



УДК 615.012.8

*Н.В. Скворцов, В.О. Самойлов,  
И.В. Ларионов, А.Г. Болдырев***ЭФФЕКТИВНЫЙ СОРБЕНТ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ ЭНДОТОКСИНА  
В БИОПРЕПАРАТАХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ГЕНЕЗА  
И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ***N.V. Skvortsov<sup>1</sup>, V.O. Samoilov<sup>1</sup>,  
I.V. Larionov<sup>2</sup>, A.G. Boldyrev<sup>2</sup>*<sup>1</sup> St. Petersburg State Polytechnical University,  
29 Politekhnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.<sup>2</sup>State Scientific-Research Institute of Pure Biochemicals,  
7 Pudozhskaya St. St. Petersburg, 197110, Russia.**AN EFFECTIVE SORBENT FOR ELIMINATION ENDOTOXIN  
IN BIOLOGICAL PRODUCTS OF GENETICALLY ENGINEERED GENESIS  
AND BIOLOGICAL LIQUIDS**

Разработан сорбент, предназначенный для элиминации эндотоксина в биологических жидкостях и биопрепаратах, полученных методами генной инженерии. В качестве основы сорбента используется высокопроницаемая биосовместимая матрица на основе регенерированной целлюлозы. Оценена эффективность сорбента при сорбции эндотоксина из модельных сред и растворов белка.

**СОРБЕНТ, ЭЛИМИНАЦИЯ, ЭНДОТОКСИН, БИОПРЕПАРАТЫ, ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, РАСТВОР БЕЛКА, БИОСОВМЕСТИМАЯ МАТРИЦА.**

An effective sorbent designed to eliminate endotoxin from biological fluids and products has been developed. A highly permeable biocompatible matrix based on regenerated cellulose was used as a base of the sorbent. The efficiency of the sorbent for endotoxin from model solutions and protein solutions were estimated.

**SORBENT, ELIMINATION, ENDOTOXIN, BIOLOGICAL PRODUCTS, GENETIC ENGINEERING, PROTEIN SOLUTION, BIOCOMPATIBLE MATRIX.**

Разработка сорбционных материалов и их разнообразное применение является одним из основных направлений биотехнологии и в смежных науках. В биохимии это выделение и очистка веществ, в области экологии – мониторинг окружающей среды, в медицине и медицинской промышленности это финишная очистка биопрепаратов, приемы эфферентной терапии [1]. Последнее направление следует рассматривать как особую область применения сорбентов, поскольку они в этом случае, в рамках процессов энтеро-, гемо- и ликво-

росорбции, выступают непосредственно в качестве терапевтического средства.

В связи с очень высокими требованиями к чистоте биотехнологических и особенно фармацевтических продуктов, сорбционные технологии (хроматографические методы) по существу являются единственным подходом, обеспечивающим достаточный уровень индивидуальности и чистоты препаратов.

Целью данной статьи является описание экспериментов, ориентированных на элиминацию липополисахарида (ЛПС) в био-

препаратах и биологических жидкостях, с использованием сорбента Сфероцелл С80. Этот сорбент обладает комплексом свойств, включающим высокую селективность, обратимость и большую емкость сорбции по ЛПС, а также механическую стабильность и способность к многократному использованию.

Основу сорбента составляет универсальная матрица Сфероцелл, разработанная в лаборатории сорбентов и носителей Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов. Матрица характеризуется высокой проницаемостью, достаточной гидродинамической жесткостью, низким уровнем неспецифических взаимодействий. На ее базе создан ряд высокочистых сорбентов ионообменного, аффинного и гидрофобного типов, разработаны эффективные хроматографические процессы выделения биологически активных веществ [2].

Одной из центральных задач получения высокочистых биопрепаратов генноинженерного происхождения является элиминация в них высокотоксичного липополисахарида (эндотоксина). Фармакопеи Всемирной организации здравоохранения рекомендуют лимитировать содержание эндотоксина в лекарственных формах внутривенного назначения пределом 0,5 ppm ( $\text{млн}^{-1}$ ). Превышение этого предела в препарате может приводить к развитию септического шока у пациентов [3, 4].

