

species due to the localization of its populations at different hypsometric levels. The study demonstrated that differences in living conditions also affected the duration of functioning of rosette leaves. In species with lower hypsometric growth levels (*G. lutea* and *G. punctata*) only immature plants belong to the group of evergreen plants, and in the alpine species of *G. acaulis* - plants of all stages of ontogenesis. This allows plants to carry out photosynthesis immediately after the snow melts. The research findings reveal that the growing conditions also affected the morphology and anatomy of underground organs, which in *G. lutea* and *G. punctata* are represented by perennial additional storage roots with strong parenchymal secondary wood and interxylary phloem. In *G. acaulis*, the root system is represented by thin additional roots, which are characterized by moderate parenchymatization of the secondary phloem and xylem. Accordingly, it affects the storage of nutrients, the depot of which in *G. lutea* and *G. punctata* has a root system, and in *G. acaulis* - a rosette of leaves. The peculiarity of these species is the absence of root hairs, which is compensated by the development of arbuscular mycorrhiza, which is the result of symbiosis with glomus fungi (Glomeromycota).

Key words: *G. lutea*, *G. punctata*, *G. acaulis*, adaptation strategies, morphology, physiology, anatomy.

Надійшла 06.05.2020.

УДК: 612.115-083-001.8

doi: 10.25128/2078-2357.20.1-2.14

Н. О. ШУРКО, В. Л. НОВАК

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів, 79057
e-mail: natalia_shurko@ukr.net

МЕТОДОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ОДЕРЖАННЯ ФАКТОРА VIII ЗСІДАННЯ КРОВІ

Проведено аналіз і систематизацію даних літератури щодо основних технологій одержання фактора VIII (FVIII) зсідання крові.

Відзначено, що традиційні методи виділення FVIII включають стадії осадження, що були спрямовані на усунення білкових домішок, таких як фібриноген, фібрoneктин та імуноглобуліни. Встановлено, що використання хроматографічних методів у технології виведення FVIII дозволило отримати препарати високого рівня чистоти та питомої активності.

Ключові слова: зсідання, плазма, фактор VIII (FVIII), розділення.

Фактор зсідання крові VIII (FVIII) – це неферментативний кофактор активованого фактора IX (FIXa), що належить до високомолекулярних білків (молекулярна маса FVIII приблизно 330 кДа) та нестабільний через можливі процеси активації/інактивації [14]. У плазмі крові людини FVIII знаходиться в концентрації 1–2 мг/мл, стабільний при рН 6,5–8,5, ізoeлектрична точка є в межах 6,95–7,02. 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. Плазмові препарати є дешевші у порівнянні з рекомбінантними, проте не можуть гарантувати абсолютну вірусну безпеку. З іншого боку відмічено, що ризик розвитку інгібіторних антитіл до FVIII рекомбінантного зразка майже удвічі вищий (27,4 %), ніж для плазмових препаратів (14,3 %) [15].

Безумовно, білки плазми крові, що знаходяться у значно вищій концентрації, чи ті, що проявляють подібні фізико-хімічні властивості, заважають очищенню FVIII. Проведення попередніх етапів осадження/ преципітації нецільових білків не тільки полегшує процес виділення бажаного білка (FVIII), але й покращує його аналітичні характеристики, оскільки

усунення природних інгібіторів чи активаторів даного білка впливає на характеристику кінцевого продукту.

Метою рукопису було проведення аналізу і систематизації даних літератури щодо основних технологій одержання препаратів FVIII зсідання крові в поєднанні класичних (фракціонування) та сучасних (хроматографічних) методів очищення.

Очищення фактора VIII методом іонообмінної хроматографії. Наявність великої кількості нецільових білків ускладнює процес очищення, тому при одержанні FVIII із загальної суміші проводять їх попереднє видалення. Серед відомих методів використовують осадження, екстракцію, преципітацію тощо [4, 5]. Іонообмінна хроматографія є основним методом при одержанні комерційних препаратів FVIII [4, 10, 16].

