



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109254** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**G01N 30/02** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 12148**

(22) Дата подання заявки: **17.10.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **10.08.2015**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **25.04.2013, Бюл.№ 8**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.08.2015, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Волков Георгій Леонідович (UA),  
Гаврилюк Сергій Петрович (UA),  
Краснобрига Євгенія Миколаївна (UA),  
Гаврилюк Олена Сергіївна (UA),  
Жукова Анастасія Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "НЕЙТРОМІКС  
УКРАЇНА",  
вул. Мельникова, 12, м. Київ, 04050 (UA)**

(74) Представник:

**Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр.  
№9**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

RU 2332247 C1, 27.08.2008

RU 2352358 C1, 20.04.2009

RU 2197500 C2, 27.01.2003

RU 2411959 C2, 20.02.2011

Johnston A. Inactivation and clearance of  
viruses during the manufacture of high purity  
factor IX/ A. Johnston, A. Macgregor, S.  
Borovec, M. Hattark, K. Stuckly // Biologicals. -  
2000. - Vol. 28- No. 3. - P. 129-136

Kim I.S. Solvent/detergent inactivation and  
chromatographic removal of human  
immunodeficiency virus during the  
manufacturing of a high purity antihemophilic  
factor VIII concentrate/ I.S. Kim, Y.W. Choi,  
H.S. Woo, C.E. Chang, S. Lee // J. Microbiol. -  
2000. - Vol. 38 - No. 3. - P. 187-191

Chromatographic production of human plasma  
proteins factor VIII, albumin and IgG / General  
Electric Company - GE Healthcare Amersham  
Biosciences AB, Uppsala, Sweden. - Ed.  
Elanders Tofters - Sweden - 2005. - P. 1-26

US 20060110399 A1, 25.05.2006

## (54) СПОСІБ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ ВІРУС-ІНАКТИВАЦІЇ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу хроматографічної вірус-інактивації розчину цільового білка, комплексу білків або пептиду, у якому піддають кондиціюванню розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду, здійснюють аплікацію кондиційованого розчину цільового білка,

UA 109254 C2

комплексу білків або пептиду на хроматографічну колонку з адсорбентом зі зв'язуванням білка, комплексу білків або пептиду, промивають адсорбент буфером аплікації, промивають адсорбент буфером інактивації вірусів, який містить розчинник і детергент у буфері аплікації, відмивають адсорбент від розчинника/детергента та продуктів розпаду вірусів буфером аплікації; та елюють розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду з адсорбенту, де зазначений адсорбент являє собою іонообмінний, афінний, обернено-фазовий або адсорбент гідрофобної взаємодії.

**Динамічна ємність адсорбентів, визначена по зв'язуванню бичачого сироваткового альбуміну (БСА), за підвищення швидкості потоку буфера:**

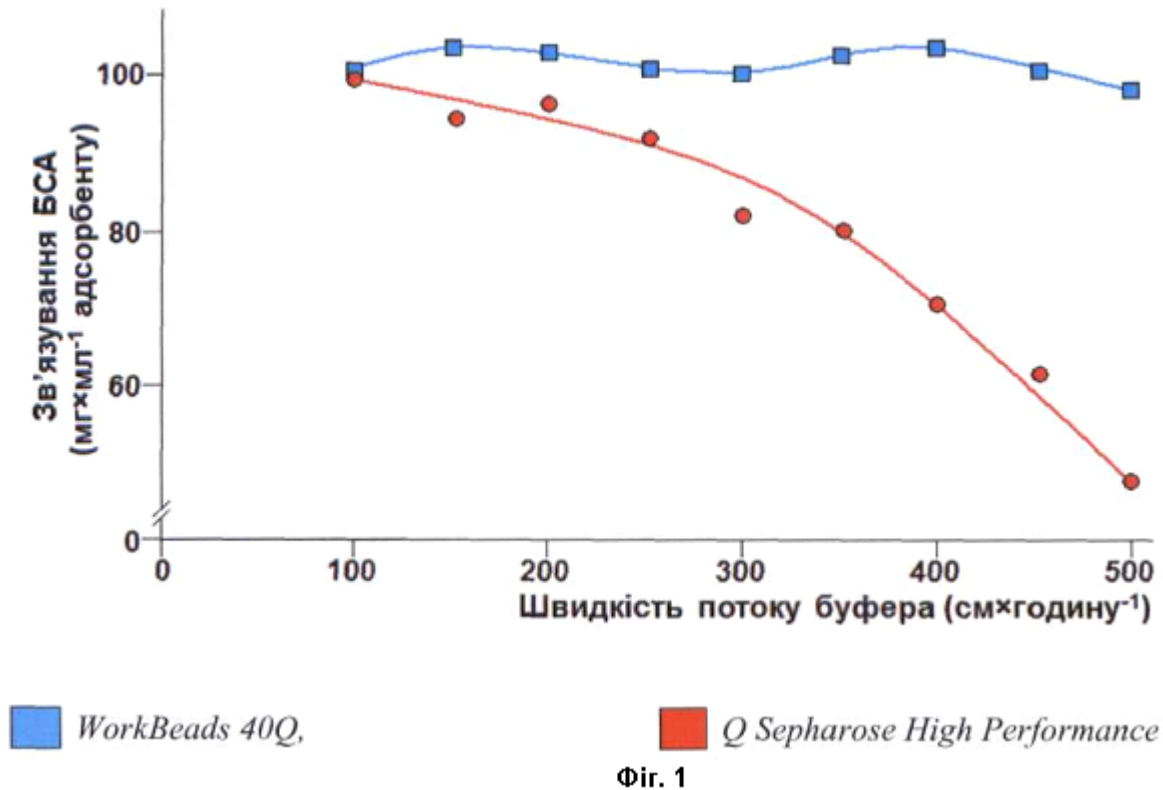


Fig. 1

Винахід належить до способу інактивації вірусів у білкових розчинах природного або штучного походження за допомогою застосування процесу обробки білків або пептидів, зв'язаних або іммобілізованих на хроматографічному адсорбенті безпосередньо у хроматографічній колонці розчином буфера, який містить розчинник і детергент. Особливістю цього процесу є використання фізичної властивості природних, синтетичних або рекомбінантних поліпептидів втрачати певну кількість ступенів свободи, тобто внутрішню рухомість фрагментів молекули при адсорбуванні на хроматографічному адсорбенті. Це, у свою чергу, істотно знижує здатність до необоротної денатурації поліпептидної молекули як наслідок присутності в буфері органічного розчинника і детергента в значимих для поліпептидів концентраціях, а також при підвищенні температури буфера. В результаті використання у процесі обробки органічного розчинника (переважно - ди- і триалкілфосфатів) і детергента (переважно - ефіри ангідридів сорбіту, що включають оксietильовані алкілфеноли і тритони) поліпептиди значною мірою звільняються від вірусів, вкритих оболонкою (ВВО), наприклад, від вірусів гепатиту, вірусів імунodefіциту людини, аденовірусів, цитомегаловіруса та інших вірусних інфекцій, і, таким чином, вище перераховані білкові препарати стають повністю очищеними.

Способи дезінфекції в біотехнології насамперед почали розробляти для видалення вірусної інфекції людини, яка найчастіше зосереджувалася у плазмі крові донорів. Дезінфектант був визначений як "агент", що звільняє від інфекції, яка виявляється, як правило, хімічною речовиною, що руйнує хвороботворні або інші згубні мікроорганізми або інактивує віруси» [1]. Існує багато різних методів дезінфекції, основною мішенню яких є специфічні віруси. Ці методи включають використання високого гідростатичного тиску, опромінення УФ-світлом, обробку перекисом водню, хлорним вапном й іншими компонентами, що містять хлор, глутаральдегідом, етанолом, іонами металів, сполуками, що містять четвертинний азот, їдким натром, карбонатом натрію і багатьма іншими речовинами [2]. Таку ж різноманітність методів розроблено і для проведення вірусної інактивації плазми донорів і її продуктів [3]. Показано, що обробка замороженої плазми флуоресцентним світлом протягом 1 години при освітленості 45000-60000 люкс у присутності 1 мкМ метиленового синього забезпечує високий рівень інактивації вірусів як для ВВО (для ВІЧ  $>6,7 \log_{10}$ ), так і для вірусів без оболонки (ВБО), наприклад, аденовірусів ( $\geq 4,0 \log_{10}$ ). Проте, такі ВБО, як віруси енцефаломіокардиту, гепатиту А, поліомієліту та свинячого парвовірусу залишалися неінактивованими [4-5]. Також у плазмі були активні проти ВІЧ-1 фоточутливі сполуки, що містили хлор [6-7], 3,3'-(1,4-нафтабоден)дипропіонат проти ВВО простого герпесу і герпесу свиней [8], в плазматичних фракціях і в концентраті фактора згортання VIII - псоралени (8-метоксипсорален і амінометил-триметилпсорален) проти ВВО гепатитів В і С, везикулярного стоматиту і лейкої котів, ВБО синього гребня [9].  $\beta$ -Пропіолактон у концентрації 0,1-0,25 % при низьких і середніх температурах (від 4 до 22 °С) і нейтрально-лужних значеннях рН (7,2-8,1) був ефективним у зниженні концентрації як ВВО, так і ВБО на 2,5-8,0 порядків у фракціях імуноглобулінів, альбуміну і фактора згортання IX [10-14]. Проте фактор згортання VIII виявився нестійким у присутності Р-пропіолактону [10]. Каприлова кислота в концентрації 12-40 мМ (25-40 °С, рН 5,1-5,4) протягом 60 хв. знижувала вміст ВВО (везикулярного стоматиту, діареї бика) у фракціях фактора згортання VIII, IgG і альбуміну не менше, чим на  $4,4 \log_{10}$  [15-16]. Опромінення потоком пульсуючого УФ-світла (254-320 нм) потужністю 750-2000 Дж·см<sup>-2</sup> тонких плівок розчинів фібриногену [17], концентрату фактора VIII [18], альбуміну [19], імуноглобулінів [20] та інших білків [21] істотно знижувало кількість ВБО (на  $\geq 4,6-6,5 \log_{10}$ ) і ВВО (на  $\geq 3,4-6,6 \log_{10}$ ). Як було показано методом MALDI-TOF/TOF мас-спектрометрії фактором інактивації вірусів при опроміненні УФ-світлом є атомарний кисень, який окислює капсидні білки [21]. Пульсуюче світло широкого спектра [22-23] і гамма-промені [24] також були ефективні при вірус-інактивації. Деякі гідролітичні ферменти у поєднанні з високою (37 °С) або низькою (4 °С) температурою, зниженими значеннями рН (4-6), певним вмістом стабілізаторів (сахарози і NaCl) і заданим вмістом білка (6-16 %), істотно знижували концентрацію ВВО (на  $\geq 2,4-6,0 \log_{10}$ ) в розчинах очищених імуноглобулінів при тривалому процесі інактивації [25-27]. Крім того, низькі значення рН розчинів імуноглобулінів (4,0-4,5) протягом 7-21 діб при температурі 21 °С викликали інактивацію вірусів гепатиту С і діареї бика [28], а 0,7 М розчин аргініну в кислих значеннях рН був більше ефективним у процесі інактивації ВВО, ніж розчини 0,1-0,7 М цитрату або 0,1 М цитрату/0,6 М NaCl [29].

Процес обробки білкових розчинів «розчинником/детергентом» (РДП) почали використовувати більше 25 років назад, завдяки класичному патенту Neurath і Horowitz із Центру крові Нью-Йорка (США) [30] на спосіб неденатуруючої обробки біологічно активних білкових дериватів плазми крові донорів. Цей РДП продовжує до цього часу залишатися основним способом інактивації вірусів, з яким порівнюють нові методи.

До 2000 р. було вже точно встановлено, що найбільше прийнятним співвідношенням РДП у процесі вірус-інактивації є 0,3-1 % три-н-бутил-фосфату (TNBP) і 1-2 % тритону X-100 [31]. В найбільш важливих роботах того часу [32-36] було показано, що ВБО практично повністю інактивуються при використанні різних співвідношень розчинника і детергенту (TNBP/Na-холат, TNBP/тритону X-100, TNBP/твін 80).

Важливим залишається розумне поєднання концентрації агентів інактивації вірусів і максимальне збереження активності білків, що виробляються. В цьому випадку найбільш цікаву модель являє собою високомолекулярний комплекс коагуляційних факторів VIII і фон Віллебранда (FVIII/vWF). Ще в 2000 р. Kim I.S. і співавтори [34] показали, що суміш TNBP/тритону X-100 в кінцевій концентрації 0,3 і 1,0 % (об'єм/об'єм), відповідно, при 22 °C і рН буфера 7,2 інактивувала ВІЧ-1 практично до значень нижньої межі методу виявлення протягом першої хвилини РДП, який йшов 1 годину. Вихід активності FVIII не обговорювався, але він, скоріше за все, був задовільним, так як зазначену розробку підприємство Greencross PD Corp. використовувало у виробництві антигемофілічного препарату «GreenMono».

Burnouf T. і співавтори [37] виявили, що інкубація кріопреципітату в 2 % TNBP або 1 % TNBP/1 % тритоні X-45 4 години при 37 °C не змінює активність FVIII/vWF. І при 90-93 %-ному виході активності FVIII/vWF і фібриногену вдається досягнути зниження концентрації вірусів >4,17, >4,73 і >4,72 для ВІЧ, вірусів діареї биків і псевдосказу, відповідно [18].

Staldrem M. і співробітники [38] для препарату «Wilate», що включає високоактивний концентрат FVIII/vWF (122 МО×мг<sup>-1</sup> білка), встановили, що оптимізований РДП досить агресивний при інактивації ВБО і в той же час м'який відносно до збереження структури і функцій молекул факторів VIII і фон Віллебранда. Хоча було виявлено, що vWF після обробки розчинником-детергентом в основній масі складався всього лише з 10 мультимерів, це не позначилося на різкому зниженні виходу активності концентрату при наступному очищенні.

Roberts P.L., вивчаючи вплив суміші 0,3 % TNBP/1 % тритон X-100 на вірус Sinbis-лихоманки, як моделі ВБО, показали, що помітну вірус-інактивацію (>4-6 log<sub>10</sub>) високо очищеного концентрату FVIII («Replenate») можна досягнути вже при температурі 4-5 °C і в 2 рази менших концентраціях розчинника та детергенту, але при тривалому терміні інкубації. Концентрація солей і рН буфера істотного впливу на ступінь інактивації не мала, вихід активності FVIII залишався задовільним для промислового виробництва [39]. Потім автору після заміни тритона X-100 на полісорбат 20 вдалося збільшити до >5,0 log<sub>10</sub> ефективність інактивації ВБО в тому ж концентраті при збереженні досить високої активності (препарат був зареєстрований під маркою «Optivate»). Проте, інактивації модельного вірусу коров'ячої віспи застосованим методом досягти не вдалося навіть при тривалому періоді інкубації [40].