В настоящее время этот процесс элиминации ЛПС реализуется, как правило, с помощью уникального сорбента – Полимиксин Б сефарозы. В этом сорбенте в качестве матрицы носителя (основы сорбента) выступает гранулированный вариант высокопроницаемой сшитой сефарозы-6б, в качестве аффинанта – Полимиксин Б, иммобилизованный на матрицу, – нативный вариант бактериального антибиотика. Этот сорбент представляет собой сложный молекулярный фрагмент со специфическим гидрофобно-гидрофильным балансом. Полимиксин Б является эффективным аффинантом для связывания ЛПС, при этом адсорбционную активность Полимиксина естественно связать с наличием в нем ги-

дрофобной компоненты. Сфероцелл 80 в качестве аффинанта также включает гидрофобный фрагмент. Именно благодаря ему сорбент демонстрирует высокую эффективность связывания ЛПС, обеспечивает высокие емкостные показатели. Так например, он позволяет получать моноклональные антитела, содержащие менее 0,625 ЕУ/мл ЛПС, из препарата с исходной концентрацией ЛПС от 20 до 100 ЕУ.

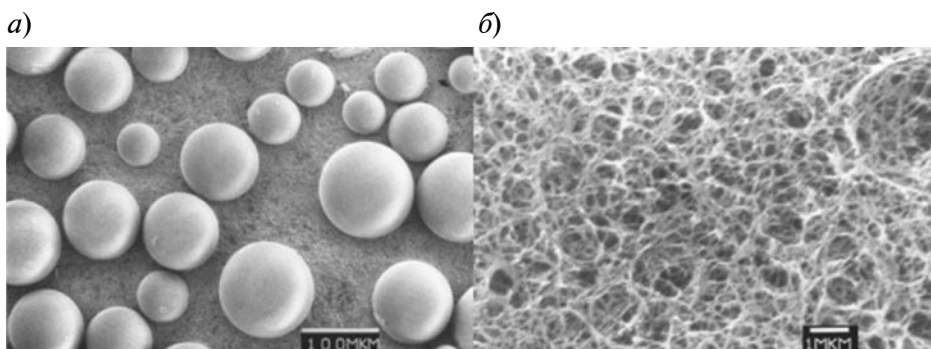
Однако используемый в прототипе аффинант – Полимиксин Б содержит в своей структуре, наряду с высокоспецифичным гидрофобным молекулярным фрагментом, массивный ионогенный фрагмент, включающий большое количество легко ионизируемых групп  $\text{NH}_2$ , а также карбоновых фрагментов, что приводит к значительной фоновой сорбции белков по ионообменному механизму. В результате при очистке бычьей каталазы на сорбенте теряется до 25 % целевого белка, а при очистке БСА – до 20 % [5].

Наряду с указанным недостатком этого сорбента, в качестве дополнительного следует указать на относительно низкий уровень проницаемости матрицы-носителя этого сорбента – сефарозы-6б, что, с учетом склонности ЛПС к образованию сложных ассоциатов с большими надмолекулярными размерами [5], затрудняет сорбцию ЛПС в объем зерна сорбента и, следовательно, существенно ограничивает его емкость.

Сорбент Сфероцелл С80 функционально построен аналогично описаному прототипу (Полимиксин Б сефароза). На нейтральную высокопроницаемую гидрофильную матрицу иммобилизованы аффинанты, специфически связывающие ЛПС. При этом используемый лиганд, как будет показано ниже, обладает весьма высоким сродством только к ЛПС.

Оригинальная матрица Сфероцелл, как показал опыт, характеризуется поровой структурой, также эффективной в отношении решаемой задачи.

Особенность высокопроницаемой поровой структуры носителя Сфероцелл (см. рисунок) состоит в том, что распределение пор по размерам бимодально. Существуют транспортные поры с характерным размером



Микрофотографии внешней (а) и внутренней (б) структуры одной гранулы сорбента Сфероцелл (получены методом сканирующей электронной микроскопии)

0,1 – 3,0 мкм (соответствующий удельный объем порового пространства для пор этого типа составляет 0,8 – 0,9), а также «хроматографические» поры с размерами 50 – 300 Å (удельный объем порового пространства для пор этого типа составляет 0,35 – 0,40), измеренные методами ртутной порометрии и эксклюзионной хроматографии соответственно. Наличие большого количества транспортных пор обеспечивает эффективный массоперенос в зерне сорбента для крупномолекулярных объектов, а гидрофобные аффинанты конкурентным образом разрушают ассоциаты ЛПС.