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 хелатну структуру типу Fractogel® EMD-SO3 і Fractogel® EMD COOH (Merck) [16].

A. Fuare та співавтори [9] очищали FVIII з плазми крові донорів на аніоніті, що має гідрофобні властивості завдяки гексильним залишкам (AH-Sepharose).

T. Burnouf та співавтори [4] описують розроблену процедуру очищення FVIII з кріопреципітату методом іонообмінної хроматографії на DEAE-Fractogel TSK 650 M. Вихід кінцевого продукту становив до 55–65%, ступінь очищення 12000 раз. В іншій роботі ці ж автори для отримання очищеного FVIII використовували свіжу або свіжозаморожену плазму [5]. Перед очищенням на алюмінію гідрооксиді 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 буфера.

P. Harrison та співавтори описують очищення комплексу VIII:C/vWF методом хроматографії на декстран-сульфат-сефарозі [10]. Вихід FVIII був в межах 40 %. Описано також спосіб отримання FVIII, де зазначається, що матриці гелю вінілового полімеру, які містять DEAE групи з гідрофобними властивостями, мають особливу здатність адсорбувати великі білкові молекули та комплекси (FVIII, FVIII/vWF) [10]. У своїй роботі дослідники використовували Fractogel TSK-DEAE 650 (M) (Merck).

У роботі M. 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 [17].

M. Poulle та P. Bonneel описали метод очищення FVIII на іонообміннику Fractogel® TSK-DEAE 650 (DEAE-Toyopearl®, Tosoh Bioscience). Елюцію проводили селективно, за рахунок збільшення іонної сили буфера. Проте, такий метод, поряд з очищенням FVIII, не дає можливості отримати очищений vWF, який відіграє важливу роль в гемостазі [19].

Y. Linnau і W. Schoenhofer в ролі катіоніта застосовували смоли з карбоксильними чи сульфогідрильними-групами: S- чи DM-Sepharose (Amersham Pharmacia), Fractogel EMD-SO3– чи COO– (Merck, Darmstadt) або SP- чи CM-Toyopearl (Tosohaas). У якості вихідного матеріалу використовували плазму або її фракції (Кріопреципітат, фракцію I за Коном тощо) [18].

У роботі [1] 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, тому часто в процесі виробництва оминають цей етап.

E. S. Rodrigues 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) [21].

Окремі повідомлення стосуються очищення FVIII людини безпосередньо з плазми з використанням аніонообмінної хроматографії з наступною гель-фільтрацією [8]. 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.

Інші дослідники отримували препарат FVIII методом аніонообмінної хроматографії на Fractogel EMD TMAE з відновленням активності 86% [20].

Хроматографічне очищення FVIII є складним процесом через потенційний ризик активації в процесі очищення та нестабільність під дією протеаз плазми крові. Процес вибору хроматографічної матриці, що зможе забезпечити достатнє специфічне зв'язування фактора, є складним та вимагає постійного пошуку та дослідження.

Отримання фактора VIII методом афінної хроматографії. Однією з найбільш характерних властивостей білкових молекул є їх здатність зворотно зв'язувати інші речовини. Утворення специфічних дисоційованих комплексів біологічних макромолекул лежить в основі афінної хроматографії [5, 7, 11, 13, 23].

Впродовж 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 біоліганди приєднували до агарозних гелів, що відігравали роль матриць. Проте, у деяких випадках селективність цих лігандів (наприклад, гепарину або декстран-сульфату) є недостатньою через спорідненість зв'язування до низки різних білків [4]. Використання таких неспецифічних лігандів може вимагати застосування додаткових стадій очищення або розробки оптимальних умов елюції, щоб ізолювати білки-мішені, усуваючи білки-домішки. Так, у літературі є 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 [10].