Велика група авторів з різних фармацевтичних компаній під керівництвом Dichtelmuller H.O. у 2009 р. опублікувала підсумковий документ 20-ти річного вивчення застосування РДП на семи підприємствах, що входять в «Асоціацію терапії білками плазми» [41-42]. Більше 300 виробничих документів, що відображають умови і варіанти комбінацій розчинника (TNBP) і детергента (ТВІН 80, тритон X-100, Na-холат, октоксінол-9) для різних продуктів, стали основою висновку, що ні клас продукту, ні концентрація білка, ні величина рН буфера не мають особливого значення для інактивації вірусів, критичною є тільки концентрація агентів інактивації - розчинника і детергента, а РДП - це промислово прийнятний метод інактивації широкого спектра ВБО, таких як ВІЧ-1,2, гепатитів В і С та ін.

Менш схильний до денатурації концентрат фактора коагуляції IX також витримував обробку розчинником/детергентом при зниженні концентрації вірусів на 4,5, 6,1, 5,1 і 5,3 log<sub>10</sub> для ВІЧ-1, вірусів везикулярного стоматиту, діареї бика та псевдосказу, відповідно. Але для ВБО (вірус гепатиту А) відмічали тільки незначне зниження концентрації (1,6 log<sub>10</sub>), і у цьому випадку була потрібна додаткова антивірусна обробка іншими методами [43]. Такі ж результати для комбінації TNBP/полісорбат 80 отримали й інші розробники [44-47]. Проте, спосіб давав можливість або отримати високий вихід фактора, або високу ефективність видалення вірусів.

Вірус-інактивацію імуноглобулінів G успішно здійснювали вже традиційними сумішами TNBP/твін 80 [48-49], TNBP/тритон X-100 [50] і каприлатом [51]. До того ж, автори розробок переконливо довели, що РДП знижував концентрацію ВБО (віруси бичачої діареї, запального ринотрахеїту, симплексного герпесу і везикулярного стоматиту), що виявляються як за кінцевим титром, так і шляхом вимірювання експресії вірусних білків [52] на 4-6 log<sub>10</sub> [48-52], але не впливав на вміст та інфекційність ВБО [48, 52]. Метод також не змінював ні фізичних, ні біологічних властивостей імуноглобулінів [49, 53].

За останні два роки РДП був розроблений для вірус-інактивації факторів X і Ха [54], XIa [55], інгібітора альфа-1-протеази [56]. При цьому продукти інактивації вірусів та інактивуючі агенти

успішно видаляли з розчинів застосуванням одного хроматографічного етапу [44] або нанофільтрації [50].

Ще в 2000 р. було впевнено показано, що стандартний етап імуноафінної хроматографії знижує концентрацію вірусу поліомієліту (ВБО) на  $\sim 3 \log_{10}$ , а катіонообмінної - на  $4-5 \log_{10}$  [57]. Такі ж результати в 2005 були отримані і для хроматографії гідрофобної взаємодії [58]. Curtis S. [59] шляхом аніонообмінної хроматографії при pH 7,0-8,0, швидкості потоку буфера  $\leq 500 \text{ см} \cdot \text{год}^{-1}$ , динамічною ємністю  $200 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  і висоті шару адсорбенту 11 см, досягнув елімінації на  $> 4,0 \log_{10}$  як для вірусу лейкемії мишей (ВБО), так і для ВБО Simian 40 (мавпячий вірус 40). У більшості досліджень фактор зниження концентрації ВБО і ВБО шляхом хроматографії був ідентичний або перевищував такий при процесі пастеризації [60-61]. До того ж, видалення вірусів хроматографічним шляхом здійснювалося, скоріш за все, за рахунок простого механічного вимивання, так як помітної взаємодії вірусних частинок із зарядженим лігандом у присутності стандартних концентрацій солі не відмічалось [62]. Крім того, існує значна різниця в ефективності взаємодії протилежно заряджених цільового білка і ліганду або афінності білка і ліганду хроматографічної матриці, що спричиняє швидке вимивання вірусних частинок із хроматографічної колонки [63]. В доповіді Groner A. на конференції «PDA Virus & TSE Safety Forum» у червні 2011 р. підсумовано п'ятнадцятирічний період застосування різних методів рідинної хроматографії для зниження концентрації ВБО і ВБО для багатьох фармацевтичних білків, що виробляються. Наведений фактор зниження концентрації вірусів при застосуванні хроматографії, що розділяє за розміром, хроматографій гідрофобної взаємодії, афінної, іонообмінної складав  $\geq 4,5-6,5$ ,  $\geq 2,7-4,2$ ,  $\leq 2,9-8,1$  і  $\geq 2,6-4,5$ , відповідно. При цьому цей фактор залежав від величини вірусної корпускули, температури буфера і швидкості його потоку, а також від висоти шару адсорбенту [63].

Із зазначеного вище видно, що ефективна інактивація ВБО і ВБО у білкових розчинах є значною проблемою при виробництві фармацевтичнопридатних білкових розчинів, і особливо при крупномасштабному виробництві, тому задачею винаходу було створення нового і ефективного способу вірус-інактивації, який забезпечував би високий вихід продукту без втрати його активності, та значний ступінь інактивації вірусів.

Винахідники зробили припущення, що ефективна інактивація ВБО і ВБО у білкових розчинах може бути досягнута при: а) високій концентрації агентів інактивації - розчинника і детергенту, у випадку використання найбільш відомих TNBP/третон X-100  $> 0,3 \%$  і  $> 1,0 \%$ , відповідно, б) високій температурі процесу інактивації, від 35 до 45 °C, в) достатній тривалості процесу інактивації,  $\geq 2-3$  год, г) використанні декількох кроків хроматографічного очищення білка з одночасним видаленням вірусів, інактивованих вірусів або їх фрагментів і агентів інактивації.

Етапи (а), (б) і (в) при всій обережності їх застосування значною мірою є етапами, які викликають денатурацію білків, що особливо відображається на виході активності високомолекулярних білків, наприклад, таких як комплекс факторів коагуляції VIII і фон Віллебранда. Крім того, РДП практично не впливає на ВБО у білкових розчинах.

Враховуючи, що схильність білка до незворотної денатурації багато в чому визначається доменною організацією його структури [64-66], фактично денатурація є інтегральною функцією кількості ступенів свободи білка [67-68]. Як відомо, у розчинах з низькою концентрацією сильних іонів кількість ступенів свободи специфічного білка досягає максимуму [69]. Після збільшення концентрації сильних аніонів (особливо полівалентних) їх взаємодія одночасно з різними сайтами білкової молекули обмежує ступінь її свободи [69]. Більше того, взаємодія білка з органічним або неорганічним матриксом меншої або більшої по величині молекули спричиняє наступну втрату ступенів свободи [70-71]. Наприклад, шаперони, «розпинаючи» білок всередині свого величезного матриксу, зводять кількість ступенів свободи білка практично до нуля, захищаючи цим його від можливої денатурації термальним шоком [72].

Відповідно, зазначена вище ціль винаходу була досягнута способом хроматографічної вірус-інактивації цільового білка, комплексу білків або пептиду, у якому піддають кондиціонуванню розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду; потім здійснюють аплікацію кондиціонованого розчину цільового білка, комплексу білків або пептиду на хроматографічну колонку з адсорбентом, зі зв'язуванням білка, комплексу білків або пептиду; після чого промивають адсорбент буфером аплікації; та промивають адсорбент буфером інактивації вірусів, який містить розчинник і детергент у буфері аплікації; згодом відмивають адсорбент від розчинника/детергенту та продуктів розпаду вірусів буфером аплікації; та елюють розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду з адсорбенту.

У додатковому варіанті реалізації винаходу адсорбент являє собою іонообмінний, афінний, обернено-фазовий або адсорбент гідрофобної взаємодії.

У ще одному варіанті реалізації винаходу адсорбент являє собою обернено-фазовий адсорбент, якщо цільовий білок, комплекс білків або пептид є низькомолекулярним ( $MW=1-30$  кДа), та адсорбент являє собою іонообмінний, афінний або адсорбент гідрофобної взаємодії, якщо цільовий білок, комплекс білків або пептид має середню або високу молекулярну масу ( $MW=20- \geq 4000$  кДа).

У додатковому варіанті реалізації винаходу афінний адсорбент являє собою хімічно нейтральну, стійку до тиску в 5-10 бар полімерну матрицю з пришитим поліпептидним фрагментом або хімічною сполукою, яка специфічно взаємодіє з цільовим білком, комплексом білків або пептидом. При цьому пришитий поліпептидний фрагмент може бути синтетичного, рекомбінантного або природного походження, та молекулярна маса пришитого поліпептидного фрагмента бажано становить приблизно від 1 до 500 кДа. Також бажано, щоб афінний адсорбент мав динамічну ємність зв'язування не менше приблизно  $15 \text{ мг білка} \cdot \text{мл}^{-1}$  адсорбенту, при швидкості протікання буфера приблизно від 10 до  $50 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1}$ .

У ще одному варіанті реалізації винаходу іонообмінний сорбент являє собою аніоніт або катіоніт з динамічною ємністю зв'язування білка приблизно від 50 до  $150 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  адсорбенту, при швидкості протікання буфера приблизно від 50 до  $500 \text{ см} \cdot \text{год}^{-1}$ . При цьому бажано адсорбент являє собою аніонообмінний адсорбент у випадку видалення денатурованих нуклеїнових кислот вірусів або їх фрагментів.

У кращому варіанті реалізації винаходу інактивуючий буфер містить: розчинник, вибраний з групи, що включає: ди- і триалкілфосфати, які містять алкільний ланцюг довжиною 1-10 вуглеводних атомів, такі як ди-*n*-пропілфосфат (DNPP) і три-*n*-бутилфосфат (TNBP); прості ефіри, такі як етиловий і пропіловий; складні ефіри, такі як амілацетат; алкільовані та гідроксильовані сполуки, такі як бутиловий ефір гідроксиланізолу (BHA) і бутиловий ефір гідрокситолуолу (BHT); та їх суміші, необов'язково з додатковими органічними сполуками в концентрації 0,002-3,0 %; та детергент, вибраний з групи, що включає: оксіетильовані алкілфеноли, такі як тритони K-60, X-45, X-100, W-30; холат і деоксихолат натрію; сульфобетайни, такі як додецилсульфонат натрію; додецилбензосульфонат натрію (Nacconol NR), N-додециламіноетансульфонова кислота, 2-сульфоетилолеат натрію (Igepon A); поліоксіетильовані похідні складних ефірів, такі як полісорбат 20 або твін 20, полісорбат 80 або твін 80; ефіри поліоксіетильованих жирних спиртів, такі як Brij 35; конденсат етиленоксиду і пропіленоксиду (Pluronic copolymers); оксіетильовані аміни, такі як Ethomeen; нонідет P-40 (Nonidet P-40) і люброкс PX (Lubrox PX); каприлат та інші неіонні детергенти в концентрації 0,005-5,0 %.

У ще кращому варіанті реалізації винаходу промивку адсорбенту буфером інактивації вірусів здійснюють в чотири стадії, де на першій стадії інактивації вірусів промивання здійснюють градієнтом буфера інактивації, концентрація якого у буфері аплікації зростає від 0 % до 100 %, об'ємом 5-10 Vc зі швидкістю  $0,1-0,2 \text{ Vc} \cdot \text{хв}^{-1}$ , на другій стадії - 10-20 Vc буфером інактивації зі швидкістю  $0,1-0,2 \text{ Vc} \cdot \text{хв}^{-1}$ , на третій стадії градієнтом буфера інактивації, концентрація якого у буфері аплікації знижується від 100 % до 0 %, об'ємом 5-10 Vc зі швидкістю  $0,1-0,2 \text{ Vc} \cdot \text{хв}^{-1}$ , на четвертій стадії - буфером аплікації об'ємом 10-20 Vc зі швидкістю  $0,1-0,2 \text{ Vc} \cdot \text{хв}^{-1}$ . Додаткових переваг отримують, коли промивання адсорбенту на першій стадії інактивації вірусів здійснюють буфером інактивації з температурою, що зростає від 4-18 °C до 30-45 °C, зі швидкістю  $0,25-0,50 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{хв}^{-1}$ , на другій стадії - з температурою 30-45 °C, на третій стадії - з температурою, що знижується від 30-45 °C до 4-18 °C, зі швидкістю  $0,25-0,50 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{хв}^{-1}$ , на четвертій стадії - буфером аплікації з температурою 4-18 °C.

У ще одному варіанті реалізації винаходу хроматографічна колонка оснащена пристроєм для термостабілізації, наприклад, водяною «сорочкою». При цьому бажано температуру хроматографічної колонки відтворювати відповідно до температури процесу інактивації вірусів і наступної відмивки адсорбенту.

У найкращому варіанті реалізації винаходу адсорбент являє собою аніонообмінний адсорбент з максимальним зворотним тиском не менше 3 бар, динамічною ємністю зв'язування БСА  $\geq 150 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$  при швидкості потоку буфера через колонку приблизно від 50 до  $500 \text{ см} \cdot \text{год}^{-1}$ , наприклад, типу WorkBeads 40 Q, температура інактивуючого буфера становить приблизно від 40 до 45 °C, при швидкості потоку через колонку  $0,1-0,2 \text{ Vc} \cdot \text{хв}^{-1}$  та тривалості інактивації не менше 2,0 год.