Такая структура носителя позволяет эффективно сорбировать молекулярные компоненты в объем зерна сорбента, в широком интервале размеров – от индивидуальных молекул до крупномасштабных ассоциатов, без потери емкости сорбента, что существенно при работе с ассоциирующимся ЛПС.

Гидрофобные радикалы, выбранные в качестве аффинантов, которые по существу представляют собой эквивалент алифатического фрагмента молекулы ЛПС, обеспечивают их эффективное высокоспецифическое связывание. При этом неспецифическая сорбция, обусловленная наличием ионогенной компоненты в структуре аффинанта прототипа, в этом случае, естественно, отсутствует.

В результате указанных особенностей отчистка препаратов на данном сорбенте, в отличие от отчистки на прототипе, практически не сопровождается потерей целевого белка. При хроматографии на Сфероцелле

С80 потери базового белка не превосходят 5 %. Соответствующие потери Полимиксина Б сефарозы составляют более 25 % [5].

Таким образом, сорбент Сфероцелл С80 по основным целевым эксплуатационным параметрам и характеристикам селективности существенно превосходит свой прототип – Полимиксин Б сефарозу.

В качестве адекватной характеристики сорбента как средства выделения и отчистки целевого компонента удобно использовать коэффициент распределения  $K_p$  для данного конкретного компонента. Величину  $K_p$  получают расчетным путем на основании данных о концентрации целевого компонента (в данном случае ЛПС) до и после завершения процесса сорбции:

$$K_p = C_{ext} / C_{int},$$

где  $C_{ext}$ ,  $C_{int}$  – равновесные концентрации данного компонента во внешнем растворе и в объеме сорбента соответственно.

Данные о концентрации ЛПС (начальной и конечной) получают с использованием хромогенного LAL-теста. Указанный тест представляет собой определение эндотоксинов; LAL – *Limulus Amebocyte Lisate* (лизат амебоцитов *limulus*) [6].

Эксперименты по сорбции проводились в статических условиях путем приготовления растворов ЛПС с определенной концентрацией (в качестве исходного варианта) и/или путем прямого определения концентрации раствора ЛПС до и после сорбции с помощью хромогенного LAL-теста. Второй вариант состоит в разведении экспериментальных препаратов до уровня компетенции

**Коэффициенты распределения  $K_p$  липополисахарида (ЛПС) для сорбента Сфероцелл С80 в альбумине**

Условие получения	$K_p$ для различных концентраций ЛПС		
	10 – 100 нг/мл	100 – 1000 нг/мл	1000 – 10 000 нг/мл
Раствор сорбента в альбумине предварительно выдержан	230	70	50
То же без предварительной выдержки	290	230	160

Примечание: концентрация водного раствора альбумина – 10 %

LAL-теста). Определенные таким образом коэффициенты распределения для Сфероцелла С80 представлены в таблице. По статистическим оценкам в рамках нескольких серий измерений погрешность приводимых величин укладывается в интервал  $\pm 5\%$  от номинала.

Сравнение данных таблицы с литературными данными показывает, что в то время как коэффициент распределения, выражающий предельную степень отчистки препарата в системе «сорбент – раствор белка», составляет для Полимиксина Б сефарозы значение  $K_p = 32 - 160$  [4], для сорбента Сфероцелл С80 этот коэффициент достигает значения 290 (см. таблицу). Результаты были получены на основе прямого тестирования проб после сорбции.

Для оценки селективности и эффективности сорбции ЛПС в условиях гемосорбции (при наличии в системе сопутствующих и конкурирующих белков) проводилась серия сравнительных экспериментов в 10%-м водном растворе альбумина; и эти данные представлены в таблице (также в статических условиях).

При этом емкость сорбента Сфероцелл С80 по ЛПС в условиях конкуренции с альбумином составляет 37000 нг/мл. Это существенно превышает соответствующую величину, характерную для сорбента прототипа.

Представления о характере конкуренции ЛПС и альбумина за адсорбционные

центры можно получить, сопоставив величины, приведенные в таблице.

Для оценки эффективности кратного использования сорбента Сфероцелл С80 был выполнен эксперимент по его регенерации путем отмывки этанолом в аппарате Сокслета. После восьмичасовой отмывки сорбента и стандартной процедуры – тренировки (уравновешивание сорбента в 0,1N растворе кислоты и 0,1N растворе щелочи с заключительной отмывкой водой до нейтральной реакции) показатели емкости изменились незначительно.