У роботі описано використання іншого афінного ліганду, диметиламінопропілкарбамоїлпентилу [23]. Проте подальші дослідження показали неможливість відновлення з такої плазми інших терапевтичних білків, що, безумовно, робить неприйнятним застосування такого методу хроматографії, оскільки, у першу чергу, з економічної точки зору, з одного пулу плазми повинні бути вилучені кілька терапевтичних продуктів.

Групою авторів запропоновано певного роду оптимізацію процесу отримання FVIII з плазми з афінним сорбентом диметиламінопропіл-карбамоїлпентил-сефарозою CL-4B (матриця C₃-C₅). Спочатку застосовується хроматографія плазми на аніоніті DEAE-сефадексі A-50, щоб відокремити ряд білків, у 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 [13]. Вихід фактора становив 50–65%.

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, кріопреципиту чи рекомбінантного зразка. Для очищення плазмового чи рекомбінантного FVIII використовується іммобілізована метал-іонна афінна хроматографія [21].

Досягнення в галузі культур клітин гібридом та отримання моноклональних антитіл відкрило новий метод імуноафінності [12]. Хоча антитіла, які застосовуються як ліганди в афінній хроматографії, мають велику стійкість до діапазонів низьких значень pH, проте вони здатні утворювати агрегати, що зумовлює використання додаткової стадії хроматографії для їх видалення, тим самим збільшуючи вартість їх виробництва [2]. 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 (у 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 [22]. Імуноафінні процедури очищення FVIII сприяють вірусній безпеці, але не вважаються настільки надійними, як процеси видалення та інактивації, оскільки видалення вірусів за допомогою хроматографії важко передбачити і контролювати. Недоліком цього методу є також використання мишачих антитіл, які можуть вилугуватись і, отже, повинні бути усунені шляхом наступної стадії адсорбційної хроматографії.

Наступним кроком у галузі афінних лігандів було створення нових синтетичних і біосинтетичних лігандів і матриць [11]. Афінні ліганди змінювались від ферментативних субстратів, коферментів, гормонів, лектинів, кофакторів, антитіл, нуклеїнових кислот, ефекторів та інгібіторів різних пептидів до поліпептидів, пептидних фрагментів, а також інших синтетичних структур. Так, 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) [7]. 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 [7].

Більшість із зареєстрованих препаратів FVIII розроблені для лікування гемофілії А, і, відповідно, мають низький вміст vWF. Молекула vWF захищає FVIII від протеолітичної дегратації, продовжуючи період його піврозпаду (півжиття FVIII у комплексі становить 10–12 год, а в дисоційованому стані – до 2,5 год). У роботі [3] наведено результати створення нового класу препаратів FVIII (BIVV001), як унікального білка, що складається з домену D'D3 vWF, приєднаного до рекомбінантного FVIII (rFVIII) через Fc домен імуноглобуліну G1 та 2-ох поліпептидів XTEN. BIVV001 – це перший препарат rFVIII з можливістю істотно зміни парадигми лікування важкої гемофілії А, забезпечуючи оптимальний захист від усіх типів кровотечі, з меншими періодами введення [3].

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 та матриць.

Висновки

Технологія отримання препаратів FVIII передбачає поєднання класичних та хроматографічних методів, що суттєво підвищує якісні та кількісні характеристики готового продукту. Традиційні методи виробництва FVIII включали стадії осадження, які були спрямовані на усунення білкових домішок. Використання хроматографічних методів дозволило отримати препарати FVIII високого рівня чистоти та питомої активності.

1. Сравнение двух альтернативных методов хроматографической очистки при получении препарата VIII фактора свертывания плазмы крови человека в дозировке 500 единиц/флакон / А. В. Ямкин и др. *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2011. № 2–2, (26). С. 49–55.
2. 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. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.032.
3. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice / Chhabra E. S., Liu T., Kulman J., S. Patarroyo-White, B. Yang, Q. Lu et al. *Blood*. 2020. 135. (17). P.1484–1496.
4. Burnouf T., Burnouf-Radosevich M., Huart J. J., Goudemand M. A highly purified factor VIII:C concentrate pre-pared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography. *Vox Sang*. 1991. Vol. 60. (S1). P. 8–15. 3–15. doi:10.1111/j.1423-0410.1991.tb00864.x
5. 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., London. 20.
6. 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. doi:10.1002/bit.20124.