При розробці даного винаходу, винахідниками було встановлено, що для істотного зниження денатурації цільового білка у процесі вірус-інактивації необхідно обмежити кількість його ступенів свободи, що найбільш перспективно здійснити шляхом зв'язування молекули на хроматографічному адсорбенті, який має або активний іонний заряд, або ділянки гідрофобної, або афінної взаємодії. При цьому, чим більше на молекулі білка буде сайтів взаємодії з

хроматографічним лігандом, тим меншу кількість ступенів свободи буде мати білок, тим нижчим буде рівень його денатурації при будь-яких умовах хроматографування. З метою організації відповідних умов необхідно так кондиціювати зразок цільового білка, який наноситься на адсорбент, і/або таким чином кондиціювати і/або модифікувати адсорбент, щоб взаємодія цільового білка з лігандом адсорбенту забезпечувала оборотне зв'язування по максимальній кількості білкових сайтів з лігандом. Модифікація адсорбенту здійснюється у випадку проведення РПД на афінному сорбенті і означає «пришивку» специфічного пептидного ліганду, який було б легко ідентифікувати і гарантовано відділити від цільового білка при його «стіканні» з колонки в процесі хроматографії. Для ефективного утримання цільового білка на іонообмінному ліганді при зростаючій температурі та гідрофобності буфера через ріст концентрацій розчинника і детергента необхідно вибирати іонообмінний адсорбент з динамічною ємністю  $\geq 150$  мг білка $\times$ мл $^{-1}$ . У випадку використання для РПД обернено-фазової або хроматографії гідрофобної взаємодії підвищення температури буде компенсовано зростанням гідрофобності буфера, завдяки збільшенню концентрації розчинника. Таким чином, для утримання цільового білка на гідрофобному або обернено-фазовому ліганді адсорбенту вистачить величини динамічної ємності  $\sim 20-25$  мг IgG $\times$ Mn $^{-1}$  або  $\sim 35-50$  мг інсуліну $\times$ мл $^{-1}$ , відповідно. За таких умов адсорбент із зв'язаним на ньому цільовим білком можна буде промивати буфером, що містить розчинник і детергент у необхідних концентраціях, і має температуру 35-45 °С, достатньо тривалий час, що спричинить елімінацію ВВО. Тривале промивання буфером з підвищеною температурою і елюція цільового білка в РДП, наступна іонообмінна (іншого типу) і/або гідрофобної взаємодії, а також «полірувальна» хроматографія, що виключає за розміром, будуть сприяти ефективному видаленню ВВО. Це, у свою чергу, дасть можливість скоротити час пастеризації/теплової обробки цільового білка, що призведе до істотного підвищення його виходу. До того ж, хроматографічні методи будуть мати перевагу перед методами нанофільтрації [73], так як при хроматографії турбулентність буфера і, відповідно, денатурація білка, що виникає через це, буде значно нижчою [74].

Відповідно до даного винаходу білкові розчини природного або штучного походження, зокрема розчини цільового білка, комплексу білків або пептиду, можуть бути такими як:

а) білкові препарати крові, що вміщують будь-яку фракцію, концентрат або дериват плазми крові, продукти із плазми чи фракцій плазми, які містять будь-які, лабільні і стабільні, білки та інші поліпептиди, наприклад імуноглобуліни, фактори згортання, інгібітори або активатори гемостазу;

б) білкові розчини/препарати з інших рідин організму тварин або рослин, що вміщують вищі та нижчі, які містять будь-які, лабільні та стабільні, білки й інші поліпептиди;

в) приготовані або отримані білкові розчини або препарати з інших тканин, органів або клітин організму тварин або рослин, що вміщують вищі та нижчі, які містять будь-які, лабільні та стабільні, білки та інші поліпептиди;

г) білкові розчини або препарати, отримані з клітин, продуктів клітин, наприклад тілець включення і т.д., середовищ культивування, гідропонних середовищ і природних рідких середовищ існування біологічних організмів, що вміщують генетично модифіковані;

д) білкові розчини або препарати, отримані шляхом хімічного синтезу поліпептидів, які, можливо, зазнали дії хімікатів, розчинів або дихання та іншого впливу оператора, що їх інфікувало,

У цілому, спосіб, відповідно до винаходу, полягає в тому, що розчин цільового білка кондиціюють шляхом доведення значення концентрації загального білка, рН, іонної сили або кондуктивності розчину до необхідних для вибраного методу хроматографії так, щоб цільовий білок після нанесення розчину на адсорбент зв'язувався адсорбентом. Адсорбент, упакований в хроматографічну колонку з «термосорочкою», урівноважують відповідним буфером для налаштування властивостей адсорбенту «захоплювати» цільовий білок. Зразок наносять на адсорбент і промивають 5-10 Vc (об'ємами колонки) буфера, що урівноважує. Потім колонку починають промивати буфером інактивації (BI) -буфером, що урівноважує, в якому заданий градієнт концентрації розчинника і детергента, наприклад TNBP і тритону X-100. Градієнт задають звичайним чином: шляхом поступового рівномірного збільшення концентрації «BI-Б» з кінцевою максимальною концентрацією агентів інактивації в «BI-А» з нульовою концентрацією агентів інактивації. Кінцева концентрація розчинника і детергента в «BI-Б» у процентному співвідношенні для афінної, катіонообмінної, аніонообмінної, зворотно-фазової та гідрофобної взаємодії може досягати співвідношення 0,5:1,5, 0,7:2, 1:3, 2:3 і 3:4, відповідно. При цьому, в буфері, що урівноважує, концентрація сильних одновалентних катіонів, виражена кондуктивністю розчину, не повинна перевищувати у зазначених випадках 5, 15, 15, 25 і 150 mS $\times$ хв $^{-1}$ . Швидкість градієнта звичайно задають у межах 5-10 Vc $\times$ год $^{-1}$ , тобто за 1 годину через

колонку має пройти 5-10 об'ємів буфера, і за даний об'єм і час градієнт повинен вийти на максимум концентрації. Одночасно з цим задають температурний градієнт теплоносія, що зростає, в «сорочці» колонки і камері підігріву буферів інактивації «БІ-А» і «БІ-Б» шляхом їх переміщення в термостат, який забезпечує циркуляцію теплоносія в «сорочці» колонки.

5 Градієнт температури задають у межах від 18 °С (робоча температура приміщення) до 30-45 °С зі швидкістю, яка відповідає швидкості градієнта концентрації, тобто 12-27 °С×год<sup>-1</sup>. Таким чином, максимальний рівень концентрації розчинника/детергента в колонці співпадає з досягненням заданого максимуму температури адсорбенту в колонці і буферів інактивації. Якщо умови хроматографічного очищення потребують нижчої температури, наприклад, 4-8 °С, то для

10 проведення вірус-інактивації по цьому способу необхідний лише термостат, здатний охолоджувати як колонку, так і буфери. При досягненні заданих максимальних рівнів концентрації агентів інактивації і температури, адсорбент в колонці продовжують промивати протягом 2-3 годин «БІ-Б» при температурі 30-45 °С, а потім задають негативні градієнти концентрації-температури і протягом 1 години повертають адсорбент в колонці до початкової

15 температури і нульової концентрації агентів інактивації. Колонку додатково промивають 5-10 Vc буфера, що урівноважує, зі швидкістю 0,2-0,5 Vc×год<sup>-1</sup> при необхідній температурі до повного видалення слідів розчинника і детергента. Елюцію цільового білка здійснюють розробленим способом.

Зазначений винахід додатково проілюстровано за допомогою фігур, які описують посилання і процес інактивації вірусів безпосередньо в хроматографічній колонці.

20 Фіг. 1 зображує графік зміни кількісного зв'язування бичачого сироваткового альбуміну (БСА) аніонообмінними адсорбентами в залежності від швидкості потоку буфера через хроматографічну колонку. При низькій швидкості потоку буфера (100-200 см×год<sup>-1</sup>) адсорбенти Q Sepharose High Performance (HP) і WorkBeads 40Q мають практично однакову динамічну

25 ємність ~100 мг×мл<sup>-1</sup> адсорбенту. Проте, при збільшенні швидкості потоку буфера ліганд Q Sepharose HP не встигає «захоплювати» альбумін, що протікає, з попередньою інтенсивністю, в силу чого динамічна ємність його падає. При швидкості буфера 500 см×год<sup>-1</sup> ємність цього адсорбенту знижується майже в 2 рази до ~50 мг×мл<sup>-1</sup> адсорбенту. В той же час динамічна ємність WorkBeads 40Q фактично не змінюється у всьому вимірюваному діапазоні швидкостей

30 буфера.

В експерименті була використана колонка XK 26/20 (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала), упакована 80 мл Q Sepharose HP (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала) або WorkBeads 40Q (Bio-Works Sweden AB, Швеція, Бромма) на висоту шару 15 см.

35 Колонку урівноважували 800 мл 0,02 М Na-ацетатного буфера, рН 6,5. Зразок альбуміну з концентрацією 25 мг×мл<sup>-1</sup> наносили в 40 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 20 мл×хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 400 мл того ж буфера зі швидкістю 80 мл×хв<sup>-1</sup>. Елюцію альбуміну здійснювали 200 мл 0,50 М Na-ацетатного буфера, рН 9,0, за різних швидкостей потоку буфера (1,7-8,5 см×хв<sup>-1</sup> або 8,8-44 мл×хв<sup>-1</sup>).

40 Фіг. 2 зображує графік зміни кількісного зв'язування бичачого сироваткового альбуміну (БСА), лізоциму й інсуліну адсорбентами різного типу зв'язування у залежності від температурних умов процесу при постійній швидкості потоку буфера через хроматографічну колонку. При підвищенні температури процесу Т-динамічна (температурозалежна) ємність іонообмінних адсорбентів, як катіонообмінника SP Sepharose HP, так і аніонообмінників Q Sepharose HP і WorkBeads 40Q, знижується. При цьому адсорбент WorkBeads 40Q показує

45 помітне зниження Т-динамічної ємності (на ~10-12 %) тільки при температурах вище 45 °С, у той час як при таких температурах ємність Q Sepharose HP падає на ~80 %, а SP Sepharose HP взагалі припиняє зв'язувати білок. Зв'язування білка по принципах гідрофобної (Phenyl Sepharose HP) або зворотно-фазової (SOURCE 15RPC) взаємодій, обумовлено експонуванням на поверхні білка гідрофобних ділянок взаємодії з лігандом сорбенту за допомогою високих

50 концентрацій солей або розчинника. Підвищення температури буфера спричиняє деяке підвищення експонування гідрофобних ділянок на поверхні білка, тому незначне збільшення Т-динамічної ємності обох адсорбентів у всьому діапазоні вимірювання температур знаходить своє пояснення.

В експерименті була використана колонка XK 26/20 (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала), упакована 80 мл Q Sepharose HP, SP Sepharose HP, Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала) або WorkBeads 40Q (Bio-Works Sweden AB, Швеція, Бромма) на висоту шару 15 см. Для експериментів з SOURCE 15RPC використовували готову набивну колонку RESOUC 15RPC об'ємом 3 мл і висотою шару 10 см (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала).

60 Для колонок, наповнених Q Sepharose HP і WorkBeads 40Q, умови хроматографування наведені в описі ФІГ. 1. Швидкість потоку буфера при елюції складала 8 мл×хв<sup>-1</sup>.



Колонку, наповнену SP Sepharose HP, урівнювали 800 мл 0,025 М гліцинового буфера, pH 3,0, який містив 3 мМ EDTA і 0,1 % твін 80, зразок лізоциму з концентрацією 25 мг·мл<sup>-1</sup> наносили в 40 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 20 мл·хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 400 мл того ж буфера зі швидкістю 80 мл·хв<sup>-1</sup>, елюцію лізоциму здійснювали 200 мл 0,025 М Na-

фосфатного буфера, pH 7,5, який містить 0,5 М NaCl, зі швидкістю потоку буфера 8 мл·хв<sup>-1</sup>. Колонку, наповнену Phenyl Sepharose HP, урівнювали 800 мл 0,050 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-буфера, pH 7,0, що містить 2 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, зразок лізоциму з концентрацією 25 мг·мл<sup>-1</sup> наносили в 40 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 20 мл·хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 400 мл того ж буфера зі швидкістю 80 мл·хв<sup>-1</sup>, елюцію лізоциму здійснювали 200 мл 0,050 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> буфера, pH 7,0, зі швидкістю потоку буфера 8 мл·хв<sup>-1</sup>.

Колонку RESOURCE 15RPC урівнювали 30 мл 0,1 % розчином трифтороцтової кислоти у воді, pH 2,0, зразок інсуліну з концентрацією 25 мг·мл<sup>-1</sup> наносили в 4-5 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 1 мл·хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 15 мл того ж буфера зі швидкістю 1,5 мл·хв<sup>-1</sup>, елюцію лізоциму здійснювали 6 мл 60 % ацетонітрилу в 0,1 % розчині трифтороцтової кислоти у воді, pH 2,0, зі швидкістю потоку буфера 1 мл·хв<sup>-1</sup>.

Фіг. 3 зображує собою графік зміни кількісного зв'язування фактора коагуляції VIII у комплексі з фактором фон Віллебранда (FVIII/vWF) синтезованим афінним адсорбентом з різною довжиною (MW 50, 250, 300 і 350 кДа) ліганду, а також інтенсивність «стікання» ліганду з адсорбенту в залежності від температурних умов процесу при постійній швидкості потоку буфера через хроматографічну колонку.

Т-динамічна ємність синтезованих афінних адсорбентів при зміні температури мало залежить від довжини ліганду або від його молекулярної маси до 250 кДа, але швидко знижується для лігандів з масою 300 і 350 кДа. Зворотна залежність від величини ліганду спостерігається і для процесу його «стікання» з матриці адсорбенту при зростанні температури. Враховуючи практично однакові рівні «стікання» лігандів з молекулярною масою 50-250 кДа, для наступної роботи був обраний адсорбент з лігандом 250 кДа, у якого т-динамічна ємність була на 10 % вище і складала для комплексу FVIII/vWF 27 мг·мл<sup>-1</sup> адсорбенту.

Афінний адсорбент Sepharose-PPSB:FVIII/vWF (PPSB [75-76] - поліпептид, який специфічно зв'язує комплекс FVIII/vWF), синтезували на основі матриці Sepharose CL 4B (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала) і поліпептидів PPSB з різною молекулярною масою від 50 до 350 кДа згідно з рекомендаціями виробника.

Колонки XK 16/20 (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала) набивали 20 мл афінного адсорбенту на висоту шару 10 см, урівнювали 0,025 мМ трис-HCl буфером, pH 7,4, що містив 50 мМ NaCl, зі швидкістю 2 мл·хв<sup>-1</sup>. На колонку наносили 20 мл зразка концентрату комплексу факторів FVIII/vWF (25 мг·мл<sup>-1</sup>). Для елюції використовували буфер, що урівноважує з pH 4,4, який містив 250 мМ NaCl. В елюйованих зразках вимірювали вміст FVIII:Ag (набір ELISA ASSERACHROM VIII:Ag, DiagnosticaStago S.A., Франція) і PPSB (IFA за допомогою антитіл проти поліпептиду).

На Фіг. 4 представлена схема проведення інактивації ВВО і ВБО безпосередньо в процесі одного із етапів хроматографічного очищення цільового білка.

Еквілібрацію адсорбенту, упакованого в хроматографічну колонку (ХК), здійснювали 5-10 Vc відповідного буфера. У зразок цільового білка, розчиненого в буфері, що урівноважує, ін'єктували модельні віруси відповідно до даних таблиці 1 і інкубували протягом 10-15 хв. при обережному перемішуванні.

Табл. 1.