Таким образом, данным исследованием показано, что предлагаемая разработка – ЛПС-связывающий сорбент Сфероцелл С80 убедительно превосходит классический прототип по всем важнейшим эксплуатационным и физико-химическим параметрам. К ним относятся максимальная емкость, селективность сорбции, коэффициент распределения (определяет максимальную остаточную концентрацию ЛПС в препарате). В качестве его дополнительных преимуществ следует указать на возможность его многократного применения (с использованием промежуточной стерилизации). В этой же связи важно отметить отсутствие необходимости стерильной сборки колонок в исходном варианте, что обуславливает более низкую цену соответствующих устройств (разница – на порядок).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Черкасов, А.Н. Мембраны и сорбенты в биотехнологии [Текст] / А.Н. Черкасов, В.А. Пасечник. – Л.:Химия, 1991.–239 с.
2. Болдырев, А.Г. Разработка аффинных сорбентов для экстракорпоральной гемокор-

- рекции [Текст] / А.Г. Болдырев, А.А. Соколов, Н.М. Федорова [и др.] // «Фундаментальные и прикладные проблемы биотехнологии и медицины». Матер. Междунар. конф. – СПб., 2000. – С. 78–79.

3. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов [Текст]: сорок шестой доклад; пер. с англ. // Всемирная организация здравоохранения (Женева), Комитет экспертов. — Женева: ВОЗ, 1998. — 120 с.

4. **Trachsel, S.** Association between inflammatory mediators and response to inhaled nitric oxide in a model of endotoxin-induced lung injury [Электронный ресурс] / S. Trachsel, G. Deby-Dupont, E. Maurenbrecher, [et al.] // *Critical Care*. — 2008. — Vol. 12. — № 5. — Режим доступа: [ccforum.com/content/12/5/R131](http://ccforum.com/content/12/5/R131)

content/12/5/R131

5. **Гусаров, Д.А.** Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки [Текст] / Д.А. Гусаров // *Биофармацевтический журнал*. — 2009. — Т. 1. — № 3. — С. 10–17.

6. Associates of Cape Cod, Inc. Описание фирменного LAL теста и инструкция по работе с ним [Электронный ресурс]. Режим доступа: [www.acciusa.com/pdfs/accProduct/inserts/ChromoLAL.pdf](http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/inserts/ChromoLAL.pdf)

#### REFERENCES

1. **Cherkasov A.N., Pasechnik V.A.** Membrany i sorbenty v biotekhnologii. Leningrad, Khimiia, 1991, 239 p. (rus)

2. **Boldyrev A.G., Sokolov A.A., Fedorova N.M. et al.** Razrabotka affinykh sorbentov dlia ekstrakorporal'noigemokorreksii. «Fundamental'nye i prikladnye problemy biotekhnologii i meditsiny». Mater. Mezhdunar. konf, St. Petersburg, 2000, pp. 78–79. (rus)

3. *WHO Expert Committee on Biological Standardization: The 46<sup>th</sup> report.* WHO, Geneva, 1998, 120 p.

4. **Trachsel S., Deby-Dupont G., Maurenbrecher**

**E. et al.** Association between inflammatory mediators and response to inhaled nitric oxide in a model of endotoxin-induced lung injury. *Critical Care*, 2008, Vol. 12, № 5. Available at: [ccforum.com/content/12/5/R131](http://ccforum.com/content/12/5/R131).

5. **Gusarov D.A.** Sposoby ochistki biofarmatsevticheskikh belkov ot endotoksinov kletochnoi stenki. *Biofarmatsevticheskii zhurnal*, 2009, Vol. 1, № 3, pp. 10–17. (rus)

6. Associates of Cape Cod, Inc. Chromo-LAL test Product Info Sheet. Available at: <http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/pisheets/ChromoLAL.pdf>

---

**СКВОРЦОВ Никита Владиславович** — аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
aelu@yandex.ru

**САМОЙЛОВ Владимир Олегович** — член-кор. РАН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
deanery@mphf.spbstu.ru

**ЛАРИОНОВ Иван Владимирович** — аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
larionov\_ivanvl@mail.ru

**БОЛДЫРЕВ Александр Георгиевич** — кандидат технических наук, научный консультант Государственного научно-исследовательского института особых и биопрепаратов.

197110, г. Санкт-Петербург, Пудожская ул., 7  
Doc.Boldyrev@yandex.ru