7. 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. doi:10.1021/jm070304x.
8. 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. doi:10.1111/j.1365-2516.2007.01573.x.
9. Fuare A., Caron M., Tepenier D. Improved buffer for the chromatographic separation of Factor VIII coagulant. *Journal of Chromatography*. 1983. 257. P. 387–391. doi:10.1016/S0021-9673(01)88196-6.
10. 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. doi: 10.1016/0049-3848(88)90230-7.
11. 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. doi:10.1016/s1570-0232(03)00098-9.
12. 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. doi:10.1111/hae.12421.
13. 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.Köng. *J Chromatogr*. 1990. 9. 503 (1). P. 103–114. doi: 10.1016/S0021-9673(01)81494-1.
14. Mazurkiewicz-Pisarek A., Płucienniczak G., Ciach T., Płucienniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biologica polonica*. 2016. 63 (1). P. 11–16. doi: 10.18388/abp.2015_1056.
15. 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. doi: 10.2450/2013.011s.
16. Pat. US 20050239171 A1. Method for purifying factor VIII/vWF-complex by means of cation exchange chromatography // Mitterer A., Fischer B., Schonberger O., Thomas-Urban K., Dorner F., Eibl J. - Appl. 10/789,562 ; Fild 27.02.2004; Publ 27.10.2005.
17. 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.
18. Pat. US 6605222 B1 Method for producing a factor VIII/von Willebrand factor complex / Linnau Y., Schoenhofer W. Baxter Aktiengesellschaft. – Appl. 09/623,245; Fild 25.02.1999; Publ 12.08.2003.
19. Pat. WO2009030866, C07K 1/ 18(2006.01), C07K 14/55(2006.01) Method for purifying the factor VIII and the von Willebrand factor / Poulle M., Bonneel P. LFB-Biotechnologies [FR/FR] – Appl. WO/2009/030866; Fild 28.08.2008; Publ 12.03.2009.
20. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrandfactor concentrates using ion-exchange chromatography / F. Mori, I. Nardini, P. Rossi, C. Nardini, C. Farina. *Vox Sang*. 2008. 95. P. 298–307. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01096.x
21. 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. doi: 10.1002/bab.1276.
22. 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. doi: 10.1021/bi00337a007.
23. 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.

References

1. Sravnenie dvuh alternativnykh metodov hromatograficheskoy ochistki pri poluchenii prepaarta VIII faktora svertivaniya plazmyi krovi cheloveka v dozirovke 500 edinits/flakon / A. V. Yamkin, O. V. Stronin, L. N. Nikitina, N. A. Simenova, A. A. Epanchentseva. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)*. 2011. № 2–2, (26). S. 49–55. [in Russian]
2. 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. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.11.032.
3. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice / Chhabra E. S., Liu T., Kulman J., S. Patarroyo-White, B. Yang, Q. Lu et al. *Blood*. 2020. 135. (17). P.1484–1496.
4. Burnouf T., Burnouf-Radosevich M., Huart J. J., Goudemand M. A highly purified factor VIII:C concentrate pre-prepared from cryoprecipitate by ion-exchange chromatography. *Vox Sang*. 1991. Vol. 60. (S1). P. 8–15. 3–15. doi:10.1111/j.1423-0410.1991.tb00864.x

