Данная схема позволила получить высокоактивные с высоким уровнем антивирусной безопасности препараты, пригодные для диагностических или лечебных целей.

Ключевые слова: плазма крови, фракционирование по Кону, аффинная хроматография, сольвентно-детергентная обработка, лечебные и диагностические препараты.

USING OF SOLVENT-DETERGENT METHOD AS ANTIVIRAL TREATMENT FOR BLOOD PLASMA PREPARATIONS.

M.I. Voronyak, T.V. Danysh

Summary. Technological process of receipt of blood coagulation and fibrinolytic factors from plasma Kohn fractions I, II+III and III, which includes the previous fractionating, solvent-detergent treatment and affinity chromatography on silica sorbents was created. This chart allowed to get high activity with high anti-virus strength security preparations, suitable in diagnostic or medical aims.

Key words: blood plasma, Kohn fractionating, affinity chromatography, solvent-detergent treatment, medical and diagnostic preparations.

Адреса для листування:

Вороняк М.І., Львів, 79044

вул. ген. Чупринки, 45

Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України

E-mail: dtaras@litech.lviv.ua

ВСТУП

Згідно сучасних 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 крові ефективніше, економічно обґрунтоване та безпечніше [1].

На сьогоднішній день традиційні методи фракціонування плазми за Коном вдало поєднують з сучасними хроматографічними методами одержання білкових препаратів. Завдяки цьому в промислових масштабах одержують ряд достатньо очищених препаратів крові [2, 3].

Але якщо в минулому основна увага приділялась методам одержання та збереження активності препаратів крові, то останніми роками на перше місце вийшла проблема противірусної безпеки, так як спиртовий метод фракціонування Кона практично не впливає на активність вірусів,

особливо таких патогенних як віруси гепатитів, ВІЛ, герпесу, цитомегаловірусів, токсоплазмозу і т.д.

На даний момент ідентифіковано понад 30 000 вірусів. Багато з них є патогенними для людського організму й можуть існувати в крові та передаватись при трансфузії препаратів крові. І такий перелік, на жаль, із кожним днем поповнюється. Тому важливим завданням є розробка надійних методів інактивації відомих вірусів. Ці методи потенційно здатні також знизити ризик передачі інших вірусів, про існування яких на сьогоднішній день не відомо.

Все більшого поширення набуває метод сольвент-детергентної (СД) інактивації вірусів, розроблений Нью-Йоркським Центром Крові у 1985 році [4]. Суть методу полягає в додаванні до робочих розчинів на певних етапах фракціонування неіонного детергенту та розчинника, які руйнують перш за все ліпідні оболонки вірусів, інактивуючи їх. Введений в виробничі процеси, метод

продемонстрував високий рівень інактивації оболонкових вірусів (HIV, HBV, HCV, HGV, CMV, поліомієліту, везикулярного стоматиту, Кассакі та ін), і в той же час характеризувався високим виходом препаратів крові [5–7]. Зараз СД метод застосовують у світі близько 80 потужних фірм-виробників, які виготовляють близько 30 різних препаратів з плазми крові. Причиною широкого поширення даного методу є його висока здатність інактивації оболонкових вірусів, «м'які» умови обробки, які не впливають на лабільні білкові фактори, простота виконання. Ці переваги дозволяють легко та швидко налагодити застосування СД методу. Успішно впроваджено даний метод при виділенні імуноглобулінів [8].

Контрольні клінічні дослідження препаратів факторів зсідання, одержаних із використанням СД-методу, продемонстрували, що при застосуванні понад 20 мільйонів одиниць препаратів не було зареєстровано жодних ознак трансмісії вірусів гепатиту В, гепатиту С та ВІЛ [9]. Згідно матеріалів останніх років [10, 11] СД свіжо-заморожена плазма має перевагу у застосуванні перед плазмою без СД-обробки, оскільки за 10 років її застосування не спостерігалось випадків захворювання TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury — Посттрансфузійної гострої легенової недостатності). В модельних експериментах продемонстрована ефективність СД-методу для інактивації SARS-CoV вірусу — високопатогенного оболонкового коронавірусу, який викликав близько 8000 інфікувань людей з летальним завершенням у 800 осіб протягом 2002–2003 р. [12]. На сьогодні найбільш ефективно застосовуються як сольвент три(*n*-бутил)фосфат, який має найслабший білокденатуруючий ефект, а як детергент — Тритон X-100, Твін-80 та інші, в основному поліоксиетилєнові нейонні детергенти. Інактивуюча можливість комбінації таких речовин значна, вона здійснюється швидко й незворотно. Проте, слід відзначити, що при СД обробці зменшується активність деяких компонентів плазми (зокрема факторів зсідання V, VIII, α_2 -антиплазміну, антитрипсину) [13,14].

При застосуванні СД-методу в технологічних процесах виробництва препаратів плазми крові необхідно вирішити наступні проблеми:

1) підібрати такі реагенти та умови застосування методу, щоб це мінімально впливало на вихід одержуваного препарату;

2) на якому етапі процедури одержання того чи іншого препарату застосувати антивірусну обробку, не допустивши зниження рівня антивірусної безпеки процесу фракціонування та якості одержуваних препаратів;

3) спосіб видалення сольвенту та детергенту (потенційних токсичних агентів) для недопущення присутності цих речовин у готових препаратах.

Найефективнішим серед різноманітних хроматографічних процедур є метод афінної хроматографії, який дозволяє після проведення СД-об-

робки одержувати високоактивні білкові препарати без домішок сольвенту та детергенту.

Співробітниками нашого інституту було продемонстровано можливість використання модифікованих кремнеземних сорбентів для отримання високоочищених білків — трипсину, урокінази, аprotиніну, протромбінового комплексу, плазміногену, плазміну, антитромбіну III, тромбіну [15–20].

Основною перевагою кремнеземних сорбентів над органічними є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації. Деякі з синтезованих нами біоспецифічних сорбентів на основі силехромів вже більше десяти років використовуються у лабораторному виробництві без втрати своїх фізико-хімічних властивостей. Це свідчить про те, що сорбенти такого типу з успіхом можуть використовуватись в інтенсивних виробництвах препаратів, подібних до тих, які здійснюються на станціях переливання крові та заводах по випуску білкових препаратів.

Мета роботи — було включити етап сольвент-детергентної антивірусної обробки у створену нами схему виділення та очищення факторів згортання крові та фібринолізу, не знижуючи при цьому якості кінцевих продуктів.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вихідною сировиною для одержання препаратів були фракції I, II+III або III плазми крові за Коном. В якості матриці хроматографічних сорбентів використовували Діасорб амінопропіловий (модифікований макропористий γ -амінопропілтриєтоксисиланом кремнеземний сорбент; розмір гранул 0,25–0,50 мкм, ЗАТ БиоХимМак-Ст, Росія). Афінним лігандом служив тріазиновий барвник Procion Blue H-B. Як реагенти при сольвент-детергентній обробці застосовували детергент Тритон X-100 та органічний розчинник три(*n*-бутил)фосфат. В роботі також використовували тріс-оксиметиламінометан, додецилсульфат натрію, N,N,N',N'-тетраметил-етилєندیамін, полієтиленгліколь ПЕГ-6000 («Acros Organics», Бельгія), мертіолат (препарат «тімеросал»), кумасці діамантовий голубий G-250 та R-250 («Ferak Berlin», Німеччина), N,N'-метилєн-бісакриламід, акриламід, амонію персульфат — («Merck», Німеччина), інші реактиви кваліфікації «чда» та «хч».

У схемі фракціонування фракцію III за Коном після етапу осадження до одержаного супернатанту додавали тритон X-100 і трибутилфосфат до кінцевої концентрації I і 0,5–1,0%, відповідно. Фракціонування продовжували до одержання концентрату факторів протромбінового комплексу, який використовували для подальшого очищення з метою одержання окремих факторів згортання крові. Надосадкову рідину на етапі одержання концентрату факторів протромбінового комплексу заморожували при -30°C і використовували у подальшому для виділення плазміногену і плазміну.

Результати та їх обговорення. Вагомою проблемою застосування сольвент-детергентного 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.

Обробка розчинів сольвент-детергентним методом приводить до утворення міцелярних структур, відділити які від розчину білка є непростим завданням. Проте ця проблема досить успішно вирішена за рахунок видалення СД-реагентів з білкових розчинів такими методами як: фазовий розподіл, переосадження, фільтрація чи діаліз, різноманітні хроматографічні процедури (гідрофобна, афінна, гель-проникна).

Методи переосадження білків хоча і дозволяють одержувати білкові розчини без наявності в них СД-компонентів, з іншої сторони, часто призводять до зміни структурних і біологічних властивостей препаратів. Діаліз — ефективний, але довготривалий процес, внаслідок якого можливі часткова денатурація чи зміни активності білкових факторів плазми крові. Методи фільтрації для відділення СД-реагентів застосовуються доволі успішно, проте вимагають використання на сьогоднішній день малодоступних нанофільтрів.

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

Нашими дослідженнями показано, що додавання тритону Х-100 і трибутилфосфату на активність факторів згортання крові та фібринолізу практично не впливають і в той же час в процесі хроматографічного очищення препаратів відбувається повне видалення сольвенту та детергенту.

ВИСНОВКИ

Включення сольвентно-детергентного методу в схему фракціонування плазми крові у поєднанні з ефективними хроматографічними етапами біоспецифічного виділення та очищення факторів згортання крові та фібринолізу дозволяє отримувати препарати високого ступеня чистоти, безпечні у застосуванні стосовно можливої вірусної контамінації. Такі препарати після проведених досліджень можуть бути використані в якості діагностичних чи лікувальних.

ЛІТЕРАТУРА

(в редакції)