Моделі вірусів, які були застосовані для визначення ефективності інактивації вірусів безпосередньо в хроматографічному процесі очищення і виділення цільового білка

Модель	Вірус	Оболонка/ геном	Розмір (нм)	Ін'єкція в зразок цільового білка
Парвовірус собаки (CPV)	B19	Hi / ssДНК	18-26	<b>3,2×10<sup>9</sup></b>
Ентеровірус бика (BEV)	гепатит А	Hi / ssPHK	22-30	<b>1,1×10<sup>*</sup></b>
Вірус гепатиту В качки (DHBV)	гепатит В	Так / dsДНК	30-40	<b>8,4×10<sup>8</sup></b>
Вірус вірусної діареї бика (BVDV)	гепатит С	Так / ssPHK	40-50	<b>1,8×10<sup>8</sup></b>
Вірус лейкемії миші типу C (MuLV)	ВІЛ, ВЛТЛ	Так / ssPHK	80-110	<b>4,7×10<sup>8</sup></b>
Вірус псевдосказу (PRV)	герпес	Так / dsДНК	120-200	<b>2,1×10<sup>9</sup></b>
ВІЛ - вірус імунodefіциту людини, ВЛТЛ - Т-лімфотропний вірус людини, ssPHK/ssДНК - односпіральна форма рибо-/дезоксирибонуклеїнової кислоти, dsPHK/dsДНК - двоспіральна форма рибо-/дезоксирибонуклеїнової кислоти.				

Потім зразок, інфікований одним з вірусів, наносили на афінний адсорбент, упакований в хроматографічну колонку (на схемі «ХК»), промивали 5-10 Vc буфера, що урівноважує, і в зібраному загальному об'ємі визначали вміст вірусів. Різницю в кількості вірусів, знайдених у зразку перед нанесенням на колонку, і в буфері, вимитому із колонки, приймали за вихідну величину кількості вірусів у зараженому білковому матеріалі  $QV_{\text{вих}}$ . Потім цільовий білок, адсорбований в колонці, піддавали процесу інактивації вірусів (умови описані в Прикладах 1-6), промивці і елюції цільового білка з обов'язковим визначенням кількості вірусного матеріалу на кожному етапі -  $QV_{\text{інк}}$ ,  $QV_{\text{відм}}$  і  $QV_{\text{біл}}$ .

Фактор зниження концентрації вірусів (ФЗК), тобто ступінь інактивації вираховували як логарифм відношення кількості вірусного матеріалу, виявленого на одній із стадій інактивації ( $QV_{\text{інк}}$ ,  $QV_{\text{відм}}$  і  $QV_{\text{біл}}$ ), до кількості вихідного вірусного матеріалу ( $QV_{\text{вих}}$ ).

Приклади реалізації винаходу

В експериментальних роботах використовували набивні лабораторні колонки ХК 50/30, FineLINE Pilot 35 і хроматограф AKTAbasic 100 з програмним забезпеченням UNICORN 5,0 (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала). Колонки пакували, як вказано в інструкціях виробника, хроматографічними адсорбентами Q Sepharose High Performance, SP Sepharose High Performance, Phenyl Sepharose High Performance, SOURCE 15 RPC (GE Healthcare AB, Швеція, Уппсала), WorkBeads 40Q (Bio-Works Sweden AB, Бромма, Швеція) і афінним адсорбентом Sepharose-PPSB:FVIII/vWF на висоту шару адсорбенту 16 см.

Цільові білки фактор коагуляції VIII - FVIII [77], IgG [78], церулоплазмін [79], лізоцим [80], ФСК<sup>1-61</sup> [81], фібрино(гено)літичний фермент [82] або їх концентрати з плазми крові донорів, коров'ячого молока, гідролізату стрептокінази, отрути щитомордника *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* отримували раніше описаними способами, їх активність/вміст вимірювали загальноприйнятими методами за допомогою IFA-наборів або стандартних флюоро/хромогенних реакцій [77-82].

Зразки білкових концентратів і отриманих фракцій відбирали і визначали концентрацію загального білка методом Бредфорда [83-84].

Процес вірус-інактивації методом «Розчинник-детергент» (РДП) здійснювали по схемі, наведеній на рисунку 4. В якості модельних ВВО/ВБО використовували віруси, представлені в Табл. 1. Концентрацію BVDV визначали методом RT-PCR з наборами «cador BVDV RT-PCR kit», BEV - «artus Enterovirus LC RT-PCR kit RUO», решти - «QuantiFast Pathogen+IC kit» (QIAGEN China (Shanghai) Co., Ltd., Китай, Шанхай).

Вміст у цільовому білку після РДП розчинника визначали методом ГРХ, а детергенту - HPLC.

Приклад 1. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату лізоциму молока за методом «розчинник/детергент».

Колонку ХК 50/30 наповнювали 300 мл адсорбенту SP Sepharose High Performance на висоту 16 см згідно з рекомендаціями виробника й урівноважували 3 л 0,025 М гліцинового буфера, pH 3,0, що містив 3 мМ ЕДТА і 0,1 % твін 80 (БІ-А). Всі буфери і колонку перед процесом інактивації вірусів термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 18 °С.

Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок лізоциму з концентрацією 25 мг·мл<sup>-1</sup> наносили в 600 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 60 мл·хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 3 л того ж буфера зі швидкістю 150 мл·хв<sup>-1</sup>.

При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 0,7 % розчинника TNBP і 2 % детергента твін 80 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості створення та нанесення на колонку 3000 мл·хв<sup>-1</sup>. БІ-А і БІ-Б, а також колонку в момент початку нанесення градієнта підігрівали від 18 до 30 °С за 1 годину, тобто градієнт температури зростав зі швидкістю 12 °С·год<sup>-1</sup>. Таким чином, адсорбент зі зв'язаним лізоцимом промивали 3000 мл буфера градієнтами розчинника/детергента (до 0,7 % TNBP і 2 % твіну 80) і температури (до 30 °С), що зростали. Адсорбент зі швидкістю 30 мл·хв<sup>-1</sup> промивали 3000 мл БІ-Б при 30 °С. Далі задавали зворотний градієнт температури і концентрації БІ-Б в БІ-А зі швидкістю 3000 мл·год<sup>-1</sup>. Після досягнення температури 18 °С адсорбент промивали 3000 мл буфера БІ-А зі швидкістю 60 мл·хв<sup>-1</sup>. Елюцію концентрату лізоциму здійснювали 600 мл 0,025 М Na-фосфатного буфера, pH 7,5, що містив 0,5 М NaCl, зі швидкістю потоку буфера 60 мл·хв<sup>-1</sup>.

Результати проведення РДП інактивації вірусів у концентраті лізоциму безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 2.

Дані таблиці 2 однозначно свідчать, що зв'язаний на хроматографічному адсорбенті лізоцим молока (у складі концентрату) піддавався тривалій (більше 2 годин) температурній обробці,

проте його вміст (вихід) і активність після елюції практично не відрізнялася від вихідних значень. Разом з тим, істотно (на 6,9-7,9  $\log_{10}$ ) була знижена концентрація ВВО як за рахунок інактивації розчинником/детергентом (на 4,8-5,6  $\log_{10}$ ), так і за рахунок їх видалення на стадіях відмивки й елюції ( $\geq 1,9 \log_{10}$ ). Інактивація за той же період часу ВВО була в 2 рази нижча, але додаткове

5 видалення вірусів за рахунок відмивки ( $\geq 2,0 \log_{10}$ ) призвело до достатньо високого сумарного фактора зниження концентрації (ФСК) вірусів - 3,7-4,5  $\log_{10}$ .

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент виявлені не були.

Табл. 2.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату лізоциму молока за методом «розчинник (0,7 % TNBP)/детергент (2 % твін 80)» за 30 °C на колонці XK 50/30, наповненій 300 мл адсорбенту SP Sepharose HP

Швидкість буфера на стадії, (Vс×хв <sup>-1</sup> )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Аплікація, 18 °C	98,87±3,04  97,33±4,17*	5,6	5,2	4,8	5,0	2,5	1,7
0,2		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії відмивання					
Відмивання, 18 °C		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,5		2,1	1,8	2,1	1,7	2,1	2,0
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, 30 °C		0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		7,9	7,2	7,0	6,9	4,5	3,7
Відмивання, 18 °C							
0,2							
Елюція білка							
0,2							

Інактивація-(+)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергента і температури знижується.

10

Приклад 2. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату фібрино(гено)літичного ферменту (FgLE) із отрути щитомордника *Agkistrodon blomhoffi ussuriensis* за методом «розчинник/детергент».

Колонку XK 50/30 наповнювали 300 мл адсорбенту Q Sepharose High Performance на висоту 16 см згідно з рекомендаціями виробника і урівноважували 3 л 0,020 М імідазол-НСІ буфера, рН 6,2, провідність по  $\text{Na}^+$  - 1,5  $\text{mS} \times \text{см}^{-1}$  (БІ-А). Всі буфери і колонку перед процесом інактивації вірусів термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 18 °C.

Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок FgLE з концентрацією 25  $\text{мг} \times \text{мл}^{-1}$  наносили в 600 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 60  $\text{мл} \times \text{хв}^{-1}$ , адсорбент промивали 3 л того ж буфера зі швидкістю 150  $\text{мл} \times \text{хв}^{-1}$ .

20

При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 0,8 % розчинника TNBP і 2,4 % детергента тритона X-100 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості створення і нанесення на колонку 3000  $\text{мл} \times \text{год}^{-1}$ . БІ-А і БІ-Б, а також колонку в момент початку нанесення градієнта підігрівали від 18 до 33 °C за 1 годину, тобто градієнт температури зростає зі швидкістю 15 °C  $\times \text{год}^{-1}$ . Таким чином, адсорбент зі зв'язаним FgLE промивали 3 л буфера, що мав градієнти розчинника/детергента (до 0,8 % TNBP і 2,4 % тритона X-100) і температури (до 33 °C), що зростали. Потім адсорбент зі швидкістю 30  $\text{мл} \times \text{хв}^{-1}$  промивали 3000 мл БІ-Б при 33 °C. Після чого, задавали зворотний градієнт температури і концентрації БІ-Б в БІ-А зі швидкістю 3000  $\text{мл} \times \text{год}^{-1}$ . За досягнення температури 18 °C адсорбент промивали 1500 мл БІ-А і 1500 мл трис-НСІ буфера, рН 8,2, що містив  $\text{Na}^+$  до провідності 31  $\text{mS} \times \text{см}^{-1}$ , зі швидкістю

30

60 мл×хв<sup>-1</sup>. Елюцію концентрату FgLE здійснювали 600 мл трис-НСІ буфера, рН 8,2, що містив Na<sup>+</sup> до провідності 56 мS×см<sup>-1</sup>, зі швидкістю потоку буфера 60 мл×хв<sup>-1</sup>.

Результати проведення РДП інактивації вірусів у концентраті FgLE безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 3.

5 Застосування позитивно зарядженого аніонообмінного адсорбенту сприяє зниженню концентрації як ВВО (~3,0 log<sub>10</sub>), так і ВБО (2,7-3,4 log<sub>10</sub>) У порівнянні з катіонообмінним адсорбентом (Табл. 2). Разом з приростом інактивації вірусів (5,0-6,0 log<sub>10</sub>) за рахунок збільшення концентрації розчинника/детергента і температури інактивації до 33 °С досягається сумарний ФЗК ВВО - 8,2-8,8 log<sub>10</sub>.

10 Умови експериментів даного Прикладу жодного впливу на зміну ФЗК ВБО не здійснювали (1,8-2,2 log<sub>10</sub>), але значно збільшувався ФЗК для ВБО за рахунок їх видалення на стадіях відмивання і елюції (2,8-3,4 log<sub>10</sub>). Сумарний ФЗК для ВБО при даних умовах становив 5,2-5,6 log<sub>10</sub>.

15 Вміст (вихід) і активність фібрино(гено)літичного ферменту після елюції його концентрату практично не відрізнялися від вихідних значень.

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент виявлені не були.

Табл. 3.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату фібрино(гено)літичного ферменту з отрути щитомордника *Agkistrodon holmohoffi ussuriensis* за методом «розчинник (1 % TNBP)/детергент (3 % тритон X-100)» за 33 °С на колонці ХК 50/30, наповненій 300 мл адсорбенту Q Sepharose HP

Швидкість буфера на стадії, (Vc×хв <sup>-1</sup> )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Апликація, 18 °С	99,39±6,72  98,61±5,53*	6,0	5,3	5,0	5,1	2,2	1,8
0,2		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії відмивки					
Відмивання, 18 °С		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,5		2,7	2,5	3,1	3,0	3,4	2,7
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, 33 °С		0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		8,8	8,2	8,2	8,3	5,6	5,2
Відмивання, 18 °С							
0,2							
Елюція білка							
0,2							

Інактивація-(+)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури знижується.

20 Приклад 3. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату імуноглобуліну G (IgG) із плазми крові донорів методом «розчинник/детергент».

Колонку ХК 50/30 наповнювали 300 мл адсорбенту WorkBeads 40Q на висоту 16 см згідно з рекомендаціями виробника і урівноважували 3 л 0,020 М Na-ацетатного буфера, рН 6,5, провідність по Na<sup>+</sup> - 1,4 мS×см<sup>-1</sup> (БІ-А). Всі буфери і колонку перед процесом інактивації термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 18 °С.

25 Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок IgG з концентрацією 25 мг×мл<sup>-1</sup> наносили в 600 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 90 мл×хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 3 л того ж буфера зі швидкістю 150 мл×хв<sup>-1</sup>.

30 При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 1 % розчинника TNBP і 3 % детергента твін 80 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості

створення і нанесення на колонку 3000 мл\*год.<sup>-1</sup>. Бі-А, Бі-Б і колонку в момент початку нанесення градієнта підігрівали від 18 до 45 °С за 1 годину, тобто градієнт температури зростав зі швидкістю 27 °С\*год.<sup>-1</sup>. Таким чином, адсорбент зі зв'язаним IgG промивали 3 л буфера, який мав градієнти розчинника/детергенту (до 1 % TNBP і 3 % твін 80) і температури (до 45 °С), що зростали. Потім адсорбент зі швидкістю 30 мл\*хв<sup>-1</sup> промивали 3000 мл Бі-Б при 45 °С і задавали зворотний градієнт температури і концентрації Бі-Б в Бі-А зі швидкістю 3000 мл\*год.<sup>-1</sup>. За досягнення температури 18 °С адсорбент промивали 3000 мл Бі-А зі швидкістю 90 мл\*хв<sup>-1</sup>. Елюцію концентрату IgG здійснювали 900 мл 0,020 М Na-ацетатного буфера, рН 9,0, зі швидкістю потоку буфера 30 мл\*хв<sup>-1</sup>.

Результати проведення РДП інактивації вірусів у концентраті IgG безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 4.

Табл. 4.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату імуноглобуліну G з плазми крові донорів за методом «розчинник (1 % TNBP)/детергент (3 % твін 80)» за 45 °С на колонці ХК 50/30, наповненій 300 мл адсорбенту WorkBeads 40Q

Швидкість буфера на стадії, (Vс*хв <sup>-1</sup> )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Апликація, 18 °С	101,08±5,39  99,26±7,07*	6,6	6,2	5,7	6,1	2,5	2,1
0,3		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії відмивки					
Відмивання, 18 °С		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,5		2,6	2,7	3,0	3,1	4,7	4,1
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, 45 °С		0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		9,4	9,1	8,8	9,3	7,3	6,4
Відмивка, 18 °С							
0,3							
Елюція білку							
0,1							

Інактивація-(+)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури знижується.

Підвищення температури буфера інактивації з 33 до 45 °С сприяло підвищенню ФЗК для ВВО на 10-15 % і практично не впливало на ВБО. Рівень видалення ВБО за рахунок їх вимивання із позитивно зарядженого аніонообмінного адсорбенту буфером з високою температурою (45 °С) збільшувався на ≥50 %. Цей же процес для ВВО при відмиванні не залежав від температури буфера у межах 33-45 °С. Сумарний ФЗК при використанні буфера інактивації з температурою 45 °С зростав для ВВО на 0,6-1,0 log<sub>10</sub>, для ВБО на 1,2-1,7 log<sub>10</sub> у порівнянні з РДП, в якому при інших рівних умовах температура інактивації була на 12 °С нижча (Табл. 4). В даних умовах сумарний ФЗК був у межах 8,8-9,4 і 6,4-7,3 log<sub>10</sub> для ВВО і ВБО, відповідно. Такі показники є цілком достатніми для фактично повної інактивації як ВВО, так і ВБО, що інфікують білкові розчини природним шляхом.

Вміст (вихід) і активність імуноглобулінів G після елюції їх концентрату практично не відрізнялися від вихідних значень.

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент виявлені не були.

Приклад 4. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату церулоплазміну (СРт) із плазми крові донорів методом «розчинник/детергент».

Колонку ХК 50/30 наповнювали 300 мл адсорбенту Phenyl Sepharose High Performance на висоту 16 см згідно з рекомендаціями виробника і урівноважували 3 л 0,020 М Na-фосфатного

буфера, pH 7,2, що містив 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (БІ-А). Всі буфери і колонку перед процесом інактивації вірусів термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 18 °С.

Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок СРт з концентрацією 25 мг×мл<sup>-1</sup> наносили в 100 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 90 мл×хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 3 л того ж буфера зі швидкістю 300 мл×хв<sup>-1</sup>.

При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 3 % розчинника TNBP і 4 % детергенту тритон Х-100 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості створення і нанесення на колонку 3000 мл×год<sup>-1</sup>. БІ-А, БІ-Б і колонку в момент початку нанесення градієнта підігрівали від 18 до 45 °С за 1 годину, тобто градієнт температури зростав зі швидкістю 27 °С×год<sup>-1</sup>. Таким чином, адсорбент зі зв'язаним СРт промивали 3000 мл буфера, який мав градієнти розчинника/детергенту (до 3 % TNBP і 4 % тритона Х-100) і температури (до 45 °С), що зростали. Адсорбент зі швидкістю 30 мл×хв<sup>-1</sup> промивали 3000 мл БІ-Б при 45 °С і задавали зворотний градієнт температури і концентрації БІ-Б в БІ-А зі швидкістю 3000 мл×год<sup>-1</sup>. За досягнення температури 18 °С адсорбент промивали 3000 мл БІ-А зі швидкістю 60 мл×хв<sup>-1</sup>. Елюцію концентрату СРт здійснювали 600 мл 0,020 M Na-фосфатного буфера, pH 7,2, що містив 0,15 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> зі швидкістю буфера 60 мл×хв<sup>-1</sup>.

Результати проведення РДП інактивації вірусів у концентраті СРт безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 5.

За додержання умов вірус-інактивації даного Прикладу ФЗК для ВВО і ВБО відповідали ФЗК Прикладу 3 і дорівнювали 8,5-9,2 та 6,0-7,2 log<sub>10</sub>, відповідно. Але приблизно 5 % цільового білка було втрачено за рахунок його дуже міцного зв'язування на адсорбенті, що підтвердила санітаризаційна відмивка Phenyl Sepharose High Performance за допомогою 0,5 M NaOH.

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент визначені не були.

Табл. 5.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату церулоплазміну з плазми крові донорів за методом «розчинник (3 % TNBP)/детергент (4 % твін 80)» за 45 °С на колонці ХК 50/30, наповненій 300 мл адсорбенту Phenyl Sepharose HP

Швидкість буфера на стадії, (Vс×хв <sup>-1</sup> )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Аплікація, 18 °С	91,51±6,03	6,4	6,4	5,7	6,0	2,2	1,9
0,3		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії відмивання					
Відмивання, 18 °С		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
1,0		2,5	2,9	2,7	2,7	4,9	3,9
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, 45 °С	92,77±5,48*	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) Сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		9,1	9,2	8,5	8,9	7,2	6,0
Відмивання, 18 °С							
0,2							
Елюція білка							
0,2							

Інактивація-(+) град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури знижується.

Приклад 5. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату фрагмента стрептокінази ФСК<sup>1-61</sup> методом «розчинник/детергент».

Колонку FineLINE Pilot 35 наповнювали 155 мл адсорбенту SOURCE 15RPC на висоту 16 см згідно з рекомендаціями виробника і урівноважували 1550 мл 0,1 % розчину трифтороцтової

кислоти у воді, рН 2,0 (БІ-А). Всі буфери і колонку перед процесом інактивації термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 18 °С.

Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок ФСК<sup>1-61</sup> з концентрацією 25 мг×мл<sup>-1</sup> наносили в 200 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю 50 мл×хв<sup>-1</sup>, адсорбент промивали 750 мл того ж буфера зі швидкістю 75 мл×хв<sup>-1</sup>.

При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 2 % розчинника TNBP і 3 % детергента тритон X-100 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості створення і нанесення на колонку 1500 мл×год<sup>-1</sup>. БІ-А, БІ-Б і колонку в момент початку нанесення градієнта підігрівали від 18 до 45 °С за 1 годину, тобто градієнт температури зростав зі швидкістю 27 °С×год<sup>-1</sup>. Таким чином, адсорбент зі зв'язаним ФСК<sup>1-61</sup> промивали 1500 мл буфера, який мав градієнти розчинника/детергента (до 2 % TNBP і 3 % тритона X-100) і температури (до 45 °С), що зростали. Адсорбент зі швидкістю 15 мл×хв<sup>-1</sup> промивали 1500 мл БІ-Б при 45 °С і задавали зворотний градієнт температури і концентрації БІ-Б в БІ-А зі швидкістю 1500 мл×год<sup>-1</sup>. За досягнення температури 18 °С адсорбент промивали 1500 мл БІ-А зі швидкістю 75 мл×хв<sup>-1</sup>. Елюцію ФСК<sup>1-61</sup> здійснювали 300 мл 60 % ацетонітрилу в 0,1 % розчині трифтороцтової кислоти у воді, рН 2,0, зі швидкістю буфера 50 мл×хв<sup>-1</sup>.

Результати проведення РДП інактивації вірусів в концентраті ФСК<sup>1-61</sup> безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 6.

Результати по вірус-інактивації, одержані в даному Прикладі 5 практично не відрізнялися від результатів Прикладу 4 як по сумарному ФЗК (8,9-9,2 та 6,1-6,9 log<sub>10</sub> для ВВО і ВБО, відповідно), так і по виходу цільового білка (втрати приблизно 5 %).

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент визначені не були.

Табл. 6.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату фрагмента стрептокінази ФСК<sup>1-61</sup> за методом «розчинник (2 % TNBP)/детергент (3 % тритон X-100)» за 45 °С на колонці FineLINE Pilot 35, наповненій 155 мл адсорбенту SOURCE 15RPC

Швидкість буфера на стадії, (Vc×хв <sup>-1</sup> )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Апликація, 18 °С	89,80±9,47  94,38±11,05*	6,2	6,1	6,1	6,0	2,3	1,9
0,3		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії відмивання					
Відмивання, 18 °С		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,5		3,0	2,9	3,1	2,8	4,6	4,2
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, 45 °С		0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів (log <sub>10</sub> ) сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		9,2	9,0	9,2	8,9	6,9	6,1
Відмивання, 18 °С							
0,5							
Елюція білка							
0,3							

Інактивація-(+)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. — стадія інактивації, градієнт розчинника/детергента і температури знижується.

Приклад 6. Процес хроматографічної вірус-інактивації концентрату факторів коагуляції VIII і фон Віллебранда (FVIII/vWF) із плазми крові донорів за методом «розчинник/детергент».

Колонку ХК 50/30 наповнювали 300 мл афінного адсорбенту Sepharose-PPSB:FVIII/vWF на висоту 16 см і урівноважували 3000 мл 0,025 мМ трис-НCl буфера, рН 7,4, що містив 50 мМ NaCl (БІ-А), зі швидкістю 30 мл×хв<sup>-1</sup>. Всі буфери і колонку перед процесом інактивації вірусів термостабілізували за допомогою термоциркулятора при 8 °С.

Інфікований вірусом (Табл. 1) зразок концентрату комплексу факторів FVIII/vWF з концентрацією  $25 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1}$  наносили в 100 мл буфера, що урівноважує, зі швидкістю  $30 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$ , адсорбент промивали 3000 мл того ж буфера зі швидкістю  $60 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$ .

При проведенні інактивації вірусів автоматично створювався градієнтний буфер інактивації шляхом запрограмованого лінійного збільшення концентрації буфера, що урівноважує, який містив 0,5 % розчинника TNBP і 1,5 % детергента твін 80 (БІ-Б), в БІ-А від 0 до 100 % при швидкості створення і нанесення на колонку  $3000 \text{ мл} \times \text{год}^{-1}$ . БІ-А, БІ-Б і колонку в момент початку нанесення градієнту підігрівали від 8 до  $35^\circ\text{C}$  за 1 годину, тобто градієнт температури зростав зі швидкістю  $27^\circ\text{C} \times \text{год}^{-1}$ . Таким чином, адсорбент зі зв'язаним комплексом факторів FVIII/vWF промивали 3000 мл буфера, який мав градієнти розчинника/детергента (до 0,5 % TNBP і 1,5 % твін 80) і температури (до  $35^\circ\text{C}$ ), що зростали. Адсорбент промивали 6000 мл БІ-Б при  $35^\circ\text{C}$  зі швидкістю  $30 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$  і задавали зворотні градієнти температури і концентрації БІ-Б в БІ-А зі швидкістю  $30 \text{ мл} \times \text{год}^{-1}$ . За досягнення температури  $8^\circ\text{C}$  адсорбент промивали 3000 мл БІ-А зі швидкістю  $30 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$ . Елюцію комплексу факторів FVIII/vWF здійснювали 600 мл  $0,025 \text{ ММ}$  трис- $\text{HCl}$  буфера, рН 4,4, що містив  $250 \text{ ММ}$   $\text{NaCl}$ , зі швидкістю потоку буфера  $30 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$ .

Результати проведення РДП інактивації вірусів в концентраті комплексу факторів FVIII/vWF безпосередньо в процесі хроматографії представлені в Табл. 7.

За рахунок зниження температури на  $10^\circ\text{C}$  у порівнянні з попереднім прикладом (Табл. 6) ФЗК при інактивації зменшився на  $0,8-1,2 \log_{10}$ . З іншого боку, за рахунок подовження часу РДП та відповідно об'єму буферів інактивації майже в 2 рази (4 год та 12 л проти 2,5 год. та 6 л у Прикладі 5) ФЗК відмивки для ВВО і ВБО зріс на  $0,5-1,1$  та  $0,3-0,5 \log_{10}$ , відповідно. Тобто, сумарний рівень ФЗК майже не змінився у порівнянні з умовами Прикладів 3-5 (Табл. 4-6) при практично 100 % виході активності фактора VIII.

В отриманому цільовому білку використаними методами ні розчинник, ні детергент визначені не були.

Табл. 7.

Результати хроматографічної вірус-інактивації концентрату факторів коагуляції VIII і фон Віллебранда (FVIII/vWF) з плазми крові донорів за методом «розчинник (0,5 % TNBP)/детергент (1,5 % твін 80)» за  $35^\circ\text{C}$  на колонці ХК 50/30, наповненій 300 мл афінного адсорбенту Sepharose-PPSB:FVIII/vWF

Швидкість буфера на стадії, ( $\text{Vc} \times \text{хв}^{-1}$ )	Вихід/Активність* цільового білка, (%)	Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії інактивації					
		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Аплікація, $18^\circ\text{C}$	101,51 $\pm$ 4,97  99,69 $\pm$ 7,31*	5,3	5,0	5,0	4,8	1,5	0,7
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії відмивання					
Відмивання, $18^\circ\text{C}$		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,2		3,7	3,8	3,6	3,9	4,9	4,7
Інактивація-(+)град.		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) на стадії елюції цільового білка					
0,17		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
Відмивання, $45^\circ\text{C}$		0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
0,1		Фактор зниження концентрації вірусів ( $\log_{10}$ ) сумарний					
Інактивація-(-)град.		DHBV	BVDV	MuLV	PRV	CPV	BEV
0,17		9,1	9,0	8,7	8,9	6,5	5,5
Відмивання, $18^\circ\text{C}$							
0,1							
Елюція білка							
0,1							

Інактивація-(+)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергенту і температури наростає. Інактивація-(-)град. - стадія інактивації, градієнт розчинника/детергента і температури знижується.

Таким чином, Прикладами 1-6 показано, що інактивація вірусів методом «розчинник/детергент» в білкових концентратах безпосередньо в процесі хроматографічного отримання цільового білка, тобто, білка, який є зв'язаним на хроматографічному адсорбенті, складається з двох різних фаз, а саме 1) руйнування вірусної корпускули за допомогою



розчинників і/або детергентів та 2) вимивання вірусного матеріалу з білкового концентрату разом з супутніми білками, які були зв'язані на адсорбенті менш міцно, ніж цільовий білок.

Як відомо, руйнування розчинником/детергентом вірусів, покритих оболонкою, відбувається більш ефективно (на 3-4  $\log_{10}$ ), ніж вірусів без оболонки, що підтверджено даними Таблиць 2-7. ФЗК ВВО залежить від кількості і співвідношення розчинника і детергента в буфері інактивації, а також суттєво і пропорційно залежить від температури буфера інактивації та його об'єму, що був пропущений через колонку. Що стосується руйнування ВВО, то воно є досить низьким і практично не є залежним від концентрації розчинника і детергента, але має частково збільшення при підвищенні температури буфера інактивації (Табл. 2-7).

Вимивання вірусів з цільового білка, який зв'язаний на адсорбенті, відбувається досить ефективно як для вірусів, вкритих оболонкою, так і для вірусів без оболонки. Таке вимивання залежить як від природи адсорбенту, від'ємно чи позитивно він заряджений, та пропорційно від температури та об'єму буфера, яким відмивають.

Показано, що позитивно заряджені сильні аніонообмінні адсорбенти типу WorkBeads 40Q є найбільш ефективними при інактивації вірусів методом «розчинник/детергент» в білкових концентратах безпосередньо в процесі хроматографічного отримання цільового білка при температурі буфера інактивації 45 °C та часу інактивації не менш, ніж 2 години.

Сумарно згадані етапи інактивації вірусів методом «розчинник/детергент» в білкових концентратах безпосередньо в процесі хроматографічного отримання цільового білка дають показники ФЗК вірусів, які є достатніми для фактично повної інактивації як ВВО, так і ВВО, що інфікують білкові розчини природним шляхом.

Літературні джерела:

1. Sofer G. Virus inactivation in the 1990s - and into the 21<sup>st</sup> Century. Part 2: Red blood cells and platelets // BioPharm. - 2002. - Vol. 15, No. 8. - P. 42-49.

2. Sofer G. Virus inactivation in the 1990s - and into the 21<sup>st</sup> Century. Part 5: Desinfection // BioPharm International. - 2003. - Vol. 15, No. 8. - P. 42-49.

3. Sofer G. Virus inactivation in the 1990s - and into the 21<sup>st</sup> Century. Part 3b: Plasma and plasma products (treatments other than heat or solvent/detergent) // BioPharm International. - 2002. - Vol. 15, No. 10. - P. 42-51.

4. Mohr H. Inactivation of viruses in human plasma methods // Enzymol. - 2000. - Vol. 319. - P. 207-216.

5. Mohr H., Lambrecht B., and Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components immunological investigations // Immunol. Invest. - 1995. - Vol. 24, No. 1, 2. - P. 73-85.

6. US Patent No. 6251644. Method for inactivating non-enveloped viral contaminants with a photosensitizer by increasing viral permeability to the photosensitizer. Int. C1. C12N 13/00, US C1. 435/173,3. Inv. - Sowemimo-Coker; Samuel O. Ass. - Baxter International, Inc. Round Lake, IL, USA. 26,06,2001.

7. Grandadam M., Ingrand D., Huraux J.-M., Avelinec B., Delgadoc O., Vever-Bizet C, Brault D. Photodynamic inactivation of cell-free HIV strains by a red-absorbing chlorin-type photosensitizer // J. Photochem. Photobiol. B. - 1995. - Vol. 1, No. 3. - P. 171-177.

8. Muller-Breitkreutz K., Mohra H., Brivibab K., Sies H. Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen // J. Photochem. Photobiol. B. - 1995. - Vol. 30, No. 1. - P. 63-70.

9. Morel P., Lin L., Wieseahn G., Corash L. Photochemical inactivation of viruses and bacteriophage in plasma and plasma fractions // Blood Cells. - 1992. - Vol. 18, No. 1. - P. 27-41, 41-42.

10. Dichtelmuller H., Rudnick D., Breuer B., Ganshirt KH. Validation of virus inactivation and removal for the manufacturing procedure of two immunoglobulins and a 5 % serum protein solution treated with beta-propiolactone // Biologicals. - 1993. - Vol. 21, No. 3. - P. 259-268.

11. Lawrence S.A. Beta-Propiolactone: viral inactivation in vaccines and plasma products // PDA J. Pharm. Sci. Technol. - 2000. - Vol. 54, No. 3. - P. 209-217.

12. Scheidler A. Inactivation of viruses by beta-propiolactone in human cryo-poor plasma and IgG concentrates // Biologicals. - 1998. - Vol. 26, No. 2. - P. 135-144.

13. Norley S.G., Lower J., Kurth R. Insufficient inactivation of HIV-1 in human cryo poor plasma by beta-propiolactone: results from a highly accurate virus detection method // Biologicals. - 1993. - Vol. 21, No. 3. - P. 251-258.

14. Epstein J.S., Fricke W.A. Current safety of clotting factor concentrates // Arch. Pathol. Lab. Med. - 1990. - Vol. 114, No. 3. - P. 335-340.

15. Korneyeva M., Hottaa J., Lebing W., Rosenthala R.S., Franksc L., Petteway S.R., Jr. Enveloped virus inactivation by caprylate: a robust alternative to solvent/detergent treatment // *Biologicals*. - 2002. - Vol. 30, No. 2. - P. 153-162.
16. US Patent No. 5886154. Chromatographic method for high yield purification and viral  
5 inactivation of antibodies. Int. C1. C07K 16/6, US C1. 530/390,1. Inv. - Lebing W.R.; Aired P.; Lee D.C.; Paul H.-I. Ass. - same. 23,03,1999.
17. Marx G., Mou X., Freed R., Ben-Hur E., Yang C, Horowitz B. Protecting fibrinogen with rutin during UVC irradiation for viral inactivation // *Photochem. Photobiol.* - 1996. - Vol. 63, No. 4. - P. 541-546.
- 10 18. Burnouf T., Goubran H. A., Radosevich M., El-Ekiaby M. Preparation and viral inactivation of cryoprecipitate in blood banks in resource-limited countries // *ISBT Science Series*. - 2007. - Vol. 2, No. 2. - P. 121-128.
19. Hosseini M., Sawyer M., Schore C, Vu J., Trzepla-Nabagie K., Pina C, Smith W., Lagunas-Solar M., Osburn B.I. Inactivating adventitious viruses while preserving biological activity: treating fetal  
15 bovine serum with pulsed ultraviolet light // *BioPharm.* - 2002. - Vol. 15, No 12. - P. 35-40.
20. Schmidt S., Kauling J. Process and laboratory scale UV inactivation of viruses and bacteria using an innovative coiled tube reactor // *Chem. Engineer. Technol.* - 2007. - Vol. 30, No. 7. - P. 945-950.
21. Wiggnton K.R., Menin L., Montoya J.P., Kohn T. Oxidation of virus protein during UV254 and singlet oxygen mediated inactivation // *Environ. Sci. Technol.* - 2010. - Vol. 44, No. 14. -P. 5437-5443.
22. Roberts P., Hope A. Virus inactivation by high intensity broad spectrum puls light // *J. Virat Methods*. - 2003. - Vol. 110, No. 1. - P. 61-65.
23. Cover W.H. Validation of broad spectrum pulsed light as a virus inactivation step. PDA/FDA Viral Clearance Forum, October 2001, Bethesda, MD, USA. P. 43-48.
- 25 24. Hersberger M., Nusbaumer N., Scholer A., Knopfli V., von Eckardstein A. Influence of practicable virus inactivation procedures on tests for frequently measured analytes in plasma // *Clin. Chem.* - 2004. - Vol. 50. - P. 944-946.
25. Omar A., Kempf C, Immelmann A., Rentsch M., Morgenthaler J.-J. Virus inactivation by pepsin treatment at pH 4 of IgG solutions: factors affecting the rate of virus inactivation // *Transfusion*. - 1996.  
30 - Vol. 36, No. 10. - P. 866-872.
26. Tanaka K., Sawatani T., Dias G.A., Shigueoka E.M., Campos T.C.X.B., Nakao H.C., Arashiro F. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography // *Braz. J. Med. Biol. Res.* - 2000. - Vol. 33, No. 1. - P. 27-30.
27. Bumouf T., Griffiths E., Padillac A., Seddik S., Stephanoe M.A., Gutierrez J.-M. Assessment  
35 of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma // *Biologicals*. - 2004. - Vol. 32, No. 3. - P. 115-128.
28. Louie R.E. Galloway C.J., Dumas M.L., Wong M.F., Mitra G. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin // *Biologicals*. - 1994. - Vol. 22, No. 1. P. 13-19.
29. Tsujimoto K., Uozaki M., Ikeda K., Yamazaki H., Utsunomiya H., Ichinose M, Koyama A.H.,  
40 Arakawa T. Solvent-induced virus inactivation by acidic arginine solution // *Int. J. Mol. Med.* - 2010. - Vol. 25, No. 3. - P. 433-437.
30. US Patent No. 4540573. Undenatured virus-free biologically active protein derivatives. Int. C1. A61K 39/00, US C1. 424/85. Inv. - Neurath A.R., Horowitz B. Ass. - New York Blood Center, Inc., New York, N.Y., USA. 09,10,1985.
- 45 31. Horowitz B., Prince A.M., Horowitz M.S., Watklevicz C Viral safety of solvent-detergent treated blood products // *Dev. Biol. Stand.* - 1993. Vol. 81. - P. 147-161.
32. US Patent No. 547954. Ultrapurification process for Factor VIII. Int. C1. A61K 35/16, US C1. 530/383. Inv. - Neslund G.G., Liu S.-L., Griffith M.J. Ass. - Baxter International Inc., Deerfield, Ill., USA. 11,28,1995.
- 50 33. Raut S., Giambattista M., Bevan S.A., Hubbard A.R., Barrowcliffe T.W., Laub R. Modification of factor VIII in therapeutic concentrates after virus inactivation by solvent-detergent and pasteurization // *Thromb. Haemost.* - 1998. - Vol. 80, No. 4. - P. 624-631.
34. Kim I.S., Choi Y.W., Woo H.S., Chang C.E., Lee S. Solvent/detergent inactivation and chromatographic removal of human immunodeficiency virus during the manufacturing of a high purity  
55 antihemophilic factor VIII concentrate // *J. Microbiol.* - 2000. - Vol. 38, No. 3. - P. 187-191.
35. Pamphilon D. Viral inactivation of fresh frozen plasma // *Br. J. Haematol.* - 2000. - Vol. 109, No. 4. P. 680-693.
36. Roberts P.L., Hart H. Comparison of the inactivation of canine and bovine parvovirus by freeze-drying and dry-heat treatment in two high purity factor VIII concentrates // *Biologicals*. - 2000. -  
60 Vol. 28, No. 3. - P. 185-188.

37. Burnouf T., Goubran H. A., Radosevich M., Sayed M.A., Gorgy G., El-Ekiaby M. A minipool process for solvent-detergent treatment of cryoprecipitate at blood centers using a disposable bag system // *Vox Sanguinis*. - 2006. - Vol. 91, No. 1. - P. 56-62.
38. Stadler M., Graber G., Kannicht C., Biesert L., Radomski K.U. et al. Characterisation of a novel high-purity, double virus inactivated von Willebrand factor and factor VIII concentrate (Wilate) // *Biologicals*. - 2006. - Vol. 34, No. 4. - P. 281-288.
39. Roberts P.L. Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII // *Biologicals*. - 2008. - Vol. 36, No. 5. - P. 330-335.
40. Roberts P.L., Lloyd D., Marshall P.J. Virus inactivation in a factor VIII/vWF concentrate using a solvent/detergent procedure based on polysorbate 20 // *Biologicals*. - 2009. - Vol. 37, No. 1. - P. 26-31.
41. Dichtelmuller H.O., Beisert L., Fabbrizzi F., Gajardo R., Groner A. et al. Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies // *Transfusion*. - 2009. - Vol. 49, No. 9. - P. 1931-1943.
42. Octapharma - Web resource for von Willebrand disease healthcare professionals and patients site. «Wilate is a double virus inactivated vWF/FVIII complex» in Double virus inactivation // [http://www.wilateusa.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=19&Itemid=49](http://www.wilateusa.com/index.php?option=com_content&view=article&id=19&Itemid=49). 2011. 4 P.
43. Johnston A., Macgregor A., Borovec S., Hattark M., Stuckly K. et al. Inactivation and clearance of viruses during the manufacture of high purity factor IX // *Biologicals*. - 2000. - Vol. 28, No. 3. - P. 129-136.
44. Roberts P.L., Dunkerley C. Effect of manufacturing process parameters on virus inactivation by solvent-detergent treatment in a high-purity factor IX concentrate // *Vox Sanguinis*. - 2003. - Vol. 84, No. 3. - P. 170-175.
45. Grifols Biologicals Inc. Factor IX complex ROFILNINE SD solvent detergent treated // Los Angeles, CA, USA. <http://pathology.columbia.edu/education/residents/current/cp/TM/components/profilnine.pdf>. 2004. 2 P.
46. Shin J.S., Choi Y.W., Sung H.M., Ryu Y.-W., Kim I.S. Enhanced virus safety of a solvent/detergent-treated antihemophilic factor IX concentrate by dry-heat treatment // *Biotech. Bioproc. Engineer.* - 2006. - Vol. 11. - P. 19-25.
47. Kim I.S., Bae J.E., Sung H.M., Kang Y., Choi Y.W. Removal and inactivation of viruses during the manufacture of a high-purity antihemophilic factor IX from human plasma // *Biotech. Bioproc. Engineer.* - 2009. - Vol. 14, No. 6. - P. 716-724.
48. Pourmokhtar M., Dinarvand R., Mousavi Hosseini K., Rezvan H., Jalili M. A. Solvent-detergent treatment of IgM-enriched immunoglobulin // *Dam*. - 2003. - Vol. 11, No. 2. - P. 47-51.
49. Aghaie A., Pourfatollah A.A., Bathaie S.Z., Moazzeni S.M., Khorsand Mohammad Pour H., Banazadeh S. Preparation, purification and virus inactivation of intravenous immunoglobulin from human plasma // *Hum Antibodies*. - 2010. - Vol. 19, No. 1. - P. 1-6.
50. US Patent No. 7655233 B2. Optimal placement of a robust solvent/detergent process post viral ultrafiltration of an immune gamma globulin. Int. C1. A61K 39/00, US C1. 424/176,1. Inv. - Van Holten R.W., Autenrieth S.M. Ass. - Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, USA. 02,02,2010.
51. Korneyeva M., Hottaa J., Lebing W., Rosenthal R.S., Franks L., Petteway S.R., Jr. Enveloped virus inactivation by caprylate: a robust alternative to solvent-detergent treatment in plasma derived intermediates // *Biologicals*. - 2002. - Vol. 30, No. 2. - P. 153-162.
52. Aghaie A., Pourfatollah A.A., Bathaie S.Z., Moazzeni S.M., Khorsand Mohammad Pour H., Sharifi Z. Inactivation of virus in intravenous immunoglobulin G using solvent/detergent treatment and pasteurization // *Hum Antibodies*. - 2008. - Vol. 17, No. 3-4. - P. 79-84.
53. Nesterova N.V., Kurkina O.V., Samoilenko V.A., Skrynnyk M.M. Physico-chemical and biological properties of solvent/detergent treated immunoglobulin G preparations // *Мікробіол. журн.* - 2009. - Т. 71, № 6. - с. 35-42.
54. US Patent Application Publication. Pub. No.: US 2010/0233149 A1. Methods for preparing factor X, activated factor X, inactivated factor X and inactivated factor Xa, and pharmaceutical compositions comprising same. Int. C1. A61K 38/48 (C12N 9/48, A61P 7/02), US C1. 424/94,64. Inv. - Lloyd J., Feldman P. Ass. - Lloyd J., Feldman P., Hertforshire, Great Britain. 09,16,2010.
55. WO Patent, Int. Pub. No. WO 2011/032195 A1. Medicinal products for the treatment of blood coagulation disorders containing thrombin-free factor Xia concentrate. Int. C1. A61K 38/36, A61P 7/04. Inv. - Eibl J. Ass. - Bioproducts & Bio-engineering AG, Wien, Austria. 03,24,2011.

56. Chao S.-F., Gall M., Hotta J.-A., Lang J., Lee D.C., Roth N.J. Effective and robust enveloped virus inactivation by a non-traditional solvent/detergent treatment step // *US Respiratory Disease*. - 2010. - Vol. 6. - P. 40-46.
57. Darling A.J. Validation of the purification process for viral clearance evaluation in:  
5 *Biopharmaceutical process validation* / ed.: G. Sofer, D.W. Zabriskie, Marcel Dekker Publ., NY, USA. 2000. 382 P.
58. Viral clearance by chromatography: predicting optimal conditions and media lifespan in:  
*Downstream*, No. 31, 2005. Ed. GE Healthcare AB, Sweden. P. 10-11.
59. Curtis S. Generic/matrix evaluation of M-MuV and SV40 clearance by anion exchange  
10 chromatography in flow-through mode. Oral presentation at IBC's 8<sup>th</sup> International conference on process validation for biological. March 7-8, 2005. San Diego, CA, USA.
60. Choi Y.W., Kim I.S. Viral clearance during the manufacturing of urokinase from human urine // *Biotechnol. Bioproc. Engin.* - 2008. - Vol. 13, No. 1. P. 25-32.
61. Adcock W.L., MacGregor A., Davies J.R., Hattarki M., Anderson D.A., Goss N.H.  
15 *Chromatographic removal and heat inactivation of hepatitis A during manufacture of human albumin* // *Biotechnol. Appl Biochem.* - 1998. - Vol. 28, No. 1. - P. 85-94.
62. Strauss D.M., Lute S., Tebaykina Z., Frey D.D. et al. Understanding the mechanism of virus removal by Q sepharose fast flow chromatography during the purification of CHO-cell derived  
20 *biotherapeutics* // *Biotechnol. Bioeng.* - 2009. - Vol. 104, No. 2. - P. 371-380.
63. Groner A. Virus removal by chromatography used for production of plasma-derived products // *PDA Virus & TSE Safety Forum*. June 27-30, 2011, Barcelona, Spain.
64. Privalov P.L. Thermodynamic problems of protein structure // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* - 1989. - Vol. 18. - P. 47-69.
65. Gorinstein S., Caspi A., Rosen A., Goshev I. et al. Structure characterization of human serum  
25 *proteins in solution and dry state* // *J. Peptide Res.* - 2002. Vol. 59. - P. 71-78.
66. Kleppe R., Haavik J. Different stabilities and denaturation pathways for structurally related aromatic amino acid hydroxylases // *FEBS Lett.* - 2004. - Vol. 565, No. 1-3. - P. 155-159.
67. Caldarelli G., De Los Rios P. Cold and warm denaturation of proteins // *J. Biol. Physics.* - 2001. - Vol. 27, No. 2-3. - P. 229-241.
68. Olivares-Quiroza L., Garcia-Colin L.S. Protein's native state stability in a chemically induced  
30 *denaturation mechanism* // *J. Theor. Biol.* - 2007. - Vol. 246, No. 2. - P. 214-224.
69. Chang B.H., Bae Y.C. Salting-out in the aqueous single-protein solution: the effect of shape factor // *Biophys. Chem.* - 2003. - Vol. 104, No. 2. - P. 523-533.
70. Pace C.N., Fu H., Fryar K.L., Landua J. et al. Contribution of hydrophobic interactions to  
35 *protein stability* // *J. Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 408, No. 3. - P. 514-528.
71. Mchaourab H.S., Godar J.A., Stewart P.L. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins // *Biochemistry.* - 2009. - Vol. 48, No. 18. - P. 3828-3837.
72. Quan S., Koldewey P., Tapley T., Kirsch N. et al. Genetic selection designed to stabilize  
40 *proteins uncovers a chaperone called Spy* // *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 18, No. 3. - P. 262-269.
73. Hongo-Hirasaki T., Yamagushi K., Yanagida K., Hayashida H., Ide S. Effects of varying virus-spiking conditions on a virus-removal filter Planova 20N in a virus validation study of antibody  
45 *solutions* // *Biotechnol. Prog.* - 2011. - Vol. 27, No. 1. - P. 162-169.
74. Francis P., Haynes C.A. Scale-up of controlled-shear affinity filtration using computational fluid dynamics // *Biotechnol. J.* - 2009. Vol. 4, No. 5. - P. 665-673.
75. Lutters B.C.H., Meijers J.C.M., Derksen R.H.W.M., Arnout J., De Groot P.G. Dimers of p<sub>2</sub>-glycoprotein I mimic the in vitro effects of P2-glycoprotein I-anti-pVglycoprotein I antibody complexes // *J. Biol. Chem.* - 2001. Vol. 276, No. 5. - P. 3060-3067.
76. Munoz C.C., Campbell W., Constantinescu I., Gyongyossy-Issa M.I. Rational design of  
50 *antithrombotic peptides to target the von Willebrand factor (vWf)-GPIIb integrin interaction* // *J. Mol. Model* - 2008. - Vol. 14, No. 12. - P. 1191-202.
77. *Chromatographic production of human plasma proteins factor VIII, albumin and IgG* / General Electric Company - GE Healthcare Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden. Ed. Elanders  
55 *Tofters, Sweden, 2005. P. 1-26.*
78. Волков Г.Л. Технологія одержання імуноглобулінів. I. Технологічні аспекти очищення // *Укр. біохім. ж.* - 2005. - Т. 78, № 3. - с. 88-98.
79. Волков Г.Л., Гаврилюк С.П., Скалка В.В., Гаврилюк Е.С. Метод АРС в пілотном  
60 *производстве церулоплазміну як Приклад преимуществ современной промышленной хроматографии* // *Биофармацевтический ж.* - 2009. - Т. 1, № 4. - с. 35-41.

80. Волков Г.Л., Краснобрижая Е. Н., Гаврилюк С.П., Гаврилюк Е.С. Промышленная хроматография белков с близкими физико-химическими свойствами. // Биофармацевтический ж. - 2009. - Т. 1, № 4. - с. 20-34.

81. Mongolia Patent No. 3168. Manufacturing of activating plasminogen hydrolysis streptokinase fragment with molecular weight of 7 kDa. Int. C1. A61K 31/711H. Inv. - Volkov G.L., Gavrylyuk S.P., Savchuk O.M. Ass. - Wisdoms Assets Holdings LLC, Mongolia, Ulaanbaatar. 15.07.2008, Bul. № 23.

82. Скалка В.В., Волков Г.Л., Краснобрижая Е.Н., Гаврилюк С.П., Жукова А.И., Нарантуяа Нандинцэцэг, Чимгээ Туваансурэн, Одончимэг Ганболд, Болор Буянба-драх, Сумия Бямбасурэн, Понсандулам Дашням, Дармостук М.С., Гаврилюк Е.С. Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Agkistrodon blomhoffi* // Биофармацевтический ж. - 2010. - Т. 2, № 1. - с. 32-39.

83. Bradford M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P. 248-254.

84. Stoscheck C.M. Quantitation of protein // Methods Enzymol. - 1990. - Vol. 182. - P. 50-69.

Не дивлячись на те, що даний винахід описаний із зазначенням найкращих варіантів реалізації винаходу, зрозуміло, що ними він не обмежується. Для фахівця в даній галузі техніки відомо, що різні модифікації можуть бути описані, тому обсяг прав за даним винаходом обмежується тільки прикладеною формулою винаходу.

Всі публікації, представлені в описі винаходу у вигляді посилань, включені в даний опис у всій їх повноті.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб хроматографічної вірус-інактивації розчину цільового білка, комплексу білків або пептиду, у якому
  - піддають кондиціюванню розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду;
  - здійснюють аплікацію кондиційованого розчину цільового білка, комплексу білків або пептиду на хроматографічну колонку з адсорбентом зі зв'язуванням білка, комплексу білків або пептиду;
  - промивають адсорбент буфером аплікації;
  - промивають адсорбент буфером інактивації вірусів, який містить розчинник і детергент у буфері аплікації;
  - відмивають адсорбент від розчинника/детергента та продуктів розпаду вірусів буфером аплікації; та
  - елюють розчин цільового білка, комплексу білків або пептиду з адсорбенту;
- де зазначений адсорбент являє собою іонообмінний, афінний, обернено-фазовий, або адсорбент гідрофобної взаємодії.
2. Спосіб за п. 1, у якому адсорбент являє собою афінний адсорбент, що має динамічну ємність зв'язування не менше  $15 \text{ мг білка} \times \text{мл}^{-1}$  адсорбенту, при швидкості протікання буфера від 10 до  $50 \text{ мл} \times \text{хв}^{-1}$ .
3. Спосіб за п. 1, у якому адсорбент являє собою іонообмінний сорбент, вибраний з аніоніту або катіоніту, з динамічною ємністю зв'язування білка від  $50 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1}$  адсорбенту, при швидкості протікання буфера від 50 до  $500 \text{ см} \times \text{год}^{-1}$ .
4. Спосіб за п. 1, у якому адсорбент являє собою обернено-фазовий адсорбент, якщо цільовий білок, комплекс білків або пептид є низькомолекулярним ( $MW=1-30 \text{ кДа}$ ), та адсорбент являє собою іонообмінний, афінний або адсорбент гідрофобної взаємодії, якщо цільовий білок, комплекс білків або пептид має середню або високу молекулярну масу ( $MW=20- \geq 4000 \text{ кДа}$ ).
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 2 або 4, у якому афінний адсорбент являє собою хімічно нейтральну, стійку до тиску в 5-10 бар полімерну матрицю з пришитим поліпептидним фрагментом або хімічною сполукою, яка специфічно взаємодіє з цільовим білком, комплексом білків або пептидом.
6. Спосіб за п. 5, у якому пришитий поліпептидний фрагмент є синтетичного, рекомбінантного або природного походження.
7. Спосіб за п. 5 або п. 6, у якому молекулярна маса пришитого поліпептидного фрагмента становить від 1 до  $500 \text{ кДа}$ .
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 3 або 4, у якому адсорбент являє собою аніонообмінний адсорбент у випадку видалення денатурованих нуклеїнових кислот вірусів або їх фрагментів.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1 - 8, у якому інактивуючий буфер містить:
  - розчинник, вибраний з групи, що включає: ди- і триалкілфосфати, які містять алкільний ланцюг довжиною 1-10 вуглеводних атомів, такі як ди-*n*-пропілфосфат (DNPP) і три-*n*-бутилфосфат (TNBP); прості ефіри, такі як етиловий і пропіловий; складні ефіри, такі як амілацетат;

алкільовані та гідроксильовані сполуки, такі як бутиловий ефір гідроксиланізолу (ВНА) і бутиловий ефір гідрокситолуолу (ВНТ); та їх суміші, необов'язково з додатковими органічними сполуками в концентрації 0,002-3,0 %;

детергент, вибраний з групи, що включає: оксіетильовані алкілфеноли, такі як тритони К-60, Х-45, Х-100, W-30; холат і деоксихолат натрію; сульфобетаїни, такі як додецилсульфонат натрію; додецилбензосульфонат натрію (Nacconol NR), N-додециламіноетансульфонова кислота, 2-сульфоетилолеат натрію (Igeron A); поліоксіетильовані похідні складних ефірів, такі як полісорбат 20 або твін 20, полісорбат 80 або твін 80; ефіри поліоксіетильованих жирних спиртів, такі як Brij 35; конденсат етиленоксиду і пропіленоксиду (Pluronic copolymers); оксіетильовані аміни, такі як Ethomeen; нонідет Р-40 (Nonidet Р-40) і люброкс РХ (Lubrox РХ); неіонні детергенти, такі як каприлат в концентрації 0,005-5,0 %.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, у якому промивання адсорбенту буфером інактивації вірусів здійснюють в чотири стадії, де на першій стадії інактивації вірусів промивання здійснюють градієнтом буфера інактивації, концентрація якого у буфері аплікації зростає від 0 % до 100 %, об'ємом 5-10 Vc зі швидкістю 0,1-0,2 Vc×хв<sup>-1</sup>, на другій стадії - 10-20 Vc буфером інактивації зі швидкістю 0,1-0,2 Vc×хв<sup>-1</sup>, на третій стадії градієнтом буфера інактивації, концентрація якого у буфері аплікації знижується від 100 % до 0 %, об'ємом 5-10 Vc зі швидкістю 0,1-0,2 Vc×хв<sup>-1</sup>, на четвертій стадії - буфером аплікації об'ємом 10-20 Vc зі швидкістю 0,1-0,2 Vc×хв<sup>-1</sup>.

11. Спосіб за п. 10, у якому промивання адсорбенту на першій стадії інактивації вірусів здійснюють буфером інактивації з температурою, що зростає від 4-18 °С до 30-45 °С, зі швидкістю 0,25-0,50 °С×хв<sup>-1</sup>, на другій стадії - з температурою 30-45 °С, на третій стадії - з температурою, що знижується від 30-45 °С до 4-18 °С, зі швидкістю 0,25-0,50 °С×хв<sup>-1</sup>, на четвертій стадії - буфером аплікації з температурою 4-18 °С.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, у якому хроматографічна колонка оснащена пристроєм для термостабілізації.

13. Спосіб за п. 12, у якому температуру хроматографічної колонки відтворюють відповідно до температури процесу інактивації вірусів і наступного відмивання адсорбенту.

14. Спосіб за п. 1, у якому адсорбент являє собою аніонообмінний адсорбент з максимальним зворотним тиском не менше 3 бар, динамічною ємністю зв'язування БСА≥150 мг×мл<sup>-1</sup> при швидкості потоку буфера через колонку від 50 до 500 см×год.<sup>-1</sup>, типу WorkBeads 40 Q, температура інактивуючого буфера становить від 40 до 45 °С, при швидкості потоку через колонку 0,1-0,2 Vc×хв<sup>-1</sup> та тривалості інактивації не менше 2,0 год.

Динамічна ємність адсорбентів, визначена по зв'язуванню бичачого сироваткового альбуміну (БСА), за підвищення швидкості потоку буфера:

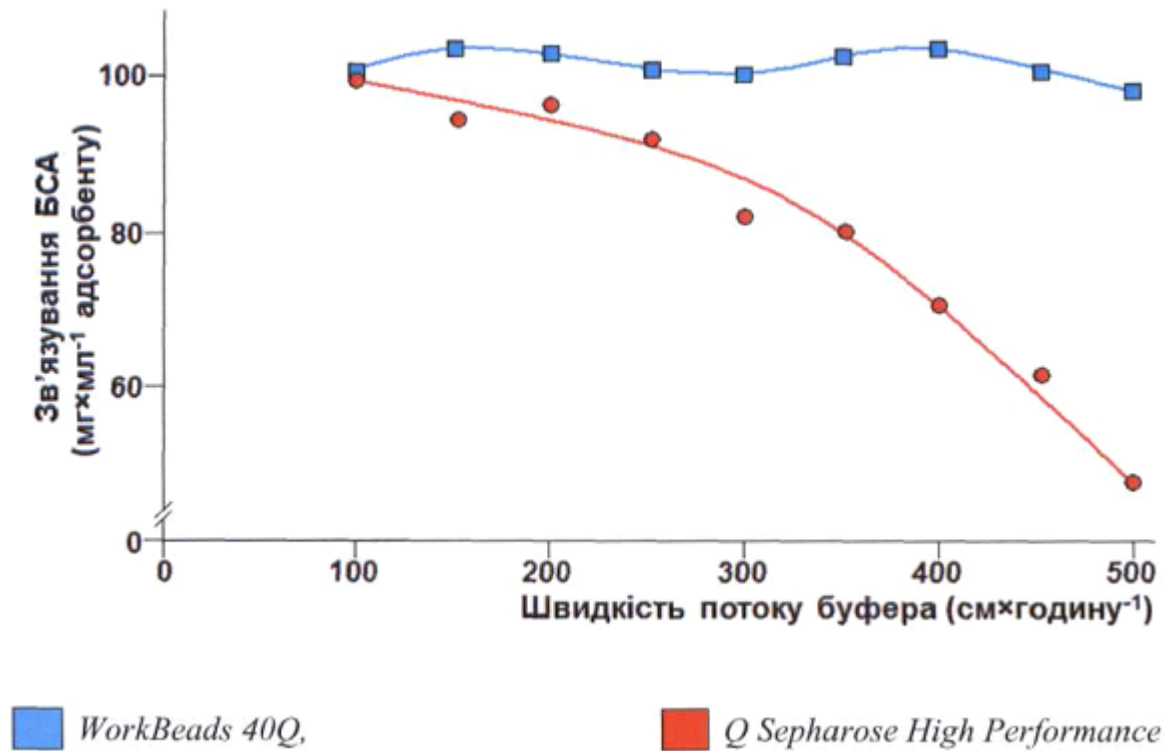
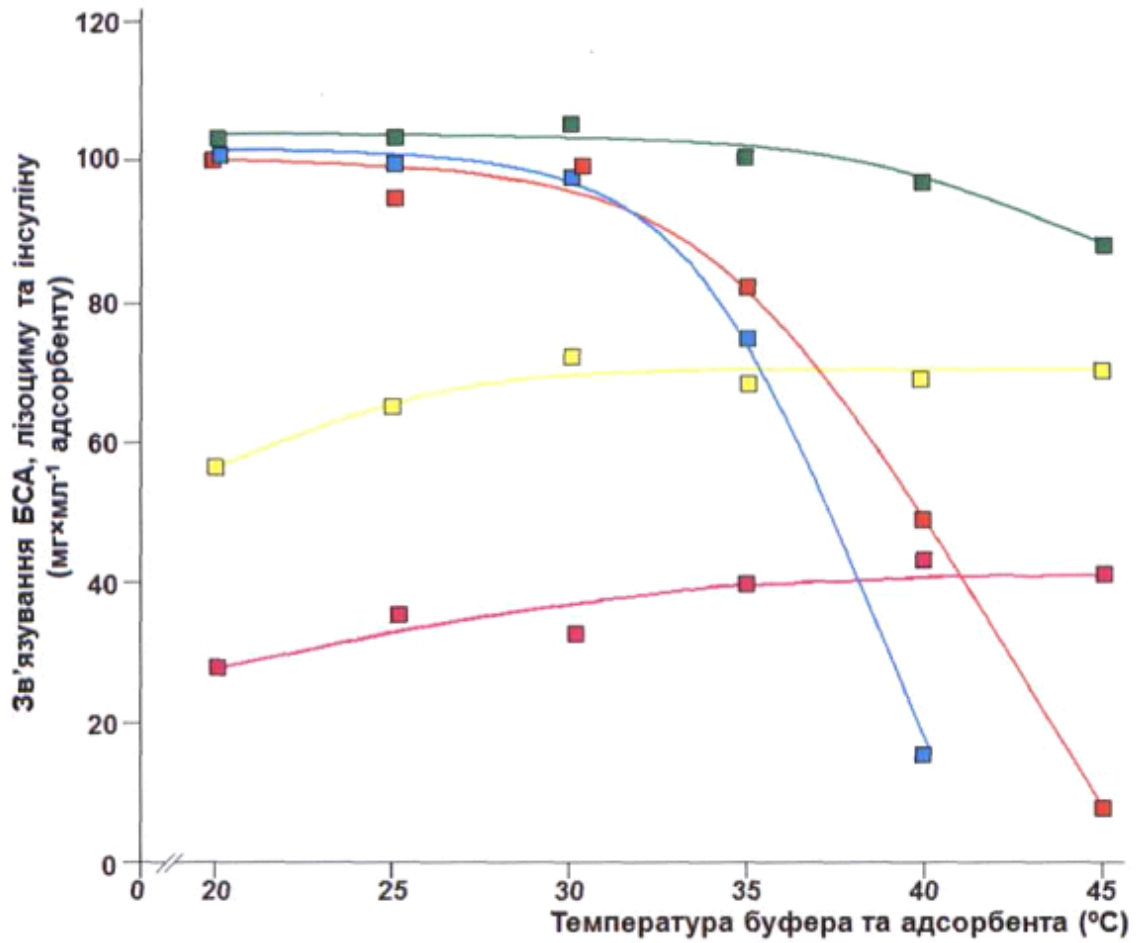


Fig. 1

Т-динамічна ємність адсорбентів, визначена по зв'язуванню альбуміну, лізоциму\* або інсуліну\*\*, за підвищення температури буфера та адсорбенту:



■ \*\*SOURCE 15RPC,

■ Q Sepharose High Performance,

■ \*Phenyl Sepharose High Performance,

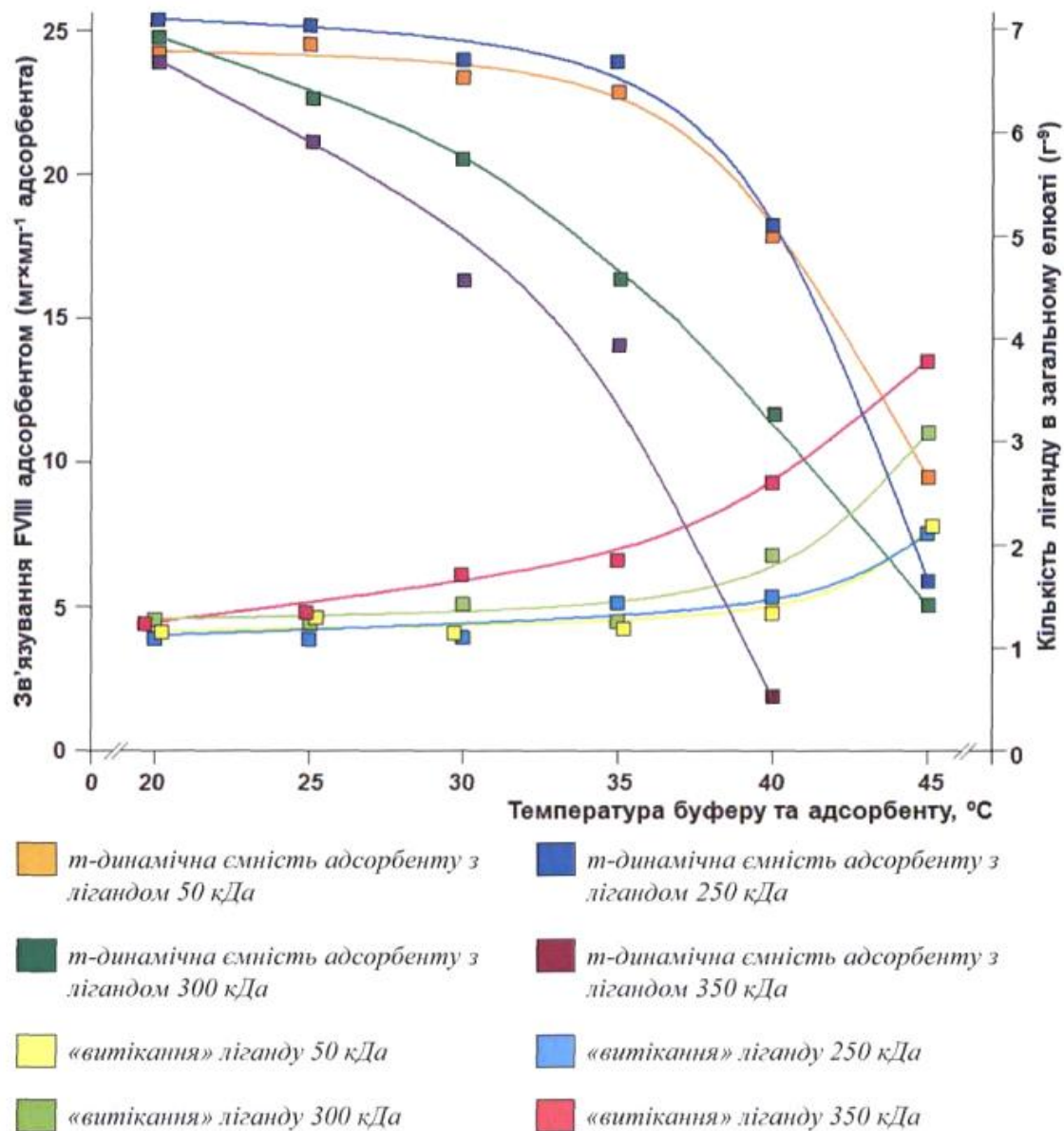
■ WorkBeads 40Q,

■ \*SP Sepharose High Performance.

Фіг. 2

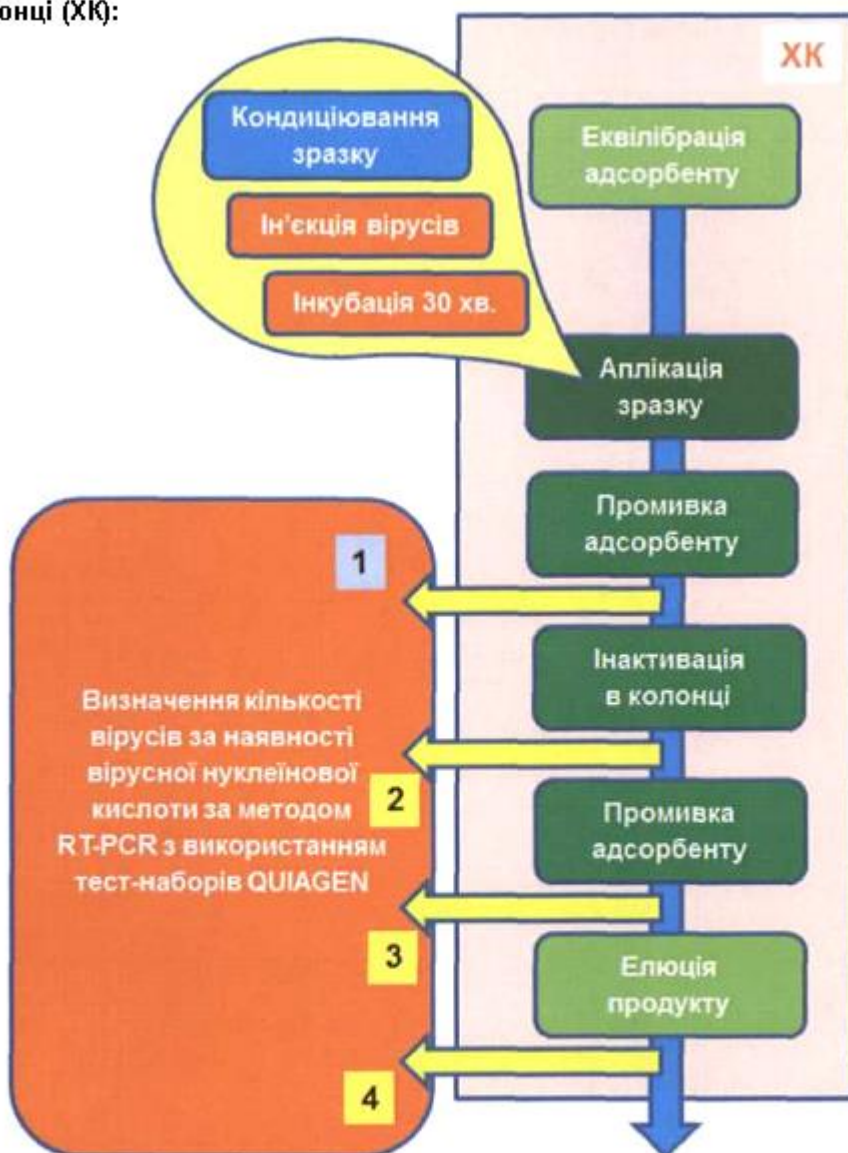


Т-динамічна ємність афінного адсорбенту Sep/zarase-PPSB:FVIII/vWF, визначена за активністю FVIII<sub>Ag</sub>, та інтенсивність «витікання» ліганду з адсорбенту за підвищення температури буферу та адсорбенту:



Фіг. 3

Схема визначення ефективності інактивації вірусів безпосередньо в процесі хроматографічного очищення цільового білка в хроматографічній колонці (ХК):



Фіг. 4

- 1 - стадія нанесення зразка, де визначається загальна кількість вірусу, яка інфікує цільовий білок;
- 2 - стадія інактивації, визначення кількості вірусу, що видаляється за допомогою застосування «розчинника/детергенту»;
- 3 - стадія промивки;
- 4 - стадія елюції цільового білка, на стадіях 3 і 4 визначається сумарна кількість вірусу, який був вимитий з колонки буферами.