5. 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., London. 20.
6. 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. doi:10.1002/bit.20124.
7. 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. doi:10.1021/jm070304x.
8. 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. doi:10.1111/j.1365-2516.2007.01573.x.
9. Fuare A., Caron M., Tepenier D. Improved buffer for the chromatographic separation of Factor VIII coagulant. *Journal of Chromatography*. 1983. 257. P. 387–391. doi:10.1016/S0021-9673(01)88196-6.
10. 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. doi: 10.1016/0049-3848(88)90230-7.
11. 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. doi:10.1016/s1570-0232(03)00098-9.
12. 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. doi:10.1111/hae.12421.
13. 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. doi: 10.1016/S0021-9673(01)81494-1.
14. Mazurkiewicz-Pisarek A., Płucienniczak G., Ciach T., Płucienniczak A. The factor VIII protein and its function. *Acta Biologica polonica*. 2016. 63 (1). P. 11–16. doi: 10.18388/abp.2015_1056.
15. 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. doi: 10.2450/2013.011s.
16. Pat. US 20050239171 A1. Method for purifying factor VIII/vWF-complex by means of cation exchange chromatography // Mitterer A., Fischer B., Schonberger O., Thomas-Urban K., Dorner F., Eibl J. - Appl. 10/789,562 ; Fild 27.02.2004; Publ 27.10.2005.
17. 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.
18. Pat. US 6605222 B1 Method for producing a factor VIII/von Willebrand factor complex / Linnau Y., Schoenhofer W. Baxter Aktiengesellschaft. – Appl. 09/623,245; Fild 25.02.1999; Publ 12.08.2003.
19. Pat. WO2009030866, C07K 1/ 18(2006.01), C07K 14/55(2006.01) Method for purifying the factor VIII and the von Willebrand factor / Poulle M., Bonneel P. LFB-Biotechnologies [FR/FR] – Appl. WO/2009/030866; Fild 28.08.2008; Publ 12.03.2009.
20. Progress in large-scale purification of factor VIII/von Willebrandfactor concentrates using ion-exchange chromatography / F. Mori, I. Nardini, P. Rossi, C. Nardini, C. Farina. *Vox Sang*. 2008. 95. P. 298–307. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01096.x
21. 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. doi: 10.1002/bab.1276.
22. 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. doi: 10.1021/bi00337a007.
23. 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.

N. O. Shurko, V. L. Novak

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine», Lviv, Ukraine

METHODOLOGICAL APPROACHES TO FACTOR VIII COAGULATION

The article deals with basic methods used by modern technology to obtain coagulation factor VIII (FVIII).

The blood plasma fractionation remains the only biotechnological approach to make life-saving protein therapy to treat human diseases. The biological medicines from human plasma play a vital role in the treatment of patients with different diseases. These products include a range of coagulation

factors (FVIII, FIX, the prothrombin complex, Von Willebrand factor, fibrinogen etc.), immunoglobulins, protease inhibitors, anticoagulants and albumin.

Four plasma proteins are commercially important for production: albumin, IgG, factor VIII, and factor IX. VIII is a coagulation factor in the blood, which is missing or defective in patients with Hemophilia A. Replacement therapy with FVIII concentrates constitutes the basis for hemophilia care.

Cryoprecipitate was described in the mid 60's of the XX century as a first concentrate of antihemophilic FVIII. The main indications for the clinical use of cryoprecipitate were hypofibrinogenemia or disfibrinogenemia. Previously, cryoprecipitate was used for treatment of hemophilia A and von Willebrand's disease.

Traditional FVIII production methods included deposition steps, which were aimed at elimination of protein impurities such as fibrinogen, fibronectin and immunoglobulins. These technologies could use the combination of methods at low temperatures or the addition of protein precipitating substances (PEG, polyvinylpyrrolidone, dextran, ficol, percol etc.). Using chromatographic methods in FVIII production technology allowed receiving high purity and specific activity concentrate of FVIII. Ion exchange chromatography techniques are often used in order to isolate coagulation FVIII. These techniques include methods of affinity chromatography as well as the use of monoclonal antibodies to bind of FVIII.

Nowadays, production of plasma concentrate of FVIII is used in combination with different chromatographic techniques.

Key words: coagulation, plasma, factor VIII (FVIII), separation.

Надійшла 13.05.